

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

TMHMA  $\Phi APMAKEYTIKH\Sigma$ 

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪ́ΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: «Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων»

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΝΝΑΒΗ (*Cannabis sativa* L.) ΚΑΙ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ



ΑΝΔΡΙΑΝΝΑ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Φαρμακοποιός

Επιβλέπων Καθηγητής: Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Αθήνα 2020

# Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την Καθηγήτρια κα Σοφία Μητάκου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρία Χαλαμπαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να αξιολογήσουν την εργασία μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υπεύθυνο της παρούσας εργασίας, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, που με δέχτηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, για τη βοήθεια και το ενδιαφέρον του στην περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τις ευκαιρίες επιστημονικής κατάρτισης που μου παρείχε.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κα Σοφία Μητάκου για τη βοήθεια στην επιλογή του θέματος, για το συνεχές ενδιαφέρον καθώς και για τις συμβουλές της στη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρία Χαλαμπαλάκη, για το συνεχές ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.

Θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Μεταδιδάκτορα Λευτέρη Πετράκη, για το αμέριστο ενδιαφέρον, τις υποδείξεις και τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε με προθυμία κατά την εκπόνηση και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον Υποψήφιο Διδάκτορα Πέτρο Τζίμα, για τη συνεχή βοήθειά του, την υπομονή, τις συμβουλές και την καθοδήγησή του στο εργαστήριο αλλά και στη συγγραφή της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Σπύρο Ταμβακόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του στο εργαστήριο, την άριστη συνεργασία μας, την υπομονή και το ευχάριστο κλίμα.

Ευχαριστώ την υποψήφια Διδάκτορα Μόνικα Αντωνιάδη για την άριστη συνεργασία και τη βοήθειά της στη διεκπεραίωση των βιολογικών δοκιμών. Επιπλέον ευχαριστώ τον Μεταδιδάκτορα Αποστόλη Αγγελή για τη συνεισφορά του στην εκχύλιση και χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση, καθώς και την Μεταδιδάκτορα Θεοδώρα Νίκου για τη λήψη των φασμάτων μάζας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Παναγιώτη Μαύρο για το υλικό που μου παρείχε όσον αφορά το αποκαρβοξυλιωμένο κλάσμα των όξινων κανναβινοειδών, ύστερα από χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση.

Ευχαριστώ όλους τους Διδακτορικούς και Μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου, για τη συνεργασία, τη βοήθεια και το ευχάριστο περιβάλλον που μοιραστήκαμε στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την υπομονή, την αδιάκοπη υποστήριξη και την ενθάρρυνσή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και σε κάθε μου βήμα έως τώρα.

## Περίληψη

Το **Cannabis sativa L.** (Cannabaceae) αποτελεί ετήσιο φυτό, το οποίο καλλιεργείται από την αρχαιότητα ως πηγή ινών, σπορέλαιου, τροφής, καθώς και για θρησκευτικούς, πνευματικούς, ευφορικούς και ιατρικούς σκοπούς. Η συγκεκριμένη εργασία έχει ως στόχο την απομόνωση γνωστών από την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία δευτερευόντων κανναβινοειδών αλλά και κανναβινοειδών τα οποία πιθανά να χαρακτηριστούν ως νέα φυσικά προϊόντα, από υπερκρίσιμο εκχύλισμα (SFE) βιομηχανικής κάνναβης (*C. sativa*). Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος της εργασίας, περιλαμβάνει δείγμα βιομηχανικής (κλωστικής) κάνναβης, ποικιλίας 'Futura 75' από την περιοχή των Φαρσάλων. Επιπλέον, στόχο αποτέλεσε η βιολογική αξιολόγηση του υπερκρίσιμου και αιθανολικού (EtOH) εκχυλίσματος, καθώς και των όξινων και ουδέτερων κλασμάτων αυτών. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν βιολογικές δοκιμές αναστολής των ενζύμων τυροσινάση και ελαστάση, ενώ επίσης έγινε προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου, των ολικών φλαβονοειδών και αναγωγής της ελεύθερης ρίζας DPPH\*.

Για την εκχύλιση του φυτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπέρηχους (Ultrasound assisted extraction - UAE), με διαλύτη αιθανόλη καθώς και εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical fluid extraction - SFE), με διαλύτη υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Για την κλασμάτωση του υπερκρίσιμου εκχυλίσματος (SFE) χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές όπως εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση (Centrifugal partition extraction - CPE) και χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (Centrifugal partition chromatography - CPC). Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν διαχωρίστηκαν περαιτέρω με κλασσικές τεχνικές όπως χρωματογραφία στήλης (Column chromatography - CC) και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Preparative thin layer chromatography - PrepTLC), αλλά και πιο εξελιγμένες τεχνικές όπως η παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Preparative high pressure liquid chromatography - HPLC). Στον έλεγχο της δομής των εν λόγω μορίων συνέβαλε η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance - NMR) μίας (<sup>1</sup>H-NMR) και δύο διαστάσεων (Two-dimensional NMR - 2D NMR). Σε μία πρώτη εκτίμηση των δεδομένων συνέβαλαν και τα δεδομένα από τις αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (Liquid chromatography - High resolution mass spectrometry - LC-HRMS), καθώς και αέριας χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματομετρία μαζών (Gas chromatography - mass spectrometry - GC-MS).

Από την πειραματική πορεία τελικά απομονώθηκαν δέκα δευτερεύοντα κανναβινοειδή: η κανναβιδιβαρίνη (CBDV), το (R)-κανναβιελσοϊκό οξύ-A ((R)-CBEA-A), το (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-B ((S)-CBEA-B), η κανναβιγερόλη (CBG), η (S)-κανναβιελσοΐνη (CBE), η κανναβικυκλόλη

(CBL), το κανναβιχρωμένιο (CBC), η κανναβικιτράνη (CBCT), η  $\Delta^8$ τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^8$ -THC) και δύο κύρια κανναβινοειδή, η κανναβιδιόλη (CBD) και η  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC). Επιπέον απομονώθηκε ένα σεσκιτερπένιο, το οξείδιο του καρυοφυλλενίου, και ένα διτερπένιο, η φυτόλη. Τέλος, απομονώθηκαν δύο ανάλογα της κανναβιδιόλης και ένα ανάλογο κανναβιγερόλης, καθώς και τρείς άγνωστες ενώσεις οι οποίες χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Όσον αφορά τις βιολογικές δοκιμές το αιθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό αναστολής της σταθερής ρίζας DPPH<sup>•</sup> (40.87%) και ακολούθησε το CBD (39.20%) σε όμοια συγκέντρωση. Σχετικά με το ολικό φορτίο φλαβονοειδών, το όξινο κλάσμα SFE παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση (90.60 mg/g) και ακολούθησε το αιθανολικό εκχύλισμα (34.30 mg/mL). Το τελευταίο παρουσίασε, επίσης, την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικού φαινολικού φορτίου (24.19 mg/mL). Όσον αφορά τις ενζυματικές δοκιμές, το όξινο κλάσμα SFE παρουσίασε τη σημαντικότερη αναστολή των ενζύμων τυροσινάση (16.44%) και ελαστάση (14.67%).

## Abstract

**Cannabis sativa L.** (Cannabaceae) is an annual plant that has been cultivated since ancient times and used as a source of industrial fiber, seed oil, food, as well as for religious, spiritual, recreational and medicinal purposes.

The main topic of this research study was the phytochemical investigation, isolation and structure elucidation of minor cannabinoids that are contained in industrial hemp (*C. sativa*) extracts, obtained by Supercritical fluid extraction (**SFE**). The industrial hemp variety used was 'Futura 75'. In addition, bioassays such as **DPPH**, **TFC**, **TPC** and **enzymatic assays of tyrosinase and elastase** were performed for the EtOH and SFE extracts of the same plant material along with their neutral and acidic fractions.

In the first place, the extraction of plant material took place. Subsequently, the fractionation of the extracts was performed using **CPE** and **CPC**, whereby two fractions were finally obtained, one of the acidic cannabinoids and one of the neutral cannabinoids and other compounds. Furthermore, fractionation of the selected extracts with chromatographic techniques, such as **CC** and **preparative TLC**, led to the isolation of secondary metabolites. In this context, preparative high pressure liquid chromatography (prep-HPLC) was also examined for the isolation procedure. For the structure identification of the purified isolated compounds, spectrometric (**GC-MS**) and spectroscopic (<sup>1</sup>**H-NMR** and **2D-NMR**) techniques were employed.

The phytochemical study of the industrial hemp extract, led to the isolation and identification of two major cannabinoids, cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and ten minor cannabinoids: cannabidivarin, (R)-cannabielsoic acid-A, (S)cannabielsoic acid-A, (S)-cannabielsoic acid-B, cannabigerol, (S)-cannabielsoin, cannabicyclol, cannabichromene, cannabicitran and  $\Delta^{8}$ -tetrahydrocannabinol. Also, phytol and caryophyllene oxide were isolated in addition to two isomers of cannabidiol and cannabigerol, respectively. Finally, 3 unknown compounds were isolated, where further investigation is needed. Regarding the results of the bioassays, the EtOH extract showed 40.87% inhibition of DPPH at a concentration of 500 μg/mL, the acidic SFE fraction showed 35.28% and CBD showed 39.20% inhibition at the same concentration. Concerning the acidic SFE fraction, its total flavonoid content was estimated to be 90.60 mg/g, followed by the EtOH extract with 34.30 mg/mL. The latter also showed the highest total phenolic content at 24.19 mg/g. With reference to the enzymatic assays, SFE extract showed 16.44% inhibition of tyrosinase at a concentration of 300 µg/mL and 14.67% inhibition of elastase at the same concentration.

# Πίνακας Περιεχομένων

Περ	ίληψη		4
Abs	tract		6
Πίνακ	ας Περιε	χομένων	7
Α. Γεν	ικό Μέρ	ος	10
КЕФА	ΛAIO 10		10
Το φυ	τό Canno	abis sativa L	10
1.1	1 Εισαγωγή		
1.2	1.2 Ιστορική αναδρομή		
1.3	1.3 Βοτανική περιγραφή		
1.4 Τα κανναβινοειδή		20	
	1.4.1	Βιοσύνθεση κανναβινοειδών	21
	1.4.2	Χημικοί τύποι κανναβινοειδών	22
	1.4.3	Φαρμακολογική δράση κανναβινοειδών	26
КЕФА	ΛΑΙΟ 2ο		36
Τεχνικ	κές εκχύλ	ισης	36
2.1. Γενικά στοιχεία			36
2.2.	2.2. Τεχνικές εκχύλισης στο φυτό της κάνναβης3		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο			42
Αναλυτικές τεχνικές			42
3.1. Γενικά στοιχεία			42
3.2 Χρωματονραφικές τεχνικές στο φυτό της κάνναβης			42
	3.2.1	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	43
	3.2.2	Υγρή χρωματογραφία	44
	3.2.3	Αέρια χρωματογραφία	45
	3.2.4	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	46
КЕФА	۸AIO 4°.		48
Παρασκευαστικές τεχνικές4			
nupu	υκευαυι		

4.2 Παρασκευαστικές χρωματογραφικές τεχνικές στο φυτό της κάνναβr				
	4.2.1	Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση		
	4.2.2	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας53		
	4.2.3	Παρασκευαστική χρωματογραφία στήλης54		
	4.2.4	Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης55		
.3	Βιολο	γικές δοκιμές55		
	4.3.1	Δοκιμή δέσμευσης σταθερής ρίζας DPPH*56		
	4.3.2 conten	Προσδιορισμός ολικού φορτίου φλαβονοειδών (Total flavonoid t – TFC)		
	4.3.3 TPC)	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου (Total Phenolic Content- 60		
	4.3.4	Μελέτη αναστολής δραστικότητας τυροσινάσης61		
	4.3.5	Μελέτη αναστολής δραστικότητας ελαστάσης62		
4.3.6 Μελέτη ενεργοποίησης υποδοχέων - διαύλων παροδικού δυναμ (Transient Receptor Potential- TRP)				
Ίρο	σωπικά	Δεδομένα66		
ÞA/	\AIO 5º.			
кол	τός			
.1	Υλικά	και μέθοδοι66		
	5.1.1	Αναλυτικές τεχνικές66		
	5.1.2	Παρασκευαστικές τεχνικές		
	5.1.3	Φασματοσκοπικές Τεχνικές		
ραι	5.1.3 ματική τ	Φασματοσκοπικές Τεχνικές68 τ <b>ορεία</b>		
<b>ραι</b> .2	5.1.3 <b>ματική π</b> Εκχύλ	Φασματοσκοπικές Τεχνικές68 τ <b>ορεία70</b> ιση φυτικού υλικού βιομηχανικής κάνναβης70		
<b>ραι</b> .2	5.1.3 <b>ματική 7</b> Εκχύλ Εκχύλ	Φασματοσκοπικές Τεχνικές68 ι <b>ορεία70</b> ιση φυτικού υλικού βιομηχανικής κάνναβης70 ιση κατανομής με φυγοκέντριση στο εκχυλίσμα SFE71		
<b>ραι</b> .2 .3	5.1.3 <b>ιατική τ</b> Εκχύλ Εκχύλ 5.3.1	Φασματοσκοπικές Τεχνικές68 ι <b>ορεία</b>		
<b>ραι</b> .2 .3	5.1.3 <b>ματική τ</b> Εκχύλ Εκχύλ 5.3.1 Χρωμ	Φασματοσκοπικές Τεχνικές		
<b>ραι</b> .2 .3	5.1.3 <b>ματική τ</b> Εκχύλ Εκχύλ 5.3.1 Χρωμ 5.4.1	Φασματοσκοπικές Τεχνικές		
<b>ραι</b> .2 .3 .4	5.1.3 ματική τ Εκχύλ Εκχύλ 5.3.1 Χρωμ 5.4.1 Χρωμ σμα όξιν	Φασματοσκοπικές Τεχνικές		
<b>ραι</b> 2 3 4	5.1.3 ματική τ Εκχύλ Εκχύλ 5.3.1 Χρωμ 5.4.1 Χρωμ σμα όξιν 5.5.1	Φασματοσκοπικές Τεχνικές		
<b>ραι</b> 2 3 4	5.1.3 ματική τ Εκχύλ Εκχύλ 5.3.1 Χρωμ 5.4.1 Χρωμ σμα όξιν 5.5.1 5.5.2	Φασματοσκοπικές Τεχνικές		
	.3 Іро ОА/ <от .1	<ul> <li>4.2.2</li> <li>4.2.3</li> <li>4.2.4</li> <li>.3 Βιολο</li> <li>4.3.1</li> <li>4.3.2 content</li> <li>4.3.3 TPC)</li> <li>4.3.4</li> <li>4.3.5</li> <li>4.3.6 Ν (Transie</li> </ul>		

	5.5.4	Υγρή χρωματογραφία υπό κενό	91		
КЕФА	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°				
6.1	Φασματοσκοπική Ταυτοποίηση				
	6.1.1	Καννναβιδιόλη	94		
	6.1.2	Κανναβιδιβαρίνη	97		
	6.1.3	(R)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-Α	101		
	6.1.4	(S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Α	105		
	6.1.5	(S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Β	106		
	6.1.6	Κανναβιγερόλη	107		
	6.1.7	(S)-Κανναβιελσοΐνη	111		
	6.1.8	Κανναβικυκλόλη	115		
	6.1.9	Δ <sup>9</sup> -τετραϋδροκανναβινόλη & Δ <sup>8</sup> -τετραϋδροκανναβινόλη	117		
	6.1.10 Κανναβιχρωμένιο				
	6.1.11	Κανναβικιτράνη	124		
	6.1.12	Φυτόλη	128		
	6.1.13	Οξειδίου του Καρυοφυλλενίου	130		
	6.1.13 Ανάλογο Κανναβιδιόλης		131		
	6.1.14	Ανάλογο Κανναβιδιόλης	131		
	6.1.15 /	Ανάλογο Κανναβιγερόλης	132		
6.2	Αποτελέσματα Βιολογικών δοκιμών		133		
	6.2.1	Δοκιμή δέσμευσης σταθερής ρίζας DPPH•	133		
	6.2.2	Προσδιορισμός ολικού φορτίου φλαβονοειδών (TFC)	136		
	6.2.3	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου (TPC)	139		
	6.2.4	Μελέτη αναστολής δραστικότητας τυροσινάσης	141		
	6.2.5	Μελέτη αναστολής δραστικότητας ελαστάσης	145		
Συμπεράσματα					
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ					
ПАРАРТНМА					

## <u>Α. Γενικό Μέρος</u>

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

### Το φυτό Cannabis sativa L.

#### 1.1 Εισαγωγή

Το φυτό Cannabis sativa L. (οικ. Cannabaceae) είναι ένα από φυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί και καλλιεργηθεί από τον άνθρωπο από την αρχαιότητα ενώ έχει επαινεθεί και αναφερθεί πολύ συχνά στην ιστορία. Πιθανώς να ήταν το πρώτο φυτό που καλλιεργήθηκε για τη δημιουργία χαρτιού, υφάσματος καθώς και για χρήση ως τρόφιμο είτε φάρμακο [1]. Κατά τη διάρκεια των αιώνων, η κάνναβη αφενός έχει εκθειασθεί ως ένα από τα πιο ωφέλιμα φυτά, ταυτόχρονα όμως η χρήση της έχει κατηγορηθεί και ως μία από τις μεγαλύτερες μάστιγες. Το φυτό της κάνναβης έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από στρατιώτες και ναυτικούς, από κυνηγούς και ψαράδες για την κατασκευή παγίδων, με σκοπό την απομάκρυνση άγριων πλασμάτων από την τίγρη μέχρι τον καρχαρία, χάρη στο χαλκώδες ύφασμα του, αλλά και στην υφαντουργία, από σχεδιαστές μόδας για να ντύσουν γυναίκες με την εύπλαστη πλέξη του [1]. Τα φύλλα έχουν χρησιμοποιηθεί από μαιευτήρες για να διευκολύνουν τον πόνο του τοκετού, μιάς και περιέχει ένα εύρος αναλγητικών ουσιών [2], [3], [4], ενώ το έλαιο των σπόρων του έχει χρησιμοποιηθεί για διατροφικούς σκοπούς και ως καύσιμο. Τέλος έχει χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο για την γνωστή ψυχοτρόπο δράση του, από την αρχαιότητα κίολας έχουν γίνει αναφορές χρήσης του φυτού για την πρόκληση ευφορίας, μακαριότητας και έκστασης [1]. Στις μέρες μας σημειώνεται αμείωτο ερευνητικό ενδιαφέρον για την θεραπευτική και όχι μόνο αξιοποίηση του φυτού της κάνναβης. Κυρίως μετά την ανακάλυψη των υποδοχέων κανναβινοειδών κατά τις αρχές της δεκαετίας του 1990 και την επακόλουθη ταυτοποίηση ενδοκανναβινοειδών μορίων όπως το ανανδαμίδιο, αυξήθηκε το ενδιαφέρον της έρευνας των κανναβινοειδών στους τομείς της ιατρικής καθώς και της φαρμακευτικής βιομηχανίας [5]. Το ενδιαφέρον αφορά τοσο την φαρμακευτική όσο και την βιομηχανική κάνναβη και δεν περιορίζεται μονάχα στην θεραπευτική αξία του φυτού. Σήμερα η βιομηχανική κάνναβη χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή κλωστής, ρούχων, χαρτιού και δομικών υλικών, ενώ οι σπόροι της χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας, όπως και στην βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή ελαίου, είτε βρώσιμων προϊόντων [6].

## 1.2 Ιστορική αναδρομή

Η αρχαιότερη ιστορική αναφορά της χρήσης κάνναβης από τον άνθρωπο προέρχεται από το νησί της Ταϊβάν [7]. Εκεί οι αρχαιολόγοι ανακάλυψαν ένα αρχαίο χωριό που χρονολογείται στην νεολιθική εποχή, περίπου **10000 χρόνια** πριν [1]. Μεταξύ των ευρημάτων υπήρχαν μερικά σπασμένα κομμάτια κεραμικών ειδών, οι πλευρές των οποίων είχαν διακοσμηθεί με λωρίδες σχοινιού που ασκούσαν πίεση στον πηλό. Ανάμεσα στα θραύσματα των κεραμικών, βρέθηκαν και επιμήκη εργαλεία σε σχήμα ράβδου, παρόμοια σε εμφάνιση με εκείνα που αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για να χαλαρώνουν τις ίνες κάνναβης από τους μίσχους του φυτού. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η κάνναβη χρησιμοποιούνταν από τις πρώιμες κιόλας ανθρώπινες κοινωνίες [1].

Η χρήση του φυτού *C. sativa* στην ιατρική χρονολογείται πριν από περίπου **5000** χρόνια, όταν ο αυτοκράτορας Chen Nung κατάρτισε την πρώτη κινεζική φαρμακοποιία [8]. Σύμφωνα με αυτό το αρχαίο κείμενο, το *C. sativa* χρησιμοποιούνταν για την θεραπεία της κόπωσης, των ρευματισμών και της ελονοσίας. Επιπλέον, οι Κινέζοι γιατροί χρησιμοποίησαν τους σπόρους του *C. sativa* κυρίως για το φυτικό έλαιο και τις πρωτεΐνες τους



**Εικόνα 1.1** Απεικόνιση του αυτοκράτορα Chen Nung και στην επάνω αριστερά, η εξέλιξη των κινεζικών χαρακτήρων της λέξης "*C. sativa*" [8]



**Εικόνα 1.2** Ma, η κινεζική λέξη για το *C. sativa*. Αποτελείται από σύμβολα που απεικονίζουν την κάνναβη. Το κάτω τμήμα αντιπροσωπεύει τις ίνες, ενώ οι οριζόντιες και κάθετες γραμμές συμβολίζουν το καταφύγιο όπου ξηραίνεται το φυτό [1]

Είναι γνωστό ότι αποτελούσε αναπόσπαστο κομμάτι και της Ινδουιστικής θρησκείας. Η σημασία της αποτυπώνεται στην συλλογή των ιερών βιβλίων Βέδες (χρονολογούνται **1700-1100 π.Χ.**), όπου αναφέρεται πως ο θεός Σίβα έφερε το φυτό της κάνναβης από τα Ιμαλάια για τη χρήση και την απόλαυση των Ινδών [1]. Σύμφωνα με τον Ινδουισμό αλλά και τον Βουδισμό, οι ταξιανθίες και η ρητίνη του *C. sativa* χρησιμοποιούνταν για την διευκόλυνση του διαλογισμού και της επικοινωνίας με τα πνεύματα [8].Εικάζεται ότι στο ιερό βιβλίο της Εξόδου (**1450 π.Χ.**) των Εβραιών, όπου αναφέρεται ότι ο Θεός έδωσε στον Μωυσή το λάδι του χρίσματος, το έλαιο αυτό πιθανά περιελάμβανε και κάνναβη [9].

Στην Αρχαία Αίγυπτο το *C. sativa* χρησιμοποιούνταν στην θεραπεία του γλαυκώματος, της φλεγμονής και τέλος χορηγούνταν ως κλύσμα. Αποτελούσε φυτό μεγάλης εθνοφαρμακολογικής σημασίας καθώς υπολείμματα της γύρης βρέθηκαν πάνω στη μούμια του Ραμσή Β΄, φαραώ της Αιγύπτου ο οποίος πέθανε το **1213 π.Χ.** [9].



**Εικόνα 1.3** Η αρχαία αιγυπτιακή θεά Seshat (θεά της σοφίας, της γνώσης, της γραφής και της αρχιτεκτονικής) απεικονίζεται με ένα φύλλο κάνναβης στο κεφάλι της [8]

Επιπρόσθετα η κάνναβη έπαιξε σημαντικό ρόλο στην κινέζικη θρησκεία και ιατρική. Σε πρόσφατα αρχαιολογικά ευρήματα στην περιοχή του Xinjiang (βορειοδυτική Κίνα), στους τάφους Yanghai (χρονολογούνται πάνω από **2700 χρόνια** πριν), ανακαλυφθήκαν φυτικά υπολείμματα κάνναβης, γεγονός που υποδηλώνει την εθνοβοτανική σημασία του *C. Sativa* στην αρχαία Κίνα [7]. Συγκεκριμένα βρέθηκε ένα δερμάτινο καλάθι γεμάτο με φρούτα, φύλλα και βλαστούς και ένα ξύλινο μπολ με τα ίδια φυτικά κατάλοιπα. Μετά από λεπτομερή μελέτη, το υλικό προσδιορίστηκε ως κάνναβη και αποτελεί το παλαιότερο διατηρημένο δείγμα κάνναβης.



**Εικόνα 1.4** (Α) Δερμάτινο καλάθι, (Β) Ξύλινο δοχείο και (C) Φυτικά υπολείμματα κάνναβης στους τάφους Yanghai [7]

Οι κινέζοι ήταν εκείνοι που επέλεξαν τις ίνες της κάνναβης για τα πρώτα τους ρούχα [1]. Στην αρχαία κινεζική κουλτούρα οι ίνες της κάνναβης κατείχαν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο καθώς, σύμφωνα με το Βιβλίο των Ρητών (**2ος αιώνας π.Χ.**), όσοι θρηνούσαν νεκρούς από σεβασμό έπρεπε να φορούν ρούχα από κάνναβη, ένα έθιμο που ακολουθείται μέχρι την σύγχρονη εποχή.

Ο ιστορικός Ηρόδοτος (περίπου το **400 π.Χ.**) είχε περιγράψει λεπτομερώς την τελετουργία εισπνοής του καπνού κάνναβης από τους Σκυθές [10]. Αργότερα, περίπου το **60 π.Χ.,** ο Διόδωρος Σικελιώτης ανέφερε ότι οι γυναίκες της αρχαίας Αίγυπτου χρησιμοποίησαν το *C. sativa* για την απαλλαγή από τον πόνο και την βελτίωση της διάθεσή τους [8].

Τον **πρώτο αιώνα μ.Χ.** ο Διοσκουρίδης στο βιβλίο του «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς» (Materia medica) συγκέντρωσε μια λίστα περισσότερων από 600 φυτών με τα ονόματα που ήταν τότε γνωστά, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους καθώς και τα συμπτώματα και τις συνθήκες για τις οποίες το κάθε φυτό είχε αποδειχθεί ευεργετικό. Μεταξύ αυτών συμπεριέλαβε την κάνναβη, γράφοντας πως είναι ένα φυτό ιδιαίτερα χρήσιμο για τη δημιουργία ισχυρών σχοινιών. Επίσης, ανέφερε τη χρήση του χυμού των σπόρων κάνναβης για τη θεραπεία της ωταλγίας, αλλά και για τη μείωση της ερωτικής επιθυμίας [1].



**Εικόνα 1.5** Αναφορά της κάνναβης σε λατινική έκδοση του βιβλίου Περὶ ὕλης ἰατρικῆς ("De Materia Medica") του Διοσκουρίδη

Αυτή ήταν η πρώτη φορά που η κάνναβη έχει περιγράφει ως θεραπευτικό φυτό σε ένα δυτικό ιατρικό κείμενο, και δεδομένου ότι το «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς» συνέχισε να είναι ένα από τα σημαντικότερα βιβλία της ιατρικής για τα επόμενα 1500 χρόνια, η κάνναβη χρησιμοποιήθηκε ως κοινό φάρμακο για τη θεραπεία επιμολύνσεων των αυτιών από σκώληκες είτε έντομα, σε ολόκληρη την Ευρώπη κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα [1]. Κατά την **μεσαιωνική περίοδο** οι Ιταλοί ξεκίνησαν την πρώτη μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια και εμπορευματοποίηση του φυτού στην περιοχή της Μεσογείου. Αντίθετα στην Αμερική, το *C. sativa* δεν ήταν γνωστό μέχρι την άφιξη και την εγκατάσταση των πρώτων Ευρωπαίων αποίκων [8]. Κατά την περίοδο εκείνη, η κάνναβη χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τις ανθεκτικές της ίνες. Οι Ισπανοί και Άγγλοι άποικοι εισήγαγαν στην Αμερική βοτανικές ποικιλίες κυρίως για την κλωστοϋφαντουργία. Παρ' όλα αυτά, ήταν επίσης γνωστά τα ψυχοτρόπα αποτελέσματα του *C. sativa* στη μαγεία και την παραδοσιακή ιατρική [8].

To **1578 μ.Χ.,** το κινεζικό ιατρικό κείμενο "Bencao Gangmu Materia Medica"περιγράφει τη χρήση μαριχουάνας για τη θεραπεία του εμέτου, παρασιτικών λοιμώξεων και αιμορραγίας [9].

To **1621 μ.Χ**., το δημοφιλές αγγλικό βιβλίο για την ψυχική υγεία (The Anatomy of Melancholy), συνέστησε την κάνναβη ως φάρμακο για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης [9].

Μέχρι το **1850**, το *C. sativa* είχε εισέλθει στη Φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών ως θεραπεία για την νευραλγία, τον τέτανο κ.ά. [9].

Παρά τα οφέλη που είχαν περιγραφεί μέχρι τότε, το **1932** απαγορεύτηκε η χρήση της κάνναβης και απομακρύνθηκε από τη Βρετανική Φαρμακοποιία, η οποία την συμπεριέλαβε στις απαγορευμένες ουσίες για θεραπευτική χρήση [8].

Η κανναβινόλη (CBN) ήταν το πρώτο από τα φυτοκανναβινοειδή που απομονώθηκε στα τέλη του 19ου αιώνα. Η χημική δομή της (Σχήμα 1.1) διευκρινίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του **1930** από τον R.S. Cahn και η χημική της σύνθεση πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το **1940** από τις ερευνητικές ομάδες των R. Adams και Lord Todd [11]. Η CBD απομονώθηκε και αυτή το **1940** από τον Adams, πιθανώς σε συνδυασμό με κανναβιδιολικό οξύ ενώ η THC απομονώθηκε για πρώτη φορά το **1942** από τους Wollner et al., πιθανότατα ως μίγμα (-)-Δ<sup>9</sup>-THC και (-)-Δ<sup>8</sup>-THC [11]. Η δομή και στερεοχημεία της CBD ως (-)-εναντιομερές, όπως αυτή απαντάται στην φύση, εξακριβώθηκε το **1963** (Mechoulam et al.) [11]. Όσον άφορα την Δ<sup>9</sup>-THC απομονώθηκε και προσδιορίστηκε στερεοχημικά το **1964** από τους Mechoulam et al., και συντέθηκε μαζί με την CBD ως (±)-εναντιομερή από τους ίδιους, ένα χρόνο αργότερα [11]. Η απόλυτη στερεοχημεία των CBD και Δ<sup>9</sup>-THC εξακριβώθηκε με μέτρηση της ειδικής στροφικής ικανότητας, σε συσχέτιση με τα τότε γνωστά τερπενοειδή. Αρκετά χρόνια αργότερα απομονώθηκε η Δ<sup>8</sup>-THC, ένα δευτερεύον, ψυχοτρόπο κανναβινοειδές [12]. Αρκετά μη ψυχοτρόπα κανναβινοειδή ταυτοποιήθηκαν επίσης εκείνη την εποχή, με γνωστότερα την κανναβιγερόλη (CBG), το κανναβιχρωμένιο (CBC), και την κανναβικυκλόλη (CBL). Για την καλύτερη κατανόηση της βιοσύνθεσης αυτών των κανναβινοειδών, ήταν απαραίτητη η απομόνωση και ο προσδιορισμός των αντίστοιχων οξέων τους.

Κατά την δεκαετία του **1980**, η Pfizer ανάπτυξε συνθετικά μόρια ligands για τους υποδοχείς των κανναβινοειδών. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκε το **1990** ο υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 1 (CB<sub>1</sub>) για πρώτη φορά, και ακολούθησε ο υποδοχέας τύπου 2 (CB<sub>2</sub>) το **1993** [11].



**Σχήμα 1.1** Μοριακές δομές των κυριώτερων ουδέτερων και όξινων κανναβινοειδών καθώς και φλαβονοειδών [13]

Ακόμη και σήμερα, υπάρχει μια συνεχής συζήτηση σχετικά με το νομικό καθεστώς του *C. sativa* σε πολλές δυτικές κυβερνήσεις. Συγκεκριμένα, η ελευθερία χρήσης της για ιατρικούς ή ψυχαγωγικούς σκοπούς θεωρείται από πολλούς ανθρώπους ως κατάχρηση των πολιτικών δικαιωμάτων αλλά και ως μείζον κοινωνικοπολιτισμικό πρόβλημα [8].



Εικόνα 1.6 Χρονοδιάγραμμα έρευνας κανναβινοειδών [14]

## 1.3 Βοτανική περιγραφή

To Cannabis sativa L. (Cannabaceae) απαντάται σε μια ποικιλία ενδιαιτημάτων και υψομέτρων, που κυμαίνονται από το επίπεδο της θάλασσας έως τους αλπικούς πρόποδες των Ιμαλαΐων από όπου πιθανά προήλθε [15]. Η καλλιέργεια και η χρήση κάνναβης χρονολογείται 5000 έως 6000 χρόνια πριν, καθιστώντας δύσκολη την επισήμανση της προέλευσης αυτού του είδους [7].

Η συστηματική ταξινόμηση για το C. sativa παρουσιάζεται παρακάτω: [15]

- Βασίλειο: Φυτικό (Φυτά)
- Υποκατηγορία: Τραχειόφυτα (Αγγειώδη φυτά)
- Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
- Ομοταξία: Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
- Τάξη: Κνιδώδη (Urticales)
- Οικογένεια: Κανναβοειδή (Cannabaceae)
- Γένος: Cannabis
- Είδος: sativa

Τα είδη του γένους Cannabis αποτελέσαν και αποτελούν αντικείμενο αντιπαράθεσης μέχρι και σήμερα. Ορισμένοι βοτανολόγοι ειδικοί στην ταξινόμηση, αντιμετωπίζουν την κάνναβη ως ένα ενιαίο αλλά ποικιλόμορφο είδος, το *C. sativa* L., ενώ άλλοι θεωρούν το γένος πολυτυπικό. Ο Lamarck το 1785 αναγνώρισε δύο διαφορετικά είδη

στην κάνναβη, το *C. indica* και το *C. sativa,* περιγράφοντας τα φυλλάρια του είδος *C. indica* στενότερα από εκείνα του *C. sativa* [16].

Αντίθετα με τον προηγούμενο, οι Schultes το 1974 και Anderson το 1980 περιέγραψαν τρία ξεχωριστά είδη στο γένος, το *C. sativa,* το *C. indica* και το *C. ruderalis* βάσει μορφολογικών κυρίως κριτηρίων, περιγράφοντας το είδος *C. indica* ως φυτά μικρά και πυκνά διακλαδισμένα με προέλευση από το Αφγανιστάν. Ο Anderson περιέγραψε το *C. sativa* ως φυτό με στενά, λογχοειδή ή γραμμικά-λογχοειδή φύλλα και το *C. indica* με πλατιά, επιμήκη φύλλα [16].

Σε γενετικές και ταξινομικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν από τους Gilmore et al. το 2003, αποδείχτηκε ότι στο παρελθόν υπήρξε γεωγραφικός διαχωρισμός μεταξύ των *C. sativa*, του οποίου η προέλευση θεωρείται ευρωπαϊκή, του *C. indica* με προέλευση από Νότια Ασία-Αφρική και του *C. ruderalis* με προέλευση από Κεντρική Ασία [8]. Οι γενετικές διαφορές που έχουν παρατηρηθεί στα τρία προαναφερθέντα είδη αφορούν κυρίως εκείνα με την υψηλή περιεκτικότητα σε Δ<sup>9</sup>-THC και έχουν σημειώσει σημαντική αύξηση τα τελευταία 50 χρόνια λόγω της ανθρώπινης παρέμβασης στην ταχεία αναπαραγωγή του φυτού [17].

Οι McPartland et al. το 2000 αντιμετώπισαν τον βιότυπο με τα πλατιά φυλλάρια ως ένα ξεχωριστό είδος από το *C. sativa* και το *C. indica* [16]. Αντίθετα ο Hillig το 2004 διαπίστωσε ότι οι βιότυποι με τα πλατιά καθώς και τα στενά φυλλάρια που είναι πλούσιοι σε Δ<sup>9</sup>-THC έχουν προέλθει από μια κοινή ομάδα γονιδίων του είδους *C. indica* [16].

Ωστόσο, παρά τις διαφορετικές ταξινομικές ερμηνείες, η κάνναβη αντιμετωπίζεται συνήθως ως ένα ενιαίο είδος και οι *C. indica* και *C. ruderalis* αναγνωρίζονται ως ποικιλίες του *C. sativa* L. [15]. Οι ποικιλίες 'Sativa' και 'Indica' είναι σημαντικές για την παγκόσμια οικονομία και ευρέως διαδεδομένες, ενώ η 'Ruderalis' θεωρείται μια πιο ανθεκτικές ποικιλίες που καλλιεργείται βόρεια των Ιμαλαΐων και στις νότιες πολιτείες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, χαρακτηρίζεται από σποραδική ανάπτυξη και σπάνια καλλιεργείται [15].

Τα φυτά που ανήκουν στις ποικιλίες 'Sativa' και 'Indica' παρουσιάζουν σημαντικές βοτανικές διαφορές μεταξύ τους όπως το ύψος. Σε σύγκριση με την 'Sativa' όπου το μέσο ύψος των φυτών κυμαίνεται στα 2.50 με 3.50 m, τα φυτά της ποικιλίας 'Indica' είναι γενικά μικρότερα με μέσο ύψος περίπου 1.80 m [15]. Επιπρόσθετα τα φυτά της ποικιλίας 'Indica' είναι πιο θαμνώδη με πλατύτερα και πιο σκούρα πράσινα φύλλα που ωριμάζουν νωρίς όταν καλλιεργούνται σε εξωτερικούς χώρους [15].

Τέλος, από πρόσφατες περιγραφές υποδεικνύεται ότι οι χημειότυποι της ποικιλίας 'Sativa' παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναλογία Δ<sup>9</sup>-THC προς CBD και το προφίλ των τερπενοειδών που περιέχουν τους προσδίδει ένα χαρακτηριστικό «γλυκό» άρωμα. Αντίθετα τα φυτά 'Indica' παρουσιάζουν ίση σχεδόν αναλογία Δ<sup>9</sup>-THC προς CBD, και το προφίλ των τερπενοειδών τους προσδίδει ένα μάλλον δυσάρεστο άρωμα [4].



Εικόνα 1.7 Ταξινόμηση της κάνναβης [4]

Το *C. sativa* είναι ετήσιο φυτό και αποτελεί κυρίως δίοικο είδος. Σπανιότερα όμως συναντώνται μόνοικα [4], καθώς και ερμαφρόδιτα φυτά [15]. Στα δίοικα είδη τα αρσενικά και τα θηλυκά άνθη αναπτύσσονται σε διαφορετικά φυτά και το φύλο του φυτού καθορίζεται από τα ετερόμορφα χρωμοσώματα, με τα αρσενικά να φέρουν XY χρωμοσώματα και τα θηλυκά XX [15]. Μορφολογικά, στην κάνναβη είναι δύσκολο να εντοπιστούν τα αρσενικά και θηλυκά φυτά στο στάδιο της βλάστησης καθώς ο φυλετικός διμορφισμός εμφανίζεται αργότερα, συγκεκριμένα μετά την έναρξη της ανθοφορίας. Ωστόσο, πλέον υπάρχει η δυνατότητα να γίνεται διαχωρισμός ακόμη και σε αρχικό στάδιο, μέσω χρήσης μοριακών τεχνικών [15].

Όσον αφορά το *C. sativa*, τα στελέχη του είναι πράσινα, κοίλα και κυλινδρικά με ραβδώσεις κατά μήκος. Η έκταση των διακλαδώσεων καθώς και η διάταξη των φύλλων ποικίλει. Ο μίσχος έχει κυλινδρικό σχήμα, καλύπτεται με αδενώδης και μη τρίχες και μπορεί να φτάσει σε μήκος τα 7 cm [4].

Τα φύλλα είναι παλαμοειδή, αποτελούνται από 3 έως 9 λοβούς και παρουσιάζουν ακτινωτό σύστημα αγγείων. Οι λοβοί των φύλλων είναι στενοί επιμήκεις και λογχοειδείς, μήκους 3 έως 20 cm και πλάτους έως 1.8 cm, με σκούρο πράσινο χρώμα στο πάνω μέρος και πιο ανοιχτό χρώμα στη βάση. Οι λοβοί αποτελούνται από οξύληκτο άκρο στην κορυφή και οδοντωτές άκρες κατά μήκος [4].

Τα αρσενικά άνθη του *C. sativa* έχουν ανοιχτό πράσινο χρώμα και φέρουν διακλαδισμένα μεταξύ τους κυκλικά, ανθήλη. Το άνθος αποτελείται από πέντε τέπαλα, πέντε στήμονες και έναν λεπτό ποδίσκο [4].

Τα θηλυκά άνθη έχουν σκούρο πράσινο χρώμα, είναι σχεδόν άμισχα και σχηματίζουν ζεύγη. Τα άνθη είναι πυκνά συναθροισμένα στην κορυφή των μικρών ταξιανθιών. Κάθε άνθος αποτελείται από μια ωοθήκη που καταλήγει σε ένα ζευγάρι από μακρά και λεπτά στίγματα στην κορυφή [4].



Εικόνα 1.8 Αρσενικά (Α) και θηλυκά (Β) άνθη του φυτού C. sativa [8]

Χημειοταξινομικά, το *C. sativa* αποτελεί ένα σύνθετο είδος χάρη στους πολυάριθμους δευτερογενείς μεταβολίτες. Η συγκέντρωση της Δ<sup>9</sup>-THC στις αποξηραμένες ταξιανθίες χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ψυχοτρόπου δράσης του [15].

Το *C. sativa* μπορεί να διακριθεί σε τρεις φαινότυπους. Ο πρώτος είναι εκείνος της φαρμακευτικής κάνναβης με συνήθη περιεκτικότητα Δ<sup>9</sup>-THC > 0.5% και CBD < 0.5%. Γενικά, η αναλογία Δ<sup>9</sup>-THC/CBD στην φαρμακευτική κάνναβη είναι πολύ μεγαλύτερη του 1. Ο δεύτερος φαινότυπος, ο λεγόμενος ενδιάμεσος τύπος, χαρακτηρίζεται από την CBD ως κύριο κανναβινοειδές με την Δ<sup>9</sup>-THC επίσης παρούσα σε διάφορες συγκεντρώσεις (αναλογία Δ<sup>9</sup>-THC προς CBD περίπου ίση του 1) [15]. Ο τρίτος φαινότυπος είναι της βιομηχανικής κάνναβης, με ιδιαίτερα χαμηλή περιεκτικότητα σε Δ<sup>9</sup>-THC < 0.3% και CBD > 0.5% [4]. Στην βιομηχανική κάνναβη η αναλογία Δ<sup>9</sup>-THC προς CBD είναι κατά πολύ μικρότερη του 1 [15].

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ναρκωτικές ουσίες που προέρχονται από την φαρμακευτική κάνναβη είναι η μαριχουάνα και το χασίς [18]. Ο όρος φαρμακευτική κάνναβη αναφέρεται στην χρήση του μη επεξεργασμένου φυτού της κάνναβης, ή των συστατικών αυτού για θεραπευτικούς σκοπούς [19],[20]. Ωστόσο ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) δεν έχει εγκρίνει το φυτό της κάνναβης ως φάρμακο [19].

Σύμφωνα με τους Ben Amar και Léonard (2002) η λέξη «μαριχουάνα» προέρχεται από τον μεξικάνικο όρο που αρχικά αποδόθηκε στον φτηνό καπνό αλλά σήμερα αναφέρεται στα αποξηραμένα φύλλα και ταξιανθίες του φυτού της κάνναβης. Η λέξη «hashish» προέρχεται από το αραβικό όνομα της ινδικής κάνναβης, και αναφέρεται στην ιξώδη ρητίνη του φυτού [18].

Σχεδόν όλα τα υπέργεια μέρη των φυτών της κάνναβης καλύπτονται με αδενώδεις τρίχες, όπου εντοπίζεται η ρητίνη, καθώς και μη αδενώδεις τρίχες. Κυρίως υπεύθυνες για την παραγωγή της Δ<sup>9</sup>-THC είναι οι αδενώδεις τρίχες των βρακτίων φύλλων του *C. sativa* [4]. Γενικά συναντώνται τρεις τύποι αδενωδών τριχών και παρουσιάζονται παρακάτω:

- Κοκκιώδεις αδενώδεις τρίχες με μίσχο (Capitate-stalked glandular trichome): Αυτός ο τύπος τριχών διαθέτει μία μεγάλη σφαιρική κεφαλή διαμέτρου μεταξύ 50-70 μm και ένα ισχυρό πολυκύτταρο στέλεχος 100-200 μm. Τα στελέχη με υψηλή περιεκτικότητα σε Δ<sup>9</sup>-THC έχουν μεγαλύτερες αδενικές κεφαλές (έως 119 μm) [4].
- Κοκκιώδεις αδενώδεις τρίχες χωρίς μίσχο (Capitate-sessile glandular trichome): Αυτός ο τύπος είναι ο πιο εμφανής κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων ανάπτυξης του βρακτίου. Ο αδένας αποτελείται από μία μεγάλη σφαιρική κεφαλή με διάμετρο περίπου 30-50 μm. Αν και εμφανίζονται άμισχα, αυτά τα τριχώματα διαθέτουν πολύ μικρό μίσχο, με ύψος ενός μόνο κυττάρου, αλλά με πάχος 2-4 κύτταρων [4].
- Βολβοειδείς αδενώδεις τρίχες (Bulbous glandular trichome): Αυτός είναι ο μικρότερος τύπος αδενικού τριχώματος του *C. sativa*. Τα τριχώματα αυτά διαθέτουν μίσχο 1-2 κυττάρων και κεφαλή 1-4 κυττάρων και ποικίλουν ως προς το μέγεθος (συνήθως έχουν διάμετρο 10-20 μm και ύψος 15-30 μm) [4].





Εικόνα 1.9 Αδενώδη τριχώματα του C. sativa [8]

## 1.4 Τα κανναβινοειδή

Τα κανναβινοειδή και τα διάφορα τερπένια, που υπάρχουν φυσιολογικά στα φύλλα και τα άνθη του *C. sativa*, χρησιμεύουν ως φραγμός στην απώλεια νερού, κατά αναλογία με τις κηρώδεις ενώσεις που επικαλύπτουν τους κάκτους και άλλα παχύφυτα (Pate et al., 1994) [21]. Επομένως καιρικές συνθήκες όπως αραιές βροχοπτώσεις, χαμηλά επίπεδα υγρασίας και υψηλή θερμοκρασία αυξάνουν την περιεκτικότητα του φυτού σε ψυχοδραστικά συστατικά [8]. Επιπλέον τα κανναβινοειδή προστατεύουν το φυτό από πηγές περιβαλλοντικού στρες όπως παθογόνα βακτήρια, μύκητες και έντομα καθώς και από τον ανταγωνισμό της γύρω βλάστησης [8].

Η κάνναβη περιέχει ένα πλήθος συστατικών, καθώς συνολικά έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 560 ενώσεις [15]. Οι πλέον σημαντικοί δευτερογενείς μεταβολίτες

του φυτού είναι τα κανναβινοειδή, τα οποία αποτελούν μια μοναδική κατηγορία τερπενοφαινολικών ενώσεων και θεωρούνται εξαιρετικά σημαντικοί χημειοταξινομικοί δείκτες [8]. Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 120 φυτοκανναβινοειδή έχουν απομονωθεί [4].

#### 1.4.1 Βιοσύνθεση κανναβινοειδών

Τα κανναβινοειδή που προέρχονται από το C. sativa παρουσιάζουν έναν χαρακτηριστικό C21 τερπενοφαινολικό σκελετό [15]. Τα κανναβινοειδή σχετίζονται χημικά με τα τερπένια και η δομή του δακτυλίου τους προέρχεται από το πυροφωσφορικό γερανύλιο που αποτελεί υπομονάδα μονοτερπενίου με 10 άτομα C. Έχουν αναφερθεί δύο ανεξάρτητες οδοί υπεύθυνες για τη βιοσύνθεση των φυτικών τερπενοειδών. Η πρώτη πραγματοποιείται μέσω του μεβαλονικού οξέος στο κυτοσόλιο του φυτικού κυττάρου και η δεύτερη μέσω της φωσφορικής μεθυλοερυθριτόλης (MEP) στα πλαστίδια. Η MEP θεωρείται υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση του τερπενοειδούς τμήματος των κανναβινοειδών [15]. Είναι γνωστό ότι το διφωσφορικό γερανύλιο (GPP) και το ολιβετολικό οξύ είναι οι αρχικοί πρόδρομοι των κανναβινοειδών, οι οποίοι προέρχονται από την βιοσυνθετική οδό της φωσφορικής δεοξυξυλουλόζης/φωσφορικής μεθυλοερυθριτόλης (DOXP/MEP), και από το μονοπάτι των πολυκετιδίων, αντίστοιχα [22]. Το πρώτο βήμα στην πορεία βιοσύνθεσης κανναβινοειδών είναι ο σχηματισμός του ολιβετολικού οξέος, του οποίου η πορεία βιοσύνθεσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι μια συνθετάση πολυκετιδίου τύπου ΙΙΙ, η ολιβετολική συνθετάση (olivetol synthase), θα μπορούσε να εμπλέκεται. Το ολιβετολικό οξύ και το διφωσφορικό γερανύλιο συζεύγνυνται υπό την επίδραση της ολιβετολικής γερανυλοτρανσφεράσης, δίνοντας κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) [15],[22]. Αυτό, με τη σειρά του, κυκλοποιείται από οξειδάσες εξαρτώμενες από το φλαβινοαδενινοδινουκλεοτίδιο (FAD), συγκεκριμένα την συνθετάση του Δ<sup>9</sup>-THCA, την συνθετάση του CBDA και την συνθετάση του CBCA, παράγοντας Δ9τετραϋδροκανναβινολικό οξύ, κανναβιδιολικό οξύ και κανναβιχρωμενικό οξύ, αντίστοιχα [15].



Σχήμα 1.2 Γενική οδός βιοσύνθεσης κανναβινοειδών [22]

#### 1.4.2 Χημικοί τύποι κανναβινοειδών

Τα κανναβινοειδή φυτικής προέλευσης, τα οποία είναι επίσης γνωστά ως φυτοκανναβινοειδή, ταξινομούνται σε δύο βασικούς τύπους: τα ουδέτερα κανναβινοειδή και τα όξινα κανναβινοειδή, με βάση την ύπαρξη ή όχι ομάδας καρβοξυλικού οξέος [4]. Τα κανναβινοειδή απαντούν φυσικά στο φυτό με τη μορφή των οξέων. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της συλλογής και αποθήκευσης των φυτών ή όταν το φυτό υφίσταται θερμική επεξεργασία, αυτά τα οξέα υφίστανται μη ενζυματική αποκαρβοξυλίωση προς τις ουδέτερες μορφές τους [4].

Από πολυάριθμες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα στο C. sativa, έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 100 κανναβινοειδή, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε **11 γενικούς τύπους**: κανναβιδιόλης (CBD), (-)-Δ<sup>9</sup>-transτετραϋδροκανναβινόλης (Δ<sup>9</sup>-THC), (-)-Δ<sup>8</sup>-trans-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ<sup>8</sup>-THC), (CBG), κανναβιχρωμένιου (CBC), κανναβιγερόλης κανναβινόλης (CBN), κανναβικυκλόλης (CBL), κανναβιελσοΐνης (CBE), κανναβιτριόλης (CBT), κανναβινοδιόλης (CBND) και διάφοροι τύποι (miscellaneous types) (Σχήμα 1.3) [15].



**Σχήμα 1.3** Κύριοι τύποι κανναβινοειδών στο *C. sativa* L. [23]

Μέχρι το 2015 είχαν αναφερθεί 23 ενώσεις του τύπου της Δ<sup>9</sup>-THC, 16 ενώσεις του τύπου CBG, 7 ενώσεις του τύπου CBD και 30 ενώσεις διαφόρων (miscellaneous) τύπων, με τον συνολικό αριθμό των κανναβινοειδών να φτάνει τα 120 [15].

ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	2005	2015
$\Delta^9$ -THC type	9	23
$\Delta^8$ -THC type	2	5
CBG type	8	16
CBC type	6	9
CBD type	7	7
CBND type	2	2
CBE type	5	5
CBL type	3	3
CBN type	7	11
CBT type	9	9
Miscellaneous types	14	30
Total cannabinoids	72	120
Total non-cannabinoids	419	445
Total	491	565

Εικόνα 1.10 Συστατικά που είχαν ταυτοποιηθεί τα έτη 2005 και 2015 από το C. sativa [15]

Τύπος - CBD: Η κανναβιδιόλη (CBD) καθώς και το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) αποτελούν τους κυριότερους μεταβολίτες των ποικιλιών βιομηχανικής κάνναβης [15]. Το CBDA ήταν το πρώτο από τα κανναβινοειδή οξέα που απομονώθηκε [24] και η συσχέτιση του με την CBD εξακριβώθηκε από τον Τσέχο χημικό Santavy [12]. Σε αυτόν τον τύπο έχουν περιγραφεί δευτερεύοντα κανναβινοειδή με πλευρική αλυσίδα αποτελούμενη απο ένα άτομο άνθρακα-C1 έως και πέντε άτομα άνθρακα-C5 [24].

**Τύπος - Δ<sup>9</sup>-THC:** Στο φυτό της κάνναβης παρατηρείται μια πλήθωρα ανηγμένων μορφών κανναβινόλης, που διαφέρουν ως προς τη θέση του διπλού δεσμού, τη διαμόρφωση των στερεογονικών κέντρων ή και των ισομερών μορφών [12]. Η κυριότερη εξ' αυτών είναι η trans-Δ<sup>9</sup>τετραϋδροκανναβινόλη (trans-Δ<sup>9</sup>-THC), που αποτελεί το βασικό κανναβινοειδές της φαρμακευτικής κάνναβης, σε συνδυασμό με ορισμένα στερεοϊσομερή, που εμφανίζονται ως δευτερεύοντα συστατικά. Δεν είναι σαφές εάν αυτές οι δευτερεύουσες ενώσεις παράγονται ενζυματικά ή αν αντίθετα είναι παράγωγα αποικοδόμησης της  $\Delta^9$ -THC ή της CBD [12]. Όσον αφορά τον τύπο Δ<sup>9</sup>-THC, έχει ταυτοποιηθεί μια ποικιλία ενώσεων, των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες απαρτίζονται απο ένα-C1 έως και πέντε-C5 άτομα άνθρακα [24]. Ο κύριος πρόδρομος των κανναβινοειδών αυτών είναι το Δ<sup>9</sup>-THCA-A, παρ' όλα αυτά σε πολύ χαμηλότερες συγκέντρωσεις στο φυτό συνυπάρχει και το  $\Delta^9$ -THCA-B (Σχήμα 1.4).



**Σχήμα 1.4** Χημικές δομές των Δ9-ΤΗCΑ-Α αριστερά και Δ9-ΤΗCΑ-Β δεξιά

- Τύπος Δ<sup>8</sup>-THC: Από την άλλη πλευρά, τα κανναβινοειδή που κατατάσσονται στον τύπο Δ<sup>8</sup>-THC θεωρούνται παράγωγα των Δ<sup>9</sup>-THC, και Δ<sup>9</sup>-THCA αντίστοιχα [24], που πιθανά προκύπτουν από οξειδωτική μετατόπιση του ενδοκυκλικού διπλού δεσμού είτε από ηλεκτρονιόφιλη κυκλοποίηση της CBD. [12] Την υπόθεση επιβεβαιώνει το γεγονός ότι ο διπλός δεσμός στην θέση 8,9 είναι θερμοδυναμικά σταθερότερος απ' ότι την θέση 9,10 (Εικ. 1.5). Τέλος η Δ<sup>8</sup>-THC χαρακτηρίζεται απο βιολογικά μειωμένη ενεργότητα, περίπου κατά 20%, σε σύγκριση με την Δ<sup>9</sup>-THC [24].
- Τύπος CBG: Το χαρακτηριστικό δομικό γνώρισμα των ενώσεων που χαρακτηρίζουν αυτό τον τύπου είναι η παρουσία ενός γραμμικού υπολείμματος ισοπρενυλίου [12]. Αυτή η ομάδα του ισοπρενύλιου δεν φέρει άτομο οξυγόνου, και επομένως βρίσκεται στην χαμηλότερη οξειδωτική βαθμίδα, αρα σε αρχικό στάδιο της βιοσυνθετικής πορείας εντός των κανναβινοειδών [25]. Οι κυριότερες εκ των δευτερευουσών ενώσεων αυτού του τύπου, αποτελούν είτε ανάλογα προπυλικής πλευρικής αλυσίδας είτε παράγωγα μονομεθυλαιθέρα του υδροξυλίου της θέσης 5 (Σχήμα 1.5) [24].
- Τύπος CBC: Σε αυτόν τον τύπο, το υπόλειμμα ισοπρενυλίου συντήκεται οξειδωτικά με τον δακτύλιο ρεσορκινόλης [12]. Σε πολλές ποικιλίες κάνναβης, η παρουσία του CBC φαίνεται να σχετίζεται με εκείνη της Δ<sup>9</sup>-THC,

υποδηλώνοντας την σχέση μεταξύ της οξειδάσης που εμπλέκεται στη δημιουργία των δύο αυτών κανναβινοειδών από την CBG [25]. Αντίθετα, δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση με την οξειδάση που εμπλέκεται στην δημιουργία της CBD.

- Τύπος CBN: Η κανναβινόλη και τα παράγωγα της θεωρούνται προϊόντα απομόνωσης που προέρχονται από αρωματοποίηση των αντίστοιχων παραγώγων του τύπου THC [26]. Η CBN αποτελεί ιδιαίτερα σταθερή ένωση ως προς την οξειδωτική αποικοδόμηση και επομένως έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την αναγνώριση της φαρμακευτικής κάνναβης σε αρχαιολογικά ευρήματα [26].
- Τύπος CBL: Η κανναβικυκλόλη μπορεί να παραχθεί από το CBC, όταν το τελευταίο έρθει σε επαφή με ακτινοβολία, μέσω της πραγματοποίησης μιας ενδομοριακής στερεοεκλεκτικής κυκλοποίησης [12]. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με την ρακεμική φύση των ενώσεων αυτού του τύπου, καθώς και η αυστηρή αναλογία των συγκεντρώσεων με εκείνη του CBC, υποδηλώνουν ότι πρόκειται για παραπροϊόντα που παράγονται κατά την αποθήκευση του φυτικού υλικού όταν αυτό έρχεται σε επαφή με ηλιακή ακτινοβολία.
- Τύπος CBE: Οι ενώσεις αυτού του τύπου πήραν το όνομα τους από την Elsa Boyanova, η οποία απομόνωσε τα πρώτα μέλη αυτής της κατηγορίας [12]. Αυτά τα κανναβινοειδή προέρχονται από την ενδομοριακή διάνοιξη των εποξειδίων του τύπου κανναβιδιόλης, όπου το οξυγόνο αντιδρά με το μενθύλιο [27]. Οι Uliss et al. πραγματοποιήσαν για πρώτη φορά την χημική σύνθεση της κανναβιελσοΐνης μέσω της εποξείδωσης του οξικού οξέος της CBD. Κατά την χημική διαδικάσια, το στάδιο τη υδρόλυσης του οξικού οξέος πυροδότησε την διάνοιξη του δακτυλίου οξυρανίου από ένα φαινολικό όρθουδροξύλιο, παρέχοντας μια ένωση πανομοιότυπη της κανναβιελσοΐνης [27].
- Τύπος CBT: Ενώσεις αυτού του τύπου παράγονται από την σύζευξη του διπλού δεσμού του τερπενυλίου και του δακτυλίου ρεσορκινόλης και είναι πιθανώς ενδιάμεσα της οξειδωτικής διαδικασίας που πραγματοποιείται κατά την αρωματοποίηση της Δ<sup>9</sup>-THC [12]. Η διαδικασία αυτή πυροδοτείται από την αρχική δημιουργία μιας ρίζας στον άνθρακα της θέσης 10a (Εικ. 1.5). Το κυριότερο κανναβινοειδές αυτού του τύπου είναι η κανναβιτριόλη, η οποία δεν παραλαμβάνεται ως καθαρή ένωση αλλα ως ρακεμικό μίγμα των δύο ισομερών μορφών της [24].
- Τύπος CBND: Αυτός ο τύπος ενώσεων χαρακτηρίζεται από την μετατροπή του δακτυλίου μενθυλίου της CBD, σε αρωματικό δακτύλιο θυμιλίου [12]. Δεδομένου ότι η CBD αποτελεί σταθερή ένωση σε ατμοσφαιρικές συνθήκες, πιθανολογείται ότι η διαδικασία της αρωματοποίησής της θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ενζυματικής δραστηριότητας, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι ενώσεις αυτού του τύπου αποτελούν ενδογενή κανναβινοειδή που βιοσυντίθενται στο φυτό.



Σχήμα 1.5 Σύστημα αρίθμησης κανναβινοειδών [12]

#### 1.4.3 Φαρμακολογική δράση κανναβινοειδών

Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι δράσεις της Δ<sup>9</sup>-THC οφείλονταν στην υδρόφοβη φύση της, η οποία της επέτρεπε να προκαλεί αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών [4], επομένως η ψυχοτρόπος ισχύς των κανναβινοειδών συσχετίστηκε με την ικανότητά τους να επιδρούν στις κυτταρικές μεμβράνες [11].

Ωστόσο αργότερα, μετά την σύνθεση των πρώτων εναντιομερών της THC από τους Mechoulam et al., παρατηρήθηκε ότι το εναντιομερές (-)-Δ<sup>9</sup>-THC παρουσιάζει ψυχοτρόπο δράση σε αντίθεση με το μη δραστικό εναντιομερές (+)-Δ<sup>9</sup>-THC [11], υποδεικνύοντας ότι η φαρμακολογική δράση της THC είναι στερεοεκλεκτική [4]. Το συμπέρασμα αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι το δραστικό εναντιομερές στοχεύει σε έναν συγκεκριμένο υποδοχέα. Η διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης οδήγησε στην ανακάλυψη των δύο τύπων υποδοχέων κανναβινοειδών, CB<sub>1</sub> και CB<sub>2</sub>, στους οποίους η (-)-Δ<sup>9</sup>-THC δεσμεύεται με υψηλή ισχύ (EC<sub>50</sub> στην περιοχή των nanomoles) καθώς και στο συμπέρασμα ότι τα ψυχοτρόπα αποτελέσματα της οφείλονται κυρίως στην ικανότητα να αλληλεπιδρά με τους CB<sub>1</sub> υποδοχείς του εγκεφάλου [4].

Οι υποδοχείς CB<sub>1</sub> και CB<sub>2</sub> είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (GPCRs), ή αλλιώς υποδοχέων με 7 διαμεμβρανικές περιοχές [28]. Οι κανναβινοειδείς υποδοχείς βρίσκονται κυρίως στις απολήξεις των κυττάρων του κεντρικού και του περιφερειακού νευρικού συστήματος, όπου μεσολαβούν στην αναστολή της απελευθέρωσης διαφόρων νευροδιαβιβαστών όπως η ακετυλοχολίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η 5-υδροξυτρυπταμίνη, το D-ασπαρτικό και η χολοκυστοκινίνη (Pertwee και Ross 2002) [29]. Υπάρχουν επιπλέον στοιχεία ότι οι υποδοχείς CB<sub>1</sub> εκφράζονται σε περιφερειακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων ιστών της καρδιάς, του αναπαραγωγικού και γαστρεντερικού συστήματος, και διαφόρων αγγείων, καθώς και σε ανοσοκύτταρα [4]. Οι υποδοχείς CB<sub>1</sub> εκφράζονται ευρέως σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται με την διάθεση και τις γνωστικές λειτουργίες, ενώ αντίθετα η έκφραση των CB<sub>2</sub> στον εγκέφαλο είναι πολύ χαμηλή σε φυσιολογικές συνθήκες, και μόνο κατά τη διάρκεια της φλεγμονής τα επίπεδα των υποδοχέων CB<sub>2</sub> αυξάνονται δραστικά στα αντίστοιχα κύτταρα. Γενικά, οι υποδοχείς CB<sub>2</sub> εμφανίζονται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και ένας από τους ρόλους τους είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης κυτταροκινών (κυτοκινών). Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν ενδογενείς αγωνιστές των υποδοχέων αυτών, τα λεγόμενα ενδοκανναβινοειδή, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των εικοσανοειδών (C20). Τα κυριότερα ενδοκανναβινοειδή είναι το αραχιδονοϋλο-αιθανολαμίδιο (ανανδαμίδιο) και η 2- αραχιδονοϋλο-γλυκερόλη [28].

Εκτός από τη δράση στους υποδοχείς CB<sub>1</sub> και CB<sub>2</sub>, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα κανναβινοειδή, ενδογενή και μη, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα μεγάλο εύρος υποδοχέων. Συγκεκριμένα, το ανανδαμίδιο μπορεί να ενεργοποιήσει τους βανιλλοειδείς υποδοχείς τύπου 1 (TRPV1) και ορισμένα κανναβινοειδή φαίνεται να έχουν ως στόχο υποδοχείς που προσομοιάζουν με τους κανναβινοειδείς CB<sub>2</sub> (CB<sub>2</sub>-like receptors), οι οποίοι φαίνονται να μεσολαβούν στον αποκλεισμό μετάδοσης σημάτων πόνου [28]. Υπάρχουν επιπλέον στοιχεία για δέσμευση κανναβινοειδών σε υποδοχείς που προσομοιάζουν τους TRPV1, όπως και σε υποδοχείς που προσομοιάζουν τους TRPV1, όπως και σε υποδοχείς που προσομοιάζουν τους TRPV1, όπως και σε υποδοχείς που προσομοιάζουν τους του ανανδαμιδίου με νέους GPCR υποδοχείς στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Παράλληλα, έχουν ανακαλυφθεί νέοι υποδοχείς των κανναβινοειδών Δ<sup>9</sup>-THC και CBN σε νευρικά κύτταρα του γαστρεντερικό σωλήνα [28].

Τα κανναβινοειδή λοιπόν δρουν μέσω πολλαπλών μηχανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό παρουσιάζοντας εκτεταμένο εύρος θεραπευτικών ιδιοτήτων, που έχουν μελετηθεί εκτενώς και συνεχίζονται να μελετώνται μέχρι σήμερα. Μερικές από τις σημαντικότερες θεραπευτικές δράσεις των κυριότερων κανναβινοειδών σε συγκεκριμένες ενδείξεις παρουσιάζονται παρακάτω:

#### Χρόνιος πόνος:

Υπάρχουν πλέον πολλά στοιχεία που επιβεβαιώνουν ότι οι αγωνιστές των κανναβινοειδών υποδοχέων μπορούν να μειώσουν την ένταση του οξέος πόνου, του νευροπαθητικού, του φλεγμονώδους, του σπλαχνικού καθώς και του πόνου σε καρκίνο [4]. Η αναλγησία επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των υποδοχέων CB<sub>1</sub> και CB<sub>2</sub> που εντοπίζονται σε οδούς του πόνου στον εγκέφαλο, στον νωτιαίο μυελό, στα περιφερειακά αισθητήρια νεύρα καθώς και στο δέρμα. Έχει αναπτυχθεί φαρμακευτικό σκεύασμα, το nabiximols (Sativex<sup>®</sup>), με δραστικές ουσίες τις Δ<sup>9</sup>-THC και CBD, το οποίο συνταγογραφείται για τη συμπτωματική ανακούφιση του νευροπαθητικού πόνου σε ενήλικες με πολλαπλή σκλήρυνση (σκλήρυνση κατά πλάκας). Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική αναλγητική θεραπεία για ενήλικες ασθενείς σε προχωρημένο καρκίνο [4].



Εικόνα 1.11 Φαρμακευτικό σκεύασμα Sativex<sup>®</sup>

Ο χρόνιος πόνος είναι ένας από τους πιο συχνά αναφερόμενους λόγους χρήσης της φαρμακευτικής κάνναβης σε πολιτείες όπου αυτή είναι διαθέσιμη στους ασθενείς. Η ανασκόπηση των Whiting et al., η οποία δημοσιεύθηκε το 2015, περιελάμβανε 28 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές σε 2454 ασθενείς με χρόνιο πόνο [30]. Ο νευροπαθητικός πόνος μελετήθηκε σε 17 από αυτές τις δοκιμές και σε μόλις πέντε αξιολόγηθηκε η λήψη του φυτικού υλικού της κάνναβης μέσω καπνού, με τις περισσότερες δοκιμές να διερευνούν το ολικό φυτικό εκχύλισμα στη μορφή του βλεννογονικού σπρέι nabiximols. Σε ανάλυση που περιελάμβανε επτά δοκιμές με Sativex και μία δοκιμή καπνιζόμενης κάνναβης, διαπιστώθηκε ότι τα προερχόμενα από το φυτό κανναβινοειδή είχαν 40% περισσότερες πιθανότητες να μειώσουν τον πόνο σε σχέση με τον παράγοντα ελέγχου [31]. Σε μια άλλη μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, επί συνόλου 178 συμμετεχόντων, η εισπνεόμενη κάνναβη μπορεί να παρέχει βραχυπρόθεσμη ανακούφιση για 1 στους 5 έως 6 ασθενείς με νευροπαθητικό πόνο [32].

#### Φλεγμονώδεις διαταραχές του εντέρου:

Τα φυτοκανναβινοειδή μπορούν επιπλέον να ασκήσουν αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες στο έντερο ενεργοποιώντας κυρίως τον υποδοχέα CB<sub>2</sub> και προάγοντας την επούλωση πληγών μέσω του υποδοχέα CB<sub>1</sub>. Συγκεκριμένα τα απομονωμένα κανναβινοειδή CBC, CBD και CBG, φάνηκε ότι δρουν ευνοϊκά σε πειραματικά μοντέλα φλεγμονώδους νόσου του εντέρου [8].

#### Ναυτία και έμετος από χημειοθεραπεία:

Τα φαρμακευτικά σκευάσματα Dronabinol και Nabilone που περιέχουν ως δραστική ουσία την Δ<sup>9</sup>-THC, εγκρίθηκαν το 1985 για χρήση στη θεραπεία της ναυτίας και του εμέτου που σχετίζονται με την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. [31] Στην έγκριση των σκευασμάτων αυτών οδήγησαν 28 δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε 1772 συμμετέχοντες με ναυτία και έμετο λόγω χημειοθεραπείας. Τα Dronabinol και Nabilone ελέγχθηκαν μαζί με εικονικό φάρμακο και συγκρίθηκαν με τα ως επι το πλείστον χρησιμοποιούμενα αντιεμετικά φάρμακα εκείνη την περίοδο, την προχλωροπεραζίνη και χλωροπρομαζίνη [30]. Εξετάζοντας τα δεδομένα των παραπάνω δοκιμών, οι Whiting et al. [30] κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα κανναβινοειδή έδειξαν μεγαλύτερο όφελος σε σχέση με τους δύο δραστικούς παράγοντες και το εικονικό φάρμακο. Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία ότι η CBD προκαλεί μειώση του εμετού που επάγεται από νικοτίνη, σισπλατίνη ή χλωριούχο λίθιο στο είδος Suncus murinus [4]. Αποδείχθηκε λοιπόν ότι ο μηχανισμός δράσης της CBD ως αντιεμετικό πραγματοποιείται μέσω του έμμεσου αγωνισμού στους 5-ΗΤ<sub>1A</sub> σεροτονινεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται στο εγκεφαλικό στέλεχος. Τα ευρήματα αυτά στηρίχθηκαν στο γεγονός ότι οι επιδράσεις της CBD παρεμποδίστηκαν με τη συγχορήγηση ενός εκλεκτικού ανταγωνιστή των υποδοχέων 5-ΗΤ<sub>1A</sub>. Επιπλέον η CBD παρουσίασε σημαντική δραστικότητα στην ενίσχυση της ισχύος του εκλεκτικού αγωνιστή των υποδοχέων 5-ΗΤ1Α να διεγείρει την δέσμευση του [<sup>35</sup>S]GTPγS σε κυτταρικές μεμβράνες του εγκεφάλου ποντικών. [4] Όσον αφορά το CBDA, παρόμοιες δράσεις έναντι του εμέτου και της ναυτίας έχουν καταγραφεί in vivo [33]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, το CBDA δρα με παρόμοιο μηχανισμό με το CBD, ενισχύοντας την ενεργοποίηση των 5-ΗΤ1Α υποδοχέων στο εγκεφαλικό στέλεχος των εξεταζόμενων πειραματοζώων.

#### Σκλήρυνση κατά πλάκας:

Η σκλήρυνση κατά πλάκας αποτελεί μια ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος, στην οποία η ικανότητα των νευρώνων για μετάδοση σημάτων εξασθενεί λόγω της απώλειας μυελίνης, η οποία κανονικά περιβάλλει την εξωτερική επιφάνεια πολλών νευρικών ινών. Ως συνέπεια, άτομα με αυτή την ασθένεια παρουσιάζουν μια ποικιλία συμπτωμάτων όπως τρόμο, σπαστικότητα, κυστικές διαταραχές και πόνο [4]. Τα περισσότερα από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά και επιπλέον μπορούν να προκαλέσουν πολλές παρενέργειες. Έχουν προκύψει πειστικές ενδείξεις ωστόσο, ότι η ενεργοποίηση των κανναβινοειδών υποδοχέων μπορεί να βελτιώσει τα συμπτώματα της σκλήρυνσης [4]. Συγκεκριμένα το φαρμακευτικό σκεύασμα Sativex αναφέρθηκε ως πολύ αποτελεσματική θεραπεία, ιδιαίτερα στην βελτίωση της σπαστικότητας (Alexander et al. 2016) [34]. Το Nabiximols (αντίστοιχο σκεύασμα του Sativex στην Ευρώπη) εγκρίθηκε το 2010 στο Ηνωμένο Βασίλειο για τη θεραπεία της σπαστικότητας που σχετίζεται με τη σκλήρυνση κατά πλάκας [31]. Σε μια συγκεντρωτική ανάλυση τριών μελετών οπου διερευνήθηκαν τα Nabiximols και Nabilone, διαπιστώθηκε ότι τα κανναβινοειδή ελάττωσαν τον βαθμό σπαστικότητας των ασθενών κατά -0.76 (σε κλίμακα από 0 έως 10) παρουσιάζοντας στατιστικά μεγαλύτερη τιμή από εικονικό φάρμακο [31]. Το Nabiximols είναι γενικά καλά ανεκτό από τους ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας παρουσιάζοντας χαμηλό ενδεχόμενο εθισμού, χαμηλό κίνδυνο ψυχοτρόπων επιδράσεων και καμία ένδειξη ανοχής στη δόση (Keating, 2017) [35]. Επιπλέον, η βελτίωση της σπαστικότητας, και της ποιότητα ζωής όσον αφορά την υγεία και τις δραστηριότητες των ασθενών φάνηκε να διαρκούν με την πάροδο του χρόνου. Ως εκ τούτου, η NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine) των ΗΠΑ κατέληξε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν ουσιαστικά στοιχεία για την αποτελεσματικότητας της πολλαπλής σκλήρυνσης, που έχουν αναφερθεί από τους ασθενείς [31].

#### Ανορεξία και απώλεια σωματικού βάρους:

Τα ενδοκανναβινοειδή αποτελούν αγγελιοφόρους του ανθρώπινου οργανισμού και εμπλέκονται στον συνολικό έλεγχο του σωματικού βάρους, παρεμβαίνοντας σε πολλαπλά κεντρικά και περιφερειακά ρυθμιστικά συστήματα που επιτελούν την ομοιόσταση της ενέργειας. Έχει φανεί ότι ο αποκλεισμός της σηματοδότησης των κανναβινοειδών υποδοχέων τύπου 1 (CB1) επιφέρει ως αποτέλεσμα την μείωση του σωματικού βάρους σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο [36]. Σε άτομα που πάσχουν από νευρική ανορεξία είτε βουλιμία έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση του υποδοχέα CB1 στον νησιωτικό φλοιό, στον κατώτερο κροταφικό και στον μετωπιαίο λοβό, έχοντας ως αποτέλεσμα την έκπτωση στην γευστική ικανότητα καθώς και στην συμπεριφορά που σχετίζεται με την ανταμοιβή [8]. Πραγματοποιήθηκε μελέτη σε αρουραίους με ανορεξία βασισμένη στην δραστηριότητα και η ταυτόχρονη θεραπεία με Δ<sup>9</sup>-THC και με συνθετικό αγωνιστή των CB1/CB2 υποδοχέων μπόρεσε να μειώσει σημαντικά την απώλεια του σώματικού βάρους [37]. Όσον αφορά τον άνθρωπο, τα στοιχεία για τις επιπτώσεις της κάνναβης και των κανναβινοειδών στην αύξηση της όρεξης και στη μείωση της απώλειας βάρους σε λοίμωξη HIV, κρίνονται περιορισμένα. Ομοίως, μελέτες μεμονωμένων κανναβινοειδών στην καρκινική καχεξία και στην απώλεια βάρους σχετιζόμενη με νευρική ανορεξία δεν έχουν αποφέρει ακόμη πειστικά στοιχεία ως προς την αποτελεσματικότητα [31]. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμη αρκετές μελέτες με αυτό το ζητούμενο. Σε μια τυχαιοποιημένη δοκιμή που πραγματοποιήθηκε από τους Abrams et al., αξιολογήθηκαν οι βραχυπρόθεσμες επιδράσεις των κανναβινοειδών σε ασθενείς με HIV, όπου παρατηρήθηκε αύξηση βάρους στις ομάδες που κάπνισαν κάνναβη είτε έλαβαν Dronabinol σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο [31]. Παρ'όλα αυτά, η διερεύνηση των μεταβολών στο

σωματικό βάρος των ασθενών δεν περιλαμβάνονταν στα κύρια αντικείμενα της εν λόγω μελέτης.

## Καρκίνος:

Όσον αφορά την τυχόν αντικαρκινική δράση των κανναβινοειδών, αρχικά οι επιστημονικές μελέτες επικεντρώθηκαν στην Δ<sup>9</sup>-THC. Έτσι, το 1975, οι Munson et al. ανέφεραν ότι η ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα μπορεί να επιβραδυνθεί με την χορήγηση  $\Delta^9$ -THC per os. Αργότερα, oι Sánchez et al. διαπίστωσαν ότι η Δ<sup>9</sup>-THC μπορούσε να προκαλέσει απόπτωση σε C6.9 κύτταρα γλοιώματος και δυνητικά σε ανθρώπινα κύτταρα PC-3 καρκίνου του προστάτη [4]. Μελέτες για τον μηχανισμό δράσης της Δ<sup>9</sup>-THC ανέφεραν ότι πιθανά ασκεί αντικαρκινικά αποτελέσματά μέσω απόπτωσης ή αναστολής πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, καθώς και μέσω αναστολής της αγγειογένεσης και της μετάστασης του όγκου, δράσεις που πιθανά μεσολαβούνται από τους κανναβινοειδείς υποδοχείς CB1 και CB2 [4]. Το 2006 οι Ligresti et al. μελέτησαν την αντικαρκινική δράση των CBD, CBG, CBC, CBDA και THCA σε μια μεγάλη ποικιλία καρκινικών σειρών. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι, εκ των πέντε κανναβινοειδών, η CBD είχε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, με IC<sub>50</sub>=6.0-10.6 μM, δείχνοντας σημαντικά χαμηλότερη δραστικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα. Διασαφηνίστηκε, λοιπόν, ότι η CBD προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μέσω άμεσης ή έμμεσης ενεργοποίησης των κανναβινοειδών CB<sub>2</sub> και των βανιλλοειδών TRPV1 υποδοχέων, καθώς και με ανεξάρτητη από τους προηγούμενους υποδοχείς αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου όπως επίσης και των δραστικών μορφών οξυγόνου [38].

Παρ' όλα αυτά, το μεγαλύτερο μέρος της υπάρχουσας βιβλιογραφίας αφορά προκλινικές μελέτες και επικεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό στα γλοιώματα. Σημαντική πηγή αποτελεί η ανασκόπιση των Machado Rocha et al που περιλαμβάνει 34 *in vitro* μελέτες καθώς και μελέτες σε ζώα [39]. Όλες οι μελέτες που εξετάστηκαν, εκτός από μία, έδειξαν ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να νεκρώσουν επιλεκτικά τα κύτταρα του γλοιώματος, χωρίς να βλάπτουν τα φυσιολογικά εγκεφαλικά κύτταρα. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε προκλινικό επίπεδο, τα στοιχεία που αφορούν κλινικές εφαρμογές είναι έως τώρα ελάχιστα.

## 🛠 Επιληψία:

Αρκετές κλινικές μελέτες έχουν εξετάσει την δράση της κάνναβης στις κρίσεις επιληψίας, περιλαμβάνοντας μελέτες περιπτώσεων, επιδημιολογικές μελέτες καθως και κλινικές δοκιμές [40]. Οι περιπτώσεις που εχουν μελετηθεί αναφέρουν

ότι η χρήση κάνναβης επιφέρει αντισπασμωδικά αποτελέσματα, με την πλειοψηφία να καταδεικνύει ευεργετική είτε καθόλου δράση στον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων. Στην κλινική δοκιμή των Davis et al., χορήγηθηκε ένα ομόλογο της  $\Delta^9$ -THC σε πέντε παιδιά με επιληψία, με τα αποτελέσματα να καταδεικνύουν μείωση της ανθεκτικής σε φαινοβαρβιτάλη ή φαινυτοΐνη επιληψίας grand mal στα 2 εκ των 5 παιδιών [41]. Σε μια άλλη κλινική μελέτη εξετάστηκε η θεραπευτική δράση εκχυλίσματος κάνναβης σε 75 ασθενείς με ανθεκτική επιληψία [42]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επιληπτικές κρίσεις ελέγχθηκαν σε ένα ποσοστό 57% των ασθενών και μειώθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% στο 33% των ασθενών, ενώ επιπλέον αναφέρθηκαν πρόσθετα οφέλη όπως βελτίωση συμπεριφοράς και εγρήγορσης (33%), ομιλίας (10%) και κινητικών δεξιοτήτων (10%) [42]. Επιλεγμένα παραδείγματα απεικονίζουν το ποικίλο φάσμα των αναφερόμενων αποκρίσεων. Η CBD και το προπυλικό ανάλογο της, η κανναβιδιβαρίνη (CBDV), έχουν αξιολογηθεί σε προκλινικές και κλινικές μελέτες για την αντισπασμωδική τους δράση. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους ασκούν τα αντιεπιληπτικά τους αποτελέσματα δεν είναι πλήρως κατανοητοί [8]. Σε πρόσφατη μελέτη όπου εξετάστηκαν 72 παιδιά και 60 ενήλικες με ανθεκτική στη θεραπεία επιληψία επισημάνθηκαν σημαντικές βελτιώσεις στον φαινότυπο της νόσου μετά τη θεραπεία με CBD [43]. Επιπλέον το 2018, για πρώτη φορά η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ενέκρινε το φάρμακο EPIDIOLEX<sup>®</sup>, το οποίο περιέχει CBD από το φυτό C. sativa, για τη θεραπεία δύο σπάνιων και σοβαρών μορφών επιληψίας, του συνδρόμου Lennox-Gastaut και του συνδρόμου Dravet [8].



**Εικόνα 1.12** Φαρμακευτικό σκεύασμα Epidiolex<sup>®</sup>

Άγχος:

Μια άλλη κατάσταση, κατά την οποία χρησιμοποιείται η κάνναβη είναι το άγχος. Πραγματοποιήθηκε μία δοκιμή όπου συμμετείχαν 24 άτομα με διαταραχή κοινωνικού άγχους, οι εθελοντές έλαβαν 600 mg CBD είτε εικονικό φάρμακο πριν από μια προσομοίωση δημόσιας ομιλίας [31]. Η κανναβιδιόλη συσχετίστηκε με σημαντικά μεγαλύτερη βελτίωση στον παράγοντα άγχους σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο [31]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κάνναβη μπορεί ταυτόχρονα να καταπραΰνει το άγχος αλλά και να προκαλέσει έντονο στρες [8]. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στην Δ<sup>9</sup>-THC, η οποία μπορεί σε χαμηλές δόσεις να δράσει αγχολυτικά ενώ σε οι υψηλότερες δόσεις να επιφέρει τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα [8]. Παρά ταύτα η CBD έχει αγχολυτικά αποτελέσματα τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο λόγω της δράσης της στο μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου [8].

#### Νευροεκφυλιστικές διαταραχές:

Τα ενδοκανναβινοειδή έχουν θεωρηθεί σημαντικός στόχος για τη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών παθήσεων που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η νόσος Alzheimer (AD). Αναφορικά με την επίδραση της κάνναβης στη μνήμη και την άνοια, αυτή υπήρξε αμφιλεγόμενη τα τελευταία χρόνια, με πολλά ευρήματα να αναφέρουν αντίθετα αποτελέσματα σε νεότερους και ηλικιωμένους χρήστες, τόσο σε χαμηλές όσο και σε υψηλές δόσεις κάνναβης [44]. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, είναι σε μεγάλο βαθμό αποδεκτό ότι χαμηλές δόσεις κάνναβης σε ενήλικες μπορούν να έχουν ευεργετική επίδραση στην πρόληψη ή ακόμη και τη θεραπεία της AD, με αρκετά in vitro και in vivo προκλινικά ευρήματα να καταδεικνύουν ότι ορισμένα κανναβινοειδή δρουν νευροπροστατευτικά έναντι της τοξικότητας του β-αμυλοειδούς (Αβ) και του νευρωνικού θανάτου [8]. Στην μελέτη των Suliman και συνεργατών το 2018, αναφέρθηκε ότι η Δ<sup>9</sup>-THC σε χαμηλή δόση μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο ηλικιωμένων αρουραίων και σύμφωνα με τους Currais και συνεργάτες, να προάγει την απομάκρυνση της ενδονευρωνικής συσσώρευσης του Αβ εμποδίζοντας την φλεγμονώδη απόκριση [8].

Η έκθεση της NASEM έκρινε ανεπαρκή τα στοιχεία που να υποστηρίζουν τη χρήση κάνναβης ή των κανναβινοειδών στη θεραπεία της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης καθώς και ορισμένων νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο του Huntington, κινητικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο Parkinson's ή της δυσκινησίας που προκαλείται από τη λεβοντόπα. Επιπρόσθετα δεν βρέθηκαν επαρκείς αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα στην σπαστικότητα που σχετίζεται με παράλυση, σε ασθενείς με τραυματισμό του νωτιαίου μυελού και δυστονία [31].

Πάθηση	Φυτοκανναβινοειδή	Εμπλεκόμενοι Υποδοχείς
Pain	D9-THC, CBD	Peripheral CB1 receptor, CB2 receptor, TRPV1, GPR55 AND PPARs
Multiple sclerosis	D9-THC, CBD	CB1 and CB2 receptors
Anorexia	D9-THC, CBG	CB1 and CB2 receptors
Nausea and vomiting	D9-THC	CB1 and CB2 receptors
Colitis	CBD, CBC, CBG, D9-THCA	CB2 receptor
Sleep disorders	D9-THC, CBD	CB1 and CB2 receptors
Tourette's syndrome	D9-THC, CBD	CB1 and CB2 receptors
Anxiety	CBD	CB2 receptor
Epilepsy	D9-THC, CBD, D9-THCV?	CB1 and CB2 receptors
Schizophrenia	CBD	CB2 receptor, dopamine, and serotonin receptors?
Alzheimer's disease	D9-THC, CBD	CB1 and CB2 receptors, GPR3, GPR6, and GPR12
Parkinson's disease	D9-THC?, CBD, D9-THCV,	CB1 and CB2 receptors

Εικόνα 1.13 Πίνακας δράσεων κανναβινοειδών σε διάφορες παθήσεις [8]

#### Επιδράσεις σε ένζυμα

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (ECS) αποτελεί ένα σύνθετο δίκτυο σηματοδότησης για την ομοιοστατική ρύθμιση, το οποίο περιλαμβάνει ενδογενή μόρια σηματοδότησης π.χ. ανανδαμίδιο, υποδοχείς που ανταποκρίνονται σε αυτά τα μόρια, και ένα περίπλοκο σύστημα ενζύμων και μεταφορέων [45]. Έχει φανεί ότι το σύστημα αυτό μπορεί να επηρεάσει τη βιολογία του δέρματος και συγκεκριμένα την μελανογένεση [45]. Συγκεκριμένα τα νεαρά ανθρώπινα μελανοκύτταρα φάνηκε να παράγουν ανανδαμίδιο και 2αραχιδονυλογλυκερόλη και να εκφράζουν τους υποδοχείς CB1 και CB2. Έχει αποδειχθεί ότι η CBD βελτιώνει τη δραστηριότητα του ενζύμου της **τυροσινάσης**, επάγοντας τη μελανογένεση των νεαρών ανθρώπινων επιδερμικών μελανοκυττάρων, ενεργοποιώντας, πιθανότατα με έμμεσο τρόπο, τους CB1 υποδοχείς [46]. Παρ' όλα αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το ευρύτερο αποτέλεσμα της σηματοδότησης μπορεί να είναι πιο περίπλοκο. Οι Magina et al. το 2011 διαπίστωσαν ότι ο εκλεκτικός αγωνιστής του CB1 υποδοχέα αραχιδονυλο-2-χλωροαιθυλαμίδιο (ACEA 1Μ και 10 μΜ), αναστέλλει (κατά 33.4% και 37.3%, αντίστοιχα) την μελανογένεση, σε καλλιέργειες ανθρώπινων μελανοκυττάρων μελανώματος (SK-mel-1) που συνδυάστηκαν με κερατινοκύτταρα (HaCaT) [47]. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι η διαταραχή του ECS μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη λεύκης, μιας χρόνιας δερματικής νόσου που χαρακτηρίζεται από εντοπισμένο ή γενικευμένο αποχρωματισμό του δέρματος [45].

Όσον αφορά το ένζυμο της **ελαστάσης,** έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για την εμπλοκή του ECS στην λειτουργία της ουδετερόφιλης ελαστάσης, που αποτελεί ένζυμο των ουδετερόφιλων κυττάρων. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν παχύσαρκα ποντίκια, στα οποία παρατηρήθηκε ουδετερόφιλη λευκοκυττάρωση σχετιζόμενη με την παχυσαρκία [48]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αποκλεισμός του κανναβινοειδούς υποδοχέα CB<sub>1</sub> με τον ανταγωνιστή SR141716A, είχε ως

αποτέλεσμα τη μείωση της ουδετερόφιλης λευκοκυττάρωσης, πιθανά μέσω της αναστολής της δραστικότητας της ουδετερόφιλης ελαστάσης. Παρά ταύτα η άμεση επίδραση του αποκλεισμού του κανναβινοειδούς υποδοχέα CB<sub>1</sub> στα ουδετερόφιλα και η δραστικότητα της ελαστάσης τους απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση [48]. Σε μια άλλη μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα του Sch.414319, ενός αντίστροφου αγωνιστή του υποδοχέα CB<sub>2</sub>, να μεταβάλει την δραστικότητα 45 ένζυμων συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεάσης ελαστάσης. Στην συγκέντρωση των 10 μM, ο Sch.414319 παρουσίασε ποσοστό αναστολής για την ελαστάση μόλις 1% [49].

Στην ανασκόπηση των Gowran et al., μελετήθηκε η ικανότητα των κανναβινοειδών να προστατεύουν από την υποβάθμιση του χόνδρου, σε καταστάσεις φλεγμονώδους αρθρίτιδας, καθώς και η επίδραση τους στα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal stem cells - MSCs), τους προδρόμους των χονδροκυττάρων, τα οποία συμβάλλουν στην ανάπλαση του χόνδρου [50]. Η θεραπεία των MSC με Δ<sup>9</sup>-THC ενίσχυσε τη χονδρογένεση, όπως φάνηκε από τα αυξημένα επίπεδα mRNA του κολλαγόνου ΙΙ, μέσω qPCR, χωρίς όμως η αύξηση αυτή να αποδοθεί στην αναστολή του ενζύμου της **κολλαγενάσης** [50].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

## Τεχνικές εκχύλισης

#### 2.1. Γενικά στοιχεία

Το πρώτο βήμα για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών των φαρμακευτικών φυτών, καθώς και για την περαιτέρω απομόνωση συγκεκριμένων ενώσεων, είναι εκείνο της εκχύλισης, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των επιθυμητών ενώσεων από την κυτταρική μήτρα [51]. Ιδανικά, η διαδικασία εκχύλισης θα πρέπει να είναι εξαντλητική, σε σχέση με τα συστατικά που πρέπει να αναλυθούν, ταχεία, απλή, φθηνή και επιδεκτική αυτοματοποίησης [51]. Επί του παρόντος χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών εκχύλισης. Οι μονογραφίες της Φαρμακοποιίας, οι οποίες χρησιμεύουν ως επίσημα πρότυπα για τον ποιοτικό έλεγχο πολλών φαρμακευτικών φυτών, χρησιμοποιούν κυρίως τεχνικές όπως η εκχύλιση Soxhlet, η διαβροχή, η απόσταξη με υδρατμούς κλπ. [51]. Παρ' όλα αυτά, οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης χαρακτηρίζονται από μειονεκτήματα όπως μεγάλος χρόνος εκχύλισης, έντονες χειροκίνητες διαδικασίες, υψηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών, κίνδυνος αλλοίωσης θερμοευαίσθητων ουσιών καθώς και μη ικανοποιητική αναπαραγωγιμότητα [51],[52]. Για την αντιμετώπιση των προαναφερόμενων προβλημάτων και για τη βελτίωση των διαδικασιών εκχύλισης, εισήχθησαν νεότερες τεχνικές εξαγωγής αναλυτών από τα φυτικά υλικά, όπως η εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound assisted extraction - UAE), η εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave assisted extraction - MAE), η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical fluid extraction - SFE), η εκχύλιση υπό πίεση (Pressurized liquid extraction - PLE), καθώς και η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated solvent extraction - ASE) που αποτελεί υποκατηγορία της τελευταίας [52],[53].

#### 2.2. Τεχνικές εκχύλισης στο φυτό της κάνναβης

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων στην κάνναβη πέρα από τα κανναβινοειδή, όπως τα τερπένια, φλαβονοειδή, στιλβένια, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, αλκαλοειδή, υδρογονάνθρακες, υδατάνθρακες και φαινόλες [13]. Οι κύριες πτητικές ουσίες που ανιχνεύονται στα υπέργεια μέρη του φυτού περιλαμβάνουν τόσο τα μονο- όσο και τα σεσκιτερπένια, με το *θ*-μυρκένιο και το *θ*-καρυοφυλλένιο ως πιο αντιπροσωπευτικές ενώσεις, αντίστοιχα [3]. Το *θ*-μυρκένιο διαθέτει αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αγχολυτικές ιδιότητες και το *θ*-καρυοφυλλένιο αποτελεί επίσης αντιφλεγμονώδη παράγοντα με γαστροπροστατευτική δράση [2]. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι το τελευταίο, μπορεί να συνδεθεί με τους υποδοχείς των
κανναβινοειδών CB<sub>2</sub> και σε αυτό το πλαίσιο, μπορεί να θεωρηθεί φυτοκανναβινοειδές [2].

Είναι γνωστό ότι η δραστικότητα των κανναβινοειδών ενισχύεται από την παρουσία άλλων δευτερογενών μεταβολιτών σε εκχυλίσματα *C. sativa,* παρέχοντας ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα [3]. Για παράδειγμα, τα τερπένια μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, συμβάλλοντας στα αναλγητικά, αλλά και στα ψυχωσικά αποτελέσματα και τα φλαβονοειδή μπορούν να επηρεάσουν την φαρμακοκινητική ορισμένων κανναβινοειδών, μέσω της αναστολής των ηπατικών ενζύμων του P450 [3]. Έχοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω, η σημασία της ανάπτυξης και εφαρμογής προηγμένων μεθόδων παραλαβής καθώς και ανάλυσης των εκχυλισμάτων της κάνναβης, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, προκειμένου να υπάρξει μια αξιόπιστη αξιολόγηση της χημικής σύστασης, υψηλότερη αναπαραγωγιμότητα των βιολογικών προσδιορισμών καθώς και εξασφάλιση της αποτελεσματικότητας και ασφάλειας στη φαρμακευτική χρήση [3].

Για την ταξιανθία του φυτού, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid liquid extraction - SLE), στην οποία είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης [13]. Προκειμένου να επιτευχθεί επιλεκτική εκχύλιση είτε των όξινων είτε των ουδέτερων κανναβινοειδών, είναι απαραίτητο να διαφοροποιηθεί η διαδικασία εκχύλισης, χρησιμοποιώντας κοινούς οργανικούς διαλύτες ή ένα μίγμα διαλυτών [13]. Ο συνηθέστερος διαλύτης εκχύλισης είναι η αιθανόλη (EtOH), με υψηλή απόδοση εκχύλισης λόγω της υψηλής συγγένειας της με τη μοριακή δομή των κανναβινοειδών. Σημειωτέον ότι η χρήση αιθανόλης 96% (v/v) για την εκχύλιση κανναβινοειδών περιγράφεται και στη Γερμανική Φαρμακοποιία, στη μονογραφία για το Cannabis Flos [54]. Πέραν της αιθανόλης, τα κανναβινοειδή μπορούν να διαλυθούν και να εκχυλιστούν από ένα φάσμα διαλύτων, διαφορετικής πολικότητας, όπως μεθανόλη (MeOH), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc), χλωροφόρμιο (CHCl3) και διχλωρομεθάνιο (DCM), πετρελαϊκός αιθέρας (PE), ακετόνη, είτε και μίγματα διαλυτών (π.χ. MeOH/CHCl3 9:1 (ν/ν)), τόσο για την διάκριση των χημειοτύπων του φυτού, όσο και για τον έλεγχο ποιότητας [13],[3],[55]. Επιπρόσθετα, για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου, έχει χρησιμοποιηθεί το κ-εξάνιο, που αποτελεί άπολο διαλύτη [56], ή το σύστημα κ-εξάνιο/ισοπροπανόλη (*n*-Hex/iPrOH 9:1 (ν/ν)) για χημειοταξινομική ανάλυση [57]. Το εξάνιο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί από τους Mariotti et al., για την ταξινόμηση του φυτού βάσει της περιεκτικότητας του σε THC, η οποία μπορεί να θεωρηθεί και δείκτης της ηλικίας του φυτού [58].

Όταν στόχος της ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός των όξινων κανναβινοειδών, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να παρεμποδιστεί η μετατροπή των όξινων σε ουδέτερα και έτσι να οριστεί με ακρίβεια η πραγματική σύνθεση των κανναβινοειδών στο υπό μελέτη φυτικό υλικό [13]. Αντιθέτως, για την παραγωγή εκχυλίσματος κάνναβης για φαρμακευτική χρήση είναι συνήθως προαπαιτούμενο να εξασφαλιστεί η παρουσία μόνο ουδέτερων

κανναβινοειδών, με την αποκαρβοξυλίωση των όξινων προς τα αντίστοιχα ουδέτερα. Για το σκοπό αυτό, η εκχύλιση πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία ή προηγείται ένα προκαταρκτικό στάδιο αποκαρβοξυλίωσης, το οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία (π.χ. νερό στους 100 °C για 2 ώρες) ή απουσία διαλύτη [13]. Η θερμοκρασία αποτελεί βασική παράμετρο που επηρεάζει δραματικά τη διαδικασία μετατροπής. Για να επιτευχθεί ποσοτική μετατροπή των όξινων κανναβινοειδών, είναι απαραίτητο να θερμανθεί το δείγμα σε θερμοκρασία τέτοια ώστε να προκληθεί εξάτμιση ή αποσύνθεση των ουδέτερων κανναβινοειδών, με απαραίτητη προϋπόθεση έναν κλειστό αντιδραστήρα και μια διαδικασία που θα πραγματοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να αποτραπούν οι παράπλευρες απώλειες [13].

Μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική μέθοδος για την ανάλυση ελέγχου ποιότητας που έχει προταθεί από τους Ameur et al., είναι η τεχνική CPE (cloud point extraction) εκχύλισης της THC από την ρητίνη της κάνναβης [13]. Η CPE είναι μια απλή, χαμηλού κόστους και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική στην οποία μειώνεται η κατανάλωση διαλυτών και ο χρόνος εκχύλισης και παρέχει επίσης παράγοντες εμπλουτισμού για τους αναλύτες [59]. Στην τεχνική CPE ένα υδατικό επιφανειοδραστικό διάλυμα διαχωρίζεται σε δύο διαφορετικές φάσεις ως αποτέλεσμα του σχηματισμού μικκυλίων με αλλαγή των συνθηκών, όπως η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία, το ρΗ, ο χρόνος εκχύλισης, η πίεση και ο διαχωρισμός των δύο φάσεων πραγματοποιείται με φυγοκέντριση [59]. Όσον αφορά την διαδικασία για την κάνναβη, χρησιμοποιήθηκε το μη ιονικό επιφανειοδραστικό Dowfax 20B102 που αναμείχθηκε με την ρητίνη, το άλας Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και απιονισμένο νερό [13]. Το μίγμα ανακινήθηκε και θερμάνθηκε σε θερμοκρασία 40-90 °C. Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων, της πλούσιας σε επιφανειοδραστικές ουσίες και της υδατικής φάσης, πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη του άλατος και φυγοκέντριση. Η απόδοση της εκχύλισης ήταν 60% για την ΤΗC μέσα σε διάστημα μιας ώρας [13].

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical fluid extraction - SFE), αποτελεί μια εναλλακτική, πολύ αποτελεσματική μέθοδο εκχύλισης κανναβινοειδών και τερπενίων από τις ταξιανθίες της κάνναβης. Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (Supercritical carbon dioxide - scCO<sub>2</sub>) σε αμιγή μορφή χρησιμοποιείται για την εκχύλιση κυρίως των τερπενίων και ουδέτερων κανναβινοειδών, ενώ για την αποτελεσματική εκχύλιση των όξινων κανναβινοειδών συνιστάται η χρήση συνδιαλύτη που συνήθως είναι η αιθανόλη σε χαμηλή περιεκτικότητα (2-20% σε scCO<sub>2</sub>) [13]. Γενικά, η SFE αποτελεί τεχνική παραλαβής αιθερίων ελαίων, και ποικίλων άλλων βιοδραστικών συστατικών από τα φυτά, και προτιμάται για την εκχύλιση ενώσεων που είναι ευαίσθητες στην υψηλη θερμοκρασία και στο φως, ενώ επίσης μπορεί να αναχθεί σε μεγάλη κλίμακα παραγωγής, π.χ. σε βιομηχανικές εφαρμογές [60],[13]. Στην τεχνική αυτή ως διαλύτες χρησιμοποιούνται τα υπερκρίσιμα ρευστά, τα οποία χαρακτηρίζονται από την υψηλή πυκνότητα και διαλυτική ικανότητα των υγρών, αλλά και από το χαμηλό ιξώδες των αερίων, γεγονός που τους προσδίδει αυξημένη διεισδυτική ικανότητα [61]. Ο σημαντικότερος υπερκρίσιμος διαλύτης είναι το CO<sub>2</sub>, καθώς αποτελεί ένα φθηνό διαλύτη, ασφαλή στη χρήση (μη εύφλεκτο) με χαμηλή τοξικότητα (δε συμβάλλει σημαντικά στο φαινόμενο της υπερθέρμανσης του πλανήτη καθώς είναι προσβάσιμο ως υποπροϊόν από άλλες βιομηχανικές διαδικασίες) και με απόλυτα γνωστές φυσικοχημικές ιδιότητες [60],[62],[63]. Το CO2 μεταβαίνει στην υπερκρίσιμη κατάσταση σε θερμοκρασία 304.25 K (31,1 °C) και πίεση 7.39 MPa (73.9 bar) και επανέρχεται στην αέρια υπό συνθήκες περιβάλλοντος [60]. Κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπει την ανάκτηση της διαλυμένης ουσίας παρέχοντας ένα προϊόν χωρίς υπολείμματα σε συνθήκες περιβάλλοντος [60],[62]. Το μειονέκτημα της χαμηλής πολικότητας του υπερκρίσιμου CO2 μπορεί να αντιμετωπιστεί, χρησιμοποιώντας πολικούς τροποποιητές όπως αλκοόλες, νερό, οξέα κλπ., για τη βελτίωση της απόδοσης και σε ορισμένες περιπτώσεις την επιλεκτικότητα της εκχύλισης, επεκτείνοντας έτσι το εύρος των εκχυλιζόμενων ουσιών προς πιο πολικά συστατικά [60],[62]. Επιπλέον, μικρές μετατροπές της πίεσης και της θερμοκρασίας μπορούν να μεταβάλουν την εκχυλιστική ισχύ του CO2, παρέχοντας σε ένα βαθμό εκλεκτικότητα στη διαδικασία της εκχύλισης [62].



**Σχήμα 2.1** Διάγραμμα φάσης του διοξειδίου του άνθρακα CO<sub>2</sub>[64]

Οι Rovetto και Aieta, το 2017, παρουσίασαν ως βέλτιστη τεχνική εκχύλισης των κανναβινοειδών τη SFE, αναφέροντας ότι πλεονεκτεί έναντι της παραδοσιακής εκχύλισης με διαλύτες (π.χ. με εξάνιο) από οικονομική και οικολογική άποψη [60]. Επιπρόσθετα μελέτησαν τις συνθήκες εκχύλισης τόσο των τερπενίων όσο και των κανναβινοειδών, συμπεραίνοντας ότι η προσθήκη EtOH σε ποσοστό 20% αυξάνει την ανάκτηση των κανναβινοειδών, και συγκεκριμένα την περιεκτικότητα σε THC σε σχέση με τη χρήση αμιγούς υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> [60]. Επιπλέον, οι Omar et al. διασφάλισαν απόδοση εκχύλισης για τα κανναβινοειδή έως και 90%, με EtOH ως συνδιαλύτη από την πρώτη κιόλας εκχύλιση, σε αντίθεση με τη χρήση 100% scCO<sub>2</sub>, όπου η απόδοση ήταν μικρότερη του 40% [65]. Συγκριτικά με την τεχνική της υδραπόσταξης για την παραλαβή πτητικών συστατικών, η εκχύλιση με υπερκρίσιμο

CO<sub>2</sub> παρουσιάζει πλεονεκτήματα όσον αφορά την κατανάλωση ενέργειας, λόγω του μικρού όγκου του διαλύτη που απαιτείται, δίνοντας υψηλότερα ποσοστά απόδοσης για τις πτητικές ενώσεις της κάνναβης [66]. Εκτός από τις ταξιανθίες, έχει εφαρμοστεί εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> και στο έλαιο σπόρων του *C. sativa,* που παραλήφθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και χρόνου με στόχο την αξιολόγηση της συγκέντρωσης σε τοκοφερόλες, λιπαρά οξέα και χρωστικές ουσίες. Η σύσταση του ελαίου συγκρίθηκε με αντίστοιχο έλαιο που παραλήφθηκε με *n*-Hex με τη μέθοδο Soxhlet. Παρατηρήθηκε ότι το CO<sub>2</sub> ως εκχυλιστικό μέσο, οδηγεί στην παραγωγή εκχυλισμάτων με υψηλότερη συγκέντρωση τοκοφερόλης [67].

Μία άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκχύλιση των κανναβινοειδών αλλά και για πλήθος άλλων βιοδραστικών ενώσεων όπως πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες, αρωματικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες και έλαια είναι η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasonic assisted extraction - UAE) [68]. Στην τεχνική αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν υδατικοί αλλά και οργανικοί διαλύτες, συμπεριλαμβανομένων διαλυτών που αναγνωρίζονται ως γενικά ασφαλείς (Generally recognized as safe - GRAS). Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από μειωμένη κατανάλωση διαλύτη, μειωμένο χρόνο εκχύλισης, υψηλή απόδοση σε χαμηλές θερμοκρασίες και επιλεκτικότητα σε ορισμένες περιπτώσεις [68],[69]. Η χρήση υπερήχων για σκοπούς εκχύλισης πρώτων υλών από φυτικά υλικά, αποτελεί μια οικονομική εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών διαδικασιών εκχύλισης, και παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον από βιομηχανική άποψη στο κομμάτι της βιώσιμης ανάπτυξης [68],[70]. Αυτή η τεχνική βασίζεται στο φαινόμενο του σχηματισμού φυσαλίδων οι οποίες αργότερα καταρρέουν βίαια, γεγονός που οδηγεί στην τοπική θερμοκρασίας (τάξης των 104 K) και της πίεσης (103 bar), αύξηση της διαταράσσοντας έτσι τα κυτταρικά τοιχώματα και επιτρέποντας στις ενώσεις στόχους να διαλυθούν στον διαλύτη,[71]. Στην UAE, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπ' όψιν η φύση του ιστού που εκχυλίζεται καθώς και το που εντοπίζονται τα προς εξαγωγή συστατικά στον εκάστοτε ιστό. Συγκεκριμένα, όταν τα επιθυμητά συστατικά βρίσκονται σε επιφανειακούς αδένες μπορούν με μια σχετικά ήπια υπερηχητική πίεση να απελευθερωθούν [72]. Αντίθετα, σε ιστούς όπου τα επιθυμητά συστατικά βρίσκονται εντός των κυττάρων, είναι απαραίτητη η προκατεργασία του δείγματος για την επίτευξη ταχείας και πλήρους εκχύλισης, κυρίως, μέσω της μείωση μεγέθους του εκχυλιζόμενου υλικού για τη μεγιστοποίηση της επιφάνειας που έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη [69]. Όσον αφορά στο C. sativa, η UAE χρησιμοποιείται κυρίως για την εξαγωγή βιοδραστικών συστατικών όπως οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και τα κανναβινοειδή. Οι Agarwal et al. το 2018, μελέτησαν την επίδραση τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (χρόνος, ισχύς των υπερήχων και συγκέντρωση μεθανόλης (MeOH)) στην ποσοτική παραλαβή βιοδραστικών από βιομηχανική κάνναβη. Στα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν εξετάστηκαν επίσης το ολικό φαινολικό φορτίο (TPC) καθώς και το ολικό φορτίο φλαβονοειδών (TFC) [71]. Διαπιστώθηκε ότι ο

χρόνος και η θερμοκρασία μπορεί να έχουν είτε θετικό είτε αρνητικό αντίκτυπο στην εκχύλιση. Η αύξηση του χρόνου της εκχύλισης μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση ορισμένων θερμοευαίσθητων ενώσεων λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας που παρατηρείται με την πάροδο του χρόνου. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι η εκχύλιση με υπερήχους παρουσίασε πολύ υψηλότερες τιμές απόδοσης κανναβινοειδών, TPC καθώς και TFC σε σχέση με εκείνες της τεχνικής αναφοράς (δυναμική εκχύλιση: 300 στροφές/λεπτό, 60 °C, 30 min) [71]. Η εκχύλιση με υπερήχους που πραγματοποιήθηκε για μόλις 15 λεπτά έδειξε αποτελέσματα για τα TPC, TFC και απόδοση μεγαλύτερα από το διπλάσιο της τεχνικής αναφοράς που διήρκησε 30 λεπτά. Επιπλέον, η πιθανότητα αποικοδόμησης των φαινολικών ενώσεων σε σχέση με τις πτητικές ενώσεις φάνηκε να είναι μικρότερη, γεγονός που οδήγησε στην αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του εκχυλίσματος UAE [71]. Τέλος, η αύξηση της περιεκτικότητας σε MeOH στο διαλύτη εκχύλισης φάνηκε να ευνοεί το TPC αλλά να επηρεάζει αρνητικά το TFC και την απόδοση της εκχύλισης. Η ισχύς των υπερήχων, από την άλλη πλευρά, δεν είχε καμία επίδραση σε όλα τα παραπάνω [71]. Σε αντίστοιχη έρευνα από τους Omar et al., μελετήθηκε η απόδοση σε πτητικές ενώσεις και κανναβινοειδή εκχυλισμάτων φαρμακευτικής κάνναβης με την τεχνική UAE, βάσει της βελτιστοποίησης του δυαδικού μίγματος διαλυτών και άλλων παραμέτρων της διαδικασίας [65]. Οι βέλτιστες συνθήκες εργασίας τελικά επιτεύχθηκαν με μίγμα ισοπροπανόλης/κυκλοεξανίου 1:1 (v/v) και διάρκεια υπερήχησης 5 λεπτών.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

# Αναλυτικές τεχνικές

## 3.1. Γενικά στοιχεία

Η χρωματογραφική ανάλυση γνωστή και ως χρωματογραφία, περιλαμβάνει σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού των συστατικών ενός μίγματος [73]. Κατά τον διαχωρισμό τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής (φέρουσας), που ρέει δια μέσου της στατικής, οι οποίες βρίσκονται στην χρωματογραφική στήλη [74],[73]. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές ορισμένων ιδιοτήτων των συστατικών του μίγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, το ηλεκτρικό φορτίο, το μέγεθος των μορίων κ.ά. Οι διαφορές αυτές μεταβάλλουν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικών μεταξύ των δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης [73]. Η κατανομή των συστατικών μεταξύ των δύο φάσεις την αναλογία των συγκεντρώσεων ενός συστατικού σε καθεμία από τις δύο φάσεις [74]. Έτσι, καθώς η κινητή φάση διέρχεται μέσα από την στατική προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των αναλυτών, οι οποίοι διαχωρίζονται μεταξύ τους, με αποτέλεσμα η έκλουσή τους να πραγματοποιείται σε διαφορετικούς χρόνους από την στήλη [74].

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης, τη φύση και τη μορφή της στατικής φάσης, αλλά και ως προς τον μηχανισμό διαχωρισμού [73]. Όσον αφορά τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης, η τεχνική παίρνει το όνομά της από την κινητή φάση και χωρίζεται σε αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography - GC), υγρή χρωματογραφία (Liquid chromatography - LC) και χρωματογραφία υπερκρίσιμων ρευστών (Supercritical fluid chromatography - SFC) [74]. Όσον αφορά το μηχανισμό διαχωρισμού, οι τεχνικές ταξινομούνται ανάλογα με τον μηχανισμό κατακράτησης των συστατικών από την στατική φάση στις ακόλουθες κατηγορίες: Χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρωματογραφία κατανομής, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφία συγγένειας [73].

## 3.2 Χρωματογραφικές τεχνικές στο φυτό της κάνναβης

Ως συνέπεια της ανάπτυξης όλο και περισσότερων φαρμακευτικών σκευασμάτων κάνναβης, υπάρχει μια αυξανόμενη ζήτηση για ανάπτυξη ποιοτικών και ποσοτικών μεθόδων για την ανάλυση των βιοδραστικών συστατικών της κάνναβης [13]. Κατά γενικό κανόνα, η αναλυτική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό

των κανναβινοειδών σε ένα δείγμα, θα πρέπει να ταιριάζει με την απαιτούμενη εφαρμογή. Συγκεκριμένα, ανάλυση του φυτικού υλικού της κάνναβης μπορεί να πραγματοποιείται για τον προσδιορισμό του χημειότυπου της κάνναβης (βιομηχανική ή φαρμακευτική), είτε για τον ποιοτικό έλεγχο του υλικού που μπορεί αργότερα να χρησιμοποιηθεί για ιατρικούς ή ερευνητικούς σκοπούς. Αντίθετα, η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, όπως ούρα, αίμα, μαλλιά, κλπ., είναι απαραίτητη για την παροχή αποδεικτικών στοιχείων ευφορικής χρήσης ή για μελέτες φαρμακοκινητικής [13]. Διαφορετικοί στόχοι απαιτούν διαφορετικές τεχνικές τόσο στην προετοιμασία όσο και στην ανάλυση του δείγματος.

### 3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin layer chromatography - TLC) παρουσιάζει πλεονεκτήματα σύγκριση με άλλες πιο εξελιγμένες σε τεχνικές, συμπεριλαμβανομένου του μειωμένου κόστους χρήσης, του ταχύτερου χρόνου ανάλυσης και της δυνατότητας ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων [51]. Μπορεί επιπλέον να εφαρμοστεί σε πλάκες TLC τόσο κανονικής (Normal phase silica) όσο και αντίστροφης φάσης (Reversed phase - silica C<sub>18</sub>) [13]. Η TLC χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην προκαταρκτική ημι-ποσοτική ανάλυση της περιεκτικότητας φυτικών εκχυλισμάτων σε κανναβινοειδή [13],[75]. Στο προσχέδιο της μονογραφίας των Cannabis Flos αναφέρεται η μέθοδος TLC για τον ποιοτικό προσδιορισμό των κυριότερων κανναβινοειδών στην ταξιανθία του C. sativa [13]. Οι Hazekamp et al., ανέπτυξαν μια απλή και γρήγορη μέθοδο TLC υψηλής απόδοσης (High performance thin layer chromatography - HPTLC), για τον ποσοτικό προσδιορισμό της THC καθώς και άλλων ουδέτερων κανναβινοειδών με τη χρήση πυκνομετρίας [49]. Στη μέθοδο αυτή, απαραίτητο βήμα αποτελεί η αρχική αποκαρβοξυλίωση των κανναβινοειδών για μετατροπή τους στην ουδέτερη μορφή. Αυτή η χρωματογραφική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ποιοτικού δακτυλικού αποτυπώματος της κάνναβης, καθώς επιτρέπει έναν καλό διαχωρισμό μεταξύ των ουδέτερων κανναβινοειδών (CBD, Δ<sup>9</sup>-THC, THCV, CBG και CBC), σε ιατροδικαστική ανάλυση και τέλος στον ποιοτικό έλεγχο της βιομηχανικής και φαρμακευτικής κάνναβης. Τα κανναβινοειδή τελικώς προσδιορίζονται συγκρίνοντας την τιμή του συντελεστή συγκράτησης (Rf) με εκείνη των αυθεντικών προτύπων, αφού πραγματοποιηθεί εμβάπτιση της πλάκας σε υδατικό διάλυμα άλατος fast blue B και fast blue BB, που αποτελούν εξειδικευμένα αντιδραστήρια ανίχνευσης κανναβινοειδών [13], [75]. Παρ 'όλα αυτά, η TLC παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς όσον αφορά την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία, σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, και συνεπώς τα αποτελέσματα πρέπει να λαμβάνονται προσεκτικά υπ' όψιν [13].

### 3.2.2 Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid chromatography - LC), αποτελεί μια εκ των σημαντικότερων αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στη σχετική συγγένεια των συστατικών ενός διαλύματος με την υγρή κινητή και τη στατική φάση [76]. Υπάρχουν αρκετά είδη LC (αντίστροφης φάσης, κανονικής φάσης, ανταλλαγής ιόντων), τα οποία ταξινομούνται συνήθως σύμφωνα με τον μηχανισμό που πραγματοποιείται ο διαχωρισμός καθώς και τη φύση της κινητής και στατικής φάσης. Η κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται κυρίως για τον διαχωρισμό και παραλαβή απομονωμένων συστατικών, ενώ η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ποσοτική ανάλυση ουσιών σε πολύπλοκα μίγματα [73]. Έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλες μέθοδοι LC για τον προσδιορισμό των συστατικών της κάνναβης: από αυτές η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (HPLC -MS) αποτελεί μέθοδο επιλογής για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε βιολογικά υγρά, ενώ η χρήση HPLC συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC - PDA) ενδείκνυται σε μεθόδους ρουτίνας για τον ποσοτικό προσδιορισμό κυρίων κανναβινοειδών σε δείγματα φυτικού υλικού [13]. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία (GC), οι τεχνικές που βασίζονται στην LC δεν οδηγούν σε αποικοδόμηση θερμοευαίσθητων ενώσεων καθώς λειτουργούν συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου, επιτρέποντας έτσι τον άμεσο προσδιορισμό των όξινων κανναβινοειδών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές στήλες είναι αντίστροφης φάσης (RP) με δεκαοκτυλιωμένη πηκτή πυριτίας (C<sub>18</sub>) και αποδεδειγμένα παρέχουν το βέλτιστο διαχωρισμό των κύριων κανναβινοειδών [13]. Η εύρεση της κατάλληλης στήλης, υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, είναι μείζονος σημασίας λόγω της παρουσίας πολυάριθμων συνεκλουόμενων κανναβινοειδών (Δ9-THC και  $\Delta^8$ -THC, CBDA και CBGA, CBD και CBG). Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (Ultra performance liquid chromatography - UPLC), με συνήθη διάμετρο σωματιδίων μικρότερη των 2 μm, που πλεονεκτούν στο χρόνο ανάλυσης καθώς και στην απόδοση του διαχωρισμού. Η βαθμιδωτή έκλουση θεωρείται αποτελεσματικότερη μέθοδος για τον διαχωρισμό των κύριων κανναβινοειδών βάσει της βιβλιογραφίας, ενώ λίγοι είναι οι συγγραφείς που προτείνουν την ισοκρατική έκλουση για τον ίδιο σκοπό. Γενικά, υπάρχει μία ποικιλία ανιχνευτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με την HPLC όπως ο ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA ή DAD), ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής (FLD) και ο ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (MS). Ο ανιχνευτής UV είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος για την ανάλυση των φυτικών υλικών, όπου η συγκέντρωση των κύριων κανναβινοειδών είναι σχετικά υψηλή [13], ενώ αντίθετα σε βιολογικά δείγματα όπου τα επίπεδα των αναλυτών ενδιαφέροντος είναι χαμηλά, προτιμάται ο ανιχνευτής MS καθώς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευαισθησία [77].

Όσον αφορά στον προσδιορισμό με φασματομετρία μάζας (MS), διαπιστώθηκε από τους Pellati et al. ότι τα όξινα κανναβινοειδή παρουσίασαν υψηλότερη ένταση σήματος στην τεχνική αρνητικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-), σε αντίθεση με τα ουδέτερα κανναβινοειδή και τα φλαβονοειδή (κανναφλαβίνη Α και Β) που ανιχνεύτηκαν μόνο σε θετικό ιονισμό [3]. Στον θετικό ιονισμό τα CBDA και CBGA φάνηκε να δημιουργούν ιόντα προσθήκης νατρίου [M + Na]<sup>+</sup>, εκτός των ψευδομοριακών τους ιόντων [M + H]<sup>+</sup>. Τα φάσματα MS<sup>2</sup>, που πραγματοποιήθηκαν σε θετικό ιονισμό, έδειξαν τόσο για το CBDA όσο και το CBGA βασικές κορυφές που σχετίστηκαν με την απώλεια νερού (-18 Da), το CBDA επιπλέον παρουσίασε ένα θραύσμα, που αποδόθηκε στην απώλεια μιας ομάδας C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>. Αντίστοιχα σε θετικό ιονισμό, στο φάσμα MS<sup>2</sup>, η CBD παρουσίασε θραύσμα αντίστοιχο στην απώλεια μιας ομάδας C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>, πιθανώς από την πλευρική αλυσίδα, το οποίο απουσίαζε στο φάσμα MS<sup>2</sup> της CBG [3]. Όσον αφορά τα δεδομένα MS που λήφθηκαν από αρνητικό ιονισμό, τα CBDA και CBGA παρουσίασαν ιόντα που αποδόθηκαν στην απώλεια νερού (-18 Da) και CO<sub>2</sub> (-44 Da), επιπρόσθετα με τα ψευδομοριακά τους ιόντα [M - H]<sup>-</sup>. Στα φάσματα MS<sup>2</sup> που αποκτήθηκαν σε αρνητικό ιονισμό, η CBG εμφάνισε ένα ιόν που σχετίστηκε με την απώλεια μιας ομάδας C5H8. Η θραυσματοποίηση της CBD αντίστοιχα παρείχε σχεδόν αποκλειστικά ένα ιόν, το οποίο οφειλόταν στην απώλεια μιας ομάδας C₅H<sub>8</sub>, μετά από μια αντίδραση Diels-Alder, η οποία αποτελεί κοινή οδό θραυσματοποίησης στο πεδίο των φυσικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιείται πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization - ESI) [3].

Σε άλλη μελέτη, οι Happyana και συνεργάτες, μελέτησαν την κατανομή και την περιεκτικότητα σε κανναβινοειδή, σε διαφορετικούς τύπους τριχωμάτων του *C. sativa* με HPLC-MS ανάλυση [78]. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με μέθοδο αρνητικού ιονισμού στην περίπτωση των όξινων κανναβινοειδών και θετικού για ανίχνευση των ουδέτερων κανναβινοειδών. Η εφαρμογή του LC-MS επέτρεψε την αποτελεσματική ανίχνευση και μέτρηση των κανναβινοειδών σε χαμηλή συγκέντρωση, από μικρό αριθμό διαφόρων κυττάρων τεμαχισμένων τριχοειδών [78]. Αντίθετα στην μελέτη των Pellati και συνεργατών, σε βιομηχανική κάνναβη η ανίχνευση του προφίλ των μη ψυχοδραστικών κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκε μέσω HPLC συζευγμένης είτε με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) - συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD) είτε με ανιχνευτή ιοντισμού ESI-MS και ESI-MS<sup>2</sup> [3]. Η περιεκτικότητα των πρενυλιωμένων φλαβονών, συμπεριλαμβανομένων των κανναφλαβινών Α και Β, αξιολογήθηκε επίσης με HPLC. Ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων της κάνναβης πραγματοποιήθηκε με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (HS-SPME) σε συνδυασμό με GC-MS και GC-FID [3].

## 3.2.3 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography - GC), αποτελεί μια εξίσου σημαντική και ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού σύνθετων μιγμάτων

πτητικών κυρίως συστατικών. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας διαδοχικής κατανομής των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινητής αέριας φάσης και μιας στατικής υγρής φάσης, η οποία συγκρατείται σε μια στήλη μικρής διαμέτρου [79]. Στη συνέχεια, ένας ανιχνευτής καταγράφει το ρεύμα αέρα καθώς αυτό αναδύεται από τη στήλη. Ο ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (MS), παρέχει σημαντικές δομικές πληροφορίες και υψηλή επιλεκτικότητα, γεγονός που καθιστά τον συνδυασμό αέριας χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματομετρία μαζών την πιο αποτελεσματική τεχνική για την ανάλυση σύνθετων μιγμάτων [79]. Βασικό χαρακτηριστικό της GC αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο θέρμανσης που υφίστανται τα δείγματα προς μελέτη σε υψηλή θερμοκρασία (μέχρι περίπου τους 280 °C). Η θέρμανση αυτή επιτρέπει στο υγρό δείγμα να μεταβεί στην αέρια φάση, ενώ παράλληλα οδηγεί στην αποκαρβοξυλίωση των όξινων κανναβινοειδών προς τα αντίστοιχα ουδέτερα. Επομένως το αποτέλεσμα της ανάλυσης αφορά το άθροισμα της όξινης και της ουδέτερης μορφής. Για να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο μπορεί να προηγηθεί το στάδιο της παραγωγοποίησης των οξέων, ώστε να είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ όξινης και ουδέτερης μορφής, χωρίς να είναι όμως εφικτό να επιτευχθεί μία απόδοση 100% για την παραγωγοποίηση [80]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι αυτή η θερμική μετατροπή που πραγματοποιείται στη θύρα έγχυσης του οργάνου GC είναι μερική και όχι ολική, γεγονός που υποδηλώνει αρνητικό σφάλμα στην εκτίμηση της συνολικής ποσότητας των κανναβινοειδών [81].

### 3.2.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Μια εναλλακτική μέθοδος, έναντι των συμβατικών αναλυτικών τεχνικών HPLC και GC για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance - NMR) [82]. Στην πραγματικότητα, το NMR στον ποσοτικό προσδιορισμό, αναγνωρίζεται ως μια τεχνική υψηλής ακρίβειας, αναπαραγωγιμότητας και σχετικά σύντομου χρόνου ανάλυσης σε αντίθεση με τις LC και GC, το κύριο πλεονέκτημα της όμως είναι η μειωμένη ευαισθησία έναντι κύριων μεταβολιτών που υπάρχουν στα φυτικά υλικά (χλωροφύλλη και λιπίδια), καθώς και η δυνατότητα ανάλυσης χωρίς την προκαταρκτική κατεργασία των δειγμάτων [13],[83]. Άλλο ένα πλεονέκτημα της τεχνικής αποτελούν τα φάσματα δυο διαστάσεων (2D), ως μια νέα κατεύθυνση ανάπτυξης του NMR και έχουν ιδιαίτερη σημασία καθώς μπορούν να συνδέουν σήματα μεταξύ δεσμών, δίνοντας πολλές παραπάνω πληροφορίες για την δομή των αναλυτών [84]. Παραδείγματα αυτών είναι τα ομοπυρηνικά πειράματα φασματοσκοπίας συσχέτισης (COSY), ολικής συσχέτισης (TOCSY), φαινομένου Overhauser (NOESY), φαινομένου Overhauser περιστρεφόμενου πλαισίου (ROESY) αλλά και τα ετεροπυρηνικά πειράματα της πολλαπλής κβαντικής συσχέτισης (HMQC) και της συσχέτισης πολλαπλών δεσμών (HMBC). Τα φάσματα 2D παρέχουν πληροφορίες για πρωτόνια που συνδέονται μεταξύ τους στο χώρο, βοηθώντας έτσι

στην ταυτοποίηση των μοριακών διαμορφώσεων [84]. Ωστόσο, το NMR δεν αποτελεί μια συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική λόγω του υψηλού κόστους και της αναγκαιότητας πολύ εξειδικευμένου προσωπικού [13]. Παρουσιάζει επίσης προβλήματα όπως η μειωμένη ευαισθησία, η ανάγκη δαπανηρών δευτεριωμένων διαλυτών καθώς και η ανάγκη καταστολής των σημάτων του διαλύτη [84].

Το NMR αποτελεί τεχνική επιλογής στην μεταβολομική ανάλυση της κάνναβης. Συγκεκριμένα η μελέτη 12 ποικιλιών του *C. sativa* από τους Choi και συνεργάτες, πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>Η NMR. Τα δεδομένα που λήφθηκαν υπέδειξαν ότι το THCA και το CBDA αποτελούν σημαντικούς μεταβολίτες για τη διαφοροποίηση των ποικιλιών μεταξύ τους [83]. Σε μελέτη των Peschel και Politi διερευνήθηκε η καταλληλότητα του <sup>1</sup>Η NMR σε συνδυασμό με την HPLC, για τη διάκριση τεσσάρων χημειοτύπων κάνναβης καθώς και για την ταυτοποίηση των THC, CBD, CBG, CBN, των οξέων THCA, CBDA, CBGA και τέλος των φλαβονοειδών κανναφλαβίνη A και B. Η ανίχνευση του συνόλου των πιθανών βιοδεικτών πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, μέσα από μια ποικιλία εκχυλισμάτων και συσχετίστηκε τελικώς με την ταξινόμηση των φυτών [82]. Τέλος, στη μελέτη των Happyana και συνεργατών, χρησιμοποιήθηκε επικουρικά η μέθοδος NMR για την ταυτοποίηση των κύριων κανναβινοειδών, THCA και CBDA καθώς και του CBCA σε τριχώματα του *C. sativa* [78]. Ωστόσο, τα σήματα των ουδέτερων κανναβινοειδών δεν μπόρεσαν να ανιχνευθούν στα δείγματα λόγω της παρουσίας τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις [78].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°

# Παρασκευαστικές τεχνικές

### 4.1 Γενικά στοιχεία

Από τη δεκαετία του 1990, το ενδιαφέρον για την έρευνα των φυσικών προϊόντων έχει αυξηθεί σημαντικά. Μετά από αρκετές σημαντικές εξελίξεις σε τομείς των τεχνικών διαχωρισμού, της φασματοσκοπίας αλλά και των βιολογικών δοκιμών, η προσοχή της έρευνας των φυσικών προϊόντων στράφηκε στην απομόνωση νέων χημικών ενώσεων [64]. Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των φυσικών προϊόντων, είναι: η υγρή χρωματογραφία υπό κενό (Vacuum liquid chromatography - VLC), η χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (Flash chromatography - FC), η υγρή χρωματογραφία χαμηλής πίεσης (Low pressure liquid chromatography -LPLC), η υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης (Medium pressure liquid chromatography - MPLC) καθώς και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ( High pressure liquid chromatography - HPLC) [85]. Οι τεχνικές LPLC, VLC και FC χρησιμοποιούνται κυρίως για την κλασμάτωση ακατέργαστων εκχυλισμάτων και σε σπάνιες περιπτώσεις για την παραλαβή καθαρών ενώσεων. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καθαρότητα του εκχυλίσματος ή του κλάσματος ενδιαφέροντος, ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις η MPLC είτε η ημι-παρασκευαστική HPLC οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλότερη ισχύ διαχωριστικής ικανότητας είναι προτιμότερες για τελικό καθαρισμό των φυσικών προϊόντων. Τέλος, οι παρασκευαστικές στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) που συμπεριλαμβάνουν την τεχνολογία μοριακού αποτυπώματος καθώς και χειρόμορφες στατικές φάσεις, χρήζουν μεγάλου ενδιαφέροντος στην απομόνωση καθαρών ενώσεων [85].

# 4.2 Παρασκευαστικές χρωματογραφικές τεχνικές στο φυτό της κάνναβης

Το φυτό *C. sativa* και τα συστατικά του, ως δευτερογενείς μεταβολίτες υψηλού ενδιαφέροντος, έχουν μελετηθεί και συνεχίζονται να μελετώνται διεξοδικά όπως έχει προαναφερθεί. Τελευταία το ενδιαφέρον της έρευνας έχει στραφεί στην απομόνωση των κανναβινοειδών, κύριων και δευτερευόντων καθώς και σε άλλους δραστικούς μεταβολίτες του φυτού. Για την απομόνωση των κανναβινοειδών χρησιμοποιούνται ποικίλες χρωματογραφικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της VLC, της ημι-παρασκευαστικής HPLC καθώς και της ημι-παρασκευαστικής εναντιοεκλεκτικής χειρόμορφης HPLC [15].

#### 4.2.1 Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση

κατανομής με φυγοκέντριση Н χρωματογραφία (Centrifugal partition chromatography - CPC) συγκαταλέγεται στις τεχνικές της υγρής - υγρής χρωματογραφίας [86]. Πρόκειται για μια εξέλιξη της χρωματογραφίας κατ' αντιρροή (Countercurrent chromatography - CCC), η οποία επίσης συνίσταται από διάφορες τεχνικές. Η πρώτη απ' αυτές εφευρέθηκε το 1970 από τους Ito και Bowman. Ο μηχανισμός της υγρής - υγρής χρωματογραφίας βασίζεται στην κατανομή των συστατικών ενός δείγματος, μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων ενός συστήματος διαλυτών. Το CPC εντάσσεται στην ευρύτερη κατηγορία της υδροστατικής χρωματογραφίας κατά αντιροή. Στα υδροστατικά συστήματα, ο μηχανισμός συγκράτησης της στατικής φάσης πραγματοποιείται μέσω της υδροστατικής πίεσης [86]. Στην CPC, ένα φυγοκεντρικό πεδίο, αποτελεσματικότερο από τη βαρύτητα, αποτελεί την πηγή της υδροστατικής πίεσης, του οποίου οι επιταχύνσεις μπορούν να φτάσουν μέχρι και εκατοντάδες q. Τα υδροδυναμικά συστήματα χρωματογραφίας χαρακτηρίζονται κυρίως από μια πλανητική κίνηση περιστροφής των πηνίων γύρω από δύο επίσης περιστρεφόμενους άξονες, η διάταξη αυτή βασίζεται στον κοχλία του Αρχιμήδη [86]. Στα συστήματα αυτά η στήλη κατασκευάζεται από ελικώδης σωλήνες PTFE που περιστρέφονται γύρω από έναν κυλινδρικό άξονα συγκράτησης για τη δημιουργία πολλαπλών επιπέδων πηνίων [87]. Η περιστροφή πραγματοποιείται γύρω από τον κεντρικό άξονα και προκαλεί μέσω της κίνησης των πηνίων μια έντονη ανάδευση των δύο φάσεων του διαλύτη, οι οποίες φυσιολογικά σε κατάσταση ισορροπίας σχηματίζουν ένα διφασικό σύστημα [86],[87]. Σε αυτό το φαινόμενο βασίζεται ο μηχανισμός της τεχνικής CPC, όπου δύο μη αναμίξιμα υγρά έρχονται σε γαλακτωματοποιούνται επαφή, αναμιγνύονται, και διαχωρίζονται ξανά επαναλαμβανόμενα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του φαινομένου των θεωρητικών πλακών και τον διαχωρισμό των διαλυμένων ουσιών [86],[87]. Η μία από τις δύο φάσεις τοποθετείται στον ρότορα και συγκρατείται ως στατική φάση, ενώ η άλλη αντλείται διαμέσου της προηγούμενης ως κινητή φάση [87]. Λόγω των διατμητικών δυνάμεων που υπάρχουν μεταξύ των δύο φάσεων, η κινητή διασπείρεται εντός της στατικής, παρέχοντας έτσι περιοχές στις οποίες σχηματίζονται διεπιφάνειες, όπου πραγματοποιείται η μεταφορά μάζας [86]. Ο διαχωρισμός των αναλυτών, που περιέχονται στην κινητή φάση, επιτυγχάνεται σύμφωνα με τον συντελεστή κατανομής τους (Κ<sub>D</sub>), που εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης στη στατική φάση προς τη συγκέντρωση στην κινητή φάση [88],[89]. Επομένως, τα συστατικά με υψηλότερη συγγένεια προς την κινητή φάση εκλούονται νωρίτερα, ενώ αντίθετα αυτά που παρουσιάζουν συγγένεια με την στατική εκλούονται αργότερα [86].



**Εικόνα 4.1** Φυγοκεντρικό πεδίο που σχηματίζει υδροστατική πίεση. Αποτελεί τον κύριο τρόπο συγκράτησης της στατικής φάσης σε όλα τα υδροστατικά συστήματα χρωματογραφίας [86]

Ανάλογα με την πυκνότητα των χρησιμοποιούμενων φάσεων, καθορίζονται δύο κύριοι τρόποι λειτουργίας [86]. Η CPC πραγματοποιείται σε αύξουσα ή ανιούσα (Ascending mode - ASC) λειτουργία εάν η ελαφρύτερη φάση χρησιμοποιείται ως κινητή φάση. Στην περίπτωση που η βαρύτερη φάση χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, η λειτουργία ονομάζεται φθίνουσα ή κατιούσα (Descending mode - DSC) [86].



Εικόνα 4.2 Αύξουσα και Φθίνουσα λειτουργία ως κύριοι τρόποι λειτουργίας στο CPC [86]

Συνήθως, η πιο βαριά φάση είναι περισσότερο πολική. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο μερικές φορές η αύξουσα λειτουργία ονομάζεται λειτουργία κανονικής φάσης (normal phase mode) και η φθίνουσα ονομάζεται λειτουργία αντίστροφης φάσης (reversed phase mode) [86].

Η CPC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά υλικά, αποτελεί ισχυρή παρασκευαστική τεχνική λόγω της υψηλής χωρητικότητάς, του χαμηλού κόστους των στατικών φάσεων (π.χ. μίγματα διαλυτών) και της χαμηλής κατανάλωσης διαλύτη (10 φορές χαμηλότερη από την HPLC) που την κατατάσσει στις πράσινες τεχνικές [87]. Κατά την CPC, ο χρόνος ανάλυσης ελαχιστοποιείται, ενώ επιπλέον η ανάγκη επανάληψης της μεθόδου καθώς και το φαινόμενο προσρόφησης στην στατική φάση, που παρατηρείται σε άλλες τεχνικές χρωματογραφίας, δεν επηρεάζουν την τεχνική αυτή [90]. Χρησιμοποιείται στην απομόνωση μεγάλης κλίμακας και μπορεί να δώσει υψηλές ποσότητες καθαρών ενώσεων, σε ποσοστό καθαρότητας μεγαλύτερο του 90% σε ένα μόλις στάδιο διαδικασίας [89]. Η μέθοδος επωφελείται πολλών πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με

τις παραδοσιακές μεθόδους διαχωρισμού υγρού-στερεού, όπως η ολική ανάκτηση του εγχυόμενου δείγματος, η απόδοση κορυφών με μειωμένη εμφάνιση ουράς (tailing), ο χαμηλός κίνδυνος καταστροφής του δείγματος καθώς και η ικανότητα ανάλυσης δείγματος που περιέχει σωματίδια [91]. Η τεχνική επιδέχεται βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας, καθώς με την αύξηση της ταχύτητας περιστροφής του ρότορα, αυξάνεται το φυγοκεντρικό πεδίο και κατά αυτό τον τρόπο μπορεί να αυξηθεί ο αριθμός των θεωρητικών πλακών [86]. Παρ' όλα αυτά ο ρυθμός ροής καθώς και η ταχύτητα περιστροφής του ρότορα περιορίζονται από τη μέγιστη πίεση λειτουργίας του μηχανήματος. Πέραν όλων των προτερημάτων της CPC, η επιλογή του κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών για τη σωστή λειτουργία της τεχνικής, αποτελεί μακράν την πιο χρονοβόρα και απαιτητική διαδικασία η οποία τελικά περιορίζει τη γενική χρήση της [91].

Μια απλή μέθοδος CPC χρησιμοποιήθηκε από τους Hazekamp και συνεργάτες, για την παρασκευαστική απομόνωση επτά κύριων κανναβινοειδών από ποικιλίες φαρμακευτικής και βιομηχανικής κάνναβης [92]. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά συστήματα διαλυτών και κατέστη δυνατή η λήψη καθαρών των κανναβινοειδών: (-)- $\Delta^9$ -trans-THC, CBD, CBN, CBG, (-)- $\Delta^9$ -trans-THCA, CBGA και CBDA. Όλες οι απομονωμένες ουσίες αποδείχθηκαν καθαρότερες από 90% (GC). Η μέθοδος CPC καθιστά τα όξινα κανναβινοειδή διαθέσιμα σε μεγάλη κλίμακα για βιολογικές δοκιμές και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και άλλων κανναβινοειδών από το C. sativa. Για την απομόνωση των όξινων κανναβινοειδών THCA και CBGA, οι Hazekamp και συνεργάτες, χρησιμοποίησαν το διφασικό σύστημα: κ-εξάνιο/μεθανόλη/νερό 5:3:2 (ν/ν/ν). Η υδατική φάση του συστήματος διαλυτών οξινίστηκε με 25 mM μυρμηκικού οξέος. Η ανώτερη πλούσια σε εξάνιο φάση χρησιμοποιήθηκε ως στατική, ενώ η κατώτερη υδατική χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση, έτσι η CPC πραγματοποιήθηκε σε φθίνουσα λειτουργία [92]. Ελαφρώς διαφορετική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των ουδέτερων κανναβινοειδών Δ<sup>9</sup>-THC, CBN, CBD και CBG. Αφού προηγήθηκε αποκαρβοξυλίωση των δειγμάτων, η κλασμάτωση των ουδέτερων κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διφασικό σύστημα κ-εξάνιο/ακετόνη/ακετονιτρίλιο 5:2:3 (ν/ν/ν). Η πλούσια σε ακετονιτρίλιο κατώτερη φάση χρησιμοποιήθηκε ως στατική ενώ η πλούσια σε εξάνιο ανώτερη φάση χρησιμοποιήθηκε ως κινητή, οπότε η CPC πραγματοποιήθηκε σε αύξουσα λειτουργία [92].

Η εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση (Centrifugal partition extraction - CPE) αποτελεί μια σύγχρονη τεχνική υγρής-υγρής εκχύλισης που περιλαμβάνει την κατανομή και τη μεταφορά των συστατικών ενός διαλύματος σε ένα διφασικό σύστημα διαλυτών, σύμφωνα με τον συντελεστή κατανομής τους, ομοίως με την χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (CPC) [93]. Η τεχνική CPE βασίζεται στην ίδια τεχνολογία με τη CPC με βασική διαφορά τις στήλες που χρησιμοποιούνται στην πρώτη, οι οποίες περιέχουν λιγότερα κελιά κατατμήσεων, μεγαλύτερου όγκου τα οποία διασυνδέονται μεταξύ τους με μεγαλύτερους αγωγούς [93],[94]. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν δυνατή την άντληση της κινητής φάσης με αυξημένους ρυθμούς ροής, διατηρώντας την συγκράτηση της στατικής φάσης, ενώ επίσης επιτρέπουν το χειρισμό υψηλότερων ποσοτήτων δείγματος βελτιστοποιώντας κατά αυτόν τον τρόπο την απόδοση της διαδικασίας [93],[94].

Το 1991, εισήχθη μια νέα τεχνική χρωματογραφίας κατά αντιροή που ονομάστηκε pH-zone-refining CCC. Η τεχνική εμπνεύστηκε από την τυχαία ανακάλυψη ενός οργανικού οξέος στο διάλυμα ενός δείγματος, το οποίο σχημάτισε την οξεία κορυφή ενός αναλύτη οξέος [95]. Το φαινόμενο αποδόθηκε στο βρωμοοξικό οξύ που υπήρχε στο διάλυμα, το οποίο φάνηκε να δεσμεύει τον όξινο αναλύτη, δίνοντας αυτή την κορυφή. Το οξύ αυτό ονομάστηκε μέσο συγκράτησης, αφού φάνηκε να κατακρατά την ένωση στόχο (οργανικό οξύ) στην στατική φάση, μιας και κινούνταν στην στήλη με ρυθμό χαμηλότερο από εκείνο της κινητής φάσης [95]. Η μέθοδος εξελίχθηκε αργότερα, συνδυάζοντας ένα οξύ ως μέσο συγκράτησης στην στατική φάση, με μια βάση η οποία λειτουργεί εκτοπίζοντας τους όξινους αναλύτες από την στατική προς την κινητή φάση, ώστε να εκλουστούν κατά φθίνουσα σειρά pKa και υδροφοβικότητας [96]. Η έκλουση τελικά οδηγεί σε μια σειρά από ορθογώνιες κορυφές ή ζώνες αναλυτών, σε υψηλές συγκεντρώσεις, με ελάχιστη αλληλοεπικάλυψη των κορυφών μεταξύ τους [96]. Τα κύρια πλεονεκτήματα της pHzone-refining CCC έναντι της συμβατικής CCC είναι η αυξημένη (>10 φορές) ικανότητα φόρτωσης δείγματος, η παραλαβή κλασμάτων σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, κοντά στο επίπεδο κορεσμού, η υψηλότερη απόδοση λόγω του αυξημένου μεγέθους του δείγματος και οι κορυφές έκλουσης που μπορούν να ανιχνευτούν με μετρητή ροής ρΗ σε ενώσεις που δεν φέρουν χρωμοφόρα [95]. Τέλος, η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς, ειδικά στον παρασκευαστικό διαχωρισμό αμινοξέων και πεπτιδίων, όξινων αναλυτών όπως κιχορικό οξύ, τριτερπενικά οξέα και όξινες τριτερπενικές σαπωνίνες, αλλά και σε βασικούς αναλύτες συμπεριλαμβανομένων αλκαλοειδών και φαινολικών ενώσεων [97].

Στην πρόσφατη μελέτη των Popp, Petrakis et al. αναπτύχθηκε μια αποτελεσματική μεθοδολογία για την απομόνωση των όξινων κανναβινοειδών από βιομηχανική κάνναβη [97]. Αρχικά το φυτό εκχυλίστηκε με την τεχνική SFE ώστε να ληφθεί ένα εμπλουτισμένο εκχύλισμα σε όξινα κανναβινοειδή. Στη συνέχεια, η κλασμάτωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο pH-zone-refining CPC, με διφασικό σύστημα διαλυτών: *κ*-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/αιθανόλη/νερό 8:2:5:5 (v/v/v) [97]. Στην οργανική, στατική φάση προστέθηκε τριφθοροξικό οξύ ως μέσο συγκράτησης και ως βάση χρησιμοποιήθηκε η τριαιθυλαμίνη για την έκλουση των όξινων κανναβινοειδών από βιομηχανική το CBDA σε βαθμό καθαρότητας >90%, σύμφωνα με την ανάλυση HPLC-PDA που πραγματοποιήθηκε. Ωστόσο, η καθαρότητα αυτή συσχετίστηκε με τη μορφή άλατος είτε με την πρωτονιωμένη μορφή του CBDA, επομένως ακολούθησε υγρή-υγρή

εκχύλιση για την ανάκτηση του όξινου κανναβινοειδούς. Η απόδοση του CBDA μετά την υγρή-υγρή εκχύλιση ήταν 91% (w/w) και η καθαρότητα του ορίστηκε >95%. Επιπλέον, παραλήφθηκε ένα κλάσμα εμπλουτισμένο σε CBDVA, το οποίο έπειτα από την ίδια κατεργασία ανακτήθηκε με καθαρότητα άνω του 85% [97]. Μετά από μικρές τροποποιήσεις, η μεθοδολογία αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση διαφόρων κυρίων αλλά και δευτερευόντων όξινων κανναβινοειδών που απαντούν σε διαφορετικές ποικιλίες του *C. sativa*.

### 4.2.2 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Preparative thin layer chromatography - PTLC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την απομόνωση συστατικών σε ποσότητες μεγαλύτερες από εκείνες που εφαρμόζονται στην αναλυτική TLC [98]. Οι ποσότητες αυτές κυμαίνονται από 10 mg έως και περισσότερο από 1 γραμμάριο. Στην παρασκευαστική TLC, τα υλικά προς διαχωρισμό εναποτίθενται στη silica συχνά ως μεγάλες λωρίδες, και όχι ως κηλίδες, στη ζώνη εφαρμογής του δείγματος. Μετά την ανάπτυξη, τα συστατικά ενδιαφέροντος μπορούν να ανακτηθούν με την απόξεση της ζώνης όπου έχουν προσροφηθεί στην πλάκα και αργότερα με την έκλουση της ζώνης, χρησιμοποιώντας έναν ισχυρό διαλύτη. Οι ουσίες που παραλαμβάνονται από την PTLC είναι πιθανό να χρειάζονται περαιτέρω καθαρισμό, αν όμως η καθαρότητα τους είναι επαρκής μπορεί να επακολουθήσει το στάδιο της ταυτοποίησης είτε μπορούν να εφαρμοστούν απευθείας σε μελέτες βιολογικής δραστικότητας, χημικής σύνθεσης αλλά και ως πρότυπες ουσίες αναφοράς [98]. Η μέθοδος PTLC είναι απλή, φθηνή και απαιτεί μικρότερους όγκους διαλύτη από άλλες παρασκευαστικές μεθόδους [99]. Ένα εκ των κυριότερων μειονεκτημάτων της διαδικασίας είναι εκείνο της απώλειας ενός σημαντικού ποσοστού του διαχωριζόμενου υλικού που βρίσκεται στις λωρίδες επισήμανσης πάνω στην πλάκα [100]. Ένα δεύτερο μειονέκτημα είναι ότι η χρήση θειικού οξέος καθώς και άλλων αντιδραστηρίων ανίχνευσης που απαιτούν την θέρμανση της πλάκας, καθιστούν τα θερμικά ασταθή και πτητικά συστατικά ευαίσθητα σε μετουσίωση και τέλος λόγω του ψεκασμού, σταγονίδια του αντιδραστηρίου ανίχνευσης μπορούν πιθανά να έρθουν σε επαφή με το προστατευμένο τμήμα της πλάκας αλλοιώνοντας έτσι την σύσταση των επιθυμητών ουσιών [100]. Όσον αφορά την χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας για την παραλαβή κανναβινοειδών έχει γίνει αναφορά από τους Papadakis et al. το 1983, για την απομόνωση και την ταυτοποίηση του κανναβινοειδούς φουρο[1,2-a] 4-η-πεντυλ-7,7,10-τριμεθυλ-διβενζοπυράνιο από το στερεό υπόλειμμα του καπνού της κάνναβης με την βοήθεια της τεχνικής PTLC σε συνδυασμό με παρασκευαστική αέρια χρωματογραφία [101]. Επιπρόσθετα η απομόνωση του φλαβονοειδούς κανναφλαβίνη από το C. sativa, πραγματοποιήθηκε

πρώτη φορά από τους Barrett et al. το 1984 μέσω παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας [102].

## 4.2.3 Παρασκευαστική χρωματογραφία στήλης

Ένα ευρύ φάσμα μεθόδων υγρής χρωματογραφίας στερεής στατικής φάσης, όπως η χρωματογραφία στήλης, είναι διαθέσιμο για την κλασμάτωση αλλά και τον τελικό διαχωρισμό των φυσικών προϊόντων [85]. Οι μέθοδοι της υγρής χρωματογραφίας στήλης χαρακτηρίζονται από απλούς χειρισμούς κατά την διαδικασία σε συνδυασμό με υψηλή χωρητικότητα δείγματος και σχετικά χαμηλό κόστος [85]. Ένα ακόμα πλεονέκτημα αποτελεί η πληθώρα των διαθέσιμων στατικών φάσεων, που παρέχουν διαφορετικό μηχανισμό διαχωρισμού η καθεμία. Η συμβατική υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης (Open Column Chromatography) αποτελεί μια μέθοδο απλή στην λειτουργιά και ως εκ τούτου χρήζει ευρείας εφαρμογής [103]. Ως υπόστρωμα της στατικής φάσης συνήθως επιλέγεται η πηκτή πυριτίας (silica gel), καθώς δίνει την δυνατότητα πολύ υψηλής χωρητικότητας στην φόρτωση του δείγματος όταν οι ουσίες που διαχωρίζονται διαφέρουν κατά πολύ στις τιμές των Rf τους. Συνηθέστερη είναι η φόρτωση 10 mg δείγματος ανά g πηκτής πυριτίας. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν περιορισμοί κατά την κλασσική χρωματογραφία ανοιχτής στήλης όπως ο μεγάλος χρόνος διαχωρισμού των ουσιών, η μη αναστρέψιμη προσρόφηση τους στην στατική φάση καθώς και η ασυμβατότητα της μεθόδου με πιθανά μικρά σωματίδια που δημιουργούνται [103]. Οι Dussy et al. ανέπτυξαν το 2015 μια απλή διαδικασία που βασίστηκε στην κλασσική χρωματογραφία στήλης πηκτής πυριτίας, για την απομόνωση του Δ<sup>9</sup>-THCA-A από βιομηχανική κάνναβη [81]. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια συμβατική στήλη 30 mm × 400 mm η οποία πληρώθηκε με 100 g πυριτίας (0.063-0.2 mm), 177 mg ακατέργαστου εκχυλίσματος και ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα κ-εξανίου, τολουολίου, ακετόνης και οξικού οξέος. Η έκλουση του Δ<sup>9</sup>-THCA-A ξεκίνησε στα 280 mL, το οποίο τελικά παραλήφθηκε σε καθαρότητα 96% [81].

Ως εξέλιξη της μεθόδου και προκειμένου να ξεπεραστούν μερικά από τα μειονεκτήματα της χρωματογραφίας ανοικτής στήλης, αναπτύχθηκαν εναλλακτικές προσεγγίσεις όπως εκείνη της υγρής χρωματογραφίας υπό κενό (Vacuum liquid chromatography - VLC) [103]. Σε αντίθεση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές στήλης όπου εφαρμόζεται πίεση για την αύξηση του ρυθμού ροής, στη VLC εφαρμόζεται κενό προς επιτάχυνση της κλασμάτωσης [85]. Η χρωματογραφία υπό κενό μπορεί να παρομοιαστεί με την παρασκευαστική TLC σε μορφή στήλης, όπου εφαρμόζεται κενό [64]. Η στήλη αφήνεται να στεγνώσει μετά τη συλλογή κάθε κλάσματος, παρόμοια με την παρασκευαστική TLC όπου η πλάκα στεγνώνει αφού αναπτυχθεί σε θάλαμο διαλυτών και στη συνέχεια οι ζώνες ενδιαφέροντος εκλούονται εκ νέου. Κατά την τελευταία δεκαετία, η VLC χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στον τομέα των φυσικών προϊόντων καθώς αποτελεί μια απλή στην

λειτουργία μέθοδο, με υψηλή χωρητικότητα δείγματος (δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού έως και 30 g εκχυλίσματος) και μπορεί να πληρωθεί με πηκτή πυριτίας τόσο κανονικής (μεγέθους σωματιδίων 40-60 mm) όσο και αντίστροφης φάσης [85],[103]. Το πάνω άκρο της στήλης είναι ανοιχτό και εύκολα προσβάσιμο για το δείγμα (σε υγρή μορφή είτε προσροφημένο σε απενεργοποιημένη πηκτή πυριτίας) και την κινητή φάση, η έκλουση πραγματοποιείται συνήθως βαθμιδωτά, με διαλυτές αυξανόμενης ισχύος έκλουσης [85]. Η VLC χρησιμοποιείται κυρίως στην αρχική κλασμάτωση των εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων, πριν από άλλα στάδια διαχωρισμού όπως HPLC [103]. Η μέθοδος VLC έχει χρησιμοποιηθεί για τον αρχικό διαχωρισμό εκχυλισμάτων του C. sativa, από τους Ahmed et al. με σκοπό την τελική απομόνωση κανναβινοειδών καθώς και κανναβινοειδών εστέρων [104]. Αντίστοιχα οι Radwan et al., κατάφεραν να απομονώσουν νέους μεταβολίτες από το C. sativa, συνδυάζοντας τα εκχυλίσματα των διαλυτών: αιθανόλη (EtOH), διχλωρομεθάνιο (DCM) και οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc), καθώς αυτά έδειξαν παρόμοια προφίλ TLC, σε ένα νέο εκχύλισμα το οποίο υποβλήθηκε αργότερα σε VLC [105]. Το σύστημα διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από οξικό αιθυλεστέρα και κ-εξάνιο σε αναλογίες αυξανόμενης κλίμακας πολικότητας και απέδωσε τελικά εννέα κλάσματα τα οποία διαχωρίστηκαν περαιτέρω με άλλες τεχνικές απομόνωσης [105].

### 4.2.4 Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (prep-HPLC), αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την απομόνωση φυσικών προϊόντων, χάρη στην ισχύ και την ευελιξία που τη χαρακτηρίζουν [106]. Η prep-HPLC διεξάγεται κυρίως για τον καθαρισμό ενός μίγματος, με σκοπό την περαιτέρω μελέτη των συστατικών του και μπορεί να πραγματοποιηθεί με στήλες αναλυτικές διαστάσεων 50-250 mm x 4 mm, ημιπαρασκευαστικές διαμέτρου 250 mm x 10 mm είτε με παρασκευαστικές στήλες διαμέτρου 2.2 cm και άνω [107]. Στην τεχνική αυτή, η διάμετρος των σωματιδίων της στατικής φάσης είναι πολύ μικρή, της τάξεως των 3-10 μm, και επομένως μεγάλης αντίστασης έτσι απαιτείται υψηλή πίεση για να οδηγηθεί ο διαλύτης διαμέσου της στατικής φάσης. Η prep-HPLC χαρακτηρίζεται από υψηλή διαχωριστική ικανότητα, υψηλή χωρητικότητα, ταχύτητα, και ακρίβεια [106],[108]. Οι Hazekamp et al., χρησιμοποίησαν την τεχνική αυτή για την απομόνωση των κανναβινοειδών CBG, Δ<sup>9</sup>-THC, CBGA, CBDA και THCA [92]. Παρομοίως στην μελέτη των R. Smith et al. εξετάστηκε η ρητίνη κάνναβης όπου συνήθως παρατηρούνται τα κύρια συστατικά, με τη μέθοδο HPLC. Η ίδια στήλη HPLC χρησιμοποιήθηκε σε αναλυτική αλλά και παρασκευαστική κλίμακα. Τα όξινα κανναβινοειδή Δ<sup>9</sup>-THCA και CBCA ανακτήθηκαν από τη ρητίνη με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης [109].

# 4.3 Βιολογικές δοκιμές

## 4.3.1 Δοκιμή δέσμευσης σταθερής ρίζας DPPH\*

Η τεχνική αναπτύχθηκε από τους Brand-Williams et al. [110] για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συγκεκριμένων ενώσεων και εκχυλισμάτων, και χρησιμοποιείται ευρέως καθώς αποτελεί μια εύκολη, έγκυρη και ακριβή μέθοδο [111]. Η ένωση 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) είναι μια σταθερή ρίζα η οποία φέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο σε άτομο αζώτου, το οποίο σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού. Εξαιτίας του φαινομένου αυτού, το διάλυμα της ρίζας DPPH έχει ένα βαθύ ιώδες χρώμα και παρουσιάζει έντονη απορρόφηση στα 517 nm. Η δέσμευση του μονήρους ηλεκτρονίου από αντιοξειδωτικές ουσίες που μπορούν να δώσουν ένα άτομο υδρογόνου οδηγεί σε αναγωγή της ρίζας προς 2,2-διφαινυλο-1πικρυλυδραζίνη (Εικ. 4.3), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος και την μετατροπή του χρώματος από ιώδες σε υποκίτρινο έως άχρωμο. Συνεπώς η απορρόφηση του διαλύματος στα 517 nm ελαττώνεται. Ο αποχρωματισμός του διαλύματος παρατηρείται φασματοφωτομετρικά και χρησιμοποιείται ως παράμετρος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας [111].



Εικόνα 4.3 Αναγωγή της ελεύθερης ρίζας DPPH

Όσον αφορά το είδος *C. sativa* L., το έλαιο της κάνναβης έχει μελετηθεί εκτενέστερα για την αντιοξειδωτική του δράση. Τα ευρήματα υποδεικνύουν τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ελαίου κάνναβης που πιθανά αποδίδονται στην υψηλή περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις και ιδιαίτερα σε φλαβονοειδή [112]. Σύμφωνα με την δοκιμασία δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, το έλαιο την κάνναβης παρουσίασε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα κλάσματά του, το λιπόφιλο και το υδρόφιλο, όπως παραλήφθηκαν και ελέχθηκαν από τους Smeriglio et al. [112].

Επιπροσθέτως έχει διερευνηθεί η αντιοξειδωτική δράση σε πολικά εκχυλίσματα που έχουν παραληφθεί από διάφορα φυτικά μέρη κάνναβης, όπως σπόροι, στελέχη, φύλλα και ταξιανθίες του φυτού. Συγκεκριμένα, επί του υδρομεθανολικού εκχυλίσματος σπόρων απαλλαγμένων από λιπαρά πραγματοποιήθηκε έλεγχος αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH και οι τιμές που παρουσιάστηκαν ήταν σημαντικές [113]. Το εύρος των δραστικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος στην περιοχή του IC<sub>50</sub> κυμαίνονταν στα 0.10-0.27 mg/mL, η καλή αντιοξειδωτική δράση αποδόθηκε στα διάφορα είδη φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στους σπόρους [113]. Σε αντίστοιχη έρευνα εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα το κέλυφος και ο πυρήνας σπόρων δύο διαφορετικών ποικιλιών κάνναβης σε διάφορα συστήματα διαλυτών [114]. Οι ποικιλίες σπόρων που μελετήθηκαν αποτελούν τις δύο κυρίαρχες ποικιλίες κάνναβης στην Κίνα, την 'Bama' και την 'Yunma', η οποία και αποτελεί την πρώτη καταγεγραμμένη βιομηχανική ποικιλία κάνναβης στην Ασία. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν με τη χρήση υδατικού διαλύματος ακετόνης 75% παρουσίασαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα σε απόλυτο διαλύτη (100% μεθανόλη, 100% αιθανόλη, 100% ακετόνη, και 100% απεσταγμένο νερό). Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων που ελέγχθηκαν αποδόθηκε κυρίως στα αμιδικά παράγωγα N-*trans*-caffeoyltyramine and cannabisin B.

Σε πρόσφατη μελέτη τα εκχυλίσματα των σπόρων και των βλαστών του *C. sativa* ελέγθηκαν με τη μέθοδο DPPH [115]. Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε ως ποσοστό αναστολής της σταθερής ρίζας DPPH. Το ποσοστό για τους σπόρους ήταν 40±2%, ενώ για τους βλαστούς ήταν 52±1% κατά την τρίτη ημέρα της βλάστησης και 48±3% κατά την πέμπτη ημέρα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης κατά την διαδικασία εκβλάστησης. Τέλος, όσον αφορά τις ταξιανθίες, διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητά τους από τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες κάνναβης: την 'Kompolti', την 'Tiborszallasi', την 'Antal' και την 'Carmagnola' [116]. Την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα συμφωνά με τη μέθοδο DPPH, έδειξε η ποικιλία 'Carmagnola' με περιεκτικότητα 77.578 mmol ισοδύναμων trolox ανά κιλό φυτικού υλικού και την χαμηλότερη η ποικιλία "Antal" (27.532 mmol trolox ανά κιλό). Η αντιοξειδωτική ικανότητα των πολικών εκχυλισμάτων των ταξιανθιών συσχετίστηκε με την ύπαρξη πολυφαινολικών ενώσεων.

Εμβαθύνοντας στις ουσίες της κάνναβης και συγκεκριμένα στα κανναβινοειδή, οι έρευνες περιορίζονται στα κύρια εξ' αυτών (major cannabinoids) δηλαδή στην Δ<sup>9</sup>τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC), στο Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (Δ<sup>9</sup>-THCA), και στην κανναβιδιόλη (CBD). Συγκεκριμένα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα κύρια κανναβινοειδή με τη μέθοδο αναγωγής της ρίζας DPPH χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το υδατοδιαλυτό παράγωγο της βιταμίνης Ε, Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8τετραμεθυλοχρωμανο-2-καρβοξυλικό οξύ) [117]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμές ανάλογες της αντιοξειδωτικής ικανότητας ισοδύναμων της ουσίας αναφοράς Trolox. Τα κανναβινοειδή εμφάνισαν διαφορετική ικανότητα αναγωγής της ελεύθερης ρίζας. Συγκεκριμένα η Δ<sup>9</sup>-THC είχε την υψηλότερη απόδοση σε ισοδύναμα Trolox φτάνοντας τα 669±11.1 μg Trolox/mg ουσίας, η CBD είχε 356±29.5 μg και το THCA μόλις 16±3.2 μg [117]. Παρ' όλα αυτά, τα στοιχεία στη βιβλιογραφία αναφορικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα των Δ<sup>9</sup>-THC και CBD είναι αντιφατικά. Σε έρευνα που μελετήθηκαν τα κανναβινοειδή Δ<sup>9</sup>-THC και CBD για την νευροπροστατευτική τους δράση σε κατάσταση εγκεφαλικής ισχαιμίας, και τα δύο παρουσίασαν σημαντική δράση με την CBD να υπερισχύει ως προς το αποτέλεσμα [118]. Η δράση αυτή συσχετίστηκε με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δυο μορίων και βάσει της μεθόδου DPPH που πραγματοποιήθηκε η CBD παρουσίασε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (EC<sub>50</sub> = 89.2 mM) έναντι της Δ<sup>9</sup>-THC (EC<sub>50</sub> = 464.2 mM).

Σε πρόσφατη συγκριτική μελέτη [119], εξετάστηκαν η CBD και η α-τοκοφερόλη ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μετά την προσθήκη σε εξευγενισμένο ελαιόλαδο και ηλιέλαιο. Σύμφωνα με τις μετρήσεις της δοκιμασίας DPPH φάνηκε ότι η CBD, σε σχέση με την α-τοκοφερόλη, παρουσιάζει ισχυρότερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας, αρά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις CBD (0.01%, 0.1% και 0.5%) σε φέρον έλαιο. Για το εξευγενισμένο ελαιόλαδο, μόνο οι συγκεντρώσεις 0.1% και 0.5% του CBD αύξησαν την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Στο ηλιέλαιο, η προσθήκη CBD και στις τρεις συγκεντρώσεις οδήγησε σε αύξηση της ικανότητας αναγωγής της ελεύθερης ρίζας σε σύγκριση με το ηλιέλαιο που δεν έγινε προσθήκη. Επιπλέον η μείωση των τιμών ECso ήταν ευθέως ανάλογη της προστιθέμενης συγκέντρωσης του CBD. Παρόλα αυτά επισημαίνεται ότι πρέπει να διερευνηθούν διεξοδικά η συγκέντρωση και οι συνθήκες βάσει των οποίων η CBD παρουσιάζει αντιοξειδωτικό ή προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα, γνωρίζοντας ότι η χρήση μιας μόνο δοκιμής μπορεί να είναι παραπλανητική [119].

Τέλος όσον αφορά τα κανναβινοειδή που απαντώνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (minor cannabinoids), δεν υπάρχει ακόμα βιβλιογραφία που να εξετάζει την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο αναγωγής της ελεύθερης ρίζας DPPH.

# 4.3.2 Προσδιορισμός ολικού φορτίου φλαβονοειδών (Total flavonoid content – TFC)

Μπορούν να διακριθούν δύο κύριες μέθοδοι φασματοφωτομετρίας για τον προσδιορισμό του ολικού φορτίου των φλαβονοειδών [120]. Η πρώτη (Χρωματομετρική Μέθοδος Χλωριούχου Αργιλίου) είναι εκλεκτική για τον προσδιορισμό φλαβονολών και φλαβονών τύπου λουτεολίνης και η απορρόφηση της μετράται στα 410-430 nm. Η δεύτερη (Χρωματομετρική Μέθοδος Νιτρώδους Νατρίου) είναι εκλεκτική μόνο για κατεχίνες και τα φλαβονοειδή ρουτίνη και λουτεολίνη. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε κυρίως στο παρελθόν για τον προσδιορισμό κατεχολικών ομάδων και περιλαμβάνει μέτρηση της απορρόφησης στα 510 nm σε αλκαλικό περιβάλλον. Η Χρωματομετρική Μέθοδος του Χλωριούχου Αργιλίου είναι εγκυρότερη καθώς η ύπαρξη ενώσεων με κατεχολικές ομάδες που δεν αποτελούν φλαβονοειδή δεν φάνηκε να επηρεάζει το αποτέλεσμα της μέτρησης σημαντικά, σε αντίθεση με την μέθοδο του Νιτρώδες Νατρίου [120].



Σχήμα 4.1 Χημικές δομές των φλαβονοειδών [120]

Η αρχή της χρωματομετρικής μεθόδου χλωριούχου αργιλίου βασίζεται στην ιδιότητα του τρισθενούς αργιλίου (Al<sup>3+</sup>) να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με την C-4 καρβονυλομάδα, καθώς και την C-3 και C-5 υδροξυλομάδα των φλαβονοειδών σε όξινο περιβάλλον. Επιπροσθέτως, το χλωριούχο αργίλιο μπορεί να σχηματίσει ασταθή σύμπλοκα με τις κατεχολικές ομάδες των δακτυλίων A ή B των φλαβονοειδών σε όξινο περιβάλλον. Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται παρουσιάζουν εύρος απορροφήσεων, δίνοντας λ<sub>max</sub> στην περιοχή 410-430 nm. Τέλος, ο προσδιορισμός του περιεχομένου σε φλαβονοειδή μπορεί να εκφράστεί σε ισοδύναμα προτύπου κερκετίνης [121].

Όσον αφορά στο *C. sativa*, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τον προσδιορισμό του ολικού φορτίου φλαβονοειδών, με την μέθοδο χρωματομετρικής ανάλυσης χλωριούχου αργιλίου. Συγκεκριμένα στο έλαιο κάνναβης, καθώς και στο λιπόφιλο και υδρόφιλο κλάσμα του ελαίου προσδιορίστηκαν τα φλαβονοειδή σε ανάλογα κερκετίνης ανά 100 g φρέσκου φυτού [112]. Τα συνολικά φλαβονοειδή είχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο έλαιο όπου έφτασαν τα 2,780.4±133.06 mg κερκετίνης ανά 100 g φυτού, στο οργανικό κλάσμα η συγκέντρωση τους ήταν 1,027.3±78.01 mg/100 g και τέλος στο υδατικό κλάσμα η συγκέντρωση έφτασε μόλις τα 157±1.10 mg/100 g. Επιπροσθέτως έχει μελετηθεί ως προς το ολικό φορτίο σε φλαβονοειδή το αλκοολικό εκχύλισμα σπόρων απαλλαγμένων από λιπαρά τριών ποικιλιών *C. sativa* (ποικιλίες 'Carmagnola', 'Futura 75' και 'Felina 32') οι οποίες καλλιεργήθηκαν σε δύο διαφορετικές τοποθεσίες της Ιταλίας, την Τreviglio και την Cavriana (επαρχία Lombardia) [113]. Στην περιοχή Treviglio την μεγαλύτερη

συγκέντρωση της υπολογίστηκε ίση με 10.90±0.44 mg ισοδύναμα ρουτίνης ανά 100mg φυτού, ακολούθησε η 'Carmagnola' με 7.33±0.59 mg στα 100 mg και τελευταία η 'Futura 75' με συγκέντρωση  $5.39\pm0.23$  mg στα 100 mg. Στην περιοχή Cavriana τα πράγματα ήταν διαφορετικά με την ποικιλία 'Carmagnola' να περιέχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, 9.78±0.63 mg ισοδύναμων ρουτίνης ανά 100 mg φυτού. Η 'Futura 75' ακολούθησε με 9.28±0.83 mg στα 100 mg, και τελευταία ήταν η 'Felina' με 7.67±0.67 mg στα 100 mg. Τέλος, σε συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά εκχυλίσματα φύλλων του φυτού *C. sativa*, φάνηκε ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή ήταν υψηλότερη στα εκχυλίσματα μεθανόλης και αιθανόλης (59.03 ± 1.31 και 56.00 ± 1.85 mg ισοδύναμων κερκετίνης ανά g φυτικού υλικού, αντίστοιχα), ακολουθούμενη από τα εκχυλίσματα εξανίου και ακετόνης (17.35±0.43 και 12.08±0.62 mg ισοδύναμων κερκετίνης ανά g φυτού) [122].

## 4.3.3 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου (Total Phenolic Content-TPC)

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αποτελεί μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες χρωματομετρικές μεθόδους για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού φορτίου, ενώ η εφαρμογή της περιγράφεται σε αρκετές Φαρμακοποιίες [123]. Ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των φασματοφωτομετρικών μεθόδων και χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος και ευκολία στην εκτέλεση [123]. Η Folin-Ciocalteu αποτελεί μια βελτιωμένη, με υψηλότερη ευαισθησία και επαναληψιμότητα έκδοση της μεθόδου Folin-Denis [124]. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελείται από ένα μίγμα σύνθετης δομής φωσφομολυβδαινικών και φωσφοβολφραμικών οξέων. Όταν τα μέταλλα του βολφραμίου και του μολυβδαινίου έρθουν σε επαφή με αναγωγικούς παράγοντες όπως φαινολικές ενώσεις, ανάγονται προς σχηματισμό ενός μπλε χρωμοφόρου συμπλόκου φωσφοβολφραμίου-φωσφομολυβδαινίου [125]. Το σχηματιζόμενο κυανό σύμπλοκο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή των 760 nm. Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το αντιδραστήριο μόνο σε αλκαλικές συνθήκες, γι αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) προς ρύθμιση του pH. Τέλος, οι φαινολικές ενώσεις που προσδιορίζονται εκφράζονται σε ισοδύναμα προτύπου γαλλικού οξέος [123].

Όσον αφορά το *C. sativa* αξιολογήθηκε το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (σε όρους ισοδυνάμων γαλλικού οξέος, mg/L) διαφόρων κλασμάτων από φύλλα, στελέχη και ταξιανθίες του φυτού χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Folin-Ciocalteu [126]. Όλα τα κλάσματα παρουσίασαν ένα εύρος τιμών ολικού φαινολικού περιεχομένου. Οι φαινολικές ενώσεις κατανεμήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών κλασμάτων ως εξής: το κλάσμα της 1-βουτανόλης είχε την μεγαλύτερη περιεκτικότητα, ακολούθησε το μεθανολικό, το κλάσμα του *κ*-εξανίου, του οξικού αιθυλεστέρα και τελευταίο του χλωροφορμίου. Μία άλλη συγκριτική μελέτη κατέγραψε την περιεκτικότητα του

ολικού φαινολικού περιεχόμενου των φύλλων του *C. sativa* σε διαφορετικούς διαλύτες [122]. Οι μέγιστες περιεκτικότητες παρατηρήθηκαν στο εκχύλισμα της μεθανόλης και του απεσταγμένου νερού (36.42±1.905 και 29.98±0.56 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g φυτικού υλικού αντίστοιχα). Ωστόσο, οι χαμηλότερες περιεκτικότητες φαινολικών καταγράφηκαν στα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της αιθανόλης (12.16±0.977 και 2.70±0.109 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά g φυτικού). Τέλος οι σπόροι, το αλεύρι και το έλαιο κάνναβης της ποικιλίας 'Fedora' που αναλύθηκαν με την παραπάνω μέθοδο περιείχαν 767±41 mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος ανά [127].

### 4.3.4 Μελέτη αναστολής δραστικότητας τυροσινάσης

Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την οξείδωση μεγάλης ποικιλίας μονοκαι πολυφαινολών. Το ένζυμο συμμετέχει άμεσα στην υδροξυλίωση μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (δραστικότητα μονοφαινολάσης) και στην οξείδωση ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (δραστικότητα διφαινολάσης). Συγκεκριμένα στον άνθρωπο η τυροσινάση είναι υπεύθυνη για την οξείδωση της τυροσίνης και της ντοπαμίνης [128]. Η τυροσίνη είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της μελανίνης στα θηλαστικά επομένως πιθανές μεταλλάξεις που απενεργοποιούν την δραστικότητα της, μπορούν να οδηγήσουν σε αλμπινισμό, πάθηση στην οποία απουσιάζει η μελανίνη [129]. Αντιθέτως σε καταστάσεις όπου διεγείρεται η παραγωγή μελανίνης όπως στην υπερμελάχρωση, στόχο αποτελεί η αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης [128]. Η δράση της τυροσινάσης στη βιοσυνθετική οδό της μελανίνης έγκειται κυρίως στην κατάλυση της οξείδωσης της L-τυροσίνης σε ντοπακινόνη (DQ), η οποία αποτελεί πρόδρομο για τη βιοσύνθεση της ευμελανίνης και της φαιομελανίνης. Η 3,4διϋδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA) επίσης οξειδώνεται από την τυροσινάση προς DQ [128].



Εικόνα 4.4 Αποκλίσεις των οδών μελανογένεσης [129]

Η δοκιμασία αναστολής τυροσινάσης χρησιμοποιείται συνήθως για τη μελέτη των λευκαντικών ιδιοτήτων φυσικών εκχυλισμάτων καθώς και καθαρών ενώσεων. Η τυροσινάση από μανιτάρια *Agaricus bisporus* είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη σε αντίστοιχες έρευνες [128],[130].



**Σχήμα 4.2** Δομή L-DOPA [131]

Η αναστολή της τυροσινάσης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Κατά τη μέθοδο χρησιμοποιείται L-DOPA ως υπόστρωμα και τελικώς προσδιορίζεται η απελευθέρωση ντοπακινόνης. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 475 nm [130].

Πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε αιθανολικό εκχύλισμα σπόρων του C. sativa το οποίο είχε υποστεί ζύμωση από βακτήρια του είδους Lactobacillus plantarum [132]. Το εκχύλισμα αυτό παρουσίασε ανασταλτική δράση για το ένζυμο της τυροσινάσης. Σε συγκριτική μελέτη, εκατό διαφορετικά φυτικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης και της αυτοοξείδωσης του DOPA in vitro ώστε να διασαφηνιστεί η λευκαντική τους δράση [133]. Ένα από αυτά τα εκχυλίσματα ήταν το εκχύλισμα μεθανόλης-νερού 80:20 (v/v) των σπόρων του C. sativa, το οποίο όμως δεν έδειξε δράση αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης. Συγκεκριμένα στην συγκέντρωση αναφοράς 333 μg/mL έδειξε ποσοστό αναστολής μόλις 3%. Σε αντίστοιχη μελέτη [134], εξετάστηκαν επιλεγμένα παραδοσιακά κινέζικα βότανα για καλλυντικές τους εφαρμογές, μια εκ των οποίων ήταν και η λευκαντική δράση. Η μελέτη επιβεβαίωσε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα των σπόρων κάνναβης δεν αναστέλλει το ένζυμο της τυροσινάσης. Αντίθετα το αιθέριο έλαιο της κάνναβης έδειξε δραστικότητα αναστολής της τυροσινάσης ανάλογη με 35.95±3.19 mg Kojic acid ανά g φυτικού υλικού και το αρωματικό ύδωρ δραστικότητα αντίστοιχη με 28.24±1.94 mg Kojic acid ανά g [135]. Η δράση του ελαίου αποδόθηκε στη υψηλή του περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά, όπως το (Ε)καρυλοφυλλένιο, το οξείδιο του καρυοφυλλενίου και το χουμουλένιο, ουσίες γνωστές για την ανασταλτική τους δράση προς το ένζυμο της τυροσινάσης.

### 4.3.5 Μελέτη αναστολής δραστικότητας ελαστάσης

Σύμφωνα με κλινικές μελέτες, ο σχηματισμός ρυτίδων στο ανθρώπινο δέρμα έχει συσχετισθεί με την απώλεια της ελαστικότητας του δέρματος [136]. Η μείωση της ευκαμψίας του δέρματος οφείλεται στην αλλοίωση της τρισδιάστατης δομής των ελαστικών ινών. Στο ανθρώπινο δέρμα υπάρχουν δυο τύποι ελαστάσης, η ελαστάση των ουδετερόφιλων και η ελαστάση των δερματικών ινοβλαστών [136]. Η ελαστάση των ουδετερόφιλων είναι πρωτεϊνάση σερίνης, ενώ η ελαστάση των ινοβλαστών του δέρματος ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοπρωτεϊνασών και έτσι διαφέρουν σημαντικά στην εξειδίκευση του υποστρώματος. Η ελαστάση των ουδετερόφιλων μπορεί να αποδομήσει όλους τους τύπους ελαστικών ινών σε αντίθεση με την ελαστάση των ινοβλαστών που έχει περιορισμένη επίδραση στις ώριμες ελαστικές ίνες. Οι ελαστάσες εμπλέκονται στον μεταβολισμό των ελαστικών ινών σε διάφορους τύπους ιστών κατά τη διάρκεια κάποιας φλεγμονής είτε ασθένειας καθώς και κατά τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης [137].

Ο τρίτος τύπος ελαστάσης, η παγκρεατική ελαστάση, είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 240 αμινοξέα, τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες και η μοριακή της μάζα είναι περίπου 25.9 kDa [138]. Ανήκει στην υποοικογένεια των πρωτεϊνασών σερίνης, είναι δηλαδή ένας ειδικός τύπος πρωτεϊνάσης που στην ενεργό θέση έχει το αμινοξύ σερίνη. Αρχικά θεωρήθηκε ότι εκφράζεται μόνο στο πάγκρεας. Ωστόσο, αργότερα ανακαλύφθηκε ότι εκφράζεται και στα βασικά στρώματα της επιδερμίδας. [139] Όπως και άλλες παγκρεατικές πρωτεϊνάσες, οι ελαστάσες συντίθενται ως αδρανείς πρόδρομοι που ονομάζονται προελαστάσες και αποθηκεύονται στα κύτταρα του παγκρέατος. Το αρχικά αδρανές ζυμογόνο ενεργοποιείται αργότερα στο δωδεκαδάκτυλο από την θρυψίνη [140]. Σε αντίστοιχες έρευνες αναστολής της ελαστάσης, το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ένζυμο αποτελεί η παγκρεατική ελαστάση χοίρου [141].

Η ελαστατινάλη είναι μια ουσία που έχει απομονωθεί από διάφορα είδη ακτινομυκήτων. Αποτελεί ισχυρό μη αναστρέψιμο ανταγωνιστικό αναστολέα της παγκρεατικής ελαστάσης [142], και μπορεί να αναστείλει το ένζυμο σε ποσοστό έως και 100% ανάλογα με την συγκέντρωση της. Στο πείραμα ελέγχου της αναστολής της δράσης της ελαστάσης, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της σωστής λειτουργικότητας του ενζύμου [143].

Η αναστολή της παγκρεατικής ελαστάσης από τα εξεταζόμενα δείγματα εξετάζεται φασματοφωτομετρικά χρησιμοποιώντας N-ηλεκτρυλο-Ala-Ala-Ala-Ala-π-νιτροανιλίδιο ως υπόστρωμα και παρακολουθείται η απελευθέρωση της *π*-νιτροανιλίνης. Η ποσότητα της *π*-νιτροανιλίνης που απελευθερώνεται προσδιορίζεται με μέτρηση στα 405 nm [142].

Έως τώρα δεν έχουν πραγματοποιηθεί πειραματικές μελέτες για την δράση είτε των εκχυλισμάτων είτε των κύριων κανναβινοειδών του είδους *C. sativa* προς το ένζυμο της ελαστάσης.

# 4.3.6 Μελέτη ενεργοποίησης υποδοχέων - διαύλων παροδικού δυναμικού (Transient Receptor Potential- TRP)

Προκειμένου να επιβιώσουν, οι οργανισμοί προσαρμόστηκαν να αισθάνονται γρήγορα και με ακρίβεια το περιβάλλον γύρω τους [144]. Μια ομάδα βιομορίων που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ερμηνεία των περιβαλλοντικών αυτών ερεθισμάτων είναι η κατηγορία των διαύλων ιόντων παροδικού δυναμικού – TRP, που αποτελούν μεμβρανικές πρωτεΐνες αξιοσημείωτης ποικιλομορφίας στους μηχανισμούς ενεργοποίησης και επιλεκτικότητας τους [144], [145]. Η υπεροικογένεια

TRP των θηλαστικών αποτελείται από έξι υποοικογένειες, με κυριότερες εξ' αυτών τις TRPV, TRPA και TRPM [144]. Οι TRP, αποτελούν μη εκλεκτικούς διαύλους κατιόντων που συμβάλλουν στην μετάδοση σήματος μέσω της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης είτε της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>) και είναι κυρίως παρόντες στους αισθητήριους νευρώνες, διαδραματίζοντας κύριο ρόλο σε οδούς του πόνου [146], [144]. Οι TRP φυσιολογικά ενεργοποιούνται από ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα όπως μεταβολή της θερμοκρασίας και του pH, μηχανικά ερεθίσματα καθώς και από διάφορα ενδοβανιλλοειδή και ενδοκανναβινοειδή μόρια, τα οποία παράγονται υπό φλεγμονώδεις συνθήκες [147]. Οι δίαυλοι αυτοί ανταποκρίνονται σε μοριακό επίπεδο σε φυτικούς δευτερογενείς μεταβολίτες όπως η καψαϊκίνη και ενώσεις που δίνουν την αίσθηση καύσου ή ψύξης [146]. Πολλά από αυτά τα κανάλια αποτελούν στόχο και για κανναβινοειδή όπως η Δ<sup>9</sup>-THC, η CBD, η CBN καθως και άλλα δευτερεύοντα κανναβινοειδή. Η δράση των αγωνιστών οφείλεται στην ταχεία και έντονη ενεργοποίηση των υποδοχέων, προκαλώντας κατ' αυτό τον τρόπο άμεση και παρατεταμένη απευαισθητοποίηση του διαύλου, είτε και ενδεχόμενο εκφυλισμό λόγω τοξικότητας από υπερδιέγερση [147]. Όπως προαναφέρθηκε, η αναλγητική δράση του φυτού είναι γνωστή τόσο από τις αναφορές των χρηστών φαρμακευτικής κάνναβης, όσο και από κλινικές μελέτες που επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα της στον χρόνιο πόνο. Η δράση αυτή αποδίδεται κυρίως στα κανναβινοειδή συστατικά, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι στοχεύουν εξειδικευμένους διαύλους ιόντων οι οποίοι σχετίζονται με το αίσθημα του πόνου [144]. Οι Starkus και Jansen [146], μελέτησαν την επίδραση των κανναβινοειδών CBD, CBN, CBDV, και CBG στην φυσιολογία των διαύλων TRPV1 TRPV2, TRPM8 και TRPA1, που εμπλέκονται σε οδούς μετάδοσης του πόνου, διαπιστώνοντας την ικανότητα των κανναβινοειδών αυτών να ενεργοποιούν τους διαύλους με διαφορετική ισχύ το καθένα.

# <u>Β. Προσωπικά Δεδομένα</u>

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

## Σκοπός

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτελεί η απομόνωση δευτερευόντων κανναβινοειδών από τα υπέργεια μέρη καλλιεργούμενης βιομηχανική κάνναβης (Cannabis sativa L.) στην Ελλάδα. Στο πλαίσιο αυτό εφαρμόστηκαν τόσο σύγχρονες όσο και κλασικές τεχνικές εκχύλισης, κλασμάτωσης και απομόνωσης, σε συνδυασμό με συγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές για την ταυτοποίηση των μορίων. Επιπλέον, στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η βιολογική αξιολόγηση των παραληφθέντων εχκυλισμάτων, αλλά και κλασμάτων από τη βιομηχανική κάνναβη.

## 5.1 Υλικά και μέθοδοι

### 5.1.1 Αναλυτικές τεχνικές

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC): Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης διοξειδίου του πυριτίου (SiO2, silica gel 60 F254 Merck) ως στατική φάση. Αρχικά τοποθετούνται πάνω στις πλάκες μικρές κηλίδες των δειγμάτων προς μελέτη σε απόσταση περίπου 1 cm από την βάση. Στη συνέχεια, οι πλάκες τοποθετούνται σε γυάλινους θαλάμους οι οποίοι έχουν ήδη κορεστεί με το σύστημα διαλυτών της εκάστοτε κινητής φάσης και έτσι πραγματοποιείται η ανάπτυξή τους. Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν με λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm και ακολούθησε ψεκασμός είτε με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση, είτε με το ειδικό αντιδραστήριο για κανναβινοειδή fast blue bb salt (Sigma-Aldrich) και θέρμανση.

### 5.1.2 Παρασκευαστικές τεχνικές

Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (CPC): Ο αρχικός διαχωρισμός



**Εικόνα 5.1** Στήλη CPE (Angers, France)

των εκχυλισμάτων κάνναβης που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε με την τεχνική εκχύλισης κατανομής με φυγοκέντριση (CPE) για το κλάσμα των όξινων κανναβινοειδών και με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (CPC) για το κλάσμα των αποκαρβοξυλιωμένων όξινων κανναβινοειδών. Τα διφασικά συστήματα που επιλέχθηκαν ήταν τα κ-εξάνιο/οξικός ακόλουθα: αιθυλεστέρας/αιθανόλη/νερό και кεξάνιο/ακετόνη/ακετονιτρίλιο. Τέλος τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το FCPE300® (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France), εφοδιασμένο με στήλη CPE (Angers, France) όγκου 300 mL και

αντλία Prep 36 LabAlliance (State College, PA, USA), και το FCPC1000<sup>®</sup> (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France), εφοδιασμένο με στήλη όγκου 1000 mL (Angers, France) και αντλία Prep 36 LabAlliance (State College, PA, USA).

- Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (PTLC): Για τον διαχωρισμό και την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών ενδιαφέροντος απο σύνθετα μίγματα, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες πλάκες επίστρωσης πυριτίου (silica gel 60 F<sub>254</sub>) κανονικής φάσης. Προκειμένου να επιτευχθεί η παραλαβή των μεταβολιτών ενδιαφέροντος, μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, επιλέγονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στις ουσίες αυτές και αργότερα εκχυλίζονται με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών, ικανό να διαλύει τις ουσίες αυτές. Η καταλληλότητα των συστήματων ανάπτυξη ελέχθηκαν πρωτίστως με αναλυτικές πλάκες TLC.
- Υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης (CC): Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε με σκοπό είτε τον περαιτέρω διαχωρισμό είτε και την απομόνωση μεταβολιτών ενδιαφέροντος από σύνθετα εκχυλισμάτα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου κανονικής φάσης (silica gel 40-60 μm) και ως κινητή, διάφορα συστήματα οργανικών διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Τα συστήματα διαλύτων που επιλέχθηκαν ήταν τα κ-εξάνιο/διχλωρομεθάνιο, διχλωρομεθάνιο/οξικός αιθυλεστέρας και διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη.
- Υγρή χρωματογραφία υπό κενό (VLC): Για την αρχική κλασμάτωση σύνθετων εκχυλισμάτων επιλέχθηκε η τεχνική VLC. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου κανονικής φάσης (silica gel 25-40 μm) και ως κινητή, διάφορα συστήματα οργανικών διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Τα συστήματα

διαλύτων που επιλέχθηκαν ήταν τα *κ*-εξάνιο/διχλωρομεθάνιο και διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη.

Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC): Εναλλακτικά των κλασσικών χρωματογραφικών τεχνικών που προαναφέρθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, με σκοπό την κλασμάτωση εκχυλισμάτων ενδιαφέροντος. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η PrepPure C18 (BÜCHI), μήκους 150 mm, εσωτερικής διαμέτρου 2 mm και μεγέθους σωματιδίων 10 μm, ενώ το σύστημα HPLC ήταν το BÜCHI Pure C-850 Flash prep εξοπλισμένο με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA).

### 5.1.3 Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR): Για την



**Εικόνα 5.2** Όργανο Bruker Avance III 600 MHz.

ταυτοποίηση μορίων των που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη φασματοσκοπική τεχνική. Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>, 99.8% atom % D; Euriso-Top, Saclay, Ελήφθησαν France). φάσματα μίας διάστασης (1D-NMR) όπως <sup>1</sup>H-NMR καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων (2D-NMR) όπως COSY, HSQC και HMBC με το φασματόμετρο Bruker Avance III 600 MHz (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten,

Germany). Στα φάσματα οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε ppm και οι σταθερές σύζευξης J σε Hertz (Hz). Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως απλή : s (singlet), ευρεία απλή : brs (broad singlet), διπλή : d (doublet), τριπλή : t (triplet), τετραπλή : q (quintuplet), διπλή διπλής : dd (doublet of doublets), πολλαπλή m : (multiplet).

<u>Φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS):</u> Συμπληρωματικά για την ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος HRMS. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής παράγονται ιοντικά θραύσματα τα οποία επάγουν τον ιοντισμό των μορίων προς μελέτη, ενώ η σχετική ένταση του ιοντικού ρεύματος αυτών των μορίων, που αντιστοιχεί στο λόγο μάζα προς φορτίο (m/z), καταγράφεται τελικά στον ανιχνευτή μάζας. Για την λήψη φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ACQUITY UPLC (Waters Corporation, MA, USA), εφοδιασμένο με υβριδικό φασματόμετρο μαζών LTQ-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany). Ο ιοντισμός των μορίων πραγματοποιήθηκε με μέθοδο ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization-ESI) σε αρνητικό (ESI -) αλλα και θετικό ιοντισμό (ESI+), σε πλήρες εύρος σάρωσης μαζών (m/z 115.0-1000.0) και διακριτική ικανότητα 30,000. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με στήλη Fortis C<sub>18</sub> (Fortis Technologies Ltd, Cheshire, UK) (100 × 2.1 mm, 1.7 μM), θερμαινόμενη στους 40 °C. Τέλος για την καταγραφή αλλά και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur 2.0.7 (Thermo Scientific).

Αέρια χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS): Επικουρικά με τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους τα δείγματα ενδιαφέροντος αναλύθηκαν και με GC-MS. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), εξοπλισμένο με τον αυτόματο δειγματολήπτη ΑΙ 3000 και συνδεδεμένο με τον εκλεκτικό ανιχνευτή μαζών Finnigan Trace DSQ. Τα δείγματα αραιώθηκαν σε DCM, εγχύθηκε όγκος 1 μL με την τεχνική χωρίς διαμοιρασμό (splitless) και ο ιονισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ηλεκτρονιακής πρόσκρουσης (Electron Impact-El). Οι θερμοκρασίες στον εγχυτή και τον ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στους 220 και 280° C, αντίστοιχα, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He), με ροή 1 mL/min. Η θερμοκρασία της στήλης αυξήθηκε σταδιακά από τους 100 στους 280 °C με ρυθμό 10 °C/min και στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή στους 280 °C για διάστημα 12 min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα ήταν 30 min. Για την καταγραφή και την επεξεργασία των δεδομένων καθως και για τη λειτουργία του συστήματος χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur 2.0.7 (Thermo Scientific). Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Trace TR-5MS (Thermo Scientific, USA), (30 m × 0.25 mm, πάχος υμενίου 0.25 μm). Για την ταυτοποίηση των ουσιών λήφθηκαν υπόψη τα φάσματα μάζας από πρότυπες ουσίες αναφοράς, όπως επίσης και τα φάσματα που περιλαμβάνονται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες Wiley 2007 και NIST 2011.

# Πειραματική πορεία

## 5.2 Εκχύλιση φυτικού υλικού βιομηχανικής κάνναβης

Τα εκχυλίσματα παραλήφθηκαν με την χρήση δύο τεχνικών, της εκχύλισης με υπερήχους και της εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις ήταν βιομηχανική κάνναβη (ποικιλία 'Futura 75') με προέλευση από τα φάρσαλα. Η πρώτη μέθοδος αποτελεί μια τροποποίηση της κλασικής τεχνικής διαβροχής, όπου η εκχύλιση διευκολύνεται με την χρήση υπερήχων (παλμοί



Εικόνα 5.3 Λουτρό υπερήχων

υψηλής συχνότητας, 37 kHz) βελτιώνοντας έτσι την απόδοση καθώς αυξάνεται η διαλυτοποίηση των μεταβολιτών στο διαλύτη. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε 20 gr κονιοποιημένου φυτικού υλικού το οποίο εισήχθη σε σφαιρική φιάλη μαζί με 200 mL EtOH και αργότερα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων (Εικ. 5.3) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 40 °C. Το εκχύλισμα διηθήθηκε υπό κενό μέσω ηθμού buchner και το διήθημα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη για συμπύκνωση μέχρι ξηρού με συσκευή Rotavapor (Buchi). Το βάρος του ξηρού εκχυλίσματος ήταν 2 g, η απόδοση εκφράστηκε ως επί τοις εκατό κατά βάρος (% w/w) περιεκτικότητα του εκχυλίσματος σε ξηρό φυτικό υλικό και υπολογίστηκε 10% (w/w). Το αιθανολικό εκχύλισμα φυλάχθηκε για μελλοντική χρήση για βιολογικές δοκιμές.



**Εικόνα 5.4** Όργανο SFE 1-2 No. 4218

Όσον αφορά την δεύτερη μέθοδο εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, πραγματοποιήθηκε σε πιλοτική κλίμακα σε ποσότητα 360 g αποξηραμένου φυτικού υλικού βιομηχανικής κάνναβης (ποικιλία 'Futura 75'), χρησιμοποιώντας 100% υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub>. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στο σύστημα SFE 1-2 No. 4218 της εταιρείας SEPAREX (Champigneulles, France), το οποίο περιλαμβάνει δοχείο CO<sub>2</sub>, αντλία υγρού CO<sub>2</sub>, δύο ανοξειδωτα δοχεία εκχύλισης με χωρητικότητα 1 L και 2 L,

τρεις διαχωριστήρες και σύστημα ψύξης με γλυκόλη (Εικ. 5.4). Το φυτικό υλικό τοποθετήθηκε στο δοχείο εκχύλισης των 2 L, όπου η πίεση ρυθμίστηκε στα 15 MPa και στους διαχωριστήρες ρυθμίστηκε στα 4 Mpa αντίστοιχα. Οι θερμοκρασίες στο δοχείο εκχύλισης και τους διαχωριστήρες ήταν, αντίστοιχα, 35 ° C και 30 ° C. Η ροή ρυθμίστηκε στα 5 kg/h και παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης,

με συνεχή ανακύκλωση του αερίου CO<sub>2</sub>. Η παραλαβή του εκχυλίσματος γίνοταν κάθε 40 min, με συνολική διάρκεια διαδικασίας 8 h. Η απόδοση εκφράστηκε ως επί τοις εκατό κατά βάρος (% w/w) περιεκτικότητα εκχυλίσματος σε ξηρό φυτικό υλικό και υπολογίστηκε 8.8% (w/w).

## 5.3 Εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση στο εκχυλίσμα SFE

Για την κλασμάτωση του ολικού υπερκρίσιμου εκχυλίσματος βιομηχανικής κάνναβης, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο σε όξινα κανναβινοειδή, χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση (CPE), σύμφωνα με την μέθοδο pH-zone-refining CPC των Popp, Petrakis et al. [97]. Η κλασμάτωση πραγματοποιήθηκε σε όργανο FCPE300® (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France), το οποίο ήταν εφοδιασμένο με στήλη CPE (Angers, France) όγκου 300 mL και αντλία Prep 36 LabAlliance (State College, PA, USA). Η έγχυση του δείγματος έγινε μέσω βρόχου χωρητικότητας 50 mL, ενώ για τη συλλογή κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Büchi B-684 (Flawil, Switzerland). Το διφασικό σύστημα διαλύτων που επιλέχθηκε ήταν κ-εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/αιθανόλη/νερό, σε αναλογία 8:2:5:5 (v/v/v/v). Συνολικά παρασκευάστηκαν 2 L διφασικού συστήματος τα οποία αναδεύτηκαν σε διαχωριστική χοάνη και αφέθηκαν προς εξισορρόπηση. Αφού διαχωρίστηκαν, οι δύο φάσεις συλλέχθηκαν σε κωνικές φιάλες και η ενδιάμεση φάση απορρίφθηκε. Βάσει της μεθόδου, για την κατακράτηση των όξινων κανναβινοειδών στην οργανική (ανώτερη) φάση, πλούσια σε κ-εξάνιο, προστέθηκαν 100mM τριφθοροξικού οξέος (TFA) προς ρύθμιση του pH 2. Επομένως ο όγκος TFA ορίστηκε 7.28 mL (950 mL οργανικής φάσης) στην προκειμένη περίπτωση. Αντίστοιχα για την έκλουση των ουσιών στην υδατική (κατώτερη) φάση, πλούσια σε νερό, προστέθηκαν 10 mM υδροξειδίου του αμμωνίου (NH₄OH) προς επίτευξη pH 10, άρα υπολογίστηκαν 0.76 mL NH4OH (1,020 mL υδατικής φάσης). Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 5 gr εκχυλίσματος SFE, τα οποία διαλυτοποιήθηκαν αρχικά σε 25 mL οξινισμένης με TFA οργανικής φάσης και μετέπειτα σε αλλα 5mL μη αλκαλοποιημένης με NH4OH υδατικής φάσης. Μιας και η οργανική φάση αποτέλεσε την στατική και η υδατική την κινητή φάση της χρωματογραφίας, η λειτουργία ορίστηκε ως κατιούσα (descending mode), επιπλέον η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε 15 mL/min. Αφού πραγματοποιήθηκε η πλήρωση της στήλης με την στατική φάση έγινε η ένεση του δείγματος και ακολούθησε η είσοδος της κινητής φάσης. Έπειτα από την έκλουση των ουσιών με την κινητή φάση, ακολούθησε εξώθηση της στατικής φάσης (extrusion).



Εικόνα 5.5 Δοκιμαστικοί σωλήνες όπου συλλέχθηκαν τα κλάσματα της CPE

Συνολικά παραλήφθηκαν 68 κλάσματα (fractions) όγκου 20 mL, τα οποία εξετάστηκαν με αναλυτική TLC. Τα χρωματογραφήματα TLC παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες (254 και 366 nm) και το ορατό φώς, μετά από ψεκασμό με θειική βανιλίνη και τελικά καταλήξαμε σε 15 συνενώσεις.



**Σχήμα 5.1** Χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων της CPE, στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη (A), fast blue bb (B) και στο υπεριώδες στα 254 nm (C) και 366 nm (D)

Τα συνενωμένα πλέον κλάσματα εξετάστηκαν εκ νέου με αναλυτική TLC σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH σε αναλογία 95:5 (v/v). Μετα την αναπτυξή τους τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες (254 και 366 nm) και στο ορατό, αφού ψεκάστηκαν με θειϊκή βανιλίνη, αλλά και με το ειδίκο αντιδραστήριο για κανναβινοειδή fast blue bb salt. Τα βάρη των κλασμάτων παρατίθενται στον πίνακα 1:
Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)	Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)
1	44.7	9	161.8
2	588.7	10	176.9
3	282.1	11	758.1
4	300	12	57.6
5	466.4	13	9.5
6	486.3	14	49.7
7	153.3	15	1,487.7
8	59		

**Πίνακας 1.** Τα συνενωμένα κλάσματα από το εκχύλισμα SFE του *C. sativa,* ποικιλίας ('Futura 75') όπως προέκυψαν από εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση.

## 5.3.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση στα συνενωμένα κλάσματα της CPE

Η μέθοδος που επιλέχθηκε για την CPE, απέδωσε κλάσματα πλούσια σε όξινα κανναβινοειδή, παρόντα σε μορφή αλάτων αμμωνίου. Για τον λόγο αυτό και με σκοπό την μετέπειτα μελέτη της βιολογικής τους δράσης, επακολούθησε υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid liquid extraction-LLE) για την ανάκτηση των όξινων κανναβινοειδών στην μόρφη που απαντώνται φυσικά στο *c. sativa.* Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν κοινή για όλα τα κλάσματα και περιγράφεται παρακάτω:



Εικόνα 5.6 LLE ενός κλάσματος της CPE

Πρωτίστως μεταφέρθηκε σε νέους περιέκτες, μια ποσότητα ανάλογη των αρχικών ακατέργαστων κλασμάτων (από 20 έως 100 mg), με σκοπό τη δημιουργία εφεδρικών δειγμάτων και η υγρή-υγρή εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στις εναπομείνουσες ποσότητες κάθε κλάσματος ξεχωριστά. Ως διφασικό σύστημα διαλυτών επιλέχθηκε H<sub>2</sub>O/HCl/*n*-Hex/EtOAc σε αναλογία Κάθε 99:1:80:20 (v/v/v/v). κλάσμα διαλυτοποιήθηκε αρχικά σε 30 mL υδατικής φάσης και μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, εφόσον ελέχθηκε πρώτα η βασική προϋπόθεση για όξινο pH 1. Τα κανναβινοειδή άλατα αμμωνίου οξινίστηκαν χάρη στην περίσσεια οξέος της υδατικής και τελικά παραλήφθηκαν στην οργανική φάση, που προστέθηκε αργότερα, μέσω έντονης ανάδευσης. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για ακόμη δύο φορές με την υδατική φάση να επανατοποθετείται στην διαχωριστική χοάνη και να αναμειγνύεται εκ νέου με 10 mL οργανικής. Τελικά η οργανική που συλλέχθηκε, τοποθετήθηκε σε καθαρή διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με 10 mL απιονισμένου H<sub>2</sub>O τρείς φορές

προς απαλλαγή από πιθανά υπολείμματα άλατων αμμωνίου. Τα κλάσματα μετά την LLE καθώς και οι ποσότητες που ανακτήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 2:

Κλάσμα μετα από LLE	Βάρος (mg)	Κλάσμα μετα από LLE	Βάρος (mg)
1	0.7	7	7
2	6.1	8	22.3
3	33.5	9	3.4
4	161	10	2.5
5	122.1	11	2.9
6	19.3	12	1.5

Πίνακας 2. Τα συνενωμένα κλάσματα μετά από LLE των αρχικών κλασμάτων της CPE.

Τα 12 κλάσματα που παραλήφθηκαν αναλύθηκαν με φασματομετρία μαζών υψηλής ικανότητας (HRMS) χρησιμοποιώντας διακριτικής το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ACQUITY UPLC (Waters), εφοδιασμένο με υβριδικό φασματόμετρο μάζας LTQ-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany), εξοπλισμένο με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Το λογισμικό Xcalibur 2.0.7 (Thermo Scientific) χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση αλλά και την επεξεργασία των δεδομένων. Για όλες τις μετρήσεις, τα δείγματα διαλύθηκαν σε σύστημα διαλυτών ακετονιτρίλιο (ACN)/νερό (H2O) 9:1 (v/v) και οι συγκεντρώσεις ορίστηκαν 0.2 mg/mL. Η ανάλυση με φασματομετρία μαζών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροψεκασμό, σε αρνητικό και θετικό ιονισμό, ESI (-) και ESI (+).

# • Κανναβιδιόλη

Ποσότητα 20 mg του κλάσματος 4, που ανακτήθηκε μετά την LLE, υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αφού διαλύθηκε σε DCM και επιστρώθηκε σε γυάλινη πλάκα silica gel F<sub>254</sub> κανονικής φάσης. Έπειτα η πλάκα τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης κορεσμένο με σύστημα διαλυτών DCM/MeOH/FA σε αναλογία 96:3.5:0.5 (v/v/v). Αφού αναπτύχθηκε, το χρωματογράφημα ελέγχθηκε στο υπεριώδες (254 nm και 366 nm) και στο ορατό, εφόσον ένα μικρό τμήμα της πλάκας ψεκάστηκε με θειϊκή βανιλίνη. Διακρίθηκαν τέσσερις ζώνες, κάθε μία απ' τις οποίες εκχυλίστηκε τρείς φορές σε σύστημα διαλυτών ACN/MeOH 5:5 (v/v), με υπερήχους. Το υπερκείμενο διάλυμα υποβλήθηκε σε διήθηση υπο κενό με ηθμό πορώδους 4 και το διήθημα τελικά συμπυκνώθηκε σε συσκευή Rotavapor (Buchi). Οι ουσίες ενδιαφέροντος αποθηκεύτηκαν σε προζυγισμένα vials πενικιλλίνης και τα βάρη τους παρουσιάζονται στον πίνακα 3:





 
 Ζώνες παρασκευαστικής TLC
 Βάρος (mg)

 Ζώνη Α
 3.4

 Ζώνη Β
 11.4

 Ζώνη C
 12.7

 Ζώνη D
 51.8

Βάσει της αναλυτικής TLC που πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 93:7 (v/v), η ζώνη Α κρίθηκε καθαρή ουσία και ταυτοποιήθηκε ως κανναβιδιόλη μετά απο ανάλυση με μεθόδους αέριας χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματομετρία μαζών (GC-MS) καθώς και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Όσον αφορά την πρώτη, το δείγμα διαλύθηκε σε DCM (0.5 mg/mL) και αναλύθηκε με το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), με ανιχνευτή μάζας Finnigan Trace DSQ, σε λειτουργία ηλεκτρονιακής πρόσκρουσης (EI). Για την δεύτερη μέθοδο το δείγμα διαλύθηκε σε 650 μL δευτεριωμένου χλωροφορμίου και λήφθηκε φάσμα μίας διάστασης (1D-NMR), με την βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600.

Αντίθετα, η ζώνη D κρίθηκε πως χρήζει περαιτέρω διαχωρισμού και έτσι υποβλήθηκε σε δεύτερη παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

# (R)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-Α

Ποσότητα 51.8 mg της ζώνης D διαλύθηκε σε DCM και επιστρώθηκε σε δύο γυάλινες πλάκες silica gel F<sub>254</sub>, οι οποίες αναπτύχθηκαν σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH 92:8 (v/v). Ακολουθήσε η ίδια διασικασία και τελικά παραλήφθηκαν δύο ζώνες από την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Οι ζώνες αυτές εκχυλίστηκαν αντίστοιχα σε σύστημα ACN/MeOH 5:5 (v/v), με υπερήχους και διηθήθηκαν μέσω ηθμού πορώδους 4. Τα βάρη των ζωνών παρατίθενται στον πίνακα 4:

**Πίνακας 3.** Ζώνες που προέκυψαν από το κλάσμα 4 μετά από PTLC

**Σχήμα 5.3** Χρωματογράφημα TLC ζωνών του κλάσματος D μετά από PTLC Πίνακας 4. Ζώνες που προέκυψαν από το κλάσμα D μετά από PTLC

8:22 UIG	Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
-	Ζώνη Α	16.4
(Ipan Cipab	Ζώνη Β	1.9
and love B		

Μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με αναλυτική TLC σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 92:8 (v/v), η ζώνη B θεωρήθηκε καθαρή ουσία και ταυτοποιήθηκε ως (R)-κανναβιελσοϊκό οξύ-A, αφού αναλύθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους GC-MS και NMR. H GC-MS ανάλυση πραγματοποιήθηκε αντίστοιχα με το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), αφού το δείγμα διαλύθηκε σε DCM, προς επίτευξη συγκέντρωσης 0.5 mg/mL. Επιπλέον λήφθηκε φάσμα 1D-NMR, με την βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600, αφού το δείγμα διαλύθηκε σε 650 μL δευτεριωμένου χλωροφορμίου.

# 5.4 Χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης



Εικόνα 5.7: CC συνενωμένου κλάσματος 4

Πραγματοποιήθηκε και δεύτερη pH-zone-refining CPE ακολουθώντας την ίδια μέθοδο για την παραλαβή παραπάνω ποσότητας των κλασμάτων ενδιαφέροντος. Το κλάσμα 4 που παραλήφθηκε συνδυάστηκε με αντίστοιχο κλάσμα από CPE που είχε προηγηθεί σε προηγούμενη μελέτη. Έτσι το συνενωμένο δείγμα με βάρος 384.9 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου (43 g) και εισήχθηκε στη στήλη με την τεχνική της ξηρής εναπόθεσης (ξηρό dépôt). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφία είχε διάμετρο 2 cm και το πορώδες ήταν μεγέθους 2. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα DCM/EtOAc (v/v) και μίγμα DCM/MeOH (v/v) αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά από τη στήλη παραλήφθηκαν 262 κλάσματα ενώ έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC καταλήξαμε σε 14 συνενώσεις.



**Σχήμα 5.4** Χρωματογραφήματα συνενωμένων κλασμάτων από την χρωματογραφία στήλης του συνενωμένου κλάσματος 4, στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη (Α) και στο υπεριώδες στα 254 nm (Β) και 366 nm

Τα συνενωμένα πλέον κλάσματα εξετάστηκαν εκ νέου με αναλυτική TLC σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH/FA σε αναλογία 95:5:0.1 (v/v), και εξετάστηκαν στο ορατό, αφού ψεκάστηκαν με θειϊκή βανιλίνη, αλλά και στο υπεριώδες. Τα βάρη των κλασμάτων παρατίθενται στον πίνακα 5:

Κλάσμα	Βάρος (mg)	Κλάσμα	Βάρος (mg)
1	33.8	8	32.9
2	51.3	9	44.3
3	43.2	10	22.8
4	41.5	11	27.3
5	24.9	12	21.2
6	21.6	13	10.1
7	18.7	14	27.7

Πίνακας 5. Τα συνενωμένα κλάσματα, από το συνενωμένο κλάσμα 4, όπως προέκυψαν από χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης.

Τα κλάσματα που προέκυψαν από την χρωματογραφία στήλης, διαλυτοποιήθηκαν σε σύστημα διαλυτών ACN/H<sub>2</sub>O 9:1 (v/v) προς παρασκευή δειγμάτων συγκέντρωσης 0.1 mg/mL. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με LC-HRMS, χρησιμοποιώντας το όργανο Accela (UHPLC), εφοδιασμένο με υβριδικό φασματόμετρο μάζας LTQ-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany), με ηλεκτροψεκασμό, σε αρνητικό και θετικό ιονισμό, ESI (-) και ESI (+).

# • Κανναβιδιόλη & Κανναβιδιβαρίνη

Το κλάσμα 1 που παραλήφθηκε από την προηγούμενη χρωματογραφία στήλης, υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό μεσω παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Σε δύο γυάλινες πλάκες πυριτίου silica gel F<sub>254</sub>, τοποθετήθηκαν 33.8 mg του κλάσματος και οι πλάκες αυτές τοποθετήθηκαν σε γυάλινο θάλαμο ανάπτυξης, κορεσμένο με σύστημα διαλυτών DCM/*c*-Hex 6:4 (v/v). Τελικά παραλήφθηκαν τέσσερις ζώνες ενδιαφέροντος και καθεμία από αυτές εκχυλίστηκε σε σύστημα ACN/EtOH 8:2 (v/v), με υπερήχους. Το υπερκείμενο διάλυμα διηθήθηκε αργότερα μέσω ηθμού με πορώδες μεγέθους 4 και το διήθημα συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη προς συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Οι ζώνες και τα βάρη στα οποία ανακτήθηκαν παρατίθενται στον πίνακα 6:

**Σχήμα 5.5** Χρωματογράφημα TLC ζωνών του κλάσματος 1 μετά από PTLC



**Πίνακας 6.** Ζώνες που προέκυψαν από το κλάσμα 1 μετά από PTLC

Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη Α	4.3
Ζώνη Β	8.5
Ζώνη C	2.3
Ζώνη D	0.6

Οι ζώνες Α και Β θεωρήθηκαν καθαρές ουσίες, βάσει του χρωματογραφήματος TLC που πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανάπτυξης DCM/c-Hex 5:5 (v/v). Επομένως κρίθηκε αναγκαίο οι ζώνες να αναλυθούν με GC-MC αφού διαλύθηκαν σε DCM (0.5 mg/mL) και με φασματοσκοπία NMR με τη βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600. Έτσι για την ζώνη Α ελήφθησαν φάσματα 2D-NMR όπως COSY, HSQC και HMBC, ένω για την ζώνη Β λήφθηκε φάσμα 1D-NMR, <sup>1</sup>H-NMR. Η ζώνη Α ταυτοποιήθηκε ως κανναβιδιόλη ενώ η ζώνη Β ως κανναβιδιβαρίνη.

# • (R)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-A

Πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, σε δύο γυάλινες πλάκες επίστρωσης πυριτίου silica gel F<sub>254</sub>, όπου επιστρώθηκαν 51.3 mg του κλάσματος 2, που παραλήφθηκε από την προηγούμενη χρωματογραφία στήλης. Το σύστημα ανάπτυξης διαλυτών που επιλέχθηκε ήταν DCM/MeOH/FA σε αναλογία 96:4:0.2 (v/v/v). Τελικά διακρίθηκαν έξι ζώνες ενδιαφέροντος, των οποίων τα βάρη παρατίθενται στον πίνακα 7: **Σχήμα 5.6** Χρωματογράφημα TLC των ζωνών του κλάσματος 2 μετά από PTLC



Πίνακας 7. Ζώνες που προέκυψαν από το κλάσμα 2 μετά από PTLC.

Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη Α	0.6
Ζώνη Β	24.2
Ζώνη C	1.3
Ζώνη D	2.2
Ζώνη Ε	7.4
Ζώνη Ε	1.5

Πραγματοποιήθηκε αναλυτική TLC, στις ζώνες που ανακτήθηκαν σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 94:6 (v/v). Από αυτές, η ζώνη F αναλύθηκε με φασματοσκοπία GC-MS αντίστοιχα με τα προηγούμενα και ταυτοποιήθηκε ως (*R*)κανναβιελσοϊκό οξύ-Α. Το δείγμα αναλύθηκε επιπλέον με φασματοσκοπία NMR, όπου ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR καθώς και 2D-NMR όπως όπως COSY, HSQC και HMBC με τη βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600.

### • (R)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-A & (S)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-A

Η ζώνη Β, που παραλήφθηκε από την προηγούμενη παρασκευαστική TLC, ως μίγμα ουσιών, διαχωρίστηκε περαιτέρω με την ίδια μέθοδο. Σε γυάλινη πλάκα επίστρωσης πυριτίου κανονικής φάσης τοποθετήθηκαν 24.2 mg της ζώνης και έπειτα η πλάκα αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH 94:6 (v/v). Τελικά παραλήφθηκαν τρείς ζώνες, τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 8:





Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη β	18.1
Ζώνη γ	1.2
Ζώνη δ	1.6

Βάσει της αναλυτικής TLC που πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH 94:6 (v/v), ως μεταβολίτες ενδιαφέροντος κρίθηκαν οι ζώνες γ και δ, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ως (*R*)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Α και (*S*)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Α. Οι δύο ζώνες αναλύθηκαν με GC-MS αφού τα δείγματα διαλύθηκαν σε DCM (0.5 mg/mL), με το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA). Για τα δύο δείγματα ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR, ενώ για την ζώνη γ ελήφθησαν και φάσματα 2D-NMR, με το όργανο Bruker Avance III 600.

# (S)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-Α & (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Β

Πραγματοποιήθηκε νέα παρασκευαστική TLC, σε γυάλινη πλάκα επίστρωσης πυριτίου κανονικής φάσης, για τη ζώνη Β που παραλήφθηκε από την προηγούμενη παρασκευαστική TLC, με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH/FA σε αναλογία 96:4:0.1 (v/v/v). Από την διαδικασία αυτή τελικά ανακτήθηκαν τέσσερις ζώνες ενδιαφέροντος, τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 9:





Πίνακας 9. Ζώνες που προέκυψαν από το κλάσμα β μετά από PTLC.

Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη a	6.5
Ζώνη b	1.7
Ζώνη c	1.6
Ζώνη d	0.5

Από την αναλυτική TLC που πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 94:6 (v/v), οι ζώνες b και c αναλύθηκαν με φασματοσκοπικές μεθόδους GC-MS και NMR και ταυτοποιήθηκαν ως (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-A και (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-B. Για την GC-MS, τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε DCM (0.5 mg/mL) και η ανάλυση τους πραγματοποιήθηκε με το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA). Όσον αφορά την φασματοσκοπία NMR, με τη βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600 ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR όπως <sup>1</sup>H-NMR αλλά και 2D-NMR όπως COSY, HSQC και HMBC για τα δύο δείγματα.

# • (S)-Κανναβιελσοϊκό οξύ-A & (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-B

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για την ζώνη Ε του κλάσματος 2 (Σχήμα 5.6) προηγούμενης παρασκευαστικής TLC, όπου 7.4 mg της ζώνης τοποθετήθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel F<sub>254</sub>, η οποία αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών DCM/EtOAc/FA 70:30:0.1 (v/v/v). Τελικά παραλήφθηκαν τρείς ζώνες των οποίων τα βάρη παρουσιάζονται στον πίνακα 10:

**Σχήμα 5.9** Χρωματογραφήματα TLC ζωνών του κλάσματος Ε μετά από PTLC



Πίνακας	10.	Ζώνες	που	προέκυψαν
από το κλ	ιάσμ	α Ε μετ	ά από	PTLC.

Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη a	0.5
Ζώνη b	0.6
Ζώνη c	5.1

Πραγματοποιήθηκαν αναλυτικές TLC για τις τρείς ζώνες σε σύστηματα διαλυτών DCM/MeOH/FA 90:10:0.1 (v/v/v) και DCM/EtOAc/FA 70:30:0.1 (v/v/v), βάσει των οποίων οι τρείς ζώνες κρίθηκαν καθαρές ουσίες και επομένως αναλύθηκαν με GC-MS ομοίως με τα προηγούμενα δείγματα. Επιπλέον τα δείγματα αναλύθηκαν με φασματοσκοπία NMR, συγκεκριμένα με 1D-NMR αλλά και 2D-NMR ομοίως με τα προηγούμενα. Τελικά η ζώνη Α ταυτοποιήθηκε ως (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Α ενώ η ζώνη C ως (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-B. Η ζώνη B χρήζει περαιτέρω μελέτης ως άγνωστη ένωση.

# 5.4.1 Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Τα κλάσματα 4 και 5 που παραλήφθηκαν από την εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση, συνδυάστηκαν δίνοντας δείγμα με βάρος 165.3 mg. Το δείγμα έπειτα υποβλήθηκε σε υγρή-υγρή εκχύλιση για την ανάκτηση των όξινων κανναβινοειδών και την απαλλαγή από υπολείμματα αλλάτων αμμωνίου και τελικά παραλήφθηκαν 119.2 mg. Το κατεργασμένο πλέον δείγμα διαλύθηκε στο σύστημα διαλυτών ACN/H<sub>2</sub>O σε αναλογία 95:5 (v/v) και υποβλήθηκε σε παρασκευαστική HPLC με τη βοήθεια του συστήματος BÜCHI Pure C-850 Flash prep εξοπλισμένο με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA). Τα φάσματα του υπεριώδους-ορατού καταγράφηκαν σε μήκη κύματος από 210 έως 800 nm ενώ ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) ρυθμίστηκε στα 210, στα 225 nm, στα 275 nm και στα 350 nm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν μίγματα H₂O (διαλύτης A)-ACN (διαλύτης B) και η ταχύτητα ροής ήταν 10 mL/min. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται ακολούθως στον Πίνακα 18.



**Σχήμα 5.10** Χρωματογράφημα παρασκευαστικής HPLC του κλάσματος 4-5 στα 210, 225 nm, 275 nm και 350 nm.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (H2O)	Διαλύτης Β (ACN)
0	45	55
8	40	60
14	25	75
22	20	80
34	15	85
42	10	90
44	5	95
48	45	55

**Πίνακας 11.** Αναλογίες (%) των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο παρασκευαστικής HPLC.

Συνολικά από τη διαδικασία παραλήφθηκαν 31 κλάσματα ενώ έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC καταλήξαμε σε 14 συνενώσεις.



**Σχήμα 5.11** Χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων από παρασκευαστική HPLC στο κλάσμα 4-5, στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη (A), fast blue bb (B) και στο υπεριώδες στα 254 nm (C) και 366 nm (D)

Τα συνενωμένα κλάσματα εξετάστηκαν με αναλυτική TLC, σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH/FA 94:6:0.2 (v/v). Τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες και στο ορατό εφόσον ψεκάστηκαν με θειϊκή βανιλίνη και fast blue bb.

**Πίνακας 12.** Τα συνενωμένα κλάσματα, από το κλάσμα 4-5, όπως προέκυψαν από παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Κλάσμα	Βάρος (mg)	Κλάσμα	Βάρος (mg)
1	4	8	6.3
2	2.6	9	1.8
3	2.4	10	7.7
4	7.7	11	15.4
5	6.6	12	9
6	5.3	13	1.6
7	9.3	14	3.7

Μιας και τα κλάσματα ενδιαφέροντος παραλήφθηκαν σε ανεπαρκείς ποσότητες, δεν ήταν δυνατή η συνέχιση της διαδικασίας απομόνωσης των επιθυμητών μεταβολιτών από την τεχνική αυτή. Ωστόσο, η συγκεκριμένη διαδικασία θα μπορούσε να αποτελέσει γρήγορη εναλλακτική για την κλασμάτωση των δευτερευόντων όξινων κανναβινοειδών με υψηλή επαναληψιμότητα, εφόσον είναι διαθέσιμη επαρκής ποσότητα του αρχικού κλάσματος.

# 5.5 Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση σε αποκαρβοξυλιωμένο κλάσμα όξινων κανναβινοειδών

Η παραλαβή του κλάσματος όξινων κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκε έπειτα από διαδοχικές υγρές-υγρές εκχυλίσεις, χρησιμοποιώντας αρχικά κ-εξάνιο/οξικό αιθυστέρα 8:2 (v/v) για διάλυση του εκχυλίσματος SFE και νερό/αιθανόλη 5:5 (v/v) ως εκχυλιστή διαλύτη, έπειτα από προσθήκη NH₄OH (pH 10). Για την υδατική φάση που συλλέχθηκε, ακολούθησε κατεργασία με οξίνιση και υγρή-υγρή εκχύλιση (βλ. παρ. 5.3.1). Η αποκαρβοξυλίωση των όξινων κανναβινοειδών επιτελέστηκε στους 140 °C, για χρονικό διάστημα 45 min. Η περαιτέρω κλασμάτωση του κλάσματος ουδέτερων κανναβινοειδών που προέκυψε πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το όργανο FCPC1000<sup>®</sup> (Rousselet-Robatel Kromaton, Annonay, France) εφοδιασμένο με παρασκευαστική στήλη όγκου 1000 mL (Angers, France) και αντλία Prep 36 LabAlliance (State College, PA, USA). Η έγχυση του δείγματος έγινε μέσω βρόχου χωρητικότητας 50 mL, ενώ για τη συλλογή κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Büchi B-684 (Flawil, Switzerland). Το διφασικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν κ-εξάνιο/ακετόνη/ακετονιτρίλιο, σε αναλογία 5:2:3 (v/v/v), σύμφωνα με την μέθοδο των Hazekamp et al [92]. Η ανώτερη, πλούσια σε κ-εξάνιο, λειτούργησε ως κινητή φάση και η κατώτερη, πλουσια σε ακετονιτρίλιο, ως στατική φάση του συστήματος, ορίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την λειτουργία σε ascending mode, ενώ τέλος η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στα 15 mL/min. Αρχικά η στήλη πληρώθηκε με την στατική φάση, και όταν το σύστημα εξισορροπήθηκε, πραγματοποιήθηκε ένεση 8.1 g δείγματος αποκαρβοξυλιωμένων κανναβινοειδών. Στη συνέχεια, εισήχθη η κινητή φάση και τέλος πραγματοποιήθηκε εξώθηση της στατικής φάσης (extrusion). Συνολικά παραλήφθηκαν 156 κλάσματα, όγκου 20 mL και μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με αναλυτική TLC καταλήξαμε σε 17 συνενώσεις.

Τα συνενωμένα κλάσματα εξετάστηκαν με αναλυτική TLC, η οποία αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών DCM/n-Hex 80:20 (v/v). Αφού αναπτύχθηκε, το χρωματογράφημα της TLC παρατηρήθηκε στο υπεριώδες (254 και 366 nm) και στο ορατό εφόσον ψεκάστηκε με fast blue bb. Τα βάρη των κλασμάτων παρατίθενται στον πίνακα 11:



**Σχήμα 5.12** Χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων της CPC, στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη (A) και fast blue bb (B) και στο υπεριώδες στα 254 nm (C) και 366 nm (D)

Πίνακας	13.	Τα	συνενωμένα	κλάσματα	από	εκχύλισμα	αποκαρβοξυλιωμένων
κανναβινα	οειδών	του	c. sativa, ποικιλ	ίας ('Futura	75') óπ	ιως προέκυψ	αν από χρωματογραφία
κατανομή	ς με φ	υγοκ	έντριση.				

Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)	Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)
1	380.67	10	633.4
2	274.84	11	275.19
3	406.33	12	94.55
4	204.37	13	135.86
5	598.48	14	88.06
6	89.92	15	53.5
7	183.7	16	58.45
8	448.1	17	75.41
9	2,810.0		

### 5.5.1 Χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης



Εικόνα 5.8: CC του κλάσματος 12-13

Τα κλάσματα 12 και 13, που παραλήφθηκαν από την προηγόυμενη CPC, συνενώθηκαν δίνοντας δείγμα με βάρος 538.8 mg. Τα συνενωμένα πλέον κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου (40 g) και εισήχθηκαν στη στήλη με την τεχνική της ξηρής εναπόθεσης (ξηρό dépôt). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφία είχε διάμετρο 1.70 cm και το πορώδες ήταν μεγέθους 3. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα *n*-Hex/DCM (v/v), μίγμα DCM/EtOAc (v/v) και τέλος μίγμα DCM/MeOH (v/v) αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά από τη στήλη κλάσματα παραλήφθηκαν 578 ενώ έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC καταλήξαμε σε 24 συνενώσεις.



**Σχήμα 5.13** Χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων από την χρωματογραφία στήλης του κλάσματος 12-13 στο ορατό, μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη

Τα χρωματογραφήματα TLC των συνενωμένων κλασμάτων, αναπτύχθηκαν σε τέσσερα συστήματα διαλυτών, αυξανόμενης πολικότητας, τα οποία ήταν κατά σειρά: DCM/n-Hex 7:3 (v/v), DCM/EtOAc 96:4 (v/v), DCM/MeOH 98:2 (v/v) και τέλος DCM/MeOH 9:1 (v/v). Μετα την ανάπτυξη τους τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν στο ορατό, αφού ψεκάστηκαν με θειϊκή βανιλίνη. Τα βάρη των κλασμάτων παρατίθενται στον πίνακα 12:

Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)	Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)
1	2.61	13	8.5
2	8.51	14	2.3
3	15.52	15	10
4	2.22	16	37.4
5	9.56	17	3.8
6	3.3	18	6.3
7	0.9	19	32.9
8	1.2	20	4.8
9	1.7	21	9
10	3.1	22	5.5
11	9.3	23	2.3
12	7.1	24	4.2

**Πίνακας 14.** Τα συνενωμένα κλάσματα από το κλάσμα 12-13, όπως προέκυψαν από χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης.

Βάσει των χρωματογραφημάτων TLC που πραγματοποιήθηκαν, αποφασίστηκε να αναλυθούν τα κλάσματα 11, 14 και 16 με τις φασματοσκοπικές μεθόδους LC-HRMS, GC-MS και NMR. Όσον αφορά την πρώτη πραγματοποιήθηκε με το όργανο Accela (UHPLC), εφοδιασμένο με LTQ-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany), αφού τα δείγματα διαλύθηκαν σε σύστημα ACN/H<sub>2</sub>O 9:1 (v/v) (0.1 mg/mL). Για την GC-MS τα δείγματα διαλύθηκαν σε DCM (0.5 mg/mL) και αναλύθηκαν με το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA). Τέλος με τη βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600, ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR καθώς και 2D-NMR. Το κλάσμα 11 ταυτοποιήθηκε ως ανάλογο κανναβιδιόλης, το 14 ως άγνωστη ένωση που χρήζει περαιτέρω μελέτης, ενώ το 16 ταυτοποιήθηκε ως (*S*)-κανναβιελσοΐνη.

Τα 21 και 23 ως κλάσματα μειωμένης καθαρότητας αναλύθηκαν με GC-MS ανάλυση ομοίως με τα προηγούμενα δείγματα. Το κλάσμα 21 αποτελείται από ένα άγνωστο μόριο και ένα σεσκιτερπένιο, το οξείδιο του καρυοφυλλενίου, ενώ το 23 από ένα μίγμα με κύριο μεταβολίτη μια άγνωστη ένωση που χρήζει περαιτέρω μελέτης, εφόσον προηγηθεί η απομόνωση της.

### • Κανναβιδιβαρίνη

Τα συνενωμένα κλάσματα 3 και 5 που προέκυψαν από την προηγούμενη χρωματογραφία στήλης, αποτέλεσαν κλάσματα ενδιαφέροντος που χρήζουν όμως περαιτέρω διαχωρισμού, όντας μίγματα. Επομένως το κλάσμα 3, υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Συγκεκριμένα, σε γυάλινη πλάκα γυάλινη πλάκα silica gel F<sub>254</sub>, επιστρώθηκαν 15.52 mg του κλάσματος και έπειτα η πλάκα αναπτύχθηκε σε υάλινο θάλαμο ανάπτυξης, κορεσμένο απο σύστημα διαλυτών DCM/*n*-Hex 7:3 (v/v). Μία ζώνη παραλήφθηκε τελικά, η οποία μετά από εκχύλιση με υπερήχους, διηθήθηκε, συμπυκνώθηκε και ανακτήθηκε σε βάρος 10.01 mg. Διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το κανναβινοειδές κανναβιδιβαρίνη μετά από ανάλυση με φασματοσκοπικές μεθόδους LC-HRMS με το σύστημα Accela (UHPLC), LTQ-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany), αφού το δείγμα διαλύθηκε σε σύστημα ACN/H<sub>2</sub>O 9:1 (v/v) (0.1 mg/mL), με GC-MS με το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), αφού το δείγμα διαλύθηκε σε DCM (0.5 mg/mL) και τέλος με NMR όπου ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR και 2D-NMR με την βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600.

• Κανναβιγερόλη

Αντίστοιχα, το κλάσμα 5 επεξεργάστηκε ομοίως με μέθοδο παρασκευαστικής TLC, κανονικής φάσης και αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών DCM/*n*-Hex 8:2 (v/v). Τελικά παραλήφθηκαν τρείς ζώνες ενδιαφέροντος, οι οποίες εκχυλίστηκαν σε σύστημα ACN/EtOH 5:5 (v/v) με υπερήχους και διηθήθηκαν μέσω ηθμού πορώδους 4. Τα βάρη των ζωνών παρατίθενται αναλυτικά στον πίνακα 13:

Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη a	1.81
Ζώνη b	8.41
Ζώνη c	1.69

Πίνακας 15.	Ζώνες που	προέκυψαν	από
το κλάσμα 5	μετά από Ρ	ΓLC.	

Η ζώνες a και b μετά από έλεγχο με TLC, κρίθηκε απαραίτητο να αναλυθούν με μεθόδους φασματοσκοπίας. Τα δύο δείγματα, ελέχθηκαν με GC-MS, χρησιμοποιώντας το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), αφού διαλύθηκαν σε DCM (0.5 mg/mL). Επιπλέον ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR και 2D-NMR με την βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600. Η πρώτη αποτελεί ανάλογο της κανναβιγερόλης ενώ η δεύτερη ταυτοποιήθηκε ως κανναβιγερόλη.

#### 5.5.2 Υγρή χρωματογραφία υπό κενό



Εικόνα 5.9: Σύστημα VLC [165]

Το κλάσμα 5, που παραλήφθηκε από την τελευταία CPC, εξετάστηκε με αναλυτική TLC σε αρκετά συστήματα διαλυτών για την εύρεση του βέλτιστου συστήματος διαχωρισμού των ουσιών του. Μετέπειτα ποσότητα 250 mg του κλάσματος υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υπό κενό (VLC), με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου (30 g) και εισήχθηκε στη στήλη με την τεχνική της ξηρής dépôt). εναπόθεσης (ξηρό Н στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφία είχε διάμετρο 2.8 cm και το πορώδες ήταν μεγέθους 3. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα n-Hex/DCM (v/v) και

μίγμα DCM/MeOH (v/v) αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά από την VLC παραλήφθηκαν 9 κλάσματα ενώ έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο καταλήξαμε σε 4 συνενώσεις, τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 14:

Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)
1	8.1
2	1.8
3	123
4	141.7

**Πίνακας 16.** Τα συνενωμένα κλάσματα από το κλάσμα 5, όπως προέκυψαν από υγρή χρωματογραφία υπό κενό.

#### 5.5.3 Χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης

Το συνενωμένο κλάσμα 3, όπως προέκυψε από την προηγούμενη VLC (123 mg), υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου (10 g) και εισήχθηκε στην στήλη με τεχνική ξηρής εναπόθεσης (ξηρό dépôt). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφία είχε διάμετρο 1.50 cm και πορώδες μεγέθους 4. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα *n*-Hex/DCM (v/v) αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά παραλήφθηκαν 138 κλάσματα ενώ έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο καταλήξαμε σε 13 συνενώσεις.



**Σχήμα 5.14** Χρωματογράφημα TLC των συνενωμένων κλασμάτων από την χρωματογραφία στήλης στο κλάσμα 3 στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη

Πραγματοποιήθηκε εκ νέου αναλυτική TLC στα συνενωμένα κλάσματα σε σύστημα ανάπτυξης DCM/*n*-Hex 70:30 (v/v), και αφού το χρωματογράφημα αναπτύχθηκε εξετάστηκε στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη. Τα βάρη των συνενωμένων κλασμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 15:

Πίνακας 17. Τα συνενωμένα κλάσματα από το κλάσμα 3, όπως προέκυψαν από χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης.

Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)	Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)
1	1.7	8	45.1
2	3.9	9	7.8
3	0.3	10	47.5
4	5.9	11	13.6
5	19.5	12	15.8
6	20.6	13	4.8
7	36.9		

Βάσει του χρωματογραφήματος TLC τα κλάσματα 1, 2, 4, 6, 12 και 13 κρίθηκε απαραίτητο να αναλυθούν με φασματοσκοπικές μεθόδους HRMS, GC-MS και NMR. Συγκεκριμένα με HRMS αναλύθηκαν τα δείγματα: 1, 4, 6, 12, 13 με το σύστημα Accela (UHPLC), LTQ-Orbitrap Discovery XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany), αφού τα δείγματα διαλύθηκαν σε σύστημα ACN/H<sub>2</sub>O 9:1 (v/v) (0.1 mg/mL). Για την ανάλυση με GC-MS χρησιμοποιήθηκε το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), αφού τα όλα δείγματα διαλύθηκαν σε DCM (0.5 mg/mL). Τέλος ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR για όλα τα δείγματα καθώς και φάσματα 2D-NMR για τα 1, 6 και 12, με την βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600. Σύμφωνα με τα δεδομένα που λήφθηκαν από τις παραπάνω τεχνικές ανάλυσης, τα κλάσματα 1 και 13 αποτελούν άγνωστες ένωσεις οι οποίες χρήζουν περαιτέρω μελέτης, το κλάσμα 2 αποτελεί ανάλογο της κανναβιδιόλης, το 4 ταυτοποιήθηκε ως κανναβικυκλόλη, το 6 ως μίγμα Δ<sup>8</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης και Δ<sup>9</sup>- τετραϋδροκανναβινόλης και τέλος το 12 ως κανναβιχρωμένιο.

## 5.5.4 Υγρή χρωματογραφία υπό κενό

Πραγματοποιήθηκε εκ νέου υγρή χρωματογραφία υπό κενό στο κλάσμα 4 της προηγούμενης υγρής χρωματογραφίας υπό κενό. Ομοίως λοιπόν, ποσότητα 141.7 mg υποβλήθηκε σε VLC, με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου (30 g) και εισήχθηκε στη στήλη με την τεχνική της ξηρής εναπόθεσης (ξηρό dépôt). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφία είχε διάμετρο 2.8 cm και το πορώδες ήταν μεγέθους 3. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα DCM/MeOH (v/v) αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά από την VLC παραλήφθηκαν 6 κλάσματα ενώ έπειτα από χρωματογραφικό έλεγχο καταλήξαμε σε 4 συνενώσεις τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 16:

**Σχήμα 5.15** Χρωματογραφήματα TLC συνενωμένων κλασμάτων από το κλάσμα 4, στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειϊκή βανιλίνη (αριστερά) και fast blue bb (δεξιά)

VICE	D-Ofmold	VICE	Quili	101 955
100	8110	32		
			-	
		and the	-	
12 17 13	11	191	PT 13	14

Πίνακας 1	<b>8.</b> Τα	συνενωμένα	κλάσματα		
από το κλά	σμα 4	, όπως προέκ	αν από		
υγρή χρωματογραφία υπό κενό.					

Συνενωμένο κλάσμα	Βάρος (mg)
1	114.6
2	16.5
3	7.1
4	11.2

Πραγματοποιήθηκαν αναλυτικές TLC στα συνενωμένα κλάσματα σε σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH 95:5 (v/v) και τα χρωματογραφήματα ψεκάστηκαν με θειϊκή βανιλίνη και fast blue bb αντίστοιχα. Βάσει των χρωματογραφημάτων που παραλήφθηκαν, αποφασίστηκε να αναλυθεί το κλάσμα 3 με φασματοσκοπικές μεθόδους GC-MS, χρησιμοποιώντας το όργανο Finnigan Trace GC Ultra 2000 (Thermo Electron Corporation, USA), αντίστοιχα με τα προηγούμενα δείγματα, αλλά και 1D, 2D-NMR με την βοήθεια του οργάνου Bruker Avance III 600. Το κλάσμα 3 αποτελεί μίγμα με κύριο μεταβολίτη μια άγνωστη ένωση η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης.

### • Κανναβικιτράνη & Φυτόλη

Ποσότητα 40 mg του κλάσματος 3 που παραλήφθηκε από την τελευταία CPC, υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, κανονικής φάσης αντίστοιχα με προηγουμένως και αναπτύχθηκε σε σύστημα διαλυτών DCM/*n*-Hex 7:3 (v/v). Τελικά παραλήφθηκαν τέσσερις ζώνες, τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 17:

**Εικόνα 5.16:** Χρωματογράφημα TLC ζωνών του κλάσματος 3 μετά από PTLC

PC.VS3	-Cohes	Delle lutter
		70:30
189696		
		-
		-
		-
	1	

Πίνακας	19.	Ζώνες	που	προέκυψαν
από το κλ	\άσμ	α 3 μετ	ά από	PTLC.

Ζώνες παρασκευαστικής TLC	Βάρος (mg)
Ζώνη a	2.2
Ζώνη b	0.2
Ζώνη c	5.6
Ζώνη d	5.2

Οι ζώνες Α, C και D θεωρήθηκαν καθαρές ουσίες βάσει του χρωματογραφήματος TLC που πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ανάπτυξης DCM/n-Hex 7:3 (v/v). Επομένως αναλύθηκαν με χρωματογραφικές/φασματοσκοπικές τεχνικές όπως GC-MS και NMR. Και για τις τρείς ζώνες ελήφθησαν φάσματα 1D-NMR , ενώ για τις ζώνες C και D ελήφθησαν συμπληρωματικά φάσματα 2D-NMR. Η ζώνη A αποτελεί μίγμα που χρήζει περαιτέρω απομόνωσης προς ταυτοποίηση των μεταβολιτών του, η ζώνη C ταυτοποιήθηκε ως κανναβικιτράνη και τέλος η ζώνη D ταυτοποιήθηκε ως το διτερπένιο φυτόλη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

#### 6.1 Φασματοσκοπική Ταυτοποίηση

Στο σημείο αυτό παρατίθενται τα δεδομένα ταυτοποίησης των απομονωμένων μορίων, σύμφωνα με τις φασματοσκοπικές τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν.

#### 6.1.1 Καννναβιδιόλη

Σύμφωνα με την ανάλυση με GC-MS παραλήφθηκε το παρακάτω χρωματογράφημα:



Σχήμα 1. Χρωματογράφημα GC-MS κανναβιδιόλης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 17.43$ , EI-MS m/z (%): 231 (100), 232 (18), 246 (14), 314 (M<sup>+</sup>, 6). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [80], ο χρόνος κατακράτησης καθώς και το μοτίβο θραυσματοποίησης συσχετίστηκε με την κανναβιδιόλη, CBD (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Χημική δομή κανναβιδιόλης



Στην περιοχή από τα 4.00 έως τα 6.00 ppm του φάσματος <sup>1</sup>H-NMR, εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες επιβεβαιώνουν την ύπαρξη κανναβιδιόλης. Συγκεκριμένα στα 4.56 και 4.66 ppm παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των δύο πρωτονίων της θέσης 9 του μεθυλενίου, η πολλαπλή κορυφή που παρατηρείται μια στα 4.56 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο cis της θέσης 9, ενώ η πολλαπλή στα 4.66 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο trans της ίδιας θέσης. Στην περιοχή 0.80 - 3.00 ppm εντοπίζονται τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας του φαινολικού δακτυλίου, συγκεκριμένα στα 0.88 ppm εντοπίζεται μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα τρία πρωτόνια της θέσης 5", στα 1.29 ppm η πολλαπλή των πρωτονίων των θέσεων 3'' και 4'' και στα 2.43 ppm η τριπλή των πρωτονίων της θέσης 1". Στα 1.65 και 1.79 ppm εντοπίζονται οι 2 απλές κορυφές των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 10 και 7 του τερπενικού δακτυλίου. Τέλος στα 3.85 ppm εντοπίζεται η πολλαπλή κορυφή του πρωτονίου της θέσης 1, στα 5.57 ppm η απλή κορυφή της θέσης 2 του τερπενικού δακτυλίου ενώ στην αρωματική περιοχή του φάσματος εντοπίζονται οι διευρυμένες κορύφες των αρωματικών πρωτονίων των θέσεων 3' και 5' [148].

Θέση	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	3.85	1H <i>, dm</i> , 10.3 Hz
2	5.57	1H <i>, d</i> , 2.5 Hz
3	-	-
4	2.09	1H <i>, m</i>
	2.23	1H, <i>m</i>
5	1.83	2H, <i>m</i>
6	2.40	1H, <i>m</i>
7	1.79	3H <i>, s</i>
8	-	-
9	4.56	trans 1H, m
	4.66	cis 1H, m
10	1.65	3H <i>, s</i>
1'	-	-
2'	-	-
3'	6.27	1H, brs
4'	-	-
5′	6.17	1H, brs
6'	-	-
1"	2.43	2H <i>, t,</i> 7.5 Hz
2"	1.55	2H, <i>m</i>
3"	1.29	2H, <i>m</i>
4"	1.29	2H, <i>m</i>
5″	0.88	3H <i>, t,</i> 7.0 Hz
2'-OH	5.96	1H, s
6'-OH	5.02	1H, s

Πίνακας 1. Φασματοσκοπικά δεδομένα κανναβιδιόλης σε  $CDCI_3$ .

### 6.1.2 Κανναβιδιβαρίνη

Σύμφωνα με την ανάλυση με GC-MS παραλήφθηκε το παρακάτω χρωματογράφημα:



Σχήμα 3. Χρωματογράφημα GC-MS κανναβιδιβαρίνης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 15.76$ , EI-MS m/z (%): 165 (15), 174 (15), 201 (20), 203 (100), 218 (22), 286 (M<sup>+</sup>, 11). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [149], το μοτίβο θραυσματοποίησης αποδίδεται στην κανναβιδιβαρίνη, CBDV (Εικ.2).



Εικόνα 2. Χημική δομή κανναβιδιβαρίνης



Σχήμα 4. Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR κανναβιδιβαρίνης

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του δείγματος εντοπίστηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές της κανναβιδιόλης με μόνη διαφορά τα σήματα της αλείφατικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν τρείς κορυφές, μια τριπλή στα 0.90 ppm, και δύο πολλαπλές στα 1.59 και 2.44 ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 3'', 2'' και 1'' της προπυλικής αλειφατικής αλυσίδας του φαινολικού δακτυλίου [149].



Σχήμα 5. Φάσμα COSY κανναβιδιβαρίνης

Στο φάσμα COSY εντοπίστηκαν δύο συσχετίσεις ανάμεσα στα πρωτόνια της αλειφατικής προπυλικής αλυσίδας. Η πρώτη δίνει σήμα στα 0.89 και 1.59 ppm και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 1'' και 2''. Η δεύτερη εντοπίζεται στα 1.59 και 2.44 ppm και αντιστοιχέι στα των θέσης 2'' και 3''.



Στο φάσμα HSQC εντοπίζονται τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα τα πρωτόνια της θέσης 3'', αντιστοιχούν στο φάσμα του άνθρακα στην περιοχή των 13.72 ppm, τα πρωτόνια της θέσης 2'' αντιστοιχούν στα 24.03 ppm και τέλος τα πρωτόνια της θέσης 1'' αντιστοιχούν στα 37.53 ppm.



Σύμφωνα με το φάσμα HMBC, τα πρωτόνια της θέσης 3" της αλειφατικής αλυσίδας δίνουν συσχετίσεις με τους άνθρακες C-2" και C-1" στα 24.03 ppm και 37.53 ppm. Για τα πρωτόνια της θέσης 2" εντοπίζεται συσχέτιση με τους αλειφατικούς άνθρακες των θέσεων 3", 1" καθώς και με τον αρωματικό άνθρακα της θέσης 4'. Τέλος τα πρωτόνια της θέσης 1" έδωσαν σήματα συσχέτισης με τους αρωματικούς άνθρακες των θέσεων C-3' και C-4'.

Θέση	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	37.32	3.85	1H <i>, dm,</i> 10.36 Hz
2	124.18	5.57	1H, <i>d</i> , 2.7 Hz,
3	139.99	-	-
4	30.40	2.10 2.23	1H, m 1H, m
5	28.52	1.83	2H, <i>m</i>
6	46.20	2.40	1H, <i>m</i>
7	23.58	1.79	3H <i>, s</i>
8	149.36	-	-
9	110.77	4.56 4.66	trans 1H, m cis 1H, m
10	20.51	1.65	3H, <i>s</i>
1'	115.9	-	-
2'	157.5	-	-
3'	107.23	6.27	1H, brs
4'	142.77	-	-
5'	107.23	6.20	1H, brs
6'	150.3	-	-
1"	37.53	2.44	2H, <i>t</i> , 7.7 Hz
2"	24.03	1.59	2H, <i>m</i>
3"	13.72	0.90	3H <i>, t,</i> 7.3 Hz
2'-OH	-	5.96	1H, <i>s</i>
6'-OH	-	5.02	1H, <i>s</i>

Πίνακας 2. Φασματοσκοπικά δεδομένα κανναβιδιβαρίνης σε CDCl<sub>3</sub>.



Σχήμα 8. Χρωματογράφημα GC-MS (R)-κανναβιελσοϊκού οξέος

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 18.25$ , EI-MS m/z (%): 43 (26), 108 (17), 147 (43), 205 (66), 247 (100), 330 ((M<sup>+</sup>, 40). Το μοτίβο θραυσματοποίησης παραπέμπει στο ισομερές του (*R*)-κανναβιελσοϊκού οξέος, (*R*)-CBEA (Εικ. 3) [150].



Εικόνα 3. Χημική δομή (R)-κανναβιελσοϊκού οξέος-Α



Στα 3.30 ppm και 4.30 ppm του φάσματος <sup>1</sup>Η-NMR εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες αποδίδονται στα πρωτόνια των θέσεων 3 και 2, του τερπενικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας εντοπίζονται στην περιοχή 0.88 με 3.00 ppm, ενώ οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές των μεθυλίων των θέσεων 10 και 7 του τερπενικού δακτυλίου, εντοπίζονται στα 1.83 ppm και 1.34 ppm. Στα 6.39 ppm και 6.35 ppm εντοπίζονται δυο ακόμη χαρακτηριστικές απλές κορυφές, η πρώτη αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 2' και η δεύτερη στο πρωτόνιο της θέσης 4' του αρωματικού δακτυλίου. Τέλος στα 11.34 ppm εντοπίζεται το πρωτόνιο του καρβονυλίου του οξέος [151].



**Σχήμα 10.** Φάσμα COSY (*R*)-κανναβιελσοϊκού οξέος

Στο φάσμα COSY ήταν ευδιάκριτα τα σήματα συσχέτισης των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας, συγκεκριμένα το σήμα στα 1.34, 0.88 ppm αφορά τα πρωτόνια των θέσεων 5" και 4" και το σήμα στα 1.57, 1.34 ppm τα πρωτόνια των θέσεων 2" και 3". Μια ακόμα σημαντική συσχέτιση εντοπίζεται στα δύο γειτονικά πρωτόνια των θέσεων 2 και 3 του τερπενικού δακτυλίου στα 4.30 και 3.30 ppm αντίστοιχα.



Στο φάσμα HSQC-DEPT εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσης 5", που αντιστοιχούν στο φάσμα του άνθρακα στα 14 ppm, τα πρωτόνια της θέση 4" στα 22.42 ppm και τέλος το πρωτόνιο της θέσης 1" στα 37.03 ppm. Όσον αφόρα τα πρωτόνια του τερπενικού δακτυλίου 2 και 3 αντιστοιχούν στα 91.28 και 41.78 ppm. Τέλος το πρωτόνιο της θέσης 4' του αρωματικού δακτυλίου αντιστοιχεί στα 106.08 ppm.



**Σχήμα 12**. Φάσμα HMBC (R)-κανναβιελσοϊκού οξέος

Στο φάσμα HMBC εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσης 3", που δίνουν συσχέτιση με το φάσμα του άνθρακα στην περιοχή των 22.40 ppm, αυτή η χημική μετατόπιση αντιστοιχεί στον άνθρακα της θέσης 4" της αλειφατικής αλυσίδας. Το πρωτόνιο της θέσης 3 του τερπενικού δακτυλίου δίνει συσχέτιση με τον άνθρακα C-6' του αρωματικού δακτυλίου στα 164.09 ppm. Αντίστοιχα το πρωτόνιο της θέσης 2 δίνει σήμα στο φάσμα του άνθρακα στα 28.41 35.59, 49.34 και 70.17 ppm, τα οποία αντιστοιχούν στους άνθρακες C-5, C-6, C-4, και C-1 του τερπενικού δακτυλίου.

Θέση	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	70.17	-	-
2	91.28	4.30	1H <i>, d,</i> 5.5 Hz
3	41.78	3.30	1H, <i>dd,</i> 10.8, 5.4 Hz
4	49.34	2.01	1H <i>, m</i>
5	28.41	1.58	2H <i>, m</i>
6	35.59	1.77	2H <i>, m</i>
7	25.26	1.36	3H <i>, s</i>
8	146.83	-	-
Q	112 03	4.55	1H, <i>m</i>
5	112.05	4.65	1H, <i>m</i>
10	18.58	1.83	3H <i>, s</i>
1'	160.84	-	-
2'	104.10	-	-
3'	150.25	-	-
4'	106.08	6.35	1H, s
5′	164.09	-	-
6'	118.22	-	-
1"	37.03	2.96	2H, <i>t</i> , 7.6 Hz
2"	31.56	1.57	2H <i>, m</i>
3"	31.83	1.34	2H <i>, m</i>
4"	22.42	1.34	2H, <i>m</i>
5"	14.00	0. 88	3H <i>, t,</i> 6.9 Hz
5'-OH	-	6.39	1H, brs
СООН		11.35	1H <i>, s</i>

Πίνακας 3. Φασματοσκοπικά δεδομένα (R)-κανναβιελσοϊκού οξέος σε CDCl<sub>3</sub>.



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα GC-MS (S)-κανναβιελσοϊκού οξέος-Α

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R$  = 18.12, EI-MS m/z (%): 43 (46), 108 (30), 147 (58), 205 (100), 247 (68), 330 (M<sup>+</sup>, 38). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [152], το μοτίβο θραυσματοποίησης παραπέμπει στο ισομερές (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ, (S)-CBEA (Εικ.4).

Τα φάσματα 1D και 2D πού λήφθηκαν έδειξαν όμοιες συσχετίσεις με το προηγούμενο ισομερές.



Εικόνα 4. Χημική δομή (S)-κανναβιελσοϊκού οξέος-Α

Για την πλήρη απόδοση του (S)-κανναβιελσοϊκού οξέος-Α σε πίνακα απαιτείται η απομόνωση του σε καθαρή μορφή.

## 6.1.5 (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Β

Σύμφωνα με το χρωματογράφημα GC-MS που λήφθηκε η ένωση ταυτοποιήθηκε ως (S)-κανναβιελσοϊκό οξύ, παρ' όλα αυτά στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του ίδιου δείγματος εντοπίστηκε μία διαφοροποίηση.



Στο φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR πού λήφθηκε εντοπίστηκαν όμοιες συσχετίσεις με τα παραπάνω ισομερή, με κύρια διαφορά στο πρωτόνιο της θέσης 2 του τερπενικού δακτυλίου, όπου εδώ εντοπίζεται σε εμφανώς χαμηλότερη χημική μετατόπιση συγκεκριμένα στα 4.16 ppm, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων αυτή μετατόπιση υποδηλώνει την υπάρξη οξέος σε Β θέση στον φαινολικό δακτύλιο του κανναβιελσοϊκού οξέος [151], χαρακτηρίζοντας έτσι το δείγμα ως *(S)*-κανναβιελσοϊκό οξύ-Β, *(S)*-CBEA-B (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Χημική δομή (S)-κανναβιελσοϊκού οξέος-Β

Για την πλήρη απόδοση του (S)-κανναβιελσοϊκού οξέος-Β σε πίνακα απαιτείται η απομόνωση του σε καθαρή μορφή.



Σχήμα 15. Χρωματογράφημα GC-MS κανναβιγερόλης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 18.66$ , EI-MS m/z (%): 69 (35), 123 (22), 136 (20), 193 (100), 231 (41), 316 (M<sup>+</sup>, 14). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [80], το μοντέλο θραυσματοποίησης παραμπέμπει στην κανναβιγερόλη, CBG (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Χημική δομή κανναβιγερόλης



**Σχήμα 16.** Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR κανναβιγερόλης

Στο φάσμα του <sup>1</sup>H-NMR εντοπίζονται τρία χαρακτηριστικά σήματα απλών κορυφών στα 1.59 ppm, 1.68 ppm και 1.81 ppm που αντιστοιχούν στα τρία μεθύλια των θέσεων 8', 9' και 3' αντίστοιχα της ισοπρενικής αλυσίδας. Στην περιοχή των 2.08 ppm εντοπίζεται άλλη μια χαρακτηριστική κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 4' και 5' της ισοπρενικής αλυσίδας. Επιπλέον στην περιοχή των 5.08 ppm εντοπίζεται μια πολλαπλή κορυφή του πρωτονίου της θέσης 6'. Τελός στην αρωματική περιοχή και συγκεκριμένα στα 6.25 ppm εντοπίζονται τα πρωτόνια των θέσεων 4 και 6 του αρωματικού δακτυλίου [148].



**Σχήμα 17.** Φάσμα COSY κανναβιγερόλης
Στο φάσμα COSY εντοπίστηκαν οι συσχετίσεις των πρωτονίων της ισοπρενικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα στα 3.40 ppm και 5.29 ppm εντοπίστηκε το σήμα των πρωτονίων των θέσεων 1' και 2' και στα 5.07 ppm και 2.08 ppm το σήμα των πρωτονίων των θέσεων 6' και 5'.



Στο φάσμα HSQC-DEPT εντοπίζονται τα πρωτόνια των μεθυλίων 8' στα 17.71 ppm στο φάσμα του άνθρακα, 9' στα 25.62 ppm και τέλος τα πρωτόνια της θέσης 3' στα 16.18 ppm. Τα πρωτόνια της θέσης 5' της ισοπρενικής αλυσίδας δίνουν σήμα στα 26.33 ppm. Όσον αφόρα τα πρωτόνια των θέσεων 6' και 2', της ίδιας αλυσίδας, αντιστοιχούν στην περιοχή των 123.83 και 121.71 ppm [148].



**Σχήμα 19.** Φάσμα ΗΜΒC κανναβιγερόλης

Τα πρωτόνια των μεθυλίων των θέσεων 8' και 9' του ισοπρενικού δακτυλίου δίνουν συσχέτισεις με τους δύο άνθρακες των θέσεων 6' και 7' στα 123.83 ppm και 132.05 ppm. Τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 3' δίνουν συσχέτιση με τους άνθρακες των θέσεων 4' και 2' στα 39.71 ppm και 121.71 ppm. Τέλος εντοπίζεται συσχέτιση των πρωτονίων των θέσεων 4' και 5' με τους άνθρακες των θέσεων 5', 2' και 3' στα 22.63 ppm, 121.71 ppm και 139.18 ppm αντίστοιχα [148].

Θέση	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	154.83	-	-
2	110.59	-	-
3	154.83	-	-
4	108.37	6.25	2H <i>, s</i>
5	142.77	-	-
6	108.37	6.25	2H, <i>s</i>
1′	22.26	3.39	2H, <i>d</i> , 7.1 Hz
2′	121.71	5.27	1H, <i>m</i>
3'	138.94	-	-
3'-Me	16.18	1.81	3H <i>, s</i>
4'	39.71	2.08	4H, <i>m</i>
5'	26.33	2.08	4H <i>, m</i>
6'	123.83	5.08	1H, <i>m</i>
7′	132.05	-	-
8′	17.71	1.59	3H <i>, s</i>
9'	25.62	1.68	3H <i>, s</i>
1"	35.51	2.46	2H <i>, t</i> , 7.6 Hz
2"	30.75	1.56	2H, <i>m</i>
3"	31.42	1.31	2H, <i>m</i>
4"	22.42	1.31	2H, <i>m</i>
5"	13.95	0. 89	3H <i>, t,</i> 7.0 Hz
ОН	-	4.97	2H, s

Πίνακας 4. Φασματοσκοπικά δεδομένα κανναβιγερόλης σε CDCl3.

### 6.1.7 (S)-Κανναβιελσοΐνη



Σχήμα 20. Χρωματογράφημα GC-MS (S)-κανναβιελσοΐνης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα: t<sub>R</sub> = 18.12, EI-MS m/z (%): 43 (39), 108 (34), 147 (74), 205 (100), 247 (99), 330 (M<sup>+</sup>, 61). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [152], το μοτίβο θραυσματοποίησης παραπέμπει στο ισομερές (*S*)-κανναβιελσοΐνη, (*S*)-CBE (Εικ. 7).



Εικόνα 7. Χημική δομή (S)-κανναβιελσοΐνης



**Σχήμα 21**. Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR (S)-κανναβιελσοΐνης

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR εντοπίστηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που προαναφέρθηκαν, με μόνη διαφορά δύο απλές κορυφές που εντοπίζονται στα 6.27 και 6.30 ppm και αντιστοιχούν στα δύο πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου των θέσεων 2' και 4', όπως επίσης και η απουσία κορυφής στην περιοχή του καρβονυλίου του οξέος. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν την ύπαρξη της (*S*)-κανναβιελσοΐνης [150].



**Σχήμα 22.** Φάσμα COSY (S)-κανναβιελσοΐνης

Στο φάσμα COSY εντοπίστηκαν οι συσχετίσεις των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα στα 0.88, 1.30 ppm εντοπίζεται η συσχέτιση των πρωτονίων

των θέσεων 5" και 4", ενώ στα 1.58, 1.30 ppm εντοπίζεται η συσχέτιση των πρωτονίων των θέσεων 3" και 2". Σημαντική είναι η συσχέτιση των γειτονικών πρωτονίων των θέσεων 2 και 3 του τερπενικού δακτυλίου στα 4.10 και 3.34 ppm.



Σχήμα 23. Φάσμα HSQC-DEPT (S)-κανναβιελσοΐνης

Στο φάσμα HSQC-DEPT εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσης 5" της αλειφατικής αλυσίδας, που δίνουν αντιστοίχιση στο φάσμα του άνθρακα στην περιοχή των 13.95 ppm. Τα υδρογόνα των μεθυλίων που βρίσκονται στις θέσεις 10 και 7 του τερπενικού δακτυλίου δίνουν σήμα στην περιοχή του άνθρακα στα 22.48 και 28.25 ppm. Όσον αφόρα τα πρωτόνια του τερπενικού δακτυλίου των θέσεων 2 και 3 αντιστοιχούν στην περιοχή των 89.28 και 41.98 ppm. Τέλος τα πρωτόνια των θέσεων 4', 2' του αρωματικού δακτυλίου αντιστοιχούν στην αρωματική περιοχή του φάσματος άνθρακα, συγκεκριμένα στα 109.64 ppm και 103.14.



Σχήμα 24. Φάσμα HMBC (S)-κανναβιελσοΐνης

Στο φάσμα HMBC εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσης 5" που δίνουν σήμα στο φάσμα του άνθρακα στα 22.48 ppm, αυτή η χημική μετατόπιση αντιστοιχεί στον άνθρακα της θέσης 4" της αλειφατικής αλυσίδας. Είναι επιπλέον εμφανής η συσχέτιση των πρωτονίων της θέσης 3" της αλειφατικής αλυσίδας με τον ίδιο άνθρακα C-4". Τέλος τα δύο πρωτόνια της θέσης 1" δίνουν σήμα στο φάσμα του άνθρακα στα 103.14 και 109.64 ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες των θέσεων 2' και 4' του αρωματικού δακτυλίου. Το πρωτόνιο της θέσης 2 του τερπενικού δακτυλίου δίνει συσχέτιση με τον άνθρακα C-6' του αρωματικού δακτυλίου στα 116.63 ppm, ο οποίος με τη σειρά του δίνει συσχέτιση με το πρωτόνιο της θέσεων 2' και 4' με τους αρωματικούς άνθρακες των θέσεων 4' και 2' αντίστοιχα.

Θέση	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	69.18	-	-
2	89.28	4.10	1H, <i>d,</i> 6.0 Hz
3	41.98	3.34	1H, <i>dd,</i> 11.0, 6.0 Hz
4	48.40	1.88	1H, <i>m</i>
5	25.82	1.51	2H, <i>m</i>
6	34.75	1.71	2H, <i>m</i>
7	28.25	1.48	3H <i>, s</i>
8	153.27	-	-
0	111 25	5.03	1H, <i>m</i>
9	111.55	5.06	1H, <i>m</i>
10	22.48	1.83	3H <i>, s</i>
1'	152.00	-	-
2'	109.64	6.27	1H, <i>s</i>
3'	144.83	-	-
4'	103.14	6.30	1H, <i>s</i>
5′	160.26	-	-
6'	116.63	-	-
1"	36.02	2.49	2H <i>, t</i> , 7.6 Hz
2"	30.90	1.58	2H, <i>m</i>
3"	31.46	1.30	2H, <i>m</i>
4"	22.48	1.30	2H, m
5″	13.95	0. 88	3H <i>, t,</i> 6.9 Hz
5'-OH	-	5.35	1H, brs

Πίνακας 5. Φασματοσκοπικά δεδομένα (S)-κανναβιελσοΐνης σε CDCl<sub>3</sub>.

#### 6.1.8 Κανναβικυκλόλη



Σχήμα 25. Χρωματογράφημα GC-MS κανναβικυκλόλης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 17.11$ , EI-MS m/z (%): 174 (12), 231 (100), 232 (26), 314 (M<sup>+</sup>, 7). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [153], το μοτίβο θραυσματοποίησης αποδίδεται στην κανναβικυκλόλη, CBL (Εικ. 8).



Στο φάσμα του <sup>1</sup>H-NMR εντοπίζεται μια διπλή διπλής κορυφή στην περιοχή των 2.60 ppm και μία διπλή κορυφή στα 3.09 ppm που αντιστοιχούν στα δύο πρωτόνια των θέσεων 7 και 1 του κυκλοβουτανίου, και αποτελούν χαρακτηριστικές κορυφές του μορίου της κανναβικυκλόλης. Στην περιοχή των 2.39 ppm εντοπίζεται άλλη μια χαρακτηριστική κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 3 του κυκλοβουτανίου. Στα 0.79 ppm και 1.37 ppm εντοπίζονται οι απλές κορυφές των πρωτονίων των τριών μεθυλίων. Επιπλέον στην περιοχή των 4.46 ppm εντοπίζεται η διευρυμένη απλή κορυφή του πρωτονίου του υδροξυλίου της θέσης 2' του αρωματικού δακτυλίου. Τελός στην αρωματική περιοχή και συγκεκριμένα στα 6.17 και 6.32 ppm εντοπίζονται οι δύο απλές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 5' και 3' [153].

Θέση	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	3.09	1H <i>, d</i> , 9.6 Hz
2	-	-
3	2.39	1H, <i>m</i>
4	1.69	2H, <i>m</i>
5	1.95	2H, <i>m</i>
6	-	-
7	2.60	1H, <i>dd</i> , 9.6, 7.4 Hz
8	1.37	6H <i>, s</i>
9	0.79	3H <i>, s</i>
10	1.37	6H <i>, s</i>
1'	-	-
2'	-	-
3′	6.32	1H, <i>s</i>
4'	-	-
5′	6.17	1H <i>, s</i>
6′	-	-
1"	2.41	2H, <i>t</i> , 7.0 Hz
2"	1.60	2H, <i>m</i>
3"	1.33	2H, <i>m</i>
4"	1.33	2H, <i>m</i>
5″	0.87	3H <i>, t,</i> 6.9 Hz
2'-OH	4.46	1H <i>, brs</i>

#### Πίνακας 6. Φασματοσκοπικά δεδομένα κανναβικυκλόλης σε CDCl<sub>3</sub>.



**Σχήμα 27.** Χρωματογράφημα GC-MS Δ<sup>9</sup>- & Δ<sup>8</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης

Στο χρωματογράφημα GS-MS παρατηρήθηκαν δυο βασικές κορυφές σε χρόνους κατακράτησης 17.96 και 18.32. Στο φάσμα μάζας της πρώτης εντοπίστηκαν τα βασικά θραύσματα:  $t_R = 17.96$ , EI-MS m/z (%): 231 (95), 243 (37), 258 (24), 271 (36), 299 (90), 300 (20), 314 (M+, 100) και στο φάσμα μάζας της δεύτερης τα θραύσματα:  $t_R = 18.32$ , EI-MS m/z (%): 231 (100), 243 (44), 258 (31), 271 (47), 299 (99), 300 (21), 314 (M+, 86). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [80], οι δύο ενώσεις αποτελούν τα ισομερή της τετραϋδροκανναβινόλης, Δ<sup>8</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>8</sup>-THC) και Δ<sup>9</sup>τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC) αντίστοιχα (Εικ. 9).



**Εικόνα 9.** Χημικές δομές Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης (αριστερά) & Δ<sup>8</sup>τετραϋδροκανναβινόλης (δεξιά)



Στο φάσμα του <sup>1</sup>H-NMR είναι διακριτά κυρίως τα σήματα που αντιστοιχούν στην Δ<sup>9</sup>τετραϋδροκανναβινόλη. Συγκεκριμένα στην περιοχή των 1.90 και 1.68 ppm εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές απλές κορυφές των μεθυλίων των θέσεων 9 και 3 του τερπενικού δακτυλίου. Στα 1.09 ppm, παρατηρείται μια απλη κορυφή η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 9. Το χαρακτηριστικό σήμα πολλαπλής κορυφής που εντοπίστηκε στα 3.20 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1 και έχει σταθερά σύζευξης 11 Hz, που υποδηλώνει την trans διευθέτιση του με το πρωτόνιο της θέσης 6. Τέλος στην περιοχή των 6.14, 6.27 και 6.31 ppm εντοπίζονται τα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου των θέσεων 3', 5' καθώς και το πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 2 [148].

Θέση	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	3.20	1H, <i>dm</i> , 11.2 Hz
2	6.31	1H <i>, q,</i> 1.7 Hz
3	-	-
3-Me	1.68	3H, s
4	2.17	2H, <i>m</i>
5	1.90	1H <i>, m</i>
J	1.40	1H <i>, m</i>
6	1.69	1H <i>, m</i>
7	-	-
8	1.41	3H <i>, s</i>
9	1.09	3H, <i>s</i>
1'	-	-
2′	-	-
3'	6.14	1H <i>, d,</i> 1.6 Hz
4'	-	-
5′	6.27	1H <i>, d,</i> 1.6 Hz
1"	2.43	2H, <i>t</i> , 7.0 Hz
2"	1.57	2H, <i>m</i>
3"	1.30	2H, <i>m</i>
4"	1.30	2H, <i>m</i>
5″	0. 87	3H, <i>t,</i> 6.9 Hz
2'-OH	4.87	1H, s

Πίνακας 7. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης σε CDCl<sub>3</sub>.

### 6.1.10 Κανναβιχρωμένιο



Σχήμα 29. Χρωματογράφημα GC-MS κανναβιχρωμενίου

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 17.47$ , EI-MS m/z (%): 174 (10), 231 (100), 232 (17), 314 (M+, 3). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [153], το μοτίβο θραυσματοποίησης αποδίδεται στο κανναβιχρωμένιο, CBC (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Χημική δομή κανναβιχρωμενίου



**Σχήμα 30**. Φάσμα <sup>1</sup>Η-ΝΜR κανναβιχρωμενίου

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR εντοπίστηκε η χαρακτηριστική διερυμένη τριπλή κορυφή, στα 5.10 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτονίο της θέσης 6' και οι δύο διπλές κορυφές, στα 5.49 και 6.61 ppm, των ολεφινικών πρωτονίων των θέσεων 2' και 1'. Στην περιοχή των 1.30 ppm - 1.70 ppm εντοπίζονται οι απλές κορυφές των μεθυλίων των θέσεων 9', 8' και 10'. Στην αρωματική περιοχή, στα 6.11 και 6.25 ppm, εντοπίζονται οι δύο απλές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 4 και 2 του αρωματικού δακτυλίου [153].



121

Στο φάσμα COSY εντοπίστηκαν οι συσχετίσεις των πρωτονίων της ισοπρενικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα στα 5.10, 2.11 ppm εντοπίστηκε το σήμα συσχέτισης των πρωτονίων των θέσεων 6' και 5' και στα 5.49, 6.61 ppm εντοπίστηκε το σήμα συσχέτισης των πρωτονίων των θέσεων 2' και 1'.



Σχήμα 32. Φάσμα HSQC-DEPT κανναβιχρωμενίου

Στο φάσμα HSQC-DEPT εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσης 6' στα 124.30 ppm στο φάσμα του άνθρακα, της θέσης 2' στα 127.20 ppm και τα πρωτόνια της θέσης 1' στα 116.69 ppm. Τελος τα πρωτόνια των θέσεων 2 και 4 του αρωματικού δακτυλίου δίνουν σήμα στην περιοχή του άνθρακα στα 109.15 και 107.61 ppm αντίστοιχα [153].



Σχήμα 33. Φάσμα ΗΜΒC κανναβιχρωμενίου

Το πρωτόνιο της θέσης 6' δίνει συχετίσεις με τους άνθρακες των θέσεων 10' και 8' του ισοπρενικού δακτυλίου στα 17.65 ppm και 25.60 ppm. Το ολεφινικό πρωτόνιο της θέσης 2' δίνει συσχέτιση με τον άνθρακα 3' στα 78.61 ppm. Το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2 δίνει συσχετίσεις στα 36.21 και 107.61 ppm με τους άνθρακες των θέσεων 1'' της αλειφατικής αλυσίδας και 4 του αρωματικού δακτυλίου. Τέλος εντοπίζεται συσχέτιση του πρωτονίου της θέσης 1' με τους άνθρακες των θέσεων 3' και 1 στα 78.61 ppm και 150.86 ppm [153]. Για την πλήρη απόδοση του κανναβιχρωμενίου σε πίνακα απαιτείται η απομόνωση του σε καθαρή μορφή.

#### 6.1.11 Κανναβικιτράνη



Σχήμα 34. Χρωματογράφημα GC-MS κανναβικιτράνης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R$  = 16.40, EI-MS m/z (%): 174 (7), 231 (100), 243 (10), 258(10), 271 (12), 299(10), 314 (M+, 23). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [153], το μοτίβο θραυσματοποίησης αποδίδεται στην κανναβικιτράνη, CBCT (Εικ. 11).



Εικόνα 11. Χημική δομή κανναβικιτράνης



Από το φάσμα του <sup>1</sup>H-NMR που λήφθηκε εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές στην αλειφατική περιοχή του φάσματος, συγκεκριμένα μεταξύ των 1.00 ppm - 1.50 ppm εντοπίζονται οι απλές κορυφές των μεθυλίων των θέσεων 9, 10 και 8. Στην αλειφατική περιοχή εντοπίζονται και οι κορυφές των μεθυλενίων των θέσεων 4 και 2 στα 1.75 και 1.82 ppm αντίστοιχα, καθώς και η διπλή διπλή διπλής του μεθινίου της θέσης 6 στα 2.01 ppm. Τέλος στην αρωματική περιοχή εντοπίζονται οι δύο απλές κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 2' και 4' του αρωματικού δακτυλίου [153].



Σχήμα 36. Φάσμα COSY κανναβικιτράνης

Στο φάσμα COSY εντοπίστηκαν κυρίως οι συσχετίσεις των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας. Επιπλέον εντοπίστηκε το σήμα συσχέτισης των πρωτονίων των θέσεων 6 και 5 στα 2.00 ppm και 1.23 ppm.



Σχήμα 37. Φάσμα HSQC κανναβικιτράνης

Στο φάσμα HSQC-DEPT εντοπίζονται τα πρωτόνια της θέσης 2 στα 35.51 ppm, της θέσης 3 στα 28.12 ppm και της θέσης 4 στα 37.49 ppm. Το πρωτόνιο της θέσης 6 εντοπίζεται στα 46.86 ppm στο φάσμα του άνθρακα και τέλος τα δύο αρωματικά πρωτόνια των θέσεων 2' και 4' εντοπίζονται στα 109.69 και 108.84 ppm.



**Σχήμα 38.** Φάσμα ΗΜΒC κανναβικιτράνης

Τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 9 δίνουν συχετίσεις με τους άνθρακες των θέσεων 8, 6 και 7 στα 29.74, 46.86 και 83.51 ppm τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 2 δίνουν συσχετίσεις με τους άνθρακες 3, 6 και 6' στα 28.12, 46.86 και 114.06 ppm. Τέλος το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 2' δίνει συσχέτιση με τους άνθρακες των θέσεων 1'', 4', 6' και 1' στα 36.13, 108.90, 114.06 και 156.87.

Θέση	<sup>13</sup> C-NMR (ppm)	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	74.44	-	-
2	35.51	1.82	2H, <i>dd</i> 13.1, 1.7 Hz
3	28.12	2.85	1H, <i>m</i>
4	37.49	1.75	2H, <i>m</i>
5	22.27	1.23	2H, <i>m</i>
6	46.86	2.01	1H, ddd 11.5, 5.4, 2.8 Hz
7	83.51	-	-
8	29.74	1.51	3H <i>, s</i>
9	23.69	1.01	3H, <i>s</i>
10	29.14	1.37	3H <i>, s</i>
1'	156.87	-	-
2'	109.69	6.27	1H, <i>s</i>
3'	142.58	-	-
4'	108.90	6.32	1H, <i>s</i>
5'	156.62	-	-
6'	114.06	-	-
1"	36.13	2.50	2H, <i>t</i> , 7.5 Hz
2"	30.54	1.55	2H, <i>m</i>
3"	31.32	1.28	2H, <i>m</i>
4"	22.47	1.28	2H, <i>m</i>
5"	13.97	0.87	3H <i>, t,</i> 7.2 Hz

Πίνακας 8. Φασματοσκοπικά δεδομένα κανναβικιτράνης σε CDCl<sub>3</sub>.

#### 6.1.12 Φυτόλη



Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 14.56$ , EI-MS m/z (%): 57 (35), 69 (42), 71 (100), 81 (22) 123 (25) 296 (M+, 0). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [154], το μοτίβο θραυσματοποίησης αποδίδεται στην φυτόλη.



Εικόνα 12. Χημική δομή φυτόλης



**Σχήμα 40**. Φάσμα <sup>1</sup>Η-NMR φυτόλης

Από το φάσμα του <sup>1</sup>Η-NMR που λήφθηκε εντοπίστηκαν οι τρείς χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 0.84, 0.85 και 0.86 ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλίων 18, 19, 16 και 20. Στα 1.52 ppm εντοπίζεται η επταπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και στα 1.67 ppm εντοπίζεται η κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου της θέσης 17. Στα 1.99 ppm εντοπίζεται η χαρακτηριστική διευρεμένη τριπλή κορυφή των πρωτονίων της θέσης 4. Τέλος στα 4.15 και 5.41 ppm εντοπίζονται οι κορυφές των πρωτονίων των θέσεων 1 και 2. Όλα τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση του μορίου ως φυτόλη [154] (Εικ. 11).

Θέση	<sup>1</sup> H-NMR (ppm)	Ολοκλήρωση, Πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
1	4.15	2H <i>, d</i> , 6.8 Hz
2	5.41	1H, <i>dt</i> , 7.0, 1.3 Hz
3	-	-
4	1.99	2H, brt, 7.3 Hz
5	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
6	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
7	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
8	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
9	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
10	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
11	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
12	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
13	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
14	1.01-1.44	19H, overlapping CH and CH <sub>2</sub> signals
15	1.52	1H <i>, hept</i> , 6.6 Hz
16	0.86	6H <i>, d</i> , 6.3 Hz
17	1.67	3H <i>, d</i> , 1.3 Hz
18	0.84	3H <i>, d</i> , 6.6 Hz
19	0.85	3H <i>, d</i> , 6.2 Hz
20	0.86	6H <i>, d,</i> 6.3 Hz

#### Πίνακας 9. Φασματοσκοπικά δεδομένα φυτόλης σε CDCl<sub>3</sub>.

### 6.1.13 Οξειδίου του Καρυοφυλλενίου



Σχήμα 41. Χρωματογράφημα GC-MS καρυοφυλλενίου

Στο φάσμα μαζών παρατηρούνται δύο βασικές κορυφές ή κύρια ( $t_R$  = 12.86) αντιστοιχεί σε άγνωστη ένωση που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η δεύτερη κορυφή έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R$  = 12.08, EI-MS m/z (%): 55 (96), 69 (78), 81 (65), 95 (65) 109 (100), 127 (91) 220 (M<sup>+</sup>, 0). Σύμφωνα με την βιβλιοθήκη Wiley και NIST, η ένωση ταυτοποιήθηκε ως οξείδιο του καρυοφυλλενίου (Εικ. 13).



Εικόνα 13. Χημική δομή οξειδίου του καρυοφυλλενίου



Σχήμα 42. Χρωματογράφημα GC-MS αναλόγου κανναβιδιόλης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 17.36$ , EI-MS m/z (%): 231 (100), 232 (17), 246 (54), 314 (M<sup>+</sup>, 13). Το μοτίβο θραυσματοποίησης μπορεί να συσχετιστεί με την κανναβιδιόλη, CBD παρ' όλα αυτά ο χρόνος κατακράτησης είναι παραπλήσιος έτσι η ένωση θεωρήθηκε ανάλογο της κανναβιδιόλης και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



### 6.1.15 Ανάλογο Κανναβιδιόλης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R = 16.76$ , EI-MS m/z (%): 231 (100), 232 (22), 314 (M<sup>+</sup>, 19). Το μοτίβο θραυσματοποίησης συσχετίστηκε επίσης με την κανναβιδιόλη, σε διαφορετικό χρόνο κατακράτησης, επομένως η ένωση θεωρήθηκε ανάλογο της κανναβιδιόλης και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



### 6.1.16 Ανάλογο Κανναβιγερόλης

Σχήμα 44. Χρωματογράφημα GC-MS αναλόγου κανναβιγερόλης

Το φάσμα μαζών που προέκυψε από την βασική κορυφή του χρωματογραφήματος έδωσε τα ακόλουθα θραύσματα:  $t_R$  = 18.70, EI-MS m/z (%): 69 (28), 123 (22), 136 (14), 193 (100), 231 (28), 316 (M+, 10). Το μοντέλο θραυσματοποίησης παραμπέμπει στην κανναβιγερόλη και ο χρόνος κατακράτησης είναι παραπλήσιος επομένως η ένωση θεωρήθηκε ανάλογο της κανναβιγερόλης και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

# 6.2 Αποτελέσματα Βιολογικών δοκιμών

### 6.2.1 Δοκιμή δέσμευσης σταθερής ρίζας DPPH\*

Ο έλεγχος των δειγμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έγινε με τη μέθοδο του DPPH (Lee S.K. et al., 1998)[90] και ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ (καθαρότητα > 98%, Sigma-Aldrich). Το γαλλικό οξύ είναι ένα φυσικό προϊόν με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα [155].

• Προετοιμασία θετικού μάρτυρα:

Η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος που αναστέλλει σε ποσοστό 50% την ελεύθερη ρίζα DPPH<sup>•</sup> είναι IC<sub>50</sub>=100 μg/mL που αντιστοιχεί σε 5 μg/mL στην πλάκα, σύμφωνα με τη πειραματική διαδικασία. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup> σε συγκέντρωση 314 μM. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 12.4 mg και διαλύθηκαν σε 100 ml EtOH abs, για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανάδευση με vortex για την πλήρη διαλυτοποίηση του διαλύματος της ρίζας και άμεση φύλαξη του σε σκοτεινό περιβάλλον, σε θερμοκρασία δωματίου.

• Προετοιμασία δειγμάτων προς μελέτη:

Για τη συγκεκριμένη δοκίμη ελέγχθηκαν τέσσερα ολικά εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης (ποικιλία 'Futura 75'): το αιθανολικό (EtOH), το υπερκρίσιμο (SFE), καθώς και το όξινο και ουδέτρο κλάσμα του υπερκρίσιμου εκχυλίσματος SFE, όπως αυτά προέκυψαν μετά από υγρή-υγρή εκχύλιση. Τέλος, ελέγχθηκε το κανναβινοειδές κανναβιδιόλη (CBD), που παραλήφθηκε σε καθαρότητα 99% από μελέτη που είχε προηγηθεί. Για τα δείγματα αυτά παρασκευάστηκαν 7 συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του IC<sub>50</sub>. Οι συγκεντρώσεις παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 1:

Συγκέντρωση δείγματος	Συγκέντρωση σε βοθρίο
10 mg/mL	500 μg/mL
5 mg/ mL	250 μg/mL
2 mg/ mL	100 µg/mL
1 mg/mL	50 μg/mL
400 mg/mL	20 μg/mL
200 mg/mL	10 μg/mL
100 mg/mL	5 μg/mL

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη.

• Πειραματική πορεία:

Σε διάφανη πλάκα 96 θέσεων προστέθηκαν 190 μL διαλύματος DPPH και 10 μL γαλλικού οξέος ή 10 μL δείγματος, αντίστοιχα. Στις θέσεις των τυφλών δειγμάτων (Blank) το διάλυμα του DPPH αντικαταστάθηκε από 190 μL EtOH. Τέλος, το Control περιείχε 190 μL DPPH και 10 μL DMSO. Μετά την φόρτωση, η πλάκα επωάστηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Η μέτρηση έγινε στο μηχάνημα Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 517 nm. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν. Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης, η οποία δηλώνει παρουσία αντιοξειδωτικών ουσιών και συνεπώς αναγωγή της ελεύθερης ρίζας, υπολογίστηκε βάσει του τύπου: (%) Inhibition = (%) Radical Scavenging Activity = {[(A-B)-(C-D)]/(A-B)} × 100

Όπου:

- A: η απορρόφηση του control
- B: το τυφλό (blank) του control
- C: η απορρόφηση του δείγματος

D: το τυφλό (blank) του δείγματος

Τα ποσοστά δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup> προσδιορίστηκαν σε σύγκριση με την αντιοξειδωτική δράση του γαλλικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη στα βοθρία καθώς και το ποσοστό (%) αναστολής που επέφεραν στην ελεύθερη ρίζα DPPH παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Συγκέντρωση εκχυλίσματος	Αναστολή ρίζας DPPH %	
(μg/mL)	SFE	EtOH
500	18.74	40.87
250	10.57	32.31
100	7.880	9.19
50	-0.04	9.61
20	-0.88	0.60
10	-6.31	0.32
5	-2.39	-7.00

**Πίνακας 2.** Συγκεντρώσεις υπερκρίσιμου εκχυλίσματος (SFE) και αιθανολικού εκχυλίσματος (EtOH), σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Συγκέντρωση όξινου κλάσματος SFE (μg/mL)	Αναστολή ρίζας DPPH %
500	35.28
250	21.99
100	14.15
50	11.49
20	9.73
10	4.49
5	-11.15

**Πινακας 3.** Συγκεντρώσεις όξινου κλάσματος SFE, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH.

**Πινακας 4.** Συγκεντρώσεις ουδέτερου κλάσματος SFE, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Συγκέντρωση ουδέτερου κλάσματος SFE (μg/mL)	Αναστολή ρίζας DPPH %
500	16.34
250	5.73
100	3.82
50	-2.60
20	1.76
10	-4.55
5	-1.85

**Πινακας 5.** Συγκεντρώσεις CBD, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Συγκέντρωση CBD (μg/mL)	Αναστολή ρίζας DPPH %
500	39.20
250	35.15
100	16.14
50	15.13
20	4.15
10	-0.90
5	-3.86

Τέλος, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς σύμφωνα με τις τιμές του ποσοστού (%) αναστολής της ελεύθερης ρίζας σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη. Τα σημεία της καμπύλης που αντιστοιχούν στην γραμμική περιοχή επιλέχθηκαν για τη δημιουργία μιας νέας εξίσωσης, από την οποία υπολογίστηκε το IC<sub>50</sub>, η συγκέντρωση δηλαδή του δείγματος που αναστέλλει την ελεύθερη ρίζα DPPH σε ποσοστό 50%. Οι γραφικές παραστάσεις με τις καμπύλες αναφοράς των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρατίθενται στη συνέχεια.



**Σχήμα 6.1** Καμπύλες αναφοράς του ποσοστού (%) αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH που παρουσίασαν τα εξεταζόμενα δείγματα.

### 6.2.2 Προσδιορισμός ολικού φορτίου φλαβονοειδών (TFC)

Ο υπολογισμός των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε ολικά φλαβονοειδή πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των Chatatikun και Chiabchalard (2013) [156]. Βάσει της μεθόδου, οι απορροφήσεις των πρότυπων της

καμπύλης αναφοράς, καθώς και των δειγμάτων προς μελέτη, για τον προσδιορισμό των ολικών φλαβονοειδών μετρήθηκαν στα 415 nm.

• Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς θετικού μάρτυρα:

Σε κάθε χρωματομετρική δοκιμασία είναι επιτακτικό να κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών-στόχων. Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε φλαβονοειδή κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς ρουτίνης. Για την καμπύλη παρασκευάστηκαν 9 δείγματα πρότυπης ρουτίνης σε διαλύτη DMSO, οι συγκεντρώσεις των οποίων παρατίθενται στον πίνακα 6.

Συγκέντρωση ρουτίνης	Συγκέντρωση σε βοθρίο
5 mg/mL	1000 µg/ml
2 mg/mL	400 μg/mL
1 mg/ml	200 μg/mL
500 μg/mL	100 μg/mL
200 μg/mL	40 μg/mL
100 μg/mL	20 μg/mL
50 μg/mL	10 μg/mL
25 μg/mL	5 μg/mL
5 μg/mL	1 μg/mL

Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων ρουτίνης.



**Σχήμα 6.2** Καμπύλη συγκεντρώσεων αναφοράς της ρουτίνης, βάσει των μετρήσεων απορρόφησης του οργάνου Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 415 nm

• Προετοιμασία δειγμάτων προς μελέτη:

Για την συγκεκριμένη δοκίμη ελέγχθηκαν τέσσερα ολικά εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης (ποικιλία 'Futura 75'): το αιθανολικό (EtOH), το υπερκρίσιμο (SFE), καθώς και το όξινο και ουδέτερο κλάσμα του υπερκρίσιμου εκχυλίσματος SFE. Για τα εκχυλίσματα αυτά, παρασκευάστηκαν 4 συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO για τον υπολογισμό των ολικών φλαβονοειδών. Οι συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Συγκέντρωση δείγματος	Συγκέντρωση σε βοθρίο
10 mg/mL	2 mg/mL
5 mg/mL	1 mg/mL
2 mg/mL	400 μg/mL
1 mg/mL	200 µg/mL

Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη.

### • Πειραματική πορεία:

Αντιδραστήρια:

- 1. Διάλυμα χλωριούχου αργιλίου (AlCl<sub>3</sub>) 10%: Για την παρασκευή διαλύματος 10% (w/v) ζυγίστηκαν 5 g αντιδραστηρίου AlCl<sub>3</sub> και διαλύθηκαν σε 50 mL H<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα οξικού νατρίου (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) 1 M: Για την παρασκευή διαλύματος 1 M ζυγίστηκαν 4.10 g οξικού νατρίου και διαλύθηκαν σε 50 mL H<sub>2</sub>O.

Σε διάφανη πλάκα 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 50 μL δείγματος ή προτύπου διαλύματος ρουτίνης για καθεμία από τις συγκεντρώσεις αναφοράς, επιπλέον τοποθετήθηκαν 20 μL AlCl<sub>3</sub> και 160 μL EtOH, και τέλος προστέθηκαν 20 μL C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>. Τα τυφλά δείγματα (Blank) περιείχαν 40 μL H<sub>2</sub>O, αντί των αντιδραστηρίων AlCl<sub>3</sub> και C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>. Στις θέσεις των Control εισήχθησαν 50 μL DMSO, 20 μL AlCl<sub>3</sub>, 160 μL EtOH και 20 μL C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>. Τα αντιδραστήρια αναμείχθηκαν ελαφρά και επωάστηκαν για 40 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου.

Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στο μηχάνημα Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 415 nm. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν.

Οι συνολικές περιεκτικότητες σε φλαβονοειδή στα αρχικά εκχυλίσματα κάνναβης εκφράστηκαν σε mg ισοδυνάμων ρουτίνης ανά g ξηρού φυτικού υλικού. Συγκεκριμένα, στο υπερκρίσιμο εκχύλισμα η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή υπολογίστηκε στα 13.5908 mg/g, στο αιθανολικό εκχύλισμα στα 24.1853 mg/g, στο

όξινο κλάσμα του υπερκρίσιμου εκχυλίσματος υπολογίστηκε στα 16.2578 mg/g και τέλος στο ουδέτερο στα 13.5904 mg/g.

## 6.2.3 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού φορτίου (TPC)

• Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς θετικού μάρτυρα:

Σε κάθε χρωματομετρική δοκιμασία είναι επιτακτικό να κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών-στόχων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, θετικός μάρτυρας ήταν το γαλλικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις που ελέχθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος παρατίθενται στον πίνακα 8:

Συγκέντρωση σε βοθρίο
100 µg/mL
80 μg/mL
60 μg/mL
40 μg/mL
20 μg/mL
15 μg/mL
10 μg/mL
5 μg/mL
1 μg/mL

Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος.



**Σχήμα 6.3** Καμπύλη συγκεντρώσεων αναφοράς του γαλλικού οξέος, βάσει των μετρήσεων απορρόφησης του οργάνου Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 415 nm

• Προετοιμασία δειγμάτων προς μελέτη:

Τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν ήταν τέσσερα ολικά εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης (ποικιλία 'Futura 75'): το αιθανολικό, το υπερκρίσιμο, καθώς και το όξινο και ουδέτερο κλάσμα του υπερκρίσιμου εκχυλίσματος SFE. Για τα εκχυλίσματα, παρασκευάστηκαν 4 συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO. Οι συγκεντρώσεις παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9.** Συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη.

Συγκέντρωση δείγματος	Συγκέντρωση σε βοθρίο
10 mg/mL	1000 μg/mL
5 mg/mL	500 μg/mL
2 mg/mL	200 μg/mL
1 mg/mL	100 μg/mL

## Πειραματική πορεία:

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα Folin-Ciocalteu 10% (v/v): Για τη παρασκευή του διαλύματος μετρήθηκαν 10 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και αναμείχθηκαν με 90 mL H<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na2CO3 7.5% (w/v): Για την παρασκευή του διαλύματος ζυγίστηκαν 7.5 g άλατος και διαλύθηκαν σε 100 mL H2O.

Στην 96-τρυπη διάφανη πλάκα φορτώθηκαν είτε 25 μL δείγματος είτε 25 μL γαλλικού οξέος στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις, αντίστοιχα, ενώ στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 125 μL Folin-Ciocalteu και 100 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Στις θέσεις των τυφλών δειγμάτων (Blank) τα αντιδραστήρια Folin-Ciocalteu και Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> αντικαταστάθηκαν από 225 μL H<sub>2</sub>O. Τέλος, στις θέσεις των Control προστέθηκαν 125 μL Folin-Ciocalteu, 100 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 25 μL DMSO. Τα αντιδραστήρια αναμείχθηκαν ελαφρά και επωάστηκαν για 30 λεπτά σε σκοτεινό περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου.

Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στο μηχάνημα Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 765 nm. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν.

Το ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού φορτίου το οποίο εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος ανά g φυτικού υλικού. Έτσι, το ολικό φαινολικό φορτίο υπολογίστηκε για το υπερκρίσιμο εκχύλισμα στα 25.776 mg/g, για το αιθανολικό εκχύλισμα στα

34.301 mg/g, για το όξινο κλάσμα του υπερκρίσιμου εκχυλίσματος στα 90.553 mg/g και τέλος για το ουδέτερο κλάσμα στα 4.535 mg/g.

## 6.2.4 Μελέτη αναστολής δραστικότητας τυροσινάσης

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα PBS Buffer 1/15 M (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών), pH=6.8: Για την παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος ζυγίστηκαν 5.005 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O και 5.758 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, τα άλατα αρχικά διαλύθηκαν σε 800 mL υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O (Milli-Q<sup>®</sup>), για την ρύθμιση του pH στο 6.8 προστέθηκε στάγδην πυκνό διάλυμα NaOH και τέλος συμπληρώθηκαν τα 200 mL H<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα Τυροσινάσης συγκέντρωσης 150 U/mL (όπως προέκυψε μετά από έλεγχο δραστικότητας): Για την δημιουργία του διαλύματος αναμείχθηκαν 21 μL ενζύμου τυροσινάσης (25.000 U/mL) με 3.479 μL PBS Buffer.
- Διάλυμα Kojic acid συγκέντρωσης 250 μΜ: Ζυγίστηκαν 0.46 mg Kojic acid (καθαρότητας 99%, Sigma-Aldrich) και διαλύθηκαν σε 12.95 mL PBS Buffer.
- Διάλυμα υποστρώματος L-Dopa 2.5 mM: Ζυγίστηκαν 3 mg L-Dopa (καθαρότητα > 98%, Sigma-Aldrich) και διαλύθηκαν σε 6.08 mL PBS Buffer.
- 5. Διάλυμα Control DMSO 5%: Για την παρασκευή του διαλύματος αναμείχθηκαν 10 μL DMSO με 190 μL PBS Buffer. Το Control DMSO εξετάζεται σε κάθε ενζυματική βιολογική δοκιμή, καθώς ο διαλύτης μπορεί να μεταβάλει τα αποτελέσματα της εκάστοτε διαδικασίας. Έχει φανεί ότι το DMSO μπορεί δυνητικά να αναστείλει την ενζυματική δραστικότητα αν ξεπεράσει μία συγκεκριμένη συγκέντρωση, η οποία διαφέρει για κάθε ένζυμο. [157] Έτσι είναι σημαντικό να τηρείται το επιτρεπτό όριο στην περιεκτικότητα του DMSO και να εξετάζεται κατά την πειραματική διαδικασία, ώστε να εξασφαλίζεται η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.
- Έλεγχος δραστικότητας τυροσινάσης:

To ένζυμο (Mushroom tyrosinase, Sigma-Aldrich) παραλαμβάνεται από λυοφιλοποιημένο μύκητα, επομένως για το λόγο αυτό πριν από κάθε δοκιμασία πρέπει να ελέγχεται η ενεργότητά του. Το ένζυμο φυλάσσεται στους -20 °C (στην κατάψυξη) σε aliquots των 25.000 U/mL. Για τον έλεγχο την ενζυματικής ενεργότητας της τυροσινάσης, παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν 6 δείγματα σε PBS Buffer με διαφορετικές συγκεντρώσεις, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Επομένως σε μια 96-τρυπη διάφανη πλάκα εξετάστηκαν τα Control (120 μL PBS Buffer, 40 μL Tyrosinase και 40 μL υπόστρωμα) και ο θετικός μάρτυρας (80 μL PBS Buffer, 40 μL Kojic Acid (συγκέντρωση 50 μΜ στην πλάκα), 40 μL Tyrosinase και 40 μL υπόστρωμα) για καθεμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Κατά αυτόν τον τρόπο αξιολογήθηκε ποια ήταν η καταλληλότερη συγκέντρωση του ενζύμου στην οποία εντοπίζεται αναστολής σε ποσοστό 50% από το Kojic acid. Η συγκέντρωση C₅=150 U/mL της τυροσινάσης αποδείχθηκε η καταλληλότερη για την πειραματική διαδικασία.

Συγκεντρώσεις τυροσινάσης προς έλεγχο		
C1	500 U/mL	
C2	400 U/mL	
C3	300 U/mL	
C4	200 U/mL	
C5	150 U/mL	
C6	100 U/mL	

Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις των προτύπων δειγμάτων τυροσινάσης.

Επομένως σε μια 96-τρυπη διάφανη πλάκα εξετάστηκαν τα Control (120 μL PBS Buffer, 40 μL Tyrosinase και 40 μL υπόστρωμα) και ο θετικός μάρτυρας (80 μL PBS Buffer, 40 μL Kojic Acid (συγκέντρωση 50 μΜ στην πλάκα), 40 μL Tyrosinase και 40 μL υπόστρωμα) για καθεμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

Κατά αυτόν τον τρόπο αξιολογήθηκε ποια ήταν η καταλληλότερη συγκέντρωση του ενζύμου στην οποία εντοπίζεται αναστολής σε ποσοστό 50% από το Kojic acid. Η συγκέντρωση C₅=150 U/mL της τυροσινάσης αποδείχθηκε η καταλληλότερη για την πειραματική διαδικασία.

• Προετοιμασία δειγμάτων προς μελέτη:

Για την συγκεκριμένη δοκιμή εξετάστηκαν 6 ολικά εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης (ποικιλία 'Futura 75'): το υπερκρίσιμο, το αιθανολικό καθώς και το όξινο και ουδέτερο κλάσμα αυτών, όπως προέκυψαν από υγρή-υγρή εκχύλιση. Για κάθε εκχύλισμα παρασκευάστηκε μία αρχική συγκέντρωση 30 mg/mL σε διαλύτη DMSO. Από αυτό το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκαν, στη συνέχεια, 3 δείγματα σε PBS Buffer, οι συγκεντρώσεις των οποίων παρατίθενται στον πίνακα 11:

Συγκέντρωση δείγματος	Συγκέντρωση σε βοθρίο
1.5 mg/mL	300 μg/mL
750 μg/mL	150 μg/mL
375 μg/mL	75 μg/mL

Πίνακας 11. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη.

### • Πειραματική πορεία:

Σε 96-τρυπη διάφανη πλάκα φορτώθηκαν 120 μL PBS Buffer, 40 μL δείγματος ή Kojic acid, 40 μL Tyrosinase και τέλος 40 μL υποστρώματος. Ελέχθηκαν δύο διαφορετικοί αρνητικοί μάρτυρες, εκ των οποίων ο πρώτος ονομάστηκε Control (120 μL PBS Buffer, 40 μL Tyrosinase και 40 μL υπόστρωμα) και ο δεύτερος Control 5% DMSO (80 μL PBS Buffer, 40 μL διαλύματος 5% DMSO, 40 μL Tyrosinase και 40 μL υπόστρωμα). Στα τυφλά δείγματα (Blank) παραλείφθηκε το διάλυμα της Tyrosinase και η ποσότητα του PBS Buffer αυξήθηκε κατά 40 μL. Στην πλάκα αρχικά συμπληρώθηκαν το Buffer, τα εκχυλίσματα προς μελέτη και το ένζυμο όπου ήταν απαραίτητο, ενώ ακολούθησε ελαφρά ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Μετά την επώαση προστέθηκε το υπόστρωμα L-Dopa σε όλα τα βοθρία. Η πλάκα επωάστηκε και πάλι στις ίδιες συνθήκες για 15 λεπτά.

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 475 nm. Τέλος το ποσοστό της αναστολής του ενζύμου από τα δείγματα προς μελέτη υπολογίστηκε από την εξίσωση: (%) Inhibition = {[(Acontrol – Acontrol's blank) – (Asample – Asample's blank)]/(Acontrol – Acontrol's blank)} × 100. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη καθώς και το ποσοστό αναστολής που επέφεραν στην τυροσινάση παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες:

Αναστολή του ενζύ	<b>ιου τυροσινάση %</b>	
SFE	EtOH	
3.05	7.81	
-7.35	2.63	
-7.26	-5.69	
	Αναστολή του ενζύμ SFE 3.05 -7.35 -7.26	

**Πίνακας 12.** Συγκεντρώσεις υπερκρίσιμου εκχυλίσματος (SFE) και αιθανολικού εκχυλίσματος (EtOH), σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου τυροσινάση.

**Πίνακας 13.** Συγκεντρώσεις όξινων κλασμάτων SFE και EtOH, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου τυροσινάση.

Συγκέντρωση όξινου	Αναστολή του ενζύμου τυροσινάση %	
κλάσματος (μg/mL)	SFE	EtOH
300	16.44	-1.83
150	10.17	-6.74
75	6.30	-3.66

**Πίνακας 14.** Συγκεντρώσεις ουδέτερων κλασμάτων SFE και EtOH, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου τυροσινάση.

Συγκέντρωση ουδέτερου	Αναστολή του ενζύμ	ιου τυροσινάση %	
κλάσματος (μg/mL)	SFE	EtOH	
300	3.94	3.23	
150	-2.06	0.67	
75	-4.02	-1.10	

Τέλος, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς σύμφωνα με τις τιμές του ποσοστού αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη. Οι γραφικές παραστάσεις με τις καμπύλες αναφοράς των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρατίθενται παρακάτω:


**Σχήμα 6.4** Καμπύλες αναφοράς του ποσοστού (%) αναστολής του ενζύμου τυροσινάση που παρουσίασαν τα εξεταζόμενα δείγματα.

## 6.2.5 Μελέτη αναστολής δραστικότητας ελαστάσης

Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα Trizma Base Buffer 50 mM, pH=7.4: Για να παρασκευαστεί ένα λίτρο διαλύματος ζυγίστηκαν 6.057 g Tris Base και διαλύθηκαν σε 850 mL υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O (Milli-Q<sup>®</sup>). Το pH ρυθμίστηκε στο 7.4 με προσθήκη πυκνού διαλύματος HCl και μετέπειτα συμπληρώθηκαν τα υπόλοιπα 150 mL H<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα Ελαστάσης συγκέντρωσης 2 U/mL (όπως προέκυψε μετά από έλεγχο δραστικότητας): Για την παρασκευή του διαλύματος αναμείχθηκαν 25 μL ενζύμου (40 U/mL) με 475 μL Buffer.
- Διάλυμα Ελαστατινάλης 5 mg/mL ως διάλυμα εργασίας: Ζυγίστηκαν 5 mg αντιδραστηρίου Elastatinal και διαλύθηκαν σε 1 mL Trizma Buffer. Για την 100% αναστολή του ενζύμου παρασκευάστηκε η συγκέντρωση 500 μg/mL

σε τελικό όγκο 80 μL. Για την παρασκευή της συγκέντρωσης αυτής, 8 μL διαλύματος εργασίας ελαστατινάλης αραιώθηκαν σε 72 μL Trizma Buffer. Για την 50% αναστολή η επιθυμητή συγκέντρωση είναι 50 μg/mL. Για διάλυμα ελαστατινάλης με τελικό όγκο 100 μL, 10 μL διαλύματος εργασίας Elastatinal αραιώθηκαν σε 90 μL Trizma Buffer.

- Διάλυμα υποστρώματος N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 2 mM: Ζυγίστηκαν 2 mg αντιδραστηρίου N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich) και διαλύθηκαν σε 2.210 mL Trizma Buffer.
- 5. Διάλυμα Control DMSO 5%: Για την παρασκευή του διαλύματος αναμείχθηκαν 10 μL DMSO με 190 μL PBS Buffer.
- Έλεγχος δραστικότητας ελαστάσης:

Πριν από κάθε πείραμα πρέπει να ελέγχεται η ενεργότητα του εκάστοτε ενζύμου και να καθορίζεται η καταλληλότερη για την πειραματική πορεία συγκέντρωσή του, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια του θετικού μάρτυρα. Θετικό μάρτυρα συνιστά η ουσία που σε καθορισμένη συγκέντρωση δίνει γνωστό ποσοστό αναστολής του ένζυμου, το οποίο χρησιμοποιείται συγκριτικά για τον προσδιορισμό των αγνώστων δειγμάτων. Στην προκειμένη περίπτωση, το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η Porcine Pancreatic Elastase type IV (PPE) (Sigma-Aldrich) και φυλάσσεται στους -20 °C σε aliquots των 40 U/mL. Ως θετικός μάρτυρας επιλέχθηκε η ελαστατινάλη (Elastatinal) της Sigma-Aldrich. Η ελαστατινάλη, σε συγκέντρωση 500 μg/mL ως διάλυμα εργασίας (άρα 50 μg/mL στην πλάκα), αναστέλλει την ελαστάση σε ποσοστό κοντά στο 100%. Για αναστολή του ενζύμου σε ποσοστό 50% απαιτείται συγκέντρωση του διαλύματος εργασίας 50 μg/mL (5 μg/mL στην πλάκα). Για τον έλεγχο της ενζυματικής ενεργότητας της ελαστάσης εξετάστηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις:

Συγκεντρώσεις τυροσινάσης προς έλεγχο						
C1	1 U/mL					
C2	1.5 U/mL					
С3	2 U/mL					
C4	3 U/mL					
C5	3.5 U/mL					
C6	4 U/mL					

Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις των προτύπων δειγμάτων ελαστάσης.

Επομένως σε μια 96-τρυπη διάφανη πλάκα εξετάστηκαν τα Control (80 μL Trizma Buffer, 5 μL Elastase, 15 μL υπόστρωμα) και οι θετικοί μάρτυρες ελαστατινάλης στις δύο συγκεντρώσεις C<sub>100%</sub> και C<sub>50%</sub> (70 μL Trizma Buffer, 10 μL Elastatinal, 5 μL Elastase, 15 μL υπόστρωμα). Έτσι αξιολογήθηκε η ενεργός συγκέντρωση του ενζύμου η οποία ήταν 2 U/mL.

• Προετοιμασία δειγμάτων προς μελέτη:

Για τα δείγματα προς μελέτη παρασκευάστηκαν τρία νέα δείγματα σε διαλύτη Trizma Buffer, σε συγκεντρώσεις που παρατίθενται στον πίνακα 16:

Συγκέντρωση δείγματος	Συγκέντρωση σε βοθρίο
3 mg/mL	300µg/mL
1 mg/mL	100µg/mL
0.5 mg/mL	50μg/mL

Πίνακας 16. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη.

## • Πειραματική πορεία:

Σε διάφανη πλάκα 96 θέσεων προστέθηκαν 70 μL Trizma Buffer, 10 μL δείγματος ή ελαστατινάλης αντίστοιχα, 5 μL ενζύμου ελαστάσης και τέλος 15 μL υποστρώματος. Ελέχθησαν δύο διαφορετικοί αρνητικοί μάρτυρες. Ο πρώτος ονομάστηκε Control (80 μL Trizma Buffer, 5 μL Elastase και 15 μL υπόστρωμα) και ο δεύτερος Control 5% DMSO (70 μL Trizma Buffer, 10 μL διάλυμα 5% DMSO, 5 μL Elastase και 15 μL υπόστρωμα). Στα τυφλά δείγματα (Blank) παραλείφθηκε το διάλυμα του ενζύμου και η ποσότητα του Buffer αυξήθηκε κατά 5 μL. Στην πλάκα, αρχικά, συμπληρώθηκαν το Buffer, τα εκχυλίσματα προς μελέτη και το ένζυμο όπου ήταν απαραίτητο, ενώ ακολούθησε ελαφρά ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μέτα την επώαση προστέθηκε το υπόστρωμα σε όλα τα βοθρία και η πλάκα επωάστηκε σε Incubator στους 37 °C για 30 λεπτά.

Τελικά η μέτρηση έγινε στο Infinite 200 PRO series (Tecan) στα 405 nm. Το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου από τα δείγματα προς μελέτη υπολογίστηκε από την εξίσωση: (%) Inhibition = {[(Acontrol – Acontrol's blank) – (Asample – Asample's blank)]/(Acontrol – Acontrol's blank)] × 100. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη καθώς και το ποσοστό (%) αναστολής που επέφεραν στο ένζυμο παρουσιάζεται στους παρακάτω πίνακες:

Συγκέντρωση εκχυλίσματος	Αναστολή του ενζύμου ελαστάση %					
(μg/mL)	SFE	EtOH				
300	-2.71	10.14				
100	-3.52	9.59				
50	-1.66	6.40				

**Πίνακας 17.** Συγκεντρώσεις υπερκρίσιμου εκχυλίσματος (SFE) και αιθανολικού εκχυλίσματος (EtOH), σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου ελαστάση.

Πίνακας 18. Συγκεντρώσεις όξινων κλασμάτων SFE και EtOH, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου ελαστάση.

Συγκέντρωση όξινου	Αναστολή του ενζύμου ελαστάση %					
κλάσματος (μg/mL)	SFE	EtOH				
300	14.67	11.88				
100	11.24	10.88				
50	6.62	9.31				

**Πίνακας 19.** Συγκεντρώσεις ουδέτερων κλασμάτων SFE και EtOH, σε αναλογία με το ποσοστό (%) αναστολής του ενζύμου ελαστάση.

Συγκέντρωση ουδέτερου	Αναστολή του ενζύμου ελαστάση %					
κλάσματος (μg/mL)	SFE	EtOH				
300	-8.81	-9.53				
100	-4.42	-3.19				
50	-3.72	-1.20				

Τέλος, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς σύμφωνα με τις τιμές του ποσοστού (%) αναστολής του ενζύμου της ελαστάσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων προς μελέτη. Οι γραφικές παραστάσεις με τις καμπύλες αναφοράς των δειγμάτων που εξετάστηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:



**Σχήμα 6.5** Καμπύλες αναφοράς του ποσοστού (%) αναστολής του ενζύμου ελαστάση που παρουσίασαν τα εξεταζόμενα δείνματα.

# Συμπεράσματα

Από την πειραματική πορεία τελικά απομονώθηκαν δέκα δευτερεύοντα κανναβινοειδή: η κανναβιδιβαρίνη (CBDV), το (*R*)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Α ((*R*)-CBEA-A), το (*S*)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Α ((*S*)-CBEA-A), το (*S*)-κανναβιελσοϊκό οξύ-Β ((*S*)-CBEA-B), η κανναβιγερόλη (CBG), η (*S*)-κανναβιελσοΐνη (CBE), η κανναβικυκλόλη (CBL), το κανναβιχρωμένιο (CBC), η κανναβικιτράνη (CBCT), και η Δ<sup>8</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>8</sup>-THC). Επιπλέον απομονώθηκαν δύο κύρια κανναβινοειδή, η κανναβιδιόλη (CBD) και η Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC), ένα σεσκιτερπένιο, το οξείδιο του καρυοφυλλενίου, και ένα διτερπένιο, η φυτόλη. Τέλος απομονώθηκαν δύο ανάλογα της κανναβιδιόλης και ένα ανάλογο κανναβιγερόλης, καθώς και τρείς άγνωστες ενώσεις οι οποίες χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Όλα τα μόρια ταυτοποιήθηκαν βάσει φασματοσκοπικών τεχνικών NMR και GC-MS.

Όσον αφορά τις βιολογικές δοκιμές το αιθανολικό εκχύλισμα παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό αναστολής της σταθερής ρίζας DPPH• (40.87%) και ακολούθησε το CBD (39.20%). Σχετικά με το ολικό φορτίο φλαβονοειδών, το όξινο κλάσμα SFE παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση (90.60 mg/g) και ακολούθησε το αιθανολικό εκχύλισμα (34.30 mg/mL). Το τελευταίο παρουσίασε, επίσης, την μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικού φαινολικού φορτίου (24.19 mg/mL). Στις ενζυματικές δοκιμές, το όξινο κλάσμα SFE παρουσίασε τη σημαντικότερη αναστολή των ενζύμων τυροσινάση (16.44%) και ελαστάση (14.67%)

Τέλος τα κλάσματα CPE\_3 και CPE\_5 φάνηκε να ενεργοποιούν ισχυρότερα τους διαύλους TRP. Βάσει της ταχείας αναγνώρισης με LC-HRMS στο κλάσμα 3 ταυτοποιήθηκαν τα κανναβινοειδή CBEA-A/B, CBDA-C4 και CBCA, ενώ στο 5 τα κανναβινοειδή CBLA, CBCA, Δ<sup>8</sup>-THCA-A και Δ<sup>9</sup>-THCA-A/B

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- R. E. Schultes, "Marihuana. The first twelve thousand years," J. Ethnopharmacol., vol. 5, no. 1, pp. 115–116, 1982, doi: 10.1016/0378-8741(82)90027-7.
- [2] C. M. Andre, J. F. Hausman, and G. Guerriero, "Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, no. FEB2016, pp. 1–17, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00019.
- [3] F. Pellati, V. Brighenti, J. Sperlea, L. Marchetti, D. Bertelli, and S. Benvenuti, "New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in Cannabis sativa L. (hemp)," *Molecules*, vol. 23, no. 10, 2018, doi: 10.3390/molecules23102639.
- [4] H. L. Suman Chandra and M. A. ElSohly, *Cannabis sativa L. Botany and Biotechnology*. 2017.
- [5] C. G. Stott and G. W. Guy, "Cannabinoids for the pharmaceutical industry," *Euphytica*, vol. 140, no. 1–2, pp. 83–93, 2004, doi: 10.1007/s10681-004-4757-8.
- [6] C. Kaiser, C. Cassady, and M. Ernst, "Industrial Hemp Production," CCD Crop Profiles, p. http://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/hempproducti, 2014, doi: 10.1016/S0921-8009(97)00040-2.
- H. E. Jiang *et al.*, "A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 108, no. 3, pp. 414–422, 2006, doi: 10.1016/j.jep.2006.05.034.
- [8] S. A. Bonini *et al.*, "Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 227, no. May, pp. 300–315, 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.09.004.
- [9] ProCon.org, "Historical Timeline History of Marijuana as Medicine 2900 BC to Present." https://medicalmarijuana.procon.org/historical-timeline/ Last updated on: 9/24/2019.
- [10] F. J. Carod-Artal, "Psychoactive plants in ancient Greece," Neurosci. Hist., vol. 1, no. 1, pp. 28–38, 2013.
- [11] R. G. Pertwee, "Cannabinoid pharmacology: The first 66 years," Br. J. Pharmacol., vol. 147, no. SUPPL. 1, 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706406.
- [12] L. O. Hanuš, S. M. Meyer, E. Muñoz, O. Taglialatela-Scafati, and G. Appendino, *Phytocannabinoids: A unified critical inventory*, vol. 33, no. 12. 2016.
- [13] C. Citti, D. Braghiroli, M. A. Vandelli, and G. Cannazza, "Pharmaceutical and

biomedical analysis of cannabinoids: A critical review," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 565–579, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.003.

- [14] R. Mechoulam, L. O. Hanuš, R. Pertwee, and A. C. Howlett, "Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 11, pp. 757–764, 2014, doi: 10.1038/nrn3811.
- [15] A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, and J. Kobayashi, *Phytocannabinoids.* Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa, vol. 103. 2017.
- K. W. Hillig, "A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis," Biochem. Syst. Ecol., vol. 32, no. 10, pp. 875–891, 2004, doi: 10.1016/j.bse.2004.04.004.
- [17] E. B. Russo, "History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet," *Chem. Biodivers.*, vol. 4, no. 8, pp. 1614–1648, 2007, doi: 10.1002/cbdv.200790144.
- [18] M. Ben Amar, "Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential," J. Ethnopharmacol., vol. 105, no. 1–2, pp. 1–25, 2006, doi: 10.1016/j.jep.2006.02.001.
- [19] "What is medical marijuana?," Natl. Inst. Drug Abus., [Online]. Available: https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/marijuanamedicined rugfacts\_july2019\_.pdf.
- [20] B. Murnion, "Medicinal cannabis," Aust. Prescr., vol. 38, pp. 212–215, 2015, doi: 10.2343/geochemj.2.0347.
- [21] D. W. Pate, "Chemical ecology of Cannabis," J. Int. Hemp Assoc., 1994, [Online]. Available: http://www.internationalhempassociation.org/jiha/iha01201.html.
- [22] I. J. Flores-Sanchez and R. Verpoorte, "PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in Cannabis sativa L. plants," *Plant Cell Physiol.*, vol. 49, no. 12, pp. 1767–1782, 2008, doi: 10.1093/pcp/pcn150.
- [23] L. O. Hanus and Department, "Pharmacological and Therapeutic Secrets of Plant and Brain (Endo)Cannabinoids," Wiley Intersci., pp. 214–171, 2008, doi: 10.1002/med.
- [24] M. A. ElSohly, *Marijuana and the Cannabinoids*. Humana Press Inc., 2007.
- [25] C. Onofri, E. P. M. De Meijer, and G. Mandolino, "Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in Cannabis sativa L. and its relationship with chemical phenotype," *Phytochemistry*, vol. 116, no. 1, pp. 57–68, 2015, doi: 10.1016/j.phytochem.2015.03.006.
- [26] E. B. Russo et al., "Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from

Central Asia," J. Exp. Bot., vol. 59, no. 15, pp. 4171–4182, 2008, doi: 10.1093/jxb/ern260.

- [27] D. B. Uliss, R. K. Razdan, and H. C. Dalzell, "Stereospecific Intramolecular Epoxide Cleavage by Phenolate Anion. Synthesis of Novel and Biologically Active Cannabinoids," J. Am. Chem. Soc., vol. 96, no. 23, pp. 7372–7374, 1974, doi: 10.1021/ja00830a045.
- [28] Roger Pertwee, Cannabinoids, vol. 168, no. 4. 2005.
- [29] R. G. Pertwee and R. A. Ross, "Cannabinoid receptors and their ligands," Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids, vol. 66, no. 2–3, pp. 101–121, 2002, doi: 10.1054/plef.2001.0341.
- [30] R. W. Penny Whiting, "Medical Use of Cannabinoids—Reply," JAMA, 2015, doi: 10.1001/jama.2015.11447.
- [31] D. I. Abrams, "The therapeutic effects of Cannabis and cannabinoids: An update from the National Academies of Sciences, Engineering and Medicine report," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 49, no. December 2016, pp. 7–11, 2018, doi: 10.1016/j.ejim.2018.01.003.
- [32] M. H. Andreae *et al.*, "Inhaled Cannabis for Chronic Neuropathic Pain: A Metaanalysis of Individual Patient Data," *J. Pain*, vol. 16, no. 12, pp. 1221–1232, 2015, doi: 10.1016/j.jpain.2015.07.009.
- [33] D. Bolognini *et al.*, "Cannabidiolic acid prevents vomiting in Suncus murinus and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT1A receptor activation," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 168, no. 6, pp. 1456–1470, 2013, doi: 10.1111/bph.12043.
- [34] S. P. H. Alexander, "Therapeutic potential of cannabis-related drugs," Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry, vol. 64, pp. 157–166, 2016, doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.001.
- [35] G. M. Keating, "Delta-9-Tetrahydrocannabinol/Cannabidiol Oromucosal Spray (Sativex<sup>®</sup>): A Review in Multiple Sclerosis-Related Spasticity," *Drugs*, vol. 77, no. 5, pp. 563–574, 2017, doi: 10.1007/s40265-017-0720-6.
- [36] H. Horn, B. Böhme, L. Dietrich, and M. Koch, "Endocannabinoids in body weight control," *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 2, 2018, doi: 10.3390/ph11020055.
- [37] M. Scherma *et al.*, "Cannabinoid CB1/CB2 receptor agonists attenuate hyperactivity and body weight loss in a rat model of activity-based anorexia," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 174, no. 16, pp. 2682–2695, 2017, doi: 10.1111/bph.13892.
- [38] A. Ligresti *et al.*, "Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 318, no. 3, pp. 1375–1387, 2006, doi: 10.1124/jpet.106.105247.

- [39] F. C. M. Rocha, J. G. Dos Santos Júnior, S. C. Stefano, and D. X. Da Silveira, "Systematic review of the literature on clinical and experimental trials on the antitumor effects of cannabinoids in gliomas," *J. Neurooncol.*, vol. 116, no. 1, pp. 11–24, 2014, doi: 10.1007/s11060-013-1277-1.
- [40] E. C. Rosenberg, R. W. Tsien, B. J. Whalley, and O. Devinsky, "Cannabinoids and Epilepsy," *Neurotherapeutics*, vol. 12, no. 4, pp. 747–768, 2015, doi: 10.1007/s13311-015-0375-5.
- [41] J. P. Davis and H. H. Ramsey, "Anti-epileptic action of marijuana-active substances," *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 8, p. 284, 1949.
- [42] C. A. Press, K. G. Knupp, and K. E. Chapman, "Parental reporting of response to oral cannabis extracts for treatment of refractory epilepsy," *Epilepsy Behav.*, vol. 45, no. July 2014, pp. 49–52, 2015, doi: 10.1016/j.yebeh.2015.02.043.
- [43] J. P. Szaflarski *et al.*, "Cannabidiol improves frequency and severity of seizures and reduces adverse events in an open-label add-on prospective study," *Epilepsy Behav.*, vol. 87, pp. 131–136, 2018, doi: 10.1016/j.yebeh.2018.07.020.
- [44] G. C. Patton, C. Coffey, J. B. Carlin, L. Degenhardt, W. Hall, and M. Lynskey, "Cohort Study Cohort Study," vol. 325, no. August 2008, pp. 1195–1198, 2002, doi: 10.1136/bmj.325.7374.1195.
- [45] K. F. Tóth, D. Ádám, T. Bíró, and A. Oláh, "Cannabinoid signaling in the skin: Therapeutic potential of the 'c(ut)annabinoid' system," *Molecules*, vol. 24, no. 5, pp. 1–56, 2019, doi: 10.3390/molecules24050918.
- [46] Y. S. Hwang *et al.*, "Cannabidiol upregulates melanogenesis through CB1 dependent pathway by activating p38 MAPK and p42/44 MAPK," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 273, pp. 107–114, 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.06.005.
- [47] S. Magina *et al.*, "Inhibition of basal and ultraviolet B-induced melanogenesis by cannabinoid CB1 receptors: A keratinocyte-dependent effect," *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 303, no. 3, pp. 201–210, 2011, doi: 10.1007/s00403-011-1126-z.
- [48] P. Mehrpouya-Bahrami *et al.*, "Blockade of CB1 cannabinoid receptor alters gut microbiota and attenuates inflammation and diet-induced obesity," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15154-6.
- [49] C. A. Lunn *et al.*, "Biology and therapeutic potential of cannabinoid CB 2 receptor inverse agonists," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, no. 2, pp. 226–239, 2008, doi: 10.1038/sj.bjp.0707480.
- [50] A. Gowran, K. McKayed, M. Kanichai, C. White, N. Hammadi, and V. Campbell, "Tissue engineering of cartilage; can cannabinoids help?," *Pharmaceuticals*, vol. 3, no. 9, pp. 2970–2985, 2010, doi: 10.3390/ph3092970.

- [51] B. Benthin, H. Danz, and M. Hamburger, "Pressurized liquid extraction of medicinal plants," *J. Chromatogr. A*, vol. 837, no. 1–2, pp. 211–219, 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00071-0.
- [52] C. W. Huie, "A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, no. 1–2, pp. 23–30, 2002, doi: 10.1007/s00216-002-1265-3.
- [53] E. S. Ong, "Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations," J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., vol. 812, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 23–33, 2004, doi: 10.1016/j.jchromb.2004.07.041.
- [54] Bekanntmachung zum Deutschen Arzneibuch 2018, "Cannabisblüten; 24.04.2018," BAnz AT 24. Apr. 2018 B5; pp. 1–9.
- [55] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *Recommended Methods* for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products. New York: United Nations, 2009.
- [56] D. Wianowska, A. L. Dawidowicz, and M. Kowalczyk, "Transformations of Tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid and cannabinol during their extraction from Cannabis sativa L.," J. Anal. Chem., vol. 70, no. 8, pp. 920– 925, 2015, doi: 10.1134/S1061934815080183.
- [57] M. Pellegrini, E. Marchei, R. Pacifici, and S. Pichini, "A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 36, no. 5, pp. 939–946, 2005, doi: 10.1016/j.jpba.2004.07.035.
- [58] K. de C. Mariotti *et al.*, "Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography-mass spectrometry and chemometric analysis," *Sci. Justice*, vol. 56, no. 1, pp. 35–41, 2016, doi: 10.1016/j.scijus.2015.09.002.
- [59] P. Samaddar and K. Sen, "Cloud point extraction: A sustainable method of elemental preconcentration and speciation," J. Ind. Eng. Chem., vol. 20, no. 4, pp. 1209–1219, 2014, doi: 10.1016/j.jiec.2013.10.033.
- [60] L. J. Rovetto and N. V. Aieta, "Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from Cannabis sativa L.," J. Supercrit. Fluids, vol. 129, pp. 16–27, 2017, doi: 10.1016/j.supflu.2017.03.014.
- [61] A. I. Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, "Dereplication and Partial Identification of Natural Products.," in *Natural products isolation (2nd ed.).*, New Jersey: Humana Press Inc., 2006.
- [62] A. C. Gallo-Molina *et al.*, "Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the Cannabis sativa L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 146, no. January,

pp. 208–216, 2019, doi: 10.1016/j.supflu.2019.01.020.

- [63] E. Anklam, H. Berg, L. Mathiasson, M. Sharman, and F. Ulberth, "Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review," *Food Addit. Contam.*, vol. 15, no. 6, pp. 729–750, 1998, doi: 10.1080/02652039809374703.
- [64] O. Sticher, "Natural product isolation," Nat. Prod. Rep., vol. 25, no. 3, pp. 517– 554, 2008, doi: 10.1039/b700306b.
- [65] J. Omar, M. Olivares, M. Alzaga, and N. Etxebarria, "Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS," J. Sep. Sci., vol. 36, no. 8, pp. 1397–1404, 2013, doi: 10.1002/jssc.201201103.
- [66] C. Da Porto, D. Decorti, and A. Natolino, "Separation of aroma compounds from industrial hemp inflorescences (Cannabis sativa L.) by supercritical CO2 extraction and on-line fractionation," *Ind. Crops Prod.*, vol. 58, no. August 2013, pp. 99–103, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.03.042.
- [67] K. Aladić *et al.*, "Supercritical CO2 extraction of hemp (Cannabis sativa L.) seed oil," *Ind. Crops Prod.*, vol. 76, pp. 472–478, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.016.
- [68] K. Vilkhu, R. Mawson, L. Simons, and D. Bates, "Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 9, no. 2, pp. 161–169, 2008, doi: 10.1016/j.ifset.2007.04.014.
- [69] S. Balachandran, S. E. Kentish, R. Mawson, and M. Ashokkumar, "Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 13, no. 6, pp. 471–479, 2006, doi: 10.1016/j.ultsonch.2005.11.006.
- [70] F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian, "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 34, pp. 540–560, 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
- [71] C. Agarwal, K. Máthé, T. Hofmann, and L. Csóka, "Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Optimized by Response Surface Methodology," J. Food Sci., vol. 83, no. 3, pp. 700–710, 2018, doi: 10.1111/1750-3841.14075.
- [72] M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, and T. J. Mason, "Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 8, no. 2, pp. 137–142, 2001, doi: 10.1016/S1350-4177(00)00033-X.

- [73] Κ. Μ. Α. Χατζηιωάννου, Θ. Π., Ενόργανη Ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.
- [74] Wilfried M.A. Niessen, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Third. 2006.
- [75] J. Sherma and F. Rabel, "Thin layer chromatography in the analysis of cannabis and its components and synthetic cannabinoids," J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., vol. 42, no. 19–20, pp. 613–628, 2019, doi: 10.1080/10826076.2019.1663529.
- [76] S. R. Gratz, B. M. Gamble, and A. M. Stalcup, "Inclusion Complexation: Liquid Chromatography," *Encycl. Sep. Sci.*, pp. 3079–3086, 2000, doi: 10.1016/b0-12-226770-2/01931-1.
- [77] A. Zgair et al., "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Development of a simple and sensitive HPLC – UV method for the simultaneous determination of cannabidiol and -tetrahydrocannabinol in rat plasma," J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 114, pp. 145–151, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.05.019.
- [78] N. Happyana, S. Agnolet, R. Muntendam, A. Van Dam, B. Schneider, and O. Kayser, "Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal Cannabis sativa using LCMS and cryogenic NMR," *Phytochemistry*, vol. 87, pp. 51–59, 2013, doi: 10.1016/j.phytochem.2012.11.001.
- [79] H. Weil and T. I. Willams, "History of chromatography," *Nature*, vol. 166, no. 4232, pp. 1000–1001, 1950, doi: 10.1038/1661000b0.
- [80] A. Hazekamp, A. Peltenburg, R. Verpoorte, and C. Giroud, "Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from Cannabis sativa L.," J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., vol. 28, no. 15, pp. 2361–2382, 2005, doi: 10.1080/10826070500187558.
- [81] F. E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbühl, T. Schwerzmann, and T. A. Briellmann, "Isolation of Δ9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ9-THC in cannabis products," *Forensic Sci. Int.*, vol. 149, no. 1, pp. 3–10, 2005, doi: 10.1016/j.forsciint.2004.05.015.
- [82] W. Peschel and M. Politi, "Talanta H NMR and HPLC / DAD for Cannabis sativa L . chemotype distinction , extract pro fi ling and speci fi cation," vol. 140, pp. 150–165, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.02.040.
- [83] R. V. Y. H. Choi, H. K. Kim, A. Hazekamp, C. Erkelens, A. W. M. Lefeber, "Metabolomic Differentiation of Cannabis sativa Cultivars Using 1H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis," J. Nat. Prod., 2004, [Online]. Available: https://doi.org/10.1021/np049919c.
- [84] M. V. Silva Elipe, "Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique," *Anal. Chim. Acta*, vol. 497, no. 1–2, pp. 1–25, 2003, doi: 10.1016/j.aca.2003.08.048.

- [85] F. Bucar, A. Wube, and M. Schmid, "Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, no. 4, pp. 525– 545, 2013, doi: 10.1039/c3np20106f.
- [86] M. Bojczuk, D. Żyżelewicz, and P. Hodurek, "Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references," J. Sep. Sci., vol. 40, no. 7, pp. 1597–1609, 2017, doi: 10.1002/jssc.201601221.
- [87] A. P. Foucault, "Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography," J. Chromatogr. A, vol. 906, no. 1–2, pp. 365–378, 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00499-4.
- [88] C. Schwienheer, J. Merz, and G. Schembecker, "Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments," *J. Chromatogr. A*, vol. 1390, pp. 39–49, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.01.085.
- [89] J. H. Lee *et al.*, "Preparative isolation of sargachromanol E from Sargassum siliquastrum by centrifugal partition chromatography and its anti-inflammatory activity," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 62, pp. 54–60, 2013, doi: 10.1016/j.fct.2013.08.010.
- [90] P. J. Lee SK, Mbwambo ZH, Chung HS, Luyengi L, Gamez EJC, Mehta RG, Kinghorn AD, "Evaluation of the antioxidant potential of natural products.," in *Comb Chem High Throughput Screen*, 1998, pp. 35–46.
- [91] K. Skalicka-Woźniak and I. Garrard, "Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: A comprehensive review with respect to the solvent systems employed," *Phytochem. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 547–572, 2014, doi: 10.1007/s11101-014-9348-2.
- [92] A. Hazekamp, R. Simons, A. Peltenburg-Looman, M. Sengers, R. Van Zweden, and R. Verpoorte, "Preparative isolation of cannabinoids from Cannabis sativa by centrifugal partition chromatography," J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., vol. 27, no. 15, pp. 2421–2439, 2004, doi: 10.1081/JLC-200028170.
- [93] M. Hamzaoui, J. H. Renault, R. Reynaud, and J. Hubert, "Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds," J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., vol. 937, pp. 7–12, 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.07.024.
- [94] C. Ungureanu, L. Marchal, A. A. Chirvase, and A. Foucault, "Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from Rhodotorula rubra," *Bioresour. Technol.*, vol. 132, pp. 406–409, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.105.
- [95] Y. Ito, "PH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism,

procedure and applications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1271, no. 1, pp. 71–85, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.024.

- [96] Y. Itoc and Y. Ma, "pH-Zone-refining counter-current chromatography: a displacement mode applied to separation of dinitrophenyl amino acids," J. Chromatogr. A, vol. 672, no. 1–2, pp. 101–108, 1994, doi: 10.1016/0021-9673(94)80597-0.
- [97] J. R. Popp *et al.*, "Rapid isolation of acidic cannabinoids from Cannabis sativa L. using pH-zone-refining centrifugal partition chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1599, pp. 196–202, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.04.048.
- [98] B. F. Joseph Sherma, "Chapter 2 Preparative Thin Layer Chromatography," in *Journal of Chromatography*, 1987, pp. 105–127.
- [99] Q. T. Liu and J. L. Kinderlerer, "Preparative thin-layer chromatographic separation and subsequent gas chromatographic-mass spectrometric analysis of monoacylglycerols derived from butter oil by fungal degradation," J. Chromatogr. A, vol. 855, no. 2, pp. 617–624, 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00726-8.
- [100] T. D. Horton and Tsuchiya, "Preparative, thin-layer chromatography in carbohydrate chemistry," in *Carbohydrate Research*, vol. 5, no. 4, 1967, pp. 426–432.
- [101] D. P. Papadakis, C. A. Salemik, F. J. Alikaridis, and T. A. Kephalas, "Isolation and identification of new cannabinoids in cannabis smoke," *Tetrahedron*, vol. 39, no. 13, pp. 2223–2225, 1983, doi: 10.1016/S0040-4020(01)91942-8.
- [102] M. L. Barrett, D. Gordon, and F. J. Evans, "Isolation from cannabis sativa L. of cannflavin-a novel inhibitor of prostaglandin production," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 34, no. 11, pp. 2019–2024, 1985, doi: 10.1016/0006-2952(85)90325-9.
- [103] K. Hostettmann · A. Marston · M. Hostettmann, *Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation.* 1998.
- [104] and M. A. E. Safwat A. Ahmed,<sup>+</sup> Samir A. Ross,<sup>\*</sup>,<sup>+</sup>,<sup>‡</sup> Desmond Slade,<sup>+</sup> Mohamed M. Radwan,<sup>+</sup> Fazila Zulfiqar, "Cannabinoid Ester Constituents from High-Potency Cannabis sativa," *Nat. Prod.*, 2008, doi: 10.3109/14017437209134285.
- [105] M. M. Radwan, S. A. Ross, D. Slade, S. A. Ahmed, F. Zulfiqar, and M. A. Elsohly, "Isolation and characterization of new cannabis constituents from a high potency variety," *Planta Med.*, vol. 74, no. 3, pp. 267–272, 2008, doi: 10.1055/s-2008-1034311.
- [106] Paul Stead, "Isolation by Preparative HPLC," in *Natural Products Isolation*, Volume 4., R. J. P. Cannell, Ed. pp. 165–208.

- [107] T. W. Lorne Burke, C. T. Mant, and R. S. Hodges, "A Novel Approach To Reversed-Phase Preparative High-Performance Liquid Chromatography of Peptides," J. Liq. Chromatogr., vol. 11, no. 6, pp. 1229–1247, 1988, doi: 10.1080/01483918808067169.
- [108] P. R. Brown, "High-Performance Liquid Chromatography: Past Developments, Present Status, and Future Trends," Anal. Chem., vol. 62, no. 19, p. 995, 1990, doi: 10.1021/ac00218a001.
- [109] R.N.Smith, "High-pressure liquid chromatography of cannabis : Identification of separated constituents," J. Chromatogr. A, vol. 115, no. 1, pp. 101–106, 1975, doi: org/10.1016/S0021-9673(00)89021-4.
- [110] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28, no. 1, pp. 25– 30, 1995, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- [111] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results," *Food Chem.*, vol. 130, no. 4, pp. 1036–1043, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127.
- [112] A. Smeriglio, E. M. Galati, M. T. Monforte, F. Lanuzza, V. D'Angelo, and C. Circosta, "Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of Cold-Pressed Seed Oil from Finola Cultivar of Cannabis sativa L," *Phyther. Res.*, vol. 1307, no. March, pp. 1298–1307, 2016, doi: 10.1002/ptr.5623.
- [113] G. Lesma et al., "Cannabinoid-free cannabis sativa I. Grown in the po valley: Evaluation of fatty acid profile, antioxidant capacity and metabolic content," Natural Product Research, vol. 28, no. 21. Taylor & Francis, pp. 1801–1807, 2014, doi: 10.1080/14786419.2014.926354.
- [114] T. Chen *et al.*, "The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of Cannabis sativa L.)," *Food Chem.*, vol. 134, no. 2, pp. 1030–1037, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.009.
- [115] S. Frassinetti *et al.*, "Nutraceutical potential of hemp (Cannabis sativa L.) seeds and sprouts," *Food Chem.*, vol. 262, no. April, pp. 56–66, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.078.
- [116] L. Izzo et al., "Analysis of Phenolic Compounds in Commercial Cannabis sativa L. Inflorescences using UHPLC-Q-Orbitrap HRMs," *Molecules*, vol. 25, no. 3, pp. 1– 12, 2020, doi: 10.3390/molecules25030631.
- [117] R. Moldzio *et al.*, "Effects of cannabinoids Δ(9)-tetrahydrocannabinol, Δ(9)tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiol in MPP+ affected murine mesencephalic cultures," *Phytomedicine*, vol. 19, no. 8–9, pp. 819–824, 2012, doi: 10.1016/j.phymed.2012.04.002.

- [118] K. Hayakawa *et al.*, "Repeated treatment with cannabidiol but not Δ9tetrahydrocannabinol has a neuroprotective effect without the development of tolerance," *Neuropharmacology*, vol. 52, no. 4, pp. 1079–1087, 2007, doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.11.005.
- [119] M. Tura, M. Mandrioli, and T. G. Toschi, "Preliminary study: Comparison of antioxidant activity of cannabidiol (CBD) and α-tocopherol added to refined olive and sunflower oils," *Molecules*, vol. 24, no. 19, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3390/molecules24193485.
- [120] A. Pękal and K. Pyrzynska, "Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay," *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, pp. 1776–1782, 2014, doi: 10.1007/s12161-014-9814-x.
- [121] C. C. Chang, M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern, "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods," J. Food Drug Anal., vol. 10, no. 3, pp. 178–182, 2002.
- [122] M. Ahmed *et al.*, "Phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of citrullus colocynthis L. and Cannabis Sativa L.," *Appl. Ecol. Environ. Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 6961–6979, 2019, doi: 10.15666/aeer/1703\_69616979.
- [123] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, "Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L.," *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, 2013, doi: 10.3390/molecules18066852.
- [124] and R. M. L.-R. VERNON L. SINGLETON, RUDOLF ORTHOFER, "Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent," in *METHODS IN ENZYMOLOGY*, vol. 299, 1999, pp. 152– 177.
- [125] M. Ikawa, T. D. Schaper, C. A. Dollard, and J. J. Sasner, "Utilization of folinciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds," J. Agric. Food Chem., vol. 51, no. 7, pp. 1811–1815, 2003, doi: 10.1021/jf021099r.
- [126] I. Nadeem, A. U. Khan, M. N. Asghar, M. Ashfaq, S. Shahid, and D. Ahmed, "In vitro total antioxidant and radical scavenging activities of organic extracts from leaves, stem and inflorescence of Cannabis sativa L.," *Asian J. Chem.*, vol. 24, no. 11, pp. 5067–5072, 2012.
- [127] F. Siano *et al.*, "Comparative study of chemical, biochemical characteristic and ATR-FTIR analysis of seeds, oil and flour of the edible Fedora cultivar hemp (Cannabis sativa L.)," *Molecules*, vol. 24, no. 1, pp. 1–13, 2019, doi: 10.3390/molecules24010083.
- [128] T. Pillaiyar, M. Manickam, and V. Namasivayam, "Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors," *J. Enzyme Inhib. Med.*

*Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 403–425, 2017, doi: 10.1080/14756366.2016.1256882.

- [129] E. J. Land, C. A. Ramsden, and P. A. Riley, "Quinone Chemistry and Melanogenesis," *Methods Enzymol.*, vol. 378, pp. 88–109, 2004, doi: 10.1016/S0076-6879(04)78005-2.
- [130] K. B. de Oliveira, K. L. Mischiatti, J. D. Fontana, and B. H. De Oliveira, "Tyrosinase immobilized enzyme reactor: Development and evaluation," J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., vol. 945–946, pp. 10–16, 2014, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.11.042.
- [131] "National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Levodopa." https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levodopa (accessed on Apr. 4, 2020).
- [132] Y. Yoon *et al.*, "Verification of Biological Activities and Tyrosinase Inhibition of Ethanol Extracts from Hemp Seed (Cannabis sativa L.) Fermented with Lactic Acid Bacteria," *J. Life Sci.*, vol. 28, no. 6, pp. 688–696, 2018, doi: 10.5352/JLS.2018.28.6.688.
- [133] K. T. Lee, B. J. Kim, J. H. Kim, M. Y. Heo, and H. P. Kim, "Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): Inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 19, no. 6, pp. 291–298, 1997, doi: 10.1046/j.1467-2494.1997.171725.x.
- [134] K. H. Wang *et al.*, "Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 106, no. 3, pp. 353–359, 2006, doi: 10.1016/j.jep.2006.01.010.
- [135] G. Zengin *et al.*, "Chromatographic analyses, in vitro biological activities, and cytotoxicity of cannabis sativa I. Essential oil: A multidisciplinary study," *Molecules*, vol. 23, no. 12, 2018, doi: 10.3390/molecules23123266.
- [136] G. Imokawa, "Mechanism of UVB-induced wrinkling of the skin: Paracrine cytokine linkage between keratinocytes and fibroblasts leading to the stimulation of elastase," J. Investig. Dermatology Symp. Proc., vol. 14, no. 1, pp. 36–43, 2009, doi: 10.1038/jidsymp.2009.11.
- [137] N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, "The Role of Elastases Secreted by Fibroblasts in Wrinkle Formation: Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity¶," *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 2, p. 283, 2001, doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0283:troesb>2.0.co;2.
- [138] D. M. Shotton and B. S. Hartley, "Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases," *Nature*, vol. 225, no. 5235, pp. 802–806, 1970, doi: 10.1038/225802a0.
- [139] U. S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology

Information, "CELA1 chymotrypsin like elastase 1." https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1990 Acceced at13-Mar-2020.

- [140] E. B. Oliveira and M. C. O.Salgado, "Handbook of Proteolytic Enzymes," in *PROTEOLYTIC ENZYMES*, Volume 3., Academic press, 2013, pp. 2639–2645.
- [141] J. H. Kim, J. C. Byun, A. K. R. Bandi, C. G. Hyun, and N. H. Lee, "Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from Callistemon lanceolatus," J. Med. Plants Res., vol. 3, no. 11, pp. 914–920, 2009.
- [142] J. Hubert *et al.*, "In vitro dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees," *Planta Med.*, vol. 82, no. 15, pp. 1351–1358, 2016, doi: 10.1055/s-0042-110180.
- [143] H. Umezawa, T. Aoyagi, A. Okura, H. Morishima, T. Takeuchi, and Y. Okami, "Elastatinal, a new elastase inhibitor produced by actinomycetes," *J. Antibiot.* (*Tokyo*)., vol. 26, no. 12, pp. 787–789, 1973, doi: 10.7164/antibiotics.26.787.
- [144] V. Y. M.-B. Amrita Samanta, Taylor E. T. Hughes, "Transient Receptor Potential (TRP) Channels Amrita," HHS Public Access, pp. 141–165, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_6. Transient.
- [145] K. Venkatachalam and C. Montell, "TRP Channels," NIH Public Access, pp. 387– 417, 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- [146] J. Starkus, C. Jansen, L. M. N. Shimoda, A. J. Stokes, A. L. Small-Howard, and H. Turner, "Diverse TRPV1 responses to cannabinoids," *Channels*, vol. 13, no. 1, pp. 172–191, 2019, doi: 10.1080/19336950.2019.1619436.
- [147] D. P. M. Aaron D. Mickle, Andrew J. Shepherd, "Sensory TRP Channels: The Key Transducers of Nociception and Pain," *HHS Public Access*, pp. 73–118, 2015, doi: 1016/bs.pmbts.2015.01.002.
- [148] Y. H. Choi et al., "NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids isolated from flowers of Cannabis sativa," *Phytochem. Anal.*, vol. 15, no. 6, pp. 345–354, 2004, doi: 10.1002/pca.787.
- [149] L. Vollner, D. Bieniek, and F. Korte, "Hashish. XX. Cannabidivarin, a new hashish constituent," *Tetrahedron Lett.*, vol. 3, no. 3, pp. 145–147, 1969.
- [150] H. Y. Ikuo YAMAMOTO, Hiroshi GOHDA, Shizuo NARIMATSU, "Identification of Cannabielsoin, a New Metabolite of Cannabidiol Formed by Guinea-Pig Hepatic Microsomal Enzymes, and Its Pharmacological Activity in Mice," J. Pharmacobiodyn., pp. 833–838, 1988, [Online]. Available: http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-styleyakedake-volcano-group-central-japan/.
- [151] A. Shani and R. Mechoulam, "Cannabielsoic acids. Isolation and synthesis by a novel oxidative cyclization," *Tetrahedron*, vol. 30, no. 15, pp. 2437–2446, 1974,

doi: 10.1016/S0040-4020(01)97114-5.

- [152] R. B. and M. Paris, *Biotransformation of cannabinoids by a cell suspension culture of Cannabis sativa L. R.*, vol. 15, no. 7. 1987.
- [153] V. V. Kane, A. R. Martin, J. A. Peters, and P. Crews, "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Cannabichromene, Cannabicitran, and Cannabicyclol and their Analogues," J. Org. Chem., vol. 49, no. 10, pp. 1793–1796, 1984, doi: 10.1021/jo00184a024.
- [154] and L. B. U. Pongprayoon, P. Baeckstrom, U. Jacobsson, M. Lindstrom, "Antispasmodic Activity of fJ-Damascenone and E-Phytol Isolated from Ipomoca pes-caprae," *Planta Med.*, vol. 58, 1991, doi: 10.1002/ejlt.201700387.
- [155] N. Kahkeshani et al., "Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review," Iran. J. Basic Med. Sci., vol. 22, no. 3, pp. 225– 237, 2019, doi: 10.22038/ijbms.2019.32806.7897.
- [156] M. Chatatikun and A. Chiabchalard, "Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (Daucus carota Linn.) root crude extracts," J. Chem. Pharm. Res., vol. 5, no. 4, pp. 97–102, 2013.
- [157] L. Di and E. H. Kerns, "Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization," *Drug Discov. Today*, vol. 11, no. 9–10, pp. 446–451, 2006, doi: 10.1016/j.drudis.2006.03.004.
- [158] R. Pavlovic *et al.*, "Phytochemical and Ecological Analysis of Two Varieties of Hemp (Cannabis sativa L.) Grown in a Mountain Environment of Italian Alps," *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no. October, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.01265.
- [159] B. T. Borille *et al.*, "Chemical profiling and classification of cannabis through electrospray ionization coupled to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics," *Anal. Methods*, vol. 9, no. 27, pp. 4070–4081, 2017, doi: 10.1039/c7ay01294b.
- [160] C. Citti *et al.*, "Cannabinoid profiling of hemp seed oil by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry," *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no. February, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3389/fpls.2019.00120.
- [161] P. Berman *et al.*, "A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32651-4.
- [162] C. Citti *et al.*, "A Metabolomic Approach Applied to a Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Method (HPLC-ESI-HRMS/MS): Towards the Comprehensive Evaluation of the Chemical Composition of Cannabis Medicinal Extracts," *Phytochem. Anal.*, vol. 29, no. 2, pp. 144–155, 2018, doi: 10.1002/pca.2722.

- [163] M. M. Radwan *et al.*, "Non-cannabinoid constituents from a high potency Cannabis sativa variety," *HHS Public Access*, vol. 69, no. 14, pp. 2627–2633, 2016, doi: 10.1016/j.phytochem.2008.07.010.Non-cannabinoid.
- [164] S. A. Ahmed, S. A. Ross, D. Slade, M. M. Radwan, I. A. Khan, and M. A. Elsohly, "Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L.," *Phytochemistry*, vol. 117, pp. 194–199, 2015, doi: 10.1016/j.phytochem.2015.04.007.
- [165] S. D. Sarker, Z. Latif, and A. I. Gray, *Natural Products Isolation: an overview*, vol. 864, no. July. 2006.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Από μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη, για την ενεργοποίηση των υποδοχέων διαύλων TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPM8 από κλάσματα που λήφθηκαν από την εκχύλιση κατανομής με φυγοκέντριση CPE1, λήφθηκαν τα ακόλουθα διαγράμματα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Calcium assay (bulk method), όπου μετρήθηκε το σήμα ασβεστίου σε RFU (relative fluorescence unit) το οποίο εισέρχεται μέσω των διαύλων κατά την ενεργοποίηση τους. Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν τα CPE1\_2, CPE1\_3, CPE1\_4 και CPE1\_5 σε συγκεντρώσεις 1μg/mL, 10 μg/mL και 100 μg/mL.

Όπως προαναφέρθηκε τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS), με σκοπό την ταυτοποίηση των κύριων ενώσεις που εντοπίζονται σε αυτά σε αυτά. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα κλάσματα παρατίθενται στον πίνακα 1.

Nia			Μοριακός		Τύπος	Σφάλμα	RDB		СР	Έ1		Βιβλιογρ.
NO. (mir	(min)	ινιεταβολιτης	τύπος	m/z	ιονισμού	(ppm)		2	3	4	5	αναφορά
1	9.33	Καννιθρένιο 2	$C_{16}H_{16}O_4$	271.0978	[M-H] <sup>−</sup>	0.80	9.5	+	+	-	-	[158]
		8(α/β),11-Di-OH-THCA-A										
2	9.63	ή Κανναβιτριολικό οξύ	$C_{22}H_{30}O_{6}$	389.1971	[M-H] <sup>−</sup>	0.35	8.5	-	+	+	-	[159], [160]
		(CBTA)										
3	10.17	Καννφλαβίνη Β (CFL-B)	$C_{21}H_{20}O_6$	367.1188	[M-H] <sup>−</sup>	0.24	12.5	+	+	+	-	[158]
4	10.53	Καννιπρένιο	$C_{21}H_{26}O_4$	341.1763	[M-H] <sup>−</sup>	1.37	9.5	-	-	-	+	[158]
5	10.54	(±)-6,7-(cis/trans)-EtO-	C22H32O5	375.2176	[M-H] <sup>−</sup>	-0.26	7.5	+	+	+	-	[160]
		CBGA										
6	10.57	κανναριοιορκολικό όξυ (CBDOA)	$C_{18}H_{22}O_4$	301.1445	[M-H] <sup>−</sup>	1.71	8.5	+	+	-	-	[161]
7	10.64	11-OH-THCA-A	$C_{22}H_{30}O_5$	373.2026	[M-H] <sup>-</sup>	1.48	8.5	+	+	-	-	[159]
8	11 02	Κανναβινοδιολικό οξύ	CaaHacOa	353 1758	[M-H]-	-0.09	10 5	+	+	+	_	[161]
0	11.02	(CBNDA)	C221126C4	555.1750		0.05	10.5	•	•	•		[101]
		(-)-(7 <i>R</i> )-										
9	11.19	Κανναβικουμαρονικό	C22H28O5	371.1872	[M-H] <sup>−</sup>	2.16	9.5	+	+	-	-	[159]
-	-	οξύ (CBCONA) ή				-						[100]
4.0		THCA-A-8-όνη			<b>Fa a a b b</b>							
10	11.31	Κανναβιστιλβένιο Ι	$C_{20}H_{24}O_{3}$	313.1804	[M+H]⁺	2.00	8.5	+	+	+	-	[158]
11	11.32	CBDVA	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	329.1761	[M-H] <sup>-</sup>	0.81	8.5	+	+	+	-	[160]
12	11.53	CBEA-A/B	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	373.2026	[M-H]⁻	1.48	8.5	+	+	+	+	[161]
13	11.75	CBDA-C₄ ή CBCA-C₄ ή THCA-C₄-A/B	$C_{21}H_{28}O_4$	343.1919	[M-H] <sup>−</sup>	1.21	8.5	+	+	+	-	[160], [161], [159]
	42.00	11-Νορ-9-καρβοξυ-		207 4042	[5 4 11]-	0.00	0.5					
14	12.08	THCA-A	$C_{22}H_{28}O_6$	387.1813	[IVI-H]	-0.03	9.5	+	+	-	-	[159]
15	12.17	CBDA	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	357.2064	[M-H] <sup>−</sup>	-0.52	8.5	-	+	+	+	[162]
16	12.35	( <i>E</i> )/( <i>Z</i> )-CBGA	C22H32O4	359.2226	[M-H] <sup>−</sup>	1.02	7.5	-	+	+	+	[162]
17	12.41	CBD	$C_{21}H_{30}O_2$	315.2323	[M+H] <sup>+</sup>	1.50	6.5	-	-	+	+	[162]
		5-Ακετοξυ-6-γερανυλο-										
18	12.68	3- <i>ν</i> -πεντυλο-1,4-	C23H32O4	371.2221	[M-H] <sup>−</sup>	-0.36	8.5	-	-	+	+	[163]
		βενζοκινόνη										
19	13.09	Δ <sup>9</sup> -THCA-A/Β ή Δ <sup>8</sup> -THCA-	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	357.2070	[M-H] <sup>−</sup>	-0.37	8.5	-	-	+	+	[162]
~~					[h 4 1 1]-	4.05						
20	13.61	ΤΗϹ ή CBD αλδεΰδη	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	341.2123	[M-H] <sup>-</sup>	1.85	8.5	+	-	-	-	[164]
21	13.69	CBNA	$C_{22}H_{26}O_4$	353.1758	[M-H] <sup>-</sup>	1.46	10.5	-	-	+	+	[160]
22	13.92	CBCA	C22H30O4	357.2075	[M-H] <sup>−</sup>	1.03	8.5	-	-	-	+	[160]
23	14.12	κανναβικιτρανικό οξύ (CBCTA)	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	357.2072	[M-H] <sup>–</sup>	0.19	8.5	-	-	+	+	[158]
24	14.42	CBLA	$C_{22}H_{30}O_4$	357.2068	[M-H] <sup>−</sup>	-0.93	8.5	-	-	+	+	[159]

Πίνακας 1. Σύσταση επιλεγμένων κλασμάτων CPE1 (CPE1\_2 έως CPE1\_5) με βάση την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-ESI-HRMS).



**Σχήμα 1.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_2

Στο διάγραμμα 1 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_2 σε συγκέντρωση 100 μg/mL, ελαφρώς μικρότερη από εκέινη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη.



**Σχήμα 2.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_2

Στο διάγραμμα 2 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_2 σε συγκέντρωση 100 μg/mL, ελαφρώς μικρότερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα.



**Σχήμα 3.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV2 από το δείγμα CPE1\_2

Όμοια στο διάγραμμα 3 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPV2 από το δείγμα CPE1\_2 σε συγκέντρωση 100 μg/mL, ανάλογη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη, μετά τα 60 λεπτά.



Σχήμα 4. Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPM8 από το δείγμα CPE1\_2

Στο διάγραμμα 4 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPM8 από το CPE1\_2, στα 100 μg/mL, μεγαλύτερη από εκείνη του θετικού μάρτυρα, μετά τα 40 λεπτά.



Σχήμα 5. Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_3

Στο διάγραμμα 5 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_3 σε συγκέντρωση 10 μg/mL, ελαφρώς μικρότερη από εκέινη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη. Αντίστοιχα και σε συγκέντρωση 100 μg/mL παρατηρείται ενεργοποίηση του υποδοχέα σε μίκροτερο ποσοστό από την προηγούμενη.



Σχήμα 6. Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_3

Στο διάγραμμα 6 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_3 σε

συγκέντρωση 100 μg/mL, μεγαλύτερη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη. Αντίστοιχα και σε συγκέντρωση 10 μg/mL παρατηρείται ενεργοποίηση του υποδοχέα σε σαφώς μίκροτερο ποσοστό από την προηγούμενη.



Σχήμα 7. Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV2 από το δείγμα CPE1\_3

Στο διάγραμμα 7 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPV2 από το δείγμα CPE1\_3 σε συγκέντρωση 100 μg/mL, σαφώς μεγαλύτερη (15 RFU) από εκείνη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη, ενώ σε συγκέντρωση 10 μg/mL παρατηρείται ενεργοποίηση του υποδοχέα σαφώς μικρότερη από εκείνη του θετικού μάρτυρα.





Στο διάγραμμα 8 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPM8 από το δείγμα CPE1\_3 σε

συγκέντρωση 100 μg/mL, σαφώς μεγαλύτερη (15 RFU) από εκείνη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη (5 RFU), ενώ σε συγκέντρωση 10 μg/mL παρατηρείται ενεργοποίηση του υποδοχέα σαφώς μικρότερη από εκείνη του θετικού μάρτυρα.



**Σχήμα 9.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_4

Στο διάγραμμα 9 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_4 σε συγκέντρωση 10 και 100 μg/mL, σχεδόν ανάλογη με εκείνη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη.



**Σχήμα 10.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_4

Στο διάγραμμα 10 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_4 σε συγκέντρωση 100 μg/mL, ελαφρώς μικρότερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα ιονομυκίνη.



**Σχήμα 11.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPM8 από το δείγμα CPE1\_4

Στο διάγραμμα 11 παρατηρείται ενεργοποίηση του TRPM8 από το δείγμα CPE1\_4 σε συγκέντρωση 100 μg/mL, ελαφρώς μικρότερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα.



**Σχήμα 12.** Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPA1 από το δείγμα CPE1\_5

Στο διάγραμμα 12 παρατηρείται η υψηλότερη ενεργοποίηση από την συγκέντρωση

173

10 μg/mL του δείγματος CPE1\_5, η οποία είναι ελαφρώς μικρότερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα. Ακολουθεί η συγκέντρωση 100 μg/mL που προκαλεί ελαφρώς ασθενέστερη ενεργοποίηση και τελευταία η συγκέντρωση 1 μg/mL.



Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV1 από το δείγμα CPE1\_5

Στο διάγραμμα 13 παρατηρείται η υψηλότερη ενεργοποίηση από την συγκέντρωση 100 μg/mL του δείγματος CPE1\_5, η οποία είναι ελαφρώς μεγαλύτερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα.



Σχήμα 14. Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPV2 από το δείγμα CPE1\_5

Στο διάγραμμα 14 παρατηρείται η υψηλότερη ενεργοποίηση από την συγκέντρωση 100 μg/mL του δείγματος CPE1\_5, η οποία είναι κατά πολύ μεγαλύτερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα.



Σχήμα 15. Διάγραμμα μελέτης ενεργοποίησης του TRPM8 από το δείγμα CPE1\_5

Στο διάγραμμα 15 παρατηρείται η υψηλότερη ενεργοποίηση από την συγκέντρωση 100 μg/mL του δείγματος CPE1\_5, η οποία είναι κατά πολύ μεγαλύτερη απο εκείνη του θετικού μάρτυρα.