



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

«Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία (Food, Nutrition and Health) »

Γ.Ειδίκευση: Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΤΟΥ
ΕΙΔΟΥΣ *CANNABIS SATIVA L.*»**



ΟΥΡΑΝΙΑ Α. ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ

**Επιβλέπων: Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α
ΑΘΗΝΑ 2020**

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών :

« Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία (Food, Nutrition and Health) »

Γ.Ειδίκευση: Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη

«Μελέτη της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου και των εκχυλισμάτων διαφορετικών ποικιλιών του είδους *Cannabis Sativa L.*»

«Study of the chemical composition of the essential oil and the extracts of different varieties of *Cannabis Sativa L.*»

ΟΥΡΑΝΙΑ Α. ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Βιολέττα Κωνσταντίνου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Γαρυφαλλιά Οικονόμου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Αθήνα 2020

... Στους γονείς μου, Ανδρέα-Έλσα.....

Και στον Κωνσταντίνο....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου κατά τη διάρκεια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο «Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία (Food, Nutrition and Health) και ειδίκευση Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων το ακαδημαϊκό έτος 2018-2020.

Μέσα σε αυτές τις λίγες γραμμές θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης Διπλωματικής Εργασίας δε θα ήταν δυνατή χωρίς την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του Καθηγητή και Προέδρου του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου Πέτρο Ταραντίλη. Τον ευχαριστώ εκ βαθέως για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αναθέτοντάς μου το θέμα αυτό και για την καθοδήγηση του. Νιώθω βαθιά ευγνωμοσύνη για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου έδωσε τόσο κατά την φοίτηση μου όσο και κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης εργασίας.

Ακόμα εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην κ. Βιολέττα Κωνσταντίνου και την κ. Γαρυφαλλιά Οικονόμου, καθηγήτριες του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, για το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση αυτής της εργασίας αλλά και τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχαν μέσω των μαθημάτων του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κυρία Δαφερέρα Δήμητρα και τον κύριο Κανάκη Χάρη, μέλη ΕΔΙΠ, για την βοήθεια και τις συμβουλές τους. Οι χρήσιμες και πλήρεις οδηγίες που μου έδωσαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και συγγραφής έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της εργασίας μου. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κύριο Παπαδόπουλο Γιώργο, αναπληρωτή καθηγητή, για την σημαντική βοήθεια του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω πολύ την υποψήφια διδάκτορα Ελένη Κακούρη, για την βοήθεια που μου παρείχε στον πειραματικό σχεδιασμό και τη συμβολή της στη διόρθωση της εργασίας.

Επιπλέον, ανεκτίμητη υπήρξε η στήριξη από την συμφοιτήτριά μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα Ιωάννα Θάνου καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Ξαγοράρη Μαρίνο, οι

οποίοι με ενθάρρυναν και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου μελέτης.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον πατέρα μου Ανδρέα, τη μητέρα μου Έλσα και το αγόρι μου Κωνσταντίνο Τζομπανάκη για την υποστήριξή τους σ' όλα τα χρόνια των σπουδών μου και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της συγκεκριμένης διατριβής. Τους ευχαριστώ για την αγάπη, την κατανόηση και την προτροπή τους ώστε να συνεχίσω όπως επιθυμώ την ακαδημαϊκή μου εκπαίδευση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Μελέτη της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου και των εκχυλισμάτων διαφορετικών ποικιλιών του είδους *Cannabis Sativa L.*»

Τα τελευταία χρόνια, το φυτό *Cannabis sativa L.* αποτέλεσε το επίκεντρο της προσοχής της επιστημονικής κοινότητας σε όλο τον κόσμο, καθιστώντας το σίγουρα ένα από τα πλέον μελετημένα φυτά. Η πιο πρόσφατη βιβλιογραφία υποστηρίζει μια μονοτυπική ταξινόμηση, στην οποία αναγνωρίζεται ένα είδος, το *Cannabis sativa* και διαιρείται σε διαφορετικούς χημειότυπους με βάση το προφίλ των κανναβινοειδών. Παρ' όλα αυτά η ταξινόμηση των χημειότυπων γίνεται κυρίως με βάση τη συγκέντρωση της ψυχοδραστικής ουσίας Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ9-THC) και της συγκέντρωσης της μη ψυχοδραστικής ουσίας της κανναβιδιόλης (CBD). Πέρα από αυτές τις δύο κύριες ουσίες έχουν προσδιοριστεί πάνω από 500 είδη κανναβινοειδών, που όμως δεν παρουσιάζουν τόσο βιολογικό ενδιαφέρον όσο οι δύο παραπάνω ουσίες, καθώς και άλλες φαινολικές ουσίες όπως φλαβονοειδή και φλαβόνες. Επιπλέον, οι ταξιανθίες του φυτού είναι πλούσιες σε πτητικά συστατικά. Τα κύρια πτητικά που ανιχνεύονται στα εναέρια μέρη του φυτού περιλαμβάνουν τόσο τα μονο- όσο και τα σεσκιτερπένια.

Υπό το πρίσμα όλων των παραπάνω, η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ταυτοποίηση πολλών βιοδραστικών συστατικών, περιλαμβανομένων των κανναβινοειδών, των φαινολικών ενώσεων και των πτητικών, που υπάρχουν στις ταξιανθίες *Cannabis sativa L.* τριών διαφορετικών ποικιλιών, Fedora, Felina, Futura. Επιπρόσθετα, στόχος είναι να προσδιοριστούν τυχόν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στα δείγματα ανάλογα με την λίπανση που χρησιμοποιήθηκε κατά την καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, στα δείγματα που αναλύθηκαν έχουν χρησιμοποιηθεί δυο διαφορετικά είδη λίπανσης, ελληνική και канаδική λίπανση, ενώ όλα τα δείγματα προέρχονται από φυτά που έχουν καλλιεργηθεί στην Ελλάδα.

Αναλυτικότερα, η παραλαβή των πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger και έπειτα ακολούθησε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρία μαζών (GC-MS). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών των αιθερίων ελαίων

έγινε με χρήση εσωτερικού προτύπου κυκλοεξανόνης. Οι αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο κυμαίνονται μεταξύ 0,3-0,6%. Τα κύρια πτητικά συστατικά που κυριαρχούν στα δείγματα βρέθηκαν να είναι τα σεσκιτερπένια β-καρβοφυλλένιο και το α-χουμουλένιο. Ακόμα, ανιχνεύθηκε στα αιθέρια έλαια όλων των δειγμάτων η κανναβιδιόλη (CBD). Σε δεύτερο στάδιο, απομονώθηκε το υδατικό υπόλειμμα από την σφαιρική φιάλη της απόσταξης, ακολούθησε διήθηση και λυοφιλίωση. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, καθώς και φασματοσκοπική ανάλυση UV-Vis.

Για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών ενώσεων, έγινε χρήση χρωματογραφιών και φασματοσκοπικών τεχνικών, συγκεκριμένα UV-Vis και LC/Q-TOF/HRMS, αφού προηγήθηκε εκχύλιση του φυτικού υλικού με μεθανόλη και χρήση υπερήχων. Τα κυριότερα κανναβινοειδή που ταυτοποιήθηκαν ήταν η κανναβιδιόλη (CBD), το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA), το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA), η κανναβιγερόλη (CBG) και η κανναβινόλη (CBN), ενώ προσδιορίστηκε ποσοτικά η συγκέντρωση της κανναβιδιόλης στα δείγματα. Τέλος, στα μεθανολικά εκχυλίσματα ταυτοποιήθηκαν τα εξής флаβονοειδή, η κανφλαβίνη A και B και το καννιπρένιο.

Επιστημονικής περιοχή διατριβής: Αθήνα

Λέξεις κλειδιά: • *Cannabis sativa* L. • Clevenger • GC/MS • Τερπένια • LC/QTOF/HRMS • Κανναβινοειδή • Φλαβονοειδή

ABSTRACT

«Study of the chemical composition of the essential oil and the extracts of different varieties of *Cannabis Sativa* L.»

In recent years, *Cannabis sativa* L. continuously attracts worldwide scientific interest, resulting nowadays one of the most studied plants. The recent literature supports a monotypic classification, in which one species is identified, *Cannabis sativa*, and is divided into different cannabinoid phenotypes. However, the classification of the phenotypes is mainly based on the concentration of the psychoactive principle Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and the concentration of the non-psychoactive compound cannabidiol (CBD). In addition to these two main compounds, more than 500 species of cannabinoids have been identified, as well as other phenolic compounds such as flavonoids and flavones. Regarding to the other compounds present in hemp, terpenes are responsible for the characteristic aroma of the plant. The major volatiles detected in the aerial parts of the plant include both mono- and sesquiterpenes.

In the light of all the above, the present study aimed at the analysis of the bioactive compounds present in hemp inflorescences of different varieties. Fedora, Felina, Futura, including cannabinoids, hemp-specific phenolics, and volatile compound. Moreover, the aim of this thesis was to determine qualitative and quantitative differences in the samples depending on the fertilizer that was used. Specifically, the samples analyzed were cultivated in different agronomic conditions. Two different types of fertilizers were used, Greek and Canadian, while all samples were cultivated in Greece.

In particular, the essential oils were received using the hydro-distillation technique with the Clevenger apparatus. The volatile compounds of the essential oils were qualitative determined by gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC/MS). The quantitative determination of the identified compounds in essential oils was performed using cyclohexanone, as internal standard. The yield of the essential oils was ranged between 0,3% to 0,6%. The major volatile compounds were found to be the sesquiterpenes β -caryophyllene and α -humulene. Also, cannabidiol (CBD) was detected

in the essential oils of all samples. In a second step, the aqueous residue was isolated from the distillation flask, followed by filtration and lyophilization. The total content of phenolic compounds was determined by Folin-Ciocalteu method and the presence of phenolic compounds was also confirmed by the spectrometry technique UV-Vis.

Furthemore, the hemp was extracted with methanol and then for the separation and the indentification of the cannabinoids were performed by instrumental analysis techniques, namely UV-Vis and LC/Q-TOF/HRMS. The main cannabinoids identified were cannabidiol (CBD), cannabidiol acid (CBDA), cannabigolic acid (CBGA), cannabigerol (CBG) and cannabinol (CBN), while cannabidiol concentration were quantitated for each sample analysed. Finally, flavonoids such as cannflavin A and B and canniprene were found in the methanolic extracts.

Scientific area of thesis: Athens

Keywords: *Cannabis sativa* L. • Clevenger • GC/MS • Terpenes • LC/QTOF/HRMS
•Cannabinoids • Flavonoids

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ & ΣΧΗΜΑΤΩΝ	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	10
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α	11
A.1 Εισαγωγή	11
A.2 Ιστορική αναδρομή	11
A.3 Βοτανική κατάταξη	13
A.4 Τα δραστικά συστατικά	15
A.5 Καλλιέργεια κλωστικής κάνναβης	19
A.6. Νομοθετικό πλαίσιο	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β	25
B.1 Αιθέρια έλαια	25
B.1.1 Σύσταση αιθερίων ελαίων	26
B.1.2 Παραλαβή πτητικών συστατικών	28
B.1.2.1 Απόσταξη	29
B.1.2.2 Εκχύλιση	30
B.1.2.3 Μηχανική παραλαβή	31
B.1.3 Σύγχρονες μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων	31
B.1.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών από αιθέρια έλαια	31
B.1.5 Πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου <i>C.sativa</i> L.	32
B.2 Κανναβινοειδή	32
B.2.1 Δ-9-τετραυδροκανναβινόλη (Δ9-THC)	33
B.2.2 Δ-8-τετραυδροκανναβινόλη (Δ8-THC)	34
B.2.3 Κανναβιγερόλη (CBG)	34
B.2.4 Κανναβιδιόλη (CBD)	35
B.2.5 Κανναβικυκλόλη (CBL)	36
B.2.6 Κανναβινόλη (CBN)	36
B.2.7 Κανναβιτριόλη (CBT)	37
B.2.8 Κανναβιλοσίνη (CBE)	37

B.2.9 Κανναβιχρωμίνη (CBC)	37
B.3 Μη κανναβινοειδή	38
B.3.1 Φλαβονοειδή	38
B.3.2 Στεροειδή	38
B.3.3 Λιπαρά Οξέα	39
B.3.4 Στεροιδάνες	40
B.3.5 Αζωτούχες Ενώσεις	40
B.3.6 Ξανθόνες	41
B.3.7 Διφαινύλια	41
B.3.8 Φαινανθρένια	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ	43
Γ.1 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)	43
Γ.2 Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (LC/QTOF/HRMS)	45
Γ.3 Φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	47
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ	50
Δ.1 Σκοπός και αντικείμενο της μελέτης	50
Δ.2 Φυτικό υλικό	52
Δ.3 Ανάλυση αιθερίου ελαίου του είδους <i>C. sativa</i> L.	53
Δ.3.1 Υδροαπόσταξη	53
Δ.3.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αιθερίων ελαίων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρίαμαζών (GC-MS)	55
Δ.3.3 Αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο του είδους <i>C.sativa</i> L.	57
Δ.3.4 Χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων <i>C.sativa</i> L.	59
Δ.4. Εκχυλίσματα <i>Cannabis sativa</i> L.	82
Δ.4.1 Παραλαβή φαινολικών ενώσεων από υδατικό υπόλειμμα <i>C.sativa</i> L.	82
Δ.4.2 Παραλαβή κανναβινοειδών από ξηρή δρόγη <i>C.sativa</i> L	83
Δ.5 Ανάλυση δειγμάτων με UV-Vis	86
Δ.6 Ανάλυση δειγμάτων με την τεχνική LC/Q-TOF/HRMS	90
Δ.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός κανναβιδιόλης σε μεθανολικά εκχυλίσματα <i>C. sativa</i> L.	101

Δ.7 Προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών ενώσεων των υδατικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	108
Δ.8. Συμπεράσματα	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	124
Παράρτημα Α	124
Παράρτημα Β	129
Παράρτημα Γ	135
Παράρτημα Δ	161

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ & ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1 : Το μοτίβο του φύλλου του φυτού <i>C.sativa</i> L.	14
Εικόνα 2: Χημική δομή κανναβιδιόλης (CBD)	16
Εικόνα 3: Χημική δομή Δ9-τετραυδροκανναβινόλη (THC)	17
Εικόνα 4: Διαφορές <i>C.sativa</i> και <i>C.indica</i>	18
Εικόνα 5: Ανθισμένα αρσενικά άνθη	22
Εικόνα 6: Ξήρανση ταξιανθιών κλωστικής κάνναβης	22
Εικόνα 7: Βιοσύνθεση τερπενίων	27
Εικόνα 8: Χημική δομή ισοπρενίου	27
Εικόνα 9: Συσκευή Clevenger	30
Εικόνα 10: Χημική δομή του οξέος της THC	34
Εικόνα 11: Χημική δομή Δ8-THC	34
Εικόνα 12: Χημική δομή κανναβιγέρολης και κανναβιγερολικού οξέος	35
Εικόνα 13: Πορεία αποκαρβοξυλίωσης κανναβιδιολικού οξέος	35
Εικόνα 14: Χημική δομή κανναβικυκλόλης (CBL)	36
Εικόνα 15: Χημική δομή κανναβινόλης και του οξέος της	36
Εικόνα 16: Χημική δομή κανναβιτριόλης (CBT)	37
Εικόνα 17: Χημική δομή συστατικών τύπου κανναβιχρωμίνης (CBC)	37
Εικόνα 18: Χημική δομή φλαβονοειδών του είδους <i>C. sativa</i> L.	38
Εικόνα 19: Χημική δομή στεροειδών του είδους <i>C.sativa</i> L.	39
Εικόνα 20: Χημική δομή λιπαρών οξέων του είδους <i>C. sativa</i> L.	39
Εικόνα 21: Χημική δομή σπεροιδάνων του είδους <i>C.sativa</i> L.	40
Εικόνα 22: Χημική δομή αζωτούχων ενώσεων του είδους <i>C. sativa</i> L.	40
Εικόνα 23: Χημική δομή της ξάνθονης του είδους <i>C. sativa</i> L	41
Εικόνα 24: Χημική δομή διφαινυλίων του είδους <i>C. sativa</i> L.	41
Εικόνα 25: Διάγραμμα ενός τυπικού αέριου χρωματογράφου συζευγμένο με φασματομετρία μαζών	44
Εικόνα 26: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης	44
Εικόνα 27: Δείγμα <i>C.sativa</i> L. σε ξηρή δρόγη	52
Εικόνα 28: Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger	54

Εικόνα 29: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρίας μαζών (GC-MS)	55
Εικόνα 30: Αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο δειγμάτων <i>Cannabis sativa</i> και <i>indica</i>	58
Εικόνα 31: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου <i>C. sativa</i> L. , ποικιλία Felina	59
Σχήμα 32: Ταξιμόνηση τερπενίων ανάλογα των αριθμό ανθράκων στα δείγματα <i>C. sativa</i> L	73
Σχήμα 33: Αναλυτικότερη ταξινόμηση τερπενίων ανάλογα των αριθμό ανθράκων στα δείγματα <i>C. sativa</i> L.	74
Σχήμα 34: Συγκέντρωση (mg/ml e.o) (E)-caryophyllene στα δείγματα <i>C. sativa</i> L.	75
Σχήμα 35: Συγκέντρωση (mg/ml e.o) α -pinene στα δείγματα <i>C. sativa</i> L.	75
Σχήμα 36: Συγκέντρωση (mg/ml e.o.) συστατικών στα δείγματα της ποικιλίας A, Fedora	76
Εικόνα 37: Η κορυφή της κανναβιδιόλης σε αέριο χρωματογράφημα δείγματος της ποικιλίας A	77
Σχήμα 38: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των δειγμάτων <i>C. sativa</i> L.	77
Σχήμα 39: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των τεσσάρων δειγμάτων από την ποικιλία A, Fedora	79
Σχήμα 40: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των τεσσάρων δειγμάτων από την ποικιλία B, Felina	79
Σχήμα 41: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των τεσσάρων δειγμάτων από την ποικιλία Γ, Futura	80
Εικόνα 42: Σύστημα λυοφιλίωσης	82
Εικόνα 43: Πολικά φίλτρα HPLC Chromafil Xtra CA-20/13	83
Εικόνα 44: Διήθηση με ηθμό Buchner	84
Εικόνα 45: Rotary Evaporator	84
Εικόνα 46: Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	86
Εικόνα 47: Φάσμα UV-Vis των ενώσεων CBD και CBG	87
Εικόνα 48: Φάσμα UV-Vis των ενώσεων CBDA και CBGA	87
Εικόνα 49: Φάσμα UV-Vis δείγματος B2 εκχυλισμένο με μεθανόλη	88
Εικόνα 50: Φάσμα UV-Vis υδατικού δείγματος ποικιλίας Γ, Futura	89
Εικόνα 51: Σύστημα υγρής χρωματογραφία (LC/QTOF/HRMS)	90
Εικόνα 52: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα και φάσμα μάζας της πρότυπης ένωσης, CBD με θετικό ιονισμό	93
Εικόνα 53: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα και φάσμα μάζας της πρότυπης ένωσης, CBD με αρνητικό ιονισμό	94
Εικόνα 54: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα του δείγματος A1a θετικού ιονισμού	95

Εικόνα 55: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα του δείγματος A1α αρνητικού ιονισμού	95
Εικόνα 56: Φάσμα μάζας θετικού ιονισμού για την κορυφή 1, κανναβινολικό οξύ (CBNA)	97
Εικόνα 57: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού για την κορυφή 2 και 4, καννφλαβίνη A και B	97
Εικόνα 58: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού για την κορυφή 5 και 6, κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και κανναβιδιόλη (CBD)	98
Εικόνα 59: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού για την κορυφή 8 και 9, κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) και κανναβιγερόλη (CBG)	99
Εικόνα 60 : Πρότυπη καμπύλη κανναβιδιόλης (CBD)	101
Σχήμα 61: Συγκέντρωση κανναβιδιόλης (mg/g.φυτικού υλικού) σε δείγματα <i>C.sativa</i> L.	104
Εικόνα 62: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS, μοντέλο Jasco V-550	109
Εικόνα 63 : Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος	109
Σχήμα 64: Συγκέντρωση (mg/ml) ολικών φαινολικών συστατικών δειγμάτων <i>C.sativa</i> L.	111
Εικόνα 65: Φάσμα UV-Vis δείγματος A1	124
Εικόνα 66: Φάσμα UV-Vis δείγματος A2	124
Εικόνα 67: Φάσμα UV-Vis δείγματος B1	125
Εικόνα 68: Φάσμα UV-Vis δείγματος B2	125
Εικόνα 69: Φάσμα UV-Vis δείγματος Γ1	126
Εικόνα 70: Φάσμα UV-Vis δείγματος Γ2	126
Εικόνα 71: Φάσμα UV-Vis δείγματος A1	127
Εικόνα 72: Φάσμα UV-Vis δείγματος B1	127
Εικόνα 73: Φάσμα UV-Vis δείγματος Γ1	128
Εικόνα 74: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος A1α	129
Εικόνα 75: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος A1β	129
Εικόνα 76: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος A2α	130
Εικόνα 77: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος A2β	130
Εικόνα 78: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B1α	131
Εικόνα 79: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B1β	131
Εικόνα 80: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B2α	132
Εικόνα 81: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B2β	132
Εικόνα 82: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ1α	133
Εικόνα 83: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ1β	133
Εικόνα 84: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ2α	134
Εικόνα 85: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ2β	134
Εικόνα 86: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος A1α	135

Εικόνα 87: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος A1β	136
Εικόνα 88: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος A2α	137
Εικόνα 89: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος A2β	138
Εικόνα 90: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος B1α	139
Εικόνα 91: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα δείγματος, θετικού ιονισμού B1β	140
Εικόνα 92: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος B2α	141
Εικόνα 93: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος B2β	142
Εικόνα 94: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Γ1α	143
Εικόνα 95: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Γ1β	144
Εικόνα 96: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα δείγματος, θετικού ιονισμού Γ2α	145
Εικόνα 97: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Γ2β	146
Εικόνα 98: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος A1α	147
Εικόνα 99: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος A1β	148
Εικόνα 100: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος A2α	149
Εικόνα 101: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος A2β	150
Εικόνα 102: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος B1α	151
Εικόνα 103: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος B1β	152
Εικόνα 104: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος B2α	153
Εικόνα 105: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος B2β	154
Εικόνα 106: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ1α	155

Εικόνα 107: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ1β	156
Εικόνα 108: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ2α	157
Εικόνα 109: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ2β	158

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βοτανική κατάταξη κάνναβης	15
Πίνακας 2: Καλλιεργούμενη έκταση κάνναβης στην Ευρώπη, 2015	20
Πίνακας 3: Ταξινόμηση τερπενίων	28
Πίνακας 4: Φαινολικά συστατικά που απομονώθηκαν από το φυτό <i>C.sativa</i> L.	32
Πίνακας 5: Κύριες τεχνικές ιονισμού στη φασματομετρία μαζών	46
Πίνακας 6 : Ποικιλίες δειγμάτων	52
Πίνακας 7: Κωδικοποίηση δειγμάτων	53
Πίνακας 8: Πληροφορίες για την πρότυπη ένωση κυκλοεξανόνη	56
Πίνακας 9: Αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο δειγμάτων	57
Πίνακας 10: Συστατικά δείγματος A1α του είδους <i>C.sativa</i> L.	59
Πίνακας 11: Συστατικά δείγματος A1β του είδους <i>C.sativa</i> L.	60
Πίνακας 12: Συστατικά δείγματος A2α του είδους <i>C.sativa</i> L.	61
Πίνακας 13: Συστατικά δείγματος A2β του είδους <i>C.sativa</i> L.	62
Πίνακας 14: Συστατικά δείγματος B1α του είδους <i>C.sativa</i> L.	63
Πίνακας 15: Συστατικά δείγματος B1β του είδους <i>C.sativa</i> L.	64
Πίνακας 16: Συστατικά δείγματος B2α του είδους <i>C.sativa</i> L.	65
Πίνακας 17: Συστατικά δείγματος B2β του είδους <i>C.sativa</i> L.	66
Πίνακας 18: Συστατικά δείγματος Γ1α του είδους <i>C.sativa</i> L.	67
Πίνακας 19: Συστατικά δείγματος Γ1β του είδους <i>C.sativa</i> L.	68
Πίνακας 20: Συστατικά δείγματος Γ2α του είδους <i>C.sativa</i> L.	69
Πίνακας 21: Συστατικά δείγματος Γ2β του είδους <i>C.sativa</i> L.	70
Πίνακας 22: Συγκέντρωση των συστατικών(mg/ml essential oil) των δειγμάτων <i>C.sativa</i> L.	72
Πίνακας 23: Ποικιλίες δειγμάτων	82
Πίνακας 24: Αποδόσεις σε mg εκχυλίσματος δειγμάτων <i>C.sativa</i> L.	85
Πίνακας 25: Απορρόφηση των υδατικών εκχυλισμάτων <i>C.sativa</i> L.	89
Πίνακας 26 : Πρόγραμμα ανάλυσης LC-QTOF-HRMS	92
Πίνακας 27: Πληροφορίες για την πρότυπη ένωση κανναβιδιόλη	93
Πίνακας 28: Σύγκριση του χρωματογραφήματος του δείγματος A1α με αυτά των πρότυπων ενώσεων και της βιβλιογραφίας	96
Πίνακας 29: Ποσότητες κανναβιδιόλης (mg/g. φυτικού υλικού) σε δείγματα <i>C.sativa</i> L.	102
Πίνακας 30: Παράμετροι της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης	103
Πίνακας 31: Παράμετροι γραμμικότητας της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης	103
Πίνακας 32: Ποσότητα mg/gr κανναβιδιόλης σε δείγματα <i>C.sativa</i> L. (Brighenti et al.,2017)	105
Πίνακας 33: Ποσότητα mg/gr κανναβιδιόλης σε δείγματα <i>C.sativa</i> L.(Pellati et al.,2018)	106
Πίνακας 34: Τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών στα υδατικά εκχυλίσματα <i>C.sativa</i> L.	110

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
Γ.Π.Α	Agricultural University of Athens	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Δ8-THC	Δ8-Tetrahydrocannabinol	Δ8-τετραυδροκανναβινόλη
Δ9-THC	Δ9-Tetrahydrocannabinol	Δ9-τετραυδροκανναβινόλη
E.E	European Union	Ευρωπαϊκή Ένωση
APCI	Atmospheric-pressure Chemical Ionization	Χημικός Ιονισμός με Ατμοσφαιρική Πίεση
CBC	Cannabichromene	Κανναβιχρωμίνη
CBD	Cannabidiol	Κανναβιδιόλη
CBDA	Cannabidiolic acid	Κανναβιδιολικό οξύ
CBE	Cannabielsoin	Κανναβιλιοσίνη
CBG	Cannabigerol	Κανναβιγερόλη
CBGA	Cannabigerolic acid	Κανναβιγερολικό οξύ
CBL	Cannabicyclol	Κανναβικυκλόλη
CBN	Cannabinol	Κανναβινόλη
CBNA	Cannabinolic acid	Κανναβινολικό οξύ
CBT	Cannabitriol	Κανναβιτριόλη
DESI	Desorption Electrospray Ionization	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό Εκρόφησης
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό
FID	Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής φλόγας ιονισμού
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry	Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών
IT	Ion trap	Παγίδα ιόντων
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
LC/MS	Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μαζών
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization	Ιονισμός με λέιζερ υποβοηθούμενο με υλικό μήτρας
QTOF	Quadrupole-Time of Flight	Τετράπολος αναλυτής μάζας/ χρόνου πτήσης
SPME	Solid Phase Microextraction	Μικροεκχύλιση στερεής φάσης
UV-Vis	Ultra Violet-Visible	Ορατού- Υπεριώδους

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α : ΤΟ ΦΥΤΟ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ

A.1 Εισαγωγή

Το φυτό της κάνναβης χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια για την πρόκληση ευφορίας, λόγω των ψυχοτρόπων ιδιοτήτων του. Παράλληλα, έχει χρησιμοποιηθεί ήδη από τον 4ο αιώνα π.Χ. για τις θεραπευτικές του ιδιότητες (Hollister, 1986). Τα τελευταία χρόνια αποτελεί ένα από τα πιο μελετημένα φυτά (Chandra et al., 2017). Τα άνθη και τα φύλλα του φυτού εκκρίνουν μια ρητίνη που περιέχει ανάμεσα σε 400 χημικές ουσίες οι οποίες καλούνται κανναβινοειδή. Κατά κύριο λόγο είναι ένα φυτό συνδεδεμένο για την ψυχαγωγική του χρήση, η οποία οφείλεται στην παρουσία της Δ9-τετραυδροκανναβινόλης (THC), μιας ουσίας η οποία επιδρά στο ενδογενές σύστημα των κανναβινοειδών του ανθρώπινου οργανισμού. Το φυτό της κάνναβης, εκτός από την Δ9-THC περιέχει ορισμένες λιγότερο ισχυρές ουσίες, όπως τα ψυχοδραστικά Δ8-τετραυδροκανναβινόλη (Δ8-THC) και κανναβινόλη (CBN) και η μη ψυχοδραστική ουσία κανναβιδιόλη (CBD), (Russo και McPartland, 2003), αλλά και άλλες όπως η κανναβιχρωμένη (CBC), η κανναβιγερόλη (CBG), η τετραυδροκανναβιβαρίνη (THCV) κ.ά. (Donald I. Abrams και Manuel Guzman, 2009).

A.2 Ιστορική αναδρομή

Το φυτό της κάνναβης καλλιεργείται από την αρχαιότητα σχεδόν σε όλα τα μέρη του κόσμου. Αποτέλεσε κύρια πηγή για την παρασκευή σχοινιών και κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων (Lin et al., 1974). Η κάνναβη ανήκει στα ελαιούχα – κλωστικά φυτά και το είδος *Cannabis sativa* L., γνωστό επίσης με την ονομασία χασίς, χρησιμοποιείται από τη νεολιθική περίοδο για την παραγωγή πλήθους προϊόντων και υποπροϊόντων. Τα πρώτα στοιχεία χρήσης της κάνναβης βρέθηκαν στην Κίνα, όπου κάποια αρχαιολογικά και ιστορικά ευρήματα δείχνουν ότι το φυτό καλλιεργούνταν για τις ίνες του από το 4000π.χ. Οι κινέζοι χρησιμοποιούσαν τους καρπούς της κάνναβης ως τροφή.

Κατά των μεσαίων αιώνα η κάνναβη ήταν πλέον διαδεδομένη σε όλη την Ευρώπη και χρησιμοποιήθηκε τόσο ως θεραπευτικό όσο και ως ευφορικό μέσο. Η λέξη χασίς, στα

αραβικά σημαίνει χόρτο και βότανο και έγινε ευρέως γνωστή στο δυτικό κόσμο ως μυητικό και τελετουργικό μέσο αιρέσεων (Γρίβας,2009).



Η πρώτη απαγόρευση της κάνναβης επιβλήθηκε το 1378 από τον εμίρη Soudoumi Schekhouni της Αραβίας. Διέταξε να καταστραφούν όλα τα φυτά κάνναβης που υπήρχαν στην επικράτειά του καθώς και τον ξεριζωμό των δοντιών των χρηστών της κάνναβης. Η προσπάθεια της απαγόρευσης δεν είχε καμία επιτυχία και αντί να μειωθεί η χρήση της κάνναβης αυξήθηκε (Lewin,1998).

Στον νεότερο κόσμο, η κάνναβη πλέον αποτελούσε μέσο επιβίωσης για μεγάλο ποσοστό του αγροτικού πληθυσμού σε Ευρώπη και Αμερική. Όσον αφορά την χρήση της κάνναβης στην Ελλάδα χρονολογείται κάπου στον 5^ο αιώνα π.Χ. από περιγραφές του Ηροδότου (484-420π.Χ.) (Herodotus,2003). Στη χώρα μας, η κάνναβη καλλιεργούνταν για αιώνες για την παραγωγή σκοινιών και υφασμάτων - την πρώτη αναφορά μάλιστα σε αυτήν συναντάμε το 450 π.Χ. στον Ηρόδοτο. Στα μέσα του 20ού αιώνα, η κάνναβη αποτελούσε βασική γεωργική καλλιέργεια και εξαγωγίμο προϊόν. Είναι χαρακτηριστικό ότι, μέχρι το 1957, όπου με νόμο απαγορεύθηκε η καλλιέργεια του φυτού, λειτουργούσαν στην Ελλάδα επτά κανναβουργεία που επεξεργάζονταν την ίνα για τη δημιουργία σκοινιών. Σήμερα στην Έδεσσα, το υδροκινούμενο κανναβουργείο της, που λειτούργησε 40 χρόνια, αποτελεί ιστορικό διατηρητέο μνημείο της βιομηχανικής κληρονομιάς της περιοχής.

Την τελευταία δεκαετία του 19^{ου} αιώνα, η κυβέρνηση στην Βρετανία ανάθεσε σε μια επιστημονική επιτροπή να ερευνήσει τις βιολογικές και κοινωνικές συνέπειες από τη χρήση της κάνναβης. Το 1894 δημοσιεύθηκε η έκθεση της ινδικής επιτροπής, η οποία μέχρι και σήμερα, σύμφωνα με νεότερες μελέτες επιβεβαιώνεται. Τα συμπεράσματα

της έκθεσης ανέφεραν ότι η περιστασιακή χρήση της κάνναβης μπορεί να είναι ευεργετική και η συντηρητική χρήση της δεν έχει καμιά αρνητική συνέπεια. Τέλος, η έκθεση τονίζει ότι οι βλάβες που προκαλεί η κατάχρησή της έχουν αντίκτυπο μόνο στο χρήστη και όχι σε τρίτους (India Hemp Drugs Commission, 1893-1894).

Στις αρχές της δεκαετίας του '90, η Ευρωπαϊκή Ένωση άρχισε να επιδοτεί τις νέες καλλιέργειες και ξεκίνησε μια περίοδος αναβίωσης της κλωστικής κάνναβης. Η κλωστική κάνναβη μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλο φάσμα αγροκλιματικών συνθηκών με αποτέλεσμα την αύξηση της βιωσιμότητας σε οικονομικό, περιβαλλοντικό, αγρονομικό και κοινωνικό επίπεδο. Επιπλέον δημιουργήθηκαν νέες πολύ παραγωγικές ποικιλίες με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα στην ψυχοτρόπο ουσία τετραϋδρακανναβινόλη (THC), ενώ αναπτύχθηκε και νέα τεχνολογία για την επεξεργασία της ίνας με χαμηλότερο κόστος (Struik et al. 2000). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το ΦΕΚ αρ. 929B/6-4-2016, η καλλιέργεια της κλωστικής κάνναβης επιτρέπεται για ποικιλίες κλωστικής κάνναβης που έχουν περιεκτικότητα σε THC χαμηλότερη από 0,2%.

A.3 Βοτανική κατάταξη

Η κάνναβη, είναι φυτό της τάξης των κνιδωδών και περιλαμβάνει ένα είδος, την κάνναβη την ήρεμη (*Cannabis sativa*) και υπάρχει στη φύση σε περισσότερες από εκατό παραλλαγές. Ο μεγάλος αριθμός των ποικιλιών αυτού του φυτού, που ταξινομήθηκε από το Λιννέο στα 1753 με το όνομα *Cannabis sativa*, δημιούργησε στο παρελθόν πολλές διαφωνίες μεταξύ των βοτανολόγων με την ακριβή ταξινόμηση του, αλλά σήμερα είναι αποδεκτό ότι υπάρχει ένα αρχικό είδος η *cannabis sativa*, από το οποίο ξεκίνησαν πολλές παραλλαγές (*Cannabis indica*, *Cannabis ruderalis*) που διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς τη περιεκτικότητά τους σε ορισμένες δραστικές ουσίες, όπως η THC και η CBD (Γρίβας, 2009).

Η κάνναβη ανήκει σε μια από τις πιο εξελιγμένες φυτικές οικογένειες. Χρησιμοποιεί το φως του ήλιου αποτελεσματικότερα από κάθε άλλο φυτό και αποτελεί μια σπουδαία πηγή που αυτοανανεώνεται, ενισχύοντας την οικολογική ισορροπία.

Η κύρια μορφολογική διαφορά μεταξύ της *indica* και της *sativa* είναι τα φύλλα τους. Τα φύλλα της *sativa* είναι πολύ μικρότερα και λεπτότερα, ενώ εκείνα της *indica* είναι πλατύτερα και έχουν χρώμα βαθύ πράσινο, συχνά με μοβ χροιά τα οποία στην ωρίμανση, γίνονται σκούρα μοβ (Εικ.1). Επίσης, τα φυτά *indica* είναι μικρότερα και πιο πυκνά, συνήθως κάτω από 6 πόδια ύψους και σπάνια πάνω από 8. Η *indica* έχει βραχέα κλαδιά φορτωμένα με πυκνούς οφθαλμούς, οι οποίοι ωριμάζουν νωρίς, συνήθως στις αρχές Σεπτεμβρίου στο Βόρειο ημισφαίριο. Η φυσική κατανομή της *indica* είναι το Αφγανιστάν, το Πακιστάν, η Ινδία και οι γύρω περιοχές. Τα φυτά της *sativa* έχουν μακριά κλαδιά, με τα χαμηλότερα να απλώνονται 4 πόδια ή περισσότερο από τον κεντρικό μίσχο. Το ύψος τους κυμαίνεται από 6 πόδια έως περισσότερο από 20 πόδια, με συνηθέστερο εύρος 8-12 πόδια. Ο χρόνος ωρίμανσης της κάνναβης ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με την ποικιλία και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η *sativa* βρίσκεται σε όλο τον κόσμο και περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος των ναρκωτικών των ισημερινών ποικιλιών όπως η Κολομβιανή, η Μεξικάνικη, η Νιγηριανή και η Νότια Αφρικάνικη.



Εικόνα 1 : Το μοτίβο του φύλλου του φυτού *C.sativa* L.

Το περίεργο μοτίβο τους διευκολύνει την αναγνώριση και επιτρέπει σε όλους να διακρίνουν τα φυτά αυτά από τα φύλλα τους σε σχέση με άλλα πανομοιότυπα (Waynesword.palomar.edu,2016). Στα οδοντωτά φύλλα, κάθε οδόντωση έχει μια κεντρική φλέβα που εκτείνεται σε κάθε άκρη της (Brandwijk,1962). Τα αρσενικά άνθη είναι κιτρινοπράσινα και τα θηλυκά διατάσσονται σε χαρακτηριστικές σταχυόμορφες δέσμες. Οι καρποί είναι ωοειδείς, ελλειπτικοί, λείοι, με σκληρό κέλυφος, έχουν μέγεθος 4-5mm και περιέχουν μόνο τον σπόρο. Επίσης, με το

πέρασμα του χρόνου οι σπόροι συνέχιζαν να χρησιμοποιούνται και για την παραγωγή λαδιού για την κουζίνα του Νεπάλ (Touwn,1981).

Πίνακας 1: Βοτανική κατάταξη κάνναβης

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Φυτά (Plantae)
ΣΥΝΩΜΟΤΑΞΙΑ	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
ΤΑΞΗ	Κνιδώδη (Urticales)
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Κανναβινοειδή (Cannabaceae)
ΓΕΝΟΣ	Κάνναβις (<i>Cannabis</i> L.)
ΕΙΔΗ	Κάνναβη η ήρεμη (<i>Cannabis sativa</i> L.)

A.4 Τα δραστικά συστατικά

Η περιεκτικότητα των ταξιανθιών και φύλλων σε δευτερογενείς μεταβολίτες όπως τα κανναβινοειδή, αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τομέα τελικών χρήσεων της κλωστικής κάνναβης (Cappelleto et al, 2001).

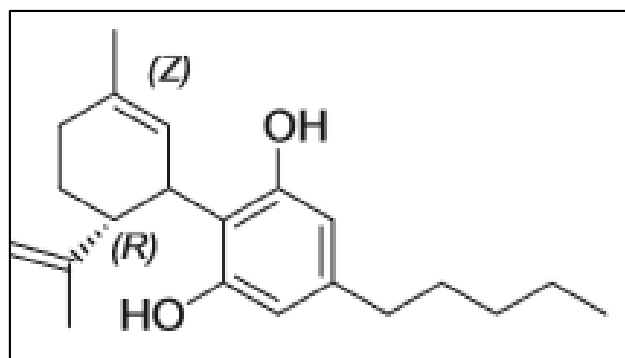
Η χημεία του συγκεκριμένου φυτού είναι αρκετά πολύπλοκη. Πράγματι, αρκετές χημικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί, συμπεριλαμβανομένων των πεπτιδίων, υδατανθράκων, λιπαρών οξέων, αμινών, φαινολικών ενώσεων και κανναβινοειδών (Andre et al.,2016). Συνήθως, σε αφθονία τα κανναβινοειδή που υπάρχουν είναι τα κανναβινικά οξέα, όπως το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA), ακολουθούμενα από τις αποκαρβοξυλιωμένες μορφές τους, δηλαδή την κανναβιδιόλη (CBD) και την κανναβιγερόλη (CBG) (Bringheti et al.,2017). Στους ιστούς των φυτών, τα κανναβινοειδή βιοσυντίθενται υπό μορφή οξέος και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμότητα και το φως, προκαλούν μια

αυθόρμητη διαδικασία αποκαρβοξυλίωσης για να σχηματίσουν αποκαρβοξυλιωμένα κανναβινοειδή.

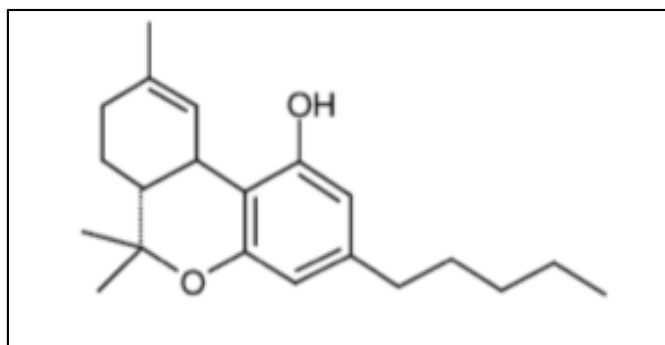
Ο συνολικός αριθμός των φυσικών ενώσεων που εντοπίστηκαν ή απομονώθηκαν συνεχίζεται να αυξάνεται κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Το 1980, 423 ενώσεις αναφέρθηκαν ότι απομονώθηκαν από το φυτό της κάνναβης (Turner,1980). Αυτός ο αριθμός αυξήθηκε το 1995 σε 485 (Ross & Elsohly,1995) και αργότερα το 2005 προστέθηκαν άλλες 8 ενώσεις (Elsohly & Slade,2005). Πλέον ο συνολικός αριθμός των συστατικών που εντοπίζονται είναι 545 ενώσεις.

Δύο από αυτά τα κανναβινοειδή έχουν σωματικές και ψυχικές επιδράσεις στον άνθρωπο ενώ τα υπόλοιπα είναι αδρανή από βιολογική άποψη.

- ✓ Δ9-τετραυδροκανναβινόλη (THC): Είναι το κύριο δραστικό συστατικό της κάνναβης και εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φύλλα του θηλυκού φυτού όπου υπάρχει πλήθος εκκριτικών αδένων. Αργότερα, εμφανίζεται σε μελέτες με τη μη επίσημη ονομασία Δροναβινόλη (Grotrnhermen & Muller-Vahl,2012).
- ✓ Κανναβιδιόλη (CBD): Μεταξύ των μη ψυχοδραστικών κανναβινοειδών, η CBD αντιπροσωπεύει την πλέον υποσχόμενη από φαρμακευτική άποψη ουσία, λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της. Επιπλέον, παρουσιάζει αντισπασμωδικές, αγχολυτικές, νευροπροστατευτικές και αντιβιοτικές ιδιότητές της (Alexander, 2016).



Εικόνα 2: Χημική δομή κανναβιδιόλης (CBD)

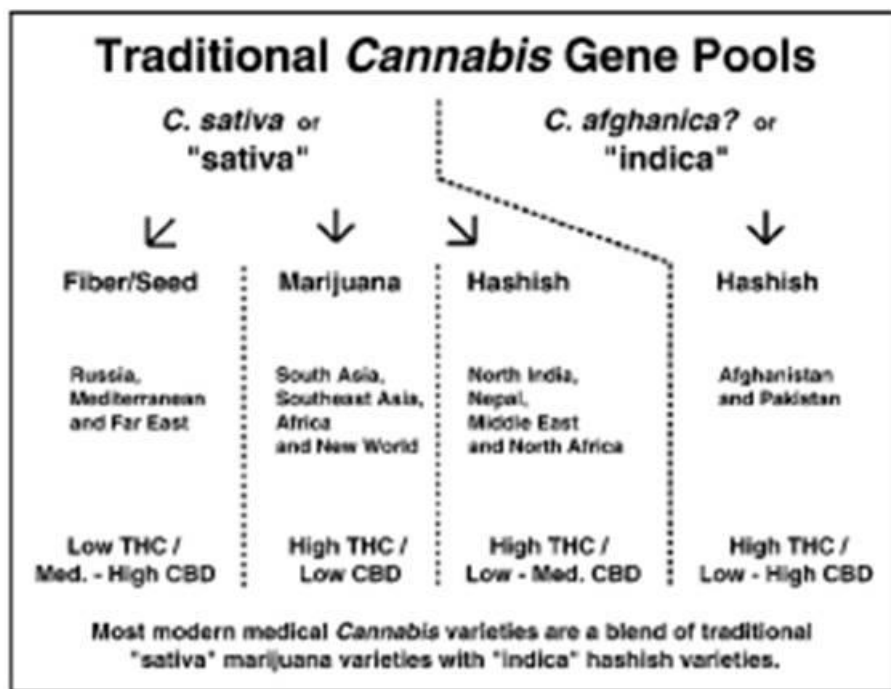


Εικόνα 3: Χημική δομή Δ9-τετραυδροκανναβινόλη (THC)

Η κανναβιδιόλη (CBD) συναντάται σε ποσοστό 0,5-2 % στο πάνω 1/3 του φυτού και έχει μελετηθεί για τη θεραπευτική της δράση σε καρκίνο, διαβήτη, Αλτσχάιμερ, επιληψία κλπ. Η αναλογία THC/CBD χρησιμοποιείται για χαρακτηρισμό της κάνναβης σε φαρμακευτική ή όχι (Mechtler et al., 2004).

Η THC και η CBD είναι οι ουσίες που αναφέρονται σε μελέτες για τις φαρμακευτικές τους δράσεις. Η συγκέντρωση της THC καθορίζει την δραστικότητα της κάνναβης, άλλα σε τελευταίες έρευνες τα επίπεδα της CBD φαίνεται να παίζουν επίσης ρόλο (Lafaye et al., 2017).

Η *C.sativa* περιέχει υψηλότερη ποσότητα THC παρότι CBD, παράγοντας πιο διεργετικά αποτελέσματα, αντίθετα η *C.indica* περιέχει υψηλότερη ποσότητα CBD έχοντας έτσι πιο καταπραυντική δράση. Η ευρωπαϊκή *C.sativa* έχει αυξημένη ποσότητα CBD από ότι THC σε σχέση με την ασιατική *indica*, όπου κυριαρχεί η THC (McPartland, 2018).



Εικόνα 4: Διαφορές *C. sativa* και *C. indica* (Elsohly, 2007)

Όπως φαίνεται παραπάνω (**Εικ.4**) υπάρχουν διαφορές στις ποσότητες CBD και THC ανάμεσα σε *sativa* και *indica*. Αναλυτικότερα, οι σπόροι της *sativa*, που καλλιεργούνται στη Ρωσία, τη μεσόγειο και τη δύση παρουσιάζουν μέτρια έως και υψηλή συγκέντρωση CBD και χαμηλή ποσότητα THC. Στη νότια Ασία και στην Αφρική οι καλλιέργειες είναι πλούσιες σε THC και παρουσιάζουν μειωμένες ποσότητες CBD ενώ στη βόρεια Ινδία, το Νεπάλ και τη βόρεια Αφρική διατηρούν τη χαμηλή συγκέντρωση THC ενώ παρουσιάζουν μέτρια ποσότητα σε CBD. Το είδος *indica* που καλλιεργείται στο Πακιστάν και στο Αβγανιστάν είναι πλούσιο σε THC και ποσότητα CBD ποικίλλει.

Η κάνναβη χρησιμοποιείται στις μέρες μας τόσο για ιατρικούς λόγους όσο και ως ναρκωτική ουσία. Συχνά, η κάνναβη χαρακτηρίζεται λανθασμένα ως ναρκωτικό για λόγους που δεν σχετίζονται με τις φαρμακολογικές της ιδιότητες και τη δομή της.

Για νομικούς λόγους, σύμφωνα με τη Σύμβαση των Ναρκωτικών του ΟΗΕ επιτρέπεται η καλλιέργεια της κάνναβης της οποίας τα στελέχη έχουν ελάχιστα ποσότητα τετραυδροκανναβινόλης (THC), που είναι το κύριο συστατικό των ψυχοδραστικών ουσιών (Erowid.org, 2006).

Η THC σε μικρές δόσεις προκαλεί ηρεμία και ελαφρύ ύπνο με όνειρα που συνοδεύεται από ευχάριστη αφύπνιση, άρα παίζει το ρόλο του ηρεμιστικού. Σε μεγαλύτερες δόσεις προκαλεί ευφορία και σε ακόμα μεγαλύτερες δόσεις προκαλεί φαινόμενα διεύρυνσης της συνείδησης παρόμοια με αυτά των ψυχεδελικών ουσιών. Όταν οι δόσεις αυξηθούν ακόμα περισσότερο προκαλεί αναισθησία και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε κόμα ή θάνατο. Τέλος, είναι αποδεκτή η άποψη ότι η κάνναβη δεν είναι ναρκωτικό και μπορεί να ορισθεί και να καταχωρηθεί ως μια μοναδική και ιδιαίτερη ψυχοδραστική ουσία (Marselos,1997).

A.5 Καλλιέργεια κλωστικής κάνναβης (*C.sativa* L.)

Η κλωστική κάνναβη είναι ένα ετήσιο φυτό εαρινής σποράς η οποία απαιτεί καλά στραγγιζόμενα εδάφη πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία και υγρασία. Η καλλιέργεια της κλωστικής κάνναβης μπορεί να γίνει με μειωμένη χρήση ζιζανιοκτόνων, γιατί λόγω της γρήγορης και μεγάλης ανάπτυξης των φυτών, παρέχουν σκίαση και άρα ανταγωνισμό στα ζιζάνια (Struik, et al., 2000). Λόγω του ριζικού της συστήματος που φτάνει σε μεγάλο βάθος βοηθάει στη βελτίωση της δομής των εδαφών και ενδείκνυται για χρήση σε αμειψισπορά (Piotrowski and Carus, 2011). Σύμφωνα με τους Montford and Small το 1999, η καλλιέργεια κάνναβης είτε για παραγωγή ινών είτε για παραγωγή σπόρων συμβάλει θετικά στην αύξηση της βιοποικιλότητας και είναι μάλιστα στις πέντε πρώτες θέσεις από είκοσι τρεις καλλιέργειες.

Το 2015 στην Ευρώπη η συνολική καλλιεργούμενη έκταση κλωστικής κάνναβης έφτασε τα 252.240 στρέμματα με κύρια χώρα καλλιέργειας τη Γαλλία στην οποία καλλιεργείται σχεδόν το 50% της προαναφερόμενης έκτασης. Το 2014 η καλλιεργούμενη έκταση ήταν 175.230 στρέμματα, ενώ το 2011 ήταν 80.000 στρέμματα.

Πίνακας 2: Καλλιεργούμενη έκταση κάνναβης στην Ευρώπη 2015(www.eiha.org)

Χώρα	Έκταση (ha)
Γαλλία	11450
Λιθουανία	2367
Ιταλία	2070
Ολλανδία	1842
Κροατία	1600
Γερμανία	1486
Ρουμανία	817
Φινλανδία	740
Σλοβενία	500
Τσεχία	480
Ουκρανία	400
Πολωνία	380
Αυστρία	367
Δανία	273
Σλοβακία	146
Ισπανία	122
Ουγγαρία	96
Σερβία	60
Λετονία	23
Πορτογαλία	5
Σύνολο	25224

Η κλωστική κάνναβη ευδοκμεί σε όλα τα εδάφη αλλά είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε βαριά, κορεσμένα εδάφη και εδάφη με $pH < 6$ πρέπει να αποφεύγονται. Η σπορά της πραγματοποιείται από τα μέσα Μαρτίου και μετά, όταν η θερμοκρασία εδάφους είναι 12-14°C και όχι χαμηλότερη από 6-8 °C (Amaducci et al., 2014).

Η κλωστική κάνναβη είναι πολύ ευαίσθητη στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η διάρκεια ημέρας και η θερμοκρασία, για αυτό το λόγο και οι ποικιλίες που δημιουργούνται στοχεύουν σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η επιλογή της ποικιλίας εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής και τη χρήση του τελικού προϊόντος. Ποικιλίες που προέρχονται από τις βόρειες περιοχές της Ευρώπης, ανθίζουν πρωιμότερα όταν καλλιεργηθούν σε νοτιότερες περιοχές πχ. Μεσόγειος (Angelini et al. 2016) για αυτό το λόγο και στη νότια Ευρώπη προτιμούνται όψιμες ποικιλίες. Κύριοι στόχοι της βελτίωσης στη κλωστική κάνναβη είναι η δημιουργία πρώιμων ποικιλιών με χαμηλή περιεκτικότητα σε THC και υψηλή απόδοση σε ίνες, χωρίς να παραβλέπεται η αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες (Salentijn et al., 2015).

Λίπανση: Η κλωστική κάνναβη απαιτεί παρόμοια σύσταση εδάφους όπως και τα σιτηρά.

Ζιζανιοκτονία: Η καλλιέργεια κλωστικής κάνναβης με αριθμό φυτών 200-250 / m² ανταγωνίζεται επαρκώς τα ζιζάνια λόγω της γρήγορης ανάπτυξης, αλλά αν η σπορά γίνει αραιότερα εμφανίζεται σημαντικός αριθμός ζιζανίων ανάλογα βέβαια και με τις προϋπάρχουσες καλλιέργειες (BCMAF,1999). Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της η κλωστική κάνναβη δεν είναι ανθεκτική στα χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα (Piotrowski and Carus, 2011).

Σπορά: Κατά τη σπορά, συνήθως για παραγωγή ίνας χρησιμοποιούνται 5 Kg/στρ σε βάθος 2 cm. Η σπορά γίνεται με τη χρήση μηχανών σποράς σιτηρών σε αποστάσεις γραμμών 14-16 cm. Η πυκνή σπορά επιβάλλεται στην περίπτωση παραγωγής ινών, για να δημιουργηθούν μονοστέλεχα φυτά. Ο επιδιωκόμενος αριθμός φυτών είναι 200.000-250.000 φυτά/στρέμμα. Η βλάστηση του σπόρου πραγματοποιείται 6-8 ημέρες μετά τη σπορά και το φυτό σε ένα μήνα έχει φτάσει ύψος 60 cm.

Άρδευση: Η βιομηχανική κάνναβη είναι φυτό απαιτητικό σε υγρασία. Ο αριθμός των ποτισμάτων εξαρτάται από τις επικρατούσες συνθήκες της περιοχής καλλιέργειας. Στη φάση μεταξύ της άνθησης και της ωρίμανσης του σπόρου, οι ανάγκες του φυτού φτάνουν το 50% των συνολικών αναγκών του φυτού σε νερό. Στα δίοικα φυτά η αρσενική ταξιανθία είναι αραιή και εμφανίζεται πιο νωρίς από τις θηλυκές ενώ η θηλυκή ταξιανθία είναι πιο ογκώδης, συμπαγής και φυλλώδης και παράγει τα κανναβινοειδή.

Συγκομιδή: Η συγκομιδή για παραγωγή ίνας ξεκινάει το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Αυγούστου, περίπου 100 ημέρες μετά την σπορά, με τη κοπή των στελεχών. Σε περίπτωση που η καλλιέργεια γίνεται για τη παραγωγή σπόρου, η συγκομιδή πραγματοποιείται περίπου 150 ημέρες μετά τη σπορά, όταν έχει ωριμάσει > 60% του σπόρου και η συγκομιδή πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά κόβεται προσεκτικά το πάνω μέρος του φυτού περίπου 30 cm., για να μη τιναχτεί ο σπόρος και στη συνέχεια τα στελέχη (Jonaitiene et al., 2016).



Εικόνα 5: Ανθισμένα αρσενικά άνθη

Σύμφωνα με τον κανονισμό της ΕΕ 809/2014 ορίζεται ότι ανά αγρό και ανα κάθε μόνοικη ποικιλία το δείγμα πρέπει να αποτελείται από 50 μέρη φυτών μήκους 30 cm., το οποίο περιλαμβάνει τουλάχιστον μία θηλυκή ταξιανθία. Τα δείγματα συλλέγονται μεταξύ 20 ημερών μετά την έναρξη της ανθοφορίας και 10 ημερών μετά το τέλος της, στη διάρκεια της ημέρας, με βάση συστηματικό σχήμα, ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό του αγρού, αποκλείοντας τα άκρα της καλλιέργειας. Σε δίοικες ποικιλίες λαμβάνονται δείγματα μόνο από θηλυκά φυτά. Κάθε δείγμα τοποθετείται, χωρίς να συνθλίβεται σε υφασμάτινο ή χάρτινο σάκο. Τα δείγματα ξηραίνονται κάτω από 70°C και μέχρι υγρασίας 8-13%, μέσα σε 48h από τη συλλογή τους (**Εικ.6**).



Εικόνα 6: Ξήρανση ταξιανθιών κλωστικής κάνναβης

A.6 Νομοθετικό πλαίσιο

Σε πρόσφατο άρθρο αναφέρονται κάποιοι τύποι κανναβινοειδών φαρμάκων που χορηγούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά. Για παράδειγμα, ορισμένα φαρμακευτικά σκευάσματα που προέρχονται από το φυτό της κάνναβης όπως , τα Dronabinol, Nabilone (χρησιμοποιούνται σε θεραπείες κατά τη ναυτία και εμετό μετά τη χημειοθεραπεία, όπως επίσης και στην απώλεια όρεξης σε ασθενείς με επίκτητα σύνδρομα ανοσολογικής ανεπάρκειας) και το Nabiximols (Borgelt et al., 2013). Σήμερα, σε 29 Πολιτείες και σε περιοχές της Κολομβίας έχει νομιμοποιηθεί η χρήση της φαρμακευτικής κάνναβης, ενώ σε ακόμα 16κράτη επιτρέπεται η χρήση της CBD για συγκεκριμένους τύπους ασθενειών. Παρόλο που, η πλειοψηφία του πληθυσμού τάσσεται υπέρ της νομιμοποίησης της κάνναβης υπάρχει μεγάλη αβεβαιότητα γύρω από το θέμα της ασφάλεια και μακροχρόνιας χρήσης σε ασθενείς.

Στην Ευρώπη έχουν αρχίσει βήματα προς την ανοχή της ιατρικής κάνναβης και των χρηστών της. Σε ορισμένες χώρες διώκεται ακόμα ποινικά, σε άλλες όμως θεωρείται απλώς παράβαση και επιβολή προστίμου. Στην Ασία η Κίνα έχει ήδη κάνει βήματα για την παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων αλλά και άλλα είδη που έχουν ως βάση την κάνναβη. Ωστόσο, η χρήση της κάνναβης θεωρείται παράνομη και τιμωρείται πολύ σκληρά σε κάποιες χώρες ακόμα και σήμερα. Η Αυστραλία δείχνει μία πολύ προοδευτική στάση.

✓ Η κάνναβη στον Ελλαδικό χώρο

Στον Ελλαδικό χώρο το θέμα της χρήσης της φαρμακευτικής κάνναβης έχει κάνει σημαντικά βήματα. Επιπρόσθετα, οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στον ελλαδικό χώρο αφορούν την κάνναβη ως ναρκωτική ουσία ή την υπόθεση για σύνδεσή της με σχιζοφρένεια και άλλους παράγοντες κινδύνου. Το καλοκαίρι του 2018 δημοσιεύτηκε ΦΕΚ στο οποίο αναγράφονται αναλυτικά ποια προϊόντα και συστατικά είναι αυτά τα οποία εγκρίνονται και νομιμοποιούνται προς χρήση (συστατικά, δοσολογίες, εγκεκριμένες ποικιλίες), οι προϋποθέσεις για την παραγωγή τους, την εισαγωγή στην ελληνική αγορά και την εξαγωγή τους στο εξωτερικό (Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, 2018). Επίσης, αναφέρεται ότι η έγκριση κυκλοφορίας φαρμακευτικής κάνναβης διαρκεί τρία έτη (μετά θα πρέπει να ανανεώνεται). Το τελικό προϊόν θα πρέπει να περάσει από διαδικασία αξιολόγησης

κατά την οποία θα αναλυθούν ενεργά συστατικά και πιθανές επιπτώσεις. Οι δικαιούχοι της έγκρισης κυκλοφορίας περιγράφονται επίσης στον ίδιο νόμο. Ωστόσο, το άρθρο 12 απαγορεύει ρητά τη διαφήμιση του τελικού προϊόντος φαρμακευτικής κάνναβης και στο άρθρο 13, ο κάτοχος είναι υποχρεωμένος να καταγράφει και να αναφέρει πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες που προκλήθηκαν από τη χρήση φαρμακευτικής κάνναβης. Τέλος, αναφέρονται σε πιθανές κυρώσεις, παραβάσεις και διοικητικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β :

ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

B.1 Αιθέρια έλαια

Είναι μίγματα πτητικών συστατικών προερχόμενα συνήθως από φυτική πηγή, με χαρακτηριστική οσμή και γεύση, ελαιώδους συστάσεως, διαλυτά σε λίπη & έλαια, οργανικούς διαλύτες, αδιάλυτα στο νερό. Συγκεκριμένα, περιέχουν πτητικά συστατικά κατά 85-99%, τα οποία είναι ένα μείγμα από τερπενικές, τερπενοειδείς και άλλες αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις. Οι ιδιότητες διαλυτότητας τα έκαναν να ορίζονται ως έλαια και η αρωματική τους ιδιότητα ως αιθέρια. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι υγρά και διαφέρουν με τα λίπη και έλαια, τόσο στις φυσικές όσο και στις χημικές τους ιδιότητες. Έχουν υψηλό δείκτη διάθλασης και είναι οπτικώς ενεργά, ιδιότητες που χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό τους έλεγχο.

Τα αιθέρια έλαια μπορούν να αποθηκευτούν σε οποιοδήποτε φυτικό όργανο: άνθη, φύλλα, φλοιός, ρίζωμα, καρποί, ξύλο και σπέρματα. Βρίσκονται σε ειδικές μονάδες που αποτελούν και τα ανατομικά χαρακτηριστικά του είδους ή ακόμα και του γένους.

Τα συστατικά του είναι υπεύθυνα για την χαρακτηριστική οσμή και γεύση του αιθερίου ελαίου και έχουν μια ελάχιστη διαλυτότητα στο νερό. Για το άρωμα του κάθε αιθερίου ελαίου ισχύει ότι αυτό είναι η συνισταμένη όλων των συστατικών του, από τα οποία μερικά παίζουν σημαντικό ρόλο στον τελικό τόνο αυτού. Κατά συνέπεια, η παρουσία ενός συστατικού στα αιθέρια έλαια σε αναλογία 1% ή μικρότερη προσδίδει σ' αυτό, το χαρακτηριστικό άρωμα (Simon, 1990).

Αναφερόμενοι στο ίδιο φυτό, η σύσταση του αιθερίου ελαίου του μπορεί να ποικίλλει σε πολύ μεγάλο βαθμό, ανάλογα με τον χημειότυπο (Σκαλτσά, 2016).

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων των αρωματικών φυτών (χημική ποικιλότητα) σχετίζεται με το περιβάλλον στο οποίο φύονται τα φυτά και συνδέεται συνήθως με κάποιο μορφολογικό χαρακτηριστικό.

Μεγάλος βαθμός ποικιλότητας έχει καταγραφεί στους αυτοφυείς πληθυσμούς των αρωματικών φυτών ανάλογα με την περιοχή εξάπλωσής τους. Είναι δυνατό η ποιοτική και ποσοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου ενός φυτικού είδους να είναι

τόσο χαρακτηριστική που να χρησιμοποιηθεί για ταξινόμηση τόσο ως προς το είδος όσο και ως προς το υποείδος. Παράλληλα, με τον όρο βιοσύνθεση νοείται η σύνθεση χημικών ουσιών που γίνεται από τους ζωντανούς οργανισμούς. Ειδικότερα, η βιοσύνθεση των τερπενίων είναι μια σειρά διαφόρων χημικών αντιδράσεων που γίνονται μέσα στους φυτικούς ιστούς, μέχρι το τελικό τους αποτέλεσμα. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από βιοσυνθετικές πορείες οι οποίες αποτελούν μια προέκταση του πρωτογενούς μεταβολισμού και εμπλέκονται σε μια σειρά από λειτουργίες όπως την άμυνα των φυτών έναντι των παθογόνων φυτοφάγων μικροοργανισμών, την αντιμετώπιση αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης, την αναπαραγωγή μέσω προσέλκυσης επικονιαστών, αλλά και την διασπορά των σπερμάτων και την αλληλοπάθεια.

Η βασική εκμετάλλευση των αιθέριων ελαίων είναι η αρωματοποιία, η κοσμητολογία και η βιομηχανία τροφίμων για την γεύση και την οσμή τους.

B.1.1 Σύσταση αιθερίων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και δεν έχουν καμία σχέση με τα λίπη και τα έλαια. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων διακρίνονται σε τερπενικούς και μη τερπενικούς υδρογονάνθρακες. Από χημικής πλευράς, τα συστατικά των αιθερίων ελαίων χωρίζονται σε δυο κατηγορίες σε οξυγονούχα και μη οξυγονούχα. Στα οξυγονούχα συστατικά ανήκουν οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες, οι κετόνες, οι φαινόλες, τα οξέα και οι εστέρες που συμβάλλουν στο άρωμα των αιθερίων ελαίων, ενώ στα μη οξυγονούχα ανήκουν οι υδατάνθρακες, μονοκυκλικά και δίκυκλα τερπένια. Κάποια αιθέρια έλαια περιέχουν ακόμα θειικές, νιτρικές ενώσεις και κουμαρίνες. Η χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων μπορεί να διαφέρει στα επιμέρους όργανα του ίδιου φυτού (Pierozan et al.,2009).

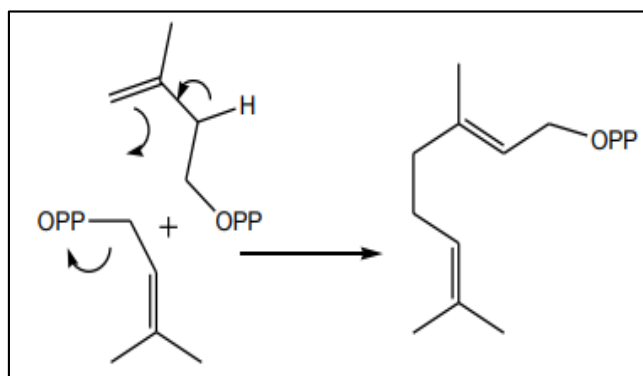
Μη τερπενικοί υδρογονάνθρακες:

Οι μη τερπενικοί υδρογονάνθρακες είναι αλκάνια ή αλκένια με μικρό αριθμό ατόμων ανθράκα ή αλκοόλες και αλδεΐδες που προέκυψαν ως προϊόντα μεταβολισμού ή αποικοδόμησης των λιπαρών οξέων.

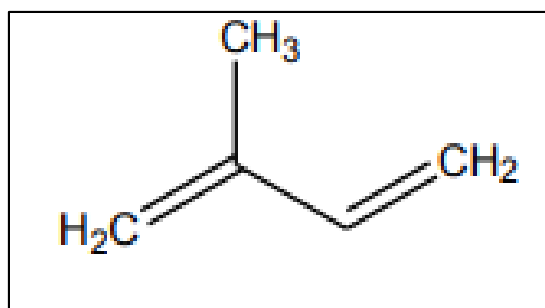
Τερπενοειδή:

Τα τερπένια είναι μια από τις μεγαλύτερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Η σύνθεσή τους είναι αποτέλεσμα φυσικών ενζυματικών αντιδράσεων. Η δομή τους προκύπτει από τη συνένωση κεφαλής-ουράς μονάδων ισοπρενίου. Περισσότερα από 300.000 τερπενοειδή έχουν απομονωθεί από φυτά, μικροοργανισμούς και ζώα.

Η δομή των τερπενίων προκύπτει από την συνένωση κεφαλής-ουράς μονάδων ισοπρενίου και η αρχικά σχηματιζόμενη δομή μπορεί στη συνέχεια με διάφορες ενζυματικές πορείες να διαφοροποιηθεί και να δημιουργήσει μια ποικιλία σκελετών με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα (**Εικ.7**) (κανόνας ισοπρενίου, L.Ruzicka,1953).



Εικόνα 7: Βιοσύνθεση τερπενίων



Εικόνα 8: Χημική δομή ισοπρενίου

Τα τερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων τους, έτσι τα μονοτερπένια είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα που συντίθενται από 2 μονάδες ισοπρενίου, τα σεσκιτερπένια ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα που

προκύπτουν από 3 μονάδες ισοπρενίου κτλ. (Πίνακας 3). Τα μονο- και σεσκιτερπένια απαντούν συνήθως στα φυτά, ενώ υψηλότερης τάξης τερπένια υπάρχουν στα ζώα και παρουσιάζουν αξιόλογη βιολογική δραστηριότητα (Ιγνατιάδου, 2009).

Πίνακας 3: Ταξινόμηση τερπενίων

<i>Αριθμός ατόμων άνθρακα</i>	<i>Μονάδες ισοπρενίου</i>	<i>Ταξινόμηση</i>
10	2	Μονοτερπένιο
15	3	Σεσκιτερπένιο
20	4	Διτερπένιο
25	5	Σεστερτερπένιο
30	6	Τριτερπένιο
40	7	Τετρατερπένιο

B.1.2 Παραλαβή πτητικών συστατικών

Μετά την συγκομιδή του φυτικού υλικού ακολουθεί η συντήρησή του. Η συνηθέστερη μέθοδος είναι η ξήρανση ή αφυδάτωση. Η ξήρανση πρέπει να γίνει γρήγορα και απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες και άμεση και αποτελεσματική απομάκρυνση των υδρατμών, για την αποφυγή του κινδύνου της αναπύξης μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να καταστρέψουν σημαντική ποσότητα του φυτικού υλικού (Σταμούλης, 1992).

Οι κυριότερες μέθοδοι ξήρανσης είναι :

α) ξήρανση με έκθεση στον αέρα

β) ξήρανση με θέρμανση (με χρήση ξηραντήρων)

γ) λυοφιλίωση (κρυοαφυδάτωση). Είναι η πιο ήπια μέθοδος. Το φυτικό υλικό καταψύχεται, έτσι ώστε το νερό περνά από υγρή σε στερεή κατάσταση (πάγος) και τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή που λειτουργεί κάτω από κενό, η επιφάνεια της οποίας διατηρείται σε θερμοκρασία -60 έως -70°C . Στην συνέχεια ο πάγος εξαχνώνεται (περνά στην αέρια κατάσταση, υδρατμοί) χωρίς να περάσει από την υγρή. Έτσι, οι υδρατμοί από το κατεψυγμένο φυτικό υλικό μεταφέρονται γρήγορα στην ψυχρή επιφάνεια, με αποτέλεσμα το φυτικό υλικό να ξηραθεί (Υψηλάντης, 2008).

Ο τρόπος παραλαβής των αιθέριων ελαίων από τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους :

α) την απόσταξη

β) την εκχύλιση

γ) την μηχανική παραλαβή.

Διεθνώς ως αιθέριο έλαιο ορίζεται το προϊόν παραλαβής με απόσταξη με ατμό, υδροαπόσταξη, ή έκθλιψη του φυτού ή μέρους του φυτού (Bicchi,2000).

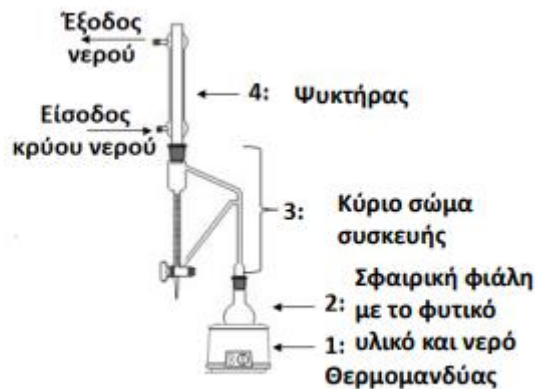
B.1.2.1 Απόσταξη

➤ Υδροαπόσταξη (hydrodistillation)

Η απόσταξη είναι η πιο απλή και συνήθης μέθοδος παραλαβής των αιθέριων ελαίων. Βασίζεται στη διαφορά σημείου ζέσεως των συστατικών ενός διαλύματος. Αναφέρεται ότι η τουρπενίνη και η καμφορά είναι τα πρώτα συστατικά αιθέριου ελαίου που απομονώθηκαν με απόσταξη στην Ελλάδα από τον Ηρόδοτο μεταξύ 484-425π.χ. (E.Hernandez,2000).

Η συσκευή της υδροαπόσταξης Clevenger, πήρε το όνομα της από τον Clevenger που την σχεδίασε το 1928. Το φυτικό υλικό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό. Όταν αρχίσει ο βρασμός οι υδρατμοί συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και το αιθέριο έλαιο συλλέγεται στο διαβαθμισμένο σωλήνα (**Εικ.9**). Χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι το φυτικό υλικό έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό (Καλλαιτζάκης, 1995).

Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση των συστατικών του αιθέριου ελαίου. Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν ο μεγάλος χρόνος διάρκειας, η μικρή απόδοση σε έλαιο και η παραλαβή κατώτερης ποιότητας αιθέριου ελαίου.



Εικόνα 9: Συσκευή Clevenger

- **Υδρο-ατμό απόσταξη (water and steam distillation).** Σε αυτή τη μέθοδο το φυτικό υλικό δεν έρχεται σε επαφή με το νερό, αλλά τοποθετείται σε πλέγμα που βρίσκεται πιο ψηλά από την επιφάνεια του νερού. Ο ατμός που σχηματίζεται από την θέρμανση του νερού, έρχεται σε επαφή με τη μάζα του φυτικού υλικού και παρασύρει το αιθέριο έλαιο.
- **Απόσταξη με υδρατμούς του νεπού φυτικού υλικού (steam distillation).** Τα πλεονεκτήματα της είναι η παραλαβή καλής ποιότητας αιθέριου ελαίου, η ικανότητα απόσταξης μεγάλων ποσοτήτων απ' όλα σχεδόν τα αρωματικά φυτά, εκτός από τα άνθη και τα κονιοποιημένα υλικά.

B.1.2.2 Εκχύλιση

Η εκχύλιση χρησιμοποιείται για τη παραλαβή αιθέριων ελαίων από φυτικά υλικά που θεωρούνται ευπαθή στην απόσταξη. Παραλαμβάνονται τα πτητικά και μη πτητικά λιπόφιλα συστατικά. Χρησιμοποιούνται πτητικοί διαλύτες κατά την εκχύλιση. Η αρχή της εκχύλισης στηρίζεται στην ισορροπία συγκεντρώσεων του προς εκχύλιση συστατικού στο δείγμα και στο εκχυλιστικό μέσο σε ορισμένη θερμοκρασία, η οποία είναι ανεξάρτητη από τη συνολική ποσότητα του συστατικού. Σε κατάσταση ισορροπίας ο συντελεστής κατανομής K της ουσίας για ορισμένη θερμοκρασία ισούται με το λόγο των συγκεντρώσεων C (η συγκέντρωση του συστατικού στο δείγμα) και C (η συγκέντρωση του συστατικού στο εκχυλιστικό μέσο).

B.1.2.3 Μηχανική παραλαβή

Κατά την μέθοδο μηχανικής παραλαβής τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται μόνο με μηχανικά μέσα. Η παραλαβή γίνεται με συμπίεση ή σύνθλιψη του φυτικού υλικού. Το εκ πίεσεως λαμβανόμενο υγρό είναι γαλάκτωμα ελαίου σε νερό και το αιθέριο έλαιο παραλαμβάνεται με φυγοκέντρωση. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως για την παραλαβή ελαίων των καρπών του γένους *Citrus* τα οποία είναι ιδιαίτερος ευπαθή σε υδρόλυση και οξείδωση. Η χρησιμοποίηση μηχανικών μέσων (σύνθλιψη, έκθλιψη, κλπ.) γίνεται κατά την παραλαβή αιθέριων ελαίων από ξηρούς καρπούς ή από το φλοιό των εσπεριδοειδών. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν ειδικά μηχανήματα ή πιεστήρια που μοιάζουν με τα ελαιοτριβεία.

B.1.3 Σύγχρονες μέθοδοι παραλαβής πτητικών συστατικών

Η επιλογή της διαδικασίας που θα ακολουθηθεί για την εξαγωγή του αιθερίου ελαίου εξαρτάται από το είδος του φυτού, το τμήμα αυτού, την περιεκτικότητα και την ποιότητα του φυτού σε αιθέριο έλαιο.

Τελευταία έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων πτητικών συστατικών αιθερίων ελαίων. Τέτοιες είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase microextraction, SPME), η ταυτόχρονη απόσταξη-εκχύλιση (simultaneous distillation-extraction, SDE), η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (supercritical fluid extraction, SFE), η εκχύλιση με μικροκύματα (microwave assisted extraction, MAE), η εκχύλιση με μικροκύματα χωρίς τη χρήση διαλύτη (solvent free microwave extraction, SFME), η εκχύλιση με υπερήχους (ultrasonic extraction) (Luque de Castro et al.,1999).

B.1.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών συστατικών από αιθέρια έλαια

Το αιθέριο έλαιο που προκύπτει με κάποια από τις παραπάνω μεθόδους αποτελεί μίγμα πολλών και διαφορετικών συστατικών με αποτέλεσμα να είναι συχνά αναγκαίος ο διαχωρισμός τους ή και η ταυτοποίησή τους. Η ανάλυση των αιθερίων ελαίων επιτυγχάνεται κυρίως με εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography-Mass Spectrometry,GC-MS) καθώς και με άλλες χρωματογραφικές μεθόδους (Burt,2004). Η χρωματογραφία αποτελεί

σημαντική μέθοδο διαχωρισμού και απομόνωσης οργανικών ενώσεων από μείγμα αυτών και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον βοτανολόγο Tswett το 1903 για τον διαχωρισμό μείγματος χρωστικών μετά την εκχύλιση φύλλων (Σακκάς, 2007)

B.1.5 Πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου *C.sativa* L.

Οι κύριες ενώσεις που συναντώνται στις ταξιανθίες της κάνναβης *C.sativa* L. είναι η Δ9-τετραυδροκανναβινόλη (THC) και η κανναβιδιόλη (CBD). Εκτός από αυτές τις ουσίες στην κάνναβη υπάρχουν και πτητικά συστατικά. Τα τερπένια ευθύνονται για το χαρακτηριστικό άρωμα του φυτού. Τα κύρια πτητικά που ανιχνεύονται στα εναέρια μέρη του φυτού περιλαμβάνουν τόσο τα μονο- όσο και τα σесκιτερπένια (Ross et al.1996), με το β-καριοφυλλένιο και το α-χουμουλένιο ως τις πλέον αντιπροσωπευτικές ενώσεις. Σχετικά με τα μονοτερπένια, κυριαρχούν το α-πινένιο και το β-μυρκένιο, το οποίο είναι γνωστό ότι κατέχει αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αγχολυτικές ιδιότητες. Αναφορικά με τα σесκιτερπένια, βρέθηκε ότι το β-καρφοφυλλένιο είναι ένας αντιφλεγμονώδης παράγοντας και έχει αποδειχθεί επίσης ότι είναι ικανό να δεσμεύεται στους υποδοχείς κανναβινοειδών τύπου 2 (CB2R) (Andre et al.,2016).

B.2 Κανναβινοειδή

Με τον όρο κανναβινοειδή αναφέρονται οι φαινολικές ουσίες που απομονώνονται από *C.sativa* L. που εμφανίζουν τον τυπικό τερπενοφαινολικό σκελετό C21, αλλά και στα παράγωγά τους. Συνολικά έχουν απομονωθεί 104 κανναβινοειδή μέχρι σήμερα τα κυριότερα των οποίων είναι η Δ9-τετραυδροκανναβινόλη (Δ9-THC) και η κανναβιδιόλη (CBD).

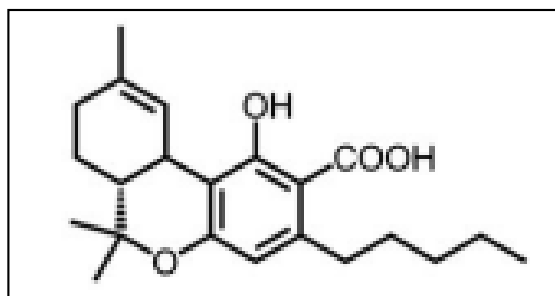
Πίνακας 4: Φαινολικά συστατικά που απομονώθηκαν από το φυτό της *C.sativa* L.

Chemical class	Number of compounds
Δ9-THC type	18
Δ8-THC type	2

CBG type	17
CBC type	8
CBD type	8
CBE type	5
CBL type	3
CBN type	10
CBT type	9
Misc type	22
Total cannabinoids	104
Total noncannabinoids	441
Total	545

B.2.1 Δ9-τετραυδροκανναβινόλη (Δ9-THC)

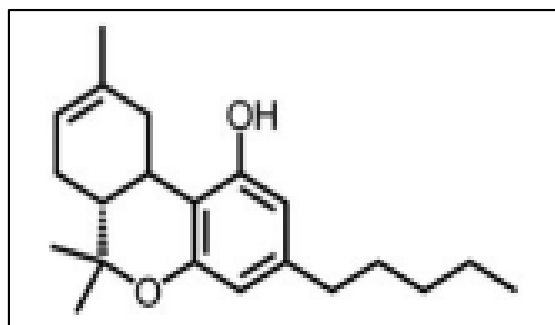
Η δομή της Δ9-τετραυδροκανναβινόλης (**Εικ.10**) αναφέρθηκε πρώτη φορά από τους Gaoni & Mechoulam το 1964 οι οποίοι όχι μόνο προσδιόρισαν την απόλυτη απεικόνιση της ως trans-(6aR,10aR), αλλά επίσης συζήτησαν και τις ψυχοτροπικές ιδιότητες του στο νευρικό σύστημα. Το 1970 οι Archer et al., ανέφεραν την λεπτομερή απεικόνιση του στο χώρο χρησιμοποιώντας ανάλυση ακτίνων X και NMR. Το αντίστοιχο οξύ (Δ9- THC οξύ A) απομονώθηκε από τους Korte et al., το 1965 από εκχύλισμα χασίς. Το καθαρό οξύ είναι ευαίσθητο στο φως και δεν ήταν ικανό να κρυσταλλοποιηθεί.



Εικόνα 10: Χημική δομή του οξέος της Δ9-τετραυδροκανναβινόλης (Δ9- THC οξύ)

B.2.2 Δ8-τετραυδροκανναβινόλη (Δ8-THC)

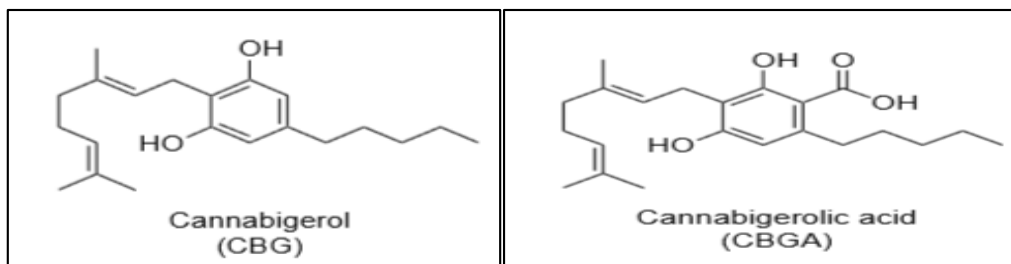
Τέτοιου είδους κανναβιοειδή έχουν απομονωθεί μόνο δύο μέχρι σήμερα, η Δ8-τετραυδροκανναβινόλη (Δ8-THC) και το Δ8-trans-τετραυδροκανναβινικό οξύ Α από τους Hanuth & Krenjci το 1975 από ποικιλία *C.sativa* της Τσεχίας και από τους Hiverly et al., το 1966 αντίστοιχα. Το 1970 οι Archer et al., δημοσίευσαν λεπτομερή δεδομένα NMR και ακτίνων X για το Δ8- THC.



Εικόνα 11: Χημική δομή Δ8-τετραυδροκανναβινόλης (Δ8-THC)

B.2.3 Κανναβιγερόλη (CBG)

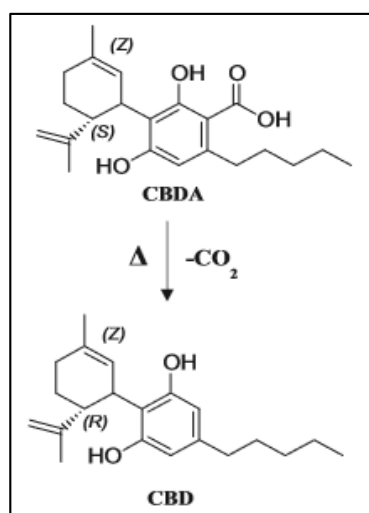
Η ένωση της κανναβιγερόλη ήταν η πρώτη ένωση που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή από ρητίνη κάνναβης. Οι Gaoni & Mechoulam το 1964 ήταν οι πρώτοι από απομόνωσαν την ένωση αυτή και ανέφεραν ότι παράγεται από συμπύκνωση του πυροφωσφορικού γερανυλίου με την ολιβετόλη. Το οξύ της κανναβιγερόλης με την επίδραση της θέρμανσης και του φωτός αποκαρβοξυλιώνεται και παράγει την κανναβιγερόλη.



Εικόνα 12: Χημική δομή κανναβιγέρολης (CBG) και κανναβιγερολικού οξέος (CBGA)

B.2.4 Κανναβιδιόλη (CBD)

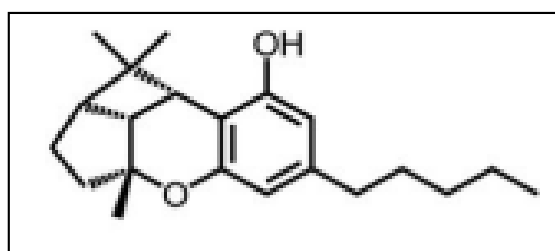
Η κανναβιδιόλη και το κανναβιδιολικό οξύ είναι οι κύριοι μεταβολίτες των μη ψυχοτρόπων ποικιλιών του *C.sativa* L. Οι Adams et al., το 1940 απομόνωσαν την κανναβιδιόλη ενώ οι Petrzilka et al., το 1969 ανέφεραν την σύνθεσή της και την απόλυτη απεικόνιση της ως (-)-trans-(1R,6R). Οι Krejci & Santavy το 1955 απομόνωσαν το αντίστοιχο οξύ, κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) ενώ το 1972 οι Shoyama et al., απομόνωσαν τον μεθυλεστέρα της κανναβιδιόλης (CBDM) από εκχυλίσματα αιθανόλης των φύλλων από ποικιλία κάνναβης . Το CBDA έχει αντιμικροβιακές και αντιναυτικές ιδιότητες (Alexander, 2016).



Εικόνα 13: Πορεία αποκαρβοξυλίωσης του κανναβιδιολικού οξέος

B.2.5 Κανναβικυκλόλη (CBL)

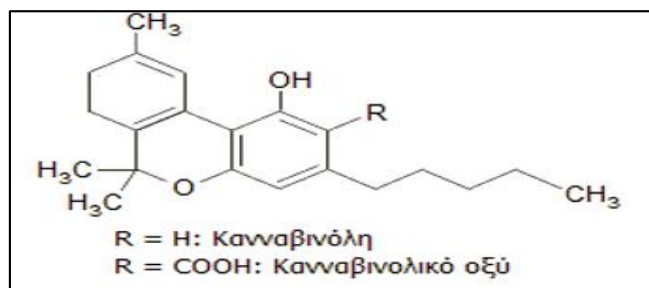
Η κανναβικυκλόλη (CBL), το κανναβικυκλολικό οξύ (CBLA) και η κανναβικυκλοβαβαρίνη (CBL-C3) είναι οι μοναδικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από αυτή την κατηγορία (Claussen et al.,1968, Korte and Sieper 1964, Mechoulam&Gaoni,1967, Shoyama et al., 1972). Συγκεκριμένα, η κανναβικυκλόλη ανιχνεύθηκε από τους Korte and Sieper 1964 με χρωματογραφία TLC από διάφορα δείγματα κάνναβης και χασίς.



Εικόνα 14: Χημική δομή κανναβικυκλόλης (CBL)

B.2.6 Κανναβινόλη (CBN)

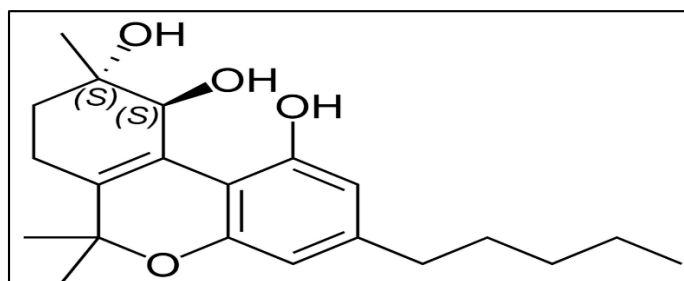
Η κανναβινόλη ταυτοποιήθηκε και ονομάστηκε για πρώτη φορά από τους Wood et al., το 1896. Το κανναβινικό οξύ CBNA απομονώθηκε από ένα ακατέργαστο όξινο κλάσμα χασίς το οποίο εστεροποιήθηκε και καθαρίστηκε σε μια στήλη silica gel από τους Mechoulam & Gaoni,1965.



Εικόνα 15: Χημική δομή κανναβινόλης και του οξέος της (CBN-CBNA)

B.2.7 Κανναβιτριόλη (CBT)

Οι Obata & Ishikawa το 1966 ανέφεραν την πρώτη απομόνωση της κανναβιτριόλης αλλά η χημική της δομή διασαφηνίστηκε από τον Chan et al., το 1976 και η στεreoχημεία της προσδιορίστηκε με ανάλυση ακτίνων X. Συνολικά έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα 9 κανναβινοειδή τύπου CBT.



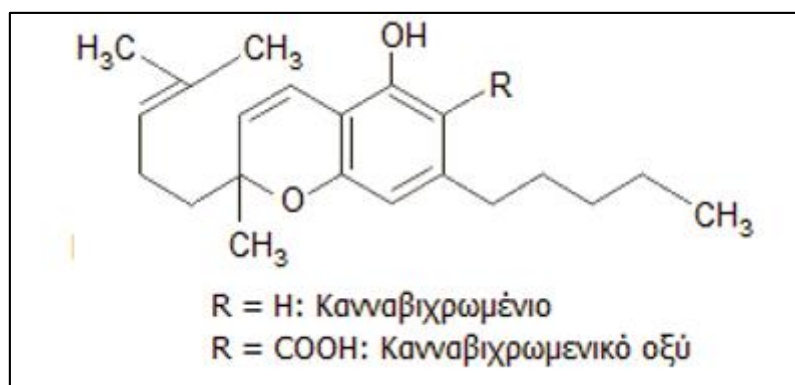
Εικόνα 16: Χημική δομή κανναβιτριόλη (CBT)

B.2.8 Κανναβιλιοσίνη (CBE)

Η κανναβιλιοσίνη ταυτοποιήθηκε από τους Bercht et al., 1973 από αιθανολικό εκχύλισμα *C. sativa* L. από το Λίβανο.

B.2.9 Κανναβιχρωμίνη (CBC)

Οι ερευνητικές ομάδες των Claussen et al., 1966 και Gaoni & Mechoulam, 1966 ανακάλυψαν ανεξάρτητα την κανναβιχρωμίνη. Οι Gaoni & Mechoulam το 1966 την απομόνωσαν από ένα εκχύλισμα εξανίου σε ποσοστό 1,5% και την ταυτοποίησαν με φασματοσκοπία NMR. Το 1977, οι Shoyama et al., απομόνωσαν το κανναβιχρωμικό οξύ (CBCVA) και η δομή του επιβεβαιώθηκε με μια σύνθεση.



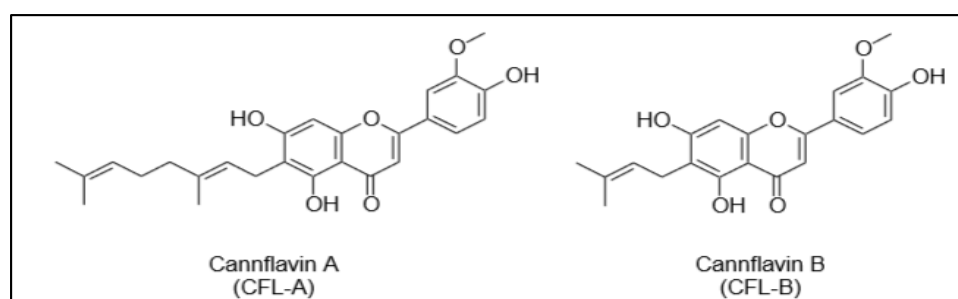
Εικόνα 17: Χημική δομή συστατικών τύπου κανναβιχρωμίνης (CBC)

B.3 Μη κανναβινοειδή

Εκατοντάδες μη κανναβινοειδή συστατικά που ανήκουν σε μια διαφορετική χημική κατηγορία έχουν αναγνωρισθεί και απομονωθεί από τη κάνναβη (Elsohly & Slade, 2005, Ross & Elsohly, 1995 & Turner et al., 1980). Από το 2005 έχουν αναφερθεί 22 μη κανναβινοειδή που ανήκουν σε οκτώ διαφορετικές χημικές κατηγορίες.

B.3.1 Φλαβονοειδή

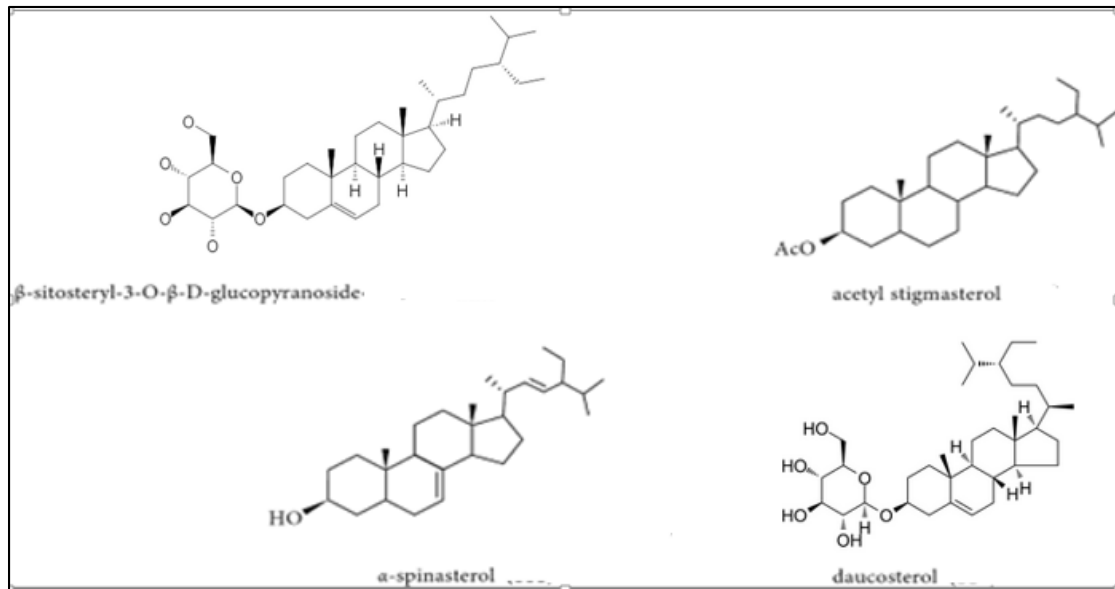
Από το 2005 έχουν αναφερθεί αρκετά νέα φλαβονοειδή. Συγκεκριμένα ο Radwan το 2008 απομόνωσε την κανφλαβίνη C, την χρυσοεόλη και την 6-πρενυλαπιγενίνη από δείγματα κάνναβης. Αρκετά από τα φλαβονοειδή που έχουν ταυτοποιηθεί, ανήκουν κυρίως σε φλαβόνες και φλαβονολές (Pollastro et al., 2018). Συγκεκριμένα, η κανφλαβίνη A και B αντιπροσωπεύουν κανναβιδικές μεθυλιωμένες ισοπρενοειδείς φλαβόνες (Pollastro et al., 2018). Αρκετές βιολογικές επιδράσεις έχουν αποδοθεί στα φλαβονοειδή κάνναβης, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών, νευροπροστατευτικών και αντιπολλαπλασιαστικών δραστηριοτήτων. Συγκεκριμένα, η κανφλαβίνη A και B είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση (Andre et al., 2016).



Εικόνα 18: Χημική δομή φλαβονοειδών του είδους *C. sativa* L.

B.3.2 Στεροειδή

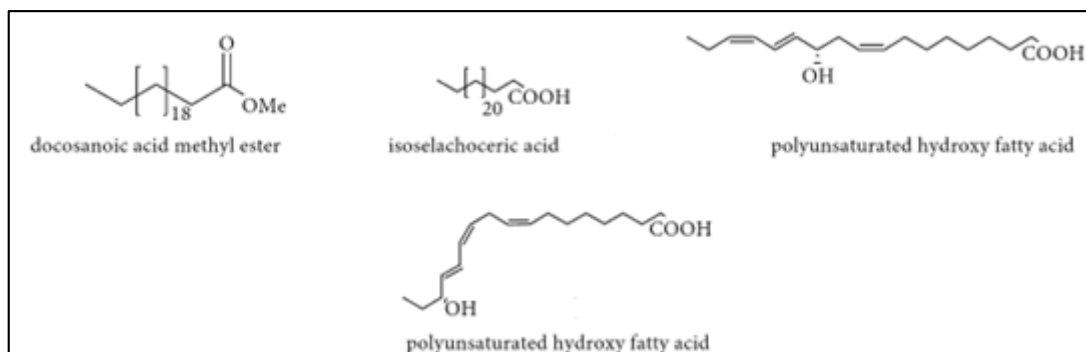
Συνολικά τέσσερα νέα στεροειδή έχουν αναφερθεί από το 2005. Οι Cheng et al., 2008 απομόνωσαν την ακετυλο σιγμαστερόλη και την α-σπινοστερόλη από δείγματα κάνναβης, ενώ η δαυκοστερόλη απομονώθηκε από τους καρπούς της κάνναβης το 2009 από τους Qian et al.



Εικόνα 19: Χημική δομή στεροειδών του είδους *C. sativa* L.

B.3.3 Λιπαρά οξέα

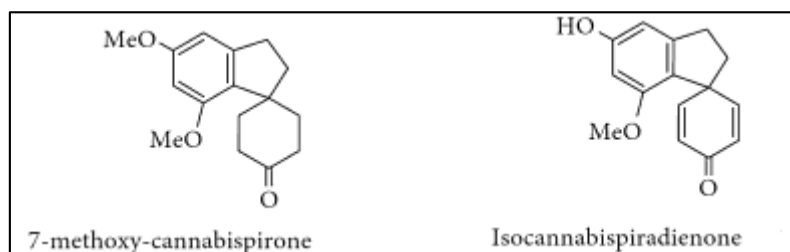
Από το φυτό της κάνναβης μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί λίγα λιπαρά οξέα. Ο μεθυλικός εστέρας του βεχανικού οξέος απομονώθηκε από κλάσμα πετρελαικού αιθέρα του εκχυλίσματος από τα φύλλα της κάνναβης και από τους καρπούς της κάνναβης. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί δύο πολυακόρεστα λιπαρά οξέα C18 από μια ποικιλία κάνναβης (carnagnole) (Pagani et al.,2011).



Εικόνα 20: Χημική δομή λιπαρών οξέων του είδους *C. sativa* L.

B.3.4 Σπεροιδάνες

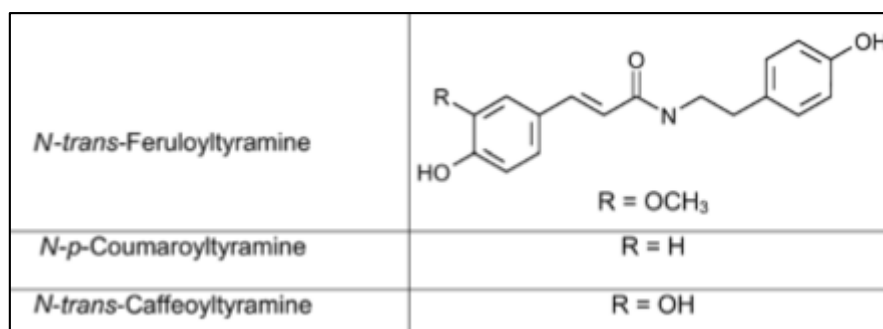
Δύο σπεροιδάνες απομονώθηκαν από το 2005. Το 2008 οι Radwan et al., απομόνωσαν τη 7-μεθόξυ-κανναβισπιρόνη από το εκχύλισμα μιας ποικιλίας κάνναβης υψηλής δραστηριότητας αρχικά με χρωματογραφία στήλης και έπειτα με ανάλυση HPLC, ενώ το 2011 απομονώθηκε η ισοκανναβισπιραδιενόνη από το εκχύλισμα μιας ποικιλίας κάνναβης (Pagani et al.,2011).



Εικόνα 21: Χημική δομή σπεροιδάνων του είδους *C.sativa* L.

B.3.5 Αζωτούχες ενώσεις

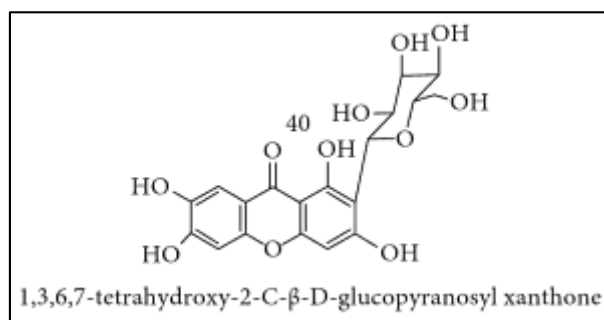
Οι δυο αζωτούχες ενώσεις που έχουν απομονωθεί από την κάνναβη είναι η ουρακίλη και η καναψίλη. Η ουρακίλη απομονώθηκε από το κλάσμα n-βουτανόλης του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων και κλαδιών μιας ποικιλίας κάνναβης (Cheng et al.,2008), ενώ η καναψίλη απομονώθηκε από τους καρπούς του *C.sativa* L.



Εικόνα 22: Χημική δομή αζωτούχων ενώσεων του είδους *C. sativa* L.

B.3.6 Ξανθόνες

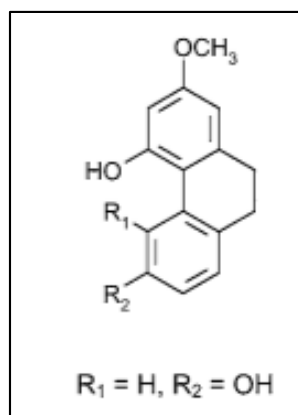
Μόνο ένα παράγωγο από αυτή τη κατηγορία έχει απομονωθεί, η 1,3,6,7-τετραυδροξυ-2-γλυκο-πυρανοσυλοξανθόνη. Η ένωση αυτή απομονώθηκε από το κλάσμα n-βουτανόλης ενός μεθανολικού εκχυλίσματος από τα φύλλα και τα κλαδιά της κάνναβης (Cheng et al.,2008).



Εικόνα 23: Χημική δομή της ξανθόνης του είδους *C. sativa* L.

B.3.7 Διφαινύλια

Το μόνο παράγωγο διφαινυλίου που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι το 5-μεθυλο-4-πεντυλο-2,6,2'-τριυδροξυδιφαινύλιο, το οποίο έχει απομονωθεί από ποικιλίας κάνναβης και προσδιορίζεται με ανάλυση HPLC (Radwan et al.,2008).



Εικόνα 24: Χημική δομή διφαινυλίων του είδους *C. sativa* L.

B.3.8 Φαιναθρένια

Τα τέσσερα φαιναθρένια που έχουν απομονωθεί από ποικιλία κάνναβης απομονώθηκαν από το αντίστοιχο αιθανολικό εκχύλισμα *C.sativa* L., και στη συνέχεια αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία HPLC (Radwan et al.,2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

Γ.1 Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Από τις αρχές της δεκαετίας του 70 ξεκίνησαν οι πρώτες αναλύσεις για να ανίχνευση συστατικών από διάφορα φυτικά υλικά μέσω αέρια χρωματογραφίας GC. Όταν ένα φυτό περιέχει πτητικά συστατικά η GC είναι μέθοδος επιλογής για την ανάλυση και την ταυτοποίηση των ουσιών αυτών. Η GC τεχνική έχει γίνει απαραίτητη μέθοδος ανάλυσης για τα αιθέρια έλαια, καθώς περιέχουν έναν ευρύ αριθμό ενώσεων και η GC είναι η μοναδική τεχνική με την οποία μπορούμε να έχουμε ένα "δακτυλικό αποτύπωμα" οποιουδήποτε κλάσματος πτητικών. Και μη πτητικές ενώσεις, με σ.ζ. μεγαλύτερο από 200-240⁰C, είναι δυνατό να αναλυθούν με την τεχνική αυτή αφού προηγουμένως μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος επιτυγχάνεται με δεδομένη τη μικρότερη ή μεγαλύτερη κατακράτησή τους από τη χρωματογραφική στήλη. Ο απαιτούμενος χρόνος για συγκεκριμένο συστατικό σε συγκεκριμένη στήλη προκειμένου να εκλουσθεί από αυτής ορίζεται ως απόλυτος χρόνος κατακράτησης *t_r* (absolute retention time), και μετράται στο σημείο του μεγίστου της κορυφής. Στη διάρκεια της ανάλυσης, το συστατικό κατανέμεται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Οι σημαντικότεροι παράμετροι στη αέρια χρωματογραφία είναι:

- ✓ Η θερμοκρασία του εισαγωγέα.

Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης η λειτουργία του φούρνου μπορεί να είναι ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας. Η δεύτερη περίπτωση εφαρμόζεται συνήθως όταν το προς διαχωρισμό μείγμα αποτελείται από συστατικά διαφορετικού σημείου ζέσεως.

- ✓ Η ροή του φέροντος αερίου.

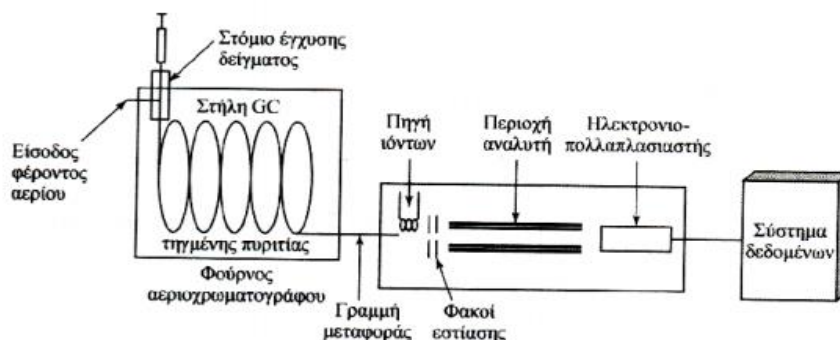
Η ροή του φέροντος αερίου παίζει καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό. Οι χρόνοι συγκράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα.

- ✓ Το είδος της στήλης.

Συνήθως χρησιμοποιούνται τριχοειδής στήλες στις οποίες η υγρή στατική φάση μπορεί να ταξινομηθεί σε πολικές, σχετικά πολικές και μη πολικές.

✓ Το είδος του ανιχνευτή.

Συνήθως χρησιμοποιούνται ανιχνευτές ιονισμού (FID) ή φασματομετρίας μαζών (MS).



Εικόνα 25: Διάγραμμα ενός τυπικού αερίου χρωματογράφου συζευγμένο με φασματομετρία μαζών.

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας FID (Flame Ionization Detector). Αργότερα, ξεκίνησε η εφαρμογή της φασματοσκοπίας μαζών (MS-Mass Spectroscopy) η οποία διευρυνόταν σε πολλούς τομείς, λόγω ανάπτυξης των τεχνικών παραγωγής ιόντων από μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή μόρια. Η φασματοσκοπία μαζών είναι μια τεχνική που παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία εφαρμογών, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τη δομή ανόργανων και οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων.

Στη Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Στη φασματομετρία μάζας μια ένωση αποσυντίθεται μετά από βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων, τα κομμάτια της αφού συλλεχθούν, καταγράφονται και με τα θραύσματα αυτά επανασυναρμολογούμε το μόριο της ένωσης. Για μικρού M.B. ενώσεις και σχετικά απλά μόρια όπως τα πτητικά των αιθερίων ελαίων, η βοήθεια των φασμάτων μάζας είναι καθοριστική. Τα αέρια μόρια εξέρχονται από τη στήλη διαχωρισμού του αερίου χρωματογράφου και εισέρχονται στη πηγή ιονισμού του φασματογράφου μαζών, όπου βομβαρδίζονται με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας.

Τέλος, με τον συνδυασμό της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μαζών (GC-MS) μπορεί να επιτευχθεί:

- Ποιοτικός προσδιορισμός, δηλαδή ο προσδιορισμός της συνολικής σύστασης των δειγμάτων
- Ποσοτικός προσδιορισμός, δηλαδή η επί της % αναλογία των συστατικών των δειγμάτων.

Γ.2 Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών (LC/MS)

Η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών μας δίνει σημαντικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση των άγνωστων ενώσεων σε ένα δείγμα. Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη της τεχνικής και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για μεγάλο φάσμα επιστημονικών, ερευνητικών δραστηριοτήτων. Κύριο πεδίο εφαρμογής είναι οι επιστήμες ζωής, των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες omics. Αυτό συμβαίνει γιατί η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων, τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, την παρουσία και το ποσοστό ισotόπων και τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging) (Ashcroft, 1997).

Η επιλογή της τεχνικής ιονισμού που θα εφαρμοστεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για την ίδια ένωση, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού. Στον **Πίνακα 5** δίνονται οι κύριες τεχνικές ιονισμού που εφαρμόζονται, οι διατάξεις με τις οποίες συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται καθώς και οι κατηγορίες των αναλυόμενων ενώσεων (Ashcroft, 1997).

Πίνακας 5: Κύριες τεχνικές ιονισμού στη φασματομετρία μαζών

Τεχνική ιονισμού	Κύρια ιόντα	Αναλυτής μαζών	Τάξεις ενώσεων
Ιονισμός ηλεκτρονίων	M ⁺ ,θυγατρικά ιόντα	Q, TOF, IT, B	Μη πολικές, κάποιες πολικές <500 datlon
MALDI	[M+H] ⁺ ,[M-H] ⁻	TOF, Orbitrap	Πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή >10 ⁶ datlon
Electrospray (DESI, EESI)	[M+H] ⁺ ,[M-H] ⁻ , ιόντα προσθήκης	Q,TOF,IT,FTICR,Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές,πρωτείνες <200.000 datlon
APCI	[M+H] ⁺ ,[M-H] ⁻ ,	Q,TOF,IT	Μη πολικές, κάποιες πολικές <1000 datlon

Κάθε χρωματογράφος συνδέεται με έναν αναλυτή. Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Υπάρχουν οι συνεχείς αναλυτές μαζών και οι παλμικοί αναλυτές. Στους συνεχείς αναλυτές ανήκει ο τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο (quadrupole,Q).

➤ **Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)**

Οι τετραπολικοί αναλυτές είναι οι πιο διαδεδομένοι αναλυτές μαζών, γιατί παρουσιάζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα. Έχουν σχετικά χαμηλή τιμή, συμπαγή κατασκευή, μεγαλύτερες ανοχές, ταχύτατη σάρωση, δυνατότητα συνδυασμών με υβριδικά όργανα και αμεσότερη συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές. Ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί ανάλογα με τα οπτικά φίλτρα επιτρέποντας σε ιόντα μιας μόνο τιμής m/z να περάσουν και να φτάσουν στο ανιχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται. Για το λόγο αυτό ο τετραπολικός αναλυτής αποκαλείται συχνά και φίλτρο μαζών. Ο συνδυασμός της λειτουργίας των τεσσάρων πόλων επιτρέπει σε ιόντα συγκεκριμένου μόνο m/z να περάσουν τον

αναλυτή και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Για τη σάρωση σ' ένα τετραπολικό αναλυτή, τα δυναμικά των δύο ρευμάτων (εναλλασόμενου και συνεχούς) αυξάνονται από τιμή 0 έως μια μέγιστη τιμή, με το λόγο των δύο περίπου στο 6. Η σάρωση αυτή των δυναμικών επηρεάζει την κίνηση των ιόντων με τρόπο που ορίζεται από περίπλοκες διαφορικές εξισώσεις. Τα ιόντα ουσιαστικά κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο. Η διαχωριστική ικανότητα τέτοιων οργάνων φθάνει στις 3000 και έχουν δυνατότητα ανάλυσης ιόντων με m/z έως τις 3000 (Watson, 2007).

➤ Αναλυτής «χρόνου πτήσης», (Time Of Flight, TOF)

Στα όργανα τύπου «χρόνου πτήσης» (Time Of Flight, TOF) τα θετικά ιόντα παράγονται περιοδικά μετά από βομβαρδισμό του δείγματος με σύντομους παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων ακτινοβολίας λέιζερ. Οι παλμοί έχουν τυπικές συχνότητες 10 έως 50 kHz και διάρκεια 0,25 μ s. Τα επιταχυνόμενα σωματίδια διέρχονται μέσω ενός θάλαμο πορείας, ο οποίος είναι απαλλαγμένος από πεδία και έχει μήκος περίπου ένα μέτρο. Επειδή όλα τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια τη στιγμή που εισέρχονται στον θάλαμο, οι ταχύτητές τους στον θάλαμο πρέπει να είναι αντιστρόφως ανάλογες με τις μάζες τους. Τα ελαφρότερα σωματίδια φθάνουν στον ανιχνευτή νωρίτερα σε σχέση με τα βαρύτερα. Οι τυπικοί «χρόνοι πτήσης» των σωματιδίων κυμαίνονται από 1 έως 30 μ s. Τα πλεονεκτήματα τους είναι η απλή κατασκευή και η μηχανική ανθεκτικότητα, η εύκολη πρόσβαση στην πηγή ιόντων, η σχεδόν απεριόριστη περιοχή μαζών και η ταχύτατη συλλογή και επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων (Skoog, et al., 2007).

Γ.3 Φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού είναι μια τεχνική στην ανάλυση φυτοχημικών ενώσεων. Οι περισσότερες από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους βασίζονται στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μια ουσία, που δεσμεύεται από τα άτομα, ή τα μόρια της ύλης και προκαλεί ηλεκτρονιακές διεγέρσεις, διεγέρσεις πυρήνων, αλλαγές στην περιστροφή και τη δόνηση των μορίων. Στη συνέχεια τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν συνήθως στην αρχική τους κατάσταση, αφού αποβάλλουν το ποσό της ενέργειας που απορρόφησαν. Η

καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης, που είναι γραμμικό στα άτομα και ταινίες στα μόρια.

Στο υπεριώδες διακρίνουμε δύο περιοχές: α) το εγγύς υπεριώδες (400 με 190 nm) και β) το άπω υπεριώδες (190 με 100 nm). Η συνήθης οργανολογία περιορίζεται στο εγγύς υπεριώδες, διότι η απορρόφηση κάτω από τα 190 nm α) από το διοξείδιο του πυριτίου (χαλαζία), υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένες τα οπτικά εξαρτήματα (κυψελίδες) και β) από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, δεν επιτρέπει μετρήσεις στο άπω υπεριώδες.

Οι ποσοτικές μετρήσεις που δίνει η φασματοφωτομετρία UV-Vis στηρίζεται στο ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία. Η ποσοτική σχέση δίνεται από το νόμο Beer-Lambert:

$$A = -\lg T = -\lg(P/P_0) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου, A=η απορρόφηση

T= η % διαπερατότητα του δείγματος

P₀ = η ισχύς της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει στο διάλυμα

P = η ισχύς της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το διάλυμα

b = το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο διάλυμα

c = η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται

ε = η μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας

Το μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, ονομάζεται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ_{\max} . Η τιμή του λ_{\max} είναι χαρακτηριστική της ουσίας, άρα μας δίνει ποιοτική πληροφορία. Το εμβάδόν της κορυφής του φάσματος σχετίζεται με τη ποσότητα της ουσίας, άρα δίνει ποσοτική πληροφορία. Γενικά, η ποσοτικοποίηση άγνωστων ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα δεν είναι τόσο εύκολο όσο οι μετρήσεις γνωστών διαλυμάτων συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Η επιλογή ενός μήκος κύματος μέγιστης

απορρόφησης δεν είναι πάντα δυνατή έτσι συχνά χρησιμοποιούνται χρωματομετρικές αντιδράσεις κατά τις οποίες η συγκέντρωση μιας χημικής ένωσης σε ένα διάλυμα καθορίζεται με τη βοήθεια ενός χρωμοφόρου αντιδραστηρίου (Richardson et al., 1990).

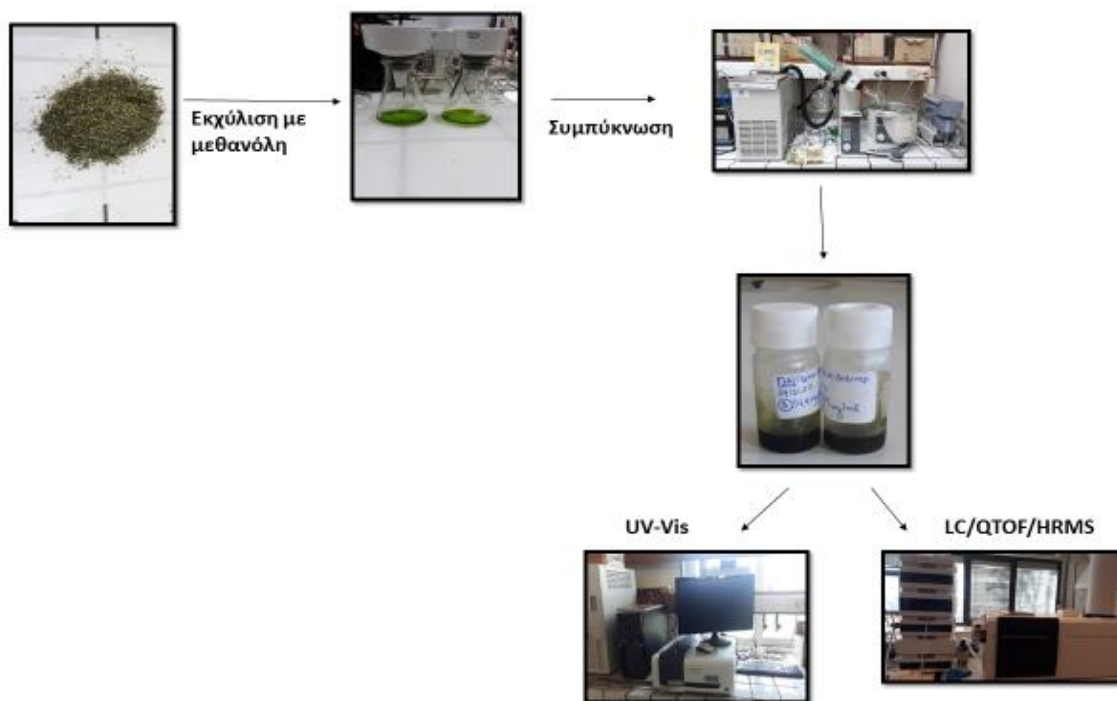
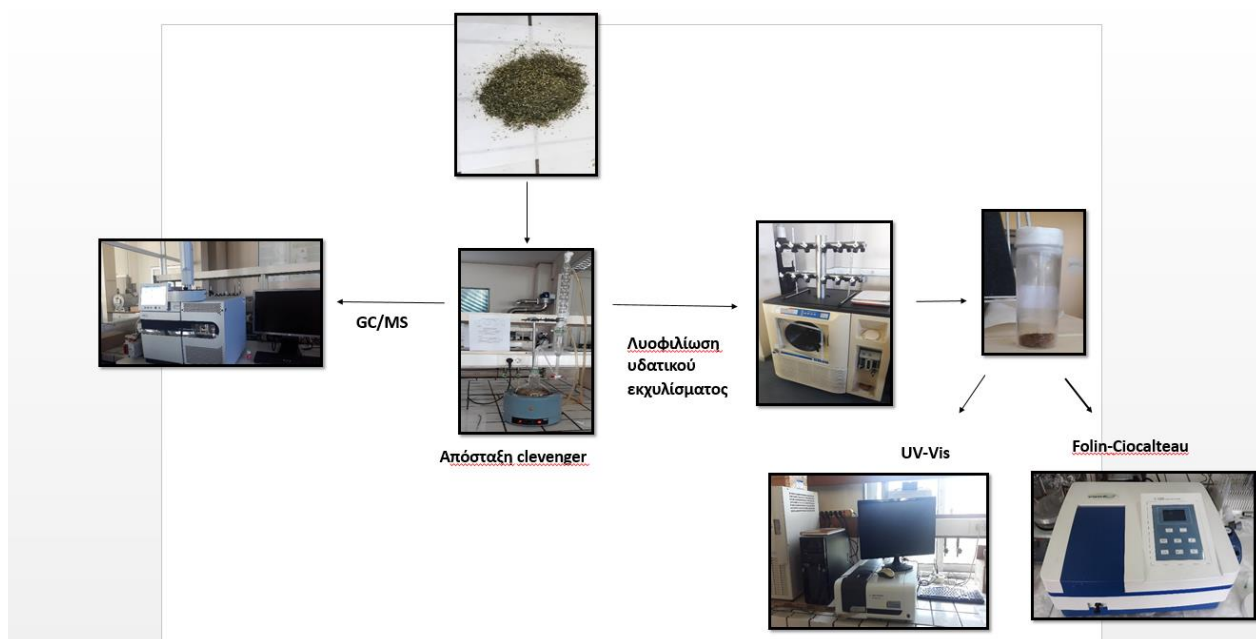
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

Δ.1 Σκοπός και αντικείμενο της μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων και των εκχυλισμάτων του είδους *Cannabis sativa* L. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από τρεις διαφορετικές ποικιλίες και έχουν χρησιμοποιηθεί δύο διαφορετικά είδη λίπανσης που αναφέρονται αναλυτικότερα παρακάτω. Αρχικά, μελετήθηκε το χημικό προφίλ του αιθέριου ελαίου που παραλήφθηκε με υδροαπόσταξη του φυτικού υλικού με στόχο την ανίχνευση πτητικών συστατικών, καθώς και το υδατικό υπόλειμμα της υδροαπόσταξης. Επιπλέον σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο προσδιορισμός των κανναβινοειδών και των φαινολικών ενώσεων από τα μεθανολικά εκχυλίσματα. Τα αιθέρια έλαια τα οποία παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών και τα εκχυλίσματα με τις φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές τεχνικές UV-Vis και LC/Q-TOF/HRMS. Τέλος, στα υδατικά υπολείμματα έγινε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Στοιχεία πρωτοτυπίας της μελέτης αποτελούν η σύγκριση υβριδίων που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες και η σύγκριση του χημικού προφίλ υβριδίων που έχουν καλλιεργηθεί με διαφορετικές λιπάνσεις. Η μελέτη αυτή θα συμβάλει, επίσης στην ανάλυση της χημικής σύστασης του είδους *Cannabis sativa* L. που έχει καλλιεργηθεί στην Ελλάδα.

Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας



Δ.2 Φυτικό υλικό

Τα δείγματα *Cannabis sativa* L. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων και την παρασκευή των εκχυλισμάτων είναι από τρεις διαφορετικές ποικιλίες Futura, Felina και Fedora, της οικογένειας Cannabaceae (Εικ.27). Τα δείγματα προμηθεύτηκαν από την κ. Ελένη Βογιαντζή, Καθηγήτρια, και τον κ. Παπαθανασίου, εκπαιδευτικό εργαστηριακό προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π.) και προέρχονται από πειραματική καλλιέργεια στο Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα).



Εικόνα 27: Δείγμα *C. Sativa* L. σε ξηρή δρόγη

Το σύνολο των δειγμάτων ήταν 12, ουσιαστικά 4 δείγματα από κάθε ποικιλία. Σε κάθε ποικιλία έχουν γίνει 2 διαφορετικές καλλιεργητικές παρεμβάσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί 2 διαφορετικές λιπάνσεις, η ελληνική και η канаδική. Το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα φύλλα, τα άνθη και οι σπόροι. Όλα τα φυτικά τμήματα ήταν αποξηραμένα. Αφαιρέθηκαν επίσης, όλοι οι ξυλοποιημένοι καρποί που υπήρχαν.

Πίνακας 6 : Ποικιλίες δειγμάτων

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
FEDORA	A1α, A1β, A2α, A2β
FELINA	B1α, B1β, B2α, B2β
FUTURA	Γ1α, Γ1β, Γ2α, Γ2β

Ο κωδικός Α,Β,Γ αφορά την ποικιλία του κάθε δείγματος. Ο κωδικός Α αναφέρεται στην ποικιλία FEDORA, ο κωδικός Β στην ποικιλία FELINA και ο κωδικός Γ στην ποικιλία FUTURA. Στη συνέχεια σε κάθε δείγμα υπάρχει ο διαχωρισμός 1 και 2. Τα

δείγματα με τον κωδικό 1 έχουν επεξεργαστεί με ελληνική λίπανση και τα δείγματα με τον κωδικό 2 με καναδική λίπανση. Όλα τα δείγματα έχουν μελετηθεί σε δύο επαναλήψεις, α και β μέρος. Στον παρακάτω πίνακα συγκεντρώνονται αναλυτικά όλες οι πληροφορίες για τα δείγματα.

Πίνακας 7: Κωδικοποίηση δειγμάτων

α/α ΔΕΙΓΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΛΙΠΑΝΣΗ
1	A*1**α***	FEDORA	Ελληνική
2	A1β	FEDORA	Ελληνική
3	A2α	FEDORA	Καναδική
4	A2β	FEDORA	Καναδική
5	B1α	FELINA	Ελληνική
6	B1β	FELINA	Ελληνική
7	B2α	FELINA	Καναδική
8	B2β	FELINA	Καναδική
9	Γ1α	FUTURA	Ελληνική
10	Γ1β	FUTURA	Ελληνική
11	Γ2α	FUTURA	Καναδική
12	Γ2β	FUTURA	Καναδική

*ποικιλία, **λίπανση, ***επανάληψη

Δ.3 Ανάλυση αιθερίου ελαίου του είδους *C.satīva* L.

Δ.3.1 Υδροαπόσταξη

Όργανα και αντιδραστήρια

- ✓ Συσκευή υδροαπόσταξης clevenger
- ✓ διαιθυλαιθέρας της εταιρίας VMR καθαρότητας 99,9% και περιέχει BHT(5ppm)

✓ άνυδρο θειικό μαγνήσιο $MgSO_4$ ήταν της εταιρίας Lab Guard, Mallinckrodt

Αναλυτική πορεία

Το φυτικό υλικό αποστάχθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης με χρήση της συσκευής Clevenger (**Εικ.28**).

Ζυγίστηκε ποσότητα ξηρής δρόγης και αποστάχθηκαν με υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger σε σφαιρική φιάλη 5 L, συνδεδεμένη με τροποποιημένο ψυχώμενο υποδοχέα αιθερίων ελαίων. Χρησιμοποιήθηκε η περιγραφόμενη μέθοδος στην Ελληνική Φαρμακοποιία ελαφρώς τροποποιημένη. Ο σωλήνας επιστροφής της υδατικής φάσης του αποστάγματος συνδέει το κάτω μέρος του βαθμονομημένου σωλήνα με τον κατακόρυφο. Το δείγμα τοποθετήθηκε με ποσότητα απιονισμένου νερού και έγινε θέρμανση με τη χρήση θερμαντικού μανδύα. Μετά το πέρασμα 3 ωρών και αφού η απόσταξη είχε τελειώσει παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο με εκχύλιση υγρού-υγρού με χρήση διαιθυλαιθέρα (GC grade). Ακολούθησε συμπύκνωση της οργανικής φάσης με υγρό άζωτο μέχρι τελικό όγκο 3mL, προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$) για την ξήρανσή του και διήθηση με φίλτρα. Τέλος, η οργανική φάση μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και φυλάχθηκε στους $-20^{\circ}C$, μέχρι την ανάλυση GC-MS. Η παραγόμενη ποσότητα του ελαίου μετράται άμεσα σε mL και η απόδοση του φυτικού δείγματος σε έλαιο εκφράζεται σε mL ελαίου/100g ξηρού δείγματος. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα δείγματα.



Εικόνα 28: Συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger

Δ.3.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αιθέριων ελαίων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS)



Εικόνα 29: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

Όργανα και αντιδραστήρια

- ✓ Αέριος χρωματογράφος Bruker, σύστημα SCION με αυτόματο δειγματολήπτη CP-8400
- ✓ Χρωματογραφική στήλη μη πολικής φάσης Rxi-5sil ms cap. column 30m 0.25mm id 0.25um
- ✓ Διαιθυλαιθέρας (GC grade)
- ✓ κυκλοεξανόνη > 99,0% της εταιρίας Merck.

Αναλυτική πορεία

Πριν την ανάλυση των δειγμάτων με GC/MS ανάλυση προηγήθηκε μία προετοιμασία. Έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με διαιθυλαιθέρα ώστε να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα που είναι συμβατά με την ευαισθησία του μηχανήματος.

Επίσης, στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο διάλυμα κυκλοεξανόνης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών των αιθέριων ελαίων. Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα κυκλοεξανόνης 10μL/mL(10000ppm).

Για να επιτευχθεί η αραιώση των αιθερικών εκχυλισμάτων 25/1000 v/v των αιθέριων ελαίων εισάγεται σε φιαλίδιο 25 μL δείγματος, 965 μL διαιθυλαιθέρα και 10 μL πρότυπο κυκλοεξανόνης (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Πληροφορίες για την πρότυπη ένωση κυκλοεξανόνη

Πρότυπη ένωση	Μοριακός τύπος	Μοριακή Μάζα	Πυκνότητα	Σημείο Βρασμού	Σημείο Τήξης
Κυκλοεξανόνη	C ₆ H ₁₀ O	98,15 g/mol	948 kg/m ³	155,6 °C	-31 °C

Για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας της εταιρίας Bruker. Τα φέρον αέριο ήταν ήλιο (He), με ροή 1mL/min. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 230°C. Το πρόγραμμα ανάλυσης το οποίο είχε διάρκεια 63,33 λεπτά, περιλάμβανε άνοδο θερμοκρασίας της στήλης, η οποία ήταν αρχικά στους 60°C και αυξανόταν με ρυθμό 4°C ανά λεπτό μέχρι τους 250°C. Ο όγκος του δείγματος προς εισαγωγής ήταν 1μL και εισαγόταν με αυτόματο δειγματολήπτη στο σύστημα έγχυσης, με την τεχνική εισαγωγής δείγματος split (Rather et al.,2011).

Η ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων έγινε με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων μάζας με αυτών των βιβλιοθηκών NIST και ADAMS.

Δ.3.3 Αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο του είδους *C.sativa* L.

Πίνακας 9: Αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο δειγμάτων

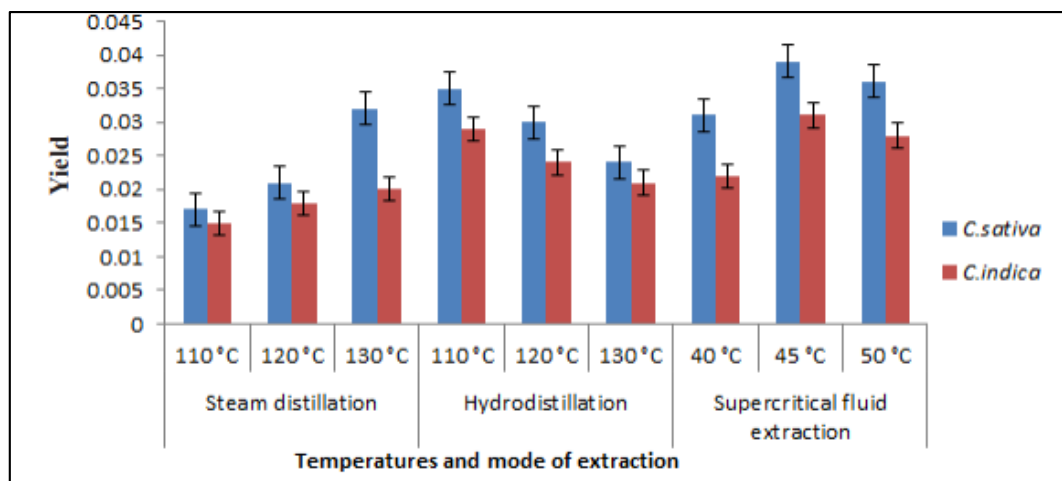
Δείγμα	Ποικιλία	Ζύγιση (g)	Ποσότητα αιθέριου ελαίου(mL)	Απόδοση σε αιθέριο έλαιο(mL/100g ξ.β.)
A1α	Fedora	46,21	0,3	0,6
A1β	Fedora	111,99	0,3	0,3
A2α	Fedora	86,98	0,4	0,5
A2β	Fedora	51,38	0,3	0,6
B1α	Felina	55,07	0,3	0,5
B1β	Felina	55,28	0,3	0,5
B2α	Felina	130,37	0,4	0,3
B2β	Felina	43,15	0,2	0,5
Γ1α	Futura	54,20	0,3	0,5
Γ1β	Futura	117,16	0,4	0,4
Γ2α	Futura	55,55	0,3	0,5
Γ2β	Futura	51,30	0,3	0,6

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Παρατηρώντας το παραπάνω πίνακα (Πίνακας 9) συμπεραίνουμε ότι οι αποδόσεις κυμαίνονται μεταξύ 0,3-0,6%. Γενικά, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά που να οφείλεται στις διαφορετικές ποικιλίες. Οι διαφορετικές καλλιεργητικές επεξεργασίες σχετικά με τις λιπάνσεις δεν φαίνεται να έχουν επηρεάσει τις αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο. Ανάμεσα στις επαναλήψεις κάθε δείγματος δεν υπάρχουν έντονες διαφορές αναφορικά με την απόδοση σε αιθέριο έλαιο.

Συγκριτικά με τη μελέτη του Nissen το 2010, όπου οι αποδόσεις κυμαίνονταν από 0,23-0,31%, οι αποδόσεις των αιθέριων ελαίων που λάβαμε κυμαίνονται σε αυξημένα ποσοστά, ενώ παρατηρούμε ότι τιμές των αποδόσεων μας ταυτίζονται με τη μελέτη των Satyal et al., το 2014.

Αργότερα, το 2017 στο Πακιστάν, οι Naz et al. παρέλαβαν το αιθέριο έλαιο με τρεις διαφορετικούς τρόπους ώστε να συγκρίνουν ποιος τρόπος παραλαβής έχει τη μεγαλύτερη απόδοση σε έλαιο. Οι τρεις τρόποι παραλαβής ήταν η υδροαπόσταξη, η απόσταξη με υδρατμούς και η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω (Εικ.30).



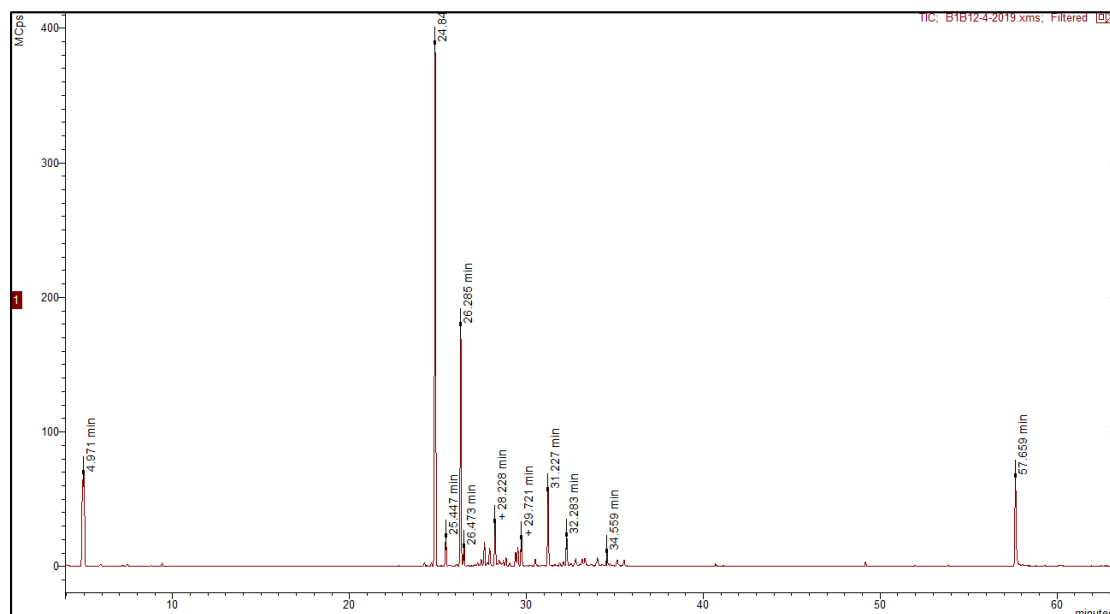
Εικόνα 30: Αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο δειγμάτων *Cannabis sativa* και *indica*

Συμπερασματικά, είναι φανερό ότι η απόδοση σε αιθέριο έλαιο του *C. sativa* είναι αυξημένη σε σχέση με την απόδοση του *C. indica*. Παρατηρούμε ότι μεγαλύτερες αποδόσεις σε έλαιο έδωσε η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά, ενώ την μικρότερη απόδοση η απόσταξη με ατμούς σε θερμοκρασία 110°C. Η υδρο- απόσταξη έδωσε αυξημένες αποδόσεις ειδικότερα σε θερμοκρασία 110°C..

Γενικώς, οι διαφορές που παρατηρούνται στις αποδόσεις των αιθερίων ελαίων μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι η επίδραση του περιβάλλοντος, η γεωγραφική περιοχή, το υψόμετρο, οι κλιματολογικές συνθήκες, οι εδαφολογικές συνθήκες, η περίοδος συλλογής του φυτού και συνεπώς ο βαθμός ωρίμανσής του, το τμήμα του φυτού και ο υβριδισμός του κάθε είδους μπορούν να επηρεάσουν τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των δευτερογενών μεταβολιτών.

Δ.3.4 Χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων *C.sativa* L.

Τα πτητικά συστατικά των αιθέριων ελαίων αναλύθηκαν με GC/MS. Το παρακάτω χρωματογράφημα αποτελεί τυπικό αέριο χρωματογράφημα των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη (Εικ.31). Τα χρωματογραφήματα όλων των δειγμάτων παρατίθενται στο παράρτημα Β.



Εικόνα 31: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών του αιθέριου ελαίου *C.sativa* L. , ποικιλία Felina

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο αιθέριο έλαιο των δειγμάτων *C.sativa* L.

✓ Δείγμα A1a

Πίνακας 10: Συστατικά δείγματος A1a του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/ml essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α -Pinene	tr*	tr	tr
981	β -Pinene	0,05	0,03	tr
990	Myrcene	0,06	0,03	tr
1036	Limonene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,06	0,03	tr
1087	Terpinolene	0,06	0,04	tr

1194	α -Terpineol	tr	tr	tr
1369	α -Ylangene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,11	0,07	0,31
1411	α -Cis-Bergamotene	0,12	0,07	0,38
1417	(E)-Caryophyllene	11,26	6,75	37,7
1432	α -Trans-Bergamotene	0,9	0,54	3,02
1453	α -Humulene	6,46	3,87	21,6
1458	Allo-Aromadendrene	0,43	0,26	1,44
1481	γ -Himachalene	0,25	0,15	0,68
1485	β -Selinene	1,08	0,65	3,31
1492	α -Selinene	0,85	0,51	2,65
1521	(Z)-Nerolidol	0,18	0,11	0,55
1533	α -Cadinene	0,35	0,21	1,07
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,51	0,31	1,72
1559	(E)-Nerolidol	0,13	0,08	0,39
1577	Caryophyllene oxide	1,18	0,71	3,95
1603	Humulene epoxide II	0,49	0,29	1,53
1632	Caryophyllene-4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,26	0,15	0,79
1651	Aromadendrene epoxide	0,41	0,25	0,68
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,24	0,14	0,57
2405	Cannabidiol	4,91	2,94	16,3

*tr=ίχνη

✓ Δείγμα A1β

Πίνακας 11: Συστατικά δείγματος A1β του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α -Pinene	0,05	0,01	tr
981	β -Pinene	0,02	0,007	tr
1031	Limonene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,04	0,01	tr
1073	cis Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	0,06	0,02	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1181	Terpinen-4-ol	tr	tr	tr
1194	α -Terpineol	tr	tr	tr
1369	α -Ylangene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,08	0,03	0,38
1411	α -Cis-Bergamotene	0,09	0,03	0,4
1417	(E)-Caryophyllene	10,1	3,04	46,2
1432	α -Trans-Bergamotene	0,7	0,2	3,04

1453	α -Humulene	5,15	1,54	23,5
1458	allo -Aromadrene	0,37	0,11	1,7
1485	β -Selinene	0,47	0,14	2,17
1492	α -Selinene	0,39	0,12	1,8
1533	α -Cadinene	0,29	0,09	1,32
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,5	0,15	2,29
1577	Caryophyllene oxide	1,08	0,32	4,96
1603	Humulene epoxide II	0,39	0,12	1,77
1632	Caryophyllene-4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,16	0,05	0,73
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,12	0,04	0,55
2405	Cannabidiol	1,63	0,48	7,43

✓ Δείγμα A2α

Πίνακας 12: Συστατικά δείγματος A2α του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α -Pinene	0,83	0,42	2,05
981	β -Pinene	0,18	0,09	0,45
990	Myrcene	0,11	0,05	0,26
1031	Limonene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,11	0,06	0,27
1073	cis Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	0,12	0,06	0,29
1098	trans Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1120	Fenchol	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1181	Terpinen-4-ol	tr	tr	tr
1194	α -Terpineol	tr	tr	tr
1369	α -Ylangene	tr	tr	tr
1375	α -Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,21	0,11	0,51
1411	α -Cis-Bergamotene	0,16	0,08	0,4
1417	(E)-Caryophyllene	15,5	7,742	38,2
1432	α -Trans-Bergamotene	1,04	0,52	2,56
1453	α -Humulene	7,6	3,8	18,7
1458	Allo-Aromadrene	0,74	0,37	1,82
1481	γ -Himachalene	0,33	0,16	0,82
1485	β -Selinene	1,54	0,77	3,8
1492	α -Selinene	1,15	0,58	2,8
1505	β -Bisabolene	0,18	0,09	0,44
1521	(Z)-Nerolidol	0,17	0,08	0,41
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,21	0,11	0,52

1559	(E)-Nerolidol	0,17	0,09	0,42
1577	Caryophyllene oxide	1,91	0,9	4,7
1603	Humulene epoxide II	0,79	0,39	1,93
1632	Caryophyllene-4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,72	0,36	1,79
1651	Aromadendrene epoxide	0,66	0,33	1,62
	Selin-11-en-4-alpha-ol	0,17	0,08	0,4
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,46	0,23	1,12
2405	Cannabidiol	1,79	0,89	4,4

✓ Δείγμα A2β

Πίνακας 13: Συστατικά δείγματος A2β του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	0,25	0,15	1,02
981	β-Pinene	0,09	0,05	0,36
990	Myrcene	0,05	0,03	0,2
1031	Limonene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,05	0,03	0,2
1073	cis Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	0,04	0,02	0,16
1172	Borneol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,10	0,06	0,41
1417	(E)-Caryophyllene	8,1	4,86	33,1
1432	α-Trans-Bergamotene	0,56	0,34	2,29
1453	α-Humulene	4,6	2,76	18,8
1458	Allo-Aromadendrene	0,68	0,4	1,69
1481	γ-Himachalene	0,16	0,09	0,41
1485	β-Selinene	0,65	0,39	1,63
1492	α-Selinene	0,53	0,32	1,33
1505	β-Bisabolene	0,1	0,06	0,39
1533	α-Cadinene	0,34	0,2	1,37
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,54	0,32	2,22
1559	(E)-Nerolidol	0,12	0,07	0,5
1577	Caryophyllene oxide	1,46	0,88	5,99
1603	Humulene epoxide II	0,59	0,35	2,4
1632	Caryophyllene-4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,31	0,18	1,2
1651	Aromadendrene epoxide	0,5	0,3	2,03

1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,28	0,16	1,13
2405	Cannabidiol	1,32	0,79	5,37

✓ Δείγμα Β1α

Πίνακας 14: Συστατικά δείγματος Β1α του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	0,11	0,05	0,42
981	β-Pinene	0,04	0,02	0,15
990	Myrcene	0,08	0,04	0,31
1049	(Z)-Ocimene	0,08	0,04	0,32
1172	Borneol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1417	(E)-Caryophyllene	7,25	3,62	27,9
1432	α-Trans-Bergamotene	0,41	0,21	1,59
1453	α-Humulene	3,8	1,9	14,6
1458	allo -Aromadrene	0,2	0,1	0,75
1481	γ-Himachalene	0,09	0,04	0,36
1485	β-Selinene	0,38	0,19	1,48
1492	α-Selinene	0,31	0,15	1,18
1505	β-Bisabolene	0,08	0,04	0,28
1521	(Z)-Nerolidol	0,08	0,04	0,34
1533	α-Cadinene	0,4	0,2	1,53
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,5	0,25	1,9
1559	(E)-Nerolidol	0,13	0,07	0,5
1577	Caryophyllene oxide	2,66	1,33	10,2
1603	Humulene epoxide II	1,22	0,61	4,7
1617	Selin-6-en-4-ol	0,29	0,14	1,1
1632	Caryophyllene-4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,38	0,19	1,44
1651	Aromadrene epoxide	0,52	0,26	2,01
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,64	0,32	2,45
1667	Bisabolol <epi-α->	0,27	0,14	1,04
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,17	0,08	0,65
2405	Cannabidiol	3,59	1,79	13,8

✓ Δείγμα Β1β

Πίνακας 15: Συστατικά δείγματος Β1β του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	0,06	0,03	0,22
981	β-Pinene	tr	tr	tr
990	Myrcene	0,05	0,03	0,2
1031	Limonene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,09	0,05	0,35
1073	cis Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,08	0,04	0,28
1417	(E)-Caryophyllene	10,4	5,21	39,4
1432	α-TransBergamotene	0,58	0,29	2,19
1453	α-Humulene	4,74	2,37	17,9
1458	allo -Aromadrene	0,38	0,19	1,42
1481	γ-Himachalene	0,16	0,08	0,61
1485	β-Selinene	0,49	0,24	1,85
1492	α-Selinene	0,39	0,19	1,47
1505	β-Bisabolene	0,12	0,06	0,46
1533	α-Cadinene	0,38	0,19	1,44
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,61	0,3	2,3
1559	(E)-Nerolidol	0,14	0,07	0,52
1577	Caryophyllene oxide	1,57	0,78	5,94
1603	Humulene epoxide II	0,68	0,34	2,6
1617	Selin-6-en-4-ol	0,22	0,11	0,83
1651	Aromadendrene epoxide	0,26	0,13	0,96
1666	14-hydroxy-9-epi- (E)- caryophyllene	0,33	0,16	1,24
1667	Bisabolol <epi-α->	0,17	0,08	0,64
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,13	0,06	0,47
2405	Cannabidiol	2,07	1,04	7,83

✓ Δείγμα Β2α

Πίνακας 16: Συστατικά δείγματος Β2α του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	1,77	0,53	2,92
981	β-Pinene	0,7	0,21	1,16
990	Myrcene	0,57	0,17	0,94
1031	Limonene	0,38	0,11	0,62
1059	γ-Terpinene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,67	0,2	1,1
1087	Terpinolene	tr	tr	tr
1120	Fenchol	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1181	Terpinen-4-ol	tr	tr	tr
1194	α-Terpineol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,27	0,08	0,44
1417	(E)-Caryophyllene	24,28	7,28	40,0
1432	α-Trans-Bergamotene	1,39	0,42	2,29
1453	α-Humulene	11,03	3,31	18,2
1458	allo -Aromadrene	1,27	0,38	2,09
1481	γ-Himachalene	0,27	0,08	0,44
1485	β-Selinene	0,98	0,29	1,61
1492	α-Selinene	0,67	0,2	1,12
1533	α-Cadinene	1,19	0,36	1,97
1539	Selina-3,7(11)-diene	1,7	0,51	2,79
1559	(E)-Nerolidol	0,29	0,09	0,48
1577	Caryophyllene oxide	4,05	1,21	6,68
1603	Humulene epoxide II	1,89	0,57	3,12
1617	Selin-6-en-4-ol	0,52	0,16	0,86
1632	Caryophyllene- 4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,7	0,21	1,16
1651	Aromadendrene epoxide	1,03	0,31	1,69
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)- caryophyllene	0,88	0,26	1,46
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,31	0,09	0,52
2405	Cannabidiol	1,69	0,51	2,78

✓ Δείγμα B2β

Πίνακας 17: Συστατικά δείγματος B2β του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	tr	tr	tr
981	β-Pinene	tr	tr	tr
990	Myrcene	tr	tr	tr
1031	Limonene	tr	tr	tr
1059	γ-Terpinene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,11	0,05	0,61
1087	Terpinolene	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1194	α-Terpineol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1417	(E)-Caryophyllene	7,42	3,71	40,1
1432	α-Trans-Bergamotene	0,39	0,19	2,08
1453	α-Humulene	3,45	1,72	18,7
1458	allo -Aromadredrene	0,26	0,13	1,42
1485	β-Selinene	0,28	0,14	1,47
1492	α-Selinene	0,22	0,11	1,06
1533	α-Cadinene	0,44	0,22	2,39
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,62	0,31	3,35
1559	(E)-Nerolidol	0,09	0,05	0,56
1577	Caryophyllene oxide	1,16	0,58	6,00
1603	Humulene epoxide II	0,52	0,26	2,64
1632	Caryophyllene- 4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,22	0,11	1,08
1651	Aromadendrene epoxide	0,37	0,19	1,92
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)- caryophyllene	0,3	0,15	1,39
1667	Bisabolol <epi-α->	0,12	0,06	0,63
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,11	0,05	0,54
2405	Cannabidiol	2,07	1,04	10,7

✓ Δείγμα Γ1α

Πίνακας 18: Συστατικά δείγματος Γ1α του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α -Pinene	tr	tr	tr
981	β -Pinene	tr	tr	tr
990	Myrcene	tr	tr	tr
1031	Limonene	tr	tr	tr
1036	Eucalyptol	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	tr	tr	tr
1059	γ -Terpinene	tr	tr	tr
1073	cis Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	tr	tr	tr
1098	trans Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1120	Fenchol	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1181	Terpinen-4-ol	tr	tr	tr
1194	α -Terpineol	tr	tr	tr
1369	α -Ylangene	tr	tr	tr
1375	α -Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,1	0,05	0,23
1411	α -Cis-Bergamotene	0,14	0,07	0,31
1417	(E)-Caryophyllene	13,3	6,64	30,1
1432	α -Trans-Bergamotene	1,35	0,67	3,05
1453	α -Humulene	7,24	3,62	16,4
1458	allo -Aromadenedrene	0,66	0,33	1,5
1481	γ -Himachalene	0,37	0,18	0,85
1485	β -Selinene	0,98	0,49	2,23
1492	α -Selinene	0,24	0,12	1,57
1505	β -Bisabolene	0,24	0,12	0,54
1521	(Z)-Nerolidol	0,22	0,11	0,49
1533	α -Cadinene	1,01	0,51	2,29
1539	Selina-3,7(11)-diene	1,67	0,84	3,79
1559	(E)-Nerolidol	0,58	0,29	1,32
1577	Caryophyllene oxide	1,45	0,73	3,28
1603	Humulene epoxide II	0,48	0,24	1,09
1617	Selin-6-en-4-ol	0,61	0,3	1,37
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)- caryophyllene	0,3	0,15	0,69
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,41	0,2	0,92
2405	Cannabidiol	6,59	3,29	14,9

✓ Δείγμα Γ1β

Πίνακας 19: Συστατικά δείγματος Γ1β του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	0,38	0,15	1,26
981	β-Pinene	0,16	0,07	0,55
990	Myrcene	0,17	0,07	0,59
1031	Limonene	tr	tr	tr
1036	Eucalyptol	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	0,15	0,06	0,51
1059	γ-Terpinene	tr	tr	tr
1073	cis-Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	0,19	0,08	0,64
1098	trans-Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1120	Fenchol	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1181	Terpinen-4-ol	tr	tr	tr
1194	Terpineol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,11	0,05	0,39
1411	α-Cis-Bergamotene	0,11	0,05	0,39
1417	(E)-Caryophyllene	11,7	4,70	38,8
1432	α-Trans-Bergamotene	0,97	0,39	3,2
1453	α-Humulene	5,53	2,21	18,3
1458	allo -Aromadrene	0,47	0,19	1,55
1481	γ-Himachalene	0,27	0,11	0,89
1485	β-Selinene	0,68	0,27	2,25
1492	α-Selinene	0,47	0,19	1,57
1505	β-Bisabolene	0,14	0,06	0,46
1533	α-Cadinene	0,44	0,17	1,46
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,63	0,25	2,11
1559	(E)-Nerolidol	0,23	0,09	0,76
1577	Caryophyllene oxide	0,95	0,38	3,14
1603	Humulene epoxide II	0,33	0,13	1,1
1617	Selin-6-en-4-ol	0,29	0,11	0,95
1632	Caryophyllene- 4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,21	0,09	0,72
1651	Aromadendrene epoxide	0,36	0,15	1,21
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)- caryophyllene	0,19	0,08	0,64
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,17	0,07	0,57
2405	Cannabidiol	1,52	0,61	5,02

✓ Δείγμα Γ2α

Πίνακας 20: Συστατικά δείγματος Γ2α του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	tr	tr	tr
981	β-Pinene	tr	tr	tr
990	Myrcene	tr	tr	tr
1031	Limonene	tr	tr	tr
1036	Eucalyptol	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	tr	tr	tr
1059	γ-Terpinene	tr	tr	tr
1073	cis Sabinene hydrate	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	tr	tr	tr
1172	Borneol	tr	tr	tr
1181	Terpinen-4-ol	tr	tr	tr
1194	α-Terpineol	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,17	0,08	0,54
1411	α-Cis-Bergamotene	0,13	0,07	0,39
1417	(E)-Caryophyllene	13,0	6,51	40,3
1432	α-Trans-Bergamotene	1,2	0,6	3,69
1453	α-Humulene	6,43	3,22	19,8
1458	allo -Aromadredrene	0,65	0,33	1,77
1481	γ-himachalene	0,28	0,14	0,79
1485	β-Selinene	1,05	0,52	3,1
1492	α-Selinene	0,76	0,39	2,14
1505	β-Bisabolene	0,18	0,09	0,04
1533	α-Cadinene	0,42	0,21	1,34
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,82	0,41	2,38
1559	(E)-Nerolidol	0,21	0,1	0,54
1577	Caryophyllene oxide	2,41	1,21	5,34
1603	Humulene epoxide II	0,75	0,38	2,11
1617	Selin-6-en-4-ol	0,35	0,17	0,64
1632	Caryophyllene-4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,58	0,29	1,35
1651	Aromadendrene epoxide	0,78	0,39	2,15
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,42	0,21	0,94
1667	Bisabolol <epi-α->	0,26	0,13	0,78
2405	Cannabidiol	2,56	1,28	6,68

✓ Δείγμα Γ2β

Πίνακας 21: Συστατικά δείγματος Γ2β του είδους *C.sativa* L.

A.INDEX	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/mL essential oil	mg/100g. φυτικού υλικού	%ποσοστό
938	α-Pinene	tr	tr	tr
981	β-Pinene	tr	tr	tr
990	Myrcene	tr	tr	tr
1031	Limonene	tr	tr	tr
1049	(Z)-Ocimene	tr	tr	tr
1087	Terpinolene	tr	tr	tr
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,14	0,09	0,49
1411	α-Cis-Bergamotene	0,12	0,07	0,4
1417	(E)-Caryophyllene	10,39	6,23	35,16
1432	α-Trans-Bergamotene	0,95	0,57	3,22
1453	α-Humulene	5,1	3,06	17,26
1458	Allo-Aromadendrene	0,66	0,4	2,23
1481	γ-Himachalene	0,31	0,19	1,07
1485	β-Selinene	1,11	0,67	3,76
1492	α-Selinene	0,8	0,48	2,73
1505	β-Bisabolene	0,004	0,002	0,01
1521	(Z)-Nerolidol	0,12	0,07	0,4
1533	α-Cadinene	0,31	0,19	1,06
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,59	0,35	1,98
1559	(E)-Nerolidol	0,17	0,1	0,58
1577	Caryophyllene oxide	1,51	0,9	5,12
1603	Humulene epoxide II	0,57	0,34	1,92
1617	Selin-6-en-4-ol	0,2	0,12	0,68
1632	Caryophyllene- 4(12),8(13)-dien-5a-ol	0,36	0,22	1,23
1651	Aromadendrene epoxide	0,36	0,22	1,23
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)- caryophyllene	0,28	0,17	0,95
1667	Bisabolol <epi-α->	0,18	0,11	0,62
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	0,12	0,07	0,41
2405	Cannabidiol	2,8	1,68	9,48

Παρακάτω ακολουθεί ένας συνολικός πίνακας με τις ποσότητες των συστατικών όλων των δειγμάτων (**Πίνακας 22**).

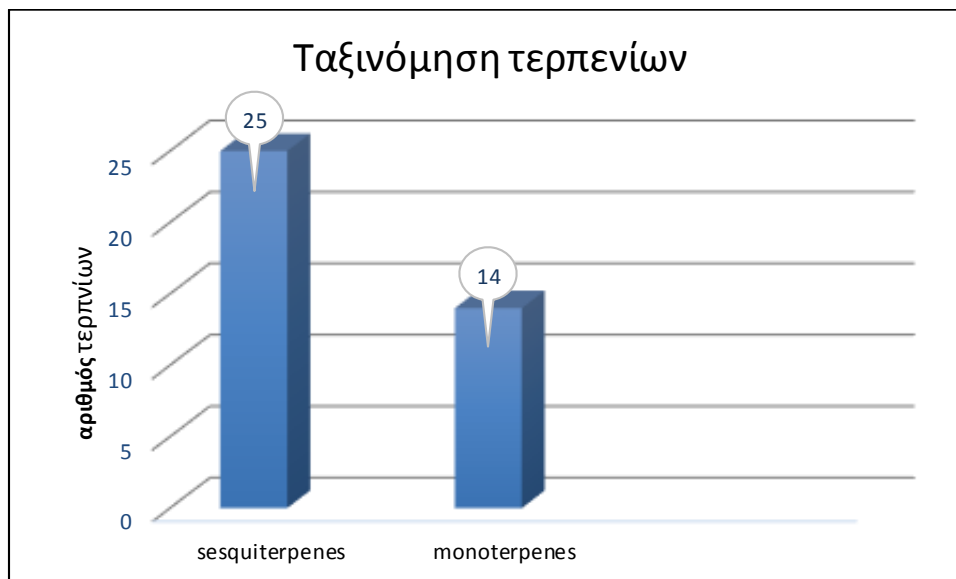
Πίνακας 22 : Συγκέντρωση των συστατικών (mg/mL essential oil) των δειγμάτων *Cannabis sativa* L.

A.Index	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ											
		A1α	A1β	A2α	A2β	B1α	B1β	B2α	B2β	Γ1α	Γ1β	Γ2α	Γ2β
938	α-Pinene	tr	0,05	0,83	0,25	0,11	0,06	1,77	tr	tr	0,38	tr	tr
981	β-Pinene	0,05	0,02	0,18	0,09	0,04	tr	0,7	tr	tr	0,16	tr	tr
990	Myrcene	0,06	-	0,11	0,05	0,08	0,05	0,57	tr	tr	0,17	tr	tr
1031	Limonene	tr	tr	tr	tr	-	tr	0,38	tr	tr	tr	tr	tr
1036	Eucalyptol	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	-
1049	(Z)-Ocimene	0,06	0,04	0,11	0,05	0,08	0,09	0,67	0,12	tr	0,15	tr	tr
1059	γ-Terpinene	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	-
1073	cis Sabinene hydrate	-	-	tr	tr	-	tr	-	-	tr	tr	tr	-
1087	Terpinolene	0,06	0,06	0,12	0,04	-	tr	tr	tr	tr	0,19	tr	tr
1098	trans Sabinene hydrate	-	-	tr	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-
1120	Fenchol	-	-	tr	-	-	-	tr	-	tr	tr	-	-
1172	Borneol	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-
1181	Terpinen-4-ol	-	tr	tr	-	-	-	tr	-	tr	tr	tr	-
1194	α-Terpineol	tr	tr	tr	-	-	-	tr	-	tr	tr	tr	-
1369	α-Ylangene	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1375	α-Copaene	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
1401	(Z)-Caryophyllene	0,11	0,08	0,21	0,10	-	0,08	0,27	-	0,1	0,11	0,17	0,14
1411	α-Cis-Bergamotene	0,12	0,09	0,16	-	-	-	-	-	0,14	0,11	0,13	0,12
1417	(E)-Caryophyllene	11,26	10,1	15,5	8,1	7,25	10,4	24,28	7,42	13,3	11,7	13,0	10,39
1432	α-Trans-bergamotene	0,9	0,7	1,04	0,56	0,41	0,58	1,39	0,39	1,35	0,97	1,2	0,95
1453	α-Humulene	6,46	5,15	7,6	4,6	3,8	4,74	11,03	3,45	7,24	5,53	6,43	5,1
1458	Allo Aromadendrene	0,43	0,37	7,39	0,68	0,2	0,38	1,27	0,26	0,66	0,47	0,65	0,66
1481	γ-Himachalene	0,25	-	0,33	0,16	0,1	0,16	0,27	-	0,37	0,27	0,28	0,31
1485	β-Selinene	1,08	0,47	1,54	0,65	0,38	0,49	0,98	0,28	0,98	0,68	1,05	1,11
1492	α-Selinene	0,85	0,39	1,15	0,53	0,31	0,39	0,67	0,22	0,24	0,47	0,76	0,8
1505	β-Bisabolene	-	-	0,18	0,1	0,08	0,12	-	-	0,24	0,14	0,18	-
1521	(Z)-Nerolidol	0,18	-	0,17	-	0,09	-	-	-	0,22	-	-	0,12
1533	α-Cadinene	0,35	0,29	0,21	0,34	0,4	0,38	1,19	0,44	1,01	0,44	0,42	0,31
1539	Selina-3,7(11)-diene	0,51	0,5	-	0,54	0,5	0,61	1,7	0,62	1,67	0,63	0,82	0,59
1559	(E)-Nerolidol	0,13	-	0,17	0,12	0,13	0,14	0,29	0,09	0,58	0,23	0,21	0,17
1577	Caryophyllene oxide	1,18	1,08	1,91	1,46	2,66	1,57	4,05	1,16	1,45	0,95	2,41	1,51
1603	Humulene epoxide II	0,49	0,39	0,79	0,59	1,22	0,68	1,89	0,52	0,48	0,33	0,75	0,57
1617	Selin-6-en-4-ol	-	-	-	-	0,29	0,22	0,52	-	0,6	0,29	0,35	0,2
1632	Caryophyllene-4(12), 8(13)-dien-5a-ol	0,26	0,16	0,72	0,31	0,38	-	0,7	0,22	-	0,21	0,58	0,36
1651	Aromadendrene epoxide	0,41	-	0,66	0,5	0,52	0,26	1,03	0,37	-	0,36	0,78	0,36
1666	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllene	0,24	0,12	0,46	0,28	0,64	0,33	0,88	0,3	0,3	0,19	0,42	0,28
1667	Bisabolol <epi-α->	-	-	-	-	0,27	0,17	-	0,2	-	-	0,26	0,18
1691	Selin-7(11)-en-4-ol	-	-	-	-	0,17	0,13	0,31	0,11	0,41	0,17	-	0,12
2405	Cannabidiol	4,91	1,63	1,79	1,32	3,59	2,07	1,69	2,07	6,59	1,52	2,56	2,8

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στους παραπάνω πίνακες παρουσιάζονται τα συστατικά που αναγνωρίστηκαν στα δείγματα *C.sativa* L., καθώς και οι ποσότητες τους εκφρασμένες σε ποσοτά επί τοις εκατό, σε mg/mL αιθερίου ελαίου και σε mg ανά 100g. φυτικού υλικού.

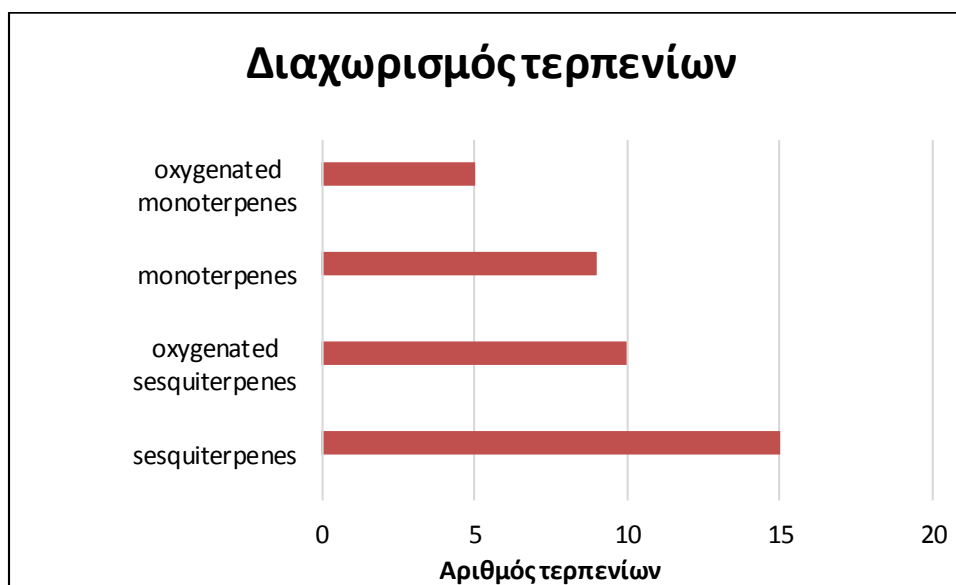
Σε όλα τα δείγματα φαίνεται να κυριαρχούν τα σесκιτερπένια με κύριο συστατικό το (E)-Caryophyllene σε μεγάλα ποσοστά και ακολουθεί η ένωση α -Humulene. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλογα με το είδος των τερπενίων που κυριαρχούν στα δείγματα (**Σχήμα 32**).



Σχήμα 32 :Ταξιμόνηση τερπενίων ανάλογα των αριθμό ανθράκων στα δείγματα *C.sativa* L.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, συνολικά, στα δείγματα κυριαρχούν τα σесκιτερπένια, αναλυτικότερα στα δείγματα ανιχνεύθηκαν 25 σесκιτερπένια και 14 μονοτερπένια. Τα σесκιτερπένια που ταυτοποιήθηκαν ήταν το (E)-Caryophyllene και το α -Humulene σε αυξημένα ποσοστά. Σε σημαντικές ποσότητες ανιχνεύθηκαν και άλλα σесκιτερπένια όπως το β -Selinene, το α -Selinene και το α -Cadinene. Τα συγκεκριμένα σесκιτερπένια αποτελούν απλούς υδρογονάθρακες. Στα δείγματα, επίσης, ταυτοποιήθηκε

και ένας σημαντικός αριθμός οξυγονωμένων σεσκιτερπενίων όπως το Caryophyllene oxide και το Humulene epoxide II. Αναφορικά με τα μονοτερπένια, στα δείγματα βρέθηκαν δεκατέσσερα, από τα οποία τα εννέα είναι απλοί υδρογονάνθρακες όπως το α -Pinene και το β -Pinene και κάποια οξυγονωμένα μονοτερπένια όπως οι ενώσεις: Borneol, Fenchol, α -Terpineol κ.ά.

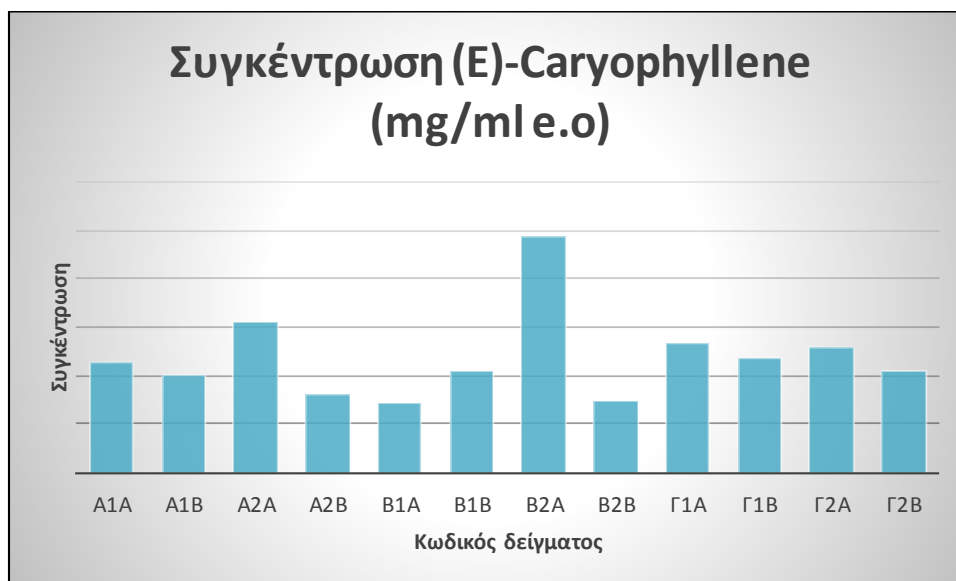


Σχήμα 33: Αναλυτικότερη ταξινόμηση τερπενίων ανάλογα των αριθμό ανθράκων στα δείγματα *C.sativa* L.

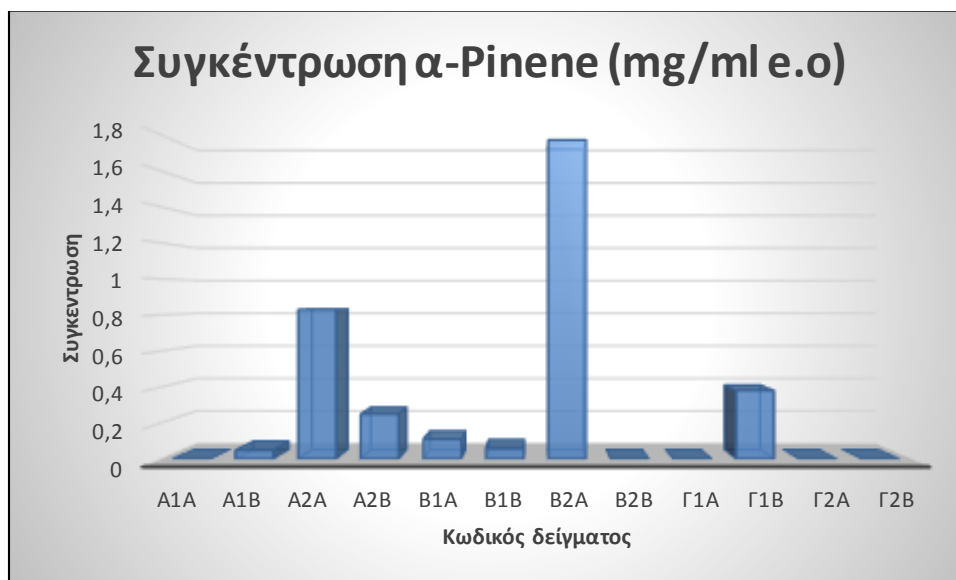
Σημαντικές ποσοτικές διαφορές δεν παρατηρούνται ανάλογα με την ποικιλία. Αναλυτικότερα, τα δείγματα της ποικιλίας B, Felina, έδωσαν τα μεγαλύτερα ποσοστά σε (E)-Caryophyllene με πρώτο το δείγμα B2a με 24,3mg/mL αιθερίου ελαίου (e.o) και ποσοστό 40% και α -Humulene με 11,7mg/mL ελαίου και ποσοστό 18,2%. Η ποικιλία A και Γ έδωσαν χαμηλότερες ποσότητες στα συγκεκριμένα συστατικά χωρίς αξιόλογες διαφορές.

Όσον αφορά τα μονοτερπένια, τα δείγματα της ποικιλίας A και B, Fedora και Felina, παρουσιάζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε α -Pinene, β -Pinene, Myrcene, (E)-Ocimene και Terpinolene σε αντίθεση με τα δείγματα της ποικιλίας Γ, Futura, που ανιχνεύθηκαν μονοτερπένια σε ίχνη εκτός από το δείγμα Γ1β, όπου ταυτοποιήθηκαν μονοτερπένια σε χαμηλά ποσοστά. Στα περισσότερα δείγματα ανιχνεύθηκαν σε ίχνη κάποια μονοτερπένια όπως το limonene, το γ -Terpinene, η α -Terpineol κ.ά.

Στο δείγμα B2α υπάρχει η μεγαλύτερη ποσότητα σε μονοτερπένια με κύριο το α-Pinene με 1,77mg/mL ελαίου (2,92%), ακολουθεί το β-Pinene με 0,7mg/mL (1,16%), το Myrcene με 0,57mg/mL (0,94%) και το (E)-Ocimene με 0,67mg/mL (1,1%). Τις διαφορές αυτές μπορούμε να τις εντοπίσουμε καλύτερα παρακάτω (Σχήμα 34&35).

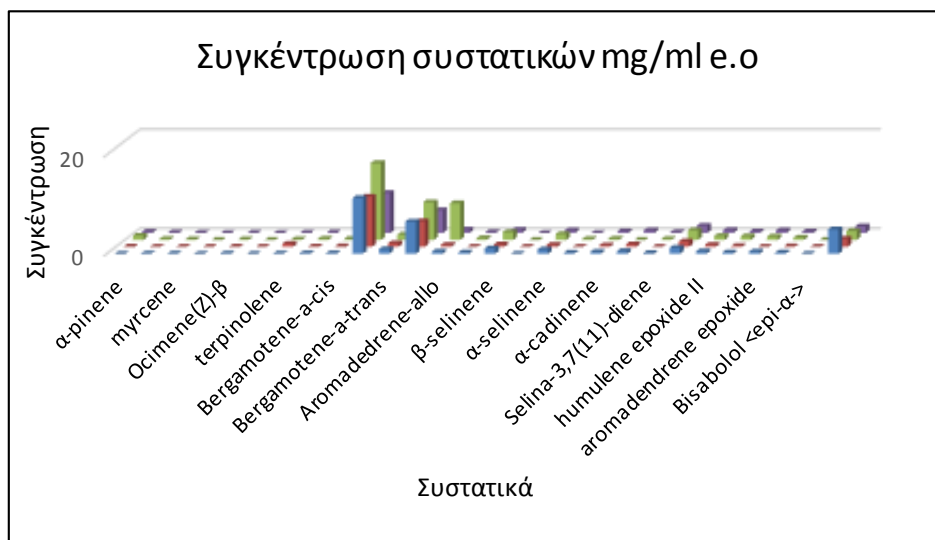


Σχήμα 34: Συγκέντρωση (mg/ml e.o) (E)-Caryophyllene στα δείγματα *C.sativa* L.

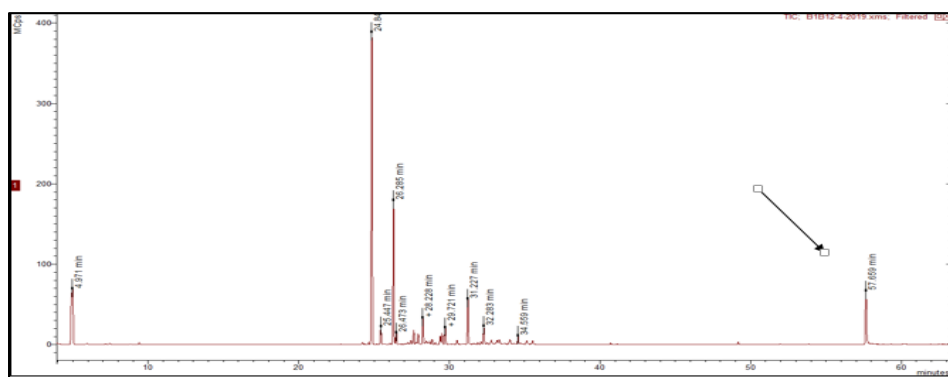


Σχήμα 35: Συγκέντρωση (mg/ml e.o) α-Pinene στα δείγματα *C.sativa* L.

Συνολικά για την ποικιλία A, Fedora τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.

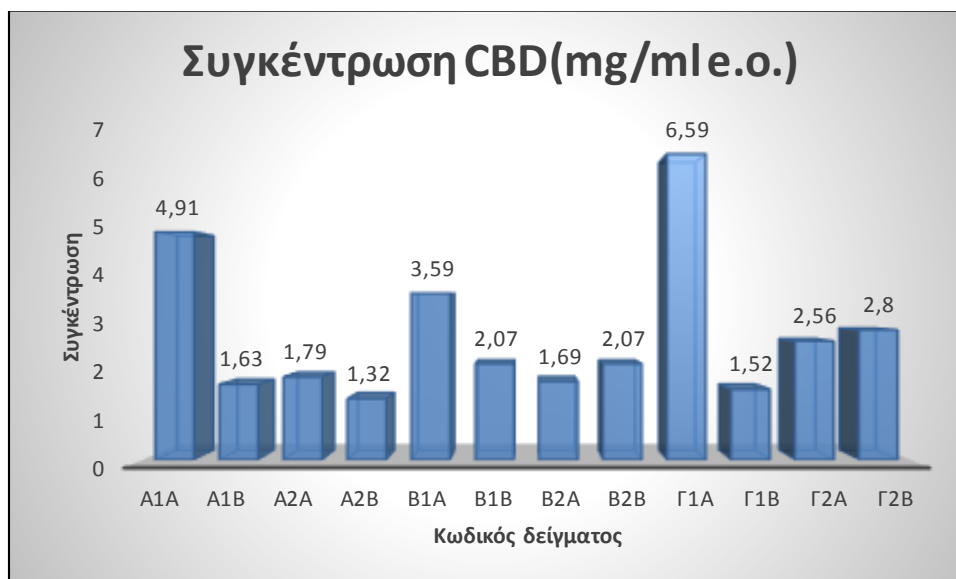


Σχήμα 36: Συγκέντρωση (mg/ml e.o.) συστατικών στα δείγματα της ποικιλίας A, Fedora. Εκτός από τα πτητικά συστατικά σε όλα τα δείγμα που αναλύθηκαν, και από τις τρεις ποικιλίες ανιχνεύθηκε σε σημαντικά ποσοστά η κανναβιδιόλη (CBD). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα δείγματα, η κανναβιδιόλη εμφανίζεται στα χρωματογραφήματα κοντά στα 58 min λόγω της πολικότητας του μορίου. Πρώτα εκλούνται τα τερπένια, ως άπολες ενώσεις και έπειτα η κανναβιδιόλη που παρουσιάζει μεγαλύτερη πολικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στα αιθέρια έλαια (**Εικ.37**).



Εικόνα 37 : Η κορυφή της κανναβιδιόλης σε αέριο χρωματογράφημα δείγματος της ποικιλίας A, Fedora

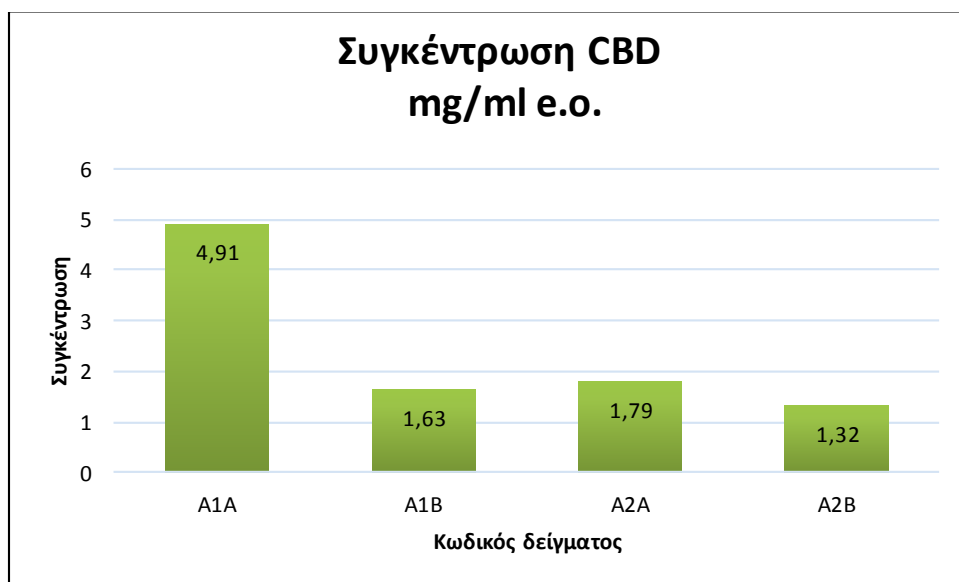
Ποσοτικά η συγκέντρωση της κανναβιδιόλης έδειξε να επηρεάζεται από την διαφορετική λίπανση που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δείγμα και όχι τόσο από την ποικιλία. Παρατηρούμε ότι στο δείγμα Γ1α ανιχνεύτηκε η κανναβιδιόλη σε συγκέντρωση 6,59mg/mL ελαίου (14,9%), ποσότητα αρκετά μεγαλύτερη από ότι στα υπόλοιπα δείγματα (Σχήμα 38).



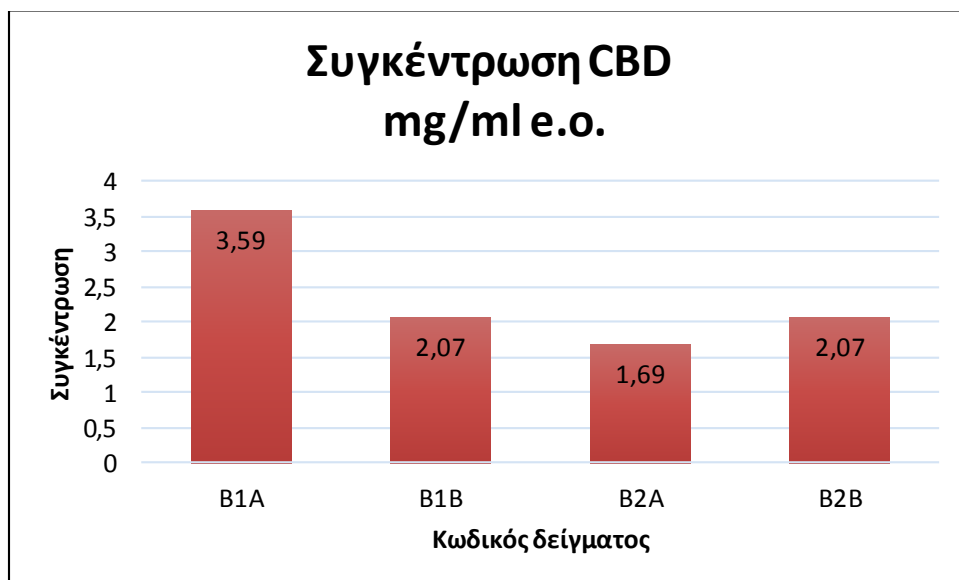
Σχήμα 38: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των δειγμάτων *C.sativa* L.

Χαμηλότερη ποσότητα κανναβιδιόλης (CBD) ταυτοποιήθηκε στο δείγμα A2β της ποικιλίας A με ποσότητα 1,32mg/mL ελαίου (5,37%). Στα ποσοστά της κανναβιδιόλης δεν υπήρχαν αξιοσημείωτες διαφορές αλλά είναι εμφανές ότι τα δείγματα της ποικιλίας Γ παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά. Όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα, τα δείγματα που καλλιεργήθηκαν με ελληνική λίπανση και έχουν το κωδικό 1 δίνουν μεγαλύτερες ποσότητες κανναβιδιόλης σε σχέση με τα δείγματα με καναδική λίπανση και τον κωδικό 2 (Σχήμα 39,40,41). Για να ελεγχθεί αν οι παράγοντες ποικιλία και λίπανση επηρεάζουν σημαντικά την συγκέντρωση της κανναβιδιόλης (CBD) στο αιθέριο έλαιο των δειγμάτων έγινε στατιστικός έλεγχος με το πρόγραμμα Statgraphics. Αρχικά εφαρμόστηκε shapiro-wilk test με βάση τα υπόλοιπα (residuals) για να ελεγχθεί αν αυτά

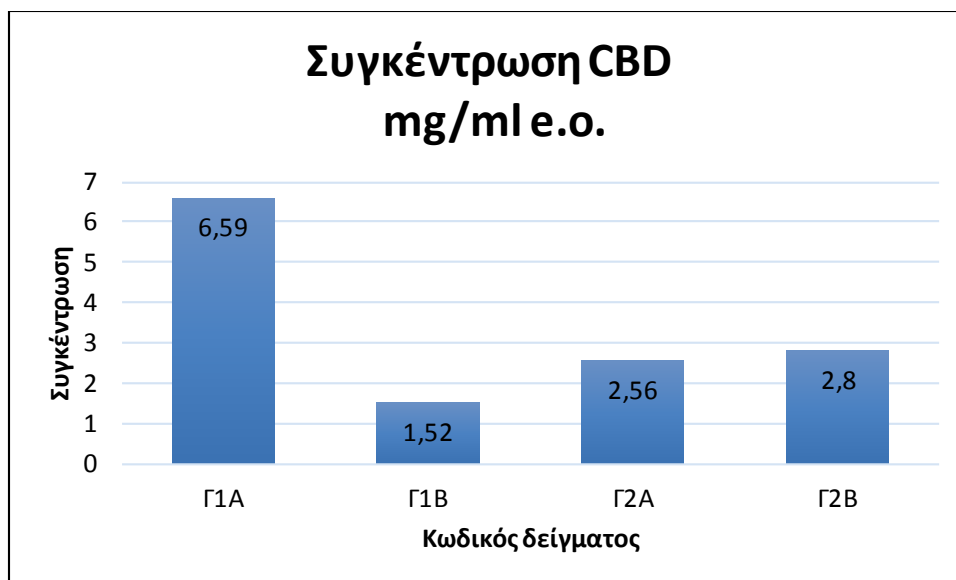
τα σφάλματα ακολουθούν κανονική κατανομή. Το shapiro-wilk test έδωσε p-value: 0,709 σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, άρα δεν μπορεί να απορριφθεί η υπόθεση ότι τα δείγματα ανήκουν σε κανονικό πληθυσμό. Από το διάγραμμα υπολοίπων είναι προφανές ότι τα σφάλματα δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους και το νέφος σημείων δημιουργεί κάποιο μοτίβο γύρω από τον αριζόντιο άξονα άρα δεν ικανοποιείται η συνθήκη της ομοσκεδαστικότητας και δεν υπάρχει σταθερή διακύμανση. Επόμενως, επιλέχθηκε να εφαρμοστεί μη παραμετρικό τεστ. Δεν υπάρχει αντίστοιχο μη παραμετρικό τεστ για δύο παράγοντες έτσι εφαρμόστηκε kruskal wallis test για κάθε παράγοντα ξεχωριστά. Το kruskal wallis test σχετικά με τη ποικιλία έδωσε p-value: 0,549 σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, και αντίστοιχα για το παράγοντα λίπανση p-value: 0,377. Συνεπώς και οι δύο παράγοντες δεν έδειξαν να επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την ποσότητα της κανναβιδιόλης (CBD) στα αιθέρια έλαια.



Σχήμα 39: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των τεσσάρων δειγμάτων από την ποικιλία A, Fedora



Σχήμα 40: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των τεσσάρων δειγμάτων από την ποικιλία B, Felina



Σχήμα 41: Συγκέντρωση CBD (mg/ml e.o) των τεσσάρων δειγμάτων από την ποικιλία Γ, Futura

Ανάλογο συμπέρασμα δεν προκύπτει για τα σесκιτερπένια καθώς δεν υπάρχουν έντονες διαφορές ανάμεσα στα δείγματα.

Παρατηρώντας τις ποσοτικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει απόλυτη επαναληψιμότητα μεταξύ της α και β επανάληψης κάθε δείγματος. Τέτοια ανομοιογένεια μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη μεταχείριση των δειγμάτων είτε κατά την καλλιεργητική επεξεργασία, είτε κατά την συγκομιδή είτε κατά τη διαδικασία ανάλυσης.

Οι χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στο παράρτημα (παράρτημα Δ).

Η κυριαρχία των σесκιτερπενίων στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων *Cannabis sativa* L. συμφωνεί με την μελέτη των Satyal et al., το 2014 οι οποίοι ταυτοποίησαν με GC-MS ανάλυση τουλάχιστον 107 συστατικά που αντιπροσωπεύει το 94,2% της σύνθεσης από αιθέριο έλαιο που παρέλαβαν με υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger και απόδοση 0,5mL. Η ανάλυση του GC-MS έδειξε ότι ο χημειότυπος του Νεπάλ χαρακτηρίζεται από την κυριαρχία των σесκιτερπενοειδών σε ποσοστό 68,1% με κυρίαρχο το (E)-Caryophyllene (20,4%). Ακολουθούν σε μικρότερα ποσοστά το α-Humulene (7,0%) και η α-Bisabolol (5,8%). Σε πολύ μικρό ποσοστό ανιχνεύθηκαν τα μονοτερπένια (0,9%).

Στη συγκεκριμένη μελέτη ταυτοποιήθηκαν σε μικρά ποσοστά μονοτερπένια όπως οι παρακάτω ενώσεις: α -Pinene, Myrcene, Sabinene, Borneol, ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις ή και σε ίχνη στη παρούσα μελέτη.

Αργότερα, το 2017 στο Πακιστάν, οι Naz et al. πραγματοποίησαν ανάλυση των ελαίων με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών. Τα ποσοστά των συστατικών διαφέρουν ανάλογα την μέθοδο παραλαβής που χρησιμοποίησαν. Και στις τρεις περιπτώσεις το κύριο συστατικό ήταν το (E)-Caryophyllene με μέγιστο ποσοστό 45,8% στην περίπτωση της υδροαπόσταξης και σε ποσοστό 8,7% το α -Humulene. Σε συμφωνία με τη συγκεκριμένη μελέτη σε πολύ μικρότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν τα μονοτερπένια., αντίθετα η κανναβιδιόλη (CBD) δεν ανιχνεύθηκε.

Με μια διαφορετική μέθοδο, την SPME παρέλαβαν το έλαιο οι Rather et al., το 2011 και έπειτα έγινε η ανάλυση με GC-FID. Ταυτοποιήθηκαν ενώσεις σε ποσοστό 96,1%. Και η μελέτη αυτή συμφωνεί με την παρούσα αφού κυριαρχούν τα σεσκιτερπένια με ποσοστό 64,3%, με κυριότερη ένωση το (E)-Caryophyllene σε ποσοστό 36,9% και δεύτερη ένωση α -Humulene (16,2%).

Σε αντίθεση έρχεται η μελέτη του Benelli, το 2018 όπου τα μονοτερπένια βρέθηκαν να κυριαρχούν σε ποσοστό 54%. Η μελέτη αυτή συμφωνεί με αυτή του Darporto et al.,2014 καθώς το (E)-Caryophyllene ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 23,8%. Ακολουθεί το α -Pinene σε ποσοστό 16,4%. Ως τελευταία ένωση κατάφεραν να ταυτοποιήσουν την κανναβιδιόλη (CBD) σε ποσοστό 0,1%.

Οι ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές ανάμεσα στις παραπάνω μελέτες και στην παρούσα οφείλονται στη διαφορά των ποικιλιών, στις καλλιεργητικές τεχνικές με τις οποίες έχουν επεξεργαστεί τα διάφορα δείγματα, στις τεχνικές παραλαβής των αιθερίων ελαίων και τέλος στις διαφορετικές κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες με τις οποίες καλλιεργήθηκαν τα δείγματα και μπορούν να επηρεάσουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες.

Δ.4. Εκχυλίσματα *Cannabis sativa* L.

Δ.4.1 Παραλαβή φαινολικών ενώσεων από υδατικό υπόλειμμα *C.sativa* L.

Μετά το τέλος κάθε απόσταξης με συσκευή Clevenger, που περιγράφεται παραπάνω το υπόλειμμα από την σφαιρική φιάλη εκχυλίστηκε με χρήση ηθμού Buchner και έπειτα το συνολικό διήθημα φυλάχθηκε στην κατάψυξη στους -20°C για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των δύο ημερών το διήθημα λυοφιλιώθηκε (Εικ.42) ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία και να παραληφθεί σε στερεά μορφή. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για ορισμένα δείγματα.



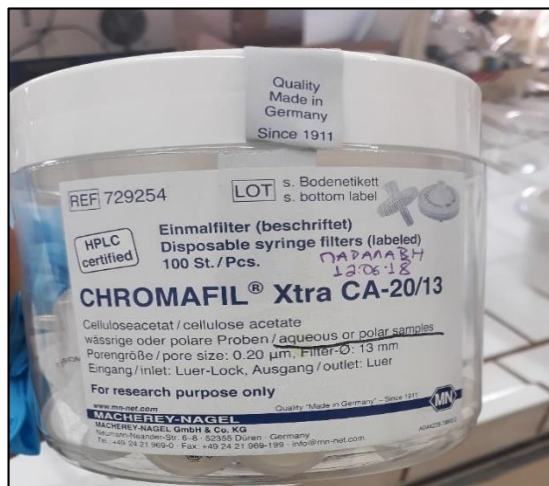
Εικόνα 42: Σύστημα λυοφιλίωσης

Επιλέχθηκαν ενδεικτικά τρία δείγματα να αναλυθούν, ένα από κάθε ποικιλία (Πίνακας 23).

Πίνακας 23: Ποικιλίες δειγμάτων

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
FEDORA	A1
FELINA	B1
FUTURA	Γ1

Τα υδατικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν αναλύθηκαν με UV-Vis. Πριν από κάθε ανάλυση έγινε μια μορφή καθαρισμού με ειδικά πολικά φίλτρα HPLC Chromafil Xtra CA-20/13(aqueous or polar samples) (Εικ.43).



Εικόνα 43: Πολικά φίλτρα HPLC Chromafil Xtra CA-20/13 (aqueous or polar samples).

Δ.4.3 Παραλαβή κανναβινοειδών από ξηρή δρόγη *C.sativa* L.

Αναλυτική πορεία

Ζυγίστηκε ποσότητα ξηρής δρόγης 2g. αφού πρώτα έχει λειοτριβηθεί από κάθε δείγμα κάνναβης και προστέθηκε σε κωνική φιάλη των 250mL (Εικ.44). Έπειτα προστέθηκε ποσότητα διαλύτη, συγκεκριμένα μεθανόλη, (20mL) και ακολούθησε η εκχύλιση του φυτικού υλικού στους υπέρηχους στους 30° για 20 min. Ακολούθησε διήθηση του φυτικού υλικού σε ηθμό Buchner και η διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλες δύο φορές. Το συνολικό διήθημα συμπυκνώθηκε στο Rotary Evaporator και φυλάχθηκε στον ξηραντήρα για 1 ημέρα, αφού πρώτα είχε ζυγιστεί (Εικ.45). Τέλος ζυγίστηκε ξανά μετά την ξήρανσή του και παραλήφθηκε σε 3mL από τον αρχικό διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε και φυλάχθηκε στους -20°C, μέχρι την ανάλυση.



Εικόνα 44: Διήθηση με ηθμό Buchner



Εικόνα 45: Rotary Evaporator

Τα μεθανολικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν αναλύθηκαν με UV-Vis. Πριν από κάθε ανάλυση έγινε μια μορφή καθαρισμού με ειδικά πολικά φίλτρα HPLC Chromafil Xtra CA-20/13 (aqueous or polar samples).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις στις τρεις επαναλήψεις των δειγμάτων (Πίνακας 24):

Πίνακας 24: Αποδόσεις σε mg εκχυλίσματος δειγμάτων *C.sativa* L.

Κωδικός δείγματος	1^η επανάληψη (mg)	2^η επανάληψη (mg)	3^η επανάληψη (mg)	Μέσος όρος
A1α	143,6	130,2	138,2	137,3±6,7
A1β	149,5	139,0	155,1	147,8±8,2
A2α	139,4	141,8	148,5	143,2±4,7
A2β	187,0	184,0	179,0	183,3±4,0
B1α	153,1	136,0	140,0	143,0±8,9
B1β	116,7	112,4	112,8	113,9±2,4
B2α	106,3	108,9	105,9	107,0±1,6
B2β	166,9	173,5	179,1	173,1±6,1
Γ1α	172,1	168,6	179,5	173,4±5,6
Γ1β	178,0	172,8	176,1	175,6±2,6
Γ2α	169,8	169,1	162,1	167,0±4,2
Γ2β	196,4	198,4	198,0	197,6±1,1

Δ.5 Ανάλυση δειγμάτων UV-Vis



Εικόνα 46: Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Όργανα και αντιδραστήρια

- ✓ Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) της εταιρείας Agilent Technologies, μοντέλο Cary 60 UV-Vis και λογισμικό CaryWinUV 5.0
- ✓ Κυψελίδα χαλαζία

Αναλυτική πορεία

- ✓ Μεθανολικά εκχυλίσματα

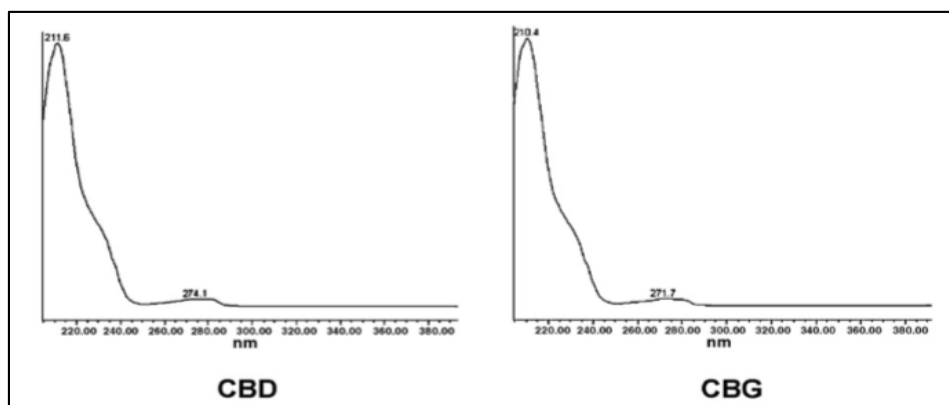
Τα δείγματα αραιώθηκαν με τον αντίστοιχο διαλύτη ώστε να έχουν συγκέντρωση 0,1mg/mL. Αρχικά μηδενίστηκε το όργανο με τη βοήθεια διαλύματος blank που περιέχει το διαλύτη εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε, δηλαδή μηδενίστηκε το όργανο με μεθανόλη και έπειτα από κάθε μηδενισμό καταγράφηκαν τα φάσματα UV-Vis των αντίστοιχων διαλυμάτων. Το εύρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν από 800-200 nm.

Τα φάσματα UV-Vis και των δειγμάτων έδειξαν έντονες κορυφές απορρόφησης στις περιοχές των 210 nm, 220 nm, 267 nm, 300 nm, 410 nm και 665 nm. Οι περιοχές 210

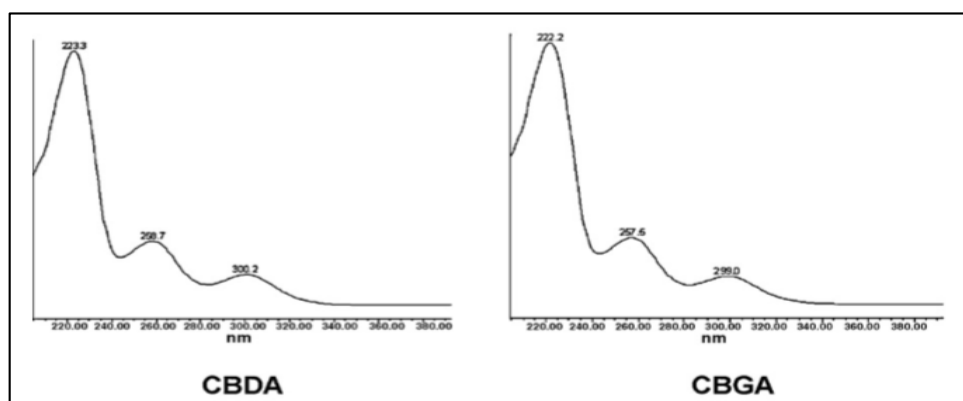
nm, 220 nm, 267 nm μας επιβεβαίωσαν με βάση τη βιβλιογραφία την ύπαρξη των κανναβινοειδών ενώσεων (Brighenti, 2017).

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα φάσματα των διαφόρων κανναβινοειδών συνήθως εμφανίζουν χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης στα 210 nm και στα 220 nm. Η απορρόφηση στα 220 nm οφείλεται στα κανναβινικά οξέα, όπως τα CBDA και CBGA, και μπορούν εύκολα να διακριθούν από τα αποκαρβοξυλιωμένα αντίστοιχα όπως τα CBD και CBG, με τα φάσματά τους UV-Vis να δίνουν μέγιστη απορρόφηση στα 210 nm (**Εικ.47&48**). Ακόμα, τα κανναβινικά οξέα δίνουν μια δεύτερη χαρακτηριστική κορυφή στα 266-270 nm και μια τρίτη περίπου στα 305 nm (De Backer et al.,2009 & Brighenti et al.,2017).

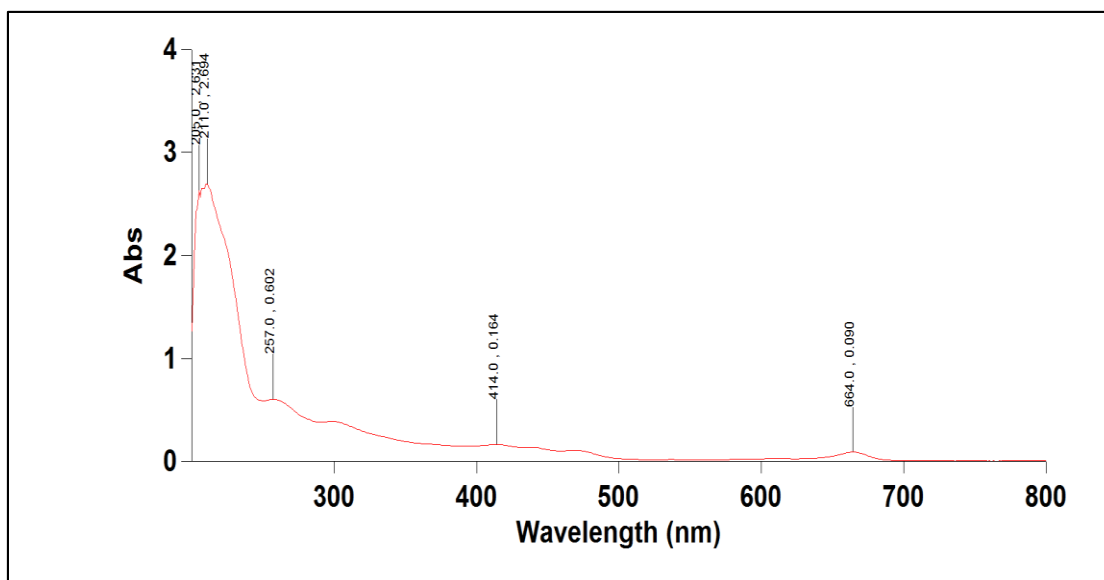


Εικόνα 47: Φάσμα UV-Vis των ενώσεων CBD και CBG (De Backer et al.,2009)



Εικόνα 48: Φάσμα UV-Vis των ενώσεων CBDA και CBGA (De Backer et al.,2009)

Τα αποτελέσματα έδειξαν έντονες κορυφές με απορρόφηση στις περιοχές 210 nm, 220 nm , 260-270 nm και στα 300-310 nm. Με βάση τη βιβλιογραφία οι περιοχές αυτές μας επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των κανναβινοειδών ενώσεων. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα UV-Vis (**Εικ.49**). Τα φάσματα των υπολοίπων δειγμάτων παρουσιάζονται αναλυτικότερα στο παράρτημα (**Παράρτημα Α**).



Εικόνα 49: Φάσμα UV-Vis δείγματος B2 εκχυλισμένο με μεθανόλη

✓ Υδατικά εκχυλίσματα

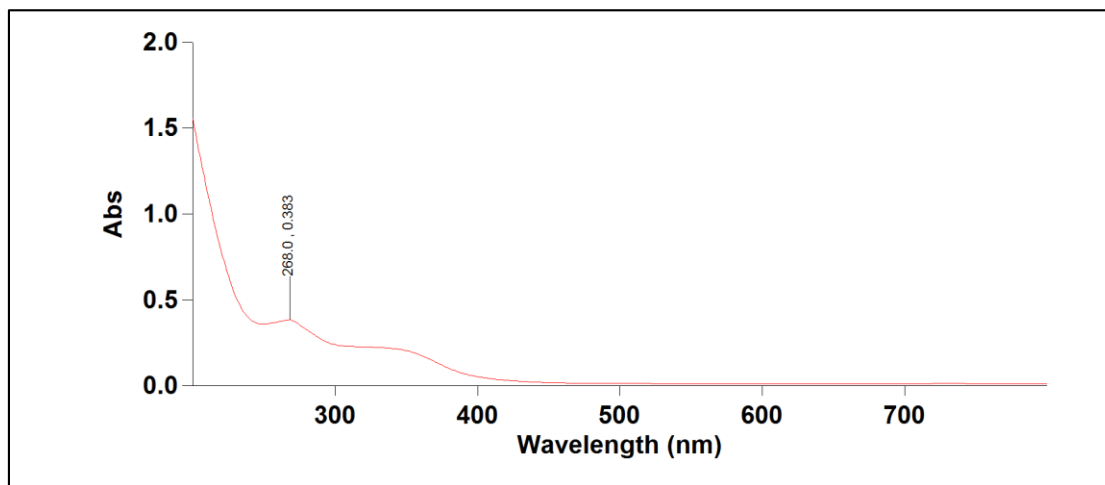
Όσον αφορά τα υδατικά υπολείμματα της υδροαπόσταξης, τα δείγματα αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό ώστε να έχουν συγκέντρωση 0,1mg/mL και το όργανο μηδενίστηκε με τον διαλύτη, δηλαδή το υπερκάθαρο νερό. Το εύρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν από 800-200 nm.

Τα αποτελέσματα ακολουθούν στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 25: Απορρόφηση των υδατικών εκχυλισμάτων *C.sativa* L.

Κωδικός δείγματος	$\lambda(\text{max})$	Abs
A1	275	0,354
B1	283	0,289
Γ1	268	0,383

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα UV-Vis (**Εικ.50**). Τα φάσματα των υπολοίπων δειγμάτων παρουσιάζονται αναλυτικότερα στο παράρτημα (**παράρτημα Α**).



Εικόνα 50: Φάσμα UV-Vis υδατικού δείγματος ποικιλίας Γ, Futura

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα φάσματα των διάφορων φαινολικών ενώσεων παρουσιάζουν χαρακτηριστικές έντονες κορυφές σε δύο ζώνες απορρόφησης. Η πρώτη ζώνη βρίσκεται στην περιοχή απορρόφησης 300-370 και αντιστοιχεί στους δακτυλίους Β και C, ενώ η δεύτερη ζώνη μεταξύ 250-300 οφείλεται στον Α δακτύλιο των φλαβονοειδών.

Τα φάσματα UV-Vis έδειξαν έντονες κορυφές απορρόφησης στις περιοχές των 250-370 nm. Οι περιοχές σε αυτά τα μήκη κύματος, μας βεβαιώνουν την ύπαρξη φλαβονοειδών ενώσεων. Στα αποτελέσματα μας παρατηρείται μικρή απορρόφηση των χαρακτηριστικών ομάδων γεγονός που δηλώνει μικρή αφθονία φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία φλαβονοειδών στα είδη *C.sativa* L. (Pellati et al., 2018).

Δ.6 Ανάλυση δειγμάτων με την τεχνική LC/Q-TOF/HRMS



Εικόνα 51: Σύστημα υγρής χρωματογραφία(LC/Q-TOF/HRMS)

Αντιδραστήρια- όργανα

- ✓ Χρωματογράφος 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
- ✓ Χρωματογραφική στήλη Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18, μήκος 100mm, εσωτερική διάμετρος 4,6nm, particle size 2,7μm
- ✓ Νερό για LC-MS
- ✓ Νερό οξινισμένο με μυρμηγκικό οξύ 0,1%
- ✓ Ακετονιτρίλιο για LC-MS
- ✓ Ακετονιτρίλιο οξινισμένο με μυρμηγκικό οξύ 0,1%

Αναλυτική πορεία

- Μεθανολικά εκχυλίσματα

Η πρότυπη ένωση που χρησιμοποιήθηκε είναι η κανναβιδιόλη (CBD) αρχικής συγκέντρωσης 4 mg/mL σε μεθανόλη LC/MS, που διατηρήθηκε την κατάψυξη στους -20°C. Η ουσία επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία, ως κύρια ουσία σε εκχυλίσματα *Cannabis sativa* L. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με βάση τη βιβλιογραφία των Pellati et al., 2018, το ίδιο και η ανάλυση LC/Q-TOF/HRMS.

Τα δείγματα αραιώθηκαν κατάλληλα ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1mg/mL.

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS ρυθμισμένο σε όγκο έκχυσης δείγματος 10μL.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανεστραμμένης φάσης όπου συνδυάστηκαν δυο διαλύτες. Ο διαλύτης Α ήταν το νερό οξινισμένο με μυρμηγκικό οξύ (0.1%), ο διαλύτης Β ήταν το ακετονιτρίλιο για LC-MS με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος (0,1%), ο διαλύτης Γ νερό για LC-MS και ο διαλύτης Δ ακετονιτρίλιο για LC-MS .

Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,94mL/min και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε Macherey-Nagel Nucleoshell Bluebird RP18, με μήκος 100 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6nm και particle size 2,7μm. Η θερμοκρασία στήλης ορίστηκε στους 30°C.

Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στη λειτουργία και θετικού και αρνητικού ιόντος ώστε να σχηματιστεί αρνητικό και θετικό ιόν, $[M-H]^+$ και $[M-H]^-$ αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ήταν 350°C, η ροή εκνέφωσης αερίου αζώτου, η πίεση αερίου ξήρανσης αζώτου ήταν 10L/min, το δυναμικό περιοχής εκνέφωσης 3500V.

Το εύρος για το κλάσμα m/z ορίστηκε μεταξύ 100-1700 και για το θετικό και για το αρνητικό ιονισμό.

Η τεχνική έκλυσης των διαλυτών που εφαρμόστηκε ήταν βαθμιδωτή ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν ως εξής:

Πίνακας 26 : Πρόγραμμα ανάλυσης LC/QTOF/HRMS

Χρόνοι	Διαλύτης A	Διαλύτης B
0min	40%	60%
8,7min	40%	60%
11,3min	20%	80%
14,7min	10%	90%
23,0min	10%	90%
25,0min	40%	60%
30,0min	40%	60%

Τα μήκη κύματος που καταγράφηκαν ήταν τα εξής: 210, 220, 300, 410, 665 nm, τα οποία επιλέχθηκαν βάση των φασμάτων UV-Vis και της βιβλιογραφίας.

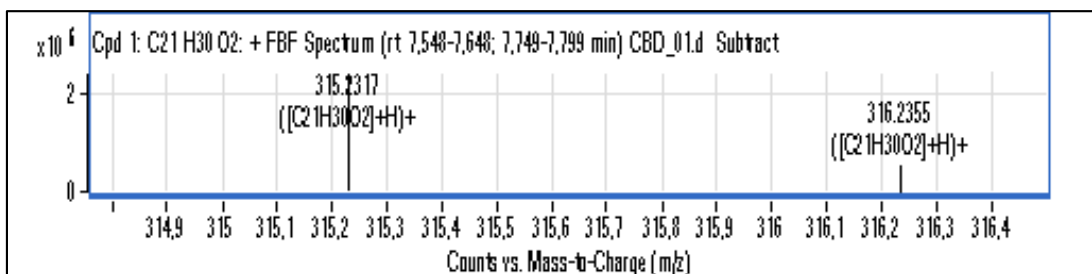
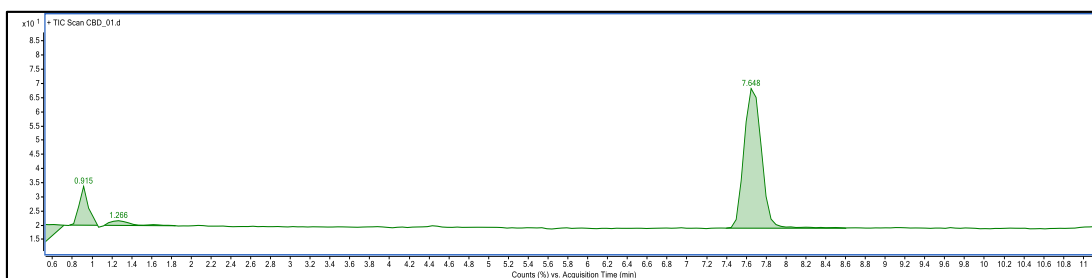
Ο ποιοτικός προσδιορισμός των κανναβινοειδών εκτιμήθηκε με βάση τον χρόνο έκλυσης (retention time) και τα φάσματα απορρόφησης της πρότυπης ουσίας, της κανναβιδιόλης από τη βιβλιογραφία, καθώς και από τα μοριακά ιόντα (m/z).

Συζήτηση και Αποτελέσματα

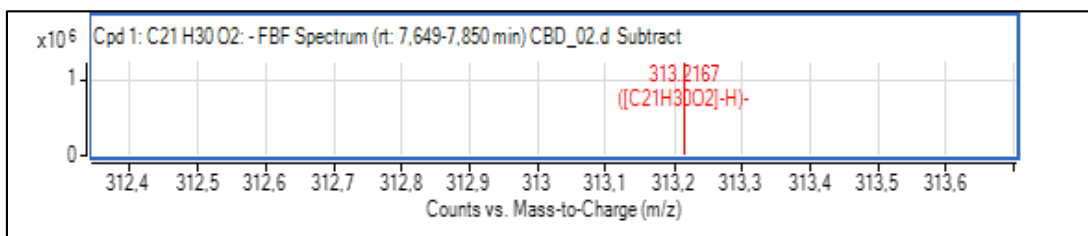
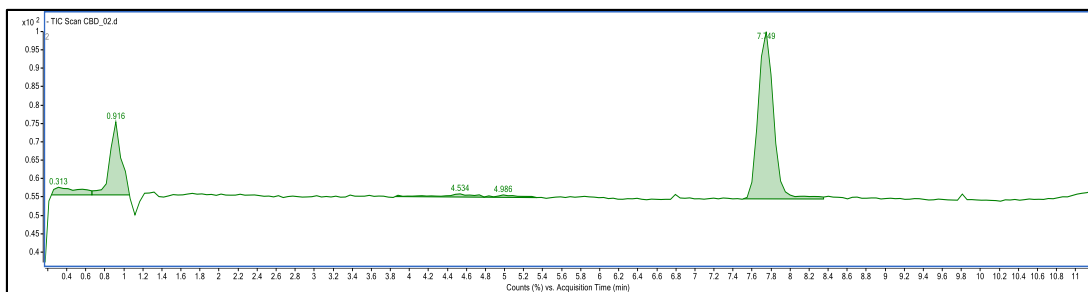
Όλα τα δείγματα καθώς και η πρότυπη ένωση, κανναβιδιόλη αναλύθηκαν με θετικό και αρνητικό ιονισμό. Στον πίνακα 27 εμφανίζονται οι πληροφορίες για την πρότυπη ουσία όπως αυτές καταγράφησαν καθώς και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα χρωματογράφημα LC/Q-TOF/HRMS (Εικ.52).

Πίνακας 27: Πληροφορίες για την πρότυπη ένωση κανναβιδιόλη

Πρότυπη ένωση	Μοριακός τύπος	RT(min)	UV-Vis(nm)	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Κανναβιδιόλη (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	7,71	210nm	315,2318	313,2168

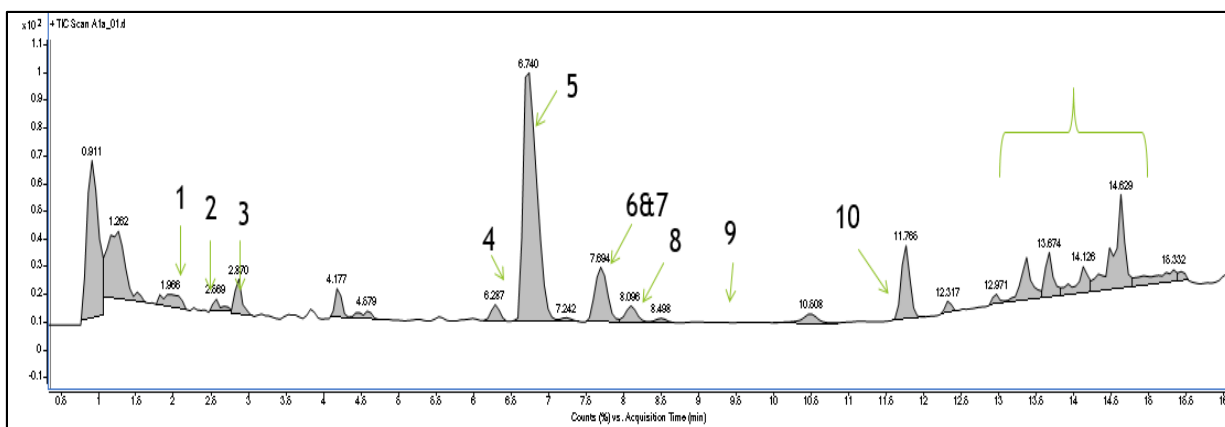


Εικόνα 52: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα και φάσμα μάζας της πρότυπης ένωσης, CBD με θετικό ιονισμό

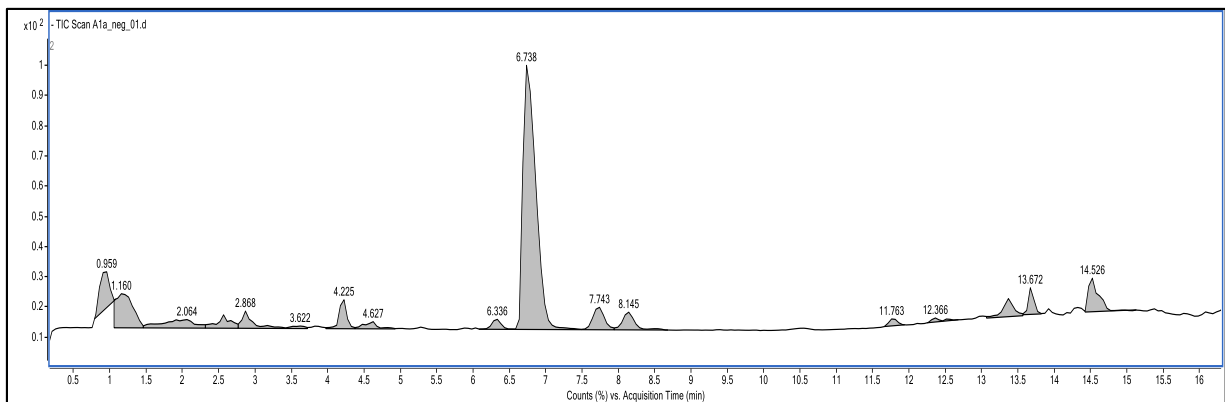


Εικόνα 53: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα και φάσμα μάζας της πρότυπης ένωσης, CBD με αρνητικό ιονισμό

Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε σε συνδυασμό του χρόνου έκλουσης καθώς και του κλάσματος m/z με την πρότυπη ένωση, την κανναβιδιόλη καθώς και άλλων ουσιών από τη βιβλιογραφία. Οι κύριες κορυφές όπως φαίνονται και στα παρακάτω χρωματογράφημα εκλούνται μετά τα 2min (**Εικ.54**). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών έγινε στα χρωματογραφήματα θετικού και αρνητικού ιονισμού. Τα χρωματογραφήματα αρνητικού ιονισμού παρουσιάζουν λιγότερες κορυφές με μικρότερη αφθονία σε σχέση με αυτά του θετικού ιονισμού. Ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος με LC όπως φαίνεται και στα δύο χρωματογραφήματα (**Εικ.54**) έχει ευρείες κορυφές οι οποίες εκλούνται για περισσότερο από 15min. Οι κορυφές αντιστοιχούν σε φλαβονοειδή και κανναβινοειδή. Αναφορικά με τα κανναβινοειδή οι κορυφές που βγαίνουν πρώτες οφείλονται στα κανναβικά οξέα και έπειτα ακολουθούν τα αποκαρβοξυλιωμένα κανναβινοειδή λόγω πολικότητας.



Εικόνα 54: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα του δείγματος A1a θετικού ιονισμού



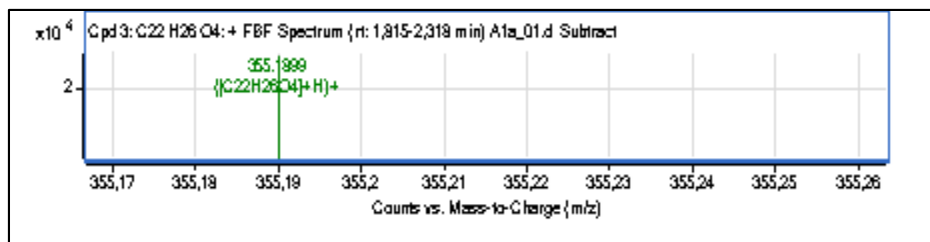
Εικόνα 55: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα του δείγματος A1a αρνητικού ιονισμού

Πίνακας 28: Σύγκριση του χρωματογραφήματος του δείγματος Α1α, θετικού ιονισμού με αυτά των πρότυπων ενώσεων και της βιβλιογραφίας

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,03	355,1899	355,1904	-1,41	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
2	2,586	369,1334	369,1332	0,54	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
3	2,887	343,1905	343,1904	0,29	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
4	6,304	437,1959	437,1959	0,00	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,750	359,2215	359,2217	-0,56	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,71	315,2316	315,2317	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,761	347,2214	347,2217	-0,86	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	8,113	361,2371	361,2373	-0,55	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
9	9,369	317,2466	317,2475	-2,84	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
10	11,18	311,2002	311,2006	-1,28	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

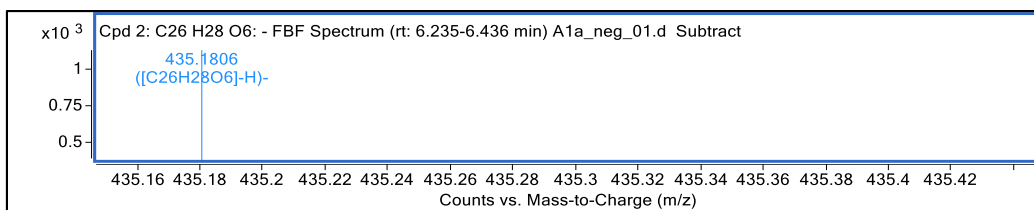
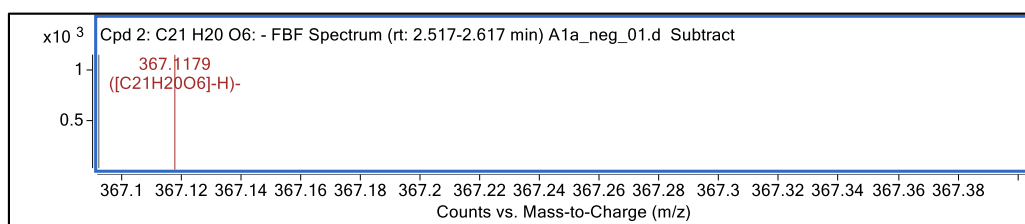
*Π=πειραματικό, Θ=θεωρητικό

Αναλυτικότερα, η κορυφή 1 με Rt=2,03min είχε [M+H]⁺ =355,1899 m/z και αποδόθηκε στο κανναβινολικό οξύ (CBNA)(**Εικ.56**). Η συγκεκριμένη ταυτοποίηση έγινε συγκριτικά με το πειραματικό και το θεωρητικό ιόν της ουσίας καθώς δεν αναλύθηκε η αντίστοιχη πρότυπη ουσία. Η ουσία αυτή ταυτοποιήθηκε και στο αντίστοιχο χρωματογράφημα αρνητικού ιονισμού με [M-H]⁻ =353,1753 m/z.



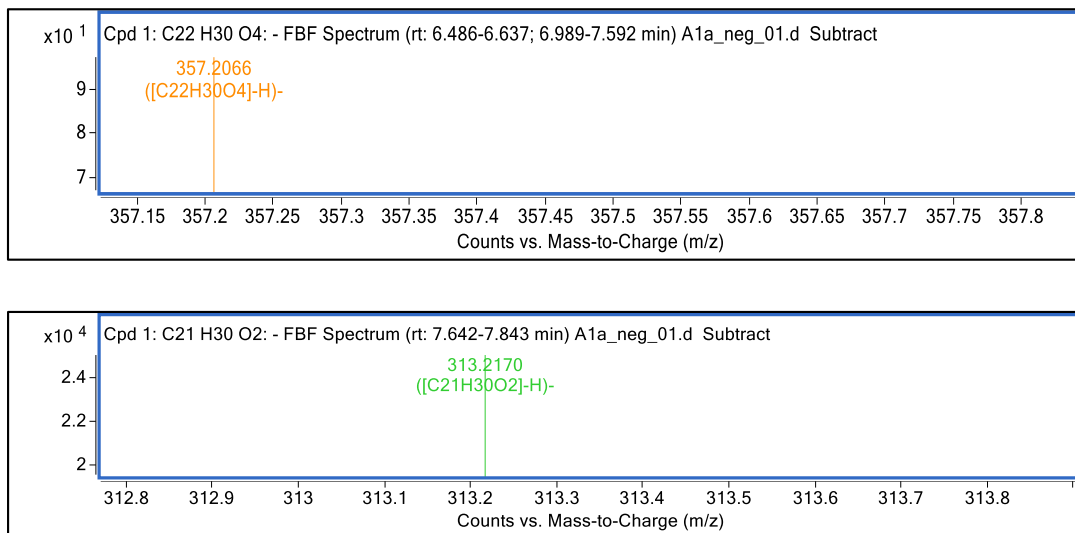
Εικόνα 56: Φάσμα μάζας θετικού ιονισμού για την κορυφή 1, κανναβινολικό οξύ (CBNA)

Στη συνέχεια η κορυφή 2 με $R_t=2,586\text{min}$ και $[M+H]^+ =369,1334\text{ m/z}$ στο θετικό ιονισμό και $[M-H]^- =367,1179\text{ m/z}$ στον αρνητικό ταυτοποιήθηκε ως καννφλαβίνη Β. Η ταυτοποίηση αυτή συμφωνεί με την μελέτη των Pellati et al., 2018, όπου αναγνώρισαν την κορυφή αυτή σε εκχυλίσματα εξανίου *C.sativa* L. διαφορετικών ποικιλιών. Επίσης, ταυτοποιήθηκε και η ισομερής ένωση καννφλαβίνη Α. Η ουσία αυτή αντιστοιχεί στην κορυφή 4 με $R_t=6,304\text{min}$. Έδωσε $[M+H]^+ =437,1959\text{ m/z}$ στο θετικό ιονισμό και $[M-H]^- =435,1806\text{ m/z}$ (Εικ.57). Το τελευταίο φλαβονοειδή που προσδιορίστηκε ήταν το καννιπρένιο. Η κορυφή 3 με $R_t=2,887\text{min}$ είχε $[M+H]^+ =343,1905\text{ m/z}$ και $[M-H]^- =341,1861\text{ m/z}$ και αποδόθηκε στο καννιπρένιο βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Pellati et al., 2018).



Εικόνα 57: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού για την κορυφή 2 και 4, καννφλαβίνη Α και Β

Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας υποδεικνύουν ότι η κορυφή 5 με $R_t=6,750\text{min}$ και $[M+H]^+ =359,2215 \text{ m/z}$, $[M-H]^- = 357,2066 \text{ m/z}$ αντιστοιχεί στο κανναβιδιολικό οξύ (CBDA), το οποίο λόγω πολικότητας εκλύεται πρώτο σε σχέση με την κανναβιδιόλη (CBD) που είναι η αποκαρβοξυλιωμένη μορφή (Brighenti et al.,2017& Pellati et al.,2018). Επιπλέον, η παρουσία κανναβικών οξέων στα δείγματα προκύπτει και από τις έντονες κορυφές στα 220 nm στα αντίστοιχα φάσματα UV-Vis της παρούσας μελέτης. Η κανναβιδιόλη (CBD) ταυτοποιήθηκε με βάση τη πρότυπη ουσία που αναλύθηκε, αλλά και τη βιβλιογραφία και αποδόθηκε στη κορυφή 6 με $R_t=7,71\text{min}$ και $[M+H]^+ =315,2316 \text{ m/z}$ στο θετικό ιονισμό και $[M-H]^- = 313,2170 \text{ m/z}$ στον αρνητικό (Εικ.58). Βάσει βιβλιογραφίας η κανναβιδιόλη εκλύεται περί τα 210 nm, κάτι που επιβεβαιώνεται και στη παρούσα μελέτη με την ανάλυση UV-Vis που προηγήθηκε.

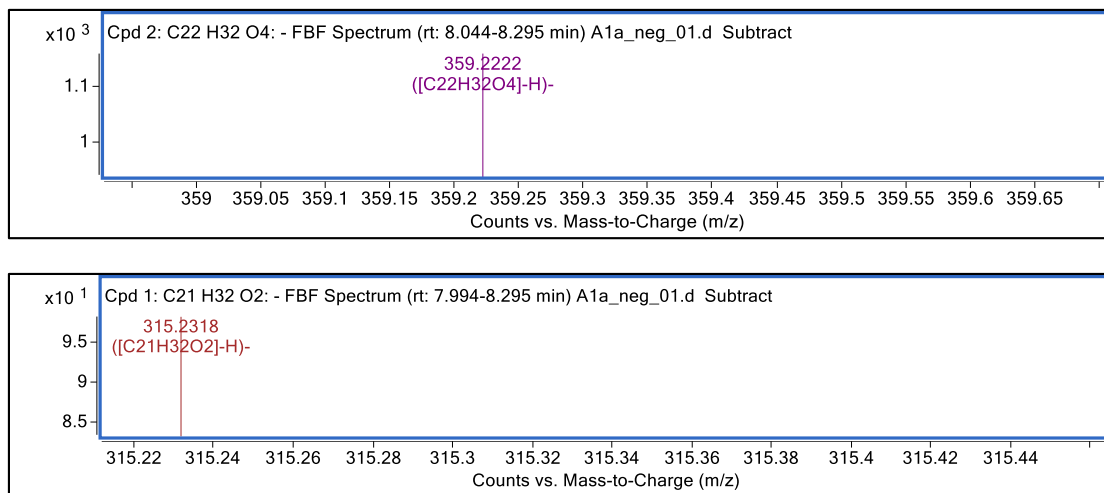


Εικόνα 58: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού για την κορυφή 5 και 6, κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και κανναβιδιόλη (CBD)

Συνεχίζοντας, η κορυφή 7 με $[M+H]^+ =347,2214 \text{ m/z}$ και $[M-H]^- = 345,2063 \text{ m/z}$ εκλύεται στα 7,760min. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένα δείγματα συνεκλύεται στον ίδιο χρόνο με την κανναβιδιόλη (CBD). Η κορυφή αυτή ταυτοποιήθηκε βιβλιογραφικά ως κανναβιτριόλη (CBT), συγκρίνοντας το πειραματικό με το θεωρητικό μοριακό ιόν που είχε τόσο στο θετικό όσο και στον αρνητικό ιονισμό.

Οι επόμενες κορυφές που ταυτοποιήθηκαν ήταν η 8 και η 9. Αναλυτικότερα, η κορυφή 8 με $[M+H]^+ = 361,2371$ m/z και $[M-H]^- = 359,2222$ m/z αποδόθηκε στο κανναβιγερολικό οξύ (CBGA). Η ταυτοποίηση της ουσίας αυτής με $RT=8,113$ min συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Brighenti et al.,2017& Pellati et al.,2018). Επιπρόσθετα, και σε αυτή τη περίπτωση το οξύ εκλύεται πρώτο σε σχέση με την κανναβιγερόλη (CBG) που ακολουθεί. Η κανναβιγερόλη (CBG) αντιστοιχεί στην κορυφή 9 με $RT=9,369$ min και $[M+H]^+ = 317,2466$ m/z, $[M-H]^- = 315,2318$ m/z (Εικ.59). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάποια δείγματα η κανναβιγερόλη (CBG) δεν ανιχνεύθηκε και σε κάποια άλλα βρέθηκε να συνεκλύεται μαζί με το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) περί τα 8min, κυρίως στα δείγματα που αναλύθηκαν με αρνητικό ιονισμό. Συνολικά όμως, η σειρά έκλυσης των συστατικών της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες (Brighenti et al.,2017& Pellati et al.,2018).

Η δέκατη κορυφή (10) με $Rt=11,8$ min είχε $[M+H]^+ = 311,2006$ m/z και $[M-H]^- = 309,1852$ m/z και αποδόθηκε με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας στην κανναβινόλη (CBN) (Stolker et al.,2004 & Aizpurua-Olaizola, 2014). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι σε κάποια χρωματογραφήματα αρνητικού ιονισμού το μοριακό ιόν της ουσίας εμφανίζεται με προσθήκη ($HCOO^-$).



Εικόνα 59: Φάσμα μάζας αρνητικού ιονισμού για την κορυφή 8 και 9, κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) και κανναβιγερόλη (CBG)

Οι κορυφές από τα 12,971min μέχρι τα 15,332min έδωσαν $[M+H]^+ = 315,2316$ m/z. Αποδόθηκαν σε κανναβινοειδή και συγκεκριμένα στην κανναβικυκλόλη (CBL), την κανναβιχρωμίνη (CBC) και η τετραυδροκανναβινόλη (THC) (Aizpurua-Olaizola, 2014 & Gul et al.,2018).Ο ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών αυτών δεν μπόρεσε να γίνει με βεβαιότητα καθώς δεν αναλύθηκαν οι αντίστοιχες πρότυπες ουσίες και δεν ακολούθησε ανάλυση MS/MS ώστε να προκύψουν τα θραύσματα κάθε μίας ουσίας και να ταυτοποιηθεί. Παρ'όλα ταύτα επιβαιώθηκε η παρουσία των ενώσεων αυτών στα δείγματα που αναλύθηκαν. Οι πίνακες με τις ουσίες που αναγνωρίστηκαν στον αρνητικό ιονισμό, καθώς και τα φάσματα μάζας όλων των συστατικών παραθέτονται στο παράρτημα Γ.

Συνολικά, δεν προκύπτει κάποιο αξιόλογο συμπέρασμα από μικρές διαφορές που εντοπίστηκαν στον ποιοτικό προσδιορισμό των ουσιών, καθώς αυτές δεν μπορούν να αποδοθούν στις διαφορετικές ποικιλίες και λιπάσεις που χρησιμοποίησαν στα δείγματα.

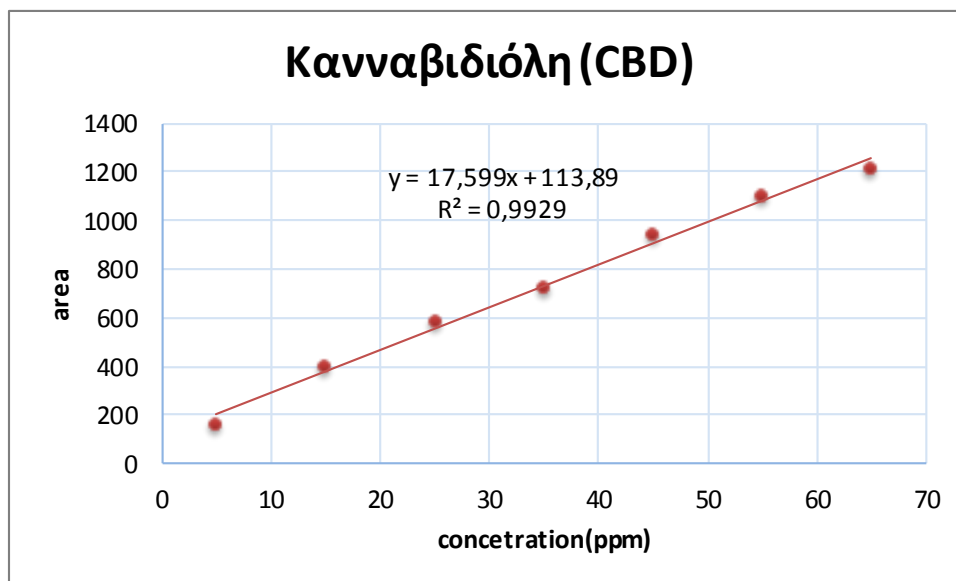
Τέλος, οι κορυφές στα χρωματογραφήματα LC/Q-TOF/HRMS που δεν ταυτοποιήθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως άγνωστες.

Δ.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός κανναβιδιόλης σε μεθανολικά εκχυλίσματα *C.sativa* L.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της κανναβιδιόλης στα εκχυλίσματα *C.sativa* L. κατασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεων κανναβιδιόλης. Για την συγκεκριμένη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε εμπορική κανναβιδιόλη και οι ποσότητες επιλέχθηκαν βάση των εμβადόν της κάθε κορυφής στα δείγματα που αναλύθηκαν.

Αρχικά, παρασκευάστηκε stock διάλυμα κανναβιδιόλης αραιωμένο με μεθανόλη 4mg/mL (4000ppm). Έπειτα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα με συγκεντρώσεις 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 (μg/mL) με τις κατάλληλες αραιώσεις.

Η ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων έγινε με τον χρωματογράφο το 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS με το ίδιο πρόγραμμα ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα και περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις κανναβιδιόλης στα εκχυλίσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της κανναβιδιόλης (Εικ.60).



Εικόνα 60: Πρότυπη καμπύλη κανναβιδιόλης (CBD)

Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 29**), μετά την ταυτοποίηση των συστατικών, υπολογίστηκαν με βάση την καμπύλη αναφοράς οι ποσότητες κανναβιδιόλης που ανιχνεύθηκαν στα δώδεκα δείγματα *C.sativa* L.

Πίνακας 29: Ποσότητες κανναβιδιόλης (mg/g. φυτικού υλικού) σε δείγματα *C.sativa* L.

Δείγματα	Ποσότητα κανναβιδιόλης (CBD)
A1α	1,92±0,15
A1β	3,76±0,14
A2α	1,39±0,05
A2β	1,57±0,2
B1α	2±0,05
B1β	2,55±0,07
B2α	2,2±0,19
B2β	1,36±0,05
Γ1α	2,58±0,09
Γ1β	3,02±0,12
Γ2α	2,58±0,1
Γ2β	1,85±0,21

Κατά την πειραματική διαδικασία έγινε ο ποσοτικός προσδιορισμός της κανναβιδιόλης με βάση την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Το εύρος της καμπύλης αναφοράς είναι 5-65 $\mu\text{g/mL}$, με εξίσωση $y=(17,6\pm 0,66)x+(113,89\pm 26,78)$ και γραμμικότητα $r^2=0,9929$, $n=7$.

Πίνακας 30: Παράμετροι της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης

	coefficients	stadard error	statistic	p-value
intercept	113,892	26,7827	4,25245	0,0081
slope	17,5987	0,664397	26,4883	0

Πίνακας 31: Παράμετροι γραμμικότητας της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης

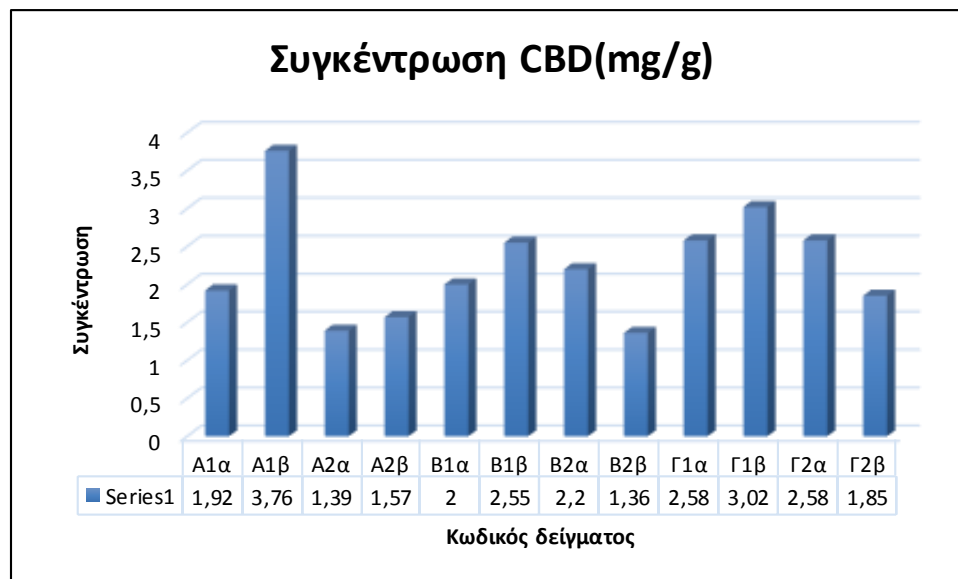
Multiple R	0,996456
R Square	99,29%
Adjusted R Square	99,15%
Stadard Error	35,1566

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Παρακάτω παρουσιάζονται συνολικά οι περιεκτικότητες σε κανναβιδιόλη των δειγμάτων που αναλύθηκαν (**Σχήμα 61**). Οι ποσότητες κυμαίνονται από 1,36mg/g φυτικού υλικού μέχρι 3,76mg/g φυτικού υλικού.

Μεγαλύτερη ποσότητα κανναβιδιόλης ανιχνεύθηκε στο δείγμα A1β της ποικιλίας A, Fedora το οποίο καλλιεργήθηκε με ελληνική λίπανση, ενώ λιγότερη ποσότητα στο δείγμα B2β, της ποικιλίας B, Felina στο οποίο χρησιμοποιήθηκε канаδική λίπανση. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στις ποσότητες κανναβιδιόλης στα δείγματα που αναλύθηκαν. Ωστόσο τα δείγματα που καλλιεργήθηκαν με ελληνική λίπανση παρουσίασαν αυξημένες ποσότητες κανναβιδιόλης σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα με την канаδική λίπανση. Αντίστοιχο συμπέρασμα δεν προκύπτει για τις ποικιλίες. Συνολικά, τα δείγματα της ποικιλίας Γ, Futura βρέθηκαν να έχουν την μεγαλύτερη ποσότητα κανναβιδιόλης. Συμπερασματικά, οι διαφορές σχετικά με την λίπανση ενδεχομένως να επηρεάσουν την συγκέντρωση της κανναβιδιόλης στο φυτικό

υλικό. Για να επιβεβαιωθεί μία τέτοια υπόθεση έγινε στατιστικός έλεγχος με το πρόγραμμα Statgraphics. Αρχικά εφαρμόστηκε shapiro-wilk test με βάση τα υπολοίπα (residuals) για να ελεγχθεί αν αυτά τα σφάλματα ακολουθούν κανονική κατανομή. Το shapiro-wilk test έδωσε p-value: 0,969 σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, άρα δεν μπορεί να απορριφθεί η υπόθεση ότι τα δείγματα ανήκουν σε κανονικό πληθυσμό. Από το διάγραμμα υπολοίπων είναι προφανές ότι τα σφάλματα δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους και το νέφος σημείων δημιουργεί κάποιο μοτίβο γύρω από τον αριζόντιο άξονα άρα δεν ικανοποιείται η συνθήκη της ομοσκεδαστικότητας και δεν υπάρχει σταθερή διακύμανση. Επόμενος, επιλέχθηκε να εφαρμοστεί μη παραμετρικό τεστ. Δεν υπάρχει αντίστοιχο μη παραμετρικό τεστ για δύο παράγοντες έτσι εφαρμόστηκε kruskal wallis test για κάθε παράγοντα ξεχωριστά. Το kruskal wallis test σχετικά με τη ποικιλία έδωσε p-value:0,369 σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, και αντίστοιχα για το παράγοντα λίπανση p-value:0,044. Συνεπώς ο παράγοντας ποικιλία δεν επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την ποσότητα της κανναβιδιόλης (CBD) στα δείγματα, όμως ο παράγοντας λίπανση φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικός.



Σχήμα 61: Συγκέντρωση κανναβιδιόλης (mg/g.φυτικού υλικού) σε δείγματα *C.sativa* L.

Το 2017, σε μελέτη που έγινε στην Ιταλία, οι Brighenti et al., ανέλυσαν εννέα δείγματα *C.sativa* L. που προέρχονται από εννέα διαφορετικές ποικιλίες. Προσδιόρισαν την ποσότητα κανναβιδιόλης σε ξηρή δρόγη του φυτικού υλικού. Σε πρώτο στάδιο έγινε εκχύλιση των κανναβινοειδών με αιθανόλη και αφού ταυτοποιήθηκαν κάποια κανναβινοειδή αναμεσά τους και η κανναβιδιόλη με ανάλυση HPLC-ESI-MS-MS, σε δεύτερο στάδιο υπολόγισαν την ποσότητα της κανναβιδιόλης σε mg/g. ξηρού φυτικού υλικού. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 32: Ποσότητα mg/gr κανναβιδιόλης σε δείγματα *C.sativa* L. (Brighenti et al.,2017)

Κωδικός δείγματος	Ποικιλία	Προέλευση	Ποσότητα κανναβιδιόλης (CBD)
C1	Futura 75	Γαλλία	3,2±0,2
C2	Felina 32	Γαλλία	4,4±0,4
C3	Fedora 17	Γαλλία	3,4±0,3
C4	Bernabeo	Γαλλία	2,9±0,1
C5	Carmaleonte	Ιταλία	2,2±0,3
C6	Codimono	Ιταλία	4,6±0,1
C7	Carmagnola	Ιταλία	23,9±0,4
C8	2077/12	Ιταλία	9,7±1,4
C9	Erno	Ιταλία	0,1

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά της παρούσας μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία. Στα πρώτα τρία δείγμα C1, C2, C3, των ποικιλιών Futura, Felina και Fedora αντίστοιχα οι ποσότητες της κανναβιδιόλης κυμαίνονται από 3,2 μέχρι 4,4mg/g φυτικού υλικού.

Αντίστοιχες ποσότητες κανναβιδιόλης ταυτοποιήθηκαν και στα δείγματα που αναλύθηκαν στην συγκεκριμένα μελέτη και προέρχονται από τις ίδιες ποικιλίες Futura, Felina και Fedora. Αναλυτικότερα, τα δείγματα της ποικιλίας Futura περιέχουν κανναβιδιόλη από 1,85 μέχρι 3,02mg/g, τα δείγματα της ποικιλίας Felina από 1,36 μέχρι 2,55mg/g και τέλος τα δείγματα της ποικιλίας Fedora από 1,57 μέχρι 3,76 mg/g φυτικού υλικού. Συμπερασματικά, υπάρχει μικρή απόκλιση όσον αφορά τα ποσοτικά αποτελέσματα. Τέτοιες διαφορές πιθανόν να οφείλονται στη διαφορετική χώρα προέλευσης καθώς τα παραπάνω δείγματα προέρχονται από τη Γαλλία, ενώ τα δείγματα της παρούσας ανάλυσης από την Ελλάδα. Ακόμα, τέτοιες διαφορές μπορεί να προκύψουν από τις διαφορετικές καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν στα δείγματα.

Το 2018, οι Pellati et al., σε έρευνα που πραγματοποίησαν σε δείγματα *C.sativa* διαφορετικών ποικιλιών (**Πίνακας 33**) υπολόγισαν τις ποσότητες κανναβιδιόλης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κοινά στοιχεία του προγράμματος ανάλυσης στο χρωματογράφο 6530 Agilent Accurate-Mass Q-TOF LC/MS με εκείνα των Pellati, 2018.

Πίνακας 33: Ποσότητα mg/g κανναβιδιόλης σε δείγματα *C.sativa* L. (Pellati et al.,2018)

Δείγμα	Ποικιλία	Ποσότητα κανναβιδιόλη (CBD)
C1	Antal	1,9±0,2
C2	Carma	5,9±0,4
C3	Carmagnola	6,3±0,3
C4	China	5,9±0,1
C5	Codimono	8,6±0,5
C6	Fibrante	6,4±0,4

Παρατηρούμε ότι οι ποσότητες κανναβιδιόλης που προσδιόρισαν οι Pellati et al., το 2018 είναι πιο αυξημένες σε σχέση με αυτές που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Το

γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στις διαφορετικές ποικιλίες που αναλύθηκαν, είτε στις διαφορετικές καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν στα δείγματα, είτε σε περιβαντολλογικούς παράγοντες όπως το κλίμα, το έδαφος κ.ά. Παρ'όλα ταύτα τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις από την μελέτη των Pellati et al.,2018.

Δ.7 Προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών ενώσεων των υδατικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος. Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το Folin Ciocalteu μόνο υπο βασικές συνθήκες γι αυτό η αντίδραση πραγματοποιείται με διάλυμα ανθρακικού νατρίου. Η αντίδραση αυτή υποστηρίζει τον μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίου. Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού η καφεικού οξέος.

Όργανα- αντιδραστήρια

- ✓ φασματοφωτόμετρο UV-VIS, μοντέλο Jasco V-550
- ✓ Κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής (1cm)
- ✓ Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu 2N
- ✓ Διάλυμα ανθρακικού νατρίου 7,5%

Αναλυτική πορεία

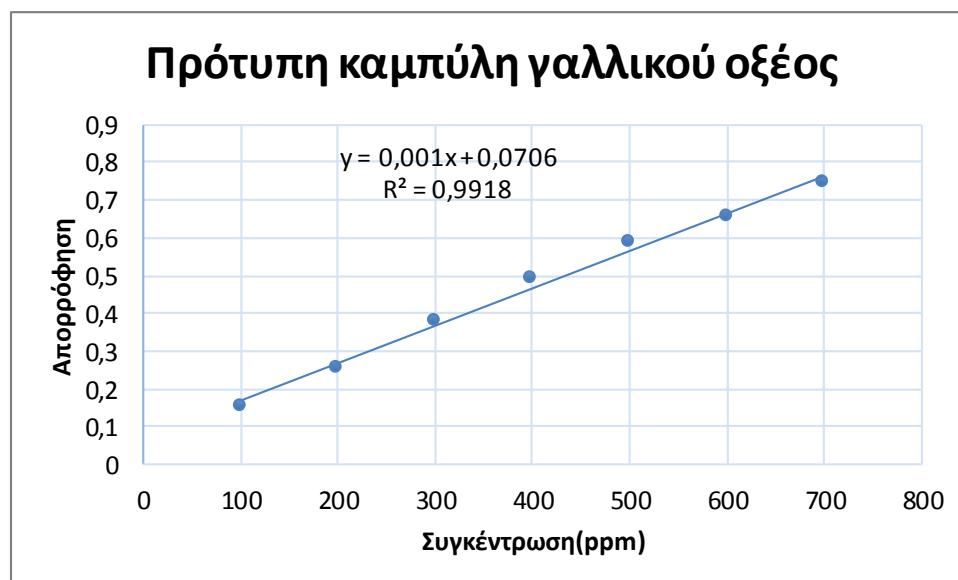
Σε vials προστέθηκαν 450μL απιονισμένο νερό, 50 μL δείγματος και 2,5mL από το διάλυμα Folin-Ciocalteu 2N και αναδεύτηκαν. Μετά από δύο λεπτά προστέθηκαν 2 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου 7,5%. Μετά από καλή ανάδευση τα vials φυλλάχθηκαν σε σκοτεινό περιβάλλον και η επώαση διήρκησε 1,5h. Έπειτα μετρήθηκαν οι απορρόφησεις στα 765 nm με το φασματοφωτόμετρο UV-VIS, μοντέλο Jasco V-550 (Εικ.62). Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με διάλυμα που παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία μόνο που αντί για δείγμα προστέθηκε απιονισμένο νερό.



Εικόνα 62: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS, μοντέλο Jasco V-550

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία. Με βάση την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών εκφρασμένα ως (mg/mL) γαλλικού οξέος (**Εικ.63**).



Εικόνα 63: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

Αποτελέσματα

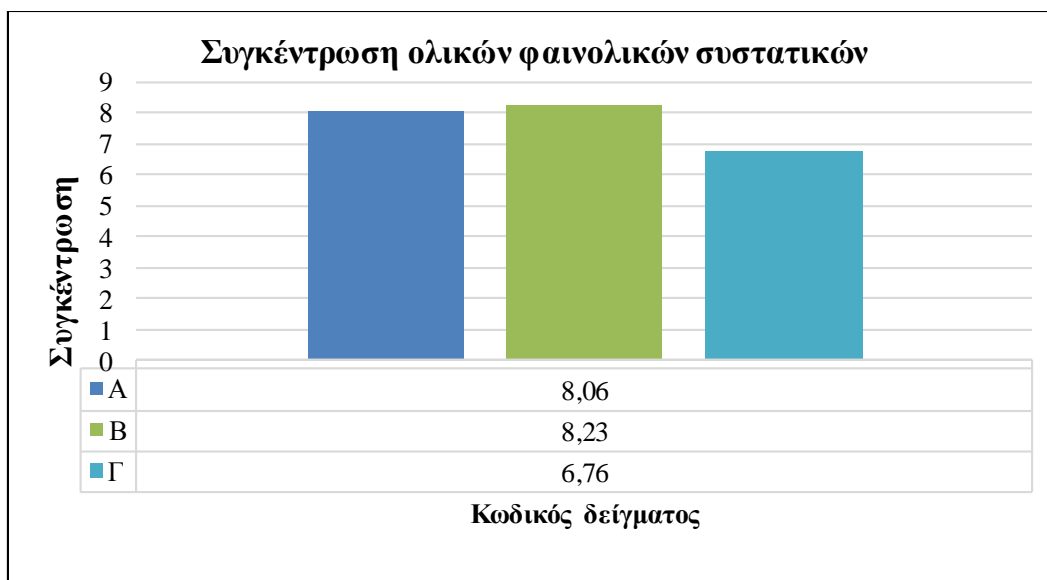
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου των τριών επαναλήψεων των απορροφήσεων και η συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά των τριών υδατικών διαλυμάτων. Στα αποτελέσματα έχει υπολογισθεί και η τυπική απόκλιση (SD).

Πίνακας 34: Τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών στα υδατικά εκχυλίσματα *C.sativa* L.

Δείγμα	Ποικιλία	A ₇₆₅ ±SD	C(mg/mL)
A1	Fedora	0,473±0,01	8,06±0,19
B1	Felina	0,482±0,009	8,23±0,19
Γ1	Futura	0,407±0,003	6,76±0,06

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών των υδατικών εκχυλισμάτων (**Εικ.64**). Τα αποτελέσματα κυμαίνονται μεταξύ 6,76 και 8,23mg/mL. Ειδικότερα το υδατικό υπόλειμμα που προέκυψε μετά την απόσταξη δείγματος ποικιλίας A έδωσε περιεκτικότητα ολικών φαινολικών συστατικών 8,06 mg/ml, της ποικιλίας B 8,23 mg/mL και την χαμηλότερη περιεκτικότητα η ποικιλία Γ με 6,76 mg/mL. Είναι εμφανές ότι δεν υπάρχουν αξιόλογες διαφορές ανάμεσα στα τρία δείγματα που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες. Συμπερασματικά, ο παράγοντας ποικιλία δεν επηρεάζει τόσο την ποσότητα των ολικών φαινολικών συστατικών στα υδατικά υπολείμματα που αναλύθηκαν.



Σχήμα 64: Συγκέντρωση (mg/mL) ολικών φαινολικών συστατικών δειγμάτων *C.sativa* L.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συγκρίθηκαν με την μελέτη των Ahmed et al., το 2019, οι οποίοι έκαναν εκχυλίσεις με διαφορετικούς διαλύτες αναμεσά τους και το νερό. Ειδικότερα στο υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε υπολογίσθηκαν τα ολικά φαινολικά συστατικά $29,98 \pm 0,56$ mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο φυτικού υλικού. Η εκχύλιση με νερό έδωσε καλά αποτελέσματα όσον αφορά τα ολικά φαινολικά συστατικά, όμως ο καλύτερος διαλύτης αποδείχθηκε η μεθανόλη με $36,42 \pm 1,91$ mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο φυτικού υλικού. Τέλος, η εκχύλιση με μεθανόλη έδωσε τη μέγιστη απόδοση σε φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά ακολουθούμενη από την εκχύλιση με απεσταγμένο νερό.

Αναμενόμενο είναι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης να δίνουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά καθώς αναλύθηκε το υδατικό υπόλειμμα που διηθήθηκε μετά το τέλος της απόσταξης και όχι κάποιο διήθημα που προέκυψε από εκχύλιση με απεσταγμένο νερό.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια ετερογενής ομάδα υδατοδιαλυτών ενώσεων, που διαθέτουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες συνδεδεμένες με έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Βρίσκονται στα φυτά, αποτελούν προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού τους και είναι μέρος του αμυντικού τους μηχανισμού, προστατεύοντάς τα

από έντομα και παθογόνους μικροοργανισμούς. Εκ φύσεως είναι ενώσεις ευαίσθητες στο φως και τη θερμοκρασία (Vermeris & Nickolson, 2006).

Συνεπώς, κατά την απόσταξη η θερμοκρασία ήταν αρκετά υψηλή ώστε σαν αποτέλεσμα να καταστραφεί ένα μέρος από τις φαινολικές ενώσεις που υπήρχαν στο υδατικό διήθημα.

Δ.8 Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάλυση της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων του είδους *Cannabis sativa* L. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν δείγματα που προέρχονται από τρεις διαφορετικές ποικιλίες, Fedora, Felina και Futura, ενώ έχουν καλλιεργηθεί με δύο είδη λιπάνσεως, την ελληνική και την καναδική λίπανση.

Αναλυτικότερα, για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκε συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger και τα αιθέρια έλαια παραλήφθησαν με διαιθυλαιθέρα και τέλος αναλύθηκαν ποιοτικά με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS). Επίσης, προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι συγκεντρώσεις των συστατικών των ελαίων με χρήση εσωτερικού προτύπου κυκλοεξανόνης. Σε όλα τα δείγματα βρέθηκαν να κυριαρχούν τα σεσκιτερπένια με κύριες ενώσεις το (E)-caryophellene και το α -humulene. Ταυτοποιήθηκαν ακόμα και αρκετά μονοτερπένια με κύρια το α - και β -pinene. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν ενώσεις όπως: myrcene, (E)-ocimene, γ -terpinolene κ.ά. Δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες ποσοτικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα διαφορετικών ποικιλιών. Οι ποσότητες των τερπενίων κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα και στις τρεις ποικιλίες. Επιπρόσθετα, στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων ταυτοποιήθηκε η κανναβιδιόλη (CBD). Οι συγκεντρώσεις της κανναβιδιόλης κυμαίνονται μεταξύ 1,32mg/mL και 14,9mg/mL ελαίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαφορές στις ποσότητες της κανναβιδιόλης δεν οφείλονται στις διαφορετικές ποικιλίες αλλά πιθανόν να σχετίζονται με τις διαφορετικές λιπάνσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Στα αιθέρια έλαια των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε η ελληνική λίπανση οι συγκεντρώσεις της κανναβιδιόλης βρέθηκαν να είναι αυξημένες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των αντίστοιχων δειγμάτων με την καναδική λίπανση. Παρ'όλα αυτά οι παράγοντες ποικιλία και λίπανση δεν φάνηκαν να είναι στατιστικά σημαντικοί σύμφωνα με τα στατιστικά τεστ που εφαρμόστηκαν. Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές από την βιβλιογραφία. Σίγουρα, η διαφορά στις καλλιεργητικές τεχνικές οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στα δείγματα, οι διαφορετικές τεχνικές παραλαβής των αιθέριων ελαίων, οι κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες με τις οποίες καλλιεργήθηκαν τα δείγματα και μπορούν να επηρεάσουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες.

Εν συνεχεία μελετήθηκαν τα υδατικά υπολείμματα που παραλήφθησαν από τη σφαιρική φιάλη μετά το τέλος της υδροαπόσταξης. Με την ανάλυση UV-Vis σε συνδυασμό με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu επιβεβαιώθηκε η παρουσία φαινολικών ενώσεων στα υδατικά υπολείμματα. Αξίζει να σημειωθεί η μικρή αφθονία σε φαινολικές ενώσεις, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη θερμική επεξεργασία που έχουν υποστεί τα υδατικά υπολείμματα κατά τη διάρκεια της υδροαπόσταξης.

Κατόπιν, αναλύθηκαν τα εκχυλίσματα του είδους *Cannabis sativa* L. Αρχικά, ποσότητα ξηρής δρόγης εκχυλίστηκε με μεθανόλη και χρήση υπερήχων και έπειτα τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν ποιοτικά με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC/QTOF/HRMS). Η υγρή χρωματογραφία έδειξε ότι όλα τα δείγματα περιέχουν ένα σημαντικό αριθμό κανναβινοειδών. Τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA), η κανναβιδιόλη (CBD), η κανναβιγερόλη (CBG), το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA), η κανναβινόλη (CBN), η κανναβιτριόλη (CBT) και το κανναβινολικό οξύ (CBNA). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν και τρία φλαβονοειδή, η καννφλαβίνη Α και Β και το καννιπρένιο. Τα αποτελέσματα του ποιοτικού προσδιορισμού των συστατικών, καθώς και η σειρά έκλουσης των ουσιών συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Διαφορές που παρατηρήθηκαν ποιοτικά ανάμεσα στα δείγματα δεν σχετίζονται πιθανότατα με τις ποικιλίες και τις λίπανσεις των δειγμάτων. Εν συνεχεία του ποιοτικού ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της κανναβιδιόλης με χρήση της πρότυπης ένωσης. Οι συγκεντρώσεις της κανναβιδιόλης στα εκχυλίσματα των δειγμάτων κυμαίνονται μεταξύ 1,36mg/g φυτικού υλικού και 3,76mg/g φυτικού υλικού. Γενικά, δεν παρατηρήθηκαν ποσοτικές διαφορές ανάλογα την ποικιλία του δείγματος, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από το στατιστικό τεστ που εφαρμόστηκε, αποδεικνύοντας ότι ο παράγοντας ποικιλία δεν είναι στατιστικά σημαντικός. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές στις συγκεντρώσεις κανναβιδιόλης ανάλογα τη λίπανση που χρησιμοποιήθηκε στο κάθε δείγμα. Στα δείγματα με την ελληνική λίπανση εντοπίστηκε ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση κανναβιδιόλης σε σχέση με εκείνα με την καναδική λίπανση. Σύμφωνα με το στατιστικό τεστ που ακολουθήθηκε επιβεβαιώθηκε ότι η διαφορετική λίπανση επηρεάζει την ποσότητα της κανναβιδιόλης στα δείγματα. Τα αποτελέσματα ακολουθούν τη βιβλιογραφία παρ' όλα ταύτα μικρές

ποσοτικές διαφορές που εντοπίστηκαν οφείλονται στις διαφορετικές ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων της κανναβιδιόλης στα αιθέρια έλαια και στα εκχυλίσματα δεν μπορεί να γίνει καθώς η ποσότητα κανναβιδιόλης που περνάει στο έλαιο είναι πολύ πιο μικρή σε σχέση με αυτή στα εκχυλίσματα. Παρατηρώντας όμως, τις συγκεντρώσεις της κανναβιδιόλης που προσδιορίστηκαν στα αιθέρια έλαια με εκείνες που προέρχονται από το εκχυλισμένο φυτικό υλικό είναι εμφανές ότι και στις δύο περιπτώσεις η συγκέντρωση της κανναβιδιόλης είναι μειωμένη στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκε η канаδική λίπανση σε σχέση με εκείνα της ελληνικής λίπανσης. Επίσης και στα αιθέρια έλαια αλλά και στο εκχυλισμένο φυτικό υλικό της ποικιλίας Γ, Futura εντοπίστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις CBD σε σχέση με τα δείγματα των άλλων δύο ποικιλιών χωρίς όμως σημαντικές διαφορές.

Ανακεφαλαιώνοντας, η παρούσα μελέτη εστιάζει στην ανάλυση του χημικού προφίλ του είδους *Cannabis sativa* L. που έχει καλλιεργηθεί στην Ελλάδα. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η καλλιέργεια με ελληνική λίπανση αυξάνει τα ποσοστά της κανναβιδιόλης στα δείγματα, σε σχέση με την канаδική και ότι ο παράγοντας ποικιλία δεν παίζει σημαντικό ρόλο σχετικά με τις συγκεντρώσεις της κανναβιδιόλης. Παρ' ότι ο παράγοντας ποικιλία βρέθηκε να μην είναι στατιστικά σημαντικός, σίγουρα, θα χρειαστούν μελλοντικά περισσότερες μελέτες καθώς μικρές στατιστικές διαφορές δεν ανιχνεύονται εύκολα σε δείγματα μικρού αριθμού. Τα στατιστικά τεστ ανιχνεύουν σε δείγματα μικρού αριθμού κυρίως μεγάλες και έντονες διαφορές. Ως μελλοντική συνέχιση της παρούσας διατριβής παρατίθενται οι παρακάτω προτάσεις:

- Ποιοτικός προσδιορισμός κανναβινοειδών και φαινολικών ενώσεων με ανάλυση MS/MS
- Ποσοτικός προσδιορισμός κανναβινοειδών και φαινολικών ενώσεων από τα εκχυλίσματα του είδους με LC/QTOF/HRMS
- Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών από το υδατικό υπόλειμμα της υδροαπόσταξης

- Εξέταση και σύγκριση διαφορετικών διαλυτών για την παραλαβή των κανναβινοειδών και των φαινολικών ενώσεων
- Εξέταση και σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης, όπως εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά ή εκχύλιση με μικροκύματα
- Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών καλλιεργητικών συνθηκών σε ποιοτικό και ποσοτικό επίπεδο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγγλική βιβλιογραφία

- Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(29), 7549–7560.
- Ahmed M., Ji M., Qin P., Gu Z., Liu Y., Sinkadar A., Iqbal M., Javeed A., (2019) Phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of *Citrullus colocynthis* L. and *Cannabis sativa* L.
- Alexander, S.P.H. Therapeutic potential of cannabis-related drugs, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2016, 64, 157–166
- Amaducci, S., D. Scordia, F.H. Liu, S.L. Cosentino. 2014. Key cultivation techniques for hemp in Europe in China. *Industrial Crops and Products*. 06:041.
- Andre, C.M.; Hausman, J.F.; Guerriero, G. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecule. *Front. Plant. Sci.* 2016, 7, 1–17
- Angelini, L.G., S. Tavarini, M.D. Candilo. 2016. Performance of new and traditional fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars for novel applications: Stem, Bark, and Core Yield and Chemical Composition. *Journal of Natural Fibers*. 13:2, 238-252.
- Appendino, G.; Chianese, G.; Tagliatela-Scafati, O. Cannabinoids: Occurrence and medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 1085–1099
- Ashcroft A.E. (1997). *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, εκδ RSC.
- Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Santini, G., Fiorini, D., Maggi, F. (2018). The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. *Industrial Crops and Products*, 122, 308–315

- Bicchi, C., Drigo, S., & Rubiolo, P. (2000). Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 892(1-2), 469–485.
- Borgelt, L. M., Franson, K. L., Nussbaum, A. M., & Wang, G. S. (2013). The Pharmacologic and Clinical Effects of Medical Cannabis. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 33(2), 195–209.
- Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Maran, D.; Benvenuti, S. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, 143, 228–236
- Cappelletto, P., Brizzi, M., Mongardini, F., Barberi, B., Sannibale, M., Nenci, G., Pasini, P. (2001). Italy-grown hemp: yield, composition and cannabinoid content. *Industrial Crops and Products*, 13(2), 101–113.
- Chandra, S.; Lata, H.; ElSohly, M.A. *Cannabis sativa* L.—Botany and Biotechnology, 1st ed.; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2017; pp. ix–xi, ISBN 978-3-319-54563-9.
- Cheng, Y., Albrecht, B. K., Brown, J., Buchanan, J. L., Buckner, W. H., DiMauro, E. F., ... Hitchcock, S. A. (2008). Discovery and Optimization of a Novel Series of N-Arylamide Oxadiazoles as Potent, Highly Selective and Orally Bioavailable Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(16), 5019–5034.
- De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Charlier, C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B*, 877(32), 4115–4124.
- E. Hernandez – 2000: Essentials oils
- ElSohly, M. A., & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78(5), 539–548.
- Erowid.org. (2006). Erowid Cannabis Vault: Basics. [online] Available at: https://erowid.org/plants/cannabis/cannabis_basics.shtml [Accessed 28 Jul. 2016].

- Gaoni Y., R. Mechoulam (1964): Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86:1646-1647.
- Grotenhermen, F., & Müller-Vahl, K. (2012). The Therapeutic Potential of Cannabis and Cannabinoids. *Deutsches Aertzblatt Online*.
- Gul, W., Gul, S., Chandra, S., Lata, H., Ibrahim, E., & ElSohly, M. (2018). Detection and Quantification of Cannabinoids in Extracts of Cannabis sativa Roots Using LC-MS/MS. *Planta Medica*, 84(04), 267–271.
- Hartse, J.A.; Eades, J.; Makriyannis, A. Cannabis sativa and hemp. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 1st ed.; Gupta, R.C., Ed.; Elsevier Inc.: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 735–754, ISBN 978-0-12-802147-7
- Hollister LE., (1986): Health aspects of cannabis. *Pharm. Rev.*, 38:1-20.
- J. T. Watson, O. D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry*, 4η έκδοση, Εκδόσεις Wiley 2007
- Jonaitiene V., Z. Jankauskiene and I. Stuoge. 2016. Hemp cultivation opportunities and perspectives in Lithuania. R. Figueiro and S. Rana (eds.), *Natural Fibres: Advances in Science and Technology Towards Industrial Applications*, RILEM Bookseries 12, DOI 10.1007/978-94-017-7515-1_32
- Lafaye G, Karila L, Blecha L, Benyamina A. Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017 Sep;19(3):309-316. PMID: 29302228; PMCID: PMC5741114.
- Lewin, L. (1998). *Phantastica*. Rochester, Vt.: Park Street Press
- Li, Hui-Lin 1974. An archeological and historical account of Cannabis in China. *Economic Botany* 28(4): 437-448
- Luque de Castro, M. ., Jiménez-Carmona, M. ., & Fernández-Pérez, V. (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(11), 708–716.
- Marselos, M. (1997). *Exartēsiogones ousies*. Athēna: Typōthētō - Giōrgos Dardanos.
- McPartland, J. M. (2018). Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1), 203–212.

- Mechoulam R. et al.: «Cannabidiol-recent advances», *Chemistry and Biodiversity*, 4 (8): 1678-1692, 21 Aug, 2007.
- Mechoulam, R., Braun, P., & Gaoni, Y. (1967). Stereospecific synthesis of (-)-.DELTA.1- and (-)-.DELTA.1(6)-tetrahydrocannabinols. *Journal of the American Chemical Society*, 89(17), 4552–4554.
- Mechtler, K., Bailer, J., & de Hueber, K. (2004). Variations of Δ^9 -THC content in single plants of hemp varieties. *Industrial Crops and Products*, 19(1), 19–24.
- Naz, S., Hanif, M. A., Bhatti, H. N., & Ansari, T. M. (2017). Impact of Supercritical Fluid Extraction and Traditional Distillation on the Isolation of Aromatic Compounds from *Cannabis indica* and *Cannabis sativa*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(1), 175–184.
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., & Monti, A. (2010). Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5), 413–419.
- Pagani, A., Scala, F., Chianese, G., Grassi, G., Appendino, G., & Tagliabatella-Scafati, O. (2011). Cannabioxepane, a novel tetracyclic cannabinoid from hemp, *Cannabis sativa* L. *Tetrahedron*, 67(19), 3369–3373.
- Pellati, F., Brighenti, V., Sperlea, J., Marchetti, L., Bertelli, D., & Benvenuti, S. (2018). New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules*, 23(10), 2639.
- Pierozan, M. K., Pauletti, G. F., Rota, L., Santos, A. C. A. dos, Lerin, L. A., di Luccio, M., Oliveira, J. V. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4), 764–770.
- Pollastro, F.; Minassi, A.; Fresu, L.G. Cannabis phenolics and their bioactivities. *Curr. Med. Chem.* 2018, 25, 1160–1185
- Radwan, M. M., ElSohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Wilson, L., El-Alfy, A. T., Ross, S. A. (2008). Non-cannabinoid constituents from a high potency *Cannabis sativa* variety. *Phytochemistry*, 69(14), 2627–2633.
- Richardson, P.M. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Second Edition. *Brittonia* **42**, 115 (1990).

- Ross, S. A., & ElSohly, M. A. (1996). The Volatile Oil Composition of Fresh and Air-Dried Buds of *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 49–51.
- Russo, E. B., & McPartland, J. M. (2002). Cannabis is more than simply Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*, 165(4), 431–432.
- Salentijn, E. M. J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L. M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68, 32–41.
- Satyal, Prabodh and William N. Setzer. 2014. "Chemotyping and Determination of Antimicrobial, Insecticidal, and Cytotoxic Properties of Wild-Grown *Cannabis sativa* from Nepal." *Journal of Medicinally Active Plants* 3, (1):9-16.
- Shoyama Y., Kuboe K., Nishioka I., & Yamauchi T. (1972). Cannabidiol Monomethyl Ether. A New Neutral Cannabinoid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 20(9), 2072–2072.
- Silva, M. T. A., Carlini, E. A., Claussen, U., & Korte, F. (1968). Lack of cross-tolerance in rats among Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabis extract, mescaline and lysergic acid diethylamide (LSD-25). *Psychopharmacologia*, 13(4), 332–340.
- Simon, J. E., 1990: Essential oils and culinary herbs
- Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. Αρχ ς της Ενόργανης Ανάλυσης. Μτφ: Μ. Ι. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωστανάκη, Ιωάννινα 2007.
- Stephan Piotrowski, Michael Carus: Multi-criteria evaluation of ligno-cellulosic niche crops for use in biorefinery processes, May 2011
- Stolker, A. A. M., van Schoonhoven, J., de Vries, A. J., Bobeldijk-Pastorova, I., Vaes, W. H. J., & van den Berg, R. (2004). Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1058(1-2), 143–151
- Struik, P. C., Amaducci, S., Bullard, M. J., Stutterheim, N. C., Venturi, G., & Cromack, H. T. H. (2000). Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*, 11(2-3), 107–118.

- Toun M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*. 1981.
- Turner, J. C., Hemphill, J. K., & Mahlberg, P. G. (1980). Trichomes and Cannabinoid Content of Developing Leaves and Bracts of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 67(10), 1397.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, New York.
- Watzl, B., Scuderi, P., & Watson, R. R. (1991). Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro. *International Journal of Immunopharmacology*, 13(8), 1091–1097.
- Watt JM, Breyer-Brandwijk MG, (1962). *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*, 2nd ed. Livingstone, London.
- Waynesword.palomar.edu. (2016). *Inflorescence Terminology (Part 1)*. [online] Available at: <http://waynesword.palomar.edu/terminf1.htm> [Accessed 28 Jul. 2016]

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γρίβας, Κ. (2009). ΨΥΧΟΤΡΟΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΝΝΑΒΗ ΜΑΡΙΧΟΥΑΝΑ - ΧΑΣΙΣ. [Accessed 27 Jul. 2016].
- Καλλαϊτζάκης, Αγγ. Ι., (1995). *Υδατάνθρακες και δευτερογενή φυτικά προϊόντα*. Αθήνα.
- Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. 2015. Βασικές αρχές φωτομετρίας και χρωματομετρικών αναλύσεων.
- Σακκάς, Ηρακλής (2007, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων), *Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων*
- Σκρουμπής Β. (1998) *Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοκομικά φυτά*

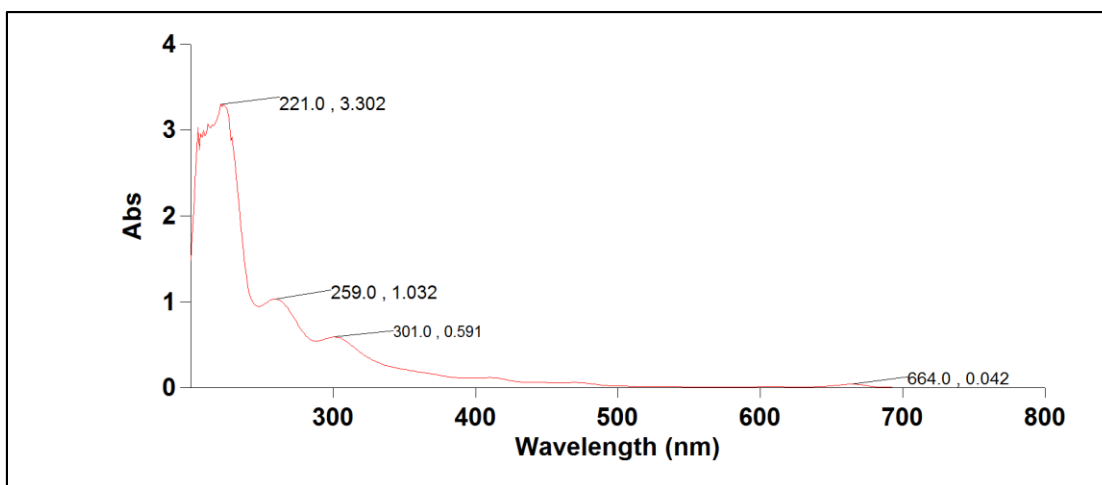
- Σταμούλης Ανδ., (1992), Αρωματικά φυτά, Διεύθυνση Γεωργίας Καρδίτσας, Καρδίτσα
- Ραγκούση-Ιγνατιάδου, Β. Χημεία Φυσικών Προϊόντων (2009).Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- Υψηλάντης Κ. (2008) Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

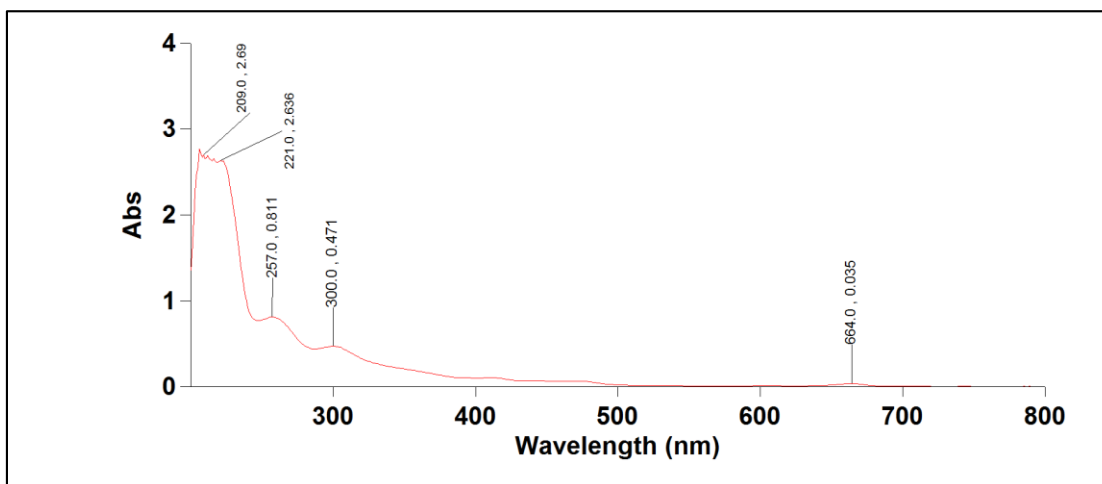
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Φάσματα UV-Vis

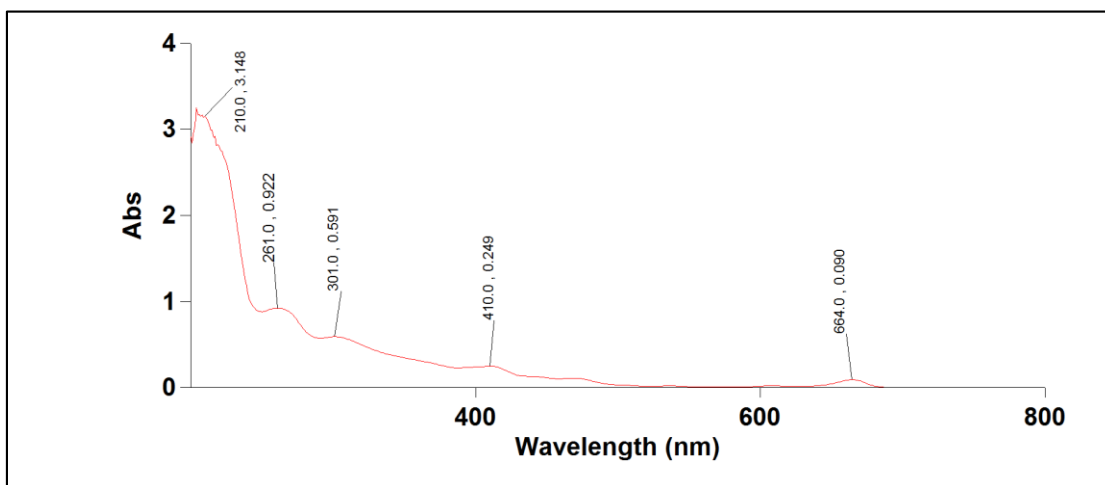
✓ Μεθανολικά εκχυλίσματα



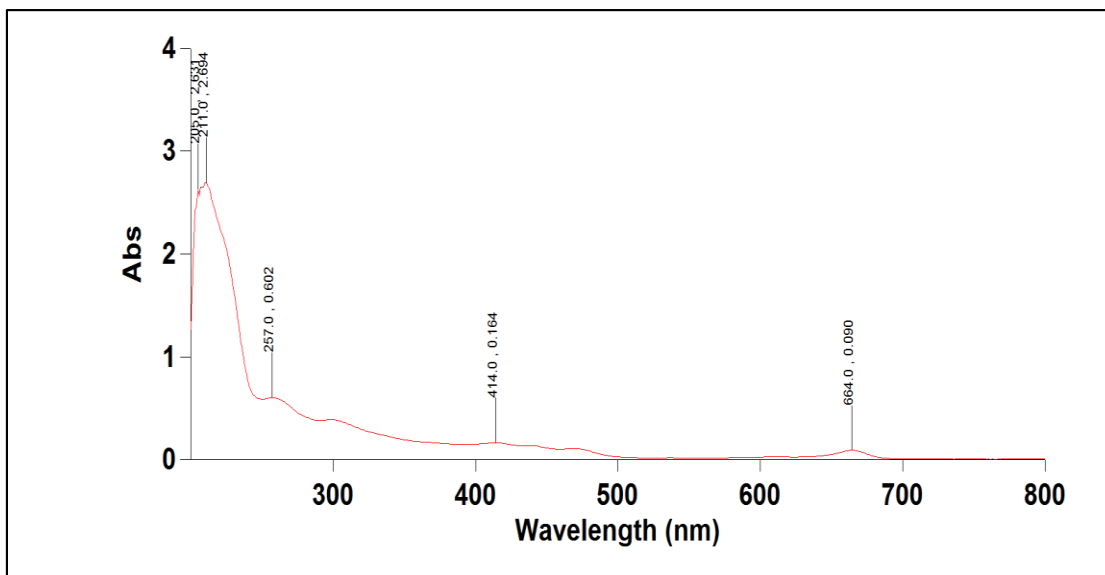
Εικόνα 65: Φάσμα UV-Vis δείγματος A1



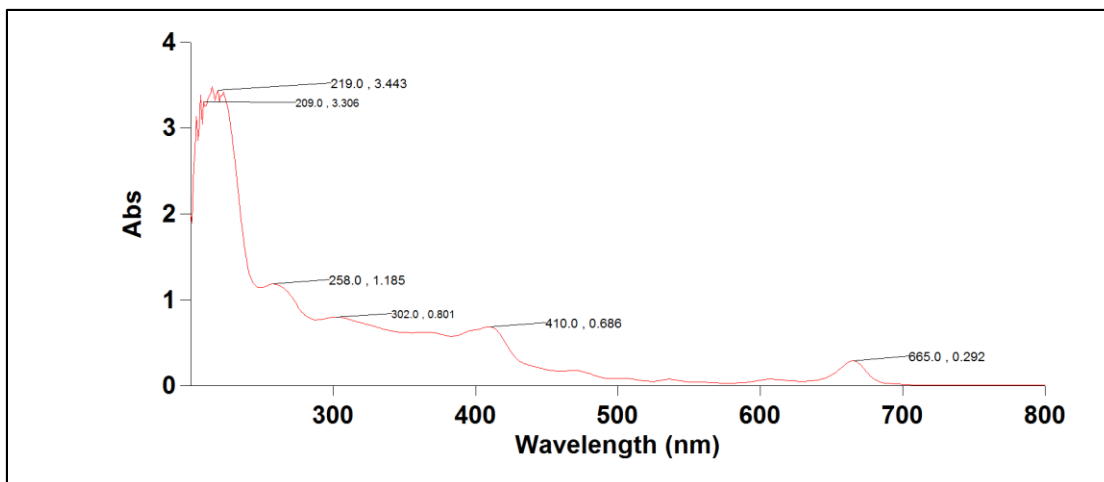
Εικόνα 66: Φάσμα UV-Vis δείγματος A2



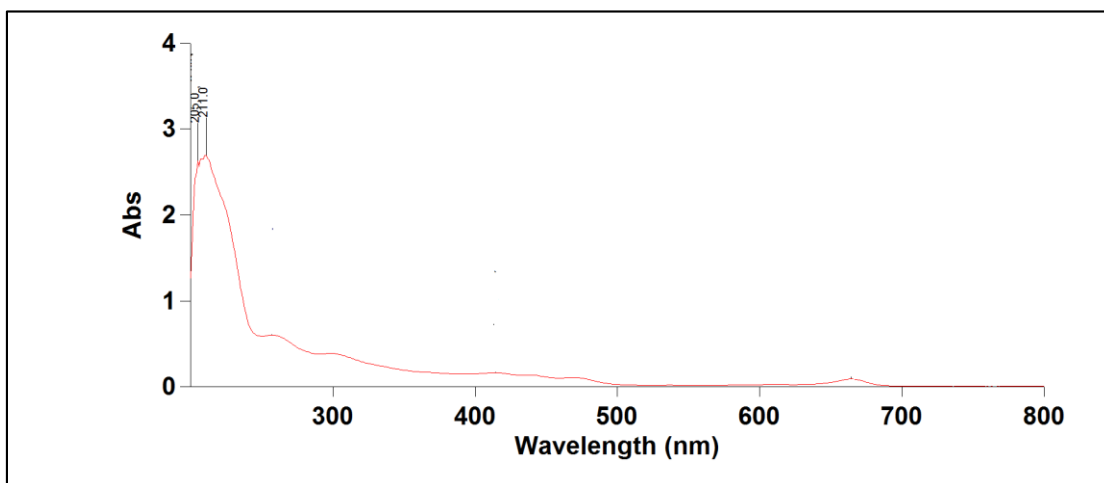
Εικόνα 67 : Φάσμα UV-Vis δείγματος B1



Εικόνα 68: Φάσμα UV-Vis δείγματος B2

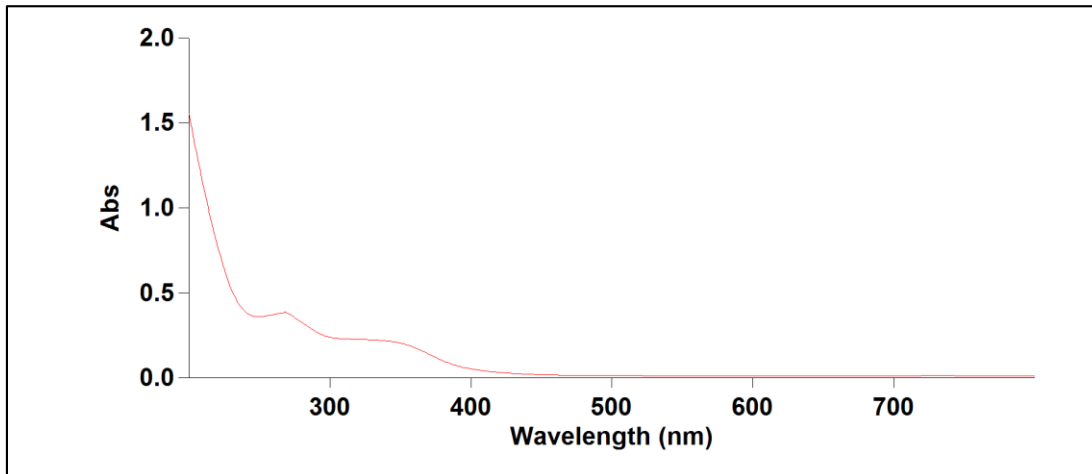


Εικόνα 69: Φάσμα UV-Vis δείγματος Γ1

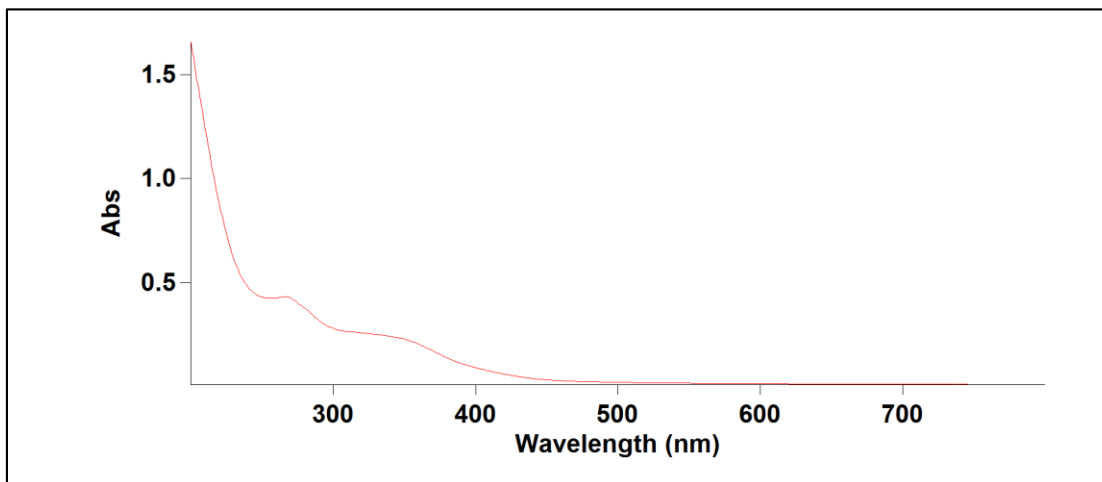


Εικόνα 70: Φάσμα UV-Vis δείγματος Γ2

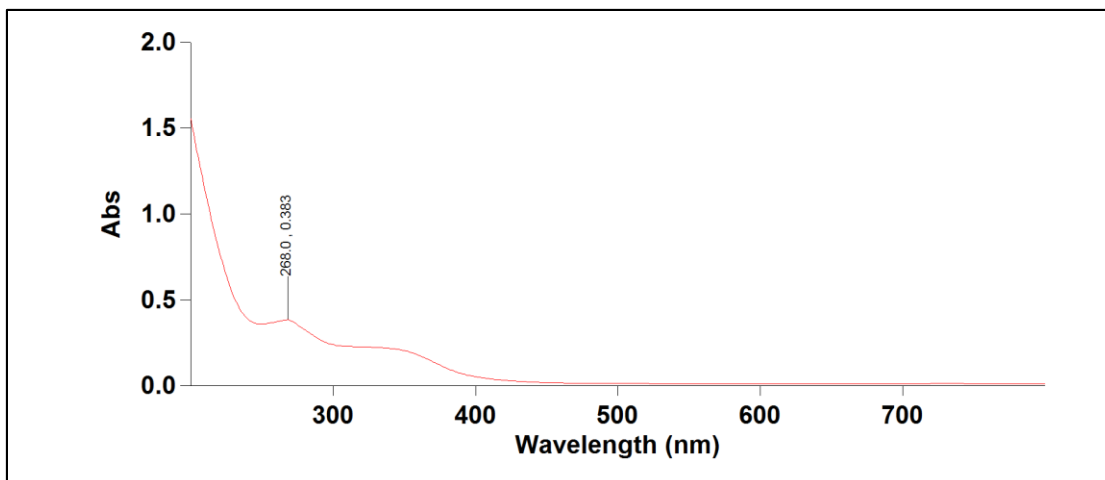
✓ Υδατικά υπολείμματα



Εικόνα 71: Φάσμα UV-Vis δείγματος A1



Εικόνα 72: Φάσμα UV-Vis δείγματος B1

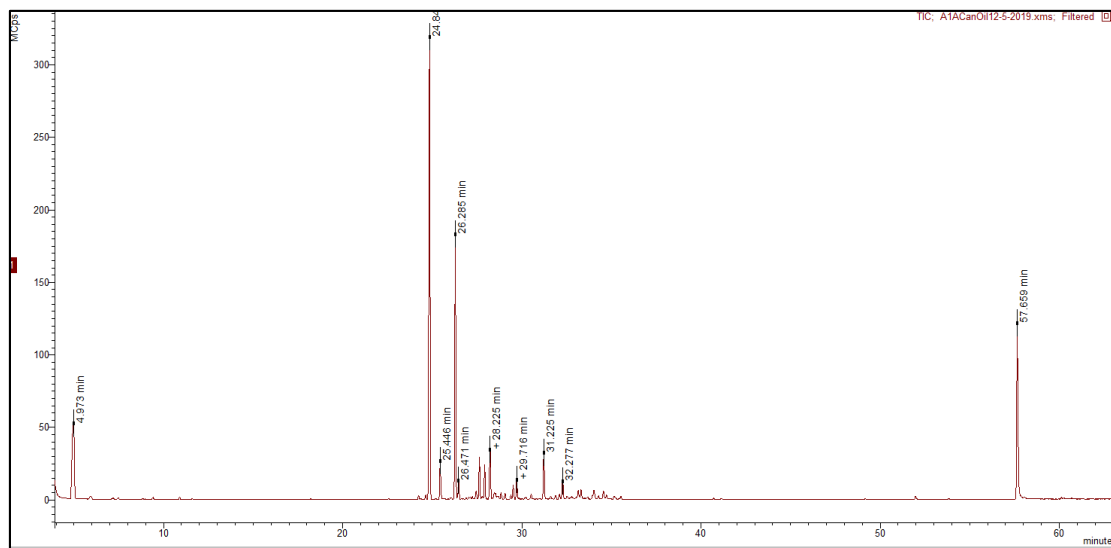


Εικόνα 73: Φάσμα UV-Vis δείγματος Γ1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

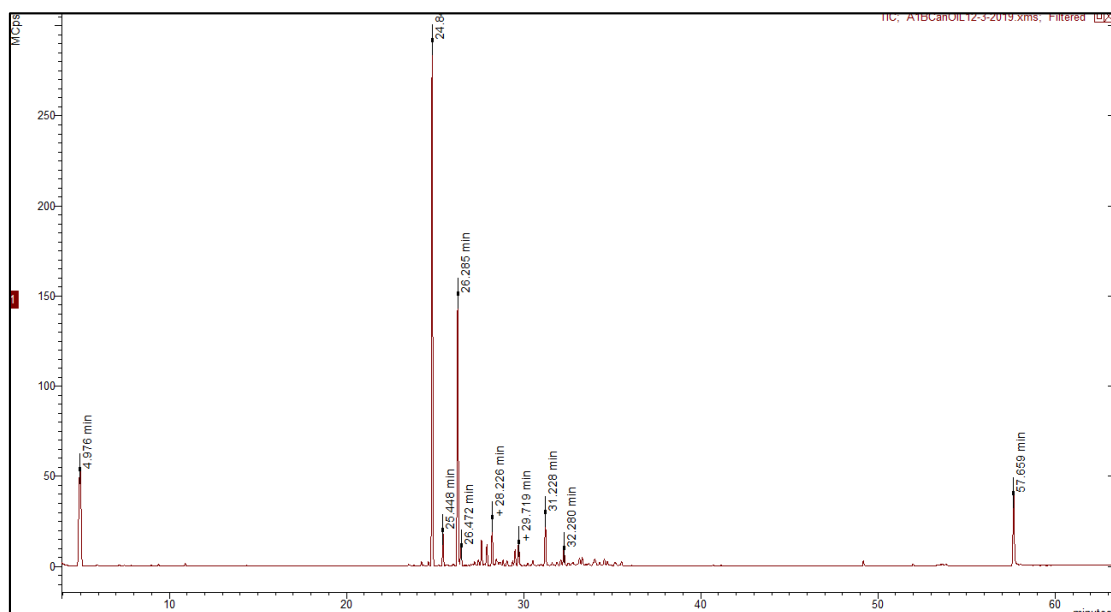
Χρωματογραφήματα GC/MS

✓ Δείγμα Α1α



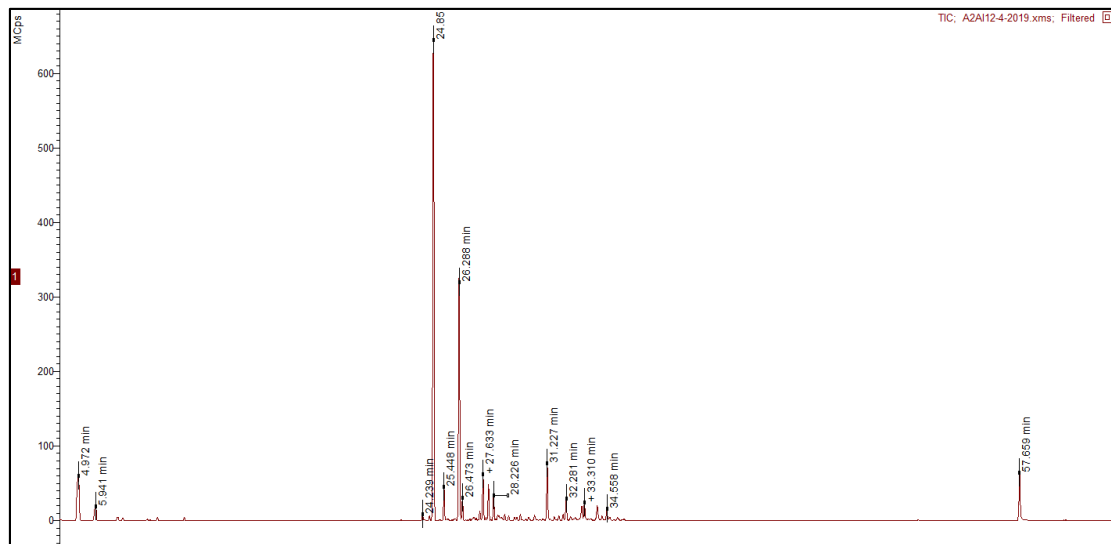
Εικόνα 74: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Α1α

✓ Δείγμα Α1β



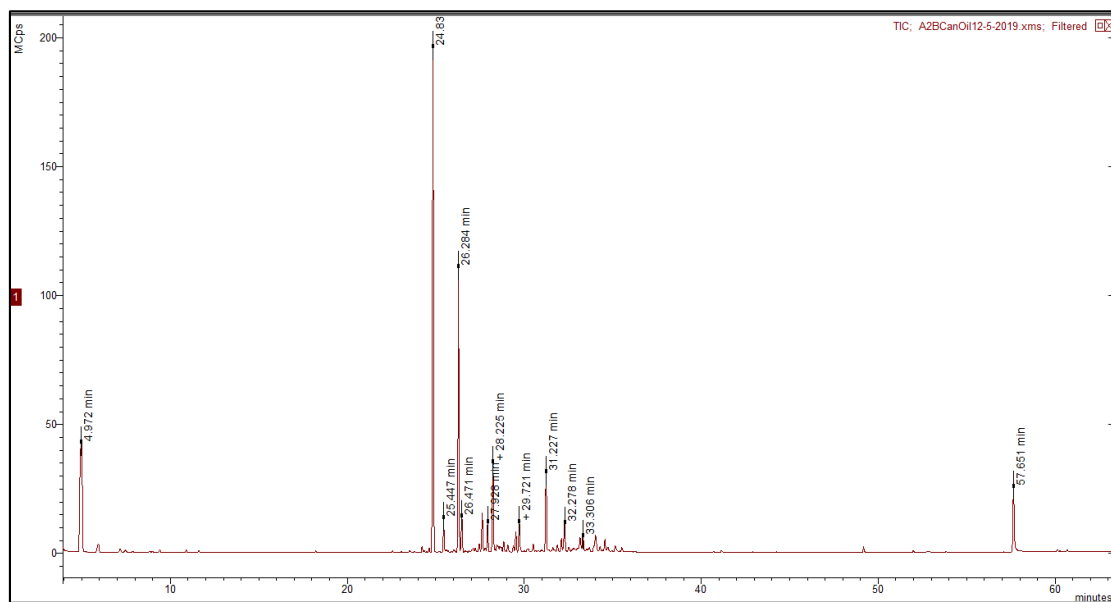
Εικόνα 75: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Α1β

✓ Δείγμα Α2α



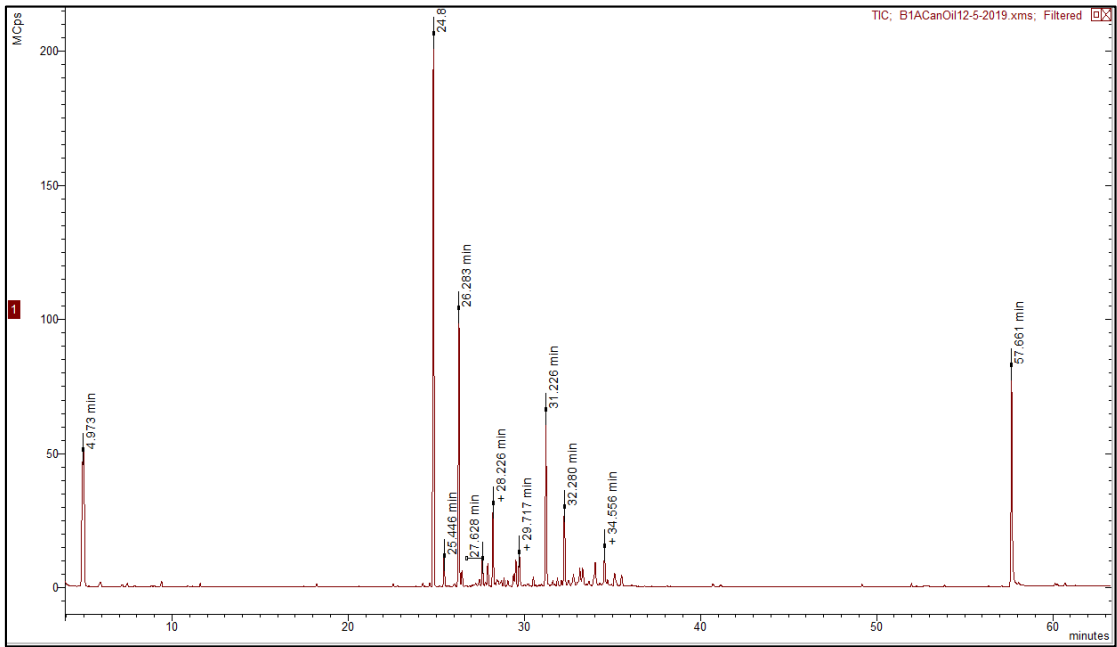
Εικόνα 76: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Α2α

✓ Δείγμα Α2β



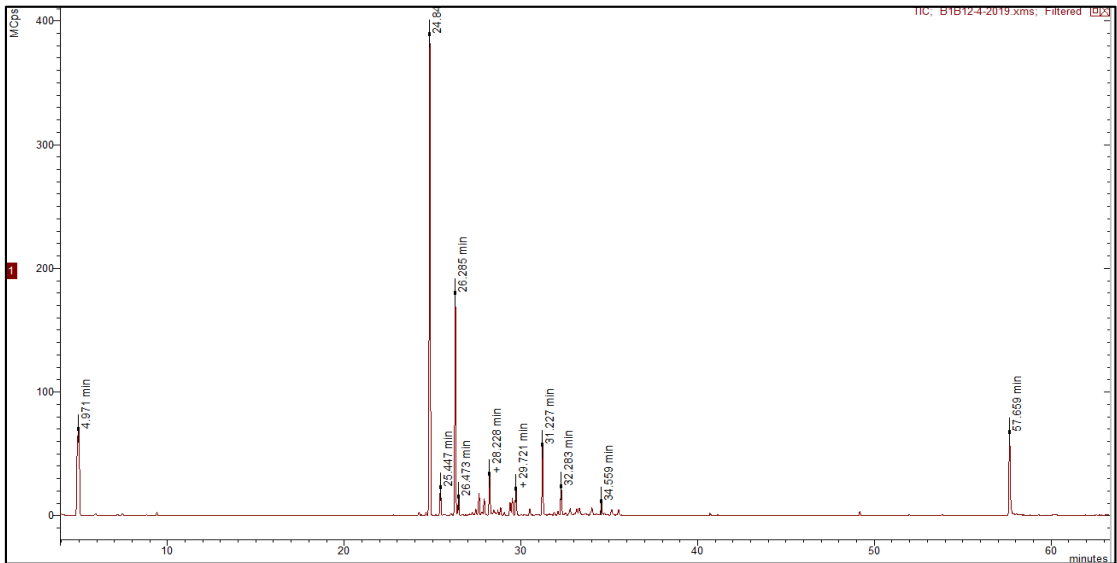
Εικόνα 77: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Α2β

✓ Δείγμα B1α



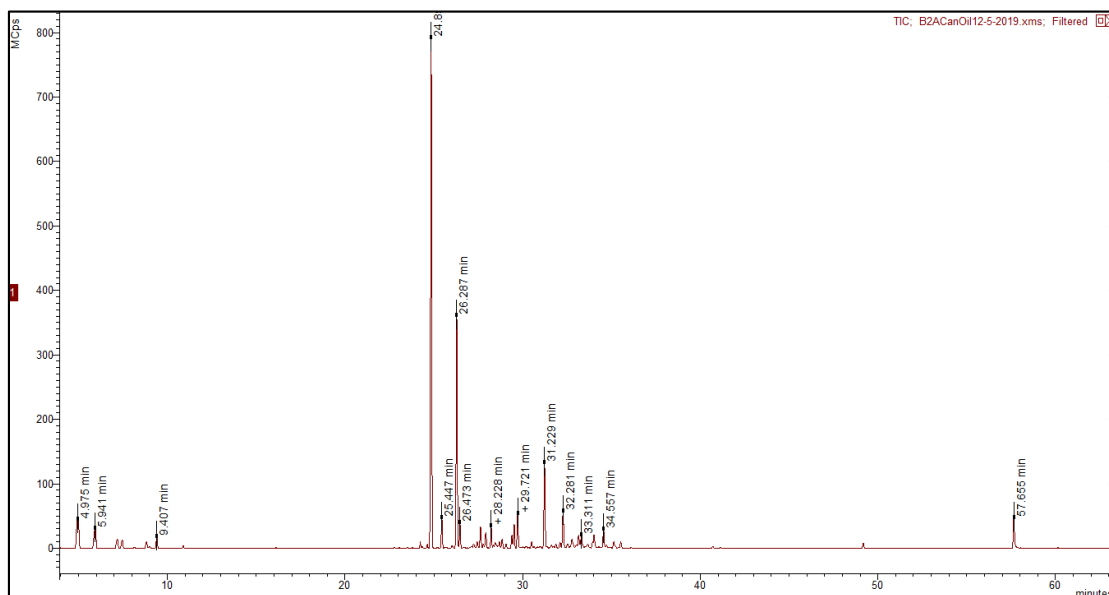
Εικόνα 78: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B1α

✓ Δείγμα B1β



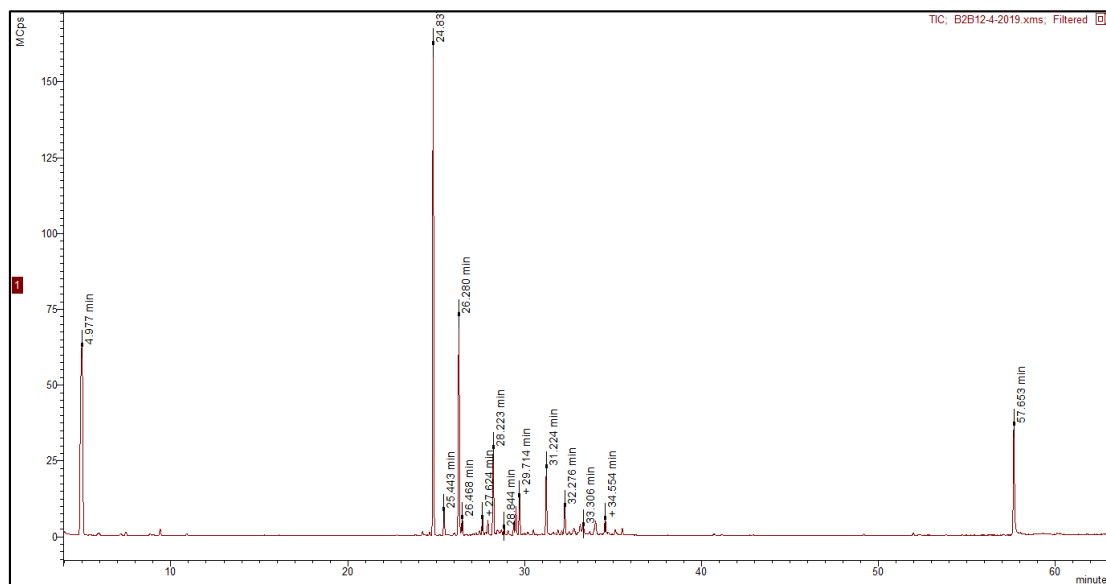
Εικόνα 79: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B1β

✓ Δείγμα B2α



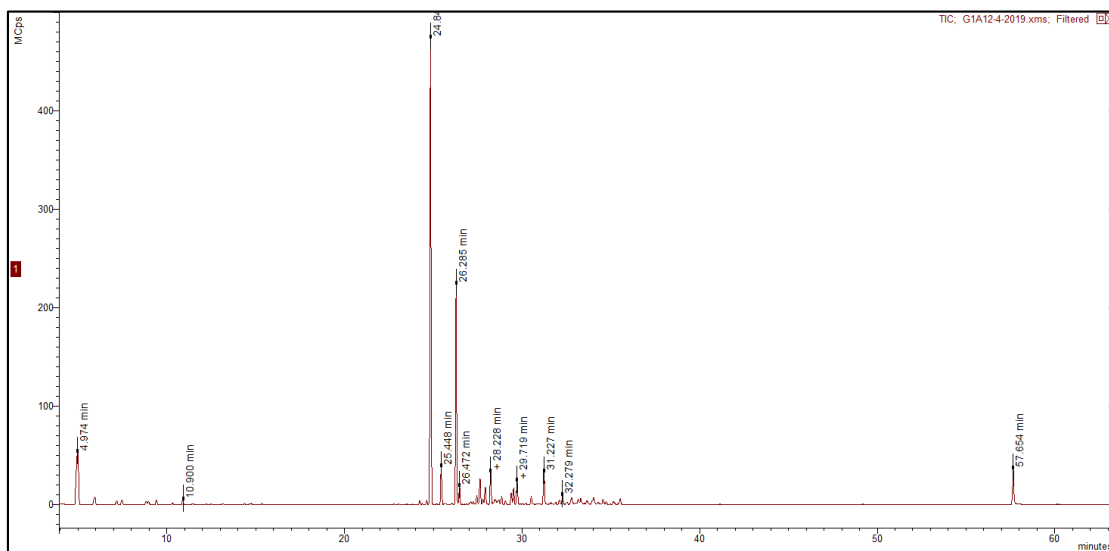
Εικόνα 80: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B2α

✓ Δείγμα B2β



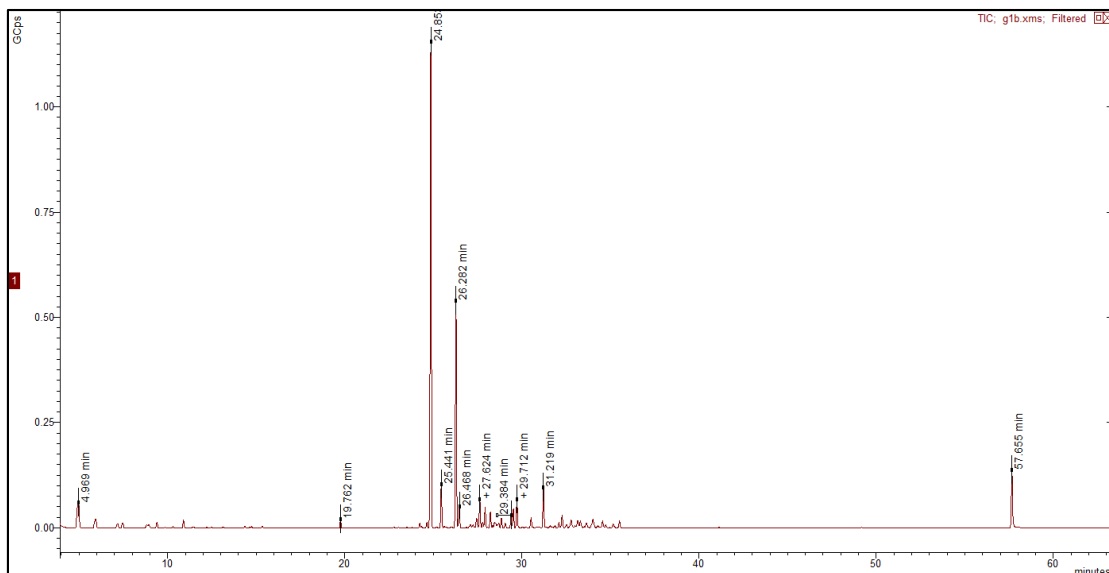
Εικόνα 81: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος B2β

✓ Δείγμα Γ1α



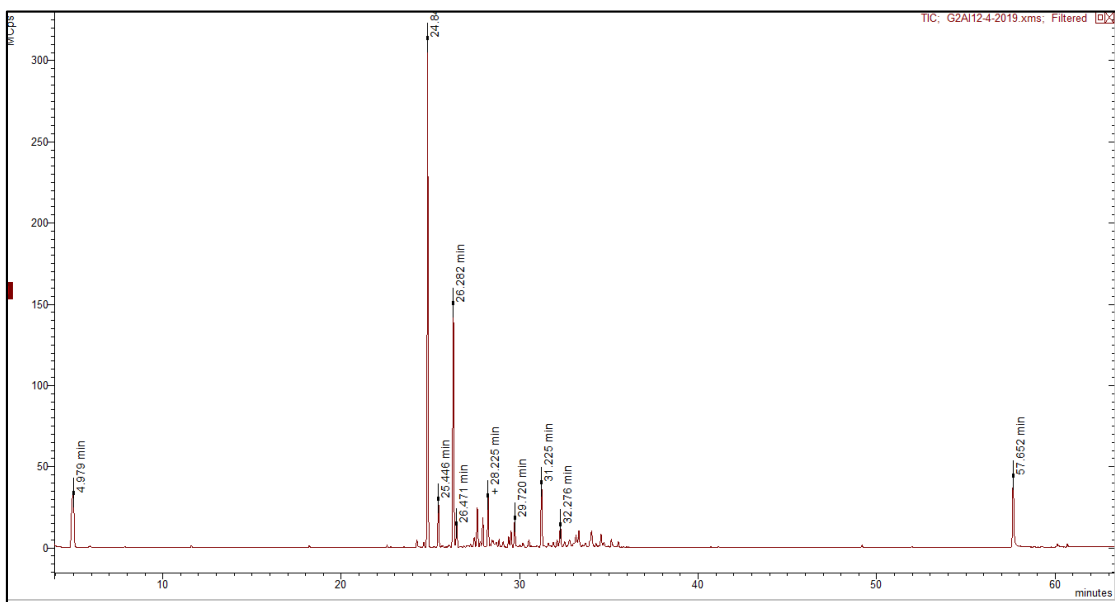
Εικόνα 82: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ1α

✓ Δείγμα Γ1β



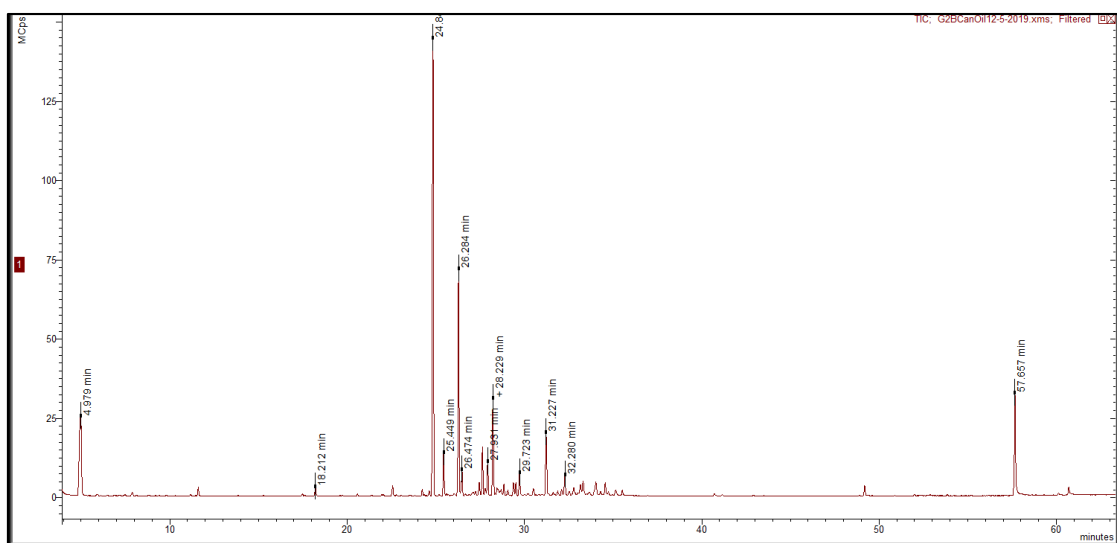
Εικόνα 83: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ1β

✓ Δείγμα Γ2α



Εικόνα 84: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ2α

✓ Δείγμα Γ2β



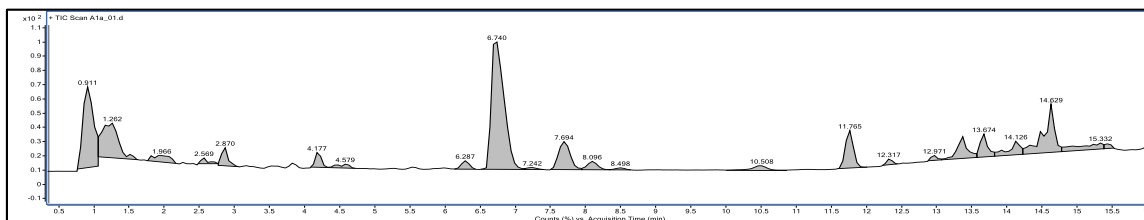
Εικόνα 85: Χρωματογράφημα GC/MS δείγματος Γ2β

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Χρωματογραφήματα LC/Q-TOF/HRMS

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΘΕΤΙΚΟ ΙΟΝΙΣΜΟ

✓ Δείγμα A1α

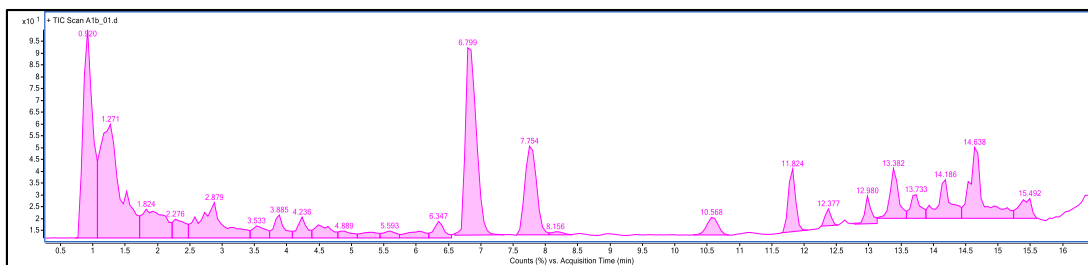


Εικόνα 86: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος A1α

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,03	355,1899	355,1904	-1,41	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
2	2,586	369,1334	369,1332	0,54	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
3	2,887	343,1905	343,1904	0,29	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
4	6,304	437,1959	437,1959	0,00	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,750	359,2215	359,2217	-0,56	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,71	315,2316	315,2317	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,761	347,2214	347,2217	-0,86	Cannabitriol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	8,113	361,2371	361,2373	-0,55	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
9	9,369	317,2466	317,2475	-2,84	Cannabigerol	C ₂₁ H ₃₂ O ₂

					(CBG)	
10	11,18	311,2002	311,2006	-1,28	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Α1β

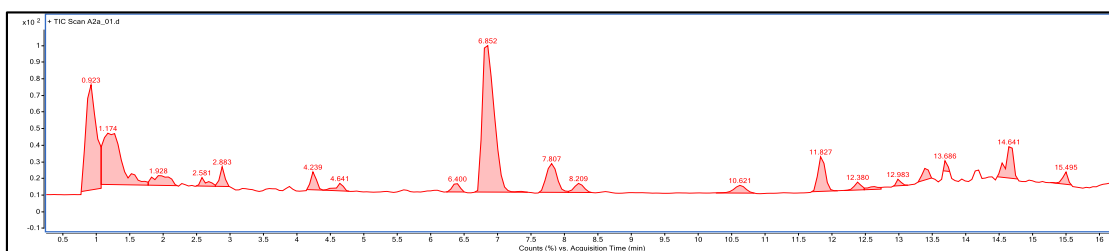


Εικόνα 87: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Α1β

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,595	369,1333	369,1332	0,27	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,896	343,1905	343,1904	0,29	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,363	437,1956	437,1959	-0,69	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,816	359,2213	359,2217	-1,11	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,771	315,2316	315,2317	-0,31	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8,223	361,2368	361,2373	-1,38	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄

7	9,479	317,2468	317,2475	-2,20	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
8	11,288	311,2006	311,2006	0,00	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Α2α

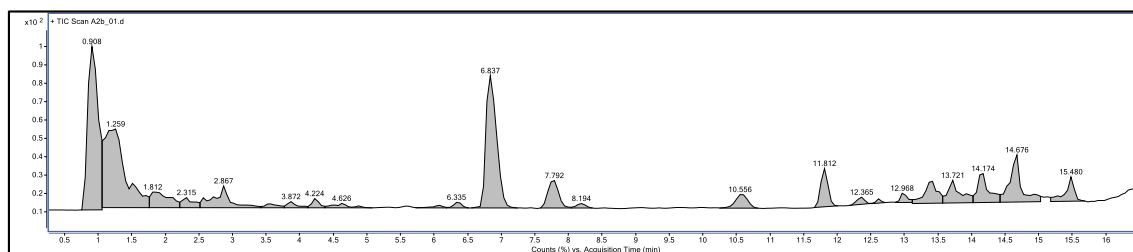


Εικόνα 88: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Α2α

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,045	355,1900	355,1904	-1,12	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
2	2,598	369,1335	369,1332	0,81	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
3	2,889	343,1906	343,1904	0,58	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
4	6,417	437,196	437,1959	0,23	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,869	359,2216	359,2217	-0,28	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,824	315,2318	315,2317	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

7	7,874	347,2214	347,2217	-0,86	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	8,226	361,237	361,2373	-0,83	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
9	11,291	311,2009	311,2006	0,96	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Α2β

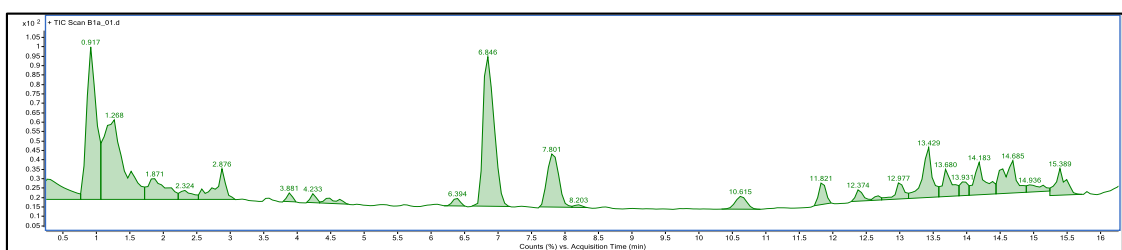


Εικόνα 89: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Α2β

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,080	355,1892	355,1900	-2,25	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
2	2,583	369,1332	369,1335	-0,81	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
3	2,884	343,1906	343,1904	0,58	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
4	6,402	437,1957	437,196	-0,69	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,954	359,2214	359,2216	-0,56	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄

6	7.809	315,2319	315,2318	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	8,211	361,2373	361,237	0,83	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
8	11.276	311,2005	311,2009	-1,28	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Β1α

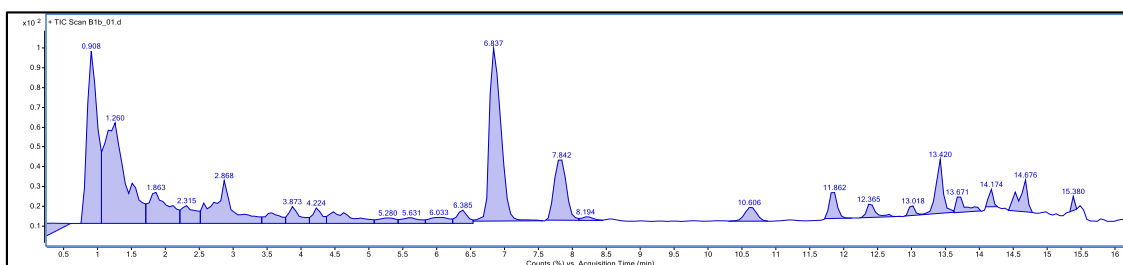


Εικόνα 90: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Β1α

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (II)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,592	369,1336	369,1335	0,27	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,889	343,1908	343,1904	1,16	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,411	437,1963	437,196	0,69	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,863	359,2214	359,2216	-0,56	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,818	315,2318	315,2318	0,00	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

6	8,220	361,2367	361,237	-0,83	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
7	11,285	311,2011	311,2009	0,64	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Β1β

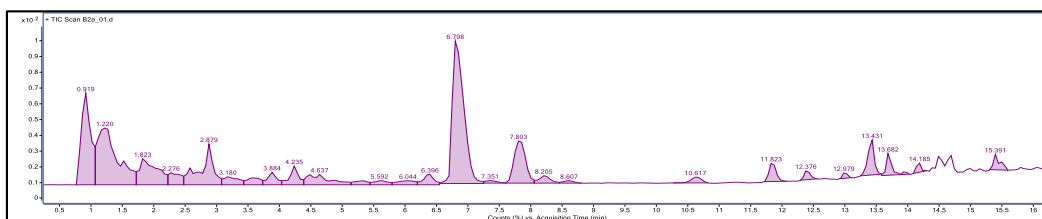


Εικόνα 91: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα δείγματος, θετικού ιονισμού Β1β

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,583	369,1335	369,1335	0,00	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,889	343,1905	343,1904	0,29	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,402	437,1961	437,196	0,23	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,854	359,2216	359,2216	0,00	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,859	315,2316	315,2318	-0,63	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8,261	361,237	361,237	0,00	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄

7	11,276	311,2006	311,2009	-0,96	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂
---	--------	----------	----------	-------	---------------------	--

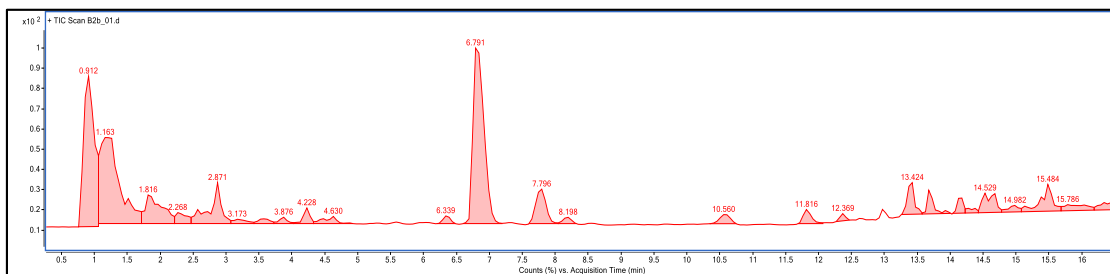
✓ Δείγμα Β2α



Εικόνα 92: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Β2α

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,594	369,1334	369,1335	-0,27	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,885	343,1908	343,1904	1,16	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,413	437,1959	437,196	-0,23	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,815	359,2215	359,2216	-0,28	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,820	315,2316	315,2318	-0,63	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8,222	361,273	361,237	0,00	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
7	11,287	311,2004	311,2009	-1,61	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

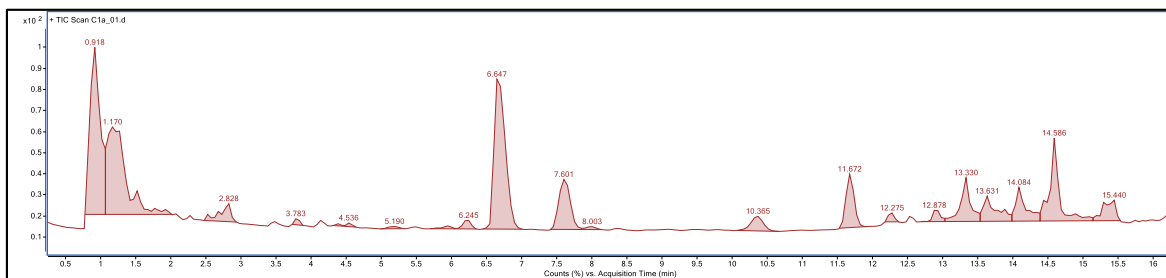
✓ Δείγμα Β2β



Εικόνα 93: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Β2β

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,587	369,1332	369,1335	-0,81	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,888	343,1906	343,1904	0,58	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,406	437,1958	437,196	-0,46	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,808	359,2215	359,2216	-0,28	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,813	315,2317	315,2318	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8,014	317,2465	317,2475	-3,15	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
7	8,215	361,2372	361,237	0,55	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
8	11,280	311,2003	311,2009	-1,93	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

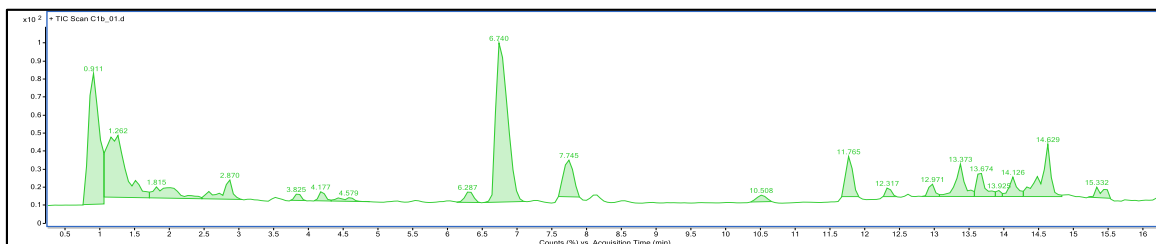
✓ Δείγμα Γ1α



Εικόνα 94: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Γ1α

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,543	369,1337	369,1335	0,54	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,845	343,1906	343,1904	0,58	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,261	437,1959	437,196	-0,23	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,663	359,2215	359,2216	-0,28	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,618	315,2317	315,2318	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8,020	361,2376	361,237	1,66	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
7	11,085	311,2009	311,2009	0,00	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

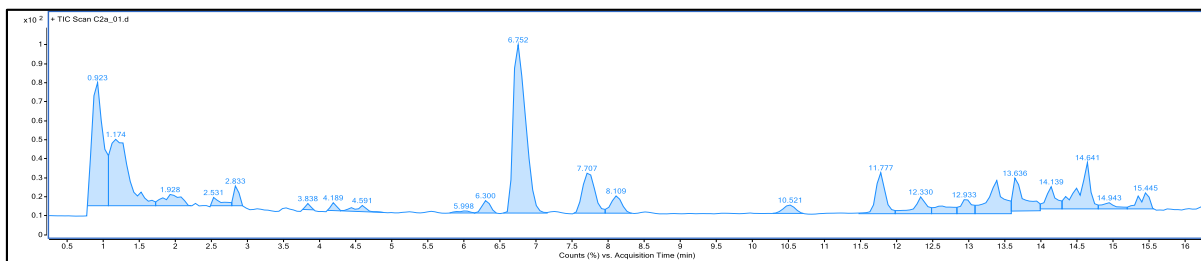
✓ Δείγμα Γ1β



Εικόνα 95: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Γ1β

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,033	355,1901	355,1900	0,28	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
2	2,586	369,1331	369,1335	-1,08	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
3	2,887	343,1906	343,1904	0,58	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
4	6,354	437,1959	437,196	-0,23	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,756	359,2214	359,2216	-0,56	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,761	315,2316	315,2318	-0,63	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	8,163	361,2373	361,237	0,83	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
8	11,229	311,2008	311,2009	-0,32	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

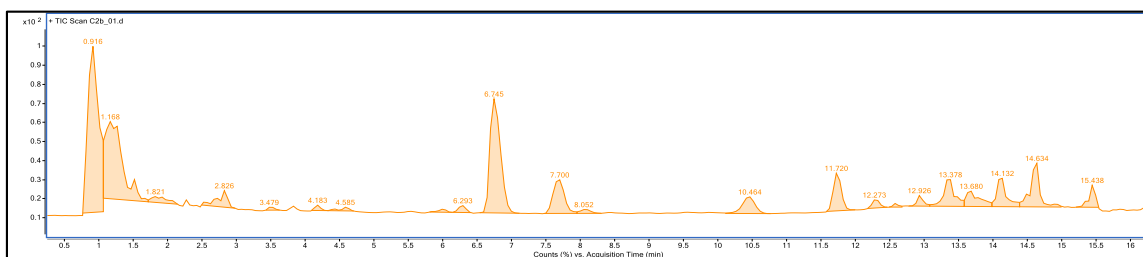
✓ Δείγμα Γ2α



Εικόνα 96: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα δείγματος, θετικού ιονισμού Γ2α

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (Π)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,548	369,1331	369,1335	-1,08	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,849	343,1904	343,1904	0,00	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,317	437,1959	437,196	-0,29	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,769	359,2215	359,2216	-0,28	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,724	315,2319	315,2318	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8,126	361,2373	361,237	0,83	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
7	11,191	311,2009	311,2009	0,00	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Γ2β

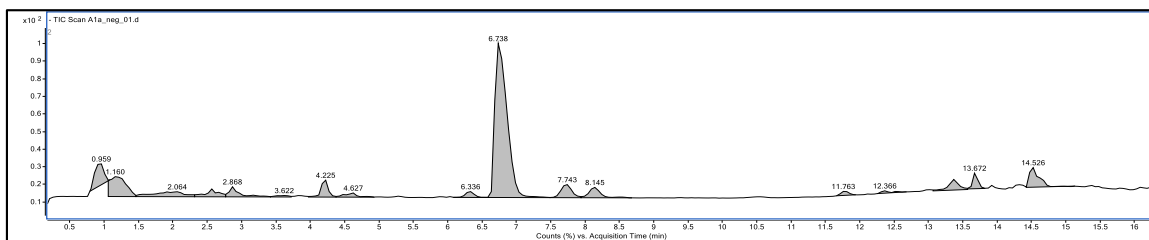


Εικόνα 97: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, θετικού ιονισμού δείγματος Γ2β

#	RT(min)	[M+H] ⁺ (II)	[M+H] ⁺ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,541	369,1332	369,1335	-0,81	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,843	343,1907	343,1904	0,87	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	6,310	437,1959	437,196	-0,23	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
4	6,762	359,2215	359,2216	-0,28	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
5	7,717	315,2317	315,2318	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
6	8.069	361,2373	361,237	0,83	Cannabigerolic acid (CBGA)	C ₂₂ H ₃₂ O ₄
7	11,184	311,2003	311,2009	-1,93	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΙΟΝΙΣΜΟ

✓ Δείγμα Α1α

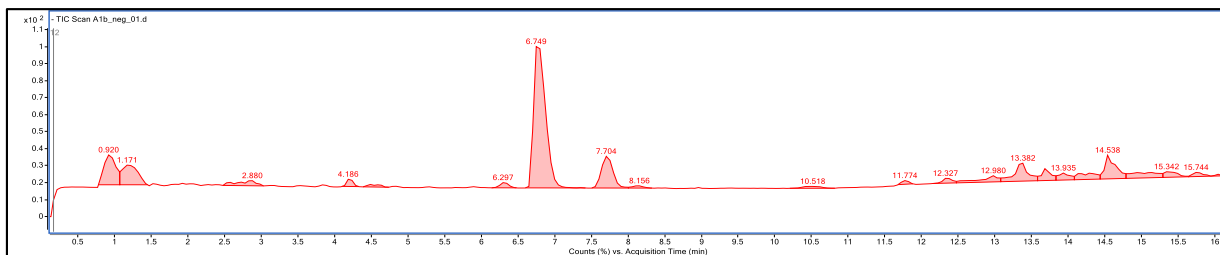


Εικόνα 98: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Α1α

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακό ς Τύπος
1	2,584	367,1179	367,1187	-2,18	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,885	341,1761	341,1758	0,88	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,689	353,1753	353,1758	-1,41	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,352	435,1806	435,1813	-1,61	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,754	357,2066	357,2071	-1,41	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,759	345,2063	345,2071	-2,32	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
7	7,96	313,2170	313,2168	0,64	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
8	8,161	315,2318	315,2329	-3,49	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂

9	11,186	309,1852	309.1860	-2,58	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂
---	--------	----------	----------	-------	---------------------	--

✓ Δείγμα Α1β

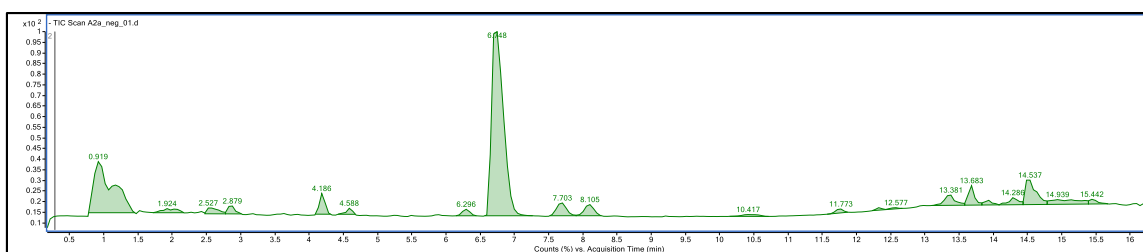


Εικόνα 99: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Α1β

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,595	367,1181	367,1187	-1,63	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,896	341,1753	341,1758	-1,46	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,650	353,1752	353,1758	-1,70	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,364	435,1803	435,1813	-2,30	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,766	357,2062	357,2071	-2,52	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,720	345,2063	345,2071	-2,32	Cannabitriol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
7	7,720	313,2166	313,2168	-0,64	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

8	9,379	315,2316	315,2329	-4,12	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
9	11,188	309,1852	309,1860	-2,59	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Α2α



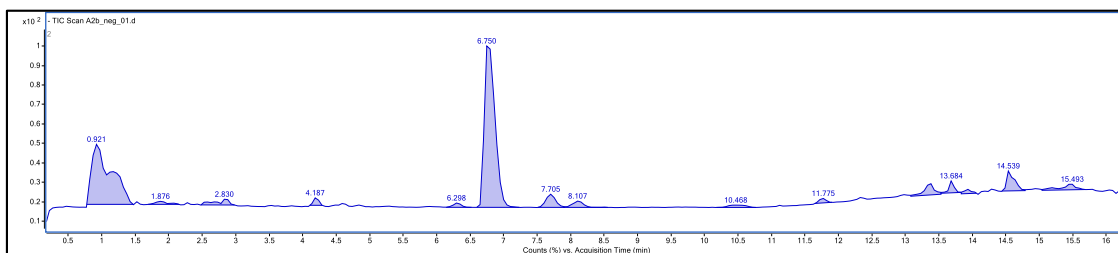
Εικόνα 100: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Α2α

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,544	367,1181	367,1187	-1,63	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,896	341,1751	341,1758	-2,05	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,650	353,1749	353,1758	-2,55	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,313	435,1802	435,1813	-2,53	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,766	357,2062	357,2071	-2,52	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,720	313,2169	313,2168	0,31	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	12,996	355,1907	355,1913*	-1,69	Cannabinol	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

					(CBN)	
--	--	--	--	--	-------	--

*[M+HCOO]⁻

✓ Δείγμα Α2β

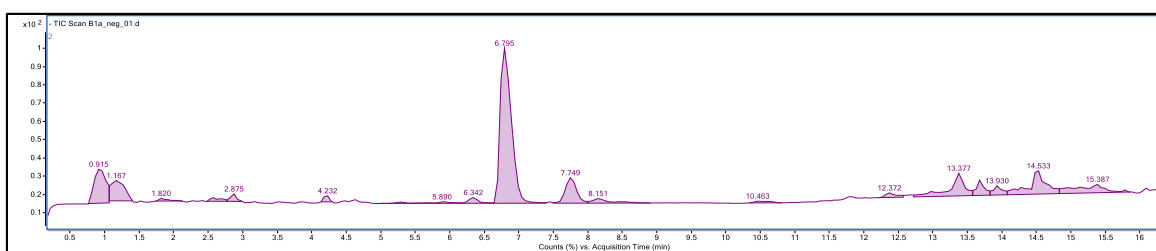


Εικόνα 101: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Α2β

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,596	367,1179	367,1187	-2,18	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,897	341,1749	341,1758	-2,64	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,651	353,1749	353,1758	-2,55	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,314	435,1800	435,1813	-2,99	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,767	357,2064	357,2071	-1,96	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,721	313,2169	313,2168	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,722	345,2058	345,2071	-3,76	Cannabitriol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄

8	8,123	315,2315	315,2329	-1,27	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
9	12,998	355,1910	355,1913	-0,85	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Β1α

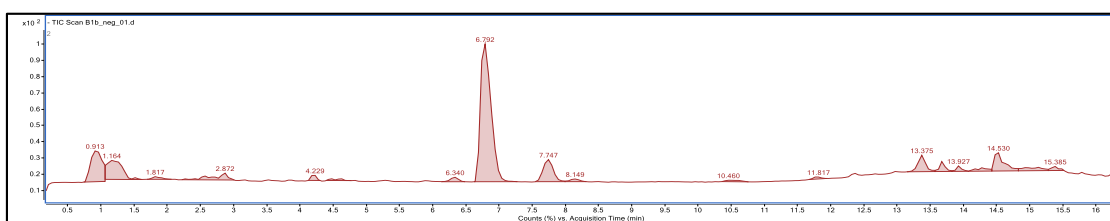


Εικόνα 102: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Β1α

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,590	367,1179	367,1187	-2,18	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,892	341,1750	341,1758	-2,34	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,696	353,1752	353,1758	-1,7	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,359	435,1803	435,1813	-2,3	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,811	357,2063	357,2071	-2,24	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,766	313,2169	313,2168	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

7	7,766	345,2062	345,2071	-2,61	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,992	355,1908	355,1913	-1,41	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Β1β

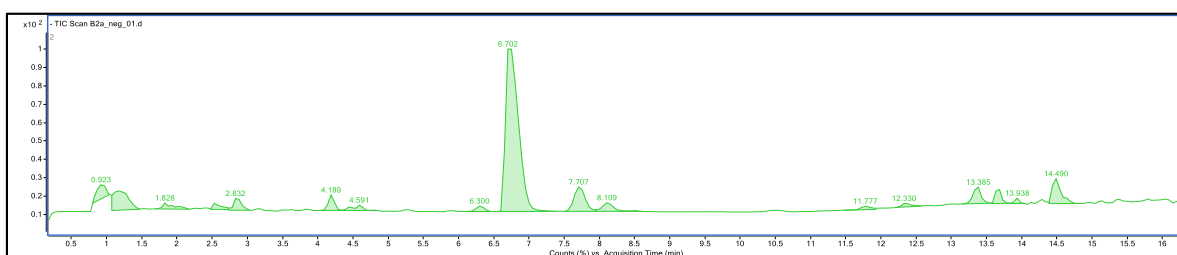


Εικόνα 103: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Β1β

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,588	367,1180	367,1187	-1,90	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,889	341,1752	341,1758	-1,76	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,693	353,1750	353,1758	-2,26	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,356	435,1802	435,1813	-2,53	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,809	357,2064	357,2071	-1,96	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,763	313,2166	313,2168	-0,64	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

7	7,763	345,2061	345,2071	-2,9	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,989	355,1917	355,1913	1,13	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα B2α

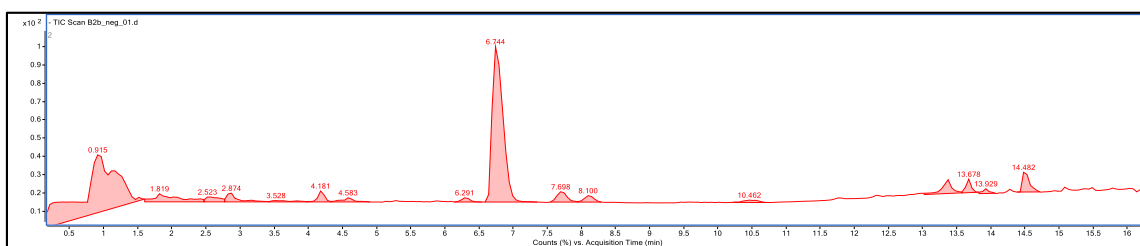


Εικόνα 104: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος B2α

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,548	367,1180	367,1187	-1,91	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,899	341,1751	341,1758	-2,05	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,653	353,1748	353,1758	-2,83	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,317	435,1802	435,1813	-2,53	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,719	357,2062	357,2071	-2,52	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,724	313,2165	313,2168	-0,96	Cannabidiol	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

					(CBD)	
7	7,724	345,2062	345,2071	-2,61	Cannabitrinol (CBT)	$C_{21}H_{30}O_4$
8	8,126	315,2316	315,2329	-0,95	Cannabigerol (CBG)	$C_{21}H_{32}O_2$
9	11,191	309,1852	309,1860	-2,59	Cannabinol (CBN)	$C_{21}H_{26}O_2$

✓ Δείγμα B2β

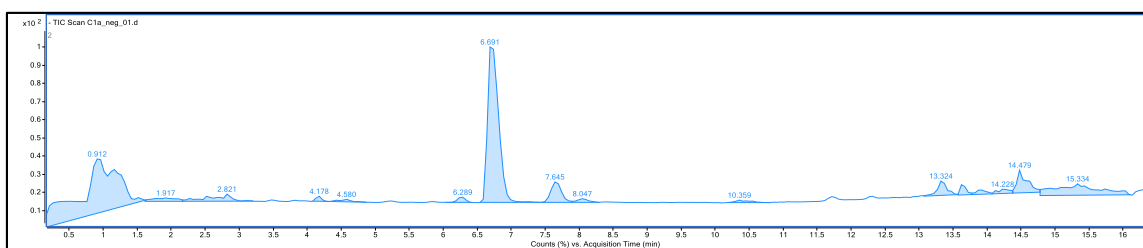


Εικόνα 105: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος B2β

#	RT(min)	$[M-H]^{-}(\Pi)$	$[M-H]^{-}(\Theta)$	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,590	367,1179	367,1187	-2,18	Cannflavin B	$C_{21}H_{20}O_6$
2	2,891	341,1747	341,1758	-3,22	Canniprene	$C_{21}H_{26}O_4$
3	3,645	353,1750	353,1758	-2,26	Cannabinolic acid (CBNA)	$C_{22}H_{26}O_4$
4	6,308	435,1798	435,1813	-3,45	Cannflavin A	$C_{26}H_{28}O_6$

5	6,760	357,2062	357,2071	-2,52	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,715	313,2169	313,2168	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,715	345,2062	345,2071	-2,61	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,991	355,1908	355,1913	-1,41	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Γ1α

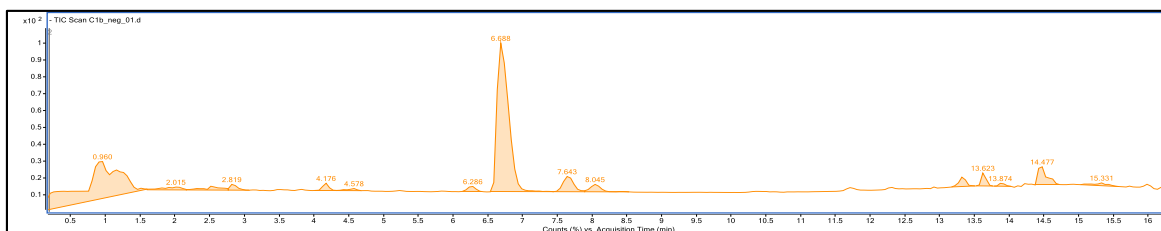


Εικόνα 106: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ1α

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,537	367,1175	367,1187	-0,82	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,838	341,1750	341,1758	-2,34	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,642	353,1752	353,1758	-1,70	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,305	435,1804	435,1813	-2,07	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆

5	6,707	357,2061	357,2071	-2,80	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,662	313,2169	313,2168	0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,662	345,2068	345,2071	-0,87	Cannabitrilol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,989	355,1917	355,1913	1,13	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Γ1β

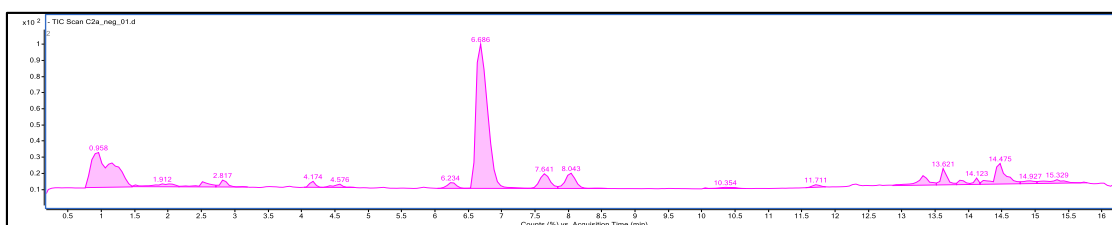


Εικόνα 107: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ1β

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,534	367,1178	367,1187	-2,45	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,886	341,1749	341,1758	-2,64	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,640	353,1747	353,1758	-3,11	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,3053	435,1803	435,1813	-2,30	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆

5	6,705	357,2059	357,2071	-3,36	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,660	313,2168	313,2168	0,00	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,660	345,2059	345,2071	-3,48	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,936	355,1898	355,1913	-4,22	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Γ2α

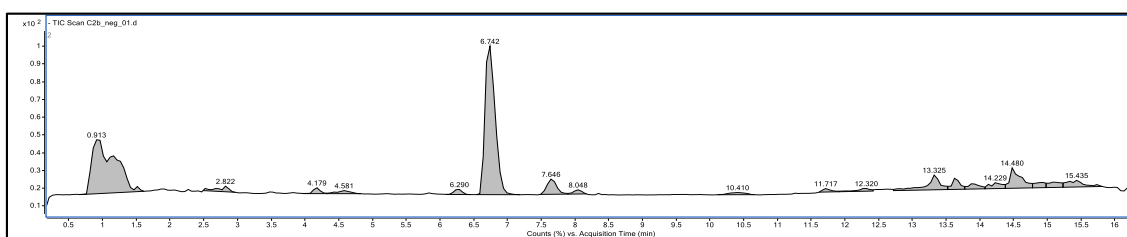


Εικόνα 108: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ2α

#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,532	367,1179	367,1187	-2,18	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,834	341,1750	341,1758	-2,34	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,638	353,1753	353,1758	-1,41	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄
4	6,301	435,1801	435,1813	-2,76	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆

5	6,703	357,2059	357,2071	-3,36	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,658	313,2167	313,2168	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,658	345,2058	345,2071	-3,77	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,934	309,1872	309,1860	3,88	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

✓ Δείγμα Γ2β

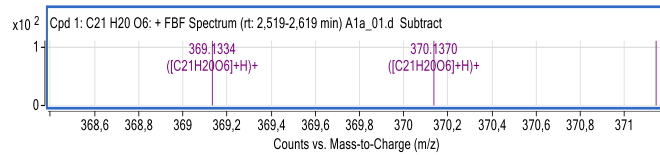
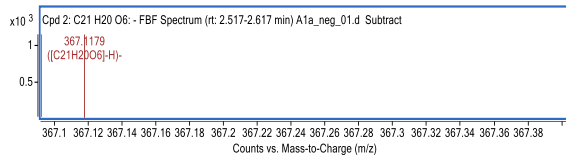


Εικόνα 109: LC/Q-TOF/HRMS χρωματογράφημα, αρνητικού ιονισμού δείγματος Γ2β

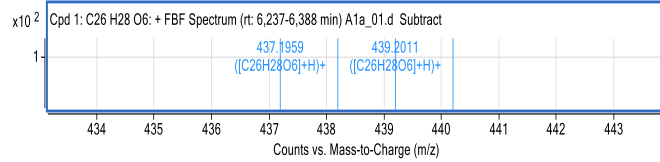
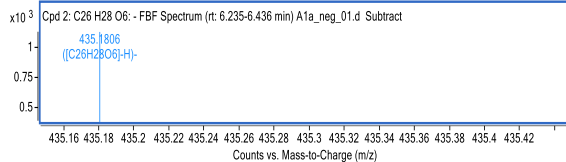
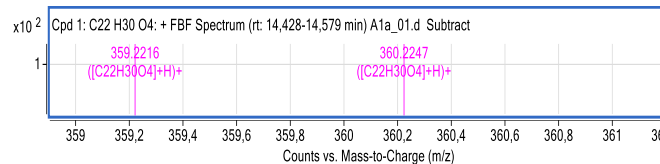
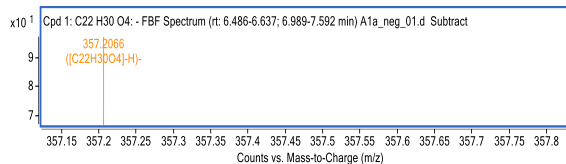
#	RT(min)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Mass Error (Δm)	Ένωση	Μοριακός Τύπος
1	2,538	367,1178	367,1187	-2,45	Cannflavin B	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
2	2,839	341,1747	341,1758	-3,22	Canniprene	C ₂₁ H ₂₆ O ₄
3	3,643	353,1745	353,1758	-3,68	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄

4	6,306	435,1801	435,1813	-2,76	Cannflavin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₆
5	6,759	357,2060	357,2071	-3,08	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
6	7,663	313,2167	313,2168	-0,32	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂
7	7,663	345,2060	345,2071	-3,19	Cannabitriol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄
8	12,939	355,1907	355,1913	-1,68	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂

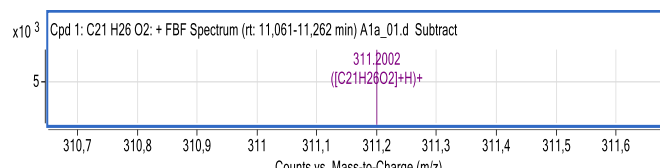
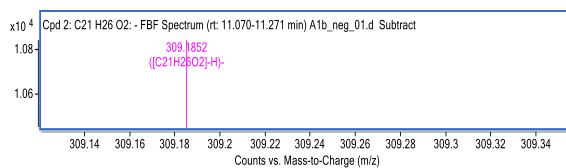
Cannflavin B



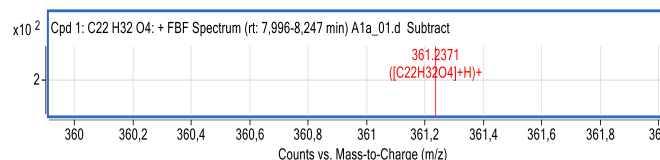
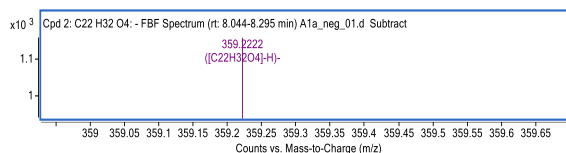
Cannflavin A

Cannabidiolic acid
(CBDA)

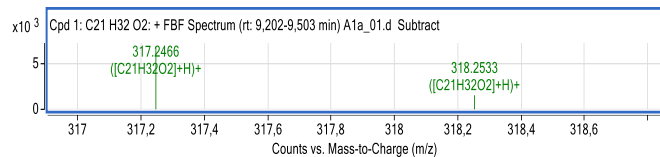
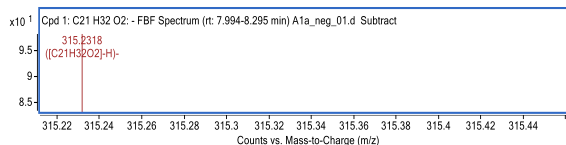
Cannabinol (CBN)



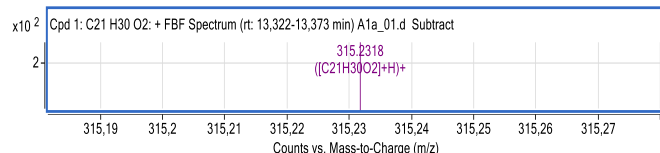
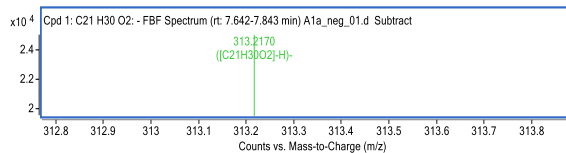
Cannabigerolic acid (CBGA)



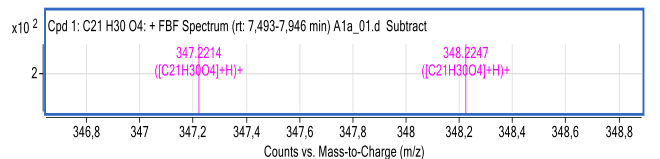
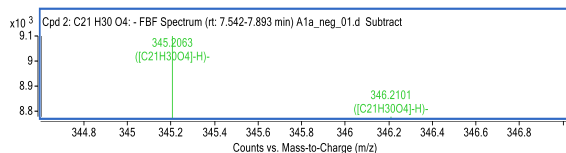
Cannabigerol (CBG)



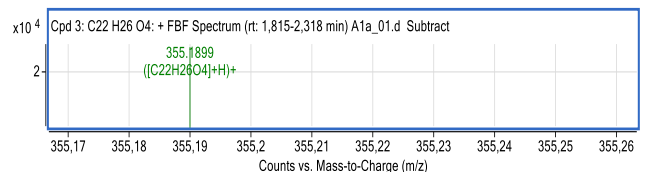
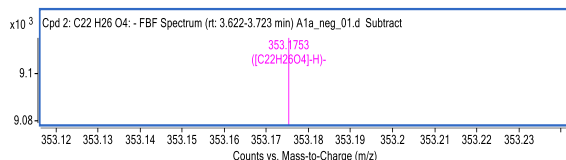
Cannabidiol (CBD)



Cannabitrinol (CBT)



Cannabinolic acid (CBNA)



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

Χημικές Δομές

