



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ & ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη προϊόντος εγκλεισμού κανναβιδιόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη

Γεωργία Β. Φρυγανά

Επιβλέπων καθηγητής:

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2024**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη προϊόντος εγκλεισμού κανναβιδιόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη

“Study of inclusion complex of cannabidiol in β-cyclodextrin”

Γεωργία Β. Φρυγανά

Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη προϊόντος εγκλεισμού κανναβιδιόλης σε β-κυκλοδεξτρίνη

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η *Cannabis sativa* L. προσελκύει παγκόσμιο ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων της. Αρχικά, στο θεωρητικό μέρος της παρούσας μελέτης αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του φυτού καθώς και τα φυτοκανναβινοειδή, που διαχωρίζονται σε ψυχοτροπικά και μη ψυχοτροπικά, εστιάζοντας στη κανναβιδιόλη. Με στόχο τη βελτίωση των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων επιχειρείται ο εγκλεισμός της σε κυκλοδεξτρίνες. Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελούν η παρασκευή, ο χαρακτηρισμός, ο προσδιορισμός της δομής και η *in vitro* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του προϊόντος εγκλεισμού κανναβιδιόλης (CBD) σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD). Δοκιμές παραλαβής CBD από *Cannabis sativa* L. και ποσοτικός προσδιορισμός, παραλαβή και ταυτοποίηση συστατικών αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa* L. και μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης.

Η παρούσα εργασία διακρίνεται σε τρία μέρη. Στο πρώτο μέρος πραγματοποιήθηκε εκχύλιση Soxhlet και εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών (CDs) από *Cannabis sativa* L., τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με HPLC, ενώ το αιθέριο έλαιο λήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης σε συσκευή Clevenger και η χημική του σύσταση αξιολογήθηκε με GC/MS, ταυτοποιήθηκαν συνολικά 75 ενώσεις με κυρίαρχες το β-μυρκένιο και α-πινένιο.

Στο δεύτερο μέρος, παρασκευάστηκαν σύμπλοκα εγκλεισμού β-CD/CBD, με τη μέθοδο της αργής ψύξης και η δομή τους προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ βάσει της οποίας αναλύθηκε εκτεταμένα η μοριακή διευθέτηση ξενιστή-ξενιζομένου των συμπλόκων στην κρυσταλλική κατάσταση. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μελέτη φάσης διαλυτότητας της CBD παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης β-CD για τον προσδιορισμό του προφίλ διαλυτότητας του συμπλόκου, της σταθεράς σύνδεσης (Kc) και της αποδοτικότητας της συμπλοκοποίησης (Complexation Efficiency-CE).

Στο τρίτο μέρος, μελετήθηκε η αντικαρκινική ιδιότητα της κανναβιδιόλης και των συμπλόκων εγκλεισμού της *in vitro* με τη μέθοδο MTT σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, νευροβλάστωματος SH-SY5Y και SK-N-SH. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών με Folin-Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με ABTS και DPPH, της κανναβιδιόλης, των συμπλόκων εγκλεισμού της και του αιθερίου ελαίου.

Επιστημονική περιοχή: Υπερμοριακή χημεία

Λέξεις κλειδιά: Κανναβιδιόλη, κυκλοδεξτρίνες, προϊόντα εγκλεισμού, Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-Χ, Φαινόμενα Εγκλεισμού

Study of inclusion complex of cannabidiol in β -cyclodextrin

MSc Food, Nutrition & Health

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of General Chemistry

ABSTRACT

In recent years *Cannabis sativa* L. has attracted scientific interest worldwide, due to its properties. Initially, the theoretical part of this study reports the phytocannabinoids, which are separated to psychotropic and non-psychotropic, focusing on cannabidiol. To improve the physicochemical properties of cannabidiol, inclusion in cyclodextrins is attempted. The aim of this study is to prepare, characterize, determine the structure, and investigate the anticancer activity *in vitro* of the inclusion product of cannabidiol (CBD) in β -cyclodextrin (β -CD). Trials were conducted to extract and quantify CBD from *Cannabis sativa* L. Additionally, the essential oil was obtained to identify its components, and lastly antioxidant activity was investigated.

This work is divided into three parts. In the first part, Soxhlet extraction and extraction of aqueous solution with cyclodextrins (CDs) from *Cannabis sativa* L. were performed. The extracts were analyzed by HPLC, while the essential oil was obtained by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. The chemical composition of the essential oil was evaluated by GC/MS, leading to the identification of 75 compounds in total, with β -myrcene and α -pinene being the dominant ones.

In the second part, CBD/ β -CD complexes were prepared by slow cooling method. The crystal structure of the inclusion complex was determined by X-ray crystallography and the guest-host molecular arrangement within the complex was extensively analyzed. Moreover, a phase solubility study was performed to determine the binding constant (K_c) and the complexation efficiency (CE).

In the third part, the anticancer activity of cannabidiol and its inclusion complexes was investigated *in vitro* using the MTT method on cancer cell lines, neuroblastoma SH-SY5Y and SK-N-SH. Finally, the identification of phenolic substances by Folin-Ciocalteu and the antioxidant ability by ABTS and DPPH method, of cannabidiol, its inclusion complexes and the essential oil were also performed.

Scientific area: Supramolecular Chemistry

Keywords: Cannabidiol, cyclodextrins, inclusion complexes, X-ray Crystallography, Inclusion Phenomena

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσικής, στο εργαστήριο Κυτταρικής τεχνολογίας, του τμήματος Βιοτεχνολογίας, και στο εργαστήριο Γενικής Χημείας, του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στη διεξαγωγή της. Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, τον καθηγητή Δρ. Κωνσταντίνο Μπεθάνη, για την εμπιστοσύνη, την κατανόηση, την πολύτιμη καθοδήγηση και το συνεχές ενδιαφέρον του για την επιστημονική μου κατάρτιση και εκπαίδευση.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Χρήστο Παππά και Πέτρο Ταραντίλη, μέλη της τριμελούς επιτροπής, που μου έδωσαν την ευκαιρία να ενταχθώ στην ομάδα του εργαστηρίου Γενικής Χημείας, την έμπρακτη βοήθεια τους στη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για τον χρόνο που αφιέρωσαν για τη διόρθωση της παρούσας μελέτης.

Επίσης ευχαριστώ θερμά, τον ακαδημαϊκό ερευνητή Ηλία Χριστοφορίδη, τον Δρ. Χαράλαμπο Κανάκη για τη πολύτιμη βοήθειά του στην υγρή χρωματογραφία και τη Δρ. Δήμητρα Δεφερέρα, που με βοήθησε στην εκτέλεση του πειράματος στην αέρια χρωματογραφία.

Την επίκουρη καθηγήτρια Σοφία Μαυρικού και τη διδακτορική ερευνήτρια Ελευθερία Καππαράκου, τους ευχαριστώ για την αμέριστη βοήθεια τους σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπισα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία και βεβαίως την οικογένεια μου και τα κοντινά μου πρόσωπα, η ηθική στήριξη τους σε κάθε μου βήμα είναι καταλυτική.

Αθήνα, 2024

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

Πίνακας εικόνων	1
Πίνακας σχημάτων.....	2
Πίνακας πινάκων	3
Πίνακας συντομογραφιών.....	4
ΜΕΡΟΣ Α΄: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Φαρμακογνωσία της <i>Cannabis sativa</i> L.	5
1.1 Μορφολογία	5
1.2 Χρήσεις κάνναβης	8
1.2.1 Χρήση για τροφή, ζωοτροφές και καλλυντικά.....	8
1.2.2 Βιομηχανική χρήση.....	9
1.2.3 Φαρμακευτική χρήση	10
1.3 Νομοθετικό πλαίσιο.....	11
1.4 Βιοσύνθεση κανναβινοειδών.....	13
1.5 Κανναβινοειδή	15
1.5.1 Τετραϋδροκανναβινόλη (THC)	15
1.5.2 Κανναβιδιόλη (CBD)	16
1.5.3 Άλλα κανναβινοειδή.....	17
1.6 Μη κανναβινοειδή	20
1.6.1 Τερπένια	20
1.6.2 Φλαβονοειδή.....	21
1.7 Μηχανισμός δράσης κανναβινοειδών.....	22
1.7.1 Ενδογενές κανναβινοειδές σύστημα	22
1.7.2 Άλλοι υποδοχείς κανναβινοειδών.....	23
1.8 Φαρμακευτική δράση	24
1.8.1 Νευρολογικές διαταραχές.....	24
1.8.2 Πόνο και φλεγμονή	26
1.8.3 Ψυχολογικές διαταραχές	26
1.8.4 Καρκίνος	28
1.8.5 Αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Κυκλοδεξτρίνες.....	32
2.1 Γενικά	32

2.2 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών σε στερεή κατάσταση..	35
2.3 Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Παραλαβή, διαχωρισμός και ταυτοποίηση συστατικών <i>Cannabis sativa</i> L.....	39
3.1 Παραλαβή των συστατικών	39
3.1.1 Τεχνικές Εκχύλισης	39
3.1.2 Παραλαβή με υδροαπόσταξη	42
3.2 Τεχνικές διαχωρισμού και ταυτοποίησης των συστατικών	43
3.2.1 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης.....	43
3.3 Ανιχνευτές	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Τεχνικές Χαρακτηρισμού	49
4.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis).....	49
4.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT/IR)	50
4.3 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ	51
4.3.1 Γενικά.....	51
4.3.2 Είδη πλεγμάτων.....	53
4.3.3 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης	55
4.3.4 Βελτιστοποίηση δομής.....	57
4.3.5 Αξιολόγηση και κατάθεση δομής.....	58
4.3.6 Οργανολογία	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανίχνευση αντικαρκινικής δράσης και προσδιορισμός αντιοξειδωτικών και φαινολικών συστατικών	61
5.1 Μελέτες βιωσιμότητας σε κύτταρα: Μέθοδος MTT	61
5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών και φαινολικών συστατικών	62
5.2.1 Δοκιμή Folin-Ciocalteu	62
5.2.2 Δοκιμή DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	63
5.2.3 Δοκιμή ABTS (2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid)	64
ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Μελέτη εκχυλίσματος <i>Cannabis sativa</i> L.	67
6.1 Εκχύλιση Soxhlet	68
6.2 Εκχύλιση με υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης.....	70
6.3 Ταυτοποίηση και ποσοτική ανάλυση εκχυλίσματος με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Μελέτη αιθερίου ελαίου <i>Cannabis sativa</i> L.....	75
7.1 Παραλαβή με Υδροαπόσταξη	75
7.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αιθέριου ελαίου με αέρια χρωματογραφία-χρωματογραφία μαζών (GC/MS)	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και αιθερίου ελαίου <i>Cannabis sativa</i> L.	86
8.1 Προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	86
8.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ενώσεων.....	91
8.2.1 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο DPPH	91
8.2.2 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και του αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο ABTS	94
8.2.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικών δοκιμών.....	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Διάγραμμα φάσης διαλυτότητας.....	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Ανίχνευση της αντικαρκινικής δράσης των συμπλόκων CBD <i>in vitro</i> σε κυτταρικές σειρές (νευροβλάστωμα SH-SY5Y και νευροβλάστωμα SK-N-SH)	103
10.1 Παρασκευή διαλυμάτων για την <i>in vitro</i> μελέτη των συμπλόκων.....	104
10.2 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT	105
10.2.1 Αποτελέσματα και συζήτηση	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Κρυσταλλογραφική μελέτη προϊόντος εγκλεισμού CBD/ β -CD	114
11.1 Κρυστάλλωση προϊόντος εγκλεισμού CBD σε β -CD	114
11.2 Επιλογή κατάλληλου μονοκρυστάλλου προϊόντος εγκλεισμού CBD σε β -CD	116
11.3 Συλλογή Κρυσταλλογραφικών δεδομένων από περίθλαση ακτίνων-Χ και προσδιορισμός δομών	117
11.4 Περιγραφή της δομής. Κρυσταλλική διευθέτηση του προϊόντος εγκλεισμού	119
Συμπεράσματα και συζήτηση.....	123
Βιβλιογραφία	127
Παραρτήματα	137
Παράρτημα 1.....	137
Παράρτημα 2.....	140

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Μέρη φυτού <i>Cannabis sativa</i> L.....	6
Εικόνα 2: Τριχώματα από <i>C. sativa</i>	7
Εικόνα 3: Οι πολλαπλές χρήσεις του φυτού της κάνναβης	8
Εικόνα 4: Η αντικαρκινική δράση της CBD	29
Εικόνα 5: Συσκευή Soxhlet.....	41
Εικόνα 6: Συσκευή Clevenger	43
Εικόνα 7: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	45
Εικόνα 8: Αέρια Χρωματογραφία	47
Εικόνα 9: Βασικά μέρη ενός FT/IR οργάνου	50
Εικόνα 10: α) Μοναδιαία κυψελίδα β) Θεμελιώδης κυψελίδα.....	52
Εικόνα 11: Τα 7 Κρυσταλλογραφικά συστήματα	54
Εικόνα 12: Τα 14 πλέγματα Bravais	55
Εικόνα 13: Νόμος Bragg.....	56
Εικόνα 14: Αρχή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.....	57
Εικόνα 15: Βασικά μέρη ενός περιθλασίμετρου D8 Venture της Bruker	60
Εικόνα 16: (α) Συσκευή Soxhlet (β) Το εκχύλισμα που λήφθηκε από την εκχύλιση Soxhlet	69
Εικόνα 17: (α) Περιστροφικός εξατμιστήρας (β) Το δείγμα που λήφθηκε μετά τη συμπύκνωση.....	69
Εικόνα 18: Όργανο HPLC.....	72
Εικόνα 19: Διαχωριστική χοάνη.....	76
Εικόνα 20: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC/MS).....	77
Εικόνα 21: Καλλιεργητικά τρυβλία 96 βοθρίων (96-well plates).....	107
Εικόνα 22: Ο μονοκρύσταλλος προσκολλάται με παραφινέλαιο ή με άλλο κρυσταλλοπροστατευτικό διάλυμα πάνω σε θηλιά, η οποία προσαρμόζεται στην κεφαλή του γωνιομέτρου	117
Εικόνα 23: Δύο εικόνες περίθλασης από κρύσταλλο συμπλόκου CBD/ β -CD που συλλέχθηκαν με μετακίνηση του κρυστάλλου κατά 90° μεταξύ τους	117
Εικόνα 24: Χημική δομή μορίου κανναβιδιόλης.....	120
Εικόνα 25: (α) Ασύμμετρη μονάδα της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου CBD/ β -CD. (β) Υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των υδροξυλομάδων του δακτυλίου-B της CBD με την β -CD.....	121

Εικόνα 26: Εγκλωβισμός ενός μορίου CBD στην κοιλότητα διμερούς β-CD τύπου «ουράς προς ουρά».....	122
Εικόνα 27: (α) Η μοριακή διευθέτηση του συμπλόκου CBD/β-CD στον κρύσταλλο. (β) Η κάτοψη κατά το ab επίπεδο και οι γέφυρες υδρογόνου που σχηματίζουν τα νερά μεταξύ τους και με τα μόρια των κυκλοδεξτρινών.	122

Πίνακας σχημάτων

Σχήμα 1: Βιοσύνθεση κανναβινοειδών	14
Σχήμα 2: Χημικές δομές κύριων κανναβινοειδών.....	19
Σχήμα 3: Χημικές δομές τερπενίων του είδους <i>C. sativa</i> L.	20
Σχήμα 4: Χημική δομή φλαβονοειδών του είδους <i>C. sativa</i> L.	22
Σχήμα 5: Δομή και διαστάσεις α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνης.....	32
Σχήμα 6: Σύμπλοκο τύπου Α, Β και οι υποκατηγορίες τους.....	34
Σχήμα 7: Χημική δομή κανναβιδιόλης (CBD) και η δομή του συμπλόκου εγκλεισμού CBD.....	38
Σχήμα 8: Αρχή μεθόδου MTT	61
Σχήμα 9: Αρχή μεθόδου Folin-Ciocalteu.....	63
Σχήμα 10: Μηχανισμός αντίδρασης DPPH από ένα αντιοξειδωτικό (ΑΗ).....	64
Σχήμα 11: Δοκιμασία ABTS, σχήμα αντίδρασης κατιονικής ρίζας (ABTS).....	65
Σχήμα 12: Αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου <i>Cannabis sativa</i> L.....	81
Σχήμα 13: Αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου <i>Cannabis sativa</i> L.....	81
Σχήμα 14: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.....	87
Σχήμα 15: Διάγραμμα σύγκρισης ολικών φαινολικών <i>Cannabis sativa</i> L.....	89
Σχήμα 16: Καμπύλη αναφοράς δοκιμής DPPH.....	92
Σχήμα 17: Σχήμα σύγκρισης αντιοξειδωτικού περιεχομένου με τη μέθοδο DPPH....	94
Σχήμα 18: Καμπύλη αναφοράς δοκιμής ABTS	95
Σχήμα 19: Σχήμα σύγκρισης αντιοξειδωτικού περιεχομένου με τη μέθοδο ABTS.....	97
Σχήμα 20: (α) Πρότυπη καμπύλη του CBD στη μεθανόλη όπως καταγράφηκε στα 209 nm (n=3) (β) Διάγραμμα φάσης διαλυτότητας του συστήματος CBD/β-CD σε νερό στους 25°C (n=3).....	101
Σχήμα 21: Αποτελέσματα επίδρασης του CBD και συμπλόκων CBD στη βιωσιμότητα των SH-SY5Y κυττάρων σε 48 ώρες και 72 ώρες.	109
Σχήμα 22: Αποτελέσματα επίδρασης του CBD και συμπλόκων CBD στη βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων σε 48 και 72 ώρες.	111

Πίνακας πινάκων

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά φυτικού υλικού.....	66
Πίνακας 2: Πρόγραμμα έκλουσης HPLC.....	71
Πίνακας 3: Πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών	73
Πίνακας 4: Συστατικά δείγματος αιθερίου ελαίου <i>Cannabis sativa</i> L.	82
Πίνακας 5: Μετρήσεις πρότυπου γαλλικού οξέος	87
Πίνακας 6: Αποτελέσματα ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη δοκιμή Folin- Ciocalteu	88
Πίνακας 7: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH.....	93
Πίνακας 8: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS.....	96
Πίνακας 9: Ποσότητες ξενιστή (β -CD, HP- β -CD) και ξενιζομένου (CBD) που αναμίχθηκαν σε 25 mL H ₂ O	105
Πίνακας 10: Οι ακριβείς ποσότητες και αναλογίες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την κρυστάλλωση των συμπλόκων	115
Πίνακας 11: Χρονοδιάγραμμα σταδιακής μείωσης της θερμοκρασίας για τη παρασκευή των συμπλόκων.....	115
Πίνακας 12: Πειραματικές λεπτομέρειες, κρυσταλλογραφικά δεδομένα και βελτιστοποίηση δομής	118

Πίνακας συντομογραφιών

ΓΠΑ	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας
β-CD	β-κυκλοδεξτρίνη
RM-β-CD	Τυχαία μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη
HP-β-CD	2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
GC	Αέρια χρωματογραφία
MTT	3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο βρωμίδιο
DPPH	2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο
ABTS	2,2'-αζινο-δι-3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ
Δ ⁹ -THC	Δ ⁹ -τετραϋδροκανναβινόλη
Δ ⁸ -THC	Δ ⁸ -τετραϋδροκανναβινολη
CBD	Κανναβιδιόλη
CBG	Κανναβιγερόλη
CBN	Κανναβινόλη
CBC	Κανναβιχρωμίνη
CBE	Κανναβιελσοΐνη
CBL	Κανναβικυκλόνη
CBT	Κανναβιτριόλη
ΕΟΦ	Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων
EFSA	Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων
FDA	Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ
EMA	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
GBM	Γλοιοβλάστωμα
EO	Αιθέριο έλαιο
ROS	Δραστικές μορφές οξυγόνου
ER	Ενδοπλασματικό Δίκτυο

ΜΕΡΟΣ Α': ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Φαρμακογνωσία της *Cannabis sativa* L.

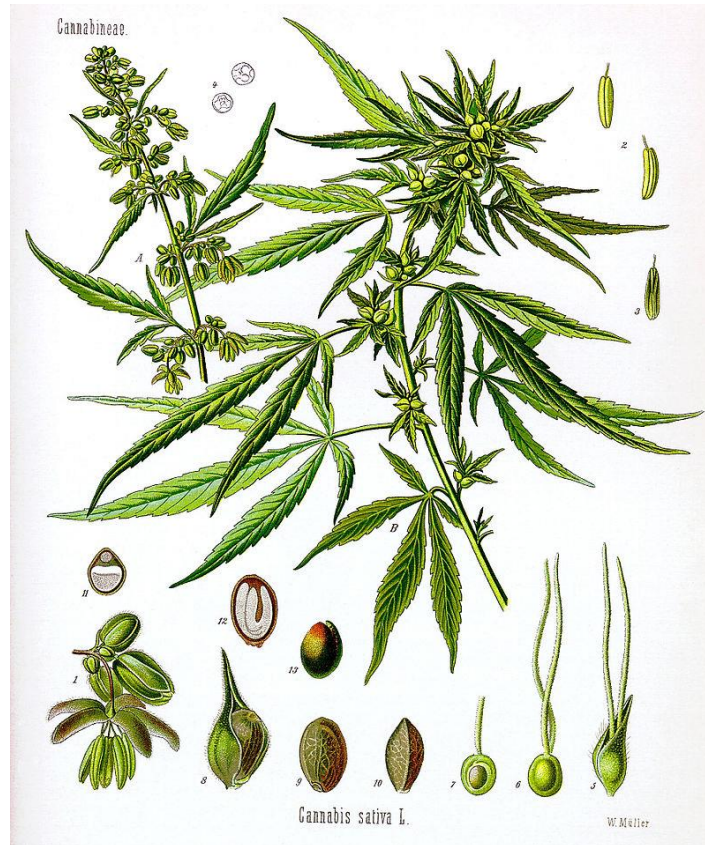
1.1 Μορφολογία

Το φυτό της κάνναβης ανήκει στη κλάση των *Hamamelidae*, στη τάξη *Rosales* και στο γένος *Cannabis* L. που ανήκει στην οικογένεια των ανθοφόρων φυτών *Cannabaceae*. Οι Schultes, Klein, Plowman, & Lockwood (1974) διέκριναν τρία είδη εντός του γένους: *C. sativa* L., *C. indica* Lam., και *C. Ruderalis*. (1)

Η *Cannabis sativa* πιστεύεται ευρέως ότι προέρχεται από την Κεντρική Ασία, ωστόσο λόγω της μακράς της ιστορίας η αρχική καταγωγή της είναι ασαφής. Το *C. sativa* είναι ένα δίοικο, σπάνια μονόικο, δηλαδή αρσενικά και θηλυκά άνθη βρίσκονται σε διαφορετικό φυτό. Τα αρσενικά άνθη αποτελούνται από πέντε πράσινα, τριχωτά φύλλα περίπου 2,5-4 mm και πέντε στήμονες. Τα θηλυκά άνθη σχεδόν άμισχα ο καρπός (σπόρος), είναι αχάινιο και περιέχει ένα σπόρο.

Το φυτό της κάνναβης είναι ετήσιο, με ύψος 1–6m. Τα φύλλα, συνήθως αποτελούνται από πέντε έως επτά μικρότερα φύλλα, είναι γραμμικά-λογχοειδή, κωνικά και στα δύο άκρα και έντονα οδοντωτά. Ένας απλός, μικρός, λείος, ανοιχτό καφέ-γκρι καρπός παράγεται ανά λουλούδι που ανθίζει τους μήνες Ιούλιο-Αύγουστο. (1) (2)

Η ανάπτυξη της κάνναβης αποτελείται από οκτώ κύρια στάδια ανάπτυξης: την βλάστηση, ανάπτυξη φύλλων, ανάπτυξη πλευρικών βλαστών, επιμήκυνση στα κύρια βλαστάρια, ανάπτυξη ταξιανθίας, ανθοφορία, ανάπτυξη καρπού, ωρίμανση καρπού και τέλος γήρανση του φυτού. (3)



Εικόνα 1: Μέρη φυτού *Cannabis sativa* L.

A. Αρσενικό άνθος (staminate) plant, B. Θηλυκό άνθος (pistillate), 1. Αρσενικό λουλούδι με στήμονες, 2. Στήμονας (ανθήρας και βραχύ νήμα), 3. Στήμονας, 4. Κόκκοι γύρης, 5. Θηλυκό άνθος με πέταλο κάλυψης 6. Θηλυκό άνθος χωρίς πέταλο κάλυψης, 7. Θηλυκά φρούτα, διαμήκης τομή, 8. Σπόρος (αχάινιο) με βράκτιο, 9. Σπόρος χωρίς βράκτιο 10. Σπόρος (πλάγια όψη) 11. Σπόρος (διατομή), 12. Σπόρος (διαμήκης τομή), 13. Σπόρος χωρίς περικάρπιο

Σχεδόν όλα τα εναέρια μέρη των φυτών κάνναβης καλύπτονται με τριχώματα (trichomes) πρόκειται για επιδερμικές αδενικές προεξοχές που καλύπτουν τα φύλλα. Δύο κύριοι τύποι τριχωμάτων υπάρχουν στο *C. sativa*: (A) αδενικά τριχώματα και (B) μη αδενικά τριχώματα. Στα αδενικά τριχώματα γίνεται η σύνθεση και αποθήκευση των κανναβινοειδών είναι υπεύθυνα για την άμυνα του φυτού και τα τερπενοειδή στα οποία οφείλεται η οσμή του φυτού. (1) (2)



Εικόνα 2: Τριχώματα από *C. sativa*

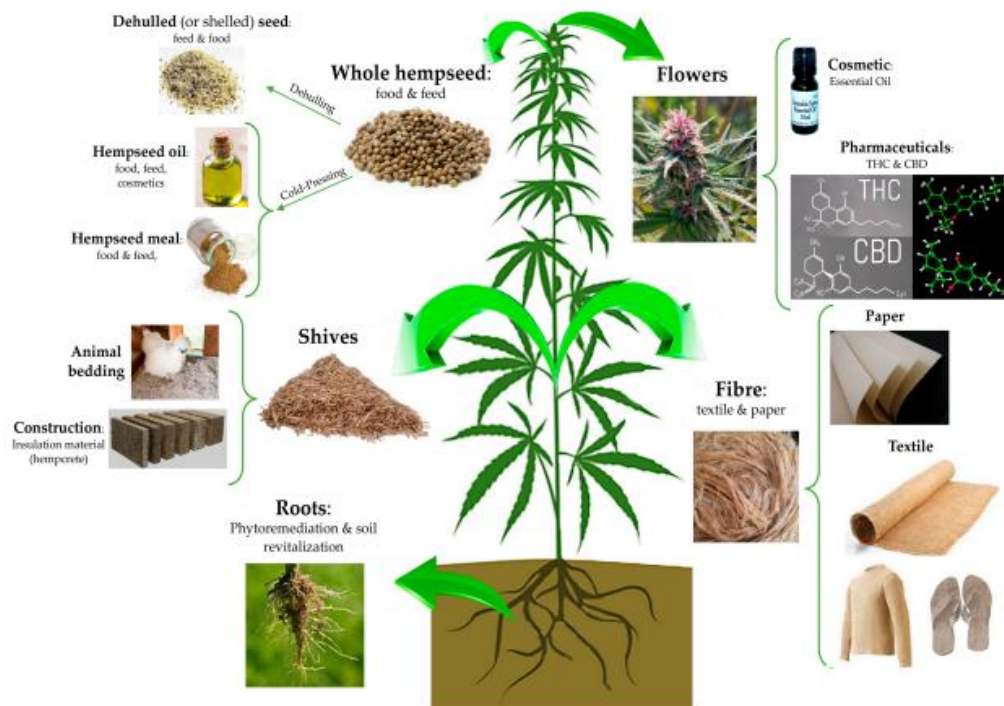
Η περιεκτικότητα σε φυτοκανναβινοειδή στο *C. sativa* επηρεάζεται από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία, ακτινοβολία, θρεπτικά συστατικά του εδάφους και τα παράσιτα. (4) Η *Cannabis sativa* L. μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιομηχανική ή ιατρική χρήση. Σήμερα, η καλλιέργεια και η παραγωγή κάνναβης είναι περιορισμένη και ελεγχόμενη λόγω των ψυχοδραστικών της ιδιοτήτων. Ταυτόχρονα δημιουργούνται νέες ποικιλίες από διάφορα γένη ώστε να έχουν τα επιθυμητά προσόντα, κάποιες από αυτές τις υβριδικές ποικιλίες έχουν εμπορευματοποιηθεί από διάφορες εταιρείες. (1)

Η συγκέντρωση κάθε κανναβινοειδούς στο φυτό καθορίζεται γενετικά, γι' αυτό υπάρχουν διαφορετικοί χημειότυποι με βάση την αναλογία των δυο κύριων κανναβινοειδών THC και CBD. Ο *C. sativa* L. *subsp. Indica* έχει χαμηλό CBD/THC (0,00-0,05) και υψηλή περιεκτικότητα σε THC (>0,3% ξηρού προϊόντος σε ανθούς θηλυκού φυτού).

Ο δεύτερος χημειότυπος χαρακτηρίζεται από (CBD/THC) (0,5–3,0), συχνά με επικρατέστερο το CBD. Οι ποικιλίες αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς και αναφέρεται ως φαρμακευτική κάνναβη. Η βιομηχανική ή κλωστική κάνναβη (*C. sativa* L. *subsp. Sativa*) χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλογία (CBD/THC) (15-25) λόγω υψηλής CBD και χαμηλής THC, όχι πάνω από 0,3% ξηρού προϊόντος σε ανθούς θηλυκού φυτού, αυτές οι ποικιλίες συνήθως καλλιεργούνται για ίνες, σπόρους και τα παράγωγά τους. (5)

1.2 Χρήσεις κάνναβης

Τα διάφορα μέρη του φυτού χρησιμοποιούνται για διαφορετικούς σκοπούς συγκεκριμένα το ανθός χρησιμοποιείται ως ναρκωτικό, για τη δημιουργία φαρμακευτικών προϊόντων και στα καλλυντικά. Ο βλαστός χρησιμοποιείται στη κλωστοϋφαντουργία και χαρτοποιία και για οικοδομικά υλικά, ενώ από τα σπέρματα παράγεται κανναβέλαιο, αλεύρι, πρωτεΐνη, συμπληρώματα, ζωτροφές, καλλυντικά και βιοκαύσιμα, τέλος οι ρίζες βελτιώνουν τη ποιότητα του εδάφους.



Εικόνα 3: Οι πολλαπλές χρήσεις του φυτού της κάνναβης

1.2.1 Χρήση για τροφή, ζωτροφές και καλλυντικά

Πολλά προϊόντα τροφίμων μπορούν να δημιουργηθούν από κάνναβη, τα περισσότερα από τα οποία φτιάχνονται από σπόρους κάνναβης. Οι σπόροι κάνναβης είναι μια πολύ θρεπτική τροφή με υψηλή διατροφική αξία. Κάθε 100 g σπόρος κάνναβης παρέχει 500–600 Kcal ενέργεια. Ο σπόρος κάνναβης περιέχει συνήθως 25-35% λιπίδια, 20-25% πρωτεΐνες και 20-30% υδατάνθρακες καθώς και βιταμίνες (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη, βιταμίνη E και C), μέταλλα (κυρίως μαγνήσιο).

Από διατροφική άποψη, το έλαιο σπόρων κάνναβης (hemp seed oil) είναι πολύ πιο πλούσιο από το σογιέλαιο. Επιπλέον, το έλαιο σπόρων κάνναβης παρουσιάζει

μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα λόγω των ισομερών τοκοφερόλης που υπάρχουν σε μεγάλη ποσότητα στο λάδι καθώς και των τερπένιων και πολυφαινόλων (κυρίως φλαβονοειδή). Το αλεύρι από σπόρους κάνναβης δεν έχει γλουτένη, και μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι δεν προκαλεί κάποια αλλεργία.

Στις ΗΠΑ το CBD δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί νόμιμα ως συστατικό τρόφιμου ή σε συμπληρώματα διατροφής. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, ωστόσο, συμπεριλαμβάνει τα συμπληρώματα που περιέχουν CBD στη κατηγορία νέα τρόφιμα ή Novel food. (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2019) (6)

Επιπλέον, πολλά κανναβινοειδή που περιέχονται στη *Cannabis sativa* παρουσιάζουν ενδιαφέρον για χρήση σε καλλυντικά καθώς το CBD, CBC, THCV και CBDV έχουν δυνατότητες για χρήση σε σκευάσματα για δέρματα με τάσεις ακμής, ενώ το CBG και CBGV για ρύθμιση της παραγωγής σμήγματος.

Το CBN και CBD φαίνεται επίσης να παρουσιάζουν ενδιαφέρον για εφαρμογή σε αντηλιακά. Το λάδι από σπόρους κάνναβης είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή, τερπένια, καροτενοειδή, φυτοστερόλες που παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη και αντιγηραντική δράση. Επιπλέον, η περιεκτικότητά του σε ω-6/ω-3 είναι ιδανική για το δέρμα. Είναι ένα ταχέως απορροφούμενο και μη φαγεσωρογόνο έλαιο. Περιέχει φυσικά τοκοφερόλη και χλωροφύλλη. (7)

Οι ίνες είναι γνωστές για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες, αυτή η ιδιότητα συνδέεται με τη χημική σύνθεση ίνες φλοιού της κάνναβης: τόσο ελεύθερες όσο και εστεροποιημένες στερόλες και τριτερπένια έχουν εντοπιστεί, μεταξύ των οποίων η β-σιτοστερόλη και η β-αμυρίνη. Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές για τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες. (1)

1.2.2 Βιομηχανική χρήση

Η βιομηχανική κάνναβη είναι ένα φυτό με πολλαπλές χρήσεις. Οι παραγόμενες ίνες υψηλότερης ποιότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην υφαντουργία και για παραγωγή χαρτιού, ενώ οι υπόλοιπες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

κατασκευή υφασμάτων σακων και σκινιών. Οι ίνες της κάνναβης χρησιμοποιούνται ακόμα για την κατασκευή υλικών μόνωσης και υλικών οικοδομών. Κατασκευές από ίνες κάνναβης χρησιμοποιούνται στην αυτοκινητοβιομηχανία, ως μονωτικό και στεγανωτικό επίστρωμα αυτοκινήτων. (8) (9)

1.2.3 Φαρμακευτική χρήση

Επί του παρόντος υπάρχουν αρκετά εμπορικά σκευάσματα που το ενεργό συστατικό είναι το CBD όπου διατίθενται στην αγορά ή είναι ακόμη υπό έρευνα η πιθανή δράση τους. Το 2018 εγκρίθηκε από τον FDA (US Food and Drug Administration) το Epidiolex και από τον EMA (European Medicines Agency) το 2019, όπου το CBD είναι το ενεργό συστατικό του, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ορισμένων μορφών μη θεραπεύσιμης παιδικής επιληψίας, καθώς αποτελεί συμπληρωματική θεραπεία για τα σύνδρομα Dravet και Lennox-Gastaut σε ασθενείς από 1 χρόνου. Δοκιμάζεται για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας και διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού. Είναι σε υγρή μορφή για δια στόματος χρήση και παράγεται από GW Pharmaceuticals. Επίσης το 2020 εγκρίθηκε από τον FDA και το 2021 από τον EMA το Epidiolex για το σύμπλεγμα κονδυλώδους σκλήρυνσης (tuberous sclerosis complex, TSC).

Το 1985 ο FDA ενέκρινε το Marinol και το 2016 το Syndros, περιλαμβάνουν το δραστικό συστατικό δροναμπινόλη (dronabinol), μια συνθετική δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC), για την αντιμετώπιση της ναυτίας και άλλων διαταραχών που προκαλούνται από τις χημειοθεραπείες, και για τις ανορεκτικές τάσεις σε ασθενής με AIDS. Ακόμη ο FDA έχει εγκρίνει το Cesamet, που περιέχει το ενεργό συστατικό ναμπιλόνη (nabilone), που έχει παρόμοια δομή με το THC και παράγεται συνθετικά, με θεραπευτική χρήση ως αντιεμετικό σε καρκινοπαθείς και ως συμπληρωματικό αναλγητικό για τον νευροπαθητικό πόνο.

Ένα βοτανικό εκχύλισμα που περιέχει CBD και Δ⁹-THC με περίπου 1:1 αναλογία των δύο ενώσεων, έχει χρησιμοποιηθεί στο Sativex, με τη μορφή σπρέι, για τη θεραπεία της σπαστικότητας και των νευροπαθητικών πόνων στη σκλήρυνση κατά πλάκας,

εγκρίθηκε το 2010 σε διάφορες χώρες όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ευρωπαϊκή Ένωση και τον Καναδά.

Επίσης, πολλά φάρμακα βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικής έρευνας, όπως το Arvisol. Είναι μια ταμπλέτα που περιέχει καθαρό CBD, αναπτύχθηκε από την Echo Pharmaceuticals βρίσκεται στη φάση I για την αντιμετώπιση διαφόρων νευρολογικών διαταραχών, όπως η σχιζοφρένια και η επιληψία. Οι Nabiximols έχουν, και εξακολουθούν να δοκιμάζονται, επίσης για άλλους τύπους σπαστικότητας, καθώς και στο γλοιοβλάστωμα και σε διάφορους πόνους που προκαλούνται σε ασθενείς με καρκίνο. (10) (11)

1.3 Νομοθετικό πλαίσιο

Μετά την ανακάλυψη της ψυχοτρόπου ουσίας THC, πολλές χώρες έλαβαν μέτρα σε μια προσπάθεια περιορισμού της χρήσης κάνναβης. Αρχικά στις ΗΠΑ, μεταξύ 1914 και 1933, 33 πολιτείες ψήφισαν νόμους που περιορίζουν τη νόμιμη παραγωγή κάνναβης εκτός από ιατρικούς και βιομηχανικούς σκοπούς. Ωστόσο, η καλύτερη κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών, της βιοσύνθεσης κανναβινοειδών του *C. sativa* L. και η πρόοδος των αναλυτικών τεχνικών βοήθησε στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών και ιδιαιτέρως του THC, καθιστώντας δυνατό να διαχωριστούν πλέον οι ποικιλίες με υψηλές και χαμηλές περιεκτικότητες σε THC.

Γι' αυτούς τους λόγους η καλλιέργεια κάνναβης επανεξετάστηκε από τις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Ευρώπη. Πρώτος ο Καναδάς το 1998, νομιμοποίησε την καλλιέργεια κάνναβης για ποικιλίες με περιεκτικότητα σε THC<0,3% ξηρού προϊόντος σε φύλλα και ανθούς. Στην ΕΕ, η καλλιέργεια κάνναβης νομιμοποιήθηκε το 2013 με τον κανονισμό της ΕΕ αριθ. 1307/2013 που επέτρεψε την καλλιέργεια του *C. sativa* L. για βιομηχανικούς σκοπούς μόνο για εκείνα τα φυτά με χαμηλά επίπεδα THC. Ενώ μόλις το 2018, η Agriculture Improvement Act (γνωστή ως Farm Bill) αφαίρεσε από τις ποικιλίες *C. sativa* με THC<0,3% το τίτλο μαριχουάνα με σκοπό την αντιμετώπιση του ως ένα κοινό φυτό. (5)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, περισσότερες από 40 χώρες έχουν εγκρίνει προγράμματα ιατρικής μαριχουάνας/κάνναβης, και 34 πολιτείες στις ΗΠΑ. Ο FDA, ενέκρινε τις ποικιλίες με περιεκτικότητα περισσότερο από 0,1% της Δ⁹-THC. (10) Όλες οι ποικιλίες κάνναβης, που έχουν εγκριθεί για καλλιέργεια περιέχουν ίχνη της ψυχοδραστικής ουσίας Δ⁹-THC, με όριο 0,2% στην ΕΕ και 0,3% στον Καναδά. (12) (13) (14)

Όσον αφορά την εθνική νομοθεσία, η κάνναβη στην Ελλάδα είναι παράνομη για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Με το Άρθρο 1 του Νόμου, εισάγεται μια εξαίρεση από την παρ. 2 του άρθρου 2 του Ν. 4139/2013, νόμος περί εξαρτησιογόνων ουσιών και άλλες διατάξεις, για το είδος *Cannabis sativa* L. με περιεκτικότητα THC κάτω από 0,2%. (15)

Το 2017, η ελληνική κυβέρνηση με την Κοινή Υπουργική Απόφαση (ΚΥΑ) Αριθμ. Γ5γ οικ. 49690/2017 (ΦΕΚ 2238/Β/29-6-2017), μετακίνησε τη χρήση της κάνναβης (και της ρητίνης της) από τον Πίνακα Α' του Ν. 3459/2006 που αφορά τις εντελώς απαγορευμένες ναρκωτικές ουσίες, στο Πίνακα Β' που αφορά τις φαρμακευτικές ουσίες. (16)

Ένα χρόνο αργότερα, με το Ν.4523/2018, νομιμοποιήθηκε η παραγωγή, κατοχή, μεταφορά, αποθήκευση και προμήθεια των πρώτων υλών και των ουσιών των ποικιλιών κάνναβης περιεκτικότητας σε τετραϋδροκανναβινόλη (THC) μεγαλύτερη του 0,2%, αυτό δίνει τη δυνατότητα στις φαρμακευτικές εταιρείες να καλλιεργούν νόμιμα κάνναβη. Όσον αφορά την κανναβιδιόλη δεν περιλαμβάνεται στη λίστα των ναρκωτικών ουσιών (Νόμος 3459/2006 – ΦΕΚ Α'/103/25.5.2006) (17). Ενώ με την Υπουργική Απόφαση Δ3(γ) 20849/2023 - ΦΕΚ 2756/Β/25-4-2023 θεσπίζονται οι όροι και προϋποθέσεις για την παραγωγή και την κυκλοφορία τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης. (18)

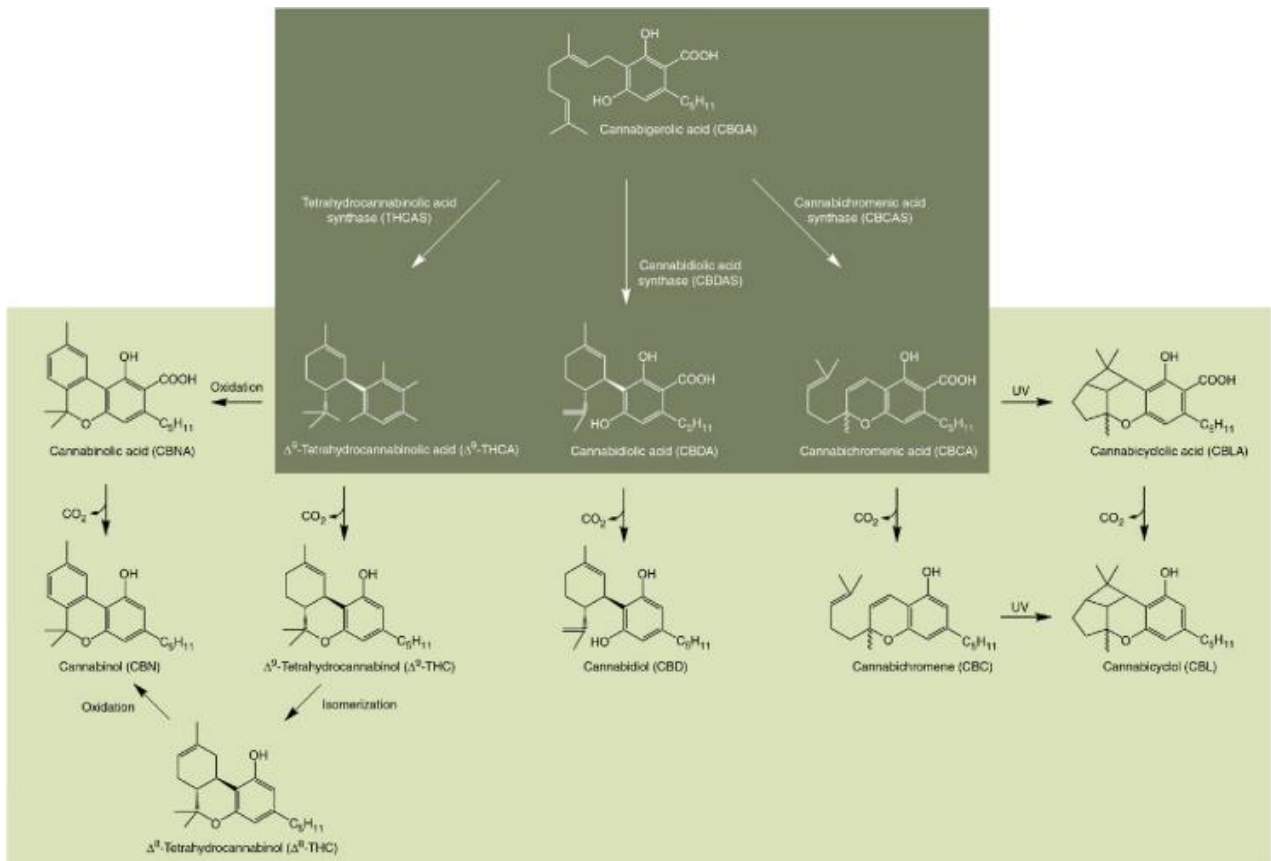
Επιπλέον, ο νόμος ΥΠ' ΑΡ. 4801/2021 αφορά την παραγωγή, εξαγωγή και διάθεση τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης του είδους *Cannabis sativa* L. περιεκτικότητας τετραϋδροκανναβινόλη (THC) άνω του 0,2% και άλλες διατάξεις, του Υπουργείου Ανάπτυξης και Επενδύσεων. Σκοπός του νόμου είναι η απλοποίηση της διαδικασίας εξαγωγής προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης και η διασφάλιση του ομαλού και ασφαλούς εφοδιασμού της ελληνικής αγοράς τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης υπό συνθήκες υψίστης ασφάλειας. (19)

Με σκοπό την αναβάθμιση και τον εκσυγχρονισμό του αγροτικού τομέα αλλά και τη προστασία του πολίτη, το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων έχει θεσπίσει διάφορες διατάξεις, σύμφωνα με το ΦΕΚ τεύχος Β 1151/15.03.2022 αναφέρει τους όρους και τις προϋποθέσεις για την καλλιέργεια και επεξεργασία της φαρμακευτικής κάνναβης, βάσει του άρθρου 18 του ν. 4801/2021 (Α' 83).

1.4 Βιοσύνθεση κανναβινοειδών

Το CBGA συντίθεται με την αλκυλίωση του ελαιολικού οξέος (OLA) με πυροφωσφορικό γερανυλεστέρα μέσω μιας πρενυλ-τρανσφεράσης γνωστή ως geranylpyrophosphate:olivetolate γερανυλ-τρανσφεράση. Το CBGA, ο κεντρικός πρόδρομος της βιοσύνθεσης κανναβινοειδών, μετατρέπεται από τρία ένζυμα CBDAS, CBCAS, και THCAS. Χρησιμοποιούν CBGA ως υπόστρωμα και καταλύουν την στερεοεκλεκτική, οξειδωτική κυκλοποίηση του τμήματος μονοτερπενίου του CBGA σε CBDA, CBCA ή THCA, αντίστοιχα. (20)

Τρεις οξειδωκυκλάσες είναι υπεύθυνες για να διάφορα κανναβινοειδή, η THCA συνθάση (THCAS) μετατρέπει το CBGA σε THCA, ενώ η CBDA συνθάση (CBDAS) συνθέτει CBDA και η CBCA συνθάση (CBCAS) παράγει CBCA. (21) Οι αντιδράσεις THCAS και CBDAS εξαρτώνται από το οξυγόνο, παράγοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου ανάλογο είτε με το CBDA είτε με το THCA. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αντίδραση CBCAS είναι ανεξάρτητη από το οξυγόνο, και μπορεί να ανασταλεί από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επιπλέον, και τα τρία ένζυμα μετατρέπουν επίσης το CBNRA, το cis-ισομερές του CBGA, με χαμηλότερη εκλεκτικότητα. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το THCA αποθηκεύεται στα αδενικά τριχώματα του φυτού. (20)



Σχήμα 1: Βιοσύνθεση κανναβινοειδών

Οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις επισημάνονται με σκούρο πράσινο. Όλες οι μη ενζυμικές αντιδράσεις επισημαίνονται με ανοιχτό πράσινο. Η βιοσύνθεση των C3-κανναβινοειδών που αρχίζει από Κανναβιγεροβαρινικό οξύ (CBGVA) πραγματοποιείται από τα ίδια ένζυμα και για καλύτερη σαφήνεια δεν αναγράφεται. (20)

Το CBD μπορεί να μετατραπεί στο τρικυκλικό διβενζοπυράνιο, Δ⁹-THC (THC), μέσω μίας αντίδρασης που καταλύεται από οξύ. (22) Το Δ⁹-THC οξειδώνεται εύκολα προς κανναβινόλη (CBN) παρουσία οξυγόνου και φωτός κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποκαρβοξυλίωσης. Η αποκαρβοξυλίωση, μια χημική αντίδραση, μετατρέπει τις όξινες μορφές (Δ⁹ THCA, CBDA, CBCA και CBGA) στις ουδέτερες μορφές τους, οι οποίες είναι πιο δραστικές και αποτελεσματικές όσον αφορά τη φαρμακολογική δραστικότητα. (20)

Τα ουδέτερα κανναβινοειδή δεν υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο φυτό. Η κάνναβη συνθέτει αρχικά τα καρβοξυλικά οξέα των Δ⁹-THC, CBD και CBG,

συγκεκριμένα, Δ^9 -τετραϋδροκανναβινολικό οξύ A (THCA-A), κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και κανναβιγερολικό οξύ (CBGA). Αυτά τα κανναβινοειδή οξέα είναι θερμικά ασταθή και μπορούν να υποστούν αποκαρβοξυλίωση όταν εκτίθενται στο φως και στη θερμότητα προς σχηματισμό των αποκαρβοξυλιωμένων κανναβινοειδών δηλαδή των Δ^9 -THC, CBD και CBG αντίστοιχα.

Στη κατεργασία αυτή τα κανναβινοειδή αποκαρβοξυλιώνονται από την φυσική τους μορφή μέσω υψηλής θερμοκρασίας. Σε θερμοκρασίες άνω των 100°C όπου η THCA αποκαρβοξυλιώνεται σε THC, και κάτω των 180°C καθώς μετά θα πραγματοποιηθεί εξάτμιση των κανναβινοειδών που βρίσκονται στα τοιχώματα των φύλλων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συνήθεις συνθήκες αποκαρβοξυλίωσης είναι σε προθερμασμένο φούρνο στους 110°C - 130°C για 60 λεπτά. (22)

1.5 Κανναβινοειδή

Τα Κανναβινοειδή είναι μια ομάδα τερπενοφαινολικών ενώσεων, που παρουσιάζουν πρόσδεση στους κανναβινοειδής υποδοχείς CB1, CB2 ή σχετίζονται δομικά με το THC. Τα κανναβινοειδή μπορούν να διαχωριστούν σε φυτοκανναβινοειδή, συνθετικά κανναβινοειδή και ενδοκανναβινοειδή. Τα φυτοκανναβινοειδή είναι μία μοναδική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών (κανναβινοειδών) που υπάρχουν σε διάφορα φυτά. (20)

Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί και αναφερθεί στο φυτό της κάνναβης 125 κανναβινοειδή, 42 μη κανναβινοειδή φαινολικά, 34 φλαβονοειδή, 120 τερπενοειδή, 3 στερόλες και 2 αλκαλοειδή. (23) Υπάρχουν 10 είδη το Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, κανναβιγερόλη (CBG), κανναβιχρωμίνη (CBC), κανναβιδιόλη (CBD), κανναβινοδιόλη (CBND), κανναβιελσοΐνη (CBE), κανναβικυκλόνη (CBL), κανναβινόλη (CBN), κανναβιτριόλη (CBT).

1.5.1 Τετραϋδροκανναβινόλη (THC)

Οι Gaoni και Mechoulam (1964) ήταν οι πρώτοι που προσδιόρισαν τη δομή του Δ^9 -THC και τις ψυχοδραστικές του ιδιότητες. Από φαρμακευτική πλευρά, το Δ^9 -THC είναι

έναν μερικός αγωνιστής και των δυο κανναβινοειδών υποδοχέων: CB1, ρυθμιστής των ψυχοδραστικών επιδράσεων και CB2, ρυθμιστής ανοσολογικών και αντιφλεγμονωδών επιδράσεων. Ο χρόνος ημιζωής της THC στο πλάσμα είναι 1 έως 3 ημέρες σε περιστασιακούς χρήστες. Μεταξύ των πιο σταθερών μεταβολιτών, αξίζει να αναφερθεί η Δ⁸-τετραϋδροκανναβινόλη, που προέρχεται από έναν όξινο ισομερισμό της Δ⁹-THC με μετατόπιση του ενδοκυκλικού διπλού δεσμού. (4) (24)

Κατά την εφάπαξ χορήγηση κάνναβης παρατηρούνται ευφορία, χαλάρωση, υποκινητικότητα, υπνηλία, ιλαρότητα και γέλωτες, αναλγησία, διέγερση της όρεξης, αγγειοδιαστολή (ερυθρότητα των επιπεφυκώτων), υπόταση (κυρίως ορθοστατική), ζάλη, ταχυκαρδία, ξηροστομία, μείωση ενδοφθάλμιας πίεσης. Καταγράφονται επίσης γνωστικές και αισθητικοκινητικές δυσλειτουργίες (μειωμένη εγρήγορση, διαταραχή στην ισορροπία και το συντονισμό των κινήσεων, αίσθηση επιβράδυνσης του χρόνου, δυσκολία συγκέντρωσης, προσοχής και μνήμης, προβλήματα προσανατολισμού στο χώρο και το χρόνο), κρίσεις πανικού και ψυχωτική αντίδραση. Αυτές οι CB1 διαμεσολαβούμενες επιδράσεις προκαλούνται από την διαταραχή GABA/γλουταμινεργικού νευροδιαβιβαστή και την απελευθέρωση ντοπαμίνης, γενικά είναι οξεία και παροδική. (25)

Επί του παρόντος, λαμβάνοντας υπόψιν τοξικολογικές μελέτες βασισμένες σε ανθρώπινα δείγματα (δράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα και αύξηση των καρδιακών παλμών) η Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) όρισε ως LOAEL (το κατώτατο επίπεδο όπου παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις) 2,5mg Δ⁹-THC ημερησίως. Λαμβάνοντας υπόψιν τους παράγοντες ασφαλείας ορίστηκε η Οξεία Δόση Αναφοράς (Acute Reference Dose ή ARfD) σε 1 μg Δ⁹-THC ανά kg σωματικού βάρους (bw) για ένα άτομο με σωματικό βάρος 70 kg. (26)

1.5.2 Κανναβιδιόλη (CBD)

Η CBD μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει σκελετό τετραϋδροδιφαινυλίου: ένας δικυκλικός πυρήνας που αντιπροσωπεύει ένα προϊόν προσθήκης που σχηματίζεται από το μονοτερπένιο, π-κυμένιο, και το παράγωγο αλκυλρεσορκινόλης, ολιβετόλη. Η CBD

μπορεί να μετατραπεί σε τρικυκλικό διβενζοπυράνιο, Δ⁹-THC (THC), μέσω αντίδρασης που καταλύεται από οξύ. (4)

Η κανναβιδιόλη (CBD) θεωρείται συνήθως ότι αναφέρεται στο φυσικό (-)-εναντιομερές και έχει τη μορφή ενός κρυσταλλικού στερεού. Η (+) CBD έχει συντεθεί αλλά έχει λάβει λίγη προσοχή. Σημείο τήξεως είναι 62-63°C και η διαλυτότητα περίπου 23,6 mg/mL σε DMSO και αιθανόλη. (27)

Το CBD και CBDA είναι κύριοι μεταβολίτες των μη ψυχοδραστικών ποικιλιών κάνναβης. Ο Adams και οι συνεργάτες του το 1940 απομόνωσαν κανναβιδιόλη, και κρυσταλλοποιήθηκε αφού το ελαιώδες CBD παρέμεινε για μερικές βδομάδες, ενώ το 1969 οι Petrzika *et al.* ανέφεραν τη σύνθεση και τη διαμόρφωση ως (-)-trans-(1R,6R). Υπάρχουν 8 κανναβινοειδή παρόμοια με τη δομή της κανναβινόλης. Η CBND-τύπου κανναβινοειδή είναι τα αρωματικά παράγωγα του CBD. (28) Ο χρόνος ημιζωής της CBD στο πλάσμα είναι 18 έως 32 ώρες. Η βιοδιαθεσιμότητα της CBD μέσω της εισπνοής είναι 11% έως 45%, ενώ αυτή της CBD από το στόμα είναι 6%. Η CBD είναι υψηλή λιπόφιλη ένωση και επομένως κατανέμεται γρήγορα στον εγκέφαλο, τον λιπώδη ιστό και άλλα όργανα. (24)

1.5.3 Άλλα κανναβινοειδή

i. Κανναβιγερόλη (CBG)

Οι Gaoni και Mechoulam (1964) ήταν οι πρώτοι που απομόνωσαν CBG και ανέφεραν παράγεται από τη συμπύκνωση της γερανυλπυροφωσφάτης με ολιβετόλη. Η πρώτη ένωση που απομονώθηκε από ρητίνη κάνναβης σε καθαρή μορφή ήταν η CBG. Αυτά τα κανναβινοειδή δεν έχουν ψυχοδραστική δράση. (4) Υπάρχουν 17 κανναβινοειδή με παρόμοια δομή με την κανναβιγερόλη.

ii. Κανναβινόλης (CBN)

Η κανναβινόλη αναφέρθηκε πρώτα το 1896 από τον Wood και τους συνεργάτες του. Το CBN λήφθηκε σε μορφή ελαίου από ρητίνη ινδικής κάνναβης. Αργότερα ο Wood (1899) ακετυλίωσε αυτό το έλαιο και έλαβε καθαρό CBN σαν οξικό άλας. Το 1940 ο

Adams και οι συνεργάτες του προσδιόρισαν τη δομή του CBN. (28) Η συγκέντρωση CBN σε προϊόντα *C. sativa* εξαρτάται από το χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης. Το CBN είναι εξαιρετικά σταθερό στην οξειδωτική αποικοδόμηση. Επιπλέον, πολλά παράγωγα αποικοδόμησης CBN είναι τα ίδια με αυτά που λαμβάνονται από την αυθόρμητη οξειδωτική αρωματοποίηση της Δ⁹-THC σε *C. sativa*. Τέλος, έχει παρατηρηθεί χαμηλή συγγένεια CBN για τους υποδοχείς CB1 και CB2. (4) Υπάρχουν 10 κανναβινοειδή με παρόμοια δομή με τη κανναβινόλη.

iii. *Κανναβιχρωμίνη (CBC)*

Οι Gaoni και Mechoulam (1966) απομόνωσαν από ένα εκχύλισμα εξανίου σε Florisil που έδωσε απόδοση 1,5% σε CBC-C5. Υπάρχουν 8 κανναβινοειδή με παρόμοια δομή με τη κανναβιχρωμίνη.

iv. *Κανναβιελσοΐνη (CBE)*

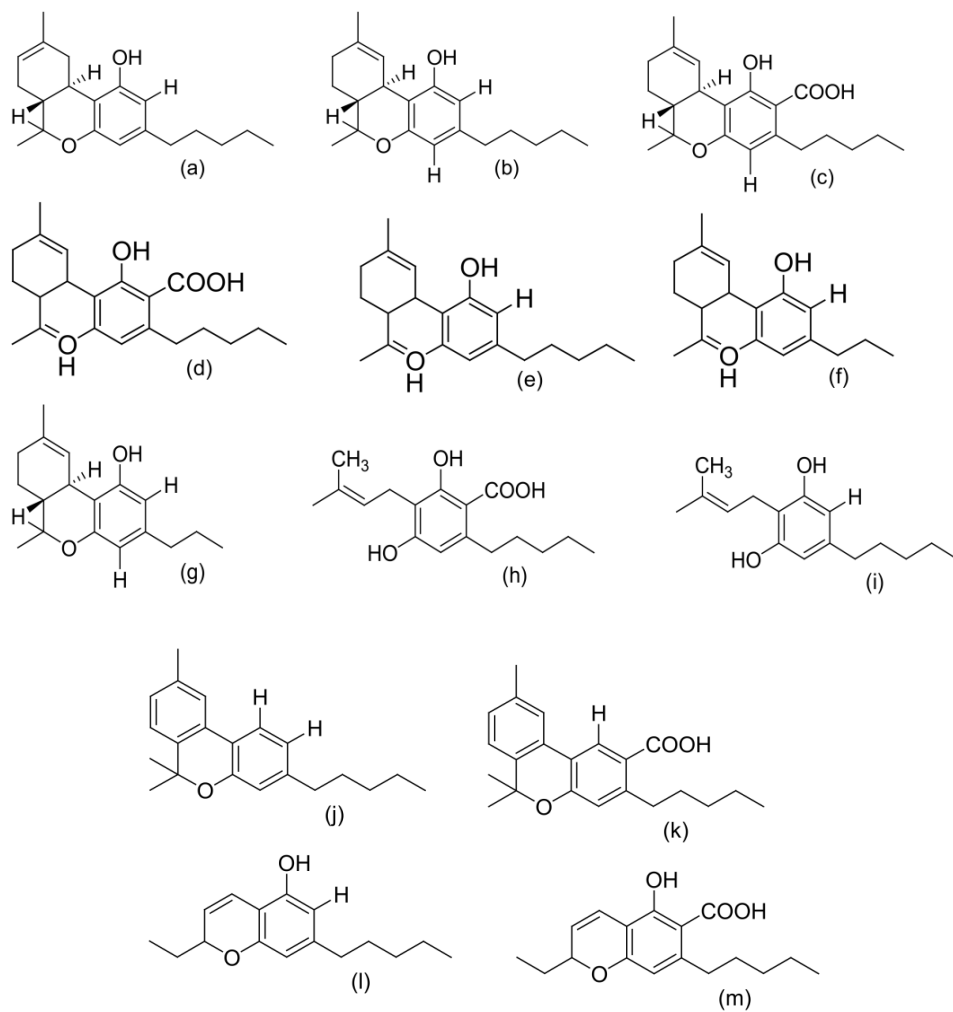
Τα CBE τύπου κανναβινοειδή μπορούν να παραχθούν από τη φωτοοξείωση από το CBD και CBDA. Ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά από τον Bercht το 1973.

v. *Κανναβικυκλόνη (CBL)*

Ρακεμικό μείγμα φυτοκανναβινοειδών που συμβαίνει κατά την αποθήκευση των τμημάτων του *C. sativa* παρουσία φωτός, αλλά με άγνωστες ακόμα βιολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν τρεις τύποι κανναβινοειδών με παρόμοια δομή. (4) Στην ίδια υποκατηγορία με το CBL ανήκουν το κανναβικυκλονικό οξύ (CBLA) και η κανναβικυκλοβαρίνη (CBL-C3). Πρώτος ο Korte *et al.* το 1965 απομόνωσε CBL με TLC από διάφορα δείγματα κάνναβης και χασίς. (28)

vi. *Κανναβιτριόλη (CBT)*

Οι Obaka και Ishikawa το 1966 ανέφεραν τη κανναβιτριόλη αλλά η χημική της δομή βρέθηκε από τον Chan *et al.* το 1976. Υπάρχουν εννιά τύποι κανναβιτριόλης. (28)



Σχήμα 2: Χημικές δομές κύριων κανναβινοειδών

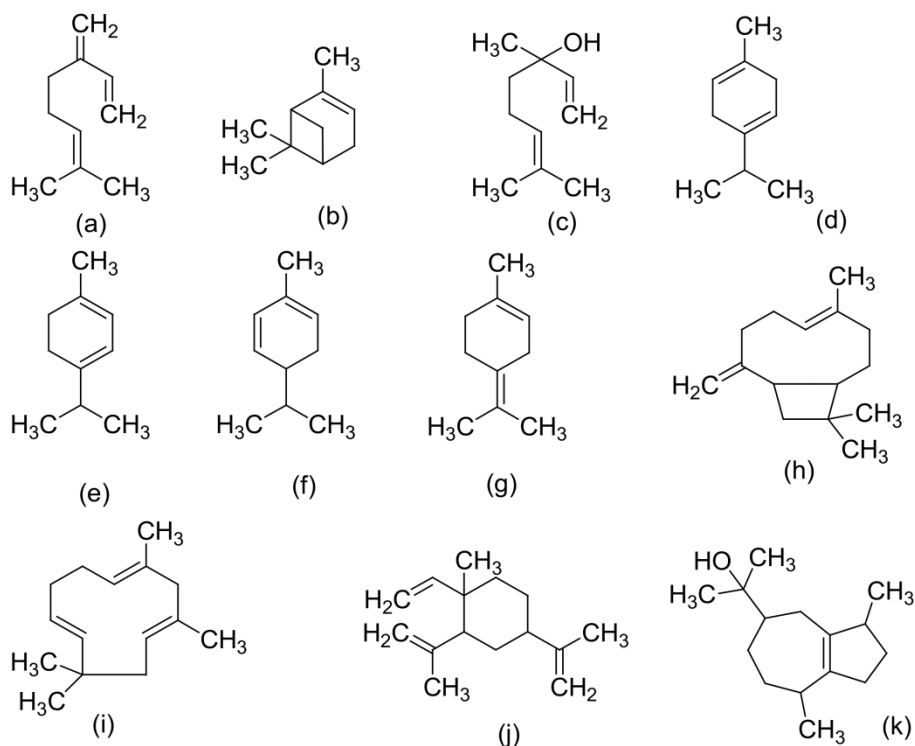
Δ^8 -THC, τετραυδροκανναβινόλη (a) Δ^9 -THC, τετραυδροκανναβινόλη (b) THCA, τετραυδροκανναβινολικό οξύ (c) CBDA, κανναβιδιολικό οξύ (d) CBD, κανναβιδιόλη (e) CBDV, κανναβιδιβαρίνη (f) THCV, τετραυδροκανναβιδιβαρίνη (g) CBGA, κανναβιγερολικό οξύ (h) CBG, κανναβιγερόλη (i) CBN, κανναβινόλη (j) CBNA, κανναβινολικό οξύ (k) CBC, κανναβιχρωμίνη (l) CBCA, κανναβιχρωμικό οξύ (m) (23)

1.6 Μη κανναβινοειδή

1.6.1 Τερπένια

Πάνω από 200 τερπένια είναι υπεύθυνα για το άρωμα του *C. sativa*, έχουν εντοπιστεί στο λουλούδι, στα φύλλα του φυτού, και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 10% του περιεχομένου στα τριχώματα. Το λιμονένιο, το μυρσένιο και το πινένιο είναι πιο κοινά και εξαιρετικά πτητικά. Από τα μονοτερπένια το β-μυρσένιο, α-πιπένιο, *trans*-οικιμένιο, α-τερπινολένιο και *trans*-καρυοφυλλένιο.

Τα τερπένια είναι απωθητικά για τα έντομα και προστατεύουν το φυτό από τα ζώα που βόσκουν. Το μείγμα διάφορων *C. sativa* τερπενοειδών και φυτοκανναβινοειδών οξέων δείχνουν συνεργατική δράση κατά διαφόρων θηρευτών. Η ποσότητα των τερπενοειδών αυξάνεται με την ηλιακή ακτινοβολία και μειώνεται ανάλογα με τη γονιμότητα του εδάφους. Τα τερπενοειδή είναι λιπόφιλα μόρια και αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες των ζώων στον εγκέφαλο.



Σχήμα 3: Χημικές δομές τερπενίων του είδους *C. sativa* L.

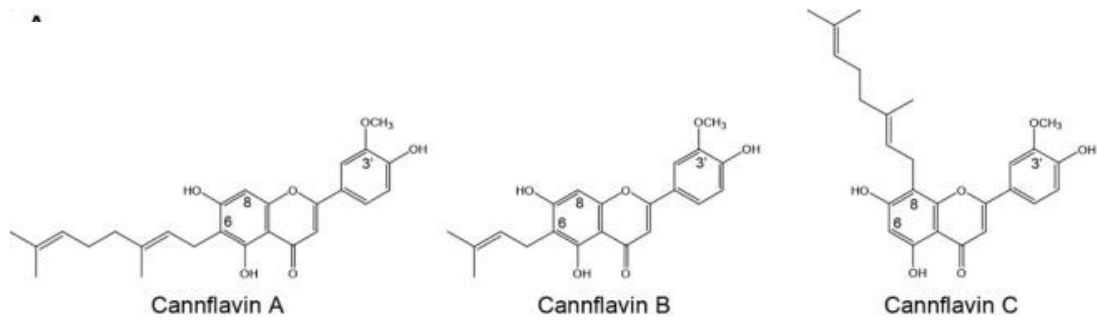
Μυρσένιο (a), α-πινένιο (b), D-λιναλοόλη (c), λιμονένιο (d), α-τερπινένιο (e), α-Φελλανδρένιο (f), α-τερπινολένιο (g), β-καρυοφυλλένιο (h), α-καρυοφυλλένιο (i), β-ελεμένιο (j), γουαλιόλη (k) (23)

1.6.2 Φλαβονοειδή

Περισσότερα από 20 φλαβονοειδή έχουν εντοπιστεί στο *C. sativa*, τα περισσότερα από τα οποία είναι φλαβόνες (απιγενίνη και λουτεολίνη) και φλαβονόλες (καεμπφερόλη και κερκετίνη), αγλυκόνες και γλυκοσίδες. Είναι ενδιαφέρον ότι τρεις πρενυλιωμένες/γερανυλιωμένες φλαβόνες, η κανφλαβίνη A, B και C απομονώθηκαν στο *C. sativa*.

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές δράσεις που έχουν οι κανφλαβίνες, όπως και άλλα φλαβονοειδή, παρουσιάζουν και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές. Η κανφλαβίνη A και B δείχνουν πολλά υποσχόμενη ως αντιφλεγμονώδης θεραπευτικός παράγοντας επειδή ήταν περίπου 30 φορές πιο αποτελεσματικές από την ασπιρίνη στην αναστολή της απελευθέρωσης PGE2 όταν προσδιορίζεται σε ανθρώπινα ρευματοειδή κύτταρα. Αρκετές θεραπευτικές δράσεις του *C. sativa* έχουν αποδοθεί στα φλαβονοειδή καθώς παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιπαρασιτικές και αντικές ιδιότητες. Τα φλαβονοειδή βρίσκονται στα περισσότερα μέρη του φυτού όπως φύλλα, λουλούδια και καρπούς ενώ είναι μη ανιχνεύσιμα σε ρίζες και σπόρους. (29)

Τέλος, αλλά μη κανναβινοειδή που περιέχονται στο φυτό της κάνναβης είναι τα στεροειδή, όπως η σιγμαστερόλη (acetyl stigmasterol). Τέσσερα λιπαρά οξέα απομονώθηκαν από φύλλα και κλαδιά του φυτού και δύο νιτρογενής ενώσεις η ουρακίλη και η κανβισίνη απομονώθηκαν από καρπούς *C. sativa* επίσης. (28)



Σχήμα 4: Χημική δομή φλαβονοειδών του είδους *C. sativa* L.

1.7 Μηχανισμός δράσης κανναβινοειδών

1.7.1 Ενδογενές κανναβινοειδές σύστημα

Περίπου στο τέλος του 1980 και μετά από μια δεκαετία ανακάλυψης των κανναβινοειδών, συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης του Δ^9 -THC στον εγκέφαλο προτάθηκαν. Οι νευρώνες συσχετίζονται με την αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, έτσι ενεργοποιήθηκε μια τυπική ενδοκυτταρική οδός σηματοδότησης από συζευγμένους υποδοχείς. Αυτό το θεμελιώδες εύρημα οδήγησε, το 1990, στον μοριακό χαρακτηρισμό του πρώτου Δ^9 -THC υποδοχέα, ο υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 1 (CB1). Εν τω μεταξύ, το 1993 ανακαλύφθηκε ο υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 2 (CB2) σε κύτταρα και ιστούς του ανοσοποιητικού.

Τα κανναβινοειδή έχουν διαφορετικούς βαθμούς πρόσδεσης στους CB1 και CB2 υποδοχείς. Παρά το γεγονός ότι ονομάστηκαν «υποδοχείς κανναβινοειδών», έγινε σύντομα σαφές ότι, εκτός από το CBN, τα περισσότερα άλλα φυτικά κανναβινοειδή που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα δεν ήταν σε θέση να ενεργοποιήσουν αποτελεσματικά τα CB1 και CB2, και ότι Δ^9 -THC, και το ισομερές του Δ^8 -τετραϋδροκανναβινόλη, ήταν πιθανό να είναι οι μόνοι ισχυροί αγωνιστές CB1 που βρέθηκαν σε άνθη κάνναβης.

Οι γνωστές δράσεις των κανναβινοειδών διαμεσολαβούνται από δύο τύπους υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G ι που κατανέμονται στο ΚΝΣ σε περιοχές που εμπλέκονται στη κίνηση, τη μνήμη, σύστημα ανταμοιβής, επιδράσεις στα

καρκινικά κύτταρα του εγκεφάλου μεταξύ άλλων. Οι υποδοχείς CB1 βρίσκονται στο ΚΝΣ, ενώ οι υποδοχείς CB2 βρίσκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα και άλλους ιστούς. (30)

1.7.2 Άλλοι υποδοχείς κανναβινοειδών

Ωστόσο πολλά από τα μη ευφορικά κανναβινοειδή όπως CBD, CBG, CBC και τα προπυλ-ομόλογα του CBD και Δ⁹-THC π.χ. κανναβιδιβαρίνη (CBDV) και Δ⁹-τετραυδροκανναβιδιβαρίνη (Δ⁹-THCV) ενεργοποιούν άλλους υποδοχείς όπως τον παροδικό δυναμικό υποδοχέα (Transient Receptor Potential, TRP) που αντιλαμβάνονται τις αλλαγές στη θερμοκρασία, συμπεριλαμβανομένων των TRPV2, 3, 4 και TRPA1. Ο τελευταίος υποδοχέας μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από το Δ⁹-THC. (31)

Τα κανάλια TRPV εντοπίζονται κυρίως στη πλασματική μεμβράνη, ένας αριθμός μελετών έχει διεξαχθεί για το ρόλο τους και πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου, μερικές φορές εντοπίζονται και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), που αποτελεί αποθήκη ασβεστίου στα κύτταρα και εμπλέκεται σε μονοπάτια αντιδράσεων που απαιτούν ασβέστιο για να διεξαχθούν. (32)

Το CBD έχει χαμηλή πρόσδεση στους CB1 και CB2 υποδοχείς, αλληλοεπιδρά με πολλούς άλλους μη κανναβινοειδής υποδοχείς. Σε χαμηλές μικρομοριακές συγκεντρώσεις, το CBD είναι ένας αναστολέας του εξισορροπητικού μεταφορέα νουκλεοσιδίων (ENT), ο ορφανός συζευγμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας GPR55, και του δυναμικού καναλιού παροδικού υποδοχέα μελαστατίνης τύπου 8 (TRPM8). Αντίθετα, η CBD ενισχύει τη δραστηριότητα του 5-HT1 υποδοχέα, του A3 και A1 υποδοχέα γλυκίνης, του δυναμικού παροδικού υποδοχέα του καναλιού αγκυρίνης τύπου 1 (TRPA1) και έχει αμφίδρομη επίδραση στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο.

Σε υψηλότερες μικρομοριακές συγκεντρώσεις, το CBD ενεργοποιεί το πυρηνικό υπεροξειδωμά που ενεργοποιείται από πολλαπλασιαστικό υποδοχέα-c και τον δυναμικό παροδικό υποδοχέα του βανιλλοειδούς τύπου 1 (TRPV1) και 2 (TRPV2)

κανάλια ενώ παράλληλα αναστέλλουν την κυτταρική πρόσληψη και αποικοδόμηση της ανανδαμίδης που καταλύεται από την υδρολάση αμιδίου των λιπαρών οξέων. (33)

Οι παρούσες έρευνες δείχνουν ότι η CBD ασκεί φαρμακολογικές δράσεις μέσω συγκεκριμένων μοριακών στόχων όπως οι υποδοχείς αδενοσίνης, υποδοχείς γλυκίνης, υποδοχείς οπιοειδών, υποδοχείς σεροτονίνης κ.α. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι η CBD είναι ένας αντίστροφος αγωνιστής για “ορφανούς υποδοχείς” συζευγμένους με πρωτεΐνη G όπως οι GPR3, GPR6 και GPR12, που κατανέμονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε περιοχές που εμπλέκονται στη κίνηση, τη μνήμη, το σύστημα ανταμοιβής, προτείνοντας νέες θεραπευτικές χρήσεις της CBD για τη νόσο του Αλτσχάιμερ, τη νόσο του Πάρκινσον και τον καρκίνο. (4) (34)

1.8 Φαρμακευτική δράση

Σε κλινικές δοκιμές και ερευνητικές μελέτες, η CBD γενικά χορηγείται από το στόμα ως είτε σε κάψουλα, είτε διαλυμένο σε διάλυμα ελαίου (π.χ. ελαιόλαδο ή σησαμέλαιο). Μπορεί να χορηγείται επίσης μέσω υπογλώσσιων ή ενδορινικών οδών. Ένα μεγάλο εύρος από στόματος χρήση έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, με τις περισσότερες μελέτες να αναφέρουν από 100-800 mg/ημέρα. (27)

1.8.1 Νευρολογικές διαταραχές

Είναι ευρέως γνωστό ότι χαμηλές δόσεις κάνναβης στους ενήλικες έχουν ευεργετική επίδραση στην πρόληψη ή ακόμη και στη θεραπεία του Αλτσχάιμερ. Αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες υπέδειξαν ότι κάποια κανναβινοειδή έχουν νευροπροστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας του β-αμυλοειδούς (Αβ) και του νευρωνικού θανάτου. Σύμφωνα με μια μελέτη χαμηλές δόσεις Δ⁹-THC αύξησαν τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο ηλικιωμένων αρουραίων.

Η φλεγμονή του εγκεφάλου είναι βασικός παράγοντας για την παθογένεση του Αλτσχάιμερ και τη στόχευση της. Ο υποδοχέας CB2 έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες

ότι μειώνει τη νευροφλεγμονή και τη βλάβη του οξειδωτικού στρες και βελτιώνει την εξασθενημένη λειτουργία μνήμης. Η CBD έχει εξεταστεί και για την νόσο του Parkinson με αισιόδοξα αποτελέσματα αλλά παραπάνω έρευνα απαιτείται για τον προσδιορισμό της δράσης του. (4)

Ενώ ενθαρρυντικά είναι τα ευρήματα για τη δράση της CBD σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, όπου το ένα τρίτο των ασθενών δεν ανταποκρίνονται στις υπάρχουσες θεραπείες. Μελέτες υποδεικνύουν ότι η CBD συνδέεται με διάφορους μοριακούς στόχους και ασκεί αντιψυχωσικές ιδιότητες. Το 2012 πραγματοποιήθηκε η πρώτη τυχαίοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο κλινική δοκιμή. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 600-800mg/ημέρα CBD, τα ευρήματα έδειξαν σημαντική κλινική βελτίωση. Όμως, η CBD δεν ήταν αποτελεσματική σε γνωστικές βλάβες που σχετίζονται με τη σχιζοφρένεια (CIAS). Παρόλο που τα αποτελέσματα στα ψυχωτικά συμπτώματα των ασθενών ήταν ενθαρρυντικά απαιτούνται ακόμη μεγάλης κλίμακας ελεγχόμενες και τυχαίοποιημένες κλινικές δοκιμές για την αξιολόγηση της μακροπρόθεσμης αποτελεσματικότητας και ασφάλεια αυτού του υποτιθέμενου νέου αντιψυχωσικού παράγοντα. (11)

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες αποκάλυψαν ότι η CBD έχει υψηλή συγγένεια με ορισμένους υποδοχείς και κανάλια που σχετίζονται με την επιληψία, συμπεριλαμβανομένου του βανιλλοειδούς δυναμικού παροδικού υποδοχέα (TRPV), των υποδοχέων σεροτονίνης (5-HT1A και 5-HT2A), υποδοχέων οπιοειδών και GPR55.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν διεξαχθεί αρκετές κλινικές μελέτες για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της CBD στη θεραπεία της επιληψίας. Σε μια κλινική έρευνα το CBD μελετήθηκε ως αντιεπιληπτική θεραπεία σε ποικίλες δόσεις (2-5 mg/kg/ημέρα τιτλοποιημένη μέχρι μέγιστη δόση 25 ή 50 mg/kg/ημέρα) σε 214 ασθενείς με επιληψία που δεν ανταποκρίθηκαν σε άλλες θεραπείες. Στη μελέτη παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στη συχνότητα των κρίσεων. (11)

1.8.2 Πόνος και φλεγμονή

Αρκετές έρευνες αποκάλυψαν την αποτελεσματικότητα του CBD σε πόνους, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλού σκληρού ερεθισμού, της ινομυαλγίας, της νόσου του Crohn και του νευροπαθητικού πόνου. Σε μια μελέτη, ασθενείς με περιφερική νευροπάθεια διαφόρων αιτιών έλαβαν CBD (250 mg/3 fl oz) μέχρι 4 φορές καθημερινά για 4 εβδομάδες ή πλασέμπο, μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας, η ομάδα πλασέμπο ξεκίνησε τη λήψη CBD για επιπλέον 4 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της φαγούρας, του έντονου, οξύ και κρύου στη κλίμακα του νευροπαθητικού πόνου στην ομάδα που έλαβε CBD σε σχέση με αυτή που έλαβε το πλασέμπο φάρμακο. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες πρέπει να γίνουν για την εύρεση των ιδιοτήτων της CBD ως τοπικό αναλγητικό. (34)

Η CBD συμβάλλει στη διαχείριση του χρόνιου πόνου και του πόνου που προκαλείται σε ασθενείς με καρκίνο. Σύμφωνα με τα ευρήματα έρευνας που διεξήχθη σε 177 ασθενείς με καρκινικό πόνο, οι οποίοι εμφάνισαν ανεπαρκή αναλγησία παρά τη χρόνια χορήγηση οπιοειδών, οι ασθενείς έλαβαν είτε THC:Εκχύλισμα CBD (n=60), εκχύλισμα THC (n=58) ή εικονικό φάρμακο (n=59) για 2 εβδομάδες ως στοματοβλεννογόνο σπρέι. Το 43% των ασθενών που λαμβάναν THC:CBD παρατήρησαν σημαντική βελτίωση στη κατάσταση τους. (11)

Η CBD, *in vitro* και *in vivo*, έχει αποδειχθεί ότι ασκεί αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες και βελτιώνει διάφορες εκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με φλεγμονές. Ο μηχανισμός αυτής της αντιφλεγμονώδους δράσης, ωστόσο, δεν είναι πλήρως κατανοητός. (35)

1.8.3 Ψυχολογικές διαταραχές

Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξετάσει την CBD για τις αγχολυτικές επιδράσεις. Η CBD είναι αγχολυτική σε πειραματόζωα ποντικών, σε υγιείς ανθρώπους η CBD μειώνει το άγχος που παρατηρήθηκε σε δημόσιες ομιλίες. Σε πρόσφατη έρευνα ασθενείς με κοινωνική αγχώδη διαταραχή επιβεβαίωσαν την αγχολυτική επίδραση του CBD και η υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής (single photon emission

computed tomography, SPECT) έδειξε ότι σχετίζεται με αλλαγές στη ροή του αίματος σε μεταιχμιακό σύστημα και στις παραλιμβικές περιοχές του εγκεφάλου. (33)

Επιπλέον, σε μία μελέτη των Morgan *et al.*, 24 καπνιστές που ήθελαν να σταματήσουν το κάπνισμα έλαβαν είτε εισπνεόμενο CBD σε δόση των 400μg CBD διαλυμένη σε καθαρή αιθανόλη 5%, είτε πλασέμπο (σκέτη αιθανόλη). Η βιοδιαθεσιμότητα του CBD μετά τη κατάποση από αυτή τη συσκευή εισπνοής βρέθηκε >65%. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση του καπνίσματος 40% σε σύγκριση με τους ανθρώπους που έλαβαν το πλασέμπο. (36)

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η κάνναβη μπορεί να έχει αγχολυτικές επιδράσεις καθώς περιέχει Δ⁹-THC και CBD, με διαφορετικές ψυχοδραστικές ιδιότητες: χαμηλές δόσεις Δ⁹-THC έχουν αγχολυτικά αποτελέσματα, οι υψηλές δόσεις είναι αγχογονικές ενώ η CBD έχει αγχολυτικές επιδράσεις τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους λόγω της δράσης της σε μεταιχμικές περιοχές του εγκεφάλου.

Ταυτόχρονα τον τελευταίο καιρό έχει προκύψει ιατρικό ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση της κάνναβης και κανναβινοειδών σε διαταραχές ύπνου. Συγκεκριμένα, η CBD μπορεί να έχει θεραπευτική δράση για την αυπνία και διαταραχή συμπεριφοράς του ύπνου REM. (4)

Σε μια μελέτη των Gulluni *et al.* εξέτασαν τις επιδράσεις αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa* σε πέντε υγιή άτομα, ανάλυση GC/EIMS και GC/FID έδειξε ότι το μυρσένιο και β-καρυοφυλλένιο ήταν το κύριο συστατικό. Η εγκεφαλική δραστηριότητα και η αρτηριακή πίεση, ο καρδιακός ρυθμός, ο αναπνευστικός ρυθμός και η θερμοκρασία καταγράφηκαν ως δείκτες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εγκεφαλική δραστηριότητα και η διάθεση επηρεάστηκαν από τη λήψη του αιθερίου ελαίου και πρότειναν τη χρήση του σε περιπτώσεις στρες, κατάθλιψης και άγχους. Βέβαια διευκρίνισαν ότι έρευνες με περισσότερους συμμετέχοντες πρέπει να πραγματοποιηθούν. (37)

1.8.4 Καρκίνος

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την αντικαρκινική ιδιότητα του CBD σε διάφορες μορφές καρκίνου. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, προκύπτουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η CBD είναι ένας ισχυρός αναστολέας τόσο της ανάπτυξης όσο και της εξάπλωσης του καρκίνου.

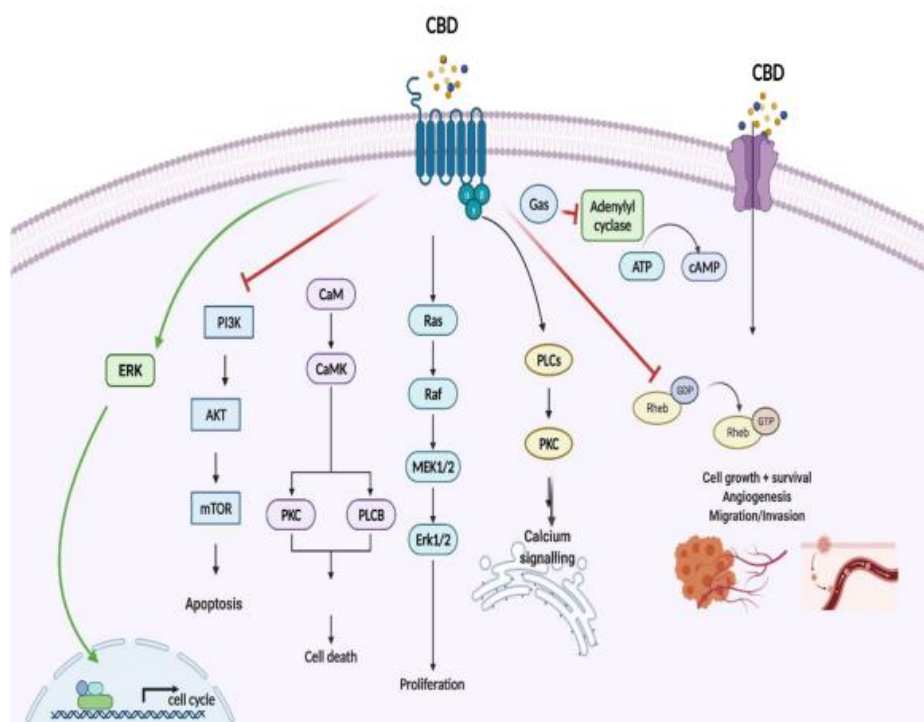
Το γλοίωμα αποτελεί μια κοινή κακοήθεια του εγκεφάλου, το γλοίωμα βαθμού IV, που ονομάζεται επίσης πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM) ή γλοιοβλάστωμα, είναι ένας από τους πιο επιθετικούς τύπους καρκίνου. Οι σύγχρονες μέθοδοι θεραπείας περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία με τεμοζολομίδη (TMZ) ή καρμουστίνη (BCNU). Παρ' όλα αυτά οι περισσότεροι όγκοι GBM είναι ανθεκτικοί σε αυτές τις θεραπείες.

Η CBD φαίνεται να διαταράσσει τη κυτταρική ομοιόσταση οξειδοαναγωγής και επάγει το οξειδωτικό στρες και ER στρες (Endoplasmic Reticulum Stress) που θα μπορούσαν στη συνέχεια να ασκήσουν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την αυτοφαγία και τον κυτταρικό θάνατο (38), αναστέλλει τη μετανάστευση και προστατεύει τα κύτταρα *in vitro*, προκαλεί μείωση του όγκου και υποχώρηση *in vivo*. Όσον αφορά την αντι-πολλαπλασιαστική δράση της CBD στο γλοιοβλάστωμα, τα δεδομένα δείχνουν ότι η απόπτωση συμβαίνει ανεξάρτητα από τα CB1, CB2 και TRPV1, αλλά εξαρτάται από το TRPV2.

Το CBD παρουσιάζει μικρή πρόσδεση στους υποδοχείς CB1 και CB2. Τα κανάλια TRPV παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά τις αντικαρκινικές λειτουργίες της κανναβιδιόλης (CBD). Έξι διαφορετικά κανάλια TRPV έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο ομάδες: τα TRPV1, TRPV2, TRPV3 και TRPV4 ανήκουν στην ομάδα I, ενώ τα TRPV5 και TRPV6 ανήκουν στην ομάδα II. (38) (39) (40)

Αυτά τα TRPV κανάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης ασβεστίου από τις εξωκυτταρικές πηγές καθώς και του ασβεστίου που αποθηκεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η διακοπή της κυτταρικής ομοιόστασης του ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη

παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), στρες στο ER και κυτταρικό θάνατο. (Εικόνα 4) (32)



Εικόνα 4: Η αντικαρκινική δράση της CBD

Το σχήμα απεικονίζει τις κύριες οδούς ενεργοποίησης των υποδοχέων CB από τα ενδοκανναβινοειδή και τα κανναβινοειδή: αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διακοπή του κυτταρικού κύκλου, πρόκληση κυτταρικού θανάτου (απόπτωση και αυτοφαγία), πρόληψη της εξέλιξης του όγκου (αγγειακή προσκόλληση καρκινικών κυττάρων, επεμβατικότητα και σχηματισμός μεταστάσεων), αναστολή της αγγειογένεσης και αναστολή της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετάβασης. (11)

Επί του παρόντος δεν υπάρχουν μεγάλες κλινικές μελέτες για τη διερεύνηση της δράσης του CBD στον καρκίνο, όμως υπάρχουν κάποιες μελέτες που αποδεικνύουν τη δράση του CBD σε ασθενείς με γλοίωμα, σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους θεραπείας. Δυο ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με προκαρβαζίνη, λομουστίνη και βινκριστίνη μαζί με CBD (ο ένας ασθενής 100-200 mg/ημέρα από το στόμα και ο άλλος με 300-450 mg/ημέρα από το στόμα) για περίπου δύο χρόνια, και οι δύο ασθενείς δεν παρουσίασαν εξέλιξη της νόσου για δύο χρόνια μετά τη θεραπεία.

Μια σειρά περιπτώσεων περιγράφει εννέα ασθενείς με βαθμού IV GBM, η μέση επιβίωση με το συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας και CBD (200–400 mg/ημέρα) παρατάθηκε σε 22,3 μήνες και δύο ασθενείς δεν είχαν σημεία εξέλιξη της νόσου για τρία ή περισσότερα χρόνια.

Συνολικά, τα δημοσιευμένα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η CBD μόνη της, ή σε συνδυασμό με Δ⁹-THC, TMZ ή γ-ακτινοβολία, δείχνουν πολλά υποσχόμενα στη θεραπεία του γλοιώματος. Ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν σοβαρές παρενέργειες της CBD μόνη της ή σε συνδυασμό με Δ⁹-THC. (38) (39) (40)

Επιπλέον οι Massi, P. *et al.* αξιολόγησαν την *in vitro* αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα της κανναβιδιόλης CBD σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γλοιώματος U87 και U373. Παρατήρησαν ότι η προσθήκη CBD στο μέσο καλλιέργειας οδήγησε σε πτώση μιτοχονδριακού οξειδωτικού μεταβολισμού και βιωσιμότητας σε κύτταρα γλοιώματος, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση ο οποίος ήταν ήδη εμφανής 24 ώρες μετά την έκθεση σε CBD. Το CBD ήταν ικανό να εισάγει την απόπτωση στα κύτταρα ανθρώπινου γλοιώματος, συμπεράναν έτσι ότι η CBD ήταν ικανή να παράγει μία σημαντική αντικαρκινική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, υποδεικνύοντας έτσι μια πιθανή εφαρμογή της CBD ως αντινεοπλασματικού παράγοντα. Η αντικαρκινική δράση του CBD έχει ελεγχθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του στήθους, η λευχαιμία κλπ. (41)

1.8.5 Αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση

Η CBD, όπως και άλλα αντιοξειδωτικά, διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μετατρέποντάς τις σε λιγότερο ενεργές μορφές. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται σε αυτές τις αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από πολλές δομές συντονισμού στις οποίες τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια βρίσκονται κυρίως στη φαινολική δομή, υποδηλώνοντας ότι οι ομάδες υδροξυλίου του δακτυλίου φαινόλης είναι κυρίως υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση της CBD. (42)

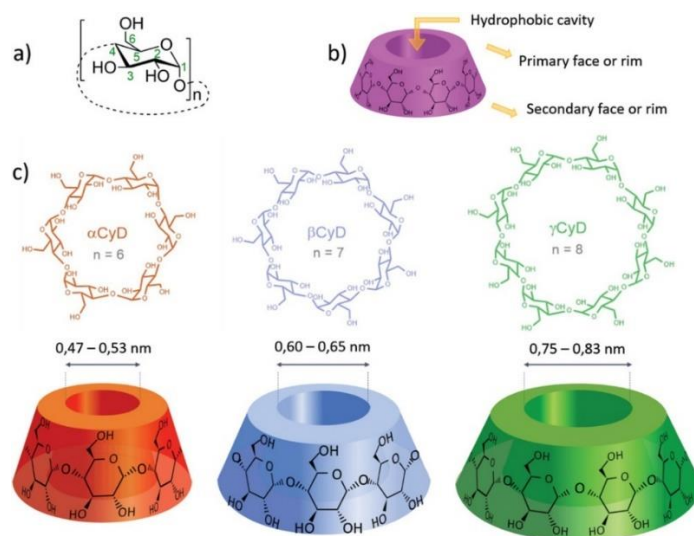
Το 1976, διαπιστώθηκε ότι η Δ⁹-THC και η CBD είναι βακτηριοστατικά καθώς και βακτηριοκτόνα έναντι μιας ομάδας θετικών κατά Gram βακτηρίων, *Streptococcus* και *Staphylococcus*. (43) Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η CBD ενισχύει την αντιμικροβιακή δράση του πεπτιδικού φαρμάκου βακιτρακίνη (bacitracin) έναντι των ειδών *Staphylococcus*, *L. monocytogenes* και *E. faecalis*. (44) Όταν το *E. coli* VCS257 υποβλήθηκε σε θεραπεία με CBD σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά παρατηρήθηκε ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σημαντικά καθώς υποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να βελτιώσουν τη δυνατότητα σε ένα ευρύ φάσμα υπαρχόντων αντιβιοτικών φαρμάκων. (45) Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι και άλλες ενώσεις που βρίσκονται στο *C. sativa* όπως τα τερπένια και η CBG έχουν πολλά υποσχόμενη αντιμικροβιακή δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Κυκλοδεξτρίνες

2.1 Γενικά

Οι κυκλοδεξτρίνες προέρχονται από άμυλο με μία ενζυματική μετατροπή, είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες, αποτελούμενοι συνήθως από έξι έως οκτώ μονάδες α -D γλυκοπυρανόζης, συνδεδεμένες με (α -1,4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τα τρία πιο σημαντικά μέλη της οικογένειας των κυκλοδεξτρινών είναι η α -κυκλοδεξτρίνη, η β -κυκλοδεξτρίνη και η γ -κυκλοδεξτρίνη (α -CD, β -CD και γ -CD αντίστοιχα).

Οι CDs έχουν σχήμα κώλου, όπου οι δευτεροταγείς υδροξυλομάδες των ατόμων C2 και C3 της γλυκόζης εντοπίζονται στη φαρδιά πλευρά του κώλου (δευτεροταγής πλευρά), ενώ εκείνες των C6 ατόμων είναι τοποθετημένες στην στενή πλευρά του (πρωτοταγής πλευρά). Τα άτομα H1, H2 και H4 των C-H ομάδων, που είναι τοποθετημένα στο εξωτερικό της κοιλότητας του μορίου και οι πολικές υδροξυλομάδες των σακχάρων που είναι διευθετημένες επίσης προς το εξωτερικό του κώλου προσδίδουν στις εξωτερικές επιφάνειες των προσόψεων των CDs υδρόφιλο χαρακτήρα. Έτσι δημιουργείται μία υδρόφοβη κοιλότητα στο κέντρο και με υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια. Η δομή τους επιτρέπει τον εγκλεισμό πολύ υδρόφοβων μορίων (ξενιζόμενος-guest) μέσα στη υδρόφοβή τους κοιλότητα (ξενιστής-host) δημιουργώντας σύμπλοκα εγκλεισμού.



Σχήμα 5: Δομή και διαστάσεις α -, β -, γ - κυκλοδεξτρίνης

Λόγω κυρίως αυτής της ιδιότητας τους, οι κυκλοδεξτρίνες τις τελευταίες δεκαετίες έχουν βρει ευρεία εφαρμογή στη φαρμακευτική, στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και γενικότερα στη χημική βιομηχανία (46). Ο Αμερικανικός οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων FDA εξετάζει συστηματικά τις φυσικές και τροποποιημένες CDs και κάποιες έχουν εγκριθεί ή έχουν χαρακτηριστεί «γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς» (GRAS).

Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες α -, β - και γ -CDs αποτελούνται από 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης. Διάφορα υδρόφιλα, υδρόφοβα και ιονικά παράγωγα έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της ικανότητας εγκλεισμού των φυσικών κυκλοδεξτρινών. Η υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη (HP- β -CD), η τυχαία μεθυλιωμένη- β -κυκλοδεξτρίνη (RM- β -CD) και η σουλφοβουτυλαιθέρα- β -κυκλοδεξτρίνη (SBE- β -CD) είναι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που διατίθενται στο εμπόριο για εφαρμογές μοριακού εγκλεισμού. Οι πολυμερισμένες κυκλοδεξτρίνες είναι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, είτε υδατοδιαλυτές είτε αδιάλυτες. (47)

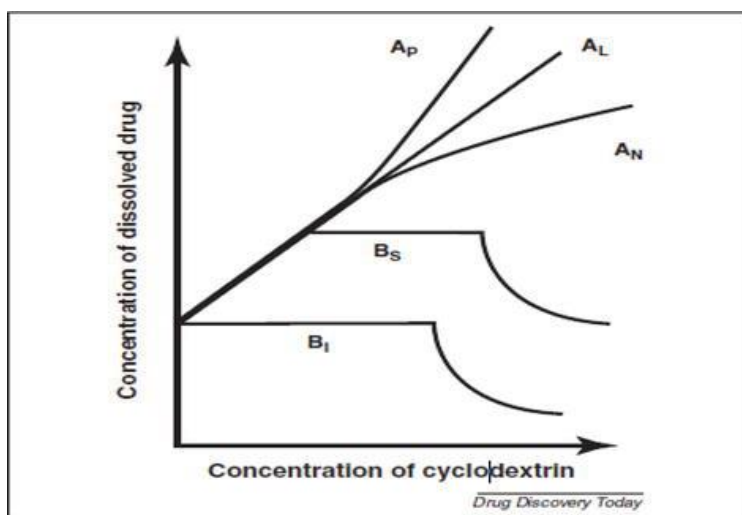
Αρκετές μελέτες τοξικότητας έδειξαν ότι η γ -κυκλοδεξτρίνη, η 2-υδροξυπροπυλ- β -κυκλοδεξτρίνη, η σουλφοβουτυλαιθερ-κυκλοδεξτρίνη, η σουλφιδική-κυκλοδεξτρίνη και η μαλτοσυλ-κυκλοδεξτρίνη είναι ασφαλείς για παρεντερική χορήγηση σε αντίθεση με την α -, β - κυκλοδεξτρίνη και τις μεθυλιωμένες κυκλοδεξτρίνες. Επιπλέον, όλες οι μελέτες τοξικότητας έδειξαν ότι η χορήγηση τους μέσω του στόματος είναι ασφαλής λόγω της μη απορρόφησης τους από το γαστρεντερικό σωλήνα. (48)

Η ικανότητα των CD να σχηματίζει σύμπλοκα εγκλεισμού εξαρτάται από στερικούς και θερμοδυναμικούς παράγοντες. Βασική κινητήρια δύναμη για τη δημιουργία συμπλόκων αποτελεί η υδροφοβικότητα, δηλαδή η απελευθέρωση μορίων νερού από την υδροφοβική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του συμπλόκου παίζουν οι δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις όπως και πιθανοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ ξενιστή-ξενιζομένου. (49) Κατά τον εγκλεισμό, τα αρχικώς εγκλεισμένα στην υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης μόρια νερού αντικαθίσταται από υδρόφοβες ενώσεις ή υδρόφοβα τμήματα ενώσεων που είναι παρούσες στο διάλυμα, ώστε το

θερμοδυναμικό σύστημα ξενιστών-ξενιζομένων να μειώνει την ελεύθερη ενέργεια του αυξάνοντας την εντροπία και μειώνοντας τη ενθαλπία του.

Η δέσμευση των ξενιζόμενων μορίων στις κυκλοδεξτρίνες, που έχουν ρόλο ξενιστή, δεν είναι μόνιμη κατάσταση αλλά μια δυναμική ισορροπία που χαρακτηρίζεται από μια σταθερά συμπλοκοποίησης (K_c). Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της K_c είναι αυτή που προτάθηκε μέσω από τους Connors και Higuchi μέσω των διαγραμμάτων της φάσης διαλυτότητας του ξενιζομένου μορίου. (47) (48)

Οι Connors και Higuchi κατηγοριοποίησαν τα σύμπλοκα με βάση το προφίλ της διαλυτότητας του υποστρώματος (ξενιζόμενο μόριο) αυξανόμενης της συγκέντρωσης του διαλυτοποιητικού μέσου ή του προσδέτη (ξενιστής). Το σύμπλοκο χαρακτηρίζεται τύπου A (με υποκατηγορίες A_p , A_L και A_N) αν αυξάνοντας τη συγκέντρωση του διαλυτοποιητή ή του προσδέτη, παρατηρείται αύξηση στη διαλυτότητα του υποστρώματος (Σχήμα 6). Ως σύμπλοκο τύπου B, χαρακτηρίζεται το σύμπλοκο με περιορισμένη διαλυτότητα που παρατηρείται συνήθως όταν ξενιστές είναι οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες, ειδικά η β -CD και μπορεί να εμφανίζει επίσης το προφίλ δύο υποκατηγοριών των B_S και B_T που απεικονίζονται στο Σχήμα 6. (50)



Σχήμα 6: Σύμπλοκο τύπου A, B και οι υποκατηγορίες τους

Στη στερεά κατάσταση (μετά από αποξήρανση ή λυοφιλοποίηση) τα σύμπλοκα εγκλεισμού είναι πολύ σταθερά και παρουσιάζουν μεγάλη διάρκεια ζωής σε

θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να επαναδιαλυτοποιηθούν σε νερό, όπου ακολουθεί η αργή απελευθέρωση του ξενιζόμενου μορίου ώστε να αποκατασταθεί η δυναμική ισορροπία εγκλεισμού που προαναφέρθηκε (48).

2.2 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών σε στερεή κατάσταση

Η παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών επιτυγχάνεται με διάφορες τεχνικές, οι οποίες εκτελούνται εργαστηριακά και η αποτελεσματικότητα τους ποικίλλει ανά περίπτωση, αλλά εξετάζονται καθώς παρουσιάζουν υψηλότερο ή χαμηλότερο βαθμό δυσκολίας σε εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας. Μερικές από αυτές είναι:

Διάχυση ατμών (Vapour Diffusion)

Σε αυτή τη τεχνική, διάλυμα δείγματος που περιέχεται σε ένα μικρό σωλήνα τοποθετείται σε μεγαλύτερο σωλήνα που περιέχει έναν δεύτερο λιγότερο αποτελεσματικό διαλύτη και αυτός ο σωλήνας στη συνέχεια σφραγίζεται. Η μέθοδος λειτουργεί καλύτερα εάν ο διαλύτης του διαλύματος είναι λιγότερο πτητικός και επομένως ο δεύτερος διαλύτης διαχέεται κυρίως στο διάλυμα του δείγματος.

Μέθοδος Συγκαταβύθισης (co-precipitation)

Αποτελεί την πιο απλή και αρκετά συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για μη υδατοδιαλυτές ουσίες. Σε αυτή τη τεχνική για να παραλάβουμε το σύμπλοκο, η προς εγκλεισμό βιοδραστική ουσία διαλύεται σε αιθανόλη και προστίθεται με ανάδευση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Καλό είναι να αποφεύγονται οργανικοί διαλύτες όπως διαιθυλαιθέρας ή βενζόλιο για τη διάλυση της βιοδραστικής ουσίας. Το τελικό διάλυμα ψύχεται και ακολουθεί η κρυστάλλωση και καθίζηση των προϊόντων εγκλεισμού. Η καθίζηση του επιτυγχάνεται με χρήση αντιδιαλύτη (ένας διαλύτης στον οποίο το προϊόν είναι αδιάλυτο). Για την παραλαβή καθαρού συμπλόκου, το διήθημα εκλούεται με

κατάλληλο οργανικό διαλύτη, ώστε να απομακρυνθούν τα ελεύθερα μόρια της βιοδραστικής ουσίας από τις επιφάνειες του και τέλος, αποξηραίνεται ή λυοφυλοποιείται (51).

Ξήρανση με ψεκασμό (Spray drying)

Μια ακόμη αρκετά συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ξήρανση με ψεκασμό. Αυτή η τεχνική χαρακτηρίζεται από τρία βήματα: τον ψεκασμό υγρής τροφοδοσίας, την ξήρανση λεπτών σταγονιδίων με τη χρήση θερμαινόμενου ρεύματος αέρα και ένα τελικό βήμα όπου τα ξηραμένα σωματίδια διαχωρίζονται από το ρεύμα αέρα. Ο ψεκασμός πραγματοποιείται μέσω ακροφυσίου σε θάλαμο ξήρανσης. Το σύμπλοκο λαμβάνεται με μορφή ξηρής σκόνης. Αυτή η τεχνική προσφέρει υψηλή απόδοση, είναι γρήγορη και είναι κατάλληλη για μαζική παραγωγή γι' αυτό μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανικό επίπεδο. Δεν ενδείκνυται για θερμοευαίσθητες ενώσεις, χρησιμοποιείται σε ενώσεις που είναι θερμικά σταθερές στους 50-70°C. (51) (52)

Λυοφιλοποίηση (Freeze-drying or lyophilization)

Η τεχνική της λυοφιλοποίησης είναι κατάλληλη για υδατοδιαλυτές ή θερμοευαίσθητες ενώσεις. Η απαιτούμενη αναλογία κυκλοδεξτρίνης και βιοδραστικής ένωσης διαλύεται σε νερό υπό ανάδευση. Το διάλυμα λυοφυλοποιείται και η σκόνη που λαμβάνεται ξεπλένεται με οργανικό διαλύτη και στη συνέχεια ξηραίνεται υπό κενό. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. (53)

Μέθοδος πολτοποίησης (Kneading Method or Paste Method)

Είναι μια απλή μέθοδος κατά την οποία οι κυκλοδεξτρίνες, αυστηρά ζυγισμένες, αναμιγνύονται σε γουδί με μικρή ποσότητα νερού ώστε να προκύψει πολτός (πάστα) και στη συνέχεια, η προς εγκλεισμό ουσία ενσωματώνεται στον πολτό με σχολαστική ανάμιξη. Το στερεό που λαμβάνεται ξεπλένεται με μικρή ποσότητα διαλύτη και ακολουθεί ξήρανση υπό κενό. Οι da Silva Júnior *et al.* ισχυρίζονται ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να προσφέρει υψηλή απόδοση και είναι εύκολα επεκτάσιμη σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας (πilotική, βιομηχανική) (54), αλλά οι Cheirsilp και Rakmai αντικρούουν τον ισχυρισμό για τις δυνατότητες της σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας ενώ αναφέρουν ότι είναι κατάλληλη για μη υδατοδιαλυτες βιοδραστικές ουσίες. (53)

Μέσω ελεγχόμενης μεταβολής της θερμοκρασίας (Control change of temperature)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την απόκτηση συμπλόκων εγκλεισμού σε κρυσταλλική κατάσταση. Ποσότητες κυκλοδεξτρίνης και βιοδραστικής ουσίας συνήθως με μοριακές αναλογίες 1:1 ή 2:1 αναμειγνύονται σε νερό, και το διάλυμα αναδεύεται για 24 – 48 h σε 70°C ή σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο ή σε κλίβανο, όπου πραγματοποιείται βαθμιαία ελάττωση ή αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία πρέπει να είναι σταδιακή και αργή, ειδικά τις τελευταίες μέρες του πειράματος. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 7-10 ημέρες με σκοπό την ανάπτυξη μονοκρυστάλλων κατάλληλων για την περιθλαση ακτίνων-Χ.
(55)

2.3 Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών

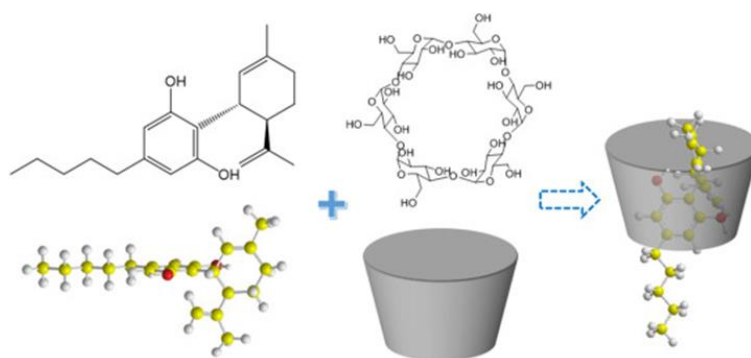
Η ενθυλάκωση των ξениζόμενων μορίων στην εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους, όπως:

- Σταθεροποίηση ουσιών ευαίσθητων στο φως ή στο οξυγόνο
- Τροποποίηση της χημικής αντιδραστικότητας των ξениζόμενων μορίων
- Σταθεροποίηση πτητικών ουσιών
- Βελτίωση διαλυτότητας ουσιών
- Τροποποίηση υγρών ουσιών σε σκόνες
- Προστασία από την αποικοδόμηση ουσιών από μικροοργανισμούς
- Απόκρυψη κακής οσμής και γεύσης
- Επικάλυψη χρωστικών ή χρώματος ουσιών
- Καταλυτική δράση κυκλοδεξτρινών με ξениζόμενα μόρια

Αυτά τα χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών ή των παραγώγων τους τα καθιστούν κατάλληλα για εφαρμογές στην αναλυτική χημεία, γεωργία, φαρμακευτική, τρόφιμα και σε είδη καλλωπισμού. (48) Η επιτυχής παροχή του φαρμάκου εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του (διαλυτότητα, διάλυση, σταθερότητα, διαπερατότητα και μεταβολισμός). Το CBD είναι ασταθές και μπορεί να διασπαστεί ανάλογα με τη

θερμοκρασία, το φως και την αυτό-οξειδωση. Η οξειδωση συνδέεται με τάγγιση, καθώς και μειωμένες συγκεντρώσεις κανναβινοειδών και τερπενίων. (56)

Η δημιουργία συμπλόκων με κυκλοδεξτρίνες έχει διερευνηθεί ως μια μέθοδος για την αύξηση της διαλυτότητας στο νερό και κατά συνέπεια την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της υπογλώσσιας χορήγησης CBD. (Σχήμα 7) Η Manpila και οι συνεργάτες της με τη μέθοδο της κατακρήμνισης δημιούργησαν σύμπλοκο εγκλεισμού CBD σε β -CD σε 1:2 αναλογία και υπέδειξαν ότι μπορεί να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα της CBD καθώς και τον ρυθμό διάλυσης (dissolution rate). (57)



Σχήμα 7: Χημική δομή κανναβιδιόλης (CBD) και η δομή του σύμπλοκου εγκλεισμού CBD. (58)

Ο Li και οι συνεργάτες του, το 2021 μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση του CBD και των συμπλόκων του με β -κυκλοδεξτρίνη (β -CD) και 2, 6-δι-*O*-μεθυλ- β -κυκλοδεξτρίνη (DM- β -CD). Παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης του CBD, με τη συμπλοκοποίηση του στις προαναφερθείσες κυκλοδεξτρίνες. Ειδικότερα, η ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών ABTS για τα δύο σύμπλοκα εγκλεισμού ήταν καλύτερη από αυτή της βιταμίνης C. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι η υδατοδιαλυτότητα του CBD υπό τη μορφή συμπλόκων CBD/ β -CD και CBD/DM- β -CD αυξήθηκε σημαντικά στο 0,395 και 14,118 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αντίστοιχα, σε σχέση με την ελεύθερη CBD (0,023 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και ο *in vitro* ρυθμός διάλυσης επίσης βελτιώθηκε στα σύμπλοκα CBD. (59)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Παραλαβή, διαχωρισμός και ταυτοποίηση συστατικών *Cannabis sativa* L.

3.1 Παραλαβή των συστατικών

3.1.1 Τεχνικές Εκχύλισης

Τρεις παράγοντες είναι σημαντικοί για την απόδοση της εκχύλισης, η κοκκομετρία του στερεού δείγματος, η θερμοκρασία του συστήματος και η συγγένεια του διαλύτη εκχύλισης ως προς την ένωση που θέλουμε να εκχυλιστεί. Αρχικό βήμα είναι η άλεση που στοχεύει να αυξήσει την επιφάνεια επαφής μεταξύ του διαλύτη και του ενεργού συστατικού. Αυτό μπορεί να γίνει με χρήση μύλου και έπειτα κοσκινίζεται. (60)

Τα κανναβινοειδή είναι διαλυτά τόσο σε πολικούς όσο και σε μη πολικούς διαλύτες, αλλά τα υπόλοιπα συστατικά της κάνναβης, όπως τα τερπένια, τα τερπενοειδή, τα флаβονοειδή και οι πολυφαινόλες, έχουν διαφορετικές αναλογίες εκχύλισης ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται. Ένας πολικός διαλύτης ευνοεί την εξαγωγή περισσότερων πολικών μορίων, όπως τα флаβονοειδή και τις πολυφαινόλες, ενώ δεν ευνοεί την εκχύλιση μη πολικών τερπενίων και αντίστροφα. (61)

Μια συνηθισμένη τεχνική εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεού-υγρού (SLE), που απαιτεί τη χρήση κατάλληλου διαλύτη με μεγάλη συγγένεια για τα κανναβινοειδή. Τα κανναβινοειδή οξέα και τα ουδέτερα κανναβινοειδή μπορούν να εκχυλιστούν χρησιμοποιώντας κοινούς οργανικούς διαλύτες ή μείγμα διαλυτών. Ο πιο κοινός διαλύτης είναι η αιθανόλη (EtOH) καθώς έχει υψηλή απόδοση λόγω υψηλής συγγένειας με τη δομή των κανναβινοειδών. Η μεθανόλη (MeOH) και ο οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) χρησιμοποιούνται επίσης μόνοι ή σε συνδυασμό με άλλους διαλύτες. Ένας ακόμη διαλύτης με υψηλή λιποφιλικότητα που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση κανναβινοειδών είναι το εξάνιο.

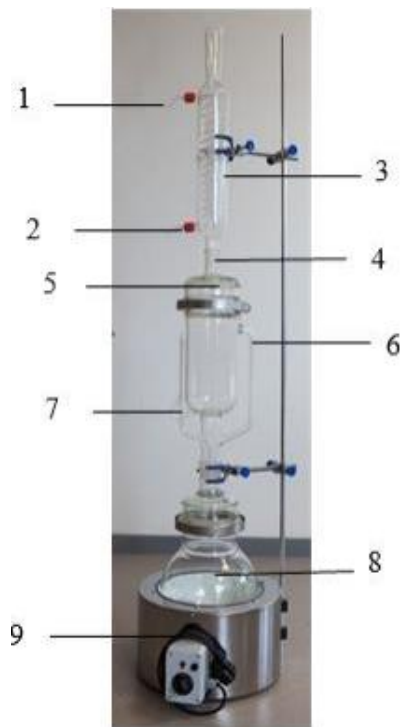
Όταν ο στόχος της εκχύλισης είναι τα κανναβινοειδή οξέα, η εκχύλιση πρέπει να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου. Διαφορετικά θα πρέπει να πραγματοποιηθεί

αποκαρβοξυλίωση. Η διαδικασία της αποκαρβοξυλίωσης μετατρέπει τα κανναβινοειδή οξέα σε ουδέτερες μορφές. (62)

Στις παραδοσιακές μεθόδους ανήκουν η εκχύλιση Soxhlet και η δυναμική διαβροχή, που είναι χρονοβόρες και καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες διαλυτών, αλλά ακριβής σε σύγκριση με σύγχρονες τεχνικές. Ανάμεσα στις σύγχρονες τεχνικές η εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE), η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα (MAE) και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE) είναι οι πιο κοινές.

3.1.1.1 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet ανακαλύφθηκε από τον Franz Ritter Von Soxhlet, έναν Γερμανό χημικό, ως μέθοδος εκχύλισης κυρίως λιπιδίων. Ωστόσο με τα χρόνια, αυτή η διαδικασία βρήκε ευρεία εφαρμογή στο διαχωρισμό βιοδραστικών ενώσεων από φυτικό υλικό. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως ως πρότυπη μέθοδος για τη σύγκριση και ανάπτυξη εναλλακτικών τεχνικών εκχύλισης. Η διαδικασία αρχίζει με τη τοποθέτηση μιας μικρής ποσότητας ξηρού δείγματος σε πορώδη φύσιγγα (thimble), ο διαλύτης υφίσταται διαδοχικούς κύκλους συμπύκνωσης και σιφωνισμού και σε κάθε κύκλο παραλαμβάνει ποσότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας από το δείγμα. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση.



Εικόνα 5: Συσκευή Soxhlet

- | | |
|---|---|
| 1. είσοδος νερού | 6. πλευρικός σωλήνας για το πέρασμα των ατμών |
| 2. έξοδος νερού | 7. σωλήνας για το σιφονισμό |
| 3. ψυκτήρας | 8. σφαιρική φιάλη όπου τοποθετείται ο διαλύτης εκχυλίσεως |
| 4. φύσιγγα εκχυλίσεως με την εκχυλιζόμενη ουσία | 9. θερμομανδίας |
| 5. σωλήνας εκχύλισης Soxhlet (εκχυλιστήρας) | |

Για εκχύλιση κάνναβης με τη χρήση της συσκευής Soxhlet, οι Lewis-Bakker *et al.* (2019) συνέκριναν διαφορετικούς τύπους οργανικών διαλυτών για τη διαδικασία και βρήκαν ότι η αιθανόλη είχε τις υψηλότερες αποδόσεις κανναβινοειδών. Η εκχύλιση Soxhlet αποτελεί μια απλή τεχνική με υψηλή απόδοση κάτω από βέλτιστες συνθήκες που ωστόσο είναι χρονοβόρα και καταναλώνει μεγάλες ποσότητες διαλυτών προκαλώντας επιπτώσεις στο περιβάλλον. (63)

3.1.1.2 Εκχύλιση υγρού-υγρού

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μια διαδικασία διαχωρισμού η οποία βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών που θα διαχωριστούν μεταξύ δύο υγρών φάσεων. Εξαρτάται από τη μεταφορά μάζας των συστατικών που θα διαχωριστούν από μια υγρή φάση σε μια άλλη υγρή φάση. Προκειμένου τα δύο υγρά να διαχωριστούν, πρέπει να έχουν διαφορετικές πυκνότητες.

Συχνά, ένας από τους διαλύτες είναι νερό ή ένα υδατικό μείγμα (πολικός) και ο άλλος είναι οργανικός διαλύτης (μη πολικός) όπως κατάλληλος αιθέρας. Όπως σε όλες τις διεργασίες εκχύλισης, η εκχύλιση υγρού-υγρού περιλαμβάνει ένα στάδιο ανακίνησης (επαφή), που ακολουθείται από ένα στάδιο διαχωρισμού φάσεων.

Σε μια διαχωριστική χοάνη προστίθενται οι διαλύτες και ακολουθείται ανακίνηση και εκτόνωση της χοάνης ώστε να δραπετεύσουν οι ατμοί των διαλυτών, στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία για να επιτραπεί ο διαχωρισμός των υγρών φάσεων μεταξύ τους. Το υγρό χαμηλότερης πυκνότητας θα παραμείνει επάνω από το υγρό υψηλότερης πυκνότητας, έτσι το μείγμα διαλυτών σχηματίζουν δυο διαφορετικά διαλύματα. (64) Αρχικά συλλέγεται η υδατική φάση (κάτω φάση) η οποία απορρίπτεται, η οργανική φάση (άνω φάση) συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη.

3.1.2 Παραλαβή με υδροαπόσταξη

Η υδροαπόσταξη χρησιμοποιεί νερό (ατμό) ως διαλύτη εκχύλισης για την ανάκτηση πτητικών ή πολικών συστατικών φυτικών υλικών. Η υδροαπόσταξη πραγματοποιείται συχνά χρησιμοποιώντας μια εγκατάσταση γνωστή ως συσκευή Clevenger. (Εικόνα 6) (65) Η διαδικασία της υδροαπόσταξης περιλαμβάνει θέρμανση παρουσία νερού σε θερμοκρασίες υψηλότερες από το σημείο βρασμού, οι υδρατμοί που περιέχουν το έλαιο εισέρχονται στο συμπυκνωτή όπου ψύχονται κάτω από τους 30°C και συμπυκνώνονται σε δύο διαχωρισμένες (μη αναμίξιμες) υγρές φάσεις. Η μία φάση είναι υδρόλυμα και η άλλη αιθέριο έλαιο. Έπειτα η στρόφιγγα ανοίγει και

συλλέγεται το υδρόλυμα (κάτω φάση) η οποία απορρίπτεται ενώ το αιθέριο έλαιο (άνω φάση) συλλέγεται. (66)



Εικόνα 6: Συσκευή Clevenger

3.2 Τεχνικές διαχωρισμού και ταυτοποίησης των συστατικών

3.2.1 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης

3.2.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

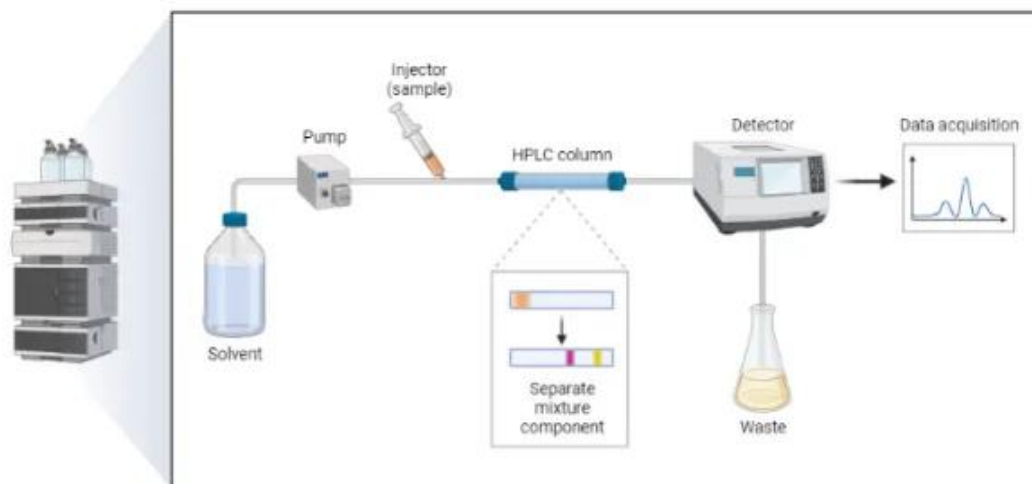
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια τεχνική στην αναλυτική χημεία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε συστατικού σε ένα μείγμα. Ένας υπό πίεση υγρός διαλύτης που περιέχει το μείγμα του δείγματος διέρχεται μέσα από μια στήλη γεμάτη με στερεό προσροφητικό υλικό. Κάθε συστατικό στο δείγμα αλληλεπιδρά ελαφρώς διαφορετικά με το προσροφητικό υλικό, δημιουργώντας διαφορετικούς ρυθμούς

ροής για τις διαφορετικές ενώσεις και οδηγώντας στο διαχωρισμό των συστατικών καθώς ρέουν προς την έξοδο. (67)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια κοινώς χρησιμοποιούμενη τεχνική υγρής χρωματογραφίας (LC) για ποσοτική ανάλυση κανναβινοειδών. Οι πιο κοινές στήλες που χρησιμοποιούνται στο HPLC αποτελούνται από στατικές φάσεις C18 και μεθανόλη με 0,1% μυρμηκικό οξύ ή νερό με 0,1% μυρμηκικό οξύ ως κινητές φάσεις. Οι στήλες C18 μπορούν να διαφοροποιήσουν τα κανναβινοειδή.

Στη Χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση, που μπορεί να είναι ύδωρ ή τριαιθυλενογλυκόλη κατακρατούμενα από σωματίδια πυριτίας (silica) ή αλουμίνας, είναι περισσότερο πολική από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο ή ισοπροπυλαιθέρας. Ενώ στη Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή φάση είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης (όπως ύδωρ, μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για ανάλυση κανναβινοειδών. Οι κοινές μέθοδοι ανίχνευσης περιλαμβάνουν τη φασματομετρία μάζας (MS) και την απορρόφηση υπεριώδους (UV) (190 έως 400 nm). Τα κανναβινοειδή οξέα έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 270nm και 310nm ενώ τα ουδέτερα κανναβινοειδή περίπου στα 220nm. (68) Μια συσκευή HPLC αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα: το σύστημα παροχής κινητής φάσεως, το σύστημα εισαγωγής δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα.



Εικόνα 7: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

3.2.1.2 Αέρια χρωματογραφία (GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι η διαδικασία διαχωρισμού των ενώσεων σε ένα μείγμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στη κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Η κινητή φάση είναι συνήθως ένα αδρανές αέριο όπως ήλιο, αργό, άζωτο ή υδρογόνο. (67)

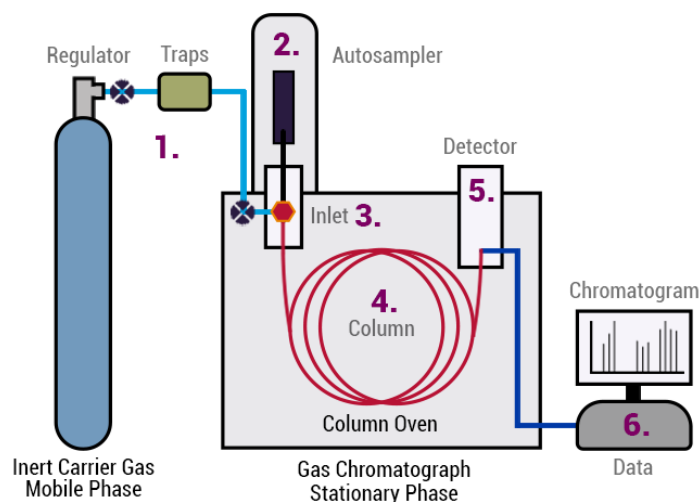
Η αέρια χρωματογραφία συνήθως ολοκληρώνεται σε 20 λεπτά στους 300°C και χρησιμοποιεί στατικές φάσεις με χαμηλές πολικότητες όπως 5% διφαινυλο- και 95% διμεθυλο-πολυσιλοξάνιο. Η συνολική ποσότητα κανναβινοειδών σε ένα δείγμα είναι το άθροισμα των όξινων και ουδέτερων κανναβινοειδών. Επειδή η αέρια χρωματογραφία απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες στήλης, τα όξινα κανναβινοειδή υφίστανται αποκαρβοξυλίωση κατά τη διέλευση μέσω της στήλης. (69)

Ένα σύστημα χρωματογραφίας GC αποτελείται από την οβίδα φέροντος αερίου που αποτελεί τη κινητή φάση, το ρυθμιστή πίεσεως-ροόμετρο, το φέρον αέριο (carrier gas) διαβιβάζεται μέσα από το ρυθμιστή πίεσεως, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και

ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά τη πίεση. Οι ταχύτητες ροής μπορούν να μετρηθούν με ροόμετρο στη κεφαλή της στήλης.

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος έχει ως εξής: το δείγμα εισάγεται με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής από ελαστική ουσία, για τις κοινές αναλυτικές πληρωμένες στήλες η ποσότητα δείγματος είναι συνήθως λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως 20μL. Οι τριχοειδείς στήλες απαιτούν δείγματα που είναι μικρότερα κατά ένα συντελεστή 100 ή μεγαλύτερο. Στη περίπτωση αυτή απαιτείται η χρήση ενός διαμοιραστή δείγματος (sample splitter), ο οποίος παρέχει μικρά γνωστά κλάσματα του εισαχθέντος δείγματος, ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στα απόβλητα. Οι σημερινοί αεριοχρωματογράφοι που χρησιμοποιούν τριχοειδείς στήλες συμπεριλαμβάνουν στον εξοπλισμό τους τέτοιους διαμοιραστές αλλά συγχρόνως επιτρέπουν και ένεση δείγματος χωρίς διαμοιρασμό (splitless injection).

Στους σύγχρονους αεριοχρωματογράφους υπάρχουν αυτόματοι εισαγωγείς δείγματος με δίσκους αυτόματης δειγματοληψίας. Ο χώρος εισαγωγής δείγματος, η στήλη και πολλές φορές και ο ανιχνευτής βρίσκονται μέσα σε θερμοστατούμενο κλίβανο. Η βέλτιστη θερμοκρασία στήλης εξαρτάται από το σημείο βρασμού του δείγματος και τον απαιτούμενο βαθμό διαχωρισμού. Οι στήλες είναι σε μορφή σπειράματος και χωρίζονται σε πληρωμένες στήλες και τριχοειδείς στήλες ή στήλες ανοικτού σωλήνα, στις οποίες γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών. Τέλος πολλοί αεριοχρωματογράφοι συνδέονται με συστήματα ανίχνευσης, όπως ο ανιχνευτής φασματογραφίας μαζών ώστε να ανιχνεύουν την εμφάνιση των αναλυτών κατά την έκλουση τους από τη στήλη και να βοηθούν στην ταυτοποίηση. Το σήμα που παράγει ο ανιχνευτής, ενισχύεται στον ενισχυτή και τέλος καταγράφεται στον καταγραφέα.



Εικόνα 8: Αέρια Χρωματογραφία

Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ GC και HPLC είναι η θερμοκρασία λειτουργίας. Η HPLC δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες όπως η GC στο στάδιο της παραγωγοποίησης και γι' αυτό είναι κατάλληλη για την ανίχνευση κανναβινοειδών οξέων καθώς και τη διαφοροποίηση μεταξύ όξινων και ουδέτερων κανναβινοειδών. Μειονέκτημα της HPLC είναι ότι δεν αναλύει πτητικές ενώσεις όπως τερπένια.

3.3 Ανιχνευτές

Ανιχνευτές Φασματογραφίας μαζών (MS)

Η φασματομετρία μαζών είναι μία τεχνική η οποία μαζί με την αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων. Το GC/MS είναι η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση κανναβινοειδών μέχρι σήμερα.

Το φασματόμετρο μαζών (mass spectrometer) είναι ένα όργανο, το οποίο παράγει και διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Στο σημείο εισόδου του φασματόμετρου μαζών εισάγεται μικροποσότητα δείγματος στην πηγή ιόντων. Εκεί οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε αεριώδη ιόντα μετά από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, φωτόνια ιόντα ή μόρια. Στη συνέχεια εξέρχεται ένα ρεύμα φορτισμένων ιόντων σε αεριώδη κατάσταση τα οποία

επιταχύνονται στον αναλυτή μαζών. Στον μεταλλάκτη ιόντων του MS η ιοντική δέσμη μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Ακολουθεί ένας επεξεργαστής σήματος και τέλος λαμβάνεται το φάσμα μάζας. (60)

Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode array Detector)

Σε αυτόν τον ανιχνευτή σειρές από πυρίτιο τύπου p πάνω σε υπόστρωμα πυριτίου τύπου n δημιουργούν μια σειρά από διόδους επαφής pn. Σε κάθε δίοδο εφαρμόζεται ανάστροφη πόλωση, οπότε τα ηλεκτρόνια και οι οπές έλκονται μακριά από την επαφή. Δημιουργείται έτσι μια περιοχή απογύμνωσης σε κάθε επαφή, όπου υπάρχουν πολύ λίγα ηλεκτρόνια και οπές. Η επαφή λειτουργεί ως πυκνωτής, ο οποίος φέρει φορτίο και στις δύο πλευρές της περιοχής απογύμνωσης. Στην αρχή του κύκλου μέτρησης, κάθε δίοδος είναι πλήρως φορτισμένη. Όταν στην επιφάνεια του ημιαγωγού προσπίπτει ακτινοβολία, παράγονται ελεύθερα ηλεκτρόνια και οπές, που μεταναστεύουν σε περιοχές αντίθετου φορτίου, αποφορτίζοντας εν μέρει τον πυκνωτή. Όσο περισσότερη ακτινοβολία προσπίπτει σε κάθε δίοδο τόσο λιγότερο φορτίο παραμένει. Στο τέλος της μέτρησης μετριούνται όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα.

Στο φασματοφωτόμετρο συστοιχίας φωτοδίοδων διαπερνά το δείγμα λευκό φως (με όλα τα μήκη κύματος). Στη συνέχεια, το φως εισέρχεται σε έναν πολυχρωμάτορα, ο οποίος αναλύει το φως στα επιμέρους μήκη κύματος και το κατευθύνει στη συστοιχία φωτοδίοδων. Κάθε δίοδος λαμβάνει διαφορετικό μήκος κύματος, και έτσι όλα τα μήκη κύματος μετριούνται ταυτόχρονα. Το DAD βοηθά να δούμε την απόκριση της αναλυόμενης ουσίας σε διαφορετικά μήκη κύματος σε μία μόνο διαδρομή και έτσι εξοικονομεί χρόνο προσφέροντας γρήγορη συλλογή του φάσματος. Είναι ανιχνευτής τύπου UV και βοηθά στην ταυτοποίηση αγνώστων καθώς παρέχει πλήρες φάσμα UV. (70) (71)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Τεχνικές Χαρακτηρισμού

Τεχνικές Θερμικής Ανάλυσης: Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), Θερμική Βαρυμετρική Ανάλυση (TGA), Μικροσκοπία Θερμού Σταδίου (HSM), Περίθλαση ακτίνων-Χ από μονοκρυστάλλο (SC-XRD), Περίθλαση ακτίνων-Χ κόνεως (P-XRD)

Φασματοσκοπικές Τεχνικές: Φασματοσκοπία FT-IR, Φασματοσκοπία Raman, Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Φασματοσκοπίας απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis), Φασματοσκοπία Μάζας (MS)

4.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία UV-Vis είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιεί φως στο ορατό, υπεριώδες, και το εγγύς υπέρυθρο. Σύμφωνα με τον νόμο Lambert-Beer η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας στο διάλυμα και του μήκους της διαδρομής.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Όπου ϵ είναι η μοριακή απορρόφηση, l πάχος κυψελίδας σε cm, και c συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (σε mole/L).

Βασική αρχή της είναι ότι ένα μόριο ή ιόν θα παρουσιάσει απορρόφηση στην ορατή ή υπεριώδη περιοχή όταν η ακτινοβολία προκαλεί μια ηλεκτρονιακή μετάβαση στη δομή της. Γι' αυτό η απορρόφηση του φωτός από ένα δείγμα στην υπεριώδη ή ορατή περιοχή συνοδεύεται από αλλαγή στην ηλεκτρονιακή κατάσταση των μορίων του δείγματος. Η ενέργεια που παρέχεται από το φως θα προωθήσει τα ηλεκτρόνια από το τροχιακό της θεμελιώδους κατάστασης σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας, διεγερμένης κατάστασης. (72)

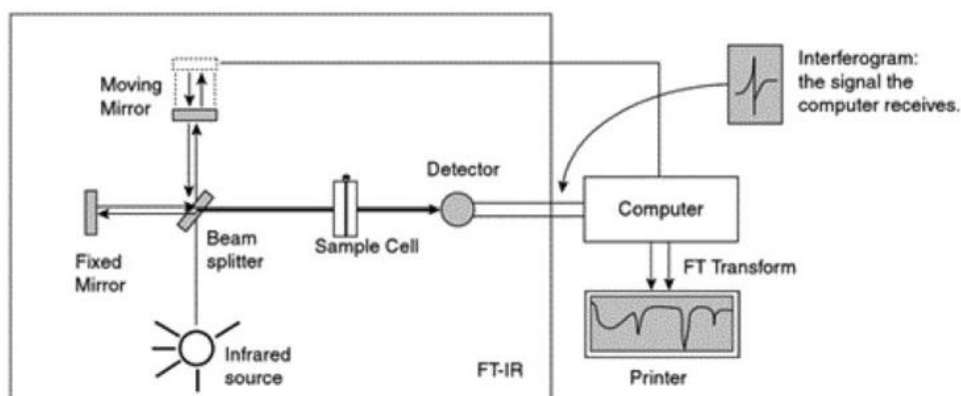
Για τη μέτρηση της απορροφήσεως χρησιμοποιούνται τα φωτόμετρα ή φασματοφωτόμετρα. Αποτελούνται από μια πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος, έναν μονοχρωμάτορα για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, μια κυψελίδα για τη τοποθέτηση του δείγματος, έναν ανιχνευτή που μετατρέπει το

οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και ένα σύστημα μετρήσεως το οποίο περιλαμβάνει ενισχυτή σήματος και όργανο αναγνώσεως. (67)

4.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT/IR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία ανιχνεύει τις μοριακές δονήσεις. Οι λειτουργικές ομάδες μπορούν να συσχετιστούν με χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης υπέρυθρων, οι οποίες αντιστοιχούν στις θεμελιώδεις δονήσεις των λειτουργικών ομάδων. Ένα μόριο απορροφά την υπέρυθρη ακτινοβολία εάν υπάρχει μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου.

Κατά την πορεία της δόνησης όταν ένα μόριο έχει κέντρο συμμετρίας, όλες οι δονήσεις που είναι συμμετρικές ως προς το κέντρο δεν ανιχνεύονται στο υπέρυθρο, αντίθετα, ασύμμετρες δονήσεις ανιχνεύονται. Αυτή η ιδιότητα μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε τις χημικές ομάδες σε ένα δείγμα, και κυρίως αμινοξέων και μορίων νερού που δύσκολα μπορούν να παρατηρηθούν με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές. Η φασματοσκοπία FT/IR χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μοριακών δομών καθώς και τον ποσοτικό προσδιορισμό. (73)



Εικόνα 9: Βασικά μέρη ενός FT/IR οργάνου

Η ακτινοβολία όλων των συχνοτήτων από την πηγή IR ανακλάται στο συμβολόμετρο, όπου διαμορφώνεται από το κινούμενο κάτοπτρο. (Εικόνα 9) Η διαμορφωμένη ακτινοβολία ανακλάται στη συνέχεια από τα δυο κάτοπτρα που βρίσκονται στο δεξιό μέρος και οδηγούνται μέσα από το δείγμα του διαμερίσματος κυψελίδων στο κάτω

μέρος. Μετά τη διέλευση της μέσα από το δείγμα, η ακτινοβολία συναντά το μεταλλάκτη. Το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων, που συνδέεται με το μεταλλάκτη, καταγράφει το αναλυτικό σήμα και το αποθηκεύει στη μνήμη ενός υπολογιστή στη μορφή ενός συμβολογράμματος. (68)

4.3 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4.3.1 Γενικά

Η διεργασία της κρυστάλλωσης βασίζεται στη μεταβολή της διαλυτότητας μίας ουσίας, όπως καθορίζεται από το διάγραμμα φάσεων της. Για να εμφανιστούν οι κρύσταλλοι σε ένα διάλυμα πρέπει είτε να κατέβει η θερμοκρασία του διαλύματος κάτω από το σημείο αλλαγής φάσης, είτε να εξατμιστεί μέρος του διαλύτη, ώστε το διάλυμα να καταστεί υπέρκορο. Η κρυστάλλωση γίνεται σε δύο στάδια: αρχικά σχηματίζονται μικροκρύσταλλοι-πυρήνες κρυστάλλων, η διαδικασία αυτή ονομάζεται πυρηνογένεση. Στο δεύτερο στάδιο αρχίζει η ανάπτυξη του κρυστάλλου καθώς επάλληλα στρώματα της ουσίας αποτίθενται πάνω στο αρχικό σωματίδιο. (74)

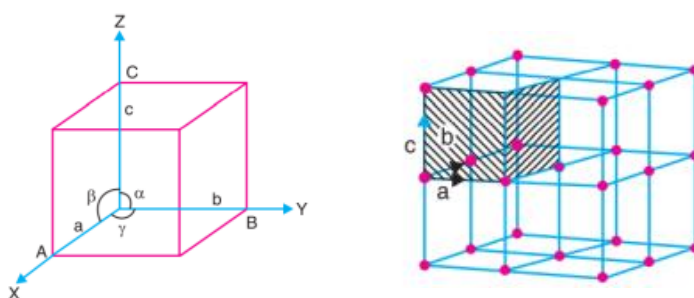
Ο στόχος στην ανάπτυξη κρυστάλλων για ένα πείραμα περίθλασης ακτίνων-Χ είναι να αναπτυχθούν μονοκρυστάλλοι κατάλληλου μεγέθους. Οι σχηματιζόμενοι μονοκρύσταλλοι πρέπει να έχουν διαστάσεις 0,2 - 0,4 mm σε τουλάχιστον δύο από τις τρεις διαστάσεις. Ένας εκ των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κρυστάλλων είναι ο διαλύτης, στον οποίο η ουσία θα πρέπει να είναι μέτρια διαλυτή. Για τη δημιουργία κατάλληλου μεγέθους μονοκρυστάλλων απαιτείται περιορισμένη πυρηνογένεση και αργή ανάπτυξη των κρυσταλλικών πυρήνων που μπορεί να πάρει αρκετές ημέρες.

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ χρησιμοποιείται ευρέως και τις περισσότερες φορές κατ' αποκλειστικότητα για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής. Βασική αρχή της κρυσταλλογραφίας είναι ότι τα κρυσταλλικά άτομα προκαλούν την περίθλαση των ακτίνων-Χ σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Μετρώντας τις γωνίες και τις αποστάσεις αυτών των περιθλάσεων, μπορεί να προσδιοριστεί η τρισδιάστατη εικόνα της πυκνότητας των ηλεκτρονίων μέσα στον κρύσταλλο. Από αυτήν την

ηλεκτρονιακή πυκνότητα, μπορεί να προσδιοριστεί η μέση θέση των ατόμων στο κρύσταλλο, η θερμική και στατιστική αποδιάταξη τους και κατ' επέκταση οι χημικοί δεσμοί, γεωμετρικά χαρακτηριστικά της δομής και άλλες πληροφορίες. Η μέθοδος αυτή αποκάλυψε τη δομή και τη λειτουργία πολλών βιολογικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων βιταμινών, φαρμάκων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, όπως το DNA. (75)

Ένας κρύσταλλος δομείται από κανονικά επαναλαμβανόμενα δομικά μοτίβα, τα οποία μπορεί να είναι άτομα, μόρια ή ομάδες ατόμων, μορίων, ιόντων. Ένα χωρικό πλέγμα είναι η διάταξη που σχηματίζεται από σημεία που αναπαριστούν τις θέσεις αυτών των μοτίβων. Το ευθύ πλέγμα είναι μια τρισδιάστατη περιοδική επανάληψη επιπέδων, με διάφορο προσανατολισμό, τα οποία τεμνόμενα μεταξύ τους σχηματίζουν διάφορα παραλληλεπίπεδα.

Η μοναδιαία κυψελίδα είναι ένα νοητό παραλληλεπίπεδο που περιέχει μια μονάδα της μεταφορικά επαναλαμβανόμενης δομής. Μοναδιαία κυψελίδα ορίζεται ως το παραλληλεπίπεδο που καθορίζεται από την κατάλληλη επιλογή των αξόνων a , b , c . Ενώ το παραλληλεπίπεδο που εγκλείεται στους θεμελιώδεις άξονες a , b , c καλείται θεμελιώδης κυψελίδα και περιέχει μόνο ένα πλεγματοειδές στοιχείο (Εικόνα 10). Σε κάθε πλεγματοειδές σημείο αντιστοιχεί μια ομάδα δομικών μονάδων που ονομάζεται βάση (πλέγμα + βάση = κρυσταλλική δομή).



Εικόνα 10: α) Μοναδιαία κυψελίδα β) Θεμελιώδης κυψελίδα

Με δομικό στοιχείο τη μοναδιαία κυψελίδα, η τρισδιάστατη διάταξη των ατόμων στο χώρο επαναλαμβάνεται σχηματίζοντας ένα δίκτυο, το κρυσταλλικό πλέγμα. Το μήκος των πλευρών της μοναδιαίας κυψελίδας a , b , c και οι γωνίες α , β , γ που περικλείονται από τις πλευρές τις κυψελίδας, αποτελούν παραμέτρους της κυψελίδας και

καθορίζουν το σχήμα και τις διαστάσεις της. Τα τρία διανύσματα a , b , c ορίζουν και το σύστημα αναφοράς O,xyz .

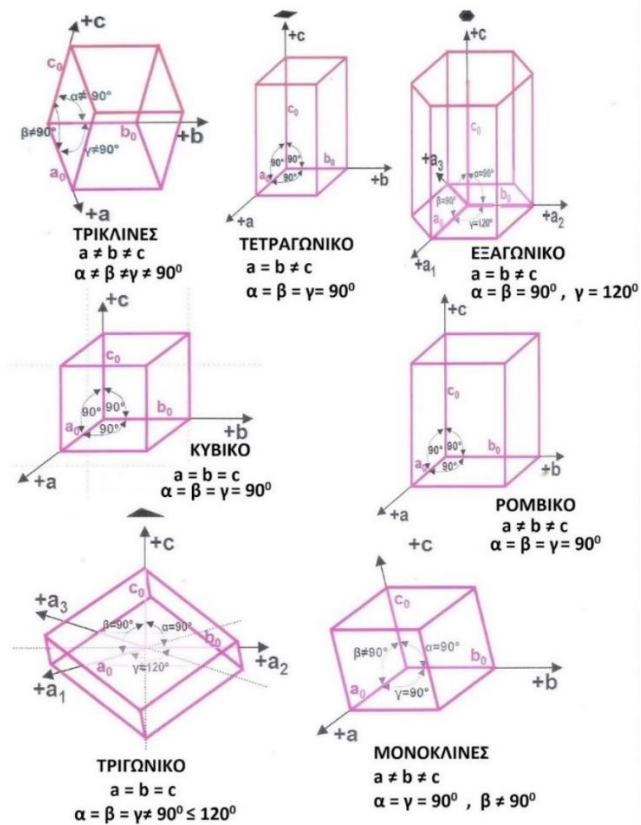
Η απόσταση μεταξύ των επιπέδων των πλεγματικών σημείων σε έναν κρύσταλλο αποτελεί σημαντική ποσοτική παράμετρο της δομής του. Τα κρυσταλλικά επίπεδα χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο δεικτών, τρεις ακέραιους αριθμούς, τους δείκτες Miller (h, k, l), που καθορίζουν πόσες φορές τα παράλληλα επίπεδα τέμνουν τους άξονες a , b , c της στοιχειώδους κυψελίδας. Ο συμβολισμός (hkl) αναφέρεται σε ένα μεμονωμένο επίπεδο. Για να καθορίσουμε ένα σμήνος παράλληλων επιπέδων χρησιμοποιούμε τον συμβολισμό $\{hkl\}$.

Οι μοναδιαίες κυψελίδες ταξινομούνται σε επτά κρυσταλλικά συστήματα σύμφωνα με τα στοιχεία περιστροφικής συμμετρίας τους. (Εικόνα 11) Επίσης υπάρχουν 14 διαφορετικά χωρικά πλέγματα στις τρεις διαστάσεις που αποτελούν τα πλέγματα Bravais. (Εικόνα 12)

4.3.2 Είδη πλεγμάτων

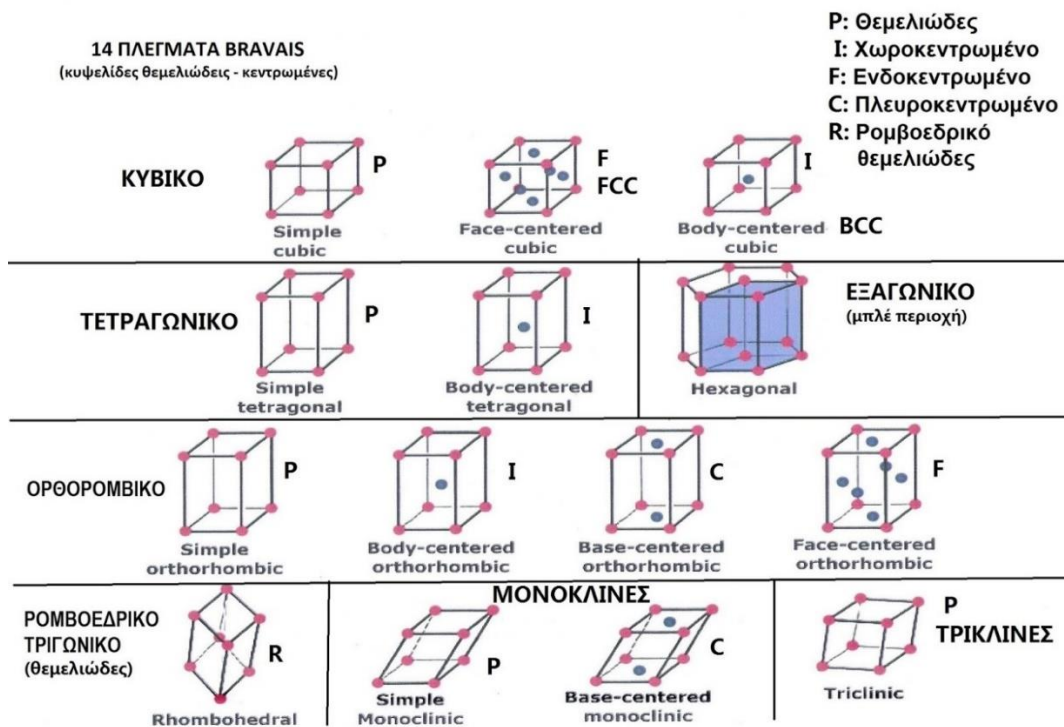
Στην κρυσταλλογραφία διακρίνονται επτά κρυσταλλογραφικά συστήματα (Εικόνα 11):

- Κυβικό όπου οι ακμές είναι ίσες και τέμνονται κάθετα δίνοντας σχήμα κύβου
- Εξαγωνικό, που οι τρεις ίσες ακμές σχηματίζουν γωνία 120° ενώ η τρίτη είναι άνιση ακμή και κάθετη στις δύο άλλες
- Τριγωνικό ή Ρομβοεδρικό κρυσταλλικό σύστημα όπου οι ακμές είναι ίσες αλλά οι γωνίες δεν είναι ορθές
- Τετραγωνικό (ή Ορθορομβικό) κρυσταλλικό σύστημα, όπου οι δύο ακμές είναι ίσες και όλες οι γωνίες ορθές
- Ρομβικό κρυσταλλικό σύστημα, οι ακμές είναι άνισες αλλά όλες οι γωνίες ορθές
- Μονοκλινές, που οι ακμές είναι άνισες σε δύο γωνίες ορθές
- Τρικλινές, οι ακμές άνισες και γωνίες όχι ορθές



Εικόνα 11: Τα 7 Κρυσταλλογραφικά συστήματα

Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα μπορούν να αποδώσουν 14 πλέγματα Bravais (Εικόνα 12). Τα πλέγματα Bravais αποτελούν βασική έννοια για την περιγραφή ενός κρυστάλλου, καθορίζουν την περιοδική διάταξη μέσα στην οποία είναι διατεταγμένες οι επαναλαμβανόμενες μονάδες ενός κρυστάλλου, που μπορεί να είναι μεμονωμένα άτομα, ομάδες ατόμων, μόρια ή ιόντα. Οι τύποι των στοιχειωδών πλεγμάτων δίνονται παρακάτω, το απλούστερο των στοιχειωδών πλεγμάτων είναι το θεμελιώδες (P).

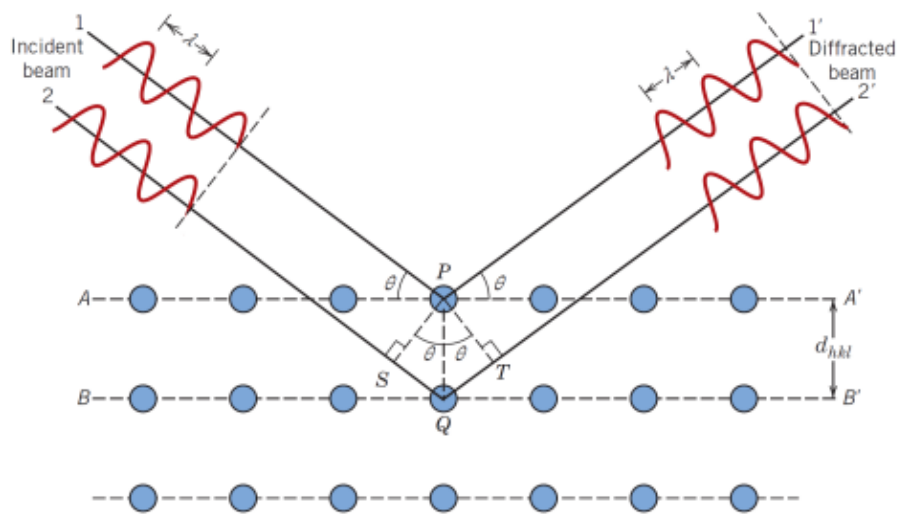


Εικόνα 12: Τα 14 πλέγματα Bravais

4.3.3 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης

Μια απλή ερμηνεία της περίθλασης των ακτίνων-Χ από κρύσταλλο που βοηθά ιδιαίτερα στην επεξεργασία των εικόνων περίθλασης δίνεται από τον νόμο Bragg. Σύμφωνα με αυτόν, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο κρύσταλλος αποτελείται από νοητά επίπεδα, πλησίον των οποίων βρίσκονται οι ατομικές θέσεις. Οι ακτίνες-Χ που προσπίπτουν σε μία οικογένεια τέτοιων επιπέδων με γωνία θ ως προς αυτά, καθώς ανακλώνται θα εμφανίσουν φαινόμενα συμβολής με μέγιστο έντασης όταν η διαφορά δρόμου των δύο συμβαλλόντων κυμάτων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος λ της ακτινοβολίας (Εικόνα 13).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{όπου } n: \text{ακέραιος αριθμός}$$

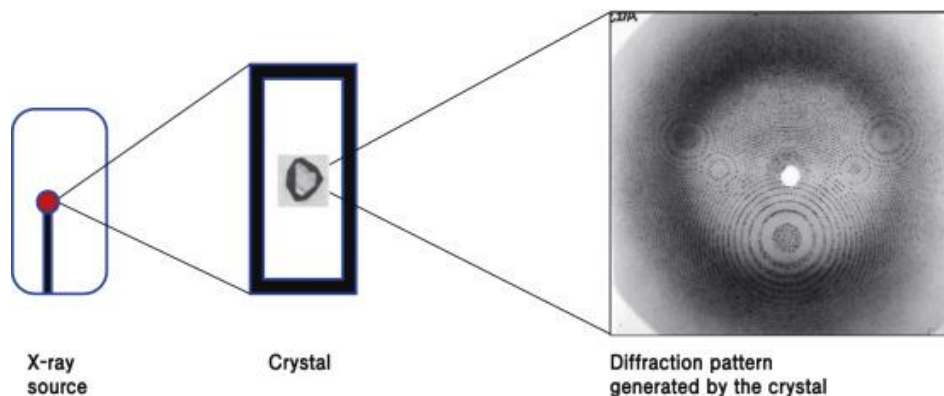


Εικόνα 13: Νόμος Bragg. Οι οριζόντιες γραμμές είναι τα παράλληλα επίπεδα που διατρέχουν τον κρύσταλλο. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία προσπίπτει στα επίπεδα και περιθλάται, d είναι η απόσταση μεταξύ των επιπέδων της οικογενείας, θ η γωνία πρόσπτωσης και λ μήκος κύματος της δέσμης.

Ο νόμος του Bragg χρησιμοποιείται πρωταρχικά για τον προσδιορισμό της απόστασης μεταξύ των επιπέδων του πλέγματος διότι, από τη στιγμή που έχει προσδιοριστεί η γωνία θ που αντιστοιχεί σε μία ανάκλαση, το d μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί.

Πειραματική διάταξη

Τρία βασικά μέρη της πειραματικής διάταξης είναι: η κεφαλή στήριξης όπου τοποθετείται ο μονοκρύσταλλος, η πηγή ακτίνων-Χ και ο ανιχνευτής της περιθλώμενης ακτινοβολίας. Ο μονοκρύσταλλος περιστρέφεται με βήμα $0,5 - 1^\circ$ και σε κάθε προσανατολισμό του ακτινοβολείται από τη δέσμη ακτίνων-Χ που παράγεται από την πηγή. Ένα μεγάλο μέρος της προσπίπτουσας στον κρύσταλλο ακτινοβολίας τον διαπερνά ενώ το υπόλοιπο περιθλάται προς διάφορες κατευθύνσεις που καταγράφονται από τον ανιχνευτή. (Εικόνα 14) (76)



Εικόνα 14: Αρχή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ

Οι θέσεις και οι εντάσεις των περιθλώμενων ακτίνων που αποτυπώνονται σε κάθε εικόνα περίθλασης (ονομάζονται ανακλάσεις ακολουθώντας την περιγραφή που ορίζει ο νόμος Bragg), αναγνωρίζονται και καταγράφονται από Η/Υ. Από αυτές αρχικά, προσδιορίζεται το κρυσταλλικό σύστημα και οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Στη συνέχεια, κατάλληλο λογισμικό εκτελεί την ρουτίνα για την δεικτοδότηση των ανακλάσεων (indexing). Στο τέλος της επεξεργασίας προκύπτουν δυο αρχεία: Το ένα (.ins file) περιέχει πληροφορίες για την μοναδιαία κυψελίδα και την κρυσταλλογραφική συμμετρία. Στο άλλο (.hkl file) δίνεται η θέση κάθε συλλεχθείσας ανάκλασης με τους δείκτες h, k, l , η ένταση της (F^2) και η τυπική απόκλιση αυτής της έντασης (σ). Με τη χρήση αυτών των αρχείων ο χρήστης μπορεί τις περισσότερες φορές να οδηγηθεί στην επίλυση της δομής με χρήση κατάλληλου υπολογιστικού προγράμματος (76) (77).

4.3.4 Βελτιστοποίηση δομής

Για την ολοκλήρωση του μοντέλου της κρυσταλλικής δομής, ακολουθεί η διαδικασία βελτιστοποίησης των ατομικών παραμέτρων (συντεταγμένες x, y, z , θερμοικοί παράγοντες (ισοτροπικοί ή ανισοτροπικοί), αριθμός κατάληψης), με μαθηματικές μεθόδους στατιστικής προσαρμογής (Ελάχιστα Τετράγωνα, Least Squares, L.S.), ώστε το τελικό μοντέλο να συμφωνεί όσο το δυνατό καλύτερα με τα πειραματικά δεδομένα. Σημαντικά κριτήρια αξιοπιστίας της προσδιορισμένης δομής αποτελούν οι παράγοντες R (R_{crist} ή R_1) και wR_2 που υπολογίζονται σύμφωνα με τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|} \quad wR_2 = \left[\frac{\sum (F_o^2 - F_c^2)^2}{\sum wF_o^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

όπου w το στατιστικό βάρος, $|F_o|$ οι πειραματικά μετρημένοι (observed) και $|F_c|$ οι υπολογιστικά προσδιορισμένοι από το μοντέλο (calculated) παράγοντες δομής. Αυτοί οι δείκτες αξιολογούν την ποιότητα της δομής και το βαθμό συμφωνίας της με τα πειραματικά δεδομένα. (78)

4.3.5 Αξιολόγηση και κατάθεση δομής

Ο τελικός έλεγχος της ορθότητας της κρυσταλλικής δομής γίνεται με την υποβολή του αρχείου κρυσταλλογραφικών πληροφοριών (CIF: Crystallographic Information File) στην ιστοσελίδα της Διεθνούς Ένωσης Κρυσταλλογραφίας (IUCr: International Union of Crystallography) για τον έλεγχο αυτών των αρχείων (<https://checkcif.iucr.org>). Εκεί ο έλεγχος πραγματοποιείται με το πρόγραμμα PLATON και ως αποτέλεσμα αυτού επιστρέφεται μια αναφορά (checkcif report) η οποία κατατίθεται ως παράρτημα στην παρούσα εργασία. (Παράρτημα 2) Στην αναφορά, πέραν των πληροφοριών του κρυσταλλογραφικού πειράματος, γίνεται αποτίμηση της ποιότητας του τελικού μοντέλου μέσω της ικανοποίησης κριτηρίων όπως:

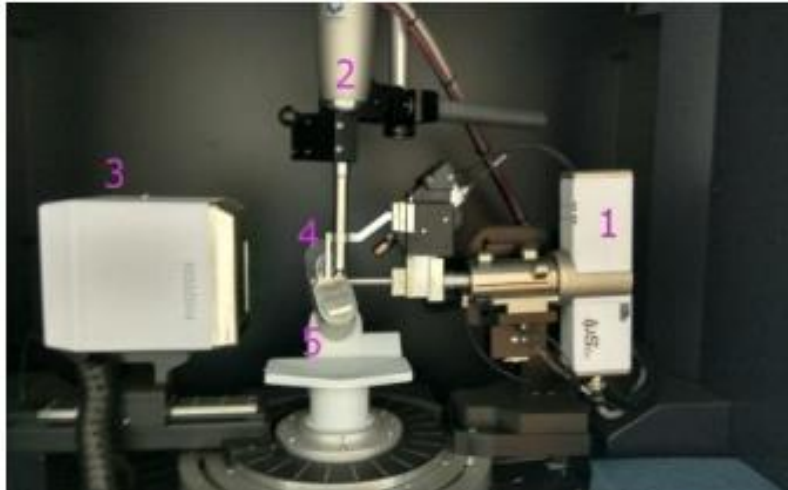
- Ο προσδιορισμός όλων των ατομικών θέσεων στην ασύμμετρη μονάδα, που πιστοποιείται όταν η μέγιστη υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα είναι μικρότερη του $0,1 \cdot Z_{MAX} \cdot 0,75$ (στην περίπτωση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου CBD/ β -CD, $Z_{MAX} = 8$ για το άτομο του οξυγόνου, οπότε θα πρέπει $\Delta\rho(\max) < 0,6 \text{ e}/\text{\AA}^3$).
- Η τιμή του δείκτη αξιοπιστίας R_1 να είναι μικρότερη του 0,1 ή 10%.
- Ο λόγος της μέγιστης μετατόπισης προς το μέγιστο σφάλμα είναι σημαντικά μικρότερος της μονάδας.

Αφού ελεγχθεί, το τελικό .cif αρχείο κατατίθεται στη βάση δεδομένων Cambridge Structural Database (CSD).

4.3.6 Οργανολογία

Τα βασικά τμήματα του περιθλασίμετρου ακτίνων-Χ περιλαμβάνουν:

- Πηγή ακτίνων Χ. Οι πηγές ακτίνων Χ αποτελούνται από γεννήτριες υψηλής τάσης, σωλήνα ακτίνων Χ που είναι μια δίοδος κενού. Η πηγή ακτίνων Χ αποτελείται από μεταλλικό στόχο, συνήθως είναι χαλκός, μολυβδαίνιο ή άργυρος, η φύση του οποίου καθορίζει και το παραγόμενο μήκος κύματος. Η δέσμη διέρχεται μέσω συστήματος κατάλληλων καθρεπτών που εστιάζουν τις παραγόμενες ακτίνες-Χ οι οποίες κατευθύνονται προς το δείγμα.
- Γωνιόμετρο, επιτρέπει την κίνηση του κρυστάλλου και του ανιχνευτή με εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια και σε πολύ μικρά βήματα. Ένας μονοκρυστάλλος περιστρέφεται γύρω από το γωνιόμετρο με τρεις διαφορετικές γωνίες εξασφαλίζοντας την συλλογή πολύ μεγάλου πλήθους ανακλάσεων, που απαιτούνται για την επίλυση της δομής δηλαδή μια συσκευή μέτρησης γωνίας 2θ . Επάνω στο γωνιόμετρο τοποθετείται το σύστημα των πηγών καθώς και ο ανιχνευτής. Οι πηγές είναι ακίνητες επάνω στο γωνιόμετρο, ενώ ο ανιχνευτής κινείται με την γωνία 2θ .
- Ανιχνευτή ακτίνων-Χ: αποτελεί συσκευή μέτρησης της θέσης και της έντασης των περιθλώμενων ακτίνων Χ.
- Σύστημα χαμηλών θερμοκρασιών. Σύστημα ψύξης των μονοκρυστάλλων με ατμούς υγρού αζώτου. Η συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ από μονοκρυστάλλους σε κρυογονικές συνθήκες (100 K) ψύξη περιορίζει την αποικοδόμηση των κρυστάλλων λόγω της ακτινοβολίας και τη θερμική κίνηση των ατόμων ώστε να προσδιοριστεί με τη βέλτιστη ευκρίνεια η κρυσταλλική δομή.
- Λογισμικό συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων για τον προσδιορισμό της δομής. Μετά τον προσδιορισμό του μεγέθους και της συμμετρίας της μοναδιαίας κυψελίδας, το πρόγραμμα μπορεί να οδηγήσει στην επίλυση της δομής από τη θέση και την ένταση των συλλεχθέντων ανακλάσεων. (77) (79) (80)



Εικόνα 15: Βασικά μέρη ενός περιθλασίμετρου D8 Venture της Bruker

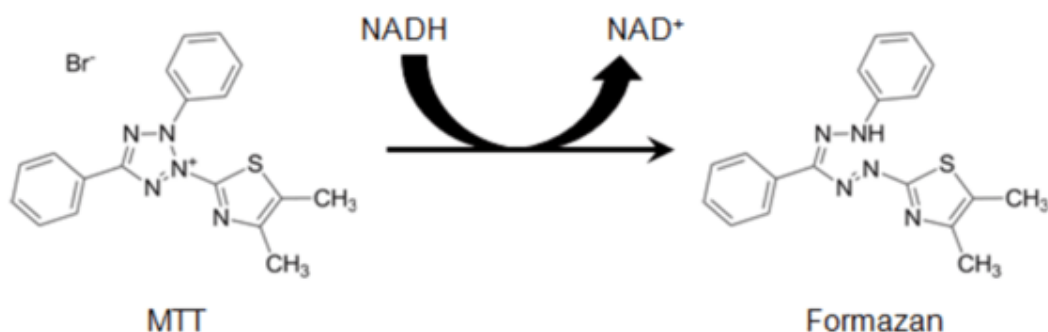
1. Πηγή ακτινοβολίας
2. Συσκευή παροχής ρεύματος ατμών από την εξάτμιση υγρού N_2 , κρατά χαμηλή τη θερμοκρασία του κρυστάλλου στους 100 ή 120 K
3. Ανιχνευτής CMOS (τύπου CCDC)
4. Ειδική παγίδα (beamstop) προκειμένου να μειωθεί η ένταση της ακτινοβολίας που δεν είχε σκεδαστεί από το δείγμα
5. Γωνιόμετρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ανίχνευση αντικαρκινικής δράσης και προσδιορισμός αντιοξειδωτικών και φαινολικών συστατικών

5.1 Μελέτες βιωσιμότητας σε κύτταρα: Μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) είναι μια χρωματομετρική ανάλυση για τη μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Βασίζεται στην ικανότητα των NADH και NADPH εξαρτώμενων κυτταρικών ενζύμων οξειδοαναγωγής για την αναγωγή της χρωστικής τετραζολίου MTT στην αδιάλυτη φορμαζάνη της, η οποία έχει μωβ χρώμα. (Σχήμα 8) Αυτή η ανάλυση επομένως μετρά τη βιωσιμότητα των κυττάρων όσον αφορά την αναγωγική δράση ως ενζυματική μετατροπή της ένωσης τετραζολίου σε αδιάλυτους στο νερό κρυστάλλους φορμαζάνης από αφυδρογονάσες που εμφανίζονται στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, αν και αναγωγικοί παράγοντες, και ένζυμα που βρίσκονται σε άλλα οργανίδια, όπως π.χ. το ενδοπλασματικό δίκτυο εμπλέκονται επίσης.

Η απορρόφηση αυτού του έγχρωμου διαλύματος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (συνήθως μεταξύ 500 και 600 nm) με ένα φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος MTT είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ανάλυση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων. (81)



Σχήμα 8: Αρχή μεθόδου MTT

Τα ζωντανά κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό μετατρέπουν το ΜΤΤ (μπλε) σε ένα μωβ προϊόν φορμαζάνης αναγάγωντας το NADH σε NAD⁺.

5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών και φαινολικών συστατικών

Η πολυπλοκότητα των συστημάτων των οποίων προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική δράση μας οδηγεί στο γεγονός ότι ο προσδιορισμός πρέπει να πραγματοποιείται με τουλάχιστον δυο μεθόδους. Το αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής δράσης εξαρτάται από τη μέθοδο προσδιορισμού, τη χημική δομή των αντιοξειδωτικών, τον τρόπο και τις συνθήκες εκχύλισης των αντιοξειδωτικών και τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών. Ανάλογα με το μηχανισμό των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα οι μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης χωρίζονται σε:

- Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer based assays, ET)
- Μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer based assays, HAT).

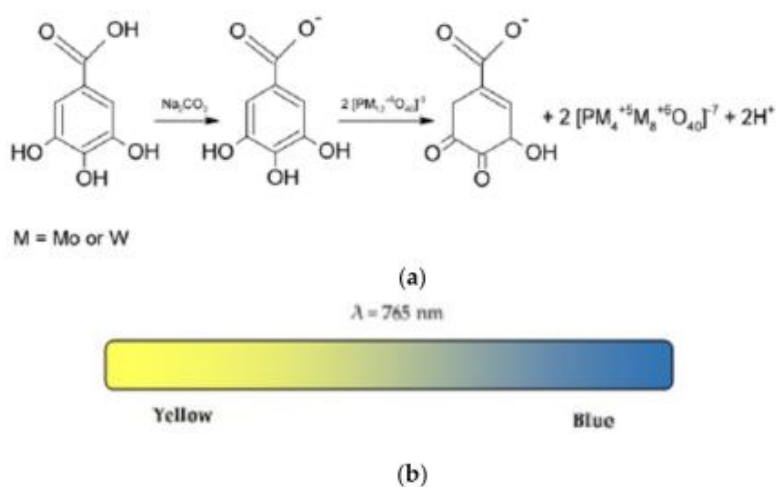
5.2.1 Δοκιμή Folin-Ciocalteu

Η αρχική μέθοδος Folin-Ciocalteu αναπτύχθηκε το 1927 αρχικά προτάθηκε ως μέθοδος για ανάλυση τυροσίνης (82), ενώ στη συνέχεια οι Singleton, Orthofer and Lamuela-Raventos τη χρησιμοποίησαν για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων στα κρασιά. Η δοκιμή Folin-Ciocalteu βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με φαινολικές ενώσεις σε αλκαλική κατάσταση. Η δοκιμή βασίζεται σε απλή μεταφορά ηλεκτρονίων (Single Electron Transfer, SET). Το γαλλικό οξύ είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιημένο πρότυπο διάλυμα, και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($H_3PMO_{12}O_{40}$) και φωσφοβολφραμικά

(H₃PW₁₂O₄₀) ετεροπολυμερή οξέα. Η δοκιμή αυτή χρησιμοποιεί το διάλυμα του Folin-Ciocalteu ως αντιδραστήριο. Μετά από επώαση αντιδραστηρίου, Na₂CO₃, H₂O και δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 2 ώρες, μετράται η απορρόφηση στα 765 nm. (83)

Στο σχήμα 9 φαίνονται οι αντιδράσεις μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των παραγώγων τους φωσφοβολφραμικό και φωσφομολυβδικά οξέα σε αλκαλικό περιβάλλον, ως αποτέλεσμα το διάλυμα χρωματίζεται μπλε, από τη δοκιμή Folin-Ciocalteu (a), διακύμανση χρώματος που παρατηρείτε στον προσδιορισμό (b).



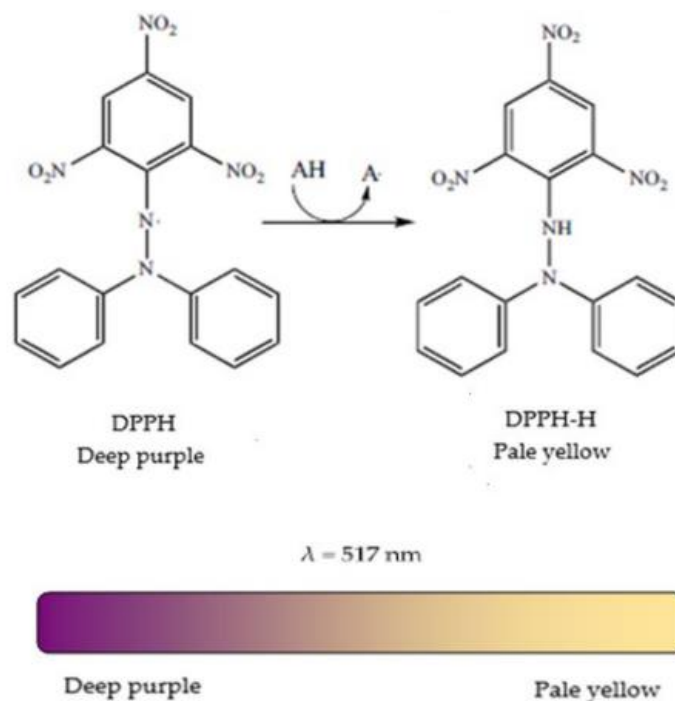
Σχήμα 9: Αρχή μεθόδου Folin-Ciocalteu

5.2.2 Δοκιμή DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Η δοκιμή δημιουργήθηκε το 1995 από τους Brand-Williams και τους συνεργάτες τους και χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων. (84) Η δοκιμή DPPH βασίζεται είτε στη μεταφορά ενός φαινολικού ατόμου H στο DPPH (HAT μηχανισμός) είτε στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Electron Transfer-ET) από τα αντιοξειδωτικά στη ρίζα DPPH*, η οποία ανάγεται, είναι μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου. Η αντίδραση συνοδεύεται από αλλαγή του χρώματος που μετριέται στα 520 nm και ο αποχρωματισμός λειτουργεί ως δείκτης αντιοξειδωτικής δράσης (Εικόνα 10). Συχνά, η αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο

DPPH αναφέρεται ως IC50, δηλαδή η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης DPPH κατά 50%. (83)

Η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1mL, όπου περιέχονται ο διαλύτης (μεθανόλη), η ρίζα DPPH* και το δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ακολουθεί ανακίνηση και επώαση για 20 λεπτά σε σκοτάδι, η οπτική απορρόφηση μετριέται στα 520 nm.



Σχήμα 10: Μηχανισμός αντίδρασης DPPH από ένα αντιοξειδωτικό (AH)

5.2.3 Δοκιμή ABTS (2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid)

Η δοκιμή ABTS αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Miller και την ομάδα του (1993) ως μία απλή και γρήγορη τεχνική για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. (85) Η δοκιμή βασίζεται σε αντίδραση μεταξύ του 2,2'-αζινοδις(3-αιθυλβενζθειαζολιν-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), σχηματίζεται η δραστική ρίζα $\text{ABTS}\bullet+$, ένα μπλε-πράσινο χρωμοφόρο, που απορροφά στα 730nm.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας, πρώτα πρέπει να σχηματιστεί η ρίζα και στη συνέχεια προστίθεται ουσία με πιθανή αντιοξειδωτική

ΜΕΡΟΣ Β': ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε προσφέρθηκε από την εταιρεία Hemp oil (Αθήνα, Ελλάδα) και είχε τα εξής χαρακτηριστικά:

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά φυτικού υλικού

Όνομα	Enectaliana	
Βοτανική ταξινόμηση	<i>Cannabis sativa</i> L.	
Εγγραφή	European Common Catalogue of Varieties of agricultural plant species	
Κωδικός	HNP187	
Κύκλος καλλιέργειας (crop cycle)	180-200 μέρες	
Φάση άνθησης (flowering phase)	50-70 μέρες	
Βοτανικά χαρακτηριστικά	Yield (gr/m ²) Ένταση πράσινου Ύψος Ποσοστό θυληκών φυτών Ποσοστό αρσενικών φυτών	425-500 μέτριο 2-2,5 μέτρα υψηλό χαμηλό
Χημειότυπος & Μεταβολίτες	THC (%) CBD (%) CBG (%) CBN (%) Τερπένια	<0.2% 5-8% <0.02% <0.02% /

Πριν ξεκινήσει η ανάλυση τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αποκαρβοξυλίωση, για τη μετατροπή των οξέων κανναβινοειδών σε ουδέτερες μορφές, η αποκαρβοξυλίωση έγινε στο φούρνο στους 120°C για 1 h. Έπειτα το δείγμα αλέθεται σε μύλο και κοσκινίζεται σε κόσκινο διαμέτρου 500 μm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Μελέτη εκχύλισματος *Cannabis sativa* L.

Διάφορες μέθοδοι εκχύλισης είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία για την εκχύλιση της CBD. Συμβατικοί οργανικοί διαλύτες όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο, μεθανόλη και οξικός αιθυλεστέρας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα. (86) Ωστόσο, λόγω της χρονοβόρας διαδικασίας και των σημαντικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων πολλών από αυτών, δεν εφαρμόζονται συνήθως σε μεγάλη κλίμακα. Εναλλακτικές μέθοδοι όπως η εκχύλιση υποβοηθούμενη με μικροκύματα και η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού CO₂ έχουν εφαρμοστεί επίσης, παρ' όλα αυτά είναι μέθοδοι που απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό και δεν συμφέρουν οικονομικά. (87) (88) Για όλα τα παραπάνω, η ανάπτυξη νέων μεθόδων εκχύλισης, αποδοτικών, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον για την εκχύλιση της CBD, και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, είναι υψίστους σημασίας.

Το εκχύλισμα από *Cannabis sativa* L. λήφθηκε με δυο διαφορετικές μεθόδους, η πρώτη μέθοδος αποτελούσε τη συμβατική εκχύλιση Soxhlet. Η μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε βασίστηκε στους Karçili *et. al*, στόχος αυτής της μελέτης ήταν η εύρεση της περιεκτικότητας κανναβινοειδών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Soxhlet. (89)

Η δεύτερη μέθοδος εκχύλισης ήταν η εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών, η μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε βασίστηκε στους Li *et al*. (2022), οι οποίοι στη μελέτη τους πραγματοποίησαν εκχύλιση από *Cannabis sativa* L. με CDs πραγματοποιώντας μια μέθοδο φιλική προς το περιβάλλον, συνέκριναν διάφορες παραμέτρους όπως ο χρόνος, η θερμοκρασία, το κλάσμα μάζας CD/φυτικό υλικό (mass ratio CD to hemp leaves), την αναλογία διαλύτη και φυτικού υλικού (30mL/g) και τέλος τη συγκέντρωση του διαλύτη (EtOH), σκοπός τους ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για υψηλές αποδόσεις CBD. Τα αποτελέσματά τους ελέγχθηκαν ως προς τη διαπερατότητα (permeability), βιοδραστικότητα (bioactivity) και σταθερότητα (stability) τόσο του εκχυλίσματος όσο και των συμπλόκων με CDs. (90)

6.1 Εκχύλιση Soxhlet

Υλικά – Εξοπλισμός

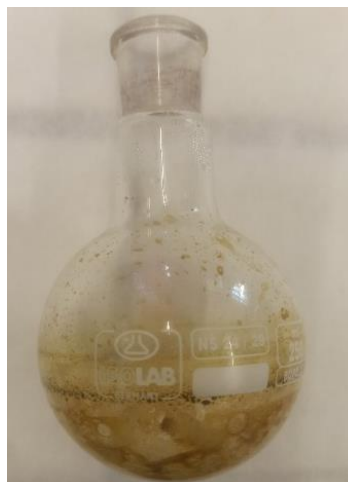
- Φυτικό υλικό (μέσης κοκκομετρίας 500 μ m)
- Εξάνιο
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Συσκευή Soxhlet
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- Αντλία κενού

Πειραματική πορεία

- Ζύγιση φυτικού υλικού μάζας $m=10,55\text{g}$
- Συναρμολόγηση συσκευής Soxhlet
- Στη φιάλη των 5000 mL, προστίθεται 400 mL εξάνιο και 3 κομμάτια πορσελάνης για την αποφυγή σχηματισμού ατμού
- Ο σωλήνας εισόδου τοποθετείται στην είσοδο της βρύσης και ανοίγεται η παροχή του νερού, ενώ ο σωλήνας εξόδου σε δοχείο αποβλήτων ή στο νεροχύτη
- Ακολουθεί θέρμανση έως ότου σχηματιστεί αφρός, τότε η θέρμανση διακόπτεται και η θερμοκρασία μειώνεται
- Το πάνω μέρος του ψυκτήρα καλύπτεται με βαμβάκι για έλεγχο διαρροής
- Η εκχύλιση διαρκεί για 4h
- Συλλέγεται το φυτικό υλικό και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία λαμβάνεται το 2^ο κλάσμα με οξικό αιθυλεστέρα
- Αφαίρεση διαλύτη με χρήση περιστροφικού αναδευτήρα



(α)



(β)

Εικόνα 16: (α) Συσκευή Soxhlet (β) Το εκχύλισμα που λήφθηκε από την εκχύλιση Soxhlet

6.1.1 Συμπύκνωση εκχυλίσματος *Cannabis sativa* L.

Το εκχύλισμα του δείγματος συμπυκνώθηκε επί ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Heidolph Laborata 4000 efficient) το δείγμα που συλλέχθηκε φαίνεται στην Εικόνα 17 (β).



(α)



(β)

Εικόνα 17: (α) Περιστροφικός εξατμιστήρας (β) Το δείγμα που λήφθηκε μετά τη συμπύκνωση

6.2 Εκχύλιση με υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης

Αντιδραστήρια-Εξοπλισμός

- Κυκλοδεξτρίνη RM-β-CD
- Φυτικό υλικό (μέση κοκκομετρία 500μm)
- Απιονισμένο νερό
- Parafilm
- Αιθανόλη (absolute for analysis)
- Ποτήρια ζέσεως
- Περιστροφικός αναδευτήρας (stirrer)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (rotary evaporator)
- Φυγόκεντρος
- Πιπέτα Pasteur
- Γυάλινα φιαλίδια

Πειραματική πορεία

1. Διαλύτης 60 %v/v EtOH:H₂O

Πιο συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 1,8g RM-β-CD και 1g φυτικό υλικό, η εκχύλιση έγινε με διάλυμα 30 mL 60% (v/v) EtOH:H₂O. Το μείγμα αναδεύτηκε για 1h στους 40°C σε περιστρεφόμενο μαγνητικό αναδευτήρα, έπειτα το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min στους 3000 rpm και το υπερκείμενο συλλέχθηκε με πιπέτα pasteur σε φιάλη viable και αποθηκεύτηκε στους 4 °C για περαιτέρω ανάλυση.

2. Διαλύτης H₂O

- Ζυγίζονται 1,8 g RM-β-CD και 1 g φυτικού υλικού, η εκχύλιση έγινε με 30 mL απιονισμένο H₂O, ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία.
- Ζυγίζονται 5 g HP-β-CD και 0,32 g φυτικού υλικού, προστίθεται 30 mL απιονισμένο H₂O

Τα τρία εκχυλίσματα λυοφιλοποιήθηκαν και έπειτα ζυγίστηκαν.

6.3 Ταυτοποίηση και ποσοτική ανάλυση εκχυλίσματος με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Πειραματικές συνθήκες

Τα δείγματα αναλύθηκαν με το σύστημα 1100 Agilent HPLC εφοδιαμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους UV-Vis (Diode Array Detector-DAD). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος περιείχε το λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. (Εικόνα 18)

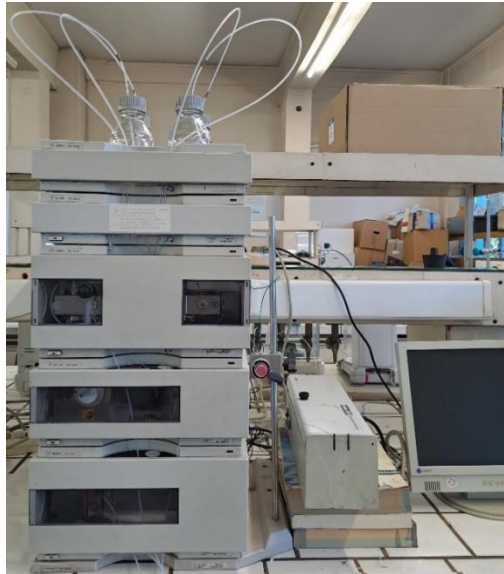
Όλα τα δείγματα πριν την ανάλυσή τους, διηθήθηκαν με φίλτρο πορώδους 0,20 μm και διάμετρο 15 mm (chromafil Xtra PET-20/15). Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανεστραμμένης φάσης (RF-HPLC). Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε δημιουργήθηκε στο εργαστήριο (CANNABIS M.). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών, A: H₂O και 0,1% μυρμηκικό οξύ και B: ακετονιτρίλιο και 0,1% μυρμηκικό οξύ.

Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος σε σταθερή ροή 0,940 mL/min. Η πίεση ήταν 110 bar και η θερμοκρασία στους 30°C. Η στήλη ήταν Macherey-Nagel, Nucleoshell Bluebird RP18, μήκους 100 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm με μήκος πόρων 2,7 μm.

Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλυσης κινητής φάσης (gradient elution). Η εισαγωγή του δείγματος στο όργανο έγινε με σύριγγα και ο όγκος εισαγωγής ήταν 20 μL. Η κάθε ένεση είχε διάρκεια 23 min. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 210nm και επισυνάπτονται στο Παράρτημα 1. Το πρόγραμμα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 2: Πρόγραμμα έκλυσης HPLC

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
0	40	60
8,7	40	60
11,30	20	80
14,70	10	90
23,00	10	90
25,00	40	60



Εικόνα 18: Όργανο HPLC

Ταυτοποίηση και ποσοτική ανάλυση εκχυλίσματων

Αρχικά έγινε η εισαγωγή του πρότυπου δείγματος CBD (100 µg/mL με σκοπό τον προσδιορισμό του χρόνου έκλουσης (tR). Ο χρόνος έκλουσης ήταν 7,018 min. Στη συνέχεια ακολούθησε η εισαγωγή των δειγμάτων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός CBD έγινε με χρήση παράγοντα απόκρισης (Response Factor, RF).

Παράγοντας απόκρισης, συνήθως στη χρωματογραφία και τη φασματοσκοπία, είναι η αναλογία μεταξύ ενός σήματος που παράγεται από μια αναλυόμενη ουσία και της ποσότητας της αναλυόμενης ουσίας που παράγει το σήμα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε % w/w.

$$\text{παράγοντας απόκρισης} = \frac{\text{σήμα αναλυόμενης ουσίας}}{\text{ποσότητα αναλυόμενης ουσίας}}$$

(response factor=peak area/sample amount)

Αποτελέσματα

Στην περίπτωση του εκχυλίσματος Soxhlet για c= 160 µg/mL αντιστοιχούν area=19135,6 επομένως με χρήση του RF= peak area/ sample amount=> RF=119,6.

Το εκχ. Soxhlet συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα όπου ζυγίστηκε 0,7446 g ή 744,6 mg συμπυκνωμένου εκχυλίσματος (λαδιού) και διαλύθηκε σε 55 mL μεθανόλη για την ανάλυση HPLC. Προκύπτει 0,7 %w/w CBD στο εκχύλισμα Soxhlet.

Στην περίπτωση των εκχυλισμάτων σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών υπολογίστηκε:

- m EtOH:H₂O με RM-β-CD = 1,3284 g
- m H₂O με RM-β-CD = 1,4695 g
- m H₂O με HP-β-CD = 3,3815 g

Προστέθηκαν 10 mL μεθανόλης και στα τρία δείγματα για την ανάλυση HPLC.

Πίνακας 3: Πίνακας αποτελεσμάτων εκχύλισης σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών

Δείγμα	Area	Αποτέλεσμα
Εκχ. RM-β-CD διαλύτης EtOH:H ₂ O	38794,3	3,2 %w/w ελεύθερη CBD σε 1 g φ. υ.
Εκχ. RM-β-CD διαλύτης H ₂ O	37241,6	3,1 %w/w ελεύθερη CBD σε 1 g φ. υ.
Εκχ. HP-β-CD/CD διαλύτης H ₂ O	30954	2,6 %w/w ελεύθερη CBD σε 0,32 g φ. υ.

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στην περίπτωση του εκχυλίσματος που λήφθηκε από την εκχύλιση Soxhlet, παρατηρείται ότι η ανάλυση HPLC έδειξε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό CBD 0,7 %w/w από το αναμενόμενο. Η αποτελεσματικότητα των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον διαλύτη. Η διαλυτότητα, η μοριακή συγγένεια, η μεταφορά μάζας, ο συνδιαλύτης, η τοξικότητα και η περιβαλλοντική ασφάλεια είναι σημαντικοί παράγοντες που πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη κατά τη διαδικασία επιλογής διαλύτη. (91) Σύμφωνα με μια μελέτη του Lewis-Bakker *et al.* συνέκρινε διάφορους οργανικούς διαλύτες και συμπέρανε ότι η αιθανόλη έδειξε τα βέλτιστα αποτελέσματα για την εκχύλιση κανναβινοειδών. (92)

Δεδομένου ότι τα κανναβινοειδή είναι πολύ λιπόφιλα μόρια με πολύ περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό (λιγότερο από 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), πρέπει να εκχυλιστούν με διαλύτες χαμηλότερης πολικότητας. Για παράδειγμα, η CBD, είναι ένα υψηλά μη πολικό μόριο, έχει διαλυτότητα $>30 \text{ mg}/\text{mL}$ σε αιθανόλη και $>100 \text{ mg}/\text{mL}$ σε εξάνιο. Η εκχύλιση τους συνήθως πραγματοποιείται σε διαδοχικά στάδια με χρήση οργανικών διαλυτών με διαφορετικές πολικότητες. (28)

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε εξάνιο λαμβάνοντας το κλάσμα μη πολικότητας και για το 2^ο κλάσμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, λαμβάνοντας το κλάσμα μέσης πολικότητας. Τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1. Στη περίπτωση του εκχυλίσματος που λήφθηκε με την εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών, παρατηρείται ότι η RM- β -CD δεν έδειξε σπουδαίες διαφορές όσον αφορά τον διαλύτη με 3,2 %w/w (διαλ. EtOH:H₂O) και 3,1 %w/w (διαλ. H₂O), ενώ η HP- β -CD έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με 2,6 %w/w.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Μελέτη αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa* L.

7.1 Παραλαβή με Υδροαπόσταξη

Όργανα και αντιδραστήρια:

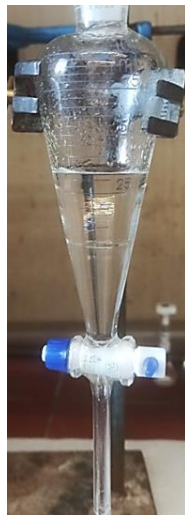
- Συσκευή απόσταξης Clevenger
- Διαχωριστική χοάνη
- Πιπέτα Pasteur
- Φίλτρα AGILENT PTFE 0,45μm, 25mm
- Γυάλινο φιαλίδιο (viable)
- Διαιθυλαιθέρας της εταιρίας VMR καθαρότητας 99,9%
- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο $MgSO_4$
- Αέριο άζωτο
- Απιονισμένο νερό
- Κομμάτια πορσελάνης

Πειραματική πορεία

Ζυγίστηκαν 100 g φυτικού υλικού και αποστάχθηκαν σε συσκευή Clevenger με σφαιρική φιάλη των 5 L. Προστέθηκαν 1200 mL απιονισμένου νερού και κομμάτια πορσελάνης για αποφυγή αφρισμού. Ακολούθησε θέρμανση με χρήση θερμομανδύα. Η απόσταξη διήρκησε 3 ώρες. Η ποσότητα αιθερίου ελαίου που συγκεντρώθηκε ως υπερκείμενη φάση του νερού ήταν 0,01mL/100g φυτικού υλικού.

Έπειτα παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο με εκχύλιση υγρού-υγρού προσθέτοντας ποσότητα διαιθυλαιθέρα όση και του υδρολύματος (20 mL). Ακολούθησε ανακίνηση-εκτόνωση με άνοιγμα της στρόφιγγας 3 φορές. Οι φάσεις διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητα και τη διαφορετική πολικότητά τους. Στο κάτω μέρος βρίσκεται η υδατική φάση και πάνω η οργανική φάση, δηλαδή ο διαιθυλαιθέρας που παρέλαβε τα πτητικά συστατικά. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και η υδατική απορρίφθηκε. Ακολούθησε συμπύκνωση της οργανικής φάσης με αέριο άζωτο έως 10 mL περίπου και προσθήκη άνυδρου μαγνησίου ($MgSO_4$) για απομάκρυνση υγρασίας. Με μια

πιπέτα Pasteur συλλέχθηκε το υπερκείμενο και τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο (vial) αφού είχε προηγηθεί διήθηση με φίλτρο AGILENT PTFE 0,45 μm . Ακολούθησε συμπύκνωση με αέριο άζωτο έως 5mL περίπου. Αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την περαιτέρω ανάλυση.



άνω φάση (οργανική)

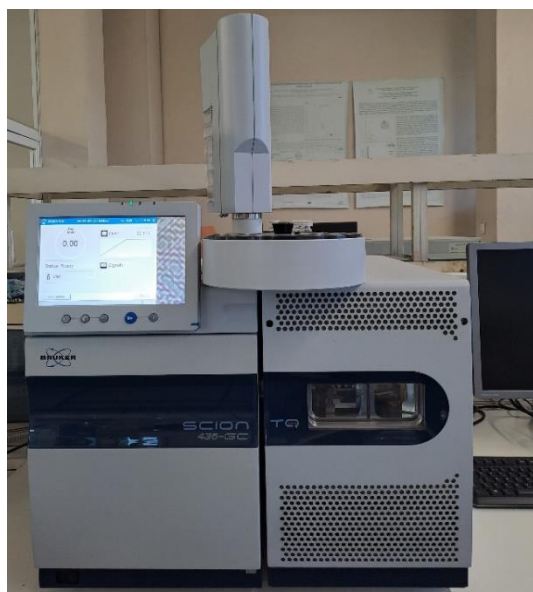
κάτω φάση (υδατική)

Εικόνα 19: Διαχωριστική χοάνη

7.2 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αιθέριου ελαίου με αέρια χρωματογραφία-χρωματογραφία μαζών (GC/MS)

Όργανα και αντιδραστήρια

- Αέριος χρωματογράφος της εταιρείας Bruker, σύστημα SCION με αυτόματο δειγματολήπτη CP-8400
- Τριχοειδής αναλυτική στήλη μη πολικής φάσης OPTIMA 5MS 30m x 0,25mm ID, πάχος υμενίου 0,25 μm
- Διαλύτης: Διαιθυλαιθέρας (GC grade)
- Εσωτερικό πρότυπο: Κυκλοεξανόνη >99,0%



Εικόνα 20: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC/MS)

Πειραματικές συνθήκες

Για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (GC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (MS). Ως φέρον αέριο (κινητή φάση) χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με ροή 1 mL/min. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών στον φούρνο ορίστηκε ως εξής: 60-70°C, ανά 3 °C/min, 70-105 °C ανά 1°C/min και 105-300°C ανά 6°C/min και η τεχνική εισαγωγής του δείγματος ήταν splitless. Με όγκο ένεσης 1 µL η θερμοκρασία του εισαγωγέα κατά την έγχυση του δείγματος ήταν 220°C. Πραγματοποιήθηκε αραίωση αιθέριου ελαίου: διαλύτη, 1:100 (10 µL οργανική φάση, 10 µL πρότυπο διάλυμα κυκλοεξανόνης 2 mg/mL, 980 µL διαιθυλεθέρα).

Οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με σύγκριση του πειραματικού AI (Arithmetic Index) και του φάσματος μαζών με τα αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας (βιβλιοθήκη ADAMS και NIST). Ενώ, οι συγκεντρώσεις των συστατικών υπολογίστηκαν με κανονικοποίηση των κορυφών (χρήση σχετικής επιφάνειας κορυφών) χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα του συστήματος GC/MS. Οι κορυφές του εσωτερικού προτύπου και του διαλύτη αφαιρέθηκαν για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Το αιθέριο έλαιο κάνναβης είναι ένα σύνθετο μείγμα πτητικών ενώσεων που αποτελείται από περισσότερα από 100 τερπένια και τερπενοειδή (τα τερπένια που περιέχουν οξυγόνο) και συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των διαφόρων ποικιλιών κάνναβης, τα μονοτερπένια (10 C) και τα σεσκιτερπένια (15 C) αποτελούν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο κάνναβης, τόσο σε υδρογονανθρακική όσο και σε οξυγονωμένη μορφή, ακολουθούμενα από τα διτερπένια (20 C). (21) (93)

Διάφοροι παράγοντες, όπως ο γονότυπος, η ανθοφορία (διοικία ή μονόοικα), η τεχνική καλλιέργειας, το στάδιο ανάπτυξης κατά τη συγκομιδή μπορούν να επηρεάσουν τη τελική σύνθεση του αιθερίου ελαίου κάνναβης και την απόδοση εκχύλισης του. Τα μονοτερπένια υπάρχουν σε αφθονία στο φρέσκο φυτικό υλικό, ενώ η ξήρανση και αποθήκευση μπορούν να οδηγήσουν στην απώλεια και μετατροπή μέρους αυτών σε σεσκιτερπένια. Σημαντικό παράγοντα αποτελούν οι περιβαλλοντικές και καιρικές συνθήκες τόσο για τη σύνθεση του αιθερίου ελαίου όσο και στην απόδοση. (94) (95)

Η χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Ειδικότερα, ταυτοποιήθηκαν 75 ενώσεις, που αντιστοιχούν στο 98,92% του αεριοχρωματογραφικού (GC) προφίλ. Οι περισσότερες ενώσεις είναι σεσκιτερπένια σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με εξαίρεση το β-καρυοφυλλένιο και αποτελούσε το 12,67%, το Σελίνα 3, 7 (11) διένιο με 6,48% και το α-χουμουλένιο με 4,11%. Από τα μονοτερπένια, το β-μυρκένιο με 14,76%, το α-πινένιο με 14,64% και β-πινένιο με 5,50% υπήρχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό. Ενώ από τα κανναβινοειδή ανιχνεύτηκε η κανναβιδιόλη (CBD) σε μικρό ποσοστό (0,43%). Η ποσότητα των ενώσεων παραγώγων σελινενίου (α-σελινένιο με 1,01%, β-σελινένιο με 0,9%, γ-σελινένιο 4,37%, σελίνα-3,7(11)-διένιο με 6,48%) είναι σημαντική καθώς αποτελεί τυπική ένωση σε αιθέρια έλαια κάνναβης.

Τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με αυτά άλλων μελετών, πιο συγκεκριμένα οι Nissen *et al.* συνέκριναν τη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου σε τρεις ποικιλίες κάνναβης (*Cannabis sativa* L.). Για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου οι ταξιανθίες

υποβλήθηκαν σε υδροαπόσταξη σε συσκευή Clevenger για 3 ώρες. Ανιχνεύτηκαν 55 ενώσεις που αντιστοιχούσαν στο 95% των συστατικών του αιθέριου ελαίου. Βρήκαν ότι οι περισσότερες ενώσεις (28) ήταν σεσκιτερπένια και υπήρχαν σε μικρό ποσοστό με εξαίρεση το β-καρυοφυλλένιο (13%) και α-χουμουλένιο (5%). Μεταξύ των μονοτερπενίων το μυρκένιο (12,5-29,2%) και α-πινένιο (11-17%) και β-πινένιο (6,4-9%) υπήρχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό. Γενικά σε όλες τις ποικιλίες υπήρχε η ίδια σύνθεση αλλά με μικρές ποσοτικές διαφορές. (96)

Ομοίως, οι Pierraci *et al.* συνέκριναν το αιθέριο έλαιο που λήφθηκε με υδροαπόσταξη σε συσκευή Clevenger για 2h και αναλύθηκε με GC/MS ανάλυση σε έντεκα γονότυπους κάνναβης, που καλλιεργήθηκαν στην ίδια τοποθεσία για δύο διαδοχικές καλλιεργητικές περιόδους.

Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 116 ενώσεις, αντιπροσωπεύαν το 90,6–99,4% της συνολικής σύνθεσης. Όλα τα ΕΟ, με εξαίρεση το Felina 32-2019, χαρακτηρίστηκαν από επικράτηση σεσκιτερπενίων, τόσο στην υδρογονανθρακική όσο και στην οξυγονωμένη μορφή τους. Οι κύριες πτητικές ενώσεις ήταν το β-καρυοφυλλένιο και το α-χουμουλένιο τα αποτελεσμά τους συμφώνησαν με τους Ascrizzi *et al.*, Vuerich *et al.* και Menghini *et al.* (97) (98) (99)

Συμπεράναν ότι όσον αφορά τα σεσκιτερπένια, η υδρογονανθρακική μορφή υπήρχε σε αφθονία στη σοδειά του 2020 και τα οξείδια τους στη σοδειά του 2019. Οι κύριες ενώσεις που ανήκουν σε αυτή τη χημική κατηγορία ήταν το β-καρυοφυλλένιο, το α-χουμουλένιο και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους το οξείδιο του καρυοφυλλενίου, το 14-υδροξυ-9-επι-(E)-καρυοφυλλένιο και οξείδιο χουμουλενίου II, όλα αποτελούν τυπικά συστατικά του αιθέριου ελαίου κάνναβης. Τα κανναβινοειδή που εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα ήταν η κανναβιδιόλη, κανναβιχρωμίνη, και Δ⁹-THC, αλλά μόνο η πρώτη υπήρχε σε σημαντικά ποσοστά. (100)

Συμπερασματικά, τα συστατικά που ανιχνευτήκαν στο αιθέριο έλαιο ήταν όμοια με αυτά της βιβλιογραφίας, ωστόσο υπήρχαν ποσοτικές διαφορές. Πιο αναλυτικά, στη μελέτη των Nissen *et al.* το Σελίνα-3,7 (11)-διένιο υπήρχε σε ίχνη 0,42%, 0,52% και 1,18% σε τρεις ποικιλίες που εξετάστηκαν, ενώ στη παρούσα μελέτη υπήρχε σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα (6,48%). Στη μελέτη τους το β-καρυοφυλλένιο και α-

χουμουλένιο που αποτελούσε το 13% και το 5% των συνολικών ενώσεων, αντίστοιχα. Το μυρσένιο, το α -πινένιο και το β -πινένιο ήταν οι κύριες ενώσεις μεταξύ των μονοτερπενίων. Τα αποτελέσματα αυτά συνέπιπταν με την παρούσα μελέτη.

Στη μελέτη των Pieracci *et al.* που συνέκριναν την απόδοση και τη χημική σύσταση σε έντεκα ποικιλίες *Cannabis sativa* L., τα οξείδια του καρυοφυλλενίου υπήρχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό (7,0- 22,7%) εν αντιθέσει με τη παρούσα μελέτη που υπήρχαν σε ίχνη (0,32%), ενώ δεν ανιχνεύτηκαν τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια 14-υδροξυ-9-επι-(E)-καρυοφυλλένιο (2,7-7,0%), και τα δύο ισομερή του 8(15)-διεν-5-όλη (0,7-3,0%), που ανιχνεύτηκαν στη μελέτη των παραπάνω. Κύρια σεσκιτερπένια ήταν το β -καρυοφυλλένιο (8,7 -16,8%) και το α -χουμουλένιο (4,1 -7,6%) τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούσαν με τη παρούσα μελέτη όπου β -καρυοφυλλένιο (12,67%) και α -χουμουλένιο (4,11%).

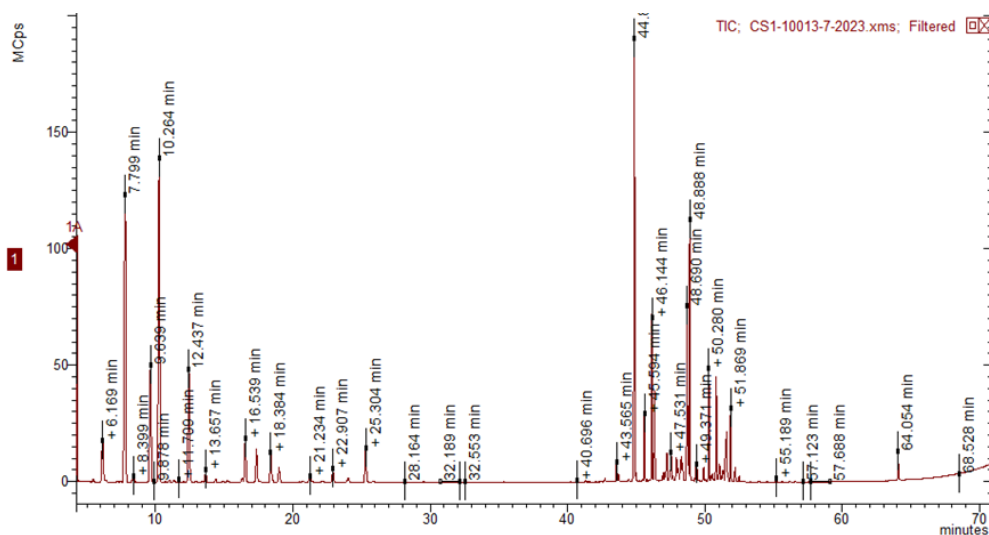
Όσον αφορά την απόδοση ήταν 0,01 mL/100g ξηρού φυτικού υλικού (0,01 %w/v), αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με άλλες μελέτες, οι Zengin *et al.* βρήκαν απόδοση από 0,19% έως 0,31%, ενώ οι Nissen *et al.* βρήκαν απόδοση 0,21 έως 0,31%.

Οι Abdollahia *et al.* μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης του φυτού στην απόδοση και τη σύνθεση του αιθερίου ελαίου τεσσάρων ποικιλιών *Cannabis sativa* L. Κατέληξαν ότι το στάδιο ανάπτυξης δεν έπαιζε σημαντικό ρόλο στην απόδοση ενώ η διαφορετικές ποικιλίες είχαν απόδοση από 0,65% έως 0,4%. (94)

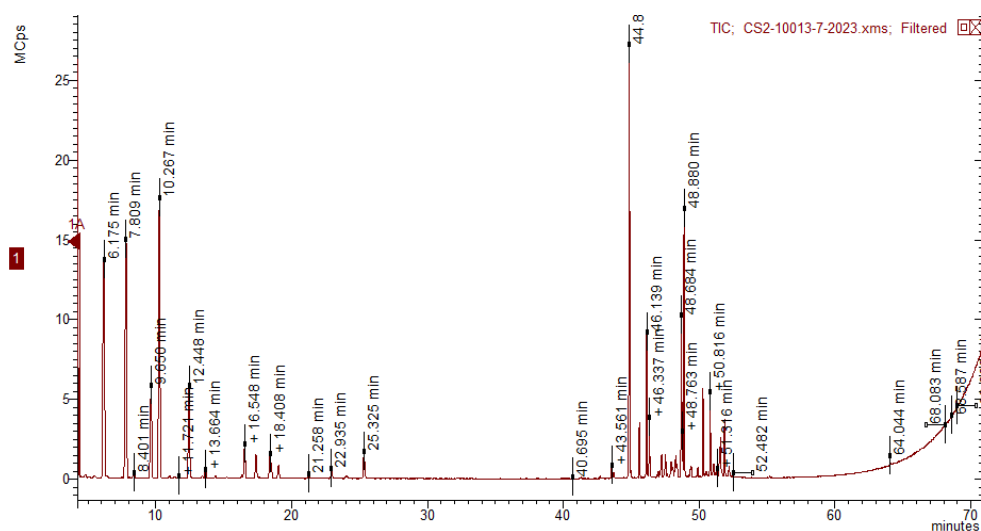
Πιστεύεται ότι η τεχνική παραλαβής του αιθερίου ελαίου παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση όπως συμπέραναν και στη μελέτη τους οι Naz *et al.* οι οποίοι παρέλαβαν το αιθέριο έλαιο από *Cannabis sativa* L. με υδροαπόσταξη, απόσταξη με υδρατμούς και εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά. Υψηλότερες αποδόσεις φαίνεται να απέδωσε η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά και έπειτα η υδροαπόσταξη. (101)

Οι διαφορές αυτές στα αποτελέσματα μας, τόσο στην απόδοση όσο και σε ποσοτικές διάφορες των δευτερογενών μεταβολιτών με αυτές άλλων μελετών, πιθανότατα να οφείλονται σε διαφορετικές κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες, στην περίοδο αποθήκευσης μετά τη συγκομιδή, το μέρος αποθήκευσης, η περίοδος συγκομιδής, σε διαφορετικές τεχνικές απόσταξης, στο γονότυπο, ανάλογα με το αν

πρόκειται για μονώκο ή δίωκο κλπ. που επηρεάζουν το ποσοστό των δευτερογενών μεταβολιτών εν τέλει, όπως επισημαίνουν και οι Vuerich, M *et al.*, Meier, C. *et al.*, Pieracci, Y. *et al.* (99), (95), (100)



Σχήμα 12: Αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa L.* (CS1 αραιώση 1 προς 100)



Σχήμα 13: Αέριο χρωματογράφημα του αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa L.* (CS2 αραιώση 1 προς 100)

Παρατηρούμε ότι στα χρωματογραφήματα CS1 και CS2 δεν υπάρχει απόλυτη επαναληψιμότητα αυτό πιθανώς οφείλεται σε διαφορές στη διαχείριση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ταυτόχρονα παρατηρούμε ότι πρώτα

εκλύονται τα τερπένια ως άπολες ενώσεις και τέλος η κανναβιδιόλη εμφανίζεται στα 64 min εξαιτίας της πολικότητας του μορίου της.

Πίνακας 4: Συστατικά δείγματος αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa* L.

Α/Α	Α.Ι.πειρ	Όνομασία προτεινόμενου Συστατικού		Εκατοστιαία περιεκτικότητα* (%)
		Ελληνικά	Αγγλικά	
1	855	εξυλ-εστέρας	Hexyl ester	0,07
2	895	επτανάλη	Heptanal	0,01± 0,02
3	916	5,5-Διμεθυλο-1-βινυλδικυκλο[2.1.1]εξάνιο	5,5-Dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane	0,02
4	923	α-Θουγιένιο	α-Thujene	0,02
5	930	α-Πινένιο	α-Pinene	14,64 ± 0,18
6	944	Καμφένιο	Camphene	0,32 ± 0,02
7	972	β-Πινένιο	β-Pinene	5,50 ± 0,13
8	987	β-Μυρκένιο	β-Myrcene	14,76 ± 0,51
9	1002	α-φελλανδρένιο	α-Phellandrene	0,05
10	1008	3-Καρένιο	δ- 3-Carene	0,04
11	1013	α-Τερπινένιο	α-Terpinene	0,13 ± 0
12	1018	π-κυμένιο	p-Cymene	0,01
13	1023	Λιμονένιο	Limonene	4,96 ± 0,01
14	1031	cis-β-οκιμένιο	cis-β-Ocimene	0,01
15	1041	trans-β-οκιμένιο	trans-β-Ocimene	0,48 ± 0,02
16	1052	γ-τερπινένιο	γ-Terpinene	0,14 ± 0,01
17	1059	cis-υδρο σαμπινενιο	cis-Sabinene hydrate	0,03
18	1063	1-οκτανόλη	1-Octanol	0,05
19	1080	Φενχόνη	Fenchone	0,17 ± 0,01
20	1083	τερπινολένιο	Terpinolene	1,83 ± 0,07
21	1095	Λιναλοόλη	Linalool	1,39 ± 0,08

22	1099	Εννεανάλη	Nonanal	0,01
23	1107	Φενχόλη	Fenchol**	1,59 ± 0,5
24	1114	<i>trans</i> -2-πινανόλη	<i>trans</i> -2-Pinanol	0,66 ± 0,02
25	1130	πινοκαρβεόλη	Pinocarveol	0,01
26	1138	Ιψοδιενόλη	Ipsdienol	0,32 ± 0,07
27	1156	Βορνεόλη	Borneol	0,58 ± 0,01
28	1168	τερπινεν-4-όλη	Terpinen-4-ol	0,10
29	1182	α -τερπινεόλη	α -Terpineol	1,49 ± 0,05
30	1188	Βουτανικός εξυλεστέρας	Hexyl butanoate	0,02
31	1211	<i>trans</i> -καρβεόλη	<i>trans</i> -Carveol	0,01
32	1248	Εξανοϊκός ισοαμυλεστέρας	Isoamyl hexanoate	0,01
33	1251	4-Δεκεν-1-όλη	4-Decen-1-ol**	0,01
34	1375	α -Υλαγκένιο	α -Ylangene	0,05
35	1379	α -κοπαένιο	α -Copaene	0,01
36	1388	Εξανοϊκός εξυλεστέρας	Hexyl hexanoate	0,47 ± 0,06
37	1390	σατιβένιο	Sativen	0,24 ± 0,03
38	1401	Ισοκαρυοφυλλένιο	Isocaryophyllene	0,01
39	1404	Σεσκιθουγιένιο	Sesquithujene	0,04
40	1416	β -Καρυοφυλλένιο	β -Caryophyllene	12,67 ± 2,01
41	1419	α -σανταλένιο	α -Santalene	0,03
42	1433	γ -ελεμένιο	γ -Elemene	0,02
43	1437	<i>trans</i> - α -περγαμοτένιο	<i>trans</i> - α -Bergamotene	1,62 ± 0,14
44	1443	Γουαϊά-6,9-διένιο	Guaia-6,9-diene	0,02
45	1453	α -καρυοφυλλένιο/ α - χουμουλένιο	α -Caryophyllene/ α - Humulene	4,11 ± 0,33
46	1459	<i>trans</i> - β -φαρνεζένιο	<i>trans</i> - β -Farnesene	2,09 ± 0,73

47	1476	γ-μουρολένιο	γ-Muurolene	0,15 ± 0,01
48	1481	γ-κουρκουμένιο	γ-Curcumene	0,14 ± 0,05
49	1485	β-σελινένιο	β-Selinene	0,90 ± 0,12
50	1494	α-σελινένιο	α-selinene	1,01 ± 0,12
51	1497	4-epi-cis- διυδροαγαροφουράνιο	4-epi-cis- Dihydroagarofuran**	0,15 ± 0,05
52	1507	β-βισαμπολένιο	β-Bisabolene	0,69 ± 0,13
53	1511	β- κουρκουμένιο	β- Curcumene	0,25 ± 0,01
54	1513	Σεσκι-κινεόλη	Sesquicineole	0,27 ± 0,06
55	1518	Γερμακρένιο A	Germacrene A	0,47 ± 0,05
56	1521	δ-καδινένιο	δ-Cadinene	0,62 ± 0,06
57	1524	β-σεσκιφελλανδρένιο	β-Sesquiphellandrene	0,53 ± 0,14
58	1536	γ-σελινένιο	γ-selinene	4,37 ± 0,55
59	1539	β-καδινένιο	β-Cadinene	0,94 ± 0,14
60	1544	Σελινα-3,7(11)-διένιο	Selina-3,7(11)-diene	6,48 ± 1,07
61	1554	Ένυδρο σεσκισαμπινένιο	Sesquisabinene hydrate**	0,01
62	1560	Γερμακρένιο B	Germacrene B	0,04
63	1563	E-νερολιδόλη	E-Nerolidol	0,30 ± 0,13
64	1584	Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	Caryophyllene oxide	0,32 ± 0,09
65	1599	γκουαϊόλη	Guaiol	2,52 ± 0,26
66	1607	α-epi-7-epi-5- Ευδεσμώλη	α-epi-7-epi-5-Eudesmol	0,06
67	1611	Εποξείδιο χουμουλενίου II	Humulene epoxide II	0,16 ± 0,01
68	1623	10-epi-γ-Ευδεσμώλη	10-epi-γ-Eudesmol	2,44 ± 0,1
69	1635	γ-ευδεσμώλη	γ-Eudesmol	0,58 ± 0,01
70	1655	β-ευδεσμώλη	β-Eudesmol	0,87 ± 0,06

71	1658	α-ευδεσμόλη	α-Eudesmol	1,32 ± 0,15
72	1672	μπουλνεσόλη	Bulnesol	1,55 ± 0,13
73	1687	α-βισαβολόλη	α-Bisabolol	0,46 ± 0,07
74	1700	Ευδεσμ-7(11)-εν-4-όλη	Eudesm-7(11)-en-4-ol	0,07
75	2433	Κανναβιδιόλη	Cannabidiol (CBD)	0,43 ± 0,42
Σύνολο (%)				98,92%

**Μέσος Όρος δύο επαναλήψεων ± εύρος διαφοράς*

***Δεν έχει προσδιοριστεί το ακριβές ισομερές*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και αιθερίου ελαίου *Cannabis sativa* L.

8.1 Προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Όργανα και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS, μοντέλο Jasco V-550
- Κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής (1 cm)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu 2 N
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου 7,5%
- Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος
- Υπό μελέτη δείγματα
- Vortex
- Πιπέτα (100-1000μL)
- Vials

Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάζονται τα υδατικά διαλύματα Folin-Ciocalteu 0,2M και ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 7,5 g/100mL. Για κάθε δείγμα εκχυλίσματος, αιθερίου ελαίου και προτύπου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Σε περιέκτη (vial) προστέθηκαν 400 μL δείγματος και 100 μL νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mL διαλύματος Folin-Ciocalteu και μετά από 5 min σε κάθε vial προστέθηκαν 2 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Ακολουθεί ανάδευση των μειγμάτων για 30s σε Vortex και επώαση σε σκοτεινό μέρος για 1,5 ώρα. Κάθε 30 min επαναλαμβάνεται η ανάδευση τους στη συσκευή Vortex. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος $\lambda=765\text{nm}$.

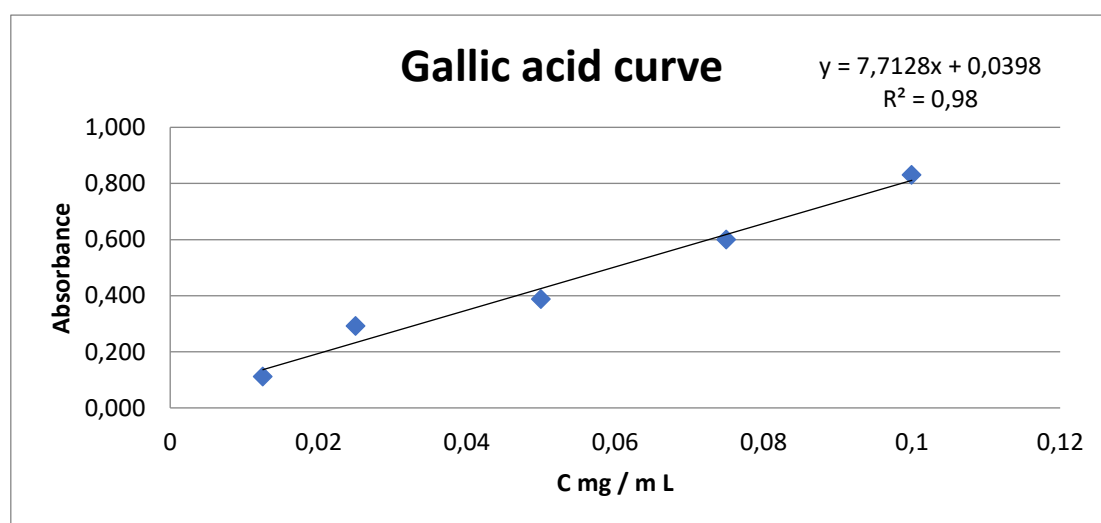
Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε ο αντίστοιχος διαλυτής που είχε χρησιμοποιηθεί κατά τη προετοιμασία του δείγματος αντίστοιχα. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται σε mg γαλλικού οξέος ανά mL εκχυλίσματος (mg GAE/mL).

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος (μητρικό διάλυμα-stock solution) και συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις σύμφωνα με τον πίνακα:

Πίνακας 5: Μετρήσεις πρότυπου γαλλικού οξέος

C (mg gallic acid /mL)	Absorbance (Abs)
0,0125	0,112
0,025	0,292
0,05	0,388
0,075	0,600
0,1	0,831



Σχήμα 14: Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Αποτελέσματα

Προσδιορίστηκε ο αριθμός των φαινολικών συστατικών σε επτά διαφορετικά δείγματα. Το καθαρό CBD διαλύθηκε σε DMSO (5% w/v) και ακολούθησε ανάδευση σε vortex ώστε να διαλυτοποιηθεί. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα:

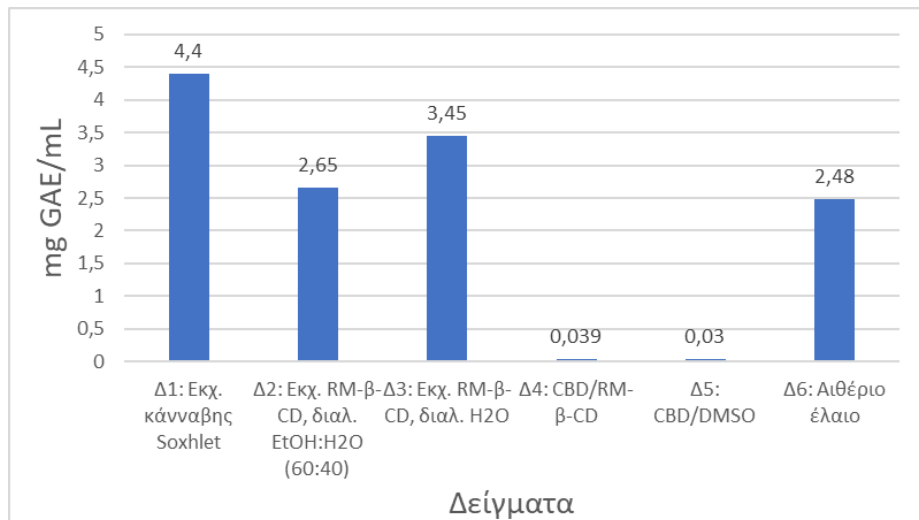
Συζήτηση αποτελεσμάτων

Για τα εκχυλίσματα τα αποτελέσματα κυμαίνονται μεταξύ 2,65-4,4 mg GAE/mL, ενώ για το αιθέριο έλαιο ήταν 2,48 mg GAE/mL (Πίνακας 6). Στην τεχνική εκχύλισης Soxhlet η περιεκτικότητα σε φαινολικά ήταν 4,4 mg GAE/mL, ενώ για την τεχνική εκχύλισης με RM-β-CD ήταν 2,65 mg GAE/mL για διαλύτη EtOH:H₂O και 3,45 mg GAE/mL για διαλύτη H₂O, στην περίπτωση όπου διαλύτης ήταν το H₂O φαίνεται να εκχυλίστηκαν καλύτερα οι φαινολικές ενώσεις.

Στο σχήμα 15 φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα, προκύπτει ότι η εκχύλιση Soxhlet είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Όσον αφορά τη καθαρή CBD η δέσμευση της σε RM-β-CD βελτίωσε τη συνολική φαινολική περιεκτικότητα ελαφρώς (από 0,03 σε 0,039 mg GAE/mL εκχυλίσματος). Γενικά, παρατηρείτε ότι η φαινολική περιεκτικότητα οφείλεται σε άλλες ενώσεις που περιέχονται στο φυτό εκτός από τα κανναβινοειδή.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu

Δείγματα	A (Abs)	A (M.O.)	mg GAE/mL
Δ1: Εκχ. κάνναβης Soxhlet	0,734 0,697	0,716	4,4
Δ2: Εκχ. RM-β-CD, διαλ. EtOH:H ₂ O (60:40)	0,425 0,464 0,445	0,445	2,65
Δ3: Εκχ. RM-β-CD, διαλ. H ₂ O	0,546 0,587 0,587	0,573	3,45
Δ4: CBD/RM-β-CD	0,323 0,345 0,356	0,341	0,039
Δ5: CBD/DMSO	0,263 0,278	0,271	0,03
Δ6: Αιθέριο έλαιο	0,990 0,993 0,998	0,994	2,48



Σχήμα 15: Διάγραμμα σύγκρισης ολικών φαινολικών *Cannabis sativa* L.

Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα διαφορετικών φυτικών εκχυλισμάτων, μη εξαιρουμένων των εκχυλισμάτων κάνναβης, είναι συχνά δύσκολο να συγκριθούν μεταξύ διαφορετικών πηγών στη βιβλιογραφία, καθώς υπάρχουν διάφορες επιλογές για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων: mg/g ξηρού βάρους, mg/L εκχυλίσματος ή τιμές EC₅₀. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα λαμβάνονται συχνά χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες, οι οποίοι μπορούν να έχουν σημαντική επίδραση στις τιμές των παραμέτρων που ελέγχονται. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η πιο αποτελεσματική εκχύλιση των φαινολικών επιτυγχάνεται με χρήση αιθανόλης 50%. (102)

Οι Ahmed *et al.* υπολόγισαν την περιεκτικότητα της *Cannabis sativa* L. σε φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu με χρήση διάφορων διαλυτών, η ανώτερη περιεκτικότητα σε φαινολικά καταγράφηκε σε μεθανόλη και νερό (36,42±1,905 και 29,98±0,56 mg GAE/g, αντίστοιχα), πρέπει να σημειωθεί ότι η εκχύλιση έγινε με τη μέθοδο της ψυχρής εκχύλισης, διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου για 72 ώρες. Η διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε τρεις φορές για να διασφαλιστεί ότι όλα τα πολικά και μη πολικά συστατικά είχαν παραληφθεί και ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό αναδευτήρα. (103)

Ενώ οι Rozanc *et al.*, υπολόγισαν τη φαινολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με διάφορες μεθόδους εκχύλισης. Στο εκχύλισμα που λήφθηκε με τη μέθοδο Soxhlet χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης μεθανόλη, η απόδοση σε

ολικά φαινολικά ήταν $126,1 \pm 1,6$ mg GAE/g εκχυλίσματος (μέσο τριών επαναλήψεων \pm SD). (104) Οι Judžentienė *et al.* στη μελέτη τους υπολόγισαν τα ολικά φαινολικά σε διάφορα μέρη του φυτού, η περιεκτικότητα των ανθών ήταν 924,7 mg GAE/L, επίσης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, σε υδατικά εκχυλίσματα *C. sativa* L. (105) Σε μια άλλη μελέτη, η απόσταξη έγινε σε συσκευή τύπου Clevenger και διήρκησε 3h, τα ολικά φαινολικά υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Folin Ciocalteu και η απόδοση ήταν 28,04 mg GAE/g. (106)

Αρκετοί ερευνητές ανέφεραν διαφορετικά επίπεδα βιοδραστικών ενώσεων στα εκχυλίσματα *Cannabis sativa* L. Αυτές οι διαφορές στη βιβλιογραφία μπορεί επίσης να συνδέονται με γεωγραφικές ή κλιματικές συνθήκες και στο γενετικό υλικό. Γενικά, τα εκχυλίσματα καθώς και το αιθέριο έλαιο βρέθηκε να είναι πλούσιες πηγές φαινολών.

Με βάση την ικανότητα εγκλεισμού οι CDs έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εξαγωγή φαινολών από φυτικά υλικά. Η διαδικασία εκχύλισης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες: τύπος CD, συγκέντρωση CD, θερμοκρασία, χρόνος εκχύλισης και τεχνική εκχύλισης, όπως αναφέρουν οι Cai *et al.* (107) Οι φαινολικές ενώσεις είναι ευαίσθητες στο φως και τη θερμοκρασία, κατά την εκχύλιση και απόσταξη η θερμοκρασία ήταν αρκετά υψηλή αυτό είχε ως αποτέλεσμα να καταστραφεί ένα μέρος των φαινολών. Ενώ σύμφωνα με τους Ruth Alara *et al.* μεταξύ των γενικά χρησιμοποιούμενων διαλυτών για την εκχύλιση πολυφαινολών είναι η μεθανόλη, το νερό, το χλωροφόρμιο, το ν-εξάνιο, αιθανόλη, προπανόλη, οξικός αιθυλεστέρας και ακετόνη. Αυτοί οι διαλύτες διαφέρουν ως προς την πολικότητα τους ως εκ τούτου, έχουν διαφορετικές επιρροές στο εξαγωγή φυτοχημικών. Γενικά πιστεύεται ότι οι διαλύτες υψηλότερης πολικότητας συχνά αποδίδουν καλύτερα όσον αφορά τις πολυφαινόλες, λόγω της υψηλής διαλυτότητας των πολυφαινολών σε τέτοιους διαλύτες. (108)

8.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ενώσεων

8.2.1 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο DPPH

Όργανα και αντιδραστήρια

- Φαματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometers)
- Vortex
- Γυάλινοι περιέκτες (vials)
- Διάλυμα DPPH
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Πρότυπα διαλύματα TROLOX
- Διαλύματα δειγμάτων

Πειραματική πορεία

Ζυγίζονται 3,2 mg DPPH και μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνονται, έως τη χαραγή, με οξικό αιθυλεστέρα. Έπειτα, σε περιέκτη προστίθεται 100 μL πρότυπου διαλύματος TROLOX και 4 mL διαλύματος DPPH. Επίσης σε άλλο vial προστίθεται διάλυμα μόνο DPPH (τυφλό). Αναδεύονται σε vortex για 30s και επωάζονται σε σκοτεινό μέρος για 30 min. Η μηδένιση του οργάνου πραγματοποιείται με καθαρό οξικό αιθυλεστέρα στα 515nm. Έπειτα μετρείται η απορρόφηση των δειγμάτων, των προτύπων και του τυφλού στο παραπάνω μήκος κύματος. Η παρεμποδιστική δράση των δειγμάτων υπολογίζεται με χρήση της εξίσωσης:

$$I\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100 \quad \text{Εξίσωση (1)}$$

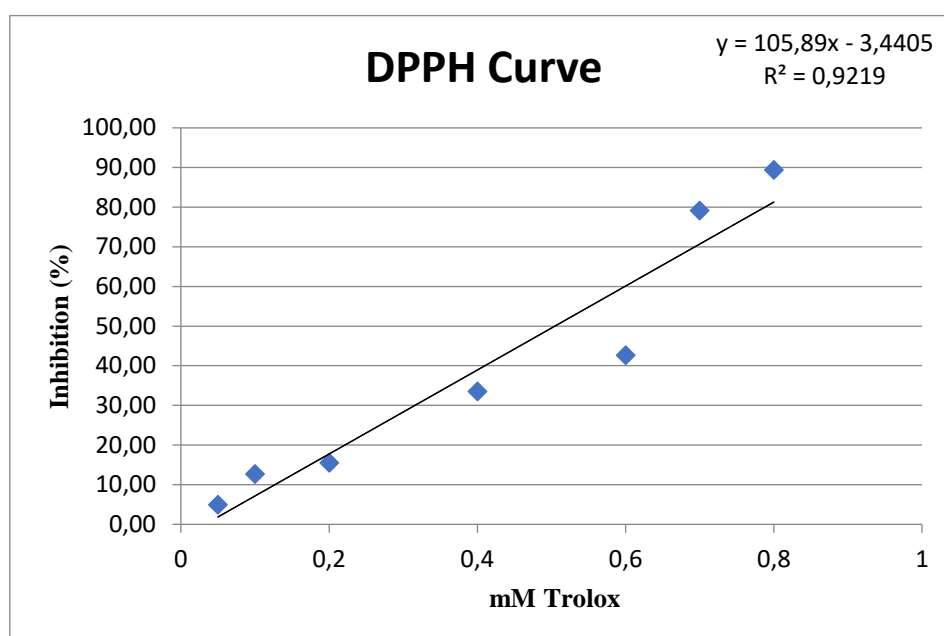
Όπου I%= η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας, A₀= η απορρόφηση του τυφλού, A= η απορρόφηση του δείγματος.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης-απορρόφησης, με βάση τα πρότυπα διαλύματα TROLOX.

Παρασκευάζονται επτά πρότυπα διαλύματα TROLOX σε οξικό αιθυλεστέρα με εύρος συγκεντρώσεων 0,05-0,8 mM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mM Trolox/mL.

Αποτελέσματα

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης $y=105,89x-3,4405$ υπολογίστηκε η συγκέντρωση c κάθε δείγματος, η εξίσωση είναι τη μορφής $y=ax+b$ με $y=I\%$, $x=c$ mM Trolox/mL, $a=105,89$ και $b=-3,4405$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα TROLOX. Αυτό σημαίνει ότι χρησιμοποιείται TROLOX ως αντιοξειδωτικό για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε 4 mL DPPH.

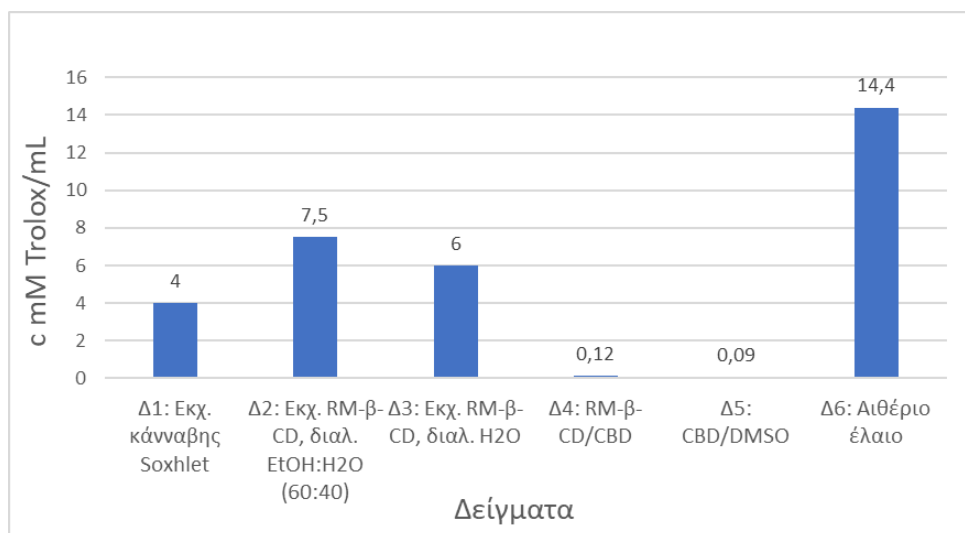


Σχήμα 16: Καμπύλη αναφοράς δοκιμής DPPH

Πίνακας 7: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

	A (Abs)	A μέσος όρος (Abs)	I%±SD	c mM Trolox/mL
Τυφλό	0,985			
Δ1: Εκχ. κάνναβης Soxhlet	0,936 0,928 0,945	0,936	4,97±0,0085	4
Δ2: Εκχ. RM-β-CD, διαλ. EtOH:H ₂ O	0,888 0,841 0,867	0,865	12,18±0,0235	7,5
Δ3: Εκχ. RM-β-CD, διαλ. H ₂ O	0,887 0,887 0,893	0,889	9,75±0,0035	6
Δ4: RM-β-CD/CBD	0,896 0,892 0,882	0,890	9,64±0,0072	0,12
Δ5: CBD/DMSO	0,932 0,890 0,938	0,920	6,60±0,0262	0,09
Τυφλό	0,910			
Δ6: Αιθέριο έλαιο	0,234 0,249 0,264	0,249	72,64±0,0212	14,4

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κυμαίνεται από 4-7,5 mM Trolox/mL. Το εκχύλισμα Soxhlet είχε τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (4 mM Trolox/mL), ενώ το εκχύλισμα με διαλύτη EtOH:H₂O την υψηλότερη (7,5 mM Trolox/mL). Παρατηρείτε ότι το σύμπλοκο RM-β-CD/CBD (0,12 mM Trolox/mL) είχε βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τη καθαρή CBD (0,09 mM Trolox/mL). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η κυκλοδεξτρίνη RM βελτίωσε την αντιοξειδωτική δράση τόσο των εκχυλισμάτων όσο και της CBD. Τέλος, το αιθέριο έλαιο είχε την υψηλότερη παρεμποδιστική δράση απ' όλα τα δείγματα (14,4 mM Trolox/mL). Στο σχήμα 17 που ακολουθεί εμφανίζονται οι μετρήσεις της δοκιμής σε ισοδύναμα (mM Trolox/mL) υπό την μορφή ραβδογράμματος, ώστε να διακρίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα καλύτερα.



Σχήμα 17: Σχήμα σύγκρισης αντιοξειδωτικού περιεχομένου με τη μέθοδο DPPH

8.2.2 Προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών ενώσεων των εκχυλισμάτων και του αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο ABTS

Όργανα και αντιδραστήρια

- Φαματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο V-1200 (VWR Spectrophotometers)
- Vortex
- Πρότυπα διαλύματα TROLOX
- Γυάλινοι περιέκτες (vials)
- Αιθανόλη
- Διάλυμα ABTS
- K₂S₂O₈
- Διαλύματα δειγμάτων

Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα ABTS, 96 mg ABTS προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και αραιώνονται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Παράλληλα 37,9 mg K₂S₂O₈ διαλύονται σε 1 mL απιονισμένο νερό και 440 μL του διαλύματος που προκύπτει προστίθενται στο διάλυμα του ABTS. Αφήνεται στο σκοτάδι για 18h να

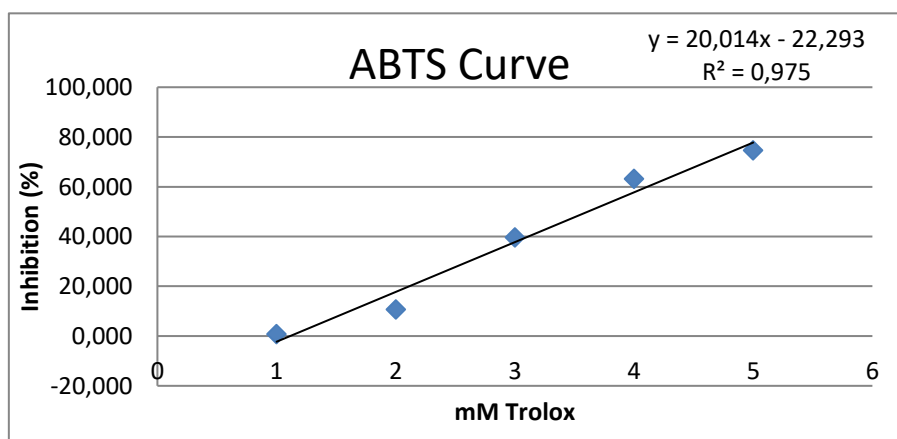
σταθεροποιηθεί. Έπειτα πραγματοποιούνται αραιώσεις με αιθανόλη έως ότου η απορρόφηση αποκτήσει τιμή $0,700 \pm 0,005$ στα 734 nm.

Προστίθεται 100 μL πρότυπου διαλύματος TROLOX και 2 mL αραιωμένου με αιθανόλη διαλύματος ABTS, ακολουθεί ανάδευση με vortex για 30s και το διάλυμα επωάζεται για 6 min σε σκοτεινό μέρος και θερμοκρασία δωματίου. Μηδενίζεται η απορρόφηση του φασματοφωτομέτρου στα 734nm με αιθανόλη και μετρείται η απορρόφηση τόσο των προτύπων όσο και των δειγμάτων στο ίδιο μήκος κύματος. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε 2 mL ABTS.

Έπειτα κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης και απορρόφησης με βάση τα πρότυπα διαλύματα TROLOX. Παρασκευάζονται πέντε πρότυπα διαλύματα TROLOX σε αιθανόλη με εύρος συγκεντρώσεων 0,05-0,8 mM. Η παρεμπόδιση 1% υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης (1) που αναφέρθηκε παραπάνω.

Αποτελέσματα

Από τη πρότυπη καμπύλη προκύπτει εξίσωση της μορφής $y=20,014x-22,293$, όπου $y=1\%$, $x=c$ mM Trolox/mL, $a=20,014$ και $b=-22,293$. Τα αποτελέσματα κυμαίνονται μεταξύ 99-245,5 mM Trolox/mL για τα εκχυλίσματα. Το εκχύλισμα που λήφθηκε με Soxhlet παρουσιάζει 99 mM Trolox/mL, ενώ η εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, 245,5 mM Trolox/mL για διαλύτη H_2O και 239,5 mM Trolox/mL για διαλύτη EtOH: H_2O (60:40). (Πίνακας 8)

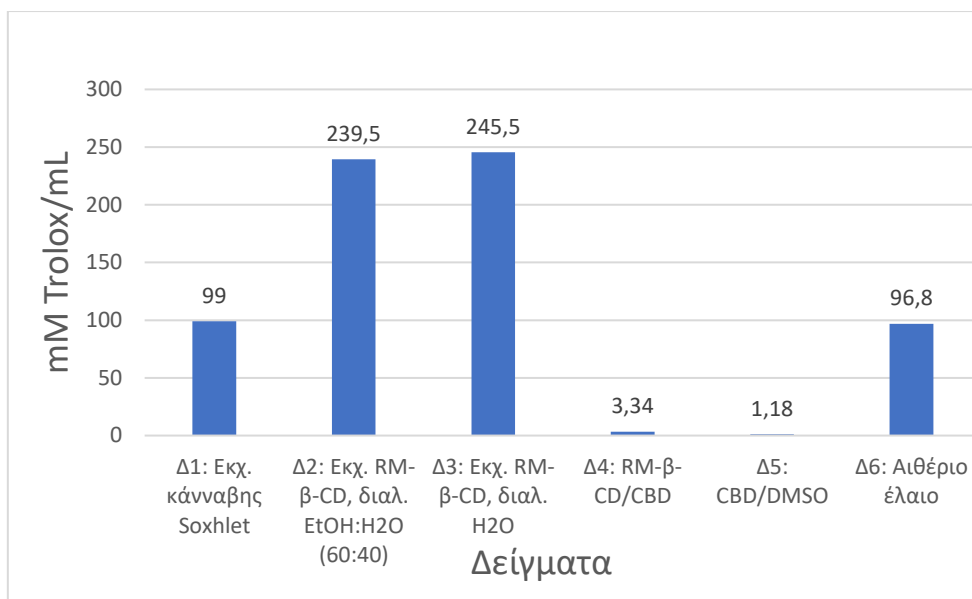


Σχήμα 18: Καμπύλη αναφοράς δοκιμής ABTS

Πίνακας 8: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο ABTS

	A (Abs)	A μέσος όρος(Abs)	I%±SD	c mM Trolox/mL
Τυφλό	0,723			
Δ1: Εκχύλισμα Soxhlet	0,625 0,581 0,588	0,598	17,29±0,024	99
Δ2: Εκχ. RM-β-CD με διαλ. EtOH:H ₂ O	0,190 0,185 0,199	0,191	73,58±0,007	239,5
Δ3: Εκχ. RM-β-CD με διαλ. H ₂ O	0,184 0,193 0,143	0,173	76,07±0,027	245,5
Δ4: RM-β-CD/CBD	0,422 0,377 0,405	0,401	44,54±0,023	3,34
Δ5: CBD/DMSO	0,718 0,711 0,712	0,714	1,24±0,004	1,18
Τυφλό	0,701			
Δ6: Αιθέριο έλαιο	0,189 0,165 0,179	0,178	74,61±0,012	96,8

Ανάμεσα στα εκχυλίσματα φαίνεται η εκχύλιση με CDs να βοήθησε στην εκχύλιση αντιοξειδωτικών ουσιών, το οποίο σημαίνει ότι η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης δεν καταστρέφει τις αντιοξειδωτικές ουσίες όπως πιθανώς να συμβαίνει στην εκχύλιση Soxhlet όπου αναπτύσσονται υψηλότερες θερμοκρασίες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Όσον αφορά την εκχύλιση με CDs και σε αυτή τη μέθοδο το H₂O ως διαλύτης έδειξε τα βέλτιστα αποτελέσματα. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η κυκλοδεξτρίνη RM-β-CD βελτίωσε την χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα της CBD από 1,18 σε 3,34 mM Trolox/mL. Το αιθέριο έλαιο παρουσίασε επίσης υψηλή αντιοξειδωτική δράση με 96,8 mM Trolox/mL. Στο σχήμα 19 που ακολουθεί εμφανίζονται οι μετρήσεις της δοκιμής σε ισοδύναμα (mM Trolox/mL) υπό την μορφή ραβδογράμματος, ώστε να διακρίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα καλύτερα.



Σχήμα 19: Σχήμα σύγκρισης αντιοξειδωτικού περιεχομένου με τη μέθοδο ABTS

8.2.3 Συζήτηση αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικών δοκιμών

Συμπερασματικά, στη μελέτη που διεξήχθη συγκρίθηκαν η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος *Cannabis sativa* L. που λήφθηκε με εκχύλιση Soxhlet όπου το δεύτερο κλάσμα είχε ληφθεί με οξικό αιθυλεστέρα και με εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης RM-β-CD, σε αυτή τη περίπτωση ο διαλύτης εκχύλισης ήταν EtOH:H₂O (60:40) ή καθαρό H₂O. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του αιθερίου ελαίου που λήφθηκε με την τεχνική της υδροαπόσταξης σε συσκευή Clevenger και τέλος μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα της CBD και του συμπλόκου της με RM-β-CD.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μεταξύ των διαφορετικών βιοδοκιμών, τα εκχυλίσματα της CBD με CDs είναι πιο αποτελεσματικά όσον αφορά την περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά. (59) Οι Li *et al.* στη μελέτη τους ερεύνησαν και την αντιοξειδωτική ικανότητα των β-CD και DM-β-CD της CBD και των συμπλόκων της. Συμπέραναν ότι στην ABTS και DPPH, η ικανότητα δέσμευσης ριζών ενός μορίου, σχετίζεται με την ικανότητά του να δίνει υδρογόνα. Επομένως, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο μπορεί να προωθήσει τη μεταφορά υδρογόνου από τη CBD, που πιθανότατα σχετίστηκε με τη νέα διαμόρφωση της CBD στα συμπλέγματα εγκλεισμού

και τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίστηκαν μεταξύ της CBD και των CDs που έκαναν το υδρογόνο στις ομάδες υδροξυλίου της CBD να απελευθερωθεί πιο εύκολα.

Τα σύμπλοκα είχαν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την ελεύθερη CBD. Η αναστολή κατά 50% για την ελεύθερη ρίζα ABTS έδειξε IC50 CBD/ β -CD (8,5 μ g/mL). Οι CDs έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και για τη δέσμευση διαφόρων ουσιών όπως η μυρικετίνη και η τριτοταγής βουτυλυδροκινόνη όπου επίσης η δεσμευσή τους με CDs αύξησε την αντιοξειδωτική ικανότητα. (109) (110)

Το εκχύλισμα κάνναβης με διάφορες μεθόδους εκχύλισης έχουν επίσης ελεγχθεί από αρκετούς ερευνητές ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα, ωστόσο οι πολλές διαφορετικές μορφές έκφρασης των αποτελεσμάτων, οι διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, οι διαλυτές εκχύλισης και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αντιοξειδωτική περιεκτικότητα στο φυτό δυσκολεύουν τη σύγκριση.

Οι Sara Palmieri *et al.* πραγματοποίησαν διαφορετικές εκχυλίσεις, αναμεσά τους και Soxhlet, τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση. Με τη μέθοδο DPPH, βρήκαν $29,92 \pm 0,32$ mg Trolox/g Dry extract όταν η εκχύλιση διήρκεσε 2h και $31,54 \pm 0,08$ mg Trolox/g Dry extract όταν η εκχύλιση διήρκεσε 6h. Ενώ με τη μέθοδο ABTS $394,39 \pm 3,41$ mg Trolox/g Dry extract για 2h και $433,22 \pm 19,81$ mg Trolox/g Dry extract για 6h εκχύλιση. Συμπέραναν ότι η *Cannabis sativa* L. είχε ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, συγκρίσιμη με αλλά φυτά γνωστά για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα όπως θυμάρι (thyme) και σπόροι κόλιανδρου (coriander seeds) η οποία εξαρτώταν από την τεχνική και το χρόνο εκχύλισης. (111)

Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο *Cannabis sativa* L., οι Palmieri *et al.* παρέλαβαν το αιθέριο έλαιο με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης για 2 και 4 ώρες. Στις διάφορες ποικιλίες που μελετήθηκαν με τη μέθοδο DPPH βρέθηκε $8,87 \pm 0,36$ έως $11,70 \pm 1,08$ mg Trolox/g, ενώ με τη μέθοδο ABTS τα αποτελέσματα κυμαίνοντουσαν $57,54 \pm 4,37$ έως $137,23 \pm 27,55$ mg Trolox/g για 4 ώρες απόσταξης. (112)

Επίσης, οι Mazzara *et al.* έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο που λήφθηκε με τη τεχνική της υδροαπόσταξης αποτελούσε πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικά ή τρόφιμα. Στη δοκιμή DPPH κυμαίνονταν από 24,1 έως

41,7 mg Trolox/g ξηρού βάρους. (113) Ταυτόχρονα οι Judžentienė *et al.* ανέφεραν για το αιθέριο έλαιο με τη μέθοδο DPPH $16,683 \pm 0,384$ mmol/L Trolox. (105)

Σπουδαία αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο ABTS και DPPH, ανέφεραν και οι A. Nafis, *et al.* σε αιθέριο έλαιο που λήφθηκε με τη μέθοδο Clevenger (τιμή IC50 $1,6 \pm 0,1$ mg/mL με τη μέθοδο DPPH). Όπως αναφέρουν η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του αιθερίου ελαίου κάνναβης μπορεί να αποδοθεί κυρίως στην παρουσία (E)-καρυοφυλλενίου και οξειδίου του καρυοφυλλενίου σε υψηλές συγκεντρώσεις. Είδη πλούσια σε αυτές τις ενώσεις είχαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, άλλα δευτερεύοντα συστατικά, όπως το μυρσένιο, η λιναλοόλη κλπ. έχουν συνεργατική δράση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. (114)

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, διαφορετικά ποσοστά αντιοξειδωτικής ικανότητας παρατηρούνται για τα ίδια δείγματα ανάμεσα στις δυο δοκιμές. Οι διαφορές αυτές πιθανώς οφείλονται στο ότι:

- Ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να μην είναι διαλυτές στα μέσα αντίδρασης και έτσι δεν μπορούν να εκφράσουν τη δέσμευση των ριζών, η δοκιμασία DPPH διεξάγεται συμβατικά υπό 50% αιθανόλη/νερό, ενώ η δοκιμασία ABTS πραγματοποιείται σε υδατικές συνθήκες. Επίσης, το DPPH δεν αντιδρά με φλαβονοειδή, τα οποία δε φέρουν υδροξυλομάδα στον Β αρωματικό δακτύλιο και με αρωματικά οξέα που περιέχουν μόνο μία υδροξυλομάδα.
- Η ρίζα DPPH* παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα από την ρίζα ABTS* γεγονός που συνεπάγεται τη χαμηλότερη αντιδραστικότητα.
- Η ABTS ανιχνεύει τις αντιοξειδωτικές ουσίες σε διαφορετικό μήκος κύματος (μέτρηση απορρόφησης στα 734nm) ενώ η δοκιμή DPPH (μέτρηση απορρόφησης στα 517nm).
- Ένα μειονέκτημα της DPPH δοκιμής είναι ότι πολλά αντιοξειδωτικά τα οποία αντιδρούν πολύ γρήγορα με τις υπεροξυ-ρίζες, αντιδρούν πολύ αργά ή καθόλου με το DPPH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Διάγραμμα φάσης διαλυτότητας

Υλικά και Μεθόδοι

- CBD με τη μορφή λευκών κρυστάλλων (Enecta Cc500 CBD crystals, 500 mg, 99% καθαρό) προσφέρθηκε από την εταιρεία Hempoil (Αθήνα, Ελλάδα)
- β -CD ως λευκή σκόνη από την Cyclolab (Ουγγαρία) και χρησιμοποιήθηκε όπως ελήφθη, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό

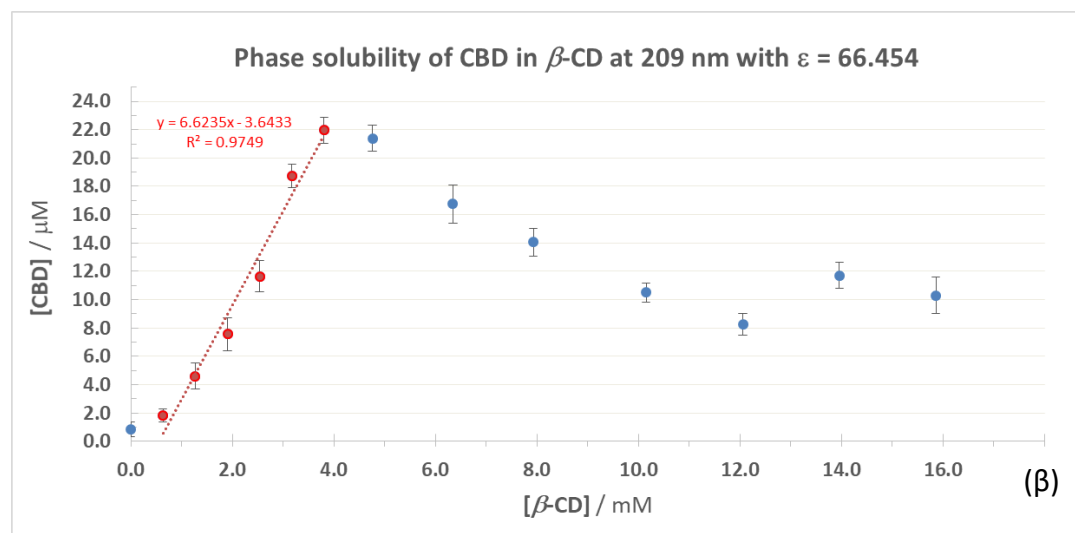
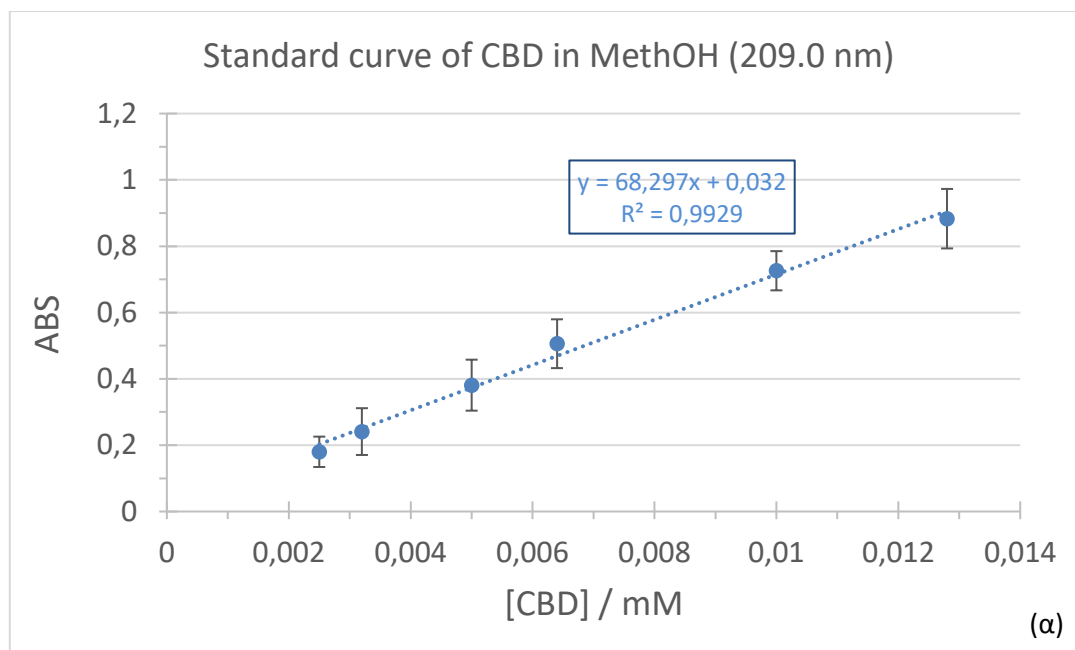
Το φασματοφωτόμετρο UV-visible (UV-Vis) (BioBase BK-S380, China) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της CBD στα διάφορα διαλύματα.

Μέγιστη απορρόφηση για τη CBD παρατηρήθηκε σε μήκος κύματος $\lambda = 209\text{nm}$. Για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης, μετρήθηκαν επτά πρότυπα διαλύματα CBD σε μεθανόλη, στο καθένα πραγματοποιήθηκε τριπλή επανάληψη. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,0025, 0,0032, 0,005, 0,0064, 0,01 και 0,0128 mM.

Η μελέτη φάσης διαλυτότητας πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους Higuchi & Connors (1965) «Phase Solubility Techniques» (115). Συγκεκριμένα, περίσσεια CBD (9 mg) προστέθηκε σε 5 mL υδατικών (απιονισμένο νερό) διαλυμάτων β -CD με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,95 έως 15,86 mM. Ακολούθησε ανάδευση για όλα τα μίγματα σε PHOENIX Instrument Laboratory Shaker RS-OS 5, Βερολίνο, Γερμανία) στους 25°C για 48 ώρες ώστε να επιτευχθεί η ισορροπία συμπλοκοποίησης. Έπειτα, τα δείγματα φιλτραρίστηκαν με φίλτρο 0,45 μm και φωτομετρήθηκαν με UV-Vis φασματοφωτόμετρο στα 209 nm.

Αποτελέσματα

Το μήκος κύματος ανίχνευσης για τη βαθμονόμηση ορίστηκε στα 209nm. Το γράφημα βαθμονόμησης ήταν γραμμικό στην περιοχή 0,0025-0,0152 mM για το CBD. Η εξίσωση παλινδρόμησης της καμπύλης και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) ήταν για το γραμμικό τμήμα $y=68,297x + 0,032$ και $R^2=0,99$ (Σχήμα 20 α). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και παρουσιάστηκαν ως Μέσος όρος \pm SD.



Σχήμα 20: (α) Πρότυπη καμπύλη του CBD στη μεθανόλη όπως καταγράφηκε στα 209 nm (n=3) (β) Διάγραμμα φάσης διαλυτότητας του συστήματος CBD/ β -CD σε νερό στους 25°C (n=3)

Το γραμμικό τμήμα του διαγράμματος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό K_s και CE. Στο σχήμα 20 (β), απεικονίζεται το προφίλ φάσης διαλυτότητας της συνολικής διαλυτότητας CBD (S_t) ως συνάρτηση διαφόρων συγκεντρώσεων β -CD στους 293 K. Πιο συγκεκριμένα, η διαλυτότητα της CBD (S_t) αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της β -CD μόνο στην περιοχή 1-4 mM υποδεικνύοντας ένα προφίλ τύπου Bs. Αυτός ο τύπος είναι συνηθισμένος για τον εγκλεισμό ενώσεων φαρμάκων σε φυσικές β -CD (116)

Το διάγραμμα διαλυτότητας δείχνει γραμμικό στη συγκέντρωση CD μεταξύ 4 και 6 mM, που ακολουθείται από μια απότομη πτώση, υποδεικνύοντας την έναρξη της κατακρήμνισης του συμπλόκου. Η μέγιστη διαλυτότητα S_{max} της CBD παρατηρείται να είναι περίπου 22 μM , δείχνοντας μια αύξηση διαλυτότητας της CBD κατά 28,6 περίπου φορές. Η σταθερά δέσμευσης (K_s), η διαλυτότητα σε καθαρό νερό (S_0) και η σταθερά συμπλοκοποίησης (CE) του συμπλέγματος μπορούν να υπολογιστούν από την εξίσωση Higuchi-Conners μόνο για το γραμμικό τμήμα του γραφήματος CBD/ β -CD, που αφορά σύμπλοκα με 1:1 στοιχειομετρία ξενιζομένου:ξενιστή, από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$K_s = \frac{Slope}{S_0 * (1 - Slope)} \quad (2)$$

$$CE = \frac{Slope}{(1 - Slope)} \quad (3)$$

Το CE είναι ανεξάρτητο τόσο από το S_0 όσο και από το S_{int} , καθώς υπολογίζεται αποκλειστικά από την κλίση των διαγραμμάτων διαλυτότητας φάσης και εκφράζει την αναλογία συγκέντρωσης μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης σε σύμπλοκο και ελεύθερη μορφή. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων που εφαρμόστηκαν στα πειράματα κυτταροτοξικότητας των κυττάρων.

Στη παρούσα μελέτη, το σύμπλοκο CBD/ β -CD, μέσω των παραπάνω εξισώσεων βρέθηκε CE=0,65% και $K_s=33 \text{ M}^{-1}$. Το CBD είναι ένα εξαιρετικά λιπόφιλο φάρμακο. Η διαλυτότητά του στο νερό (S_0) έχει μετρηθεί στα 0,2 μM από τους *Mannila et al.* (57) λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προαναφερθέντα, είναι σαφές ότι ο προσδιορισμός του K_s με τη μέθοδο της φάσης διαλυτότητας, επηρεάζεται σημαντικά από τη χαμηλή διαλυτότητα του CBD. Στην παρούσα μελέτη η διαλυτότητα της καθαρής CBD προσδιορίστηκε $S_0 = 0,7 \mu\text{M}$ και αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της K_s .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Ανίχνευση της αντικαρκινικής δράσης των συμπλόκων CBD *in vitro* σε κυτταρικές σειρές (νευροβλάστωμα SH-SY5Y και νευροβλάστωμα SK-N-SH)

i. Αντιδραστήρια

- Κρύσταλλοι CBD Enecta 99% CBD + 1% terpenes (500 mg)
- β -CD, Alfa aesar β -cyclodextrin Powder $C_{42}H_{70}O_{35}$ (100 g)
- HP- β -CD, Aldrich (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (100 g)
- DMSO -Dimethyl sulfoxide: Διμεθυλοσουλφοξείδιο
- MTT-Διάλυμα MTT 5 mg/mL (5-dimethyl tetrazolium bromide)
- 10% v/v Ορό εμβρύου μόσχου (FBS-Foetal Bovine Serum)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS-Phosphate Buffered Saline)
- Γλουταμίνη (L-Alanyl-L-Glutamine)
- Αντιβιοτικά
- Θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας ζωικών κυττάρων (DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Θρεπτικό μέσο: DMEM, 10%v/v FBS, 2 mM γλουταμίνη και 1x αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (antidiotics)

ii. Πειραματικός εξοπλισμός

- Θάλαμος νηματικής ροής (LaminAir, Holten, Bioline)
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός (AxioLab)
- Φασματοφωτόμετρο Infinite M200PRO
- Φυγόκεντρος (Heraeus Instruments Biofuge 28RS)
- Θάλαμος επώασης (Heat Force Incubator, HF90/HF2400)
- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 75 cm² Starstedt
- Αιματοκυτταρόμετρο της πλάκας Neubauer
- Σωληνάρια Eppendorf
- Καλλιεργητικά τρυβλία 96 βοθρίων (96-well plates) (Cellstar, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο A. Kruss-MBL3200
- Φίλτρο 0,2 μ m

- Πολυπτυέτα 8 καναλιών
- Ποτήρια ζέσεως

iii. Βιολογικό υλικό

Κυτταροκαλλιέργεια ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y και SK-N-SH.

Οι κυτταρικές σειρές είναι αποθηκευμένες σε κρυοφιαλίδια στους -80°C σε ειδικό καταψύκτη φύλαξης κυττάρων. Για να αποψυχθούν τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για μερικά λεπτά στους 37°C . Έπειτα το διάλυμα μεταφέρεται σε φλάσκα καλλιέργειας αφού έχει προηγηθεί η προσθήκη του θρεπτικού μέσου των 20 mL DMEM/10% FBS. Η φλάσκα τοποθετείτε σε θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO_2 .

10.1 Παρασκευή διαλυμάτων για την *in vitro* μελέτη των συμπλόκων

Η παρασκευή των διαλυμάτων CBD/CD πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης φάσης διαλυτότητας και την εκτίμηση της απόδοσης συμπλοκοποίησης (CE) όπως αυτή είχε προσδιοριστεί από τους Hatziağariou *et al.* (117) ώστε η ποσότητα της συμπλοκοποιημένης CBD στα υδατικά διαλύματα να είναι συγκρίσιμη με αυτήν της ελεύθερης CBD σε διαλύματα DMSO.

Δεδομένης της χαμηλής απόδοσης συμπλοκοποίησης της CBD σε β -CD (CE = 1,2) η ανάμειξή τους έγινε με μοριακή αναλογία CBD: β -CD ίση με 1:80. Δεδομένης της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας της β -CD, αυτό επέτρεψε την συμπλοκοποίηση μόλις 0,8 mg CBD σε 25 mL H_2O . Αντίστοιχα, για τη δημιουργία συμπλόκων CBD/HP- β -CD, για τα οποία έχει προσδιοριστεί CE = 2,9 (59) η ανάμειξη ξενιζόμενου ξενιστή έγινε με μοριακή αναλογία 1:37 και δεδομένης της σημαντικά υψηλότερης διαλυτότητας της HP- β -CD, ποσότητα 8 mg CBD συμπλοκοποιήθηκε σε 25 mL H_2O .

Πίνακας 9: Ποσότητες ξενιστή (β -CD, HP- β -CD) και ξενιζομένου (CBD) που αναμίχθηκαν σε 25 mL H₂O

Αναλογία	Ποσότητα Ξενιστή (mg)	Ποσότητα CBD (mg)
1:80	β -CD: 258,5	0,8
1:37	HP- β -CD/CBD: 1.323,4	8

10.2 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT

i. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

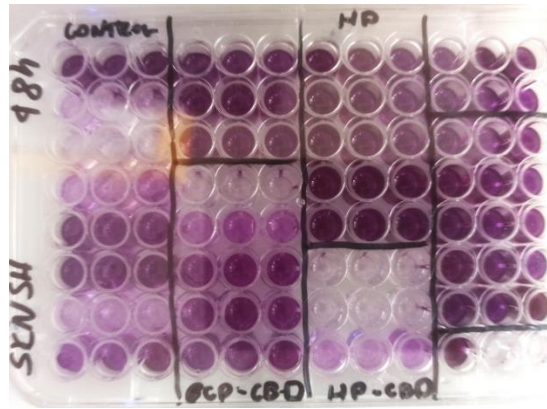
- Αναρρόφηση θρεπτικού μέσου με πιπέτα Pasteur
- Η φλάσκα εκπλύθηκε με PBS για απομάκρυνση νεκρών κυττάρων
- Τοποθέτηση 1 mL θρυψίνη για αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται θρυψινοποίηση
- Η φλάσκα τοποθετήθηκε στο θάλαμο καλλιέργειας κυττάρων στους 37°C και 5% CO₂ για 5-10 λεπτά
- Όταν τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τη φλάσκα, με χρήση πιπέτας τοποθετήθηκαν 9 mL ορού εμβρύου μόσχου στη φλάσκα, με σκοπό την αδρανοποίηση της θρυψίνης
- Το περιεχόμενο της φλάσκας τοποθετήθηκε σε σωλήνα falcon των 15 mL και φυγοκεντρήθηκε για 4 λεπτά στις 1000 στροφές στους 25°C
- Μεταφορά 10 μ L από το εναιώρημα των κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer και ακολουθεί καταμέτρηση κυττάρων
- Ανακαλλιέργεια κατάλληλης ποσότητας κυττάρων που εξαρτάται από το είδος των κυττάρων σε φλάσκα με θρεπτικό υλικό 20 mL
- Ακολούθησε στρώσιμο κυττάρων σε πλακίδια, σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν 85 μ L θρεπτικό υλικό και 15 μ L (6000 κύτταρα για επώαση 48 και 72 ωρών με τα διαλύματα CBD) από το εναιώρημα των κυττάρων
- Αποθηκεύτηκαν στο θάλαμο επώασης κυττάρων στους 37°C και 5% CO₂

ii. Προετοιμασία δείγματος

Τα δείγματα προς δοκιμή ήταν τα CBD, β -CD, β -CD/CBD, HP- β -CD, HP- β -CD/CBD τα οποία τοποθετήθηκαν σε διαφορετικά βιοθρία ανά τριπλή επανάληψη και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις. Ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα από τα δείγματα σε σωλήνες falcon και προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού, ακολούθησε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα και προστέθηκαν 2 mL H₂O, περάστηκε από φίλτρο 0,2 μ m. Λήφθηκε κατάλληλη ποσότητα δείγματος και κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού έως τελικού όγκου 2 mL άρα παρασκευάστηκε το δείγμα 0,065 mM και ακολούθησαν 4 αραιώσεις 0,0325, 0,01625, 0,008, 0,004 mM. Η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε στις 48 και 72 ώρες. Ως control χρησιμοποιήθηκε DMSO και ως blank χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό.

iii. Εφαρμογή της μεθόδου MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphenyl tetrazolium bromide]

- Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από τις 3 πρώτες θέσεις που ανήκουν στο control με χρήση πολυπιπέτας και προστέθηκε το control
- Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και στις 3 επόμενες θέσεις και προστίθεται 150 μ L δείγματος ξεκινώντας από την μικρότερη συγκέντρωση προς τη μεγαλύτερη
- Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ουσίες για 48 και 72 ώρες
- Στη συνέχεια, προστέθηκαν 15 μ L διάλυμα MTT
- Ακολούθησε η ίδια διαδικασία για όλα τα δείγματα
- Επώαση των κυττάρων για 3 ώρες για να δράσει το αντιδραστήριο σε θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂
- Αφαιρέθηκαν τα διαλύματα θρεπτικού που περιείχαν τις διαφορετικές συγκεντρώσεις CBD και το MTT
- Προστέθηκαν 150 μ L DMSO
- Λήφθηκε μέτρηση στα 560 nm, το πλακίδιο τοποθετήθηκε σε φασματοφωτόμετρο αφού επιλέχθηκε κατάλληλο πρόγραμμα (3 λεπτά ηρεμία, 30' ανάδευση)



Εικόνα 21: Καλλιεργητικά τρυβλία 96 βοθρίων (96-well plates)

iv. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων με σκοπό την απεικόνιση των αποτελεσμάτων με μορφή ραβδογράμματος έγινε με χρήση του Microsoft Excel. Υπολογίζοντας κάθε φορά τη τυπική απόκλιση, τα διαγράμματα που λήφθηκαν απεικόνιζαν τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων (%) συναρτήσει της συγκέντρωσης CBD (0,004-0,065 mM).

10.2.1 Αποτελέσματα και συζήτηση

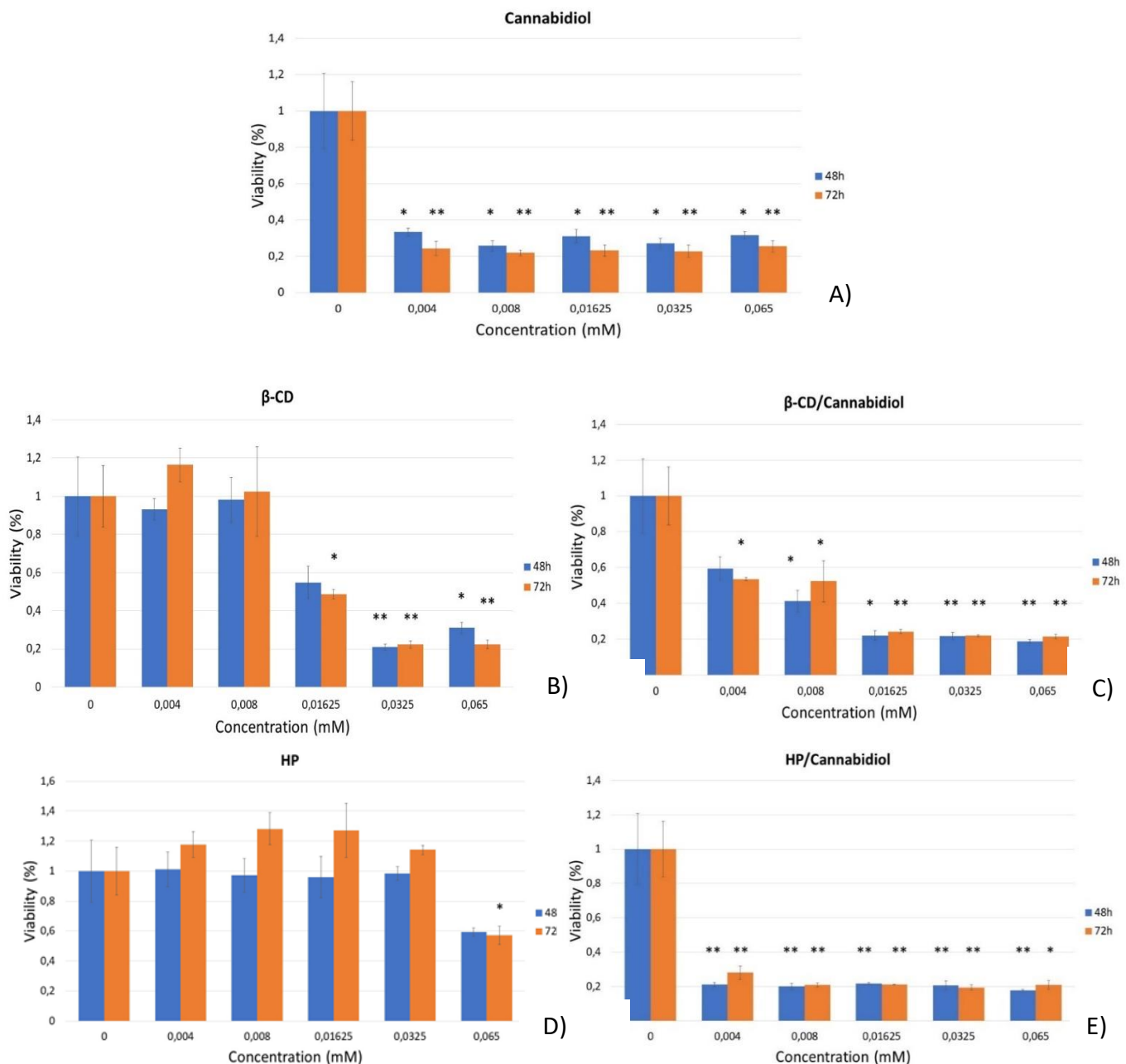
Η πρώτη μελέτη για την αντικαρκινική δράση των κανναβινοειδών δημοσιεύθηκε από τον Munson *et al.* το 1975, παρουσιάστηκε καταστολή της ανάπτυξης του όγκου από Δ⁸-THC, Δ⁹-THC και CBN από τότε πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί *in vitro* και *in vivo* υποδεικνύοντας ότι τα κανναβινοειδή ασκούν ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του καρκίνου, αναχαιτίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προκαλώντας απόπτωση σε πολλαπλές μορφές καρκίνου, παρόλο που ακόμα δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες σε μεγάλη έκταση. (118) Σε αυτή τη μελέτη, μελετήθηκε η δράση της CBD και των συμπλόκων της β-CD/CBD και HP-β-CD/CBD σε κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος SH-SY5Y και SK-N-SH σε 48 και 72h και στις δυο σειρές παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη επίδραση.

Σύμφωνα με το σχήμα 21 A) παρατηρείτε ότι στη κυτταρική σειρά SH-SY5Y, η αδέσμευτη CBD είχε κυτταροτοξική δράση στις 48h ($p < 0,05$) ενώ η κυτταροτοξικότητα βελτιώθηκε ελάχιστα στις 72h ($p < 0,01$), αποδεικνύοντας την αντικαρκινική ιδιότητα

της. Η κυκλοδεξτρίνη β -CD σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,004, 0,008 mM) και η HP- β -CD σε συγκεντρώσεις (0,004-0,0325 mM) δεν παρουσίασε κυτταροτοξική δράση σε 48 και 72h ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, (HP- β -CD $c=0,004-0,0325$ mM 72h, β -CD $c=0,004$ mM και $c=0,008$ mM 72h), η βιοδιαθεσιμότητα είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με το control (Σχήμα 21B και D), επομένως παρατηρείται αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα καθώς η μέθοδος MTT μετράει τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων. Η β -CD για $c \geq 0,01625$ mM παρουσίασε κυτταροτοξική δράση στις 48 και 72h ($p < 0,01$) (Σχήμα 21B) και η HP- β -CD για $c=0,065$ mM σε 48 και 72h.

Το σύμπλοκο HP- β -CD/CBD παρουσίασε την καλύτερη κυτταροτοξική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις για τις 48h και τις 72h ($p < 0,01$). Ενώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις 48h και τις 72h για όλα τα δείγματα υπό εξέταση, μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις β -CD/CBD $c=0,008$ mM και HP- β -CD/CBD $c=0,004$ mM παρατηρήθηκε σταδιακή ανάκτηση των κυττάρων όχι όμως σε τόσο υψηλά επίπεδα σε σχέση με πριν την έκθεση των κυττάρων στο φάρμακο. (Σχήμα 21C και 21E)

Στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου συγκριτικά, το σύμπλοκο HP- β -CD/CBD φαίνεται η να ήταν πιο αποτελεσματικό από το β -CD/CBD. Όσο αυξανόταν η συγκέντρωση τόσο η βιωσιμότητα των κυττάρων μειωνόταν όπως ήταν αναμενόμενο. Η κυκλοδεξτρίνη β -CD φαίνεται να έχει κυτταροτοξικές επιδράσεις για $c \geq 0,01625$ mM όμως για τις ίδιες συγκεντρώσεις το σύμπλοκο β -CD/CBD παρουσίασε καλύτερη κυτταροτοξικότητα. Όσον αφορά το χρόνο στις 48h παρατηρήθηκε καλύτερη κυτταροτοξικότητα σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα, εκτός από την αδέσμευτη CBD που οι 72h έδωσαν ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα.



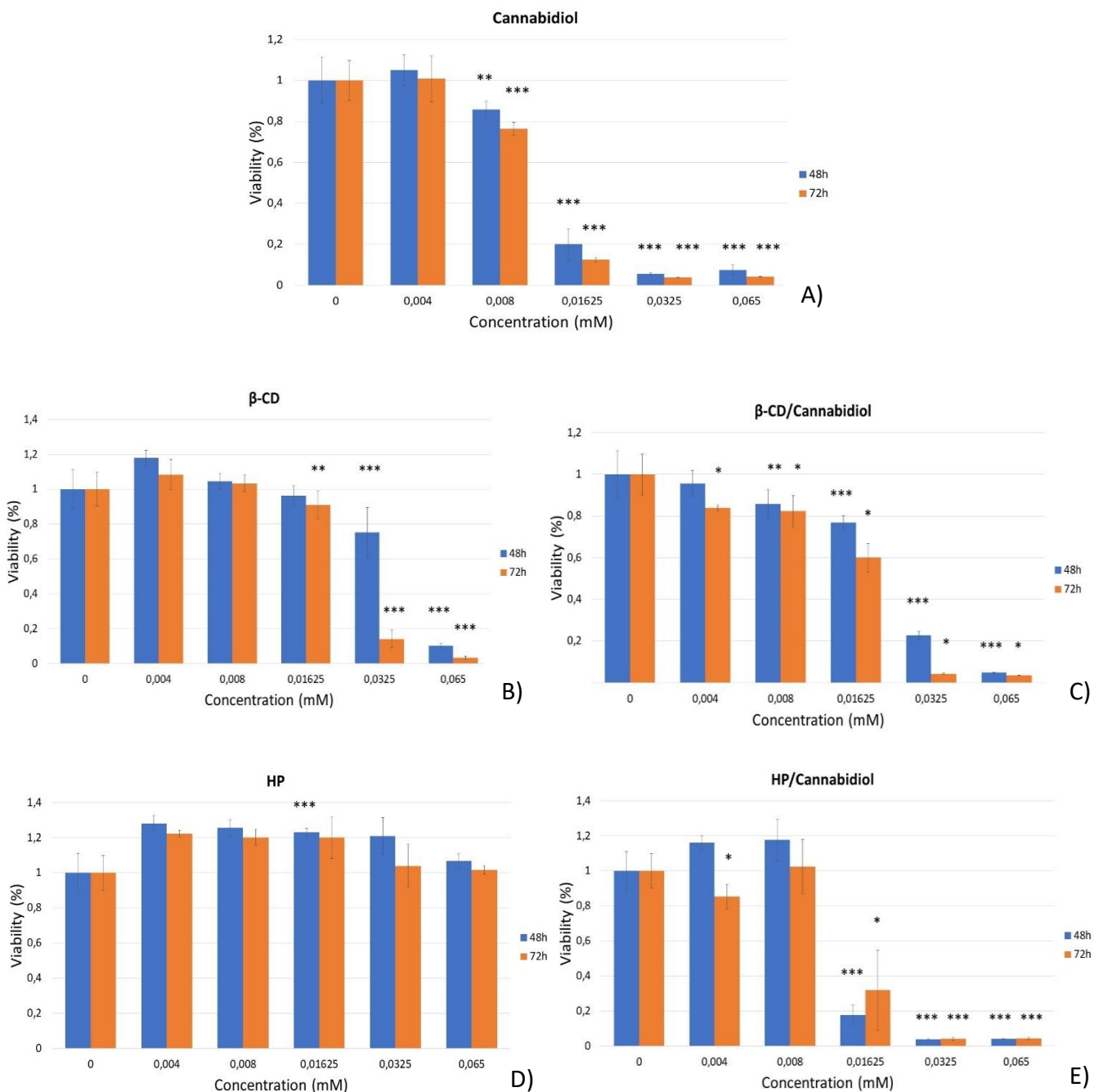
Σχήμα 21: Αποτελέσματα επίδρασης του CBD και συμπλόκων CBD στη βιωσιμότητα των SH-SY5Y κυττάρων σε 48 ώρες και 72 ώρες.

A) Αποτελέσματα επίδρασης CBD/DMSO B) Αποτελέσματα επίδρασης β-CD C) Αποτελέσματα επίδρασης β-CD/CBD στη βιωσιμότητα των SH-SY5Y κυττάρων D) Αποτελέσματα επίδρασης HP-β-CD E) Αποτελέσματα επίδρασης HP-β-CD/CBD (Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο ±SD τριπλής επανάληψης, όπου * αντιστοιχεί σε $p < 0,05$, ** αντιστοιχεί σε $p < 0,01$, *** αντιστοιχεί σε $p < 0,001$)

Στη κυτταρική σειρά SK-N-SH η αδέσμευτη CBD παρουσίασε χαμηλή βιωσιμότητα για συγκεντρώσεις από 0,01625-0,065 mM ($p < 0,001$, στατιστικά σημαντική διαφορά) (Σχήμα 22A). Στο σύμπλοκο β -CD/CBD για $c=0,0325$ mM παρατηρήθηκε βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με τη β -CD ειδικά στις 48h (Σχήμα 22B και C). Συγκριτικά η HP- β -CD βοήθησε καλύτερα την κυτταροτοξική δράση της CBD σε σχέση με τη β -CD και σε αυτήν τη κυτταρική σειρά.

Το HP- β -CD/CBD παρουσίασε βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα σε συγκέντρωση 0,01625-0,065 mM από την αδέσμευτη CBD στις 48 ώρες (Σχήμα 22A και E). Για το σύμπλοκο β -CD/CBD καλύτερη κυτταροτοξικότητα παρατηρήθηκε σε συγκέντρωση 0,065 mM ενώ για το σύμπλοκο HP- β -CD/CBD στα 0,0325 mM και 0,065 mM όπως φαίνεται στο σχήμα 22C και 22E ($p < 0,001$).

Η HP- β -CD δεν παρουσίασε κυτταροτοξικότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα καθώς η βιωσιμότητα είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με το control (HP- β -CD/CBD $c=0,04$ mM, 0,008 mM για 48h), (HP- β -CD 0,004-0,065 mM 48 και 72h, β -CD $c=0,004$ mM για 48h), στην προκειμένη περίπτωση παρατηρείται αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα. Η β -CD παρουσίασε κυτταροτοξική δράση για $c=0,0325$ στις 72h και 0,065 mM σε 48 και 72h (Σχήμα 22B)



Σχήμα 22: Αποτελέσματα επίδρασης του CBD και συμπλόκων CBD στη βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων σε 48 και 72 ώρες.

A) Αποτελέσματα επίδρασης CBD/DMSO στη βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων B) Αποτελέσματα επίδρασης β-CD C) Αποτελέσματα επίδρασης β-CD/CBD στη βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων D) Αποτελέσματα επίδρασης HP-β-CD E) Αποτελέσματα επίδρασης HP-β-CD/CBD (Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο ±SD

τριπλής επανάληψης, όπου * αντιστοιχεί σε $p < 0,05$, ** αντιστοιχεί σε $p < 0,01$, *** αντιστοιχεί σε $p < 0,001$)

Καταλήγοντας, η επίδραση της CBD και των συμπλόκων της φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τον χρόνο. Αρχικά, μετρήσεις έγιναν στις 48 ώρες και 72 ώρες, όσον αφορά το χρόνο οι 48h έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά, ενώ σε λίγες περιπτώσεις στις 72 ώρες παρατηρήθηκε σταδιακή ανάκτηση των κυττάρων σε σχέση με τις 48 ώρες (SH-SY5Y κύτταρα HP- β -CD/CBD για $c = 0,004$ mM και β -CD/CBD για $c = 0,008$ mM), (SK-N-SH κύτταρα HP- β -CD/CBD $c = 0,01625$ mM).

Η δραστηριότητα του CBD βελτιώθηκε με την HP- β -CD, τα σύμπλοκα ήταν περισσότερο κυτταροτοξικά σε σχέση με τη CBD διαλυμένη σε DMSO. Είναι σημαντικό να συγκριθεί η κυτταροτοξικότητα των κυκλοδεξτρινών σε σχέση με τα συμπλοκά τους με CBD, ώστε να αξιολογηθεί ή πιθανή συνέργεια τους στην βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ το CBD/DMSO είχε σημαντική κυτταροτοξική δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση 0,004 mM για κυτταρική σειρά SK-N-SH στις 48 και 72 ώρες, παρ' όλα αυτά ούτε και τα σύμπλοκα παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξική δράση στην ίδια συγκέντρωση ($p < 0,05$).

Η CBD έχει μελετηθεί κυρίως για ψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές, στη παρούσα μελέτη ερευνάται η αντικαρκινική ιδιότητα της, παρουσίασε κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος SH-SY5Y και SK-N-SH. Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι λιπόφιλη ένωση επομένως ένα μόριο ξενιστής, όπως οι κυκλοδεξτρίνες, θα βοηθήσει στη στοχευμένη και καλύτερη διαθεσιμότητά της οδηγώντας σε υψηλότερη πρόσληψη *in vitro* από τα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, η HP- β -CD είναι εγκεκριμένη από τον FDA, ο εγκλεισμός της CBD και άλλων κανναβινοειδών είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούσαν με αυτά άλλων μελετών, πιο συγκεκριμένα οι Pin Lv *et al.* παρασκεύασαν επιτυχώς σύμπλοκα εγκλεισμού κανναβιδιόλης (CBD) με τρεις φυσικές κυκλοδεξτρίνες, α -CD, β -CD και γ -CD, με τη μέθοδο εναιώρησης. Η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο MTT, *in vitro* έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών Hep G2 και A549, τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στις 24 και 48h. Έδειξαν ότι η *in vitro* κυτταροτοξικότητα της CBD σε σύμπλοκα με CDs ήταν μεγαλύτερη από εκείνη της ελεύθερης CBD και CD. Τόνισαν ότι το σύμπλεγμα

εγκλεισμού μπορεί να εισέλθει και να απορροφηθεί από τα κύτταρα πιο εύκολα σε σύγκριση με την ελεύθερη CBD. (119)

Σε ακόμη μια μελέτη των Hatziagarίου *et al.* ερεύνησαν την *in vitro* αντικαρκινική ιδιότητα της CBD και των συμπλοκών της με RM-β-CD και HP-β-CD σε κυτταρικές σειρές A172 γλοιοβλαστώματος και TE671 ραβδομυοσάρκωματος, τα δείγματα εξετάστηκαν στις 6, 24, 48, 72h. Τα βέλτιστα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας παρατηρήθηκαν στις 48h, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις στις 72h παρατηρήθηκε σταδιακή ανάκτηση των κυττάρων, όχι όμως στα ίδια επίπεδα με πριν την έκθεση των κυττάρων στο φάρμακο. Το σύμπλοκο HP-β-CD/CBD έδωσε τα βέλτιστα αποτελέσματα. (117)

Μια σημαντική παρατήρηση, όπως επισήμαναν ήταν ότι οι ξενιστές CD παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα για $c \geq 0,018$ mM για την HP-β-CD και $c \geq 0,036$ mM για τη RM-β-CD, πιστεύεται ότι η HP-β-CD προάγει την απόπτωση σε λευχαιμικά κύτταρα διαταράσσοντας την ομοιόσταση της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη, παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Yokoo *et al.* και Yamaguchi *et al.* (120) (121) Ωστόσο φαίνεται η αντικαρκινική δράση δεν οφείλονταν αποκλειστικά στις CDs αλλά αυξήθηκε στη περίπτωση των συμπλόκων με CBD.

Στη παρούσα μελέτη η β-CD ήταν κυτταροτοξική για $c \geq 0,01625$ mM σε SH-SY5Y, και $c \geq 0,0325$ mM για SK-N-SH η HP-β-CD μείωσε ελαφρώς τη βιοδιαθεσιμότητα των κυττάρων για $c = 0,065$ mM. Επομένως, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι CDs παρουσιάζουν κάποια αντικαρκινική δράση από μόνες τους και συμβάλουν διπλά, καθώς μεταφέρουν αποδοτικά το φάρμακο αλλά και βοηθούν στην υπάρχουσα αντικαρκινική δράση του φαρμάκου. Ένας αριθμός αντικαρκινικών φαρμάκων έχει συνδυαστεί με CDs και τα παράγωγα τους για τη βελτίωση της διαλυτότητας και σταθερότητας, αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας υδροφοβικών ουσιών και της διάλυσης, μείωση της τοξικότητας και τροποποίηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του φαρμάκου ώστε να καταφέρει να ξεπεράσει βιολογικά εμπόδια, όπως η κυτταρική μεμβράνη και να εισχωρήσει στα κύτταρα χωρίς να διαταράξει τα λιπιδικά στρώματα. (122) (123)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Κρυσταλλογραφική μελέτη προϊόντος εγκλεισμού CBD/ β -CD

11.1 Κρυστάλλωση προϊόντος εγκλεισμού CBD σε β -CD

Υλικά

- CBD σε μορφή κρυστάλλων καθαρότητας 99% + 1% τερπένια, της εταιρείας Enecta
- β -CD σε μορφή άσπρης σκόνης, της εταιρείας Alfa aesar
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Ποτήρι ζέσεως 10 mL
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Lab Tech Daihan Labtech. Co)
- Αναλυτικός ζυγός
- Σπάτουλα
- Αλουμινόχαρτο
- Μηχανική πιπέτα 10 μ L
- Υδατόλουτρο

Πειραματική πορεία

Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αργής ψύξης. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για τη δημιουργία και ανάπτυξη κρυστάλλων των προϊόντων εγκλεισμού του CBD σε β -CD είναι η εξής:

- Σε ποτήρι ζέσεως με 2 mL ddH₂O αναμινύονται ποσότητες β -CD και CBD ζυγισμένες με ζυγό ακριβείας ώστε να ικανοποιούνται οι μοριακές αναλογίες που δίνονται αναλυτικά στον ακόλουθο Πίνακα 10.
- Ανακινούμε το ποτήρι ζέσεως μέσα στο υδατόλουτρο στους 70°C έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές και μετά το ποτήρι καλύπτεται με μεμβράνη parafilm
- Ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 2 ώρες

- Το γαλακτόχρουν διάλυμα του συμπλόκου τοποθετείται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Οι σωλήνες τοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 70°C και πραγματοποιείται σταδιακή ψύξη μέχρι τη θερμοκρασία των 23°C για χρονικό διάστημα 7 ημερών
- Η ελάττωση της θερμοκρασίας πραγματοποιείται 2 φορές την ημέρα και είναι της τάξης των 5°C τις πρώτες 3 μέρες του πειράματος, ενώ τις υπόλοιπες της τάξης των 4°C έως 2,5°C (Πίνακας 11)
- Μετά το πέρας του σταδίου ψύξης, τα δείγματα τοποθετούνται για μία μέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν σε δωμάτιο θερμοκρασίας 18°C, με σκοπό να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των κρυστάλλων και να διατηρηθούν χωρίς αλλοιώσεις.

Πίνακας 10: Οι ακριβείς ποσότητες και αναλογίες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την κρυστάλλωση των συμπλόκων

Μοριακή Αναλογία	Ποσότητα β-CD (mg)	Ποσότητα CBD (g)	Ποσότητα ddH ₂ O (mL)
1:1	31,3	8,2	2
1,5:1	31,0	5,7	2

Πίνακας 11: Χρονοδιάγραμμα σταδιακής μείωσης της θερμοκρασίας για τη παρασκευή των συμπλόκων

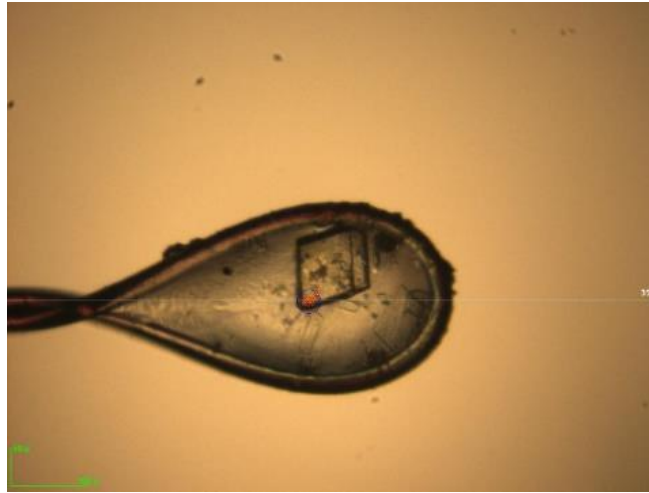
Ημερομηνία	Θερμοκρασία (°C)	Ώρα
13/10	70	12:00
13/10	65	18:30
14/10	60	20:00
14/10	55	18:30
15/10	50	12:30
15/10	45	19:15
17/10	42,5	19:15

17/10	39	18:00
18/10	37,5	20:00
18/10	35	19:00
19/10	32,5	19:00
19/10	30	18:00
20/10	28,5	20:00

11.2 Επιλογή κατάλληλου μονοκρυστάλλου προϊόντος εγκλεισμού CBD σε β -CD

Αρχικό βήμα είναι η επιλογή και τοποθέτηση στο γωνιόμετρο ενός κρυστάλλου υψηλής ποιότητας. Ο κρύσταλλος αρχικά ελέγχεται με οπτικό μικροσκόπιο ώστε να διαθέτει καθορισμένες γωνίες και επιφάνειες, να μην έχει ρωγμές και να μην είναι ενωμένος με άλλο κρύσταλλο. Το μέγεθος μπορεί να κυμαίνεται από 0,02 mm έως 0,2 mm.

Όταν επιλεγεί ο κατάλληλος κρύσταλλος, προσκολλάται με παραφινέλαιο το οποίο χρησιμεύει και ως κρυσπροστατευτικό του κρυστάλλου, στην θηλιά η οποία προσαρμόζεται στην κεφαλή του γωνιόμετρου και ο κρύσταλλος εστιάζεται με την δέσμη των ακτίνων-Χ. Ο προσδιορισμός της μοναδιαίας κυψελίδας γίνεται από τις λαμβανόμενες εικόνες περίθλασης για τρεις διαφορετικούς προσανατολισμούς του κρυστάλλου. Σύμφωνα με την μοναδιαία κυψελίδα και την πιθανή κρυσταλλογραφική συμμετρία ακολουθείται η κατάλληλη στρατηγική για τη συλλογή πλήρους σετ ανακλάσεων όπως προτείνεται από το κατάλληλο λογισμικό του οργάνου. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία ο χρήστης προχωρεί στην επεξεργασία των δεδομένων κατεβάζοντας το αρχείο με τις κατάλληλες πληροφορίες που συλλέχθηκαν.

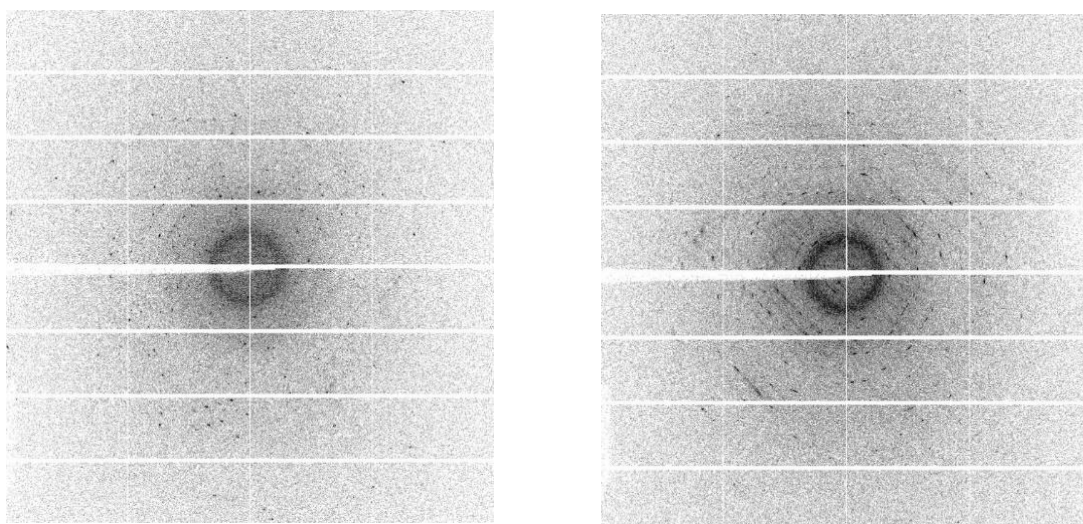


Εικόνα 22: Ο μονοκρύσταλλος προσκολλάται με παραφινέλαιο ή με άλλο κρυσταλλοπροστατευτικό διάλυμα πάνω σε θηλιά, η οποία προσαρμόζεται στην κεφαλή του γωνιομέτρου

11.3 Συλλογή Κρυσταλλογραφικών δεδομένων από περίθλαση ακτίνων-Χ και προσδιορισμός δομών

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ από μονοκρύσταλλο του συμπλόκου CBD/ β -CD πραγματοποιήθηκε με ακτινοβολία σύγχροτρον στο EMBL του Αμβούργου (Beamline P13, PETRA III storage ring, DESY, Hamburg, Germany).

Το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το *XDS* μέσω της αυτοματοποιημένης πλατφόρμας *autoPROC* 1.1.7. Το πρόγραμμα *AIMLESS* (version 0.7.7) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της ορθής ομάδας χώρου που κρυσταλλώνει το σύμπλοκο. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την επίλυση της δομής *SHELXD* (Sheldrick, 2008) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση της δομής *SHELXL2019/2* (Sheldrick, 2019). Με το πρόγραμμα *Mercury* πραγματοποιήθηκε η γεωμετρική ανάλυση της δομής του συμπλόκου εγκλεισμού και η σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής και της διευσθέτησης του συμπλόκου στον χώρο.



Εικόνα 23: Δύο εικόνες περίθλασης από κρύσταλλο συμπλόκου CBD/β-CD που συλλέχθηκαν με μετακίνηση του κρυστάλλου κατά 90° μεταξύ τους

Η μοναδιαία κυψελίδα είχε διαστάσεις $a = 19,3670$, $b = 24,5660$ και $c = 15,8850$ Å και ο όγκος της υπολογίστηκε στα $7125,6$ Å³. Η ομάδα χώρου της κρυσταλλικής δομής ορίστηκε $C2$ (Μονοκλινές κρυσταλλογραφικό σύστημα). Πληροφορίες για τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα και τη βελτιστοποίηση της κρυσταλλικής δομής παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Πειραματικές λεπτομέρειες, κρυσταλλογραφικά δεδομένα και βελτιστοποίηση δομής

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα	
Δεδομένα κρυστάλλου	
Χημική δομή	$2(C_{42}H_{70}O_{35}) \cdot C_{21}H_{24}O_2 \cdot 24.6(O)$
Μοριακό βάρος	2971.95
Κρυσταλλικό Σύστημα, Ομάδα χώρου	Μονοκλινές, $C2$
Θερμοκρασία συλλογής δεδομένων (K)	100
a, b, c (Å)	19.3670 (15), 24.5660 (18), 15.8850 (11)
β (°)	109.467 (5)
V (Å ³)	7125.6 (9)
Z	2
$F(000)$	3134
Υπολογισμένη πυκνότητα ($mg \cdot m^{-3}$)	1.385
Τύπος ακτινοβολίας	Σύγχροτρον, $\lambda = 0.7293$ Å
μ (mm^{-1})	0,13

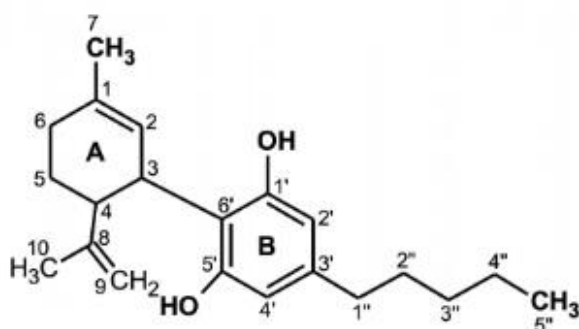
θ (°)	9,6-26,0
Διαστάσεις κρυστάλλου (mm)	0.83 × 0.71 × 0.50
Παράμετροι κυψελίδας	2428 ανακλάσεις
Σχήμα κρυστάλλου	Πρίσμα
Χρώμα κρυστάλλου	Άχρωμο
Συλλογή δεδομένων περίθλασης	
Περιθλασίμετρο	EIGER 16M
Μετρημένες ανακλάσεις, ανεξάρτητες ανακλάσεις, ανακλάσεις με κριτήριο [$I > 2\sigma(I)$]	59197, 13211, 11808
R _{int}	0.058
($\sin \theta/\lambda$) _{max} (Å ⁻¹)	0.610
θ _{max} , θ _{min} (°)	26.4, 1.4
Βελτιστοποίηση	
Μέθοδος	Ελάχιστα τετράγωνα
R [$F^2 > 2\sigma(F^2)$], wR(F ²), S	0.087, 0.260, 1.02
Αρ. ανακλάσεων	13211
Αρ. παραμέτρων	898
Αρ. περιορισμών	107
Προσδιορισμός θέσεων H	Υπολογιστικά
Χειρισμός ατόμων H	Χρήση περιορισμών
Δρ _{max} , Δρ _{min} (e Å ⁻³)	0.75, -0.51
(Δ/σ) _{max}	0.001
Προσδιορισμός απόλυτης δομής	H παράμετρος Flack x καθορίζεται με 5041 ζεύγη ανακλάσεων [(I+)-(I-)]/[(I+)+(I-)] (Parsons, Flack and Wagner, Acta Cryst. B69 (2013)
Απόλυτη παράμετρος δομής	-0.2 (3)

11.4 Περιγραφή της δομής. Κρυσταλλική διευθέτηση του προϊόντος εγκλεισμού

Η κανναβιδιόλη (C₂₁H₃₀O₂) είναι μια τερπενοφαινόλη με 21 άτομα άνθρακα και μοριακό βάρος 314,464 g/mol. Η χημική δομή της κανναβιδιόλης (Εικόνα 24) προσδιορίστηκε το 1963. Το ονομά της κατά IUPAC είναι 2- [(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl] -5-pentylbenzene-1,3-diol, επιπλέον η φυσική CBD είναι η (-)-CBD. Το μόριο της περιλαμβάνει ένα δακτύλιο κυκλοξενίου (A), ένα φαινολικό δακτύλιο (B) και μια πεντυλική πλευρική αλυσίδα. Ο τερπενικός

δακτύλιος (A) και ο αρωματικός δακτύλιος (B) βρίσκονται σε επίπεδα που είναι σχεδόν κάθετα μεταξύ τους.

Η χημική δραστηριότητα της CBD οφείλεται κυρίως στη θέση και στο περιβάλλον των υδροξυλομάδων στον φαινολικό δακτύλιο στις θέσεις C-1' και C-5' (B), καθώς και την ομάδα μεθυλίου στη θέση C-1 του δακτυλίου κυκλοεξενίου (A) και της πεντυλικής αλυσίδας στο C-3' του φαινολικού δακτυλίου (B). Ο ανοιχτός δακτύλιος στη θέση C-4 είναι ανενεργός (124).



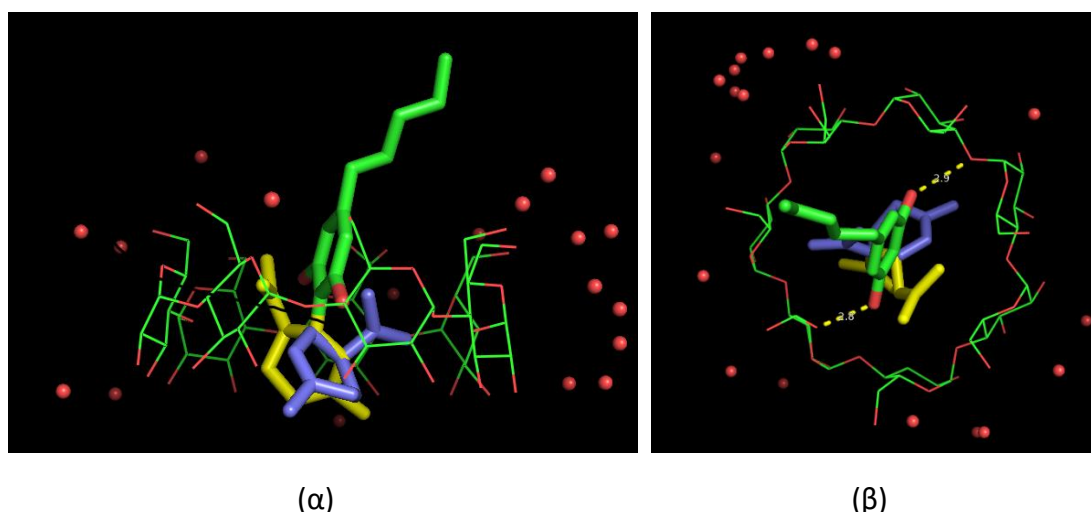
Εικόνα 24: Χημική δομή μορίου κανναβιδιόλης

Το σύμπλοκο CBD/ β -CD κρυσταλλώνει σε μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα και συγκεκριμένα στην ομάδα χώρου C2. Οι παράμετροι της μοναδιαίας κυψελίδας και περισσότερες πληροφορίες για την συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X που οδήγησαν στον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου συνοψίζονται στον Πίνακα 12. Η ασύμμετρη μονάδα της κρυσταλλικής δομής περιέχει ένα μόριο ξενιστή (β -CD) με κατάληψη 100%, ένα ξενιζόμενο μόριο (CBD) με κατάληψη 50% και 11,5 μόρια νερού καταναμεμένα σε 18 θέσεις (Εικόνα 25α).

Οι υδροξυλόμαδες της βενζενεδιόλης (δακτύλιος-B) της CBD δένονται με δεσμούς υδρογόνου με τα αιθερικά οξυγόνα της β -CD. Ο δακτύλιος-A κυκλοεξενίου της CBD εγκλωβίζεται στην εσωτερική κοιλότητα της β -CD προεξέχοντας από την ευρεία (δευτεροταγή) πλευρά της και βρίσκεται αποδιατεταγμένος σε δύο θέσεις (σημειώνονται με κίτρινο και μωβ χρώμα στην Εικόνα 25α) καθώς μπορεί να περιστρέφεται ελεύθερα γύρω από τον δεσμό των C3 – C6'. Τα μόρια νερού που περιβάλλουν το σύμπλοκο λειτουργούν μέσω υδρογονικών δεσμών ως «γέφυρες» για τη διεύθυνση των συμπλόκων στον κρύσταλλο (Εικόνα 27). Σύμφωνα με την

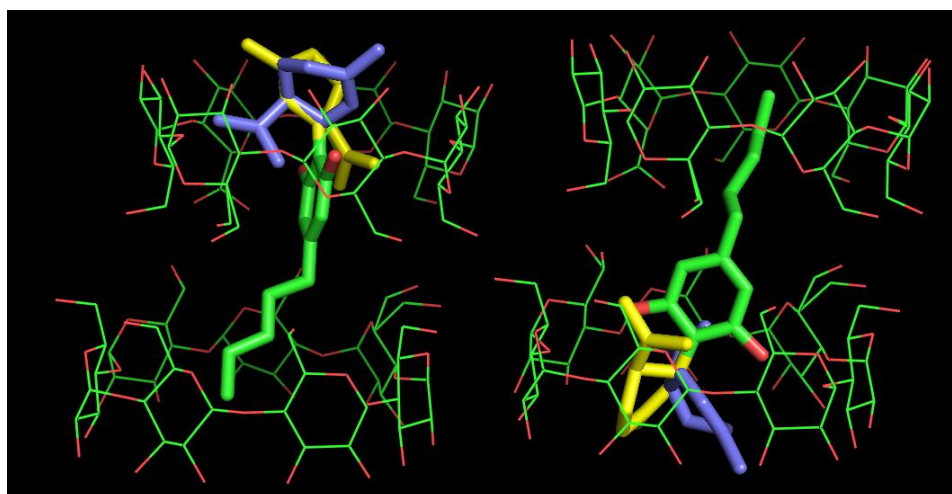
κρυσταλλογραφική συμμετρία (ομάδα χώρου C₂), ένα ξενιζόμενο μόριο CBD εγκλωβίζεται σε δύο διαδοχικά μόρια β-CD τα οποία διευθετούνται έτσι ώστε η στενή περιοχή του ενός (ουρά-tail) να βρίσκεται απέναντι από την στενή περιοχή του άλλου. Με τον τρόπο αυτό τα ξενιζόμενα μόρια CBD συγκρατούν διμερή β-CD τα οποία διευθετούνται με τον τύπο «ουρά προς ουρά» (tail-to-tail mode).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, γειτονικά διμερή μπορούν να περιέχουν ξενιζόμενη CBD με αντι-παράλληλο προσανατολισμό, πάντως είναι σαφές ότι η στοιχειομετρία ξενιζομένου:ξενιστή είναι 1:2 για το σύμπλοκο στην κρυσταλλική κατάσταση. Ο σχηματισμός συμπλόκων 1:2 φαίνεται να συμβαίνει και στο διάλυμα καθώς το προφίλ του διαγράμματος φάσης διαλυτότητας (Σχήμα 20) είναι τύπου B_s. Επιπλέον, δεδομένης της ικανότητας των β-CD να σταθεροποιούνται όταν έχουν εγκλείσει ξενιζόμενο μόριο κατάλληλου μεγέθους και σχήματος (125) και να συνδέονται με υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ των δευτεροταγών υδροξυλίων τους (σχηματισμός διμερών τύπου «κεφαλής προς κεφαλή» head-to-head mode), φαίνεται ότι υπάρχει έντονη τάση συσσωμάτωσης των συμπλόκων CBD/β-CD, γεγονός που ερμηνεύει τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα του συμπλόκου όπως φαίνεται και από τη μελέτη φάσης διαλυτότητας (Σχήμα 20). Η μοριακή διευθέτηση των συμπλόκων στον κρύσταλλο επιτυγχάνεται με το σχηματισμό καναλιών κατά τον κρυσταλλογραφικό άξονα c τα οποία διευθετούνται αντιπαράλληλα στο επίπεδο ab (Εικόνα 27).

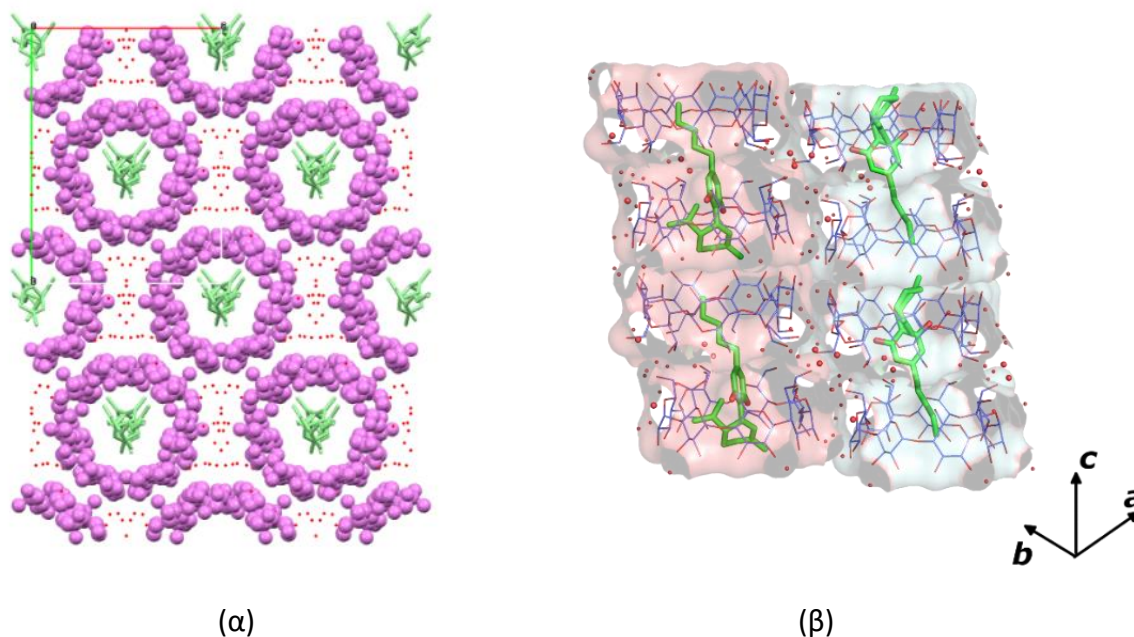


Εικόνα 25: (α) Ασύμμετρη μονάδα της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου CBD/β-CD. Για την ευκρίνεια της εικόνας παραλείπονται τα άτομα υδρογόνου. Με κόκκινα σφαιρίδια αναπαρίστανται τα μόρια νερού (θέσεις οξυγόνου). Οι δύο θέσεις αποδιάταξης του δακτυλίου-A της CBD σημειώνονται με κίτρινο και μωβ χρώμα. (β)

Υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των υδροξυλομάδων του δακτυλίου-B της CBD με την β-CD.



Εικόνα 26: Εγκλωβισμός ενός μορίου CBD στην κοιλότητα διμερούς β-CD τύπου «ουράς προς ουρά». Γειτονικά διμερή μπορούν να περιέχουν ξενιζόμενη CBD με αντιπαράλληλο προσανατολισμό. Η στοιχειομετρία ξενιζομένου ξενιστή είναι 1:2 για το σύμπλοκο στην κρυσταλλική κατάσταση.



Εικόνα 27: (α) Η μοριακή διεύθυνση του συμπλόκου CBD/β-CD στον κρύσταλλο. Τα σύμπλοκα στοιβάζονται κατά μήκος του κρυσταλλογραφικού άξονα c σχηματίζοντας κανάλια (channel mode, CH) (β) Η κάτοψη κατά το *ab* επίπεδο και οι γέφυρες υδρογόνου που σχηματίζουν τα νερά μεταξύ τους και με τα μόρια των κυκλοδεξτρινών.

Συμπεράσματα και συζήτηση

Στο πρώτο μέρος αυτής της μελέτης, λήφθηκε το εκχύλισμα από *Cannabis sativa* L. με δυο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης, με τη μέθοδο Soxhlet και σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με HPLC, όπου προκύπτει για το εκχύλισμα Soxhlet 0,7 %w/w CBD, ποσοστό χαμηλότερο από το αναμενόμενο. Με μια σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση, πιθανότατα, αυτό να οφείλεται σε λάθος τεχνικές αποθήκευσης του φυτικού υλικού ή σε λάθος χειρισμούς κατά την ανάλυση (μέθοδος εκχύλισης, διαλύτες κλπ). Στην εκχύλιση Soxhlet αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλα χρονικά διαστήματα, με αποτέλεσμα την καταστροφή μέρους των κανναβινοειδών. Σε αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων εκχύλισης CBD από *Cannabis sativa* L., δοκιμάστηκε η εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Η RM-β-CD απέδωσε 3,2 %w/w (διαλ. EtOH: H₂O, 60:40) και 3,1 %w/w (διαλ. H₂O) σε 1 g φυτικό υλικό, ενώ η HP-β-CD έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με 2,6 %w/w σε 0,32 g φυτικό υλικό.

Επιπλέον, λήφθηκε το αιθέριο έλαιο με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης σε συσκευή Clevenger με απόδοση 0,01 mL/100g φυτικού υλικού και πραγματοποιήθηκε ανάλυση GC/MS για την εύρεση του χημειοτύπου. Ταυτοποιήθηκαν 75 ενώσεις, που αντιστοιχούν στο 98,92% του αεριοχρωματογραφικού (GC) προφίλ. Κυρίαρχες ενώσεις βρέθηκαν οι β-μυρκένιο με 14,76% και α-πινένιο με 14,64%.

Τα εκχυλίσματα, το αιθέριο έλαιο καθώς και η πρότυπη CBD και το συμπλοκό της με RM-β-CD ελέγχθηκαν και ως προς την συνολική φαινολική περιεκτικότητα και αντιοξειδωτική δράση. Η περιεκτικότητα σε φαινόλες ελέγχθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, τα αποτελέσματα κυμαίνονται μεταξύ 2,65-4,4 mg GAE/mL για τα εκχυλίσματα με υψηλότερο το εκχύλισμα που λήφθηκε Soxhlet (4,4 mg GAE/mL), ενώ για το αιθέριο έλαιο ήταν 2,48 mg GAE/mL. Η εκχύλιση με RM-β-CD ήταν 2,65 mg GAE/mL για διαλύτη EtOH:H₂O (60:40) και 3,45 mg GAE/mL για διαλύτη H₂O.

Η αντιοξειδωτική δράση ελέγχθηκε με δυο διαφορετικές μεθόδους. Με τη μέθοδο DPPH, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων κυμαίνεται από 4-7,5 mM Trolox/mL. Το εκχύλισμα Soxhlet είχε τη μικρότερη αντιοξειδωτική δράση (4 mM Trolox/mL), ενώ το εκχύλισμα με διαλύτη EtOH:H₂O (60:40) την υψηλότερη (7,5 mM

Trolox/mL). Την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα είχε το αιθέριο έλαιο με 14,4 mM Trolox/mL. Παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο RM-β-CD/CBD (0,12 mM Trolox/mL) είχε βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τη καθαρή CBD (0,09 mM Trolox/mL). Συμπερασματικά, η κυκλοδεξτρίνη RM-β-CD βελτίωσε την αντιοξειδωτική δράση τόσο των εκχυλισμάτων όσο και της CBD.

Όσον αφορά τη μέθοδο ABTS, τα αποτελέσματα κυμαίνονται μεταξύ 99-245,5 mM Trolox/mL για τα εκχυλίσματα. Το εκχύλισμα που λήφθηκε με Soxhlet παρουσιάζει 99 mM Trolox/mL. Ενώ η εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα 239,5 mM Trolox/mL για διαλύτη EtOH:H₂O (60:40) και 245,5 mM Trolox/mL για διαλύτη H₂O. Το αιθέριο έλαιο είχε επίσης υψηλή αντιοξειδωτική δράση (96,8 mM Trolox/mL). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η κυκλοδεξτρίνη RM-β-CD βελτίωσε την χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα της CBD από 1,18 σε 3,34 mM Trolox/mL.

Το βασικό μέρος της παρούσας μελέτης ήταν η παρασκευή προϊόντων εγκλεισμού της CBD σε β-κυκλοδεξτρίνη με στόχο την βελτίωση των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες φάσης διαλυτότητας για τα σύμπλοκα εγκλεισμού σε διάλυμα και κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής.

Το διάγραμμα διαλυτότητας φάσης έδειξε ότι η διαλυτότητα της CBD υπό τον εγκλεισμό της σε β-CD μπορεί να αυξηθεί περίπου 29 φορές. Εντούτοις, το σύμπλοκο CBD/β-CD παρουσιάζει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, η οποία μειώνεται περαιτέρω παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων β-CD, γεγονός που ερμηνεύεται από τη δομή του όπως προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά.

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ παρέχει μοναδικές και ακριβείς πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου εγκλεισμού, αποκαλύπτοντας τη στοιχειομετρία ξενιστή-ξενιζόμενου και τον τρόπο εγκλεισμού. Στην παρούσα μελέτη, η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CBD/β-CD αποκάλυψε τον εγκλεισμό ενός μορίου CBD στην υδρόφοβη κοιλότητα που σχηματίζεται από δύο μόρια β-CD (στοιχειομετρία συμπλόκου 1:2) τα οποία διευθετούνται με τις στενές περιοχές τους αντικρουστά. Η CBD συγκρατείται ισχυρά στην κοιλότητα του διμερούς, δημιουργώντας ένα αρκετά

σταθερό σύμπλοκο, καθώς τα υδροξύλια της “αγκιστρώνονται” μέσω υδρογονικών δεσμών με τη β -CD ενώ το υπόλοιπο τμήμα της αναπτύσσει πολυαριθμές αλληλεπιδράσεις van der Waals με τους ξενιστές. Επιπλέον, οι ευρείες περιοχές των ξενιστών συναρμολογούνται μεταξύ τους με υδρογονικούς δεσμούς, σχηματίζοντας νανοσωλήνες και τελικά, μέσω επιπλέον πολυάριθμων C-H...O και H...H αλληλεπιδράσεων μεταξύ κοντινών ξενιστών, συσσωματώματα που ερμηνεύουν τη χαμηλή διαλυτότητα του συμπλόκου.

Ένα ακόμη μέρος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση της αντικαρκινικής δράσης με τη μέθοδο MTT, των CBD, β -CD, β -CD/CBD, HP- β -CD, HP- β -CD/CBD *in vitro* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές νευροβλάστωματος SH-SY5Y και SK-N-SH. Η CBD είναι εξαιρετικά λιπόφιλη, επομένως ένα μόριο ξενιστής, όπως οι κυκλοδεξτρίνες, είναι απαραίτητη για την αποδοτική, στοχευμένη μεταφορά και αργή αποδέσμευση του φαρμάκου που οδηγεί σε αύξηση της πρόσληψης *in vitro* από τα καρκινικά κύτταρα. Η κυτταροτοξικότητα ελέγχθηκε στις 48 και 72h.

Στη βιωσιμότητα των SK-N-SH κυττάρων, οι 72h έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τις 48h έκθεσης των κυττάρων στο φάρμακο. Η CBD παρουσίασε κυτταροτοξικότητα για $c \geq 0,01625$ mM, ενώ η β -CD παρουσίασε κυτταροτοξικότητα για $c \geq 0,0325$ mM. Το σύμπλοκο β -CD/CBD βοήθησε στη κυτταροτοξικότητα της CBD. Επίσης η δραστηριότητα του CBD βελτιώθηκε με την HP- β -CD, τα σύμπλοκα ήταν περισσότερο κυτταροτοξικά σε σχέση με τη CBD διαλυμένη σε DMSO για $c \geq 0,01625$ mM σε 48h.

Για την κυτταρική σειρά SH-SY5Y έγινε δοκιμή για το CBD και τα σύμπλοκα CBD *in vitro*. Η αδέσμευτη CBD παρουσίασε χαμηλή βιωσιμότητα για συγκεντρώσεις από 0,004-0,065 mM. Η β -CD παρουσίασε κυτταροτοξική δράση για $c \geq 0,01625$ mM στις 48 και 72h. Στο σύμπλοκο β -CD/CBD για $c=0,004$ mM και $c=0,008$ mM παρατηρήθηκε βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με τη β -CD ειδικά στις 48h. Η HP- β -CD δεν παρουσίασε σπουδαία κυτταροτοξικότητα, ενώ το σύμπλοκο HP- β -CD/CBD παρουσίασε βελτιωμένη κυτταροτοξικότητα σε συγκέντρωση 0,004-0,065 mM από την αδέσμευτη CBD στις 48h. Η HP- β -CD βοήθησε καλύτερα την κυτταροτοξική δράση της CBD σε σχέση με τη β -CD και σε αυτήν τη κυτταρική σειρά.

Παρόλο που οι CDs φαίνεται να έχουν κάποια κυτταροτοξική δράση, φαίνεται η αντικαρκινική δράση δεν οφείλονται αποκλειστικά στις CDs αλλά αυξήθηκε στη περίπτωση των συμπλόκων με CBD. Στη παρούσα μελέτη η β -CD ήταν κυτταροτοξική για $c \geq 0,01625$ mM σε SH-SY5Y, και $c \geq 0,0325$ mM. Στην SK-N-SH κυτταρική σειρά, η HP- β -CD μείωσε ελαφρώς τη βιοδιαθεσιμότητα των κυττάρων για $c = 0,065$ mM. Επομένως μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι CDs παρουσιάζουν κάποια αντικαρκινική δράση από μόνες τους και συμβάλουν διπλά, καθώς μεταφέρουν αποδοτικά το φάρμακο αλλά και βοηθούν στην υπάρχουσα αντικαρκινική δράση του φαρμάκου.

Η *Cannabis sativa* L. αποτελεί πρώτη ύλη για ανεξάντλητη έρευνα εξαιτίας των φαρμακολογικών της ιδιοτήτων. Μελλοντικά η έρευνα θα μπορούσε να εστιαστεί στη σύγκριση συμβατικών μεθόδων εκχύλισης όπως η εκχύλιση Soxhlet με εναλλακτικές μεθόδους εκχύλισης όπως η εκχύλιση σε υδατικό διάλυμα κυκλοδεξτρινών. Προσθέτοντας CDs στο εκχύλισμα Soxhlet, ώστε να συγκριθεί η ποσότητα του CBD πριν και μετά τη δέσμευση από τις CDs. Επίσης χρήση διαφορετικών διαλυτών για τις εκχυλίσεις μπορεί να δοκιμαστεί και σύγκριση των αποτελεσμάτων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης της CBD.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης αξιολογήθηκε το αιθέριο έλαιο ως προς τη χημική σύσταση, τη φαινολική περιεκτικότητα και την αντιοξειδωτική του δράση. Στο μέλλον θα μπορούσε να επιχειρηθεί και ο εγκλεισμός συστατικών του αιθερίου ελαίου και έλεγχος της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής του δράσης, καθώς κυρίως σε ενώσεις που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (καρυοφυλλένιο, μυρκένιο κλπ.) φαίνεται να οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση της κάνναβης.

Η κάνναβη ενδείκνυται κυρίως για νευρολογικές διαταραχές, στη παρούσα μελέτη ερευνάται η αντικαρκινική της δράση. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν την αντικαρκινική δράση του CBD μόνο του ή σε συνδυασμό με υπάρχουσες θεραπείες, ωστόσο συστηματικές κλινικές μελέτες που προσδιορίζουν την ασφάλεια και αποδοτικότητα του φαρμάκου, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν σε μεγαλύτερη έκταση για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

Βιβλιογραφία

1. Farag, S., Kayser, O. The Cannabis Plant: Botanical Aspects. Handbook of Cannabis and Related Pathologies. s.l. : Elsevier, 2017.
2. Raman, V., Lata, H., Chandra, S., Khan, Ikhlas A., ElSohly, M. Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa* L.). 2017.
3. Strzelczyk M., Lochynska M., Chudy M. Systematics and Botanical Characteristics of Industrial Hemp *Cannabis Sativa* L. Journal of Natural Fibers. 2021.
4. Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. Journal of Ethnopharmacology. 2018, 227, pp. 300-315.
5. Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., Merendino, N. The Seed of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. Nutrients. 2020, 1935, 12.
6. Salehi, A., Puchalski, K., Shokoohinia, Y., Zolfaghari, B., Asgary, S. Differentiating Cannabis Products: Drugs, Food, and Supplements. Front. Pharmacol. 06 27, 2022, Vol. 13.
7. Mnekin, L., Lionel, R. Topical Use of *Cannabis sativa* L. Biochemicals. Cosmetics. 8(3), 85, 2021.
8. Sorrentino, G. Introduction to emerging industrial applications of cannabis (*Cannabis sativa* L.). Cannabis and Cannabinoids. 2021, Vol. 32, pp. 233–243.
9. Τσαλίκη, Ε., Καλύβας, Α. Βιομηχανική κάνναβη – μια νέα καλλιέργεια στην Ελλάδα. ΕΛΓΟ–ΔΗΜΗΤΡΑ. 19, σσ. 6-7.
10. FDA (Food and Drug Administration). FDA and Cannabis: Research and Drug Approval Process. <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-and-cannabis-research-and-drug-approval-process>. [Ηλεκτρονικό] 24 02 2023. [Παραπομπή: 21 05 2023.]
11. Jiangling P., Mingjie F., Chelsea A., Feng N., Wendong H., Jiankang L. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). 2022, 130, 4, pp. 439 - 456.
12. Health Canada. Industrial hemp regulations and amendment to schedule ii of the controlled drugs and substances. 1989.
13. Commission Regulation (EC) No 1177/2000. Official journal of the European communities. 2000.
14. Commission Implementing Regulation (EC) No 809/2014. Article 45 on Verification of the tetrahydrocannabinol content in hemp. 2014.
15. ΦΕΚ Α'74/20.3.2013. Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής δημοκρατίας. Α', 20 03 2013, σσ. 961-992.

16. ΦΕΚ 2238/Β/29-6-2017. Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής δημοκρατίας. Β', 29 06 2017, σσ. 22673-22676.
17. ΦΕΚ 41/Α/7-3-2018. Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής δημοκρατίας. Α', 07 03 2018, σσ. 6591-6594.
18. ΦΕΚ 2756/Β/25-4-2023. Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής δημοκρατίας. 25 04 2023, σσ. 27839-27850.
19. ΦΕΚ Α' 83/24-5-2021. Εφημερίδα της κυβερνήσεως της Ελληνικής δημοκρατίας. 24 05 2021.
20. Degenhardt F., Stehle F., Kayser O. The Biosynthesis of Cannabinoids. Handbook of Cannabis and Related Pathologies. s.l. : Elsevier, 2017.
21. Andre, C., Hausman, J. F., Guerriero, G. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. Frontiers in plant science. 2016, 7, 19.
22. Wang M., Wang Y. H., Avula B., Radwan M. M., Wanas A. S., Antwerp J., Parcher J. F., ElSohly M. A., Khan I. A. Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. Cannabis and cannabinoids research. 2016, 1, pp. 262-271.
23. Odieka A. E., Obuzor G. U., Oyedeji O. O., Gondwe M., Hosu Y. S., Oyedeji A. O. The Medicinal Natural Products of *Cannabis sativa* Linn.: A Review. Molecules. 2022, 27, 5.
24. Chayasirisobhon, S. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. Perm J. 2020.
25. ΕΟΦ (Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων). Πυρήνας Περίληψης Χαρακτηριστικών Τελικών Προϊόντων Φαρμακευτικής Κάνναβης. s.l. : ΚΥΑ: Αριθμός Δ3(γ)52588 16.7.2018, 2022.
26. Schweikle S., Golombek P., Sproll C., Walch S. G., Lachenmeier D.W. The Challenge of Risk Assessment of Tetrahydrocannabinol (THC) in Cannabidiol (CBD) Oils and Food Supplements: An Approach for Deriving Maximum Limits. Challenges. 2022, 13, 32.
27. World Health Organization (WHO). Cannabidiol (CBD). Geneva : s.n., 2018.
28. Pertwee, R. Handbook of cannabis. s.l. : Oxford University Press, 2016, p. 784.
29. Bautista, J., Yu, S., Tian, Li. Flavonoids in Cannabis sativa: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology. ACS Omega. 2021.
30. Barrales C., Hebert J., Lopez V., German L., Reyes C., Cetina-Alcala, Victor M., Vasquez-Garcia I., Diaz L., Oscar F., Herrera C., Braulio E. Chemical Characteristics, Therapeutic Uses, and Legal Aspects of the Cannabinoids of Cannabis sativa: A Review. Human and Animal Health. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2020, 63.
31. Piscitelli, F., Di Marzo, V. Cannabinoids: a class of unique natural products with unique pharmacology. Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali 32. 2021, pp. 5-15.
32. Haustrate A., Prevarskaya N., V'yacheslav L. Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. Cells. 2020, 9, 2, p. 317.

33. Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, Katz R, Di Marzo V, Jutras-Aswad D, Notcutt WG, Martinez-Orgado J, Robson PJ, Rohrback BG, Thiele E, Whalley B, Friedman D. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*. 55(6), 2014, pp. 791-802.
34. Britch, S., C., Babalonis, S., Walsh, S. L. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology*. 2020.
35. Seegehalli M. A., Hadar P., Hinanit K. Medical Cannabis Activity Against Inflammation: Active Compounds and Modes of Action. *Front Pharmacol*. 13:908198, 2022.
36. Morgan, Celia J.A, Das, Ravi K., Joye, Alyssa, Curran, Valerie H., Kambo, Sunjeev K. Cannabidiol reduces cigarette consumption in tobacco smokers: Preliminary findings. *Addictive Behaviors* 38. 2013, pp. 2433–2436.
37. Gulluni, N., Re, T., Loiacono, I., Lanzo, G., Luigi, G., Macchi, C., Epifani, F., Bragazzi, N., Firenzuoli, F. annabis Essential Oil: A Preliminary Study for the Evaluation of the Brain Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018, 18, p. 11.
38. Seltzer, E. S., Watters, A. K., MacKenzie J., D., Granat, L., M., Zhang, D. Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers*. 2020, 12, 3203.
39. Dall' Stella, P. B., Docema, M. F. L., Maldaun, M. V. C., Feher, O., Lancellotti, C. L. P. Case Report: Clinical Outcome and Image Response of Two Patients With Secondary High-Grade Glioma Treated With Chemoradiation, PCV, and Cannabidiol. *Front. Oncol*. 2019, 8.
40. Likar, R., Koestenberger, M., Stultschinig, M., Nahler, G. Concomitant Treatment of Malignant Brain Tumours With CBD - A Case Series and Review of the Literature. *Anticancer Res*. 2019, 39, pp. 5797-5801.
41. Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M. P., Parolaro, D. Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004, pp. 838-845.
42. Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., Skrzydlewska, E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*. 2020, 9, 1.
43. Leeuwenhoek, A. Antibacterial activity of A9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. 1976, pp. 9-12.
44. Wassmann, C.S., Hojrup, P., Klitgaard, J.K. Cannabidiol is an effective helper compound in combination with bacitracin to kill Gram-positive bacteria. *Sci. Rep*. 2020.
45. Farha, M. A., Halfawy, O. M., Gale, R. T., MacNair, C. R., Carfrae, L. A., Zhang, X., Jentsch, N. G., Magolan, J., Brown, E. D. Uncovering the Hidden Antibiotic Potential of Cannabis. *Infectious Diseases*. 2020, pp. 338-346.
46. Lima, P. S., Lucchese, A., Araujo-Filho, H. G., Menezes, P., P., Araujo, A. A. S., Quintans-Junior, L. J., Quintans, J. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation,

characterization and Pharmacological Approaches. *Carbohydrate Polymers* 151. 2016, pp. 965-987.

47. Conceicao, J., Adeoye, O., Cabral-Marques, H., Sousa, L., Jose, M. Cyclodextrins as Drug Carriers in Pharmaceutical Technology: The State of the Art. *Current Pharmaceutical Design*. 2018, Vol. 24, 13, pp. 1405-1433.

48. Martin Del Valle, E. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39. 2004, pp. 1033–1046.

49. Gidwani, B., Vyas, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Research International*. 2015.

50. Yousaf, R., Razzaq, F. A., Asghar, S., Irfan, M., Khan, I. U., Khalid, S. H. Cyclodextrins: An Overview of Fundamentals, Types, and Applications. s.l. : IntechOpen, 2023.

51. Cid-Samamed, A., Rakmai, J., Mejuto, Juan C., Gandara, J. S., Astray, G. Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications. *Food Chemistry* 384. 2022.

52. Watson, M. A., Lea, J. M., Bett-Garber, K. L. Spray drying of pomegranate juice using maltodextrin/cyclodextrin blends as the wall material. *Food Science & Nutrition*. 2017, 5, 3, pp. 820-826.

53. Cheirsilp, B., Rakmai, J. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biology, Engineering and Medicine*. 2016, 2, 1, pp. 1-6.

54. Da Silva Junior, W. F., Oliveira Pinheiro, J. G., Moreira, C. D., Souza, F. J., Lima, A. A. N. Alternative Technologies to Improve Solubility and Stability of Poorly Water-Soluble Drugs. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. 2017, pp. 281-305.

55. Χριστοφορίδης, Η., Τσορτέκη, Φ. Κρυστάλλωση κυκλοδεξτρινών και συμπλόκων τους με γεωργικής σημασίας χημικές ουσίες. Αθήνα : ΓΠΑ, 2017.

56. Millar, S. A., Maguire, R. F., Yates, A. S., O'Sullivan, S. E. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). *Pharmaceuticals*. 2020, pp. 1-15.

57. Mannila, J., Jarvinen, T., Jarvinen, K., Jarho, P. Precipitation Complexation Method Produces Cannabidiol/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex Suitable for Sublingual Administration of Cannabidiol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, 96, 2, pp. 312-319.

58. Pang, L., Zhu, S., Jinqiu, Z., L., Liu, Yijing O., Ge, Li, R., Wang, Y., L., Y., Jin, X., Du, L., Jin, Y. Intranasal temperature-sensitive hydrogels of cannabidiol inclusion complex for the treatment of post-traumatic stress disorder. *Acta Pharmaceutica Sinica* . July 2021, 11, 7, pp. 2031-2047.

59. Hang Li, Sen-Lin Chang, Tan-Ran Chang, Ying You, Xiao-Dong Wang, Li-Wei Wang, Xiao-Fan Yuan, Ming-Hui Tan, Pei-Dong Wang, Peng-Wei Xu, Wei-Bo Gao, Qing-Sheng Zhao, Bing Zhao. Inclusion complexes of cannabidiol with β -cyclodextrin and its derivative: Physicochemical properties, water solubility, and antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*. 2021, 334.

60. Stefkov, G., Karanfilova, I. Cvetkovikj, G., V., S., Trajkovska, A., Geskovski, N., Karapandzova, M., Kulevanova, S. Analytical Techniques for Phytocannabinoid Profiling of Cannabis and Cannabis-Based Products—A Comprehensive Review. *Molecules*. 2022, 27, 975.
61. Moreno-Sanz, G., Vera, F. C., Sanchez-Carnerero, C., Roura, X. N., Medina B., Sanchez V. Biological Activity of Cannabis sativa L. Extracts Critically Depends on Solvent Polarity and Decarboxylation. *Separations*. 2020, 7, 4.
62. Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., Cannazza, G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147. 2018, pp. 565-579.
63. Lazarjani, M. P., Young, O., Kebede, L., Seyfoddin, A. Processing and extraction methods of medicinal cannabis: a narrative review. *Journal of Cannabis Research* 3. 2021, 32.
64. Berk, Z. Extraction. *Food Process Engineering and Technology*. s.l. : Academic Press, 2018, 3, pp. 289-310.
65. Sovova, H., Aleksovski, S. A. Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006, 21, 6, pp. 881-889.
66. Sadgrove, N. J., Jones, G., Lloyd. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*. 2015, pp. 48-102.
67. Χατζηιωάννου, Θ. Π., Κουππάρη, Μ. Α. Ενόργανη Ανάλυση. Αθήνα : Πανεπιστημίου Αθηνών, 2015.
68. Skoog, D. A., Holler, J. F., Crouch, S. R. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης. [μεταφρ.] Μιλτιάδης Ι. Καραγιάννης και Κωνσταντίνος Ηλ. Ευσταθίου. s.l. : Κωσταράκη, 2007. Τόμ. 3. 978-960-99858-1-9.
69. Lazarjani, M. P., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, C., Young, O., Seyfoddin, A. Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. *Journal of Cannabis Research*. 2020, 2, 35.
70. Sunil, A., Anju, G., Rajat, V. HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. *Organic and Medicinal Chemistry*. 2018, 6, 5.
71. Harris, D. C. Ποσοτική χημική ανάλυση. s.l. : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2010. Τόμ. 2. 9789605242817.
72. Govinda V., Manish M. Development and Optimization of UV-Vis Spectroscopy- A review. 2018, 7, 11, pp. 1170-1180.
73. Berthomieu, C. και Hienerwadel, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res*. 2009, pp. 157–170.
74. Ζουμπούλης, Α., Καραπάντσιος, Θ., Μάτης, Κ., Μαύρος, Π. Στοιχεία Φυσικών Διεργασιών. Αθήνα : Τζιόλα, 2009. 978-960-418-201-5.
75. Atkins, P., De Paula, J. Φυσικοχημεία. [επιμ.] Γιάννης Κωτσόπουλος. [μεταφρ.] Σπ. Αναστασιάδης, και συν. Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2015. 978-960-524-431-6.

76. Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L., Stryer, Lubert, Gatto, Gregory J. Βιοχημεία. [ed.] Αζαρίας Καραμανλίδης and Γεώργιος Παπαδόπουλος. s.l. : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2012. Vol. 7. 978-960-524-432-3.
77. Τερζάκης, Σ., Τρικαλίτης, Π. Εισαγωγή στην περίθλαση ακτίνων-Χ για τον προσδιορισμό της ατομικής δομής στερεών από μονοκρυστάλλους. 2020. Τόμ. 1.
78. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr C Struct Chem*. 2015, 71, pp. 3–8.
79. Labb M., Palmer R. *Structure Determination by X-ray Crystallography*. New York : Plenum Publishers, 2003. 4.
80. Giacovazzo, C., Monaco, H., Viterdo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G., Catti, M. *Fundamentals of Crystallography*. s.l. : Oxford University Press, 2011. 3.
81. Lanhai L., Lihong Z., Wai M., Sen M., Wai Y., Tai D., Jie X. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*. 2012, 26, 4, pp. 636-644.
82. Folin, O., Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem*. 1927, 73, pp. 627–650.
83. Munteanu, I. G., Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22, 3380.
84. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 1995, 28, pp. 25-30.
85. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates". *Clinical Science*. 1993, 84, pp. 407-412.
86. Agarwal, C., Mathe, K., Hofmann, T., Csoka, L.,. Ultrasound-Assisted Extraction Of Cannabinoids From Cannabis sativa L. optimized by response surface methodology. *J Food Sci*. 2018, pp. 700-710.
87. Fiorini, D., Scortichini, S., Bonacucina, G., Greco, N.G., Mazzara, E., Petrelli, R., Torresi, J., Maggi, F., Cespi, M. Cannabidiol-enriched hemp essential oil obtained by an optimized microwave-assisted extraction using a central composite design. *Ind. Crop. Prod*. 2020, 154.
88. Attard, T.M., Bainier, C., Reinaud, M., Lanot, A., McQueen-Mason, S.J., Hunt, A.J. Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Ind. Crop. Prod*. 112, 2018, pp. 38–46.
89. Kargili, U., Aytaç, E. Soxhlet Extraction of Cannabinoids (CBD and THC) From Four Different Strains of Cannabis Grown in Four Different Regions. *Research Square*. 2021.
90. Hang Li, Qing-Sheng Zhao, Li-Wei Wang, Sen-Lin Chang, Pei-Dong Wang, Bing Zhao. Optimization of cyclodextrin-assisted green extraction of cannabidiol from industrial hemp leaves: Release behavior, permeability, bioactivity and stability. *Industrial Crops & Products*. 2022.
91. Azmir J. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J food Eng*. 2013, 117(4) pp. 426–36.

92. Lewis-Bakker M. M, Yang Y, Vyawahare R, Kotra L. P. Extractions of medical cannabis cultivars and the role of decarboxylation in optimal receptor responses. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2019, 4(3) pp. 183–94.
93. Mediavilla, V., Steinemann, S. Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. *J. Int. Hemp Assoc.* 1997, 4, 80.
94. Abdollahi M., Sefidkon F., Calagari M., Mousavi A., Mahomoodally M. F. Impact of four hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties and stage of plant growth on yield and composition of essential oils. *Ind. Crops Prod.* 2020.
95. Meier, C., Mediavilla, V. Factors influencing the yield and the quality of hemp essential oil. *J. Int. Hemp Assoc.* 1998, 5, pp. 16–20.
96. Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biovati, B., Monti, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia.* 2010, pp. 413-419.
97. Ascrizzi, R., Iannone, M., Cinque, G., Marianelli, A., Pistelli, L., Flamini, G. Hemping” the drinks: Aromatizing alcoholic beverages with a blend of *Cannabis sativa* L. flowers. *Food Chem.* 2020, 325.
98. Menghini, L., Ferrante, C., Carradori, S., D' Antonio, M., Orlando, G., Cairone, F., Cesa, S., Filippi, A., Frascetti, C., Zengin, G. Chemical and Bioinformatics Analyses of the Anti-Leishmanial and Anti-Oxidant Activities of Hemp Essential Oil. *Biomolecules.* 2021, 11, 272.
99. Vuerich, M., Ferfuia, C., Zuliani, F., Piani, B., Sepulcri, A., Baldini, M. Yield and Quality of Essential Oils in Hemp Varieties in Different Environments. *Agronomy.* 2019.
100. Pieracci, Y., Ascrizzi, R., Terreni, V., Pistelli, L., Flamini, G., Bassolino, L., Fulvio, F., Montanari, M., Paris, R. Essential Oil of *Cannabis sativa* L: Comparison of Yield and Chemical Composition of 11 Hemp Genotypes. *Molecules.* 2021, 26.
101. Naz, S., Asif Hanif, M., Bhatti, H. N., Ansari, T. M. Impact of Supercritical Fluid Extraction and Traditional Distillation on the Isolation of Aromatic Compounds from *Cannabis indica* and *Cannabis sativa*. Taylor and Francis. 2017, pp. 175 - 184.
102. Drinić Z., Vidović S., Vladić J., Koren A., Kiproviski B., Sikora V. Effect of extraction solvent on total polyphenols content and antioxidant activity of *Cannabis sativa*. 2018, pp. 17-21.
103. Ahmed, M., Qin, P., Gu Z., Liu, Y., Sikandar, A., Iqbal, M. F., Javeed, A. Phytochemical screening, total phenolic and flavonoids contents and antioxidant activities of *Citrullus colocynthis* L. and *Cannabis sativa* L. *Applied Ecology and Environmental Research.* 2019, pp. 6961-6979.
104. Rozanc, J., Kotnik, P., Milojevic, M., Gradisnik, L., Hrnčić, M., Masa K., Knez, Z., Maver, U. Different *Cannabis sativa* Extraction Methods Result in Different Biological Activities against a Colon Cancer Cell Line and Healthy Colon Cells. *Plants.* 2021, 10, 3.
105. Judzentiene, A., Garjonyte, R., Budiene, J. Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Various Extracts of Fibre Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivated in Lithuania. *Molecules.* 2023, 28, 13.

106. Zengin G., Menghini L., Di Sotto A., Mancinelli R., Sisto F., Carradori S., Cesa S., Frascchetti C., Filippi A., Angiolella L., Locatelli M., Mannina L., Ingallina C., Puca V., D'Antonio M., Grande R. Chromatographic Analyses, In Vitro Biological Activities, and Cytotoxicity of Cannabis sativa L. Essential Oil: A Multidisciplinary Study. *Molecules*. 2018.
107. Rui Cai, Yahong Yuan, Lu Cui, Zhouli Wang, Tianli. Cyclodextrin-assisted Extraction of Phenolic Compounds: Current Research and Future Prospects. *Trends in Food Science & Technology*. 2018.
108. Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. 2021, 4, pp. 200-214.
109. Yao, Y.S., Xie, Y., Hong, C., Li, G.W., Shen, H.Y., Ji G. Development of a myricetin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization, and evaluation. *Carbohydr. Polym.* 2014, 110, pp. 329-337.
110. Pu H. Y., Sun Q. M., Tang P. X., Zhao L. D., Li Q., Liu Y. Y., Li H. Characterization and antioxidant activity of the complexes of tertiary butylhydroquinone with betacyclodextrin and its derivatives. *Food Chem.* 2018, 260, pp. 185-192.
111. Palmieri S., Pellegrini M., Ricci A., Compagnone D., Lo Sterzo C. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Thyme, Hemp and Coriander Extracts: A Comparison Study of Maceration, Soxhlet, UAE and RSLDE Techniques. *Foods*. 2020, 9, 1221.
112. Palmieri S., Maggio F., Pellegrini M., Ricci A., Serio A., Paparella A., Lo Sterzo C. Effect of the Distillation Time on the Chemical Composition, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Different Cannabis sativa L. Cultivars. *Molecules*. 2021.
113. Mazzara, E., Torresi, J., Fico, G., Papini, A., Kulbaka, N., Dall' Acqua, S., Sut, S., Garzoli, S., Mustafa, A., Cappellacci, L., Fiorini, D., Maggi, F., Giuliani, C., Petrelli, R. A Comprehensive Phytochemical Analysis of Terpenes, Polyphenols and Cannabinoids, and Micromorphological Characterization of 9 Commercial Varieties of Cannabis sativa L. *Plants*. 2022.
114. Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Mezrioui, N., Setzer, W., Abbad, A., Hassani, L. Antioxidant activity and evidence for synergism of Cannabis sativa (L.). *Industrial Crops & Products*. 2019, pp. 396-400.
115. Higuchi, T., Connors, K.A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 1965, 4, pp. 117–212.
116. Christoforides, E., Andreou, A., Papaioannou, A., & Bethanis, K. Structural Studies of Piperine Inclusion Complexes in Native and Derivative β -Cyclodextrins. *Biomolecules*. 2022, 12.
117. Hatziagapiou, K., Bethanis, K., Koniari, E., Christoforides, E., Nikola, O., Andreou, A., Mantzou, A., Chrousos, G.P., Kanaka-Gantenbein, C., Lambrou, G. Biophysical Studies and In Vitro Effects of Tumor Cell Lines of Cannabidiol and Its Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Pharmaceutics*. 26 Mar 2022, 14, 4.

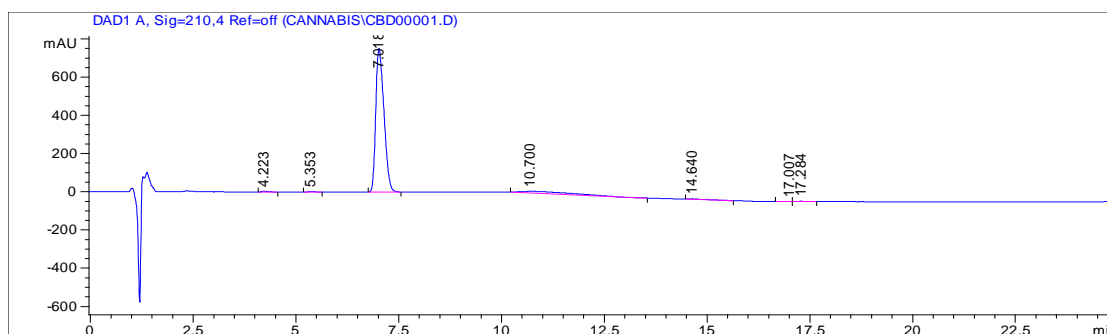
118. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983, pp. 55-63.
119. Pin Lva, D. Z. Structural analysis and cytotoxicity of host-guest inclusion complexes of cannabidiol with three native cyclodextrins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019, pp. 337-344.
120. Yokoo, M., και συν. 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin acts as a novel anticancer agent. *PLoS ONE*. 2015.
121. Yamaguchi, R., Perkins, G., Hirota, K. Targeting cholesterol with b-cyclodextrin sensitizes cancer cells for apoptosis. *Febs Letters*. 2015, pp. 4097-4105.
122. Neng Qiu, Xuebing Li, Junda Liu. Application of cyclodextrins in cancer treatment. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2017.
123. Kiss T., Fenyvesi F., Bácskay I., Váradi J., Fenyvesi E., Iványi R., Szenté L., Tószaki A., Vecsernyés M. Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010.
124. Elsohly, M. A. και Slade , D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. 2005, pp. 539-548.
125. Bethanis, K., Christoforides, E., Andreou, A., Eliopoulos, E. Molecular Symmetry of Permethylyated β -Cyclodextrins upon Complexation. *Symmetry*. 14, 2022, 2214.
126. Mannila, J., Järvinen, T., Järvinen, K., & Jarho, P. Precipitation complexation method produces cannabidiol/ β -cyclodextrin inclusion complex suitable for sublingual administration of cannabidiol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, 96, 2, pp. 312–319.
127. Hang Li, Sen-Lin Chang, Tan-Ran Chang, Ying You, Xiao-Dong Wang, Li-Wei Wang, Xiao-Fan YuanMing-Hui Tan, Pei-Dong Wang Peng-Wei Xu, Wei-Bo Gao, Qing-Sheng Zhao , Bing Zhao. Inclusion complexes of cannabidiol with b-cyclodextrin and its derivative: Physicochemical properties, water solubility, and antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*. 2021.
129. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, G. A. *Introduction to Spectroscopy*. s.l. : Cengage Learning, 2008.
130. Valdeolivas C., Navarrete, I., Cantarero, ML, Bellido, E., Munoz, O., S. Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington’s disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice. *Neurotherapeutics* 12. 2015, pp. 185-199.
131. Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., Keurentjes, J. C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M., Kleijnen, J. Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 313. 2015, pp. 2456–2473.
132. Nelson, K. M., Bisson, J., Singh, G., Graham, J. G., Chen, S., Friesen, B. J., Dahlin, J. L., Niemitz, M., Walters, M. A., Pauli, G. F. The Essential Medicinal Chemistry of Cannabidiol (CBD). *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, 63, pp. 12137–12155.

133. Nachnani, R., Raup-Konsavage, W. M., Vrana, K. E. The Pharmacological Case for Cannabigerol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2021, pp. 204-212.

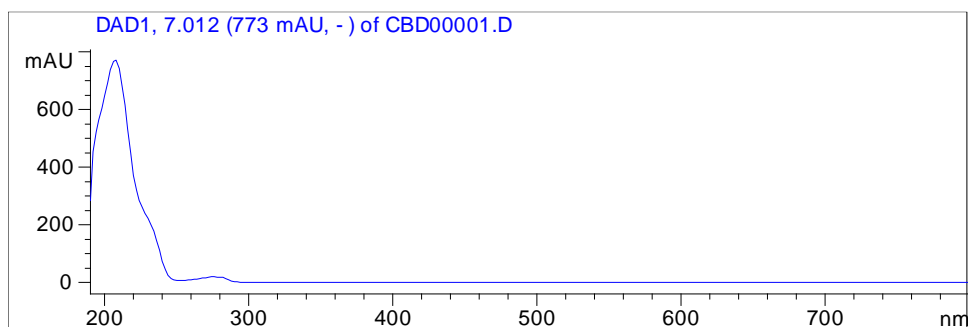
134. Zengin G., Menghini L., Di Sotto A., Mancinelli R., Sisto F., Carradori S., Cesa S., Frascetti C., Filippi A., Angiolella L., Locatelli M., Mannina L., Ingallina C., Puca V., D'Antonio M., Grande R. Chromatographic Analyses, In Vitro Biological Activities, and Cytotoxicity of Cannabis sativa L. Essential Oil: A Multidisciplinary Study. *Molecules*. 2018.

Παραρτήματα

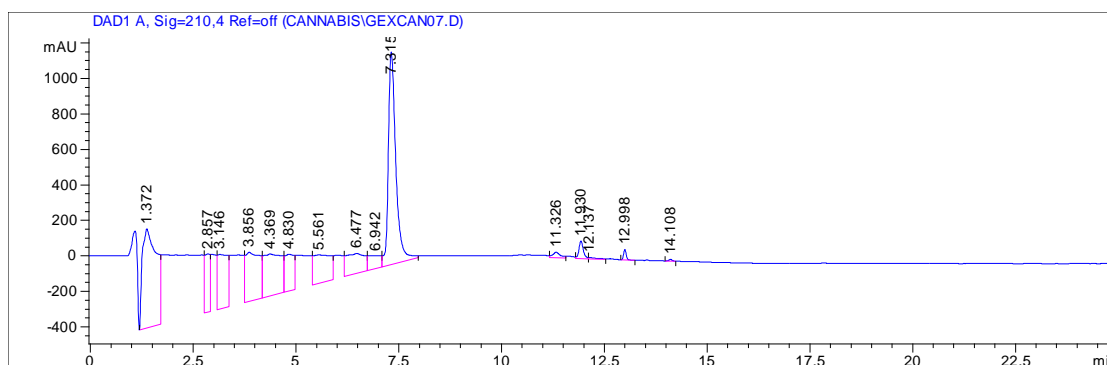
Παράρτημα 1



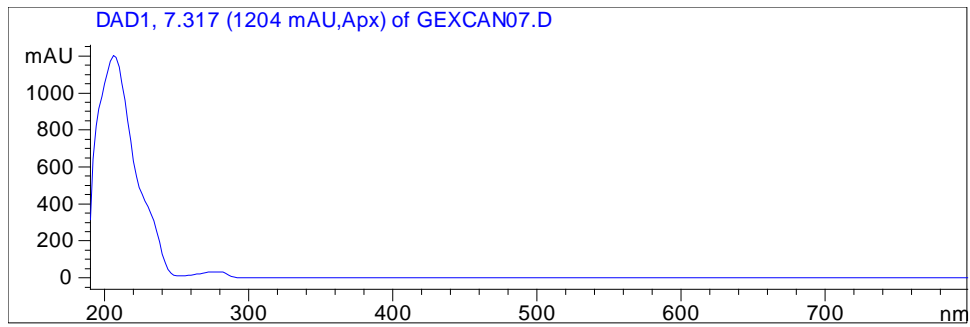
Cannabidiol (CBD) 100 µg/mL in MeOH



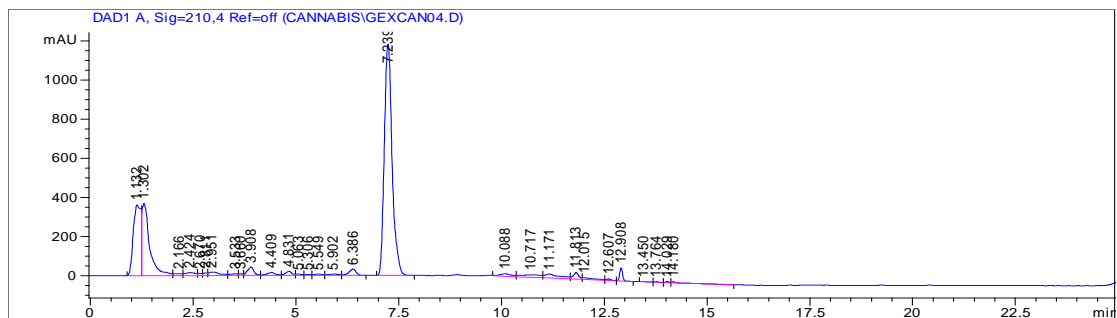
UV-Vis CBD



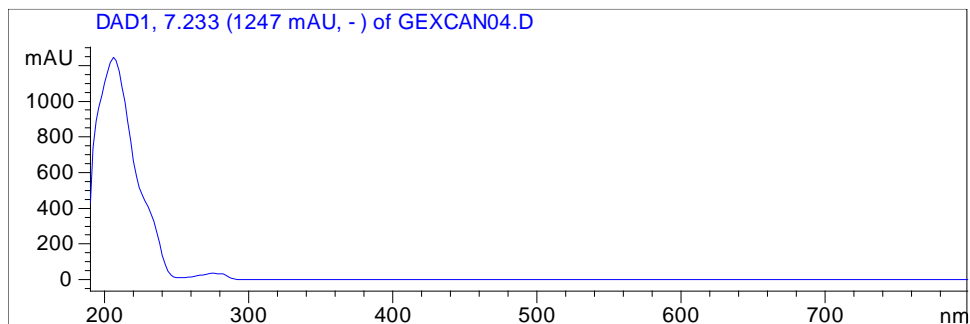
Εκχύλισμα Κάνναβης (*Cannabis sativa*), εκχυλιστής διαλύτης EtOH:H₂O (60:40) με χρήση κυκλοδεξτρίνης (ανάδευση στους 40 °C), Αραίωση 1:50



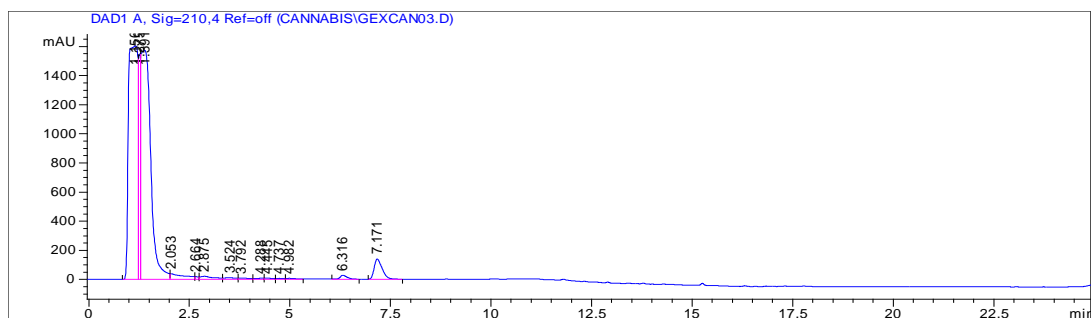
Φάσμα UV-Vis κορυφής στα 7,315 min, CBD



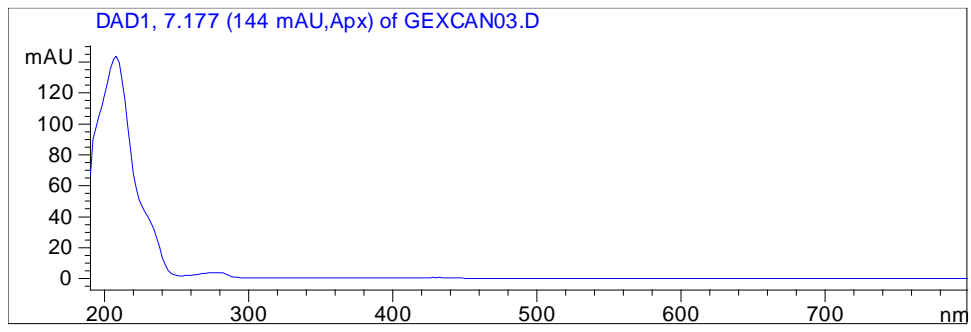
Εκχύλισμα Κάνναβης (*Cannabis sativa*), εκχυλιστής διαλύτης H₂O με χρήση κυκλοδεξτρίνης (ανάδευση στους 40 °C), Αραίωση 1:10



Φάσμα UV-Vis κορυφής στα 7,239 min, CBD



Εκχύλισμα Κάνναβης (*Cannabis sativa*), εκχυλιστής διαλύτης MeOH (Soxhlet)



Φάσμα UV-Vis κορυφής στα 7,171 min, CBD

Παράρτημα 2

checkCIF/PLATON report

Structure factors have been supplied for datablock(s) HPI-42_CBD-bCD

THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.


No syntax errors found. CIF dictionary Interpreting this report

Datablock: HPI-42_CBD-bCD

Bond precision: C-C = 0.0101 A	Wavelength=0.72931		
Cell:	a=19.3670(15)	b=24.5660(18)	c=15.8850(11)
	alpha=90	beta=109.467(5)	gamma=90
Temperature:	100 K		
	Calculated	Reported	
Volume	7125.6(9)	7125.6(9)	
Space group	C 2	C 2	
Hall group	C 2y	C 2y	
2(C42 H70 O35), C11 H15 O2,2(C42 H70 O35), C21 H24 O2,			
Moiety formula			
	C10 H9, 24.6(O)	24.6(O)	
Sum formula	C105 H164 O96.60	C105 H164 O96.60	
Mr	2971.97	2971.95	
Dx,g cm-3	1.385	1.385	
Z	2	2	
Mu (mm-1)	0.131	0.131	
F000	3133.6	3134.0	
F000'	3136.23		
h,k,lmax	23,29,19	23,29,19	

Nref 13539[6938] 13217
 Tmin,Tmax 0.989,0.993
 Tmin' 0.989
 Correction method= Not given
 Data completeness= 1.91/0.98 Theta(max)= 26.404
 wR2(reflections)=
 R(reflections)= 0.0862(11814)
 0.2569(13217)
 S = 1.016 Npar= 913

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format **test-name_ALERT_alert-type_alert-level**. Click on the hyperlinks for more details of the test.

 **Alert level B**

PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow1 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow2 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow3 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow4 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow6 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow7 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow8 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow9 Check
 PLAT306_ALERT_2_B Isolated Oxygen Atom (H-atoms Missing ?) Ow12
 Check PLAT340_ALERT_3_B Low Bond Precision on C-C Bonds 0.01006
 Ang.
 PLAT430_ALERT_2_B Short Inter D...A Contact Ow13 ..O53 . 2.80 Ang.
 -1/2+x,1/2+y,z = 3_455 Check PLAT430_ALERT_2_B
 Short Inter D...A Contact Ow1 ..Ow4 . 2.81 Ang.

$1/2+x,-1/2+y,z = 3_545$ Check PLAT430_ALERT_2_B
Short Inter D...A Contact Ow1 ..Ow4 . 2.81 Ang.

$1/2-x,-1/2+y,2-z = 4_547$ Check PLAT430_ALERT_2_B
Short Inter D...A Contact Ow2 ..Ow6 . 2.84 Ang.

$-x,y,1-z = 2_556$ Check PLAT430_ALERT_2_B Short
Inter D...A Contact Ow3 ..Ow6 . 2.77 Ang.

$1-x,y,2-z = 2_657$ Check PLAT430_ALERT_2_B Short
Inter D...A Contact Ow3 ..Ow4 . 2.78 Ang.

$1/2-x,-1/2+y,2-z = 4_547$ Check PLAT430_ALERT_2_B
Short Inter D...A Contact Ow3 ..Ow5A . 2.80 Ang.

$-x,y,2-z = 2_557$ Check PLAT430_ALERT_2_B Short
Inter D...A Contact Ow8 ..Ow12 . 2.67 Ang.

$1/2-x,-1/2+y,1-z = 4_546$ Check PLAT430_ALERT_2_B
Short Inter D...A Contact Ow12 ..Ow16 . 2.73 Ang.

$1+x,y,z = 1_655$ Check



Alert level C

DIFMX02_ALERT_1_C The maximum difference density is >
0.1*ZMAX*0.75 The relevant atom site should be identified.

PLAT042_ALERT_1_C Calc. and Reported MoietyFormula Strings Differ Please
Check

PLAT084_ALERT_3_C High wR2 Value (i.e. > 0.25) 0.26 Report

PLAT097_ALERT_2_C Large Reported Max. (Positive) Residual Density 0.77 eA-3

PLAT202_ALERT_3_C Isotropic non-H Atoms in Anion/Solvent 9 Check
Ow13 Ow15 Ow5A Ow6 Ow8 Ow9 etc.

PLAT234_ALERT_4_C Large Hirshfeld Difference O64 --C64 . 0.19 Ang.

PLAT260_ALERT_2_C Large Average Ueq of Residue Including Ow7 0.174
Check PLAT430_ALERT_2_C Short Inter D...A Contact Ow7 ..O54 . 2.88
Ang.

$x,y,z = 1_555$ Check PLAT911_ALERT_3_C
Missing FCF Refl Between Thmin & STh/L= 0.600 72 Report

PLAT918_ALERT_3_C Reflection(s) with I(obs) much Smaller I(calc) . 1 Check
 PLAT975_ALERT_2_C Check Calcd Resid. Dens. 0.90Ang From Ow6 . 0.60 eA-3

Alert level G

ABSMU01_ALERT_1_G Calculation of _exptl_absorpt_correction_mu
 not performed for this radiation type. PLAT002_ALERT_2_G Number of
 Distance or Angle Restraints on AtSite 41 Note

PLAT003_ALERT_2_G Number of Uiso or Uij Restrained non-H Atoms ... 20
 Report

PLAT007_ALERT_5_G Number of Unrefined Donor-H Atoms 25 Report

PLAT032_ALERT_4_G Std. Uncertainty on Flack Parameter Value High . 0.300
 Report

PLAT068_ALERT_1_G Reported F000 Differs from Calcd (or Missing)... Please
 Check PLAT092_ALERT_4_G Check: Wavelength Given is not Cu,Ga,Mo,Ag,In Ka
 0.72931 Ang.

PLAT172_ALERT_4_G The CIF-Embedded .res File Contains DFIX Records 43
 Report

PLAT173_ALERT_4_G The CIF-Embedded .res File Contains DANG Records 50
 Report

PLAT174_ALERT_4_G The CIF-Embedded .res File Contains FLAT Records 15
 Report

PLAT180_ALERT_4_G Check Cell Rounding: # of Values Ending with 0 = 3 Note

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O63A Constrained at 0.5 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O63B Constrained at 0.5 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O65A Constrained at 0.6 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O65B Constrained at 0.4 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C65A Constrained at 0.6 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C65B Constrained at 0.4 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H63C Constrained at 0.5 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H63D	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H65	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H65A	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H65B	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H65C	Constrained at	0.4 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H65D	Constrained at	0.4 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H65E	Constrained at	0.4 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O2_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of O1_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C23_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C22_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C21_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C20_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C18_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C15_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C17_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C12_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C16_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C11_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C8_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H23A_1	Constrained at	0.5
Check		
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H23B_1	Constrained at	0.5
Check		
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H23C_1	Constrained at	0.5
Check		

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H22A_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H22B_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H21A_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H21B_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H20A_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H20B_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H18A_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H18B_1 Check	Constrained at	0.5
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H17_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H2_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H16_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H1_1	Constrained at	0.5 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C4_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C3_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C5_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C6_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C7_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C9_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C10_1 Check	Constrained at	0.25

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C13_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C14_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C19_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H3_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5A_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H6A_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H6B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7_1	Constrained at	0.25 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H13A_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H13B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H13C_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C4B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C3B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C5B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C6B_1 Check	Constrained at	0.25

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C7B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C9B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C10B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C13B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C14B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of C19B_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H3A_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5C_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H5D_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H6C_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H6D_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H7A_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H13D_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H13E_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of H13F_1 Check	Constrained at	0.25
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow13 Check	Constrained at	0.6 Check

PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow15	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow5A	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow10	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow1B	Constrained at	0.6 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow14	Constrained at	0.4 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow5B	Constrained at	0.4 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow11	Constrained at	0.4 Check
PLAT300_ALERT_4_G Atom Site Occupancy of Ow16	Constrained at	0.4 Check
PLAT301_ALERT_3_G Main Residue Disorder(Resd 1)	4%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 2)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 3)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 4)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 5)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 6)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 11)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 16)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 17)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 19)	100%	Note
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 20)	100%	Note

PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 21)	100%
Note	
PLAT302_ALERT_4_G Anion/Solvent/Minor-Residue Disorder (Resd 22)	100%
Note	
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 3)	4.75 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 4)	4.75 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 5)	0.60 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 6)	0.60 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 7)	0.50 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 11)	0.60 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 15)	0.50 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 16)	0.30 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 17)	0.60 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 19)	0.40 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 20)	0.40 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 21)	0.40 Check
PLAT304_ALERT_4_G Non-Integer Number of Atoms in (Resd 22)	0.40 Check
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)	Ow13
Check	
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)	Ow15
Check	
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)	Ow5A
Check	
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)	Ow10
Check	
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)	Ow1B
Check	
PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?)	Ow14
Check	

PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?) Ow5B
 Check

PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?) Ow11
 Check

PLAT311_ALERT_2_G Isolated Disordered Oxygen Atom (No H's ?) Ow16
 Check

PLAT315_ALERT_2_G Singly Bonded Carbon Detected (H-atoms Missing). C14_1
 Check

PLAT315_ALERT_2_G Singly Bonded Carbon Detected (H-atoms Missing). C19_1
 Check

PLAT315_ALERT_2_G Singly Bonded Carbon Detected (H-atoms Missing). C14B_1
 Check

PLAT315_ALERT_2_G Singly Bonded Carbon Detected (H-atoms Missing). C19B_1
 Check

PLAT411_ALERT_2_G Short Inter H...H Contact H32 ..H5C_1 . 1.26
 Ang. x,y,z = 1_555 Check PLAT413_ALERT_2_G
 Short Inter XH3 .. XHn H33 ..H13F_1 . 1.85 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT413_ALERT_2_G Short Inter XH3 .. XHn H34
 ..H13D_1 . 2.13 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT413_ALERT_2_G Short Inter XH3 .. XHn H37 ..H13B_1 . 1.91 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT414_ALERT_2_G Short Intra D-H..H-X H63B ..H63C
 . 2.03 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT414_ALERT_2_G Short Intra D-H..H-X H63B ..H63D . 1.12 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact Ow13 ..C13
 . 3.00 Ang.

-1/2+x,1/2+y,z = 3_455 Check PLAT432_ALERT_2_G
 Short Inter X...Y Contact O2_1 ..C56 . 3.01 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact O43
 ..C14_1 . 2.00 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact O44 ..C14_1 . 2.90 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact O47
 ..C19B_1 . 2.95 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact O54 ..C14_1 . 2.94 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C14
 ..C14_1 . 2.71 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C24 ..C14_1 . 2.99 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C32
 ..C5B_1 . 3.12 Ang. x,y,z = 1_555 Check

PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C34 ..C14_1 . 2.34 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C43
 ..C14_1 . 3.19 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C44 ..C14_1 . 2.63 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C51
 ..C19B_1 . 2.78 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C51 ..C10B_1 . 3.08 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C52
 ..C14B_1 . 2.75 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C54 ..C14_1 . 2.40 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C61
 ..C14B_1 . 2.94 Ang. x,y,z = 1_555 Check
 PLAT432_ALERT_2_G Short Inter X...Y Contact C62 ..C14B_1 . 3.17 Ang.
 x,y,z = 1_555 Check PLAT720_ALERT_4_G Number of Unusual/Non-Standard
 Labels 84 Note

PLAT789_ALERT_4_G Atoms with Negative _atom_site_disorder_group # 66
 Check

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 5 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 8 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 9 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 10 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 11 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 13 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 15 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 16 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 17 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 18 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 19 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 20 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 21 Note

O

PLAT790_ALERT_4_G Centre of Gravity not Within Unit Cell: Resd. # 22 Note

O

PLAT822_ALERT_4_G CIF-embedded .res Contains Negative PART Numbers 3
Check

PLAT860_ALERT_3_G Number of Least-Squares Restraints 107 Note

PLAT883_ALERT_1_G No Info/Value for _atom_sites_solution_primary . Please Do
!

PLAT899_ALERT_4_G SHELXL2018 is Deprecated and Succeeded by SHELXL 2019/3
Note

PLAT912_ALERT_4_G Missing # of FCF Reflections Above STh/L= 0.600 70 Note

PLAT933_ALERT_2_G Number of HKL-OMIT Records in Embedded .res File 37
Note PLAT978_ALERT_2_G Number C-C Bonds with Positive Residual Density. 1
Info

0 **ALERT level A** = Most likely a serious problem - resolve or explain

19 **ALERT level B** = A potentially serious problem, consider carefully

11 **ALERT level C** = Check. Ensure it is not caused by an omission or oversight

186 **ALERT level G** = General information/check it is not something unexpected

5 ALERT type 1 CIF construction/syntax error, inconsistent or missing data

63 ALERT type 2 Indicator that the structure model may be wrong or deficient

7 ALERT type 3 Indicator that the structure quality may be low

140 ALERT type 4 Improvement, methodology, query or suggestion

1 ALERT type 5 Informative message, check

It is advisable to attempt to resolve as many as possible of the alerts in all categories. Often the minor alerts point to easily fixed oversights, errors and omissions in your CIF or refinement strategy, so attention to these fine details can be worthwhile. In order to resolve some of the more serious problems it may be necessary to carry out additional measurements or structure refinements. However, the purpose of your study may justify the reported deviations and the more serious of these should normally be commented upon in the discussion or experimental section of a paper or in the "special_details" fields of the CIF. checkCIF was carefully designed to identify outliers and unusual parameters, but every test has its limitations and alerts that are not important in a particular case may appear. Conversely, the absence of alerts does not guarantee there are no aspects of the results needing attention. It is up to the individual to critically assess their own results and, if necessary, seek expert advice.

Publication of your CIF in IUCr journals

A basic structural check has been run on your CIF. These basic checks will be run on all CIFs submitted for publication in IUCr journals (Acta Crystallographica, Journal of Applied

Crystallography, Journal of Synchrotron Radiation); however, if you intend to submit to Acta Crystallographica Section C or E or IUCrData, you should make sure that full publication checks are run on the final version of your CIF prior to submission.

Publication of your CIF in other journals

Please refer to the Notes for Authors of the relevant journal for any special instructions relating to CIF submission.

PLATON version of 06/07/2023; check.def file version of 30/06/2023

Datablock HPI-42_CBD-bCD - ellipsoid plot

