

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ
ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Χαρτογράφηση των βιοδραστικών συστατικών της βιομηχανικής κάνναβης και παραγωγή εκχυλισμάτων για βιομηχανικές εφαρμογές

Διπλωματική εργασία

Γεώργιος Θεοχάρης



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαρία Γιαννακούρου

Αθήνα,
Σεπτέμβριος 2023

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2022- 2023 στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μαρίας Γιαννακούρου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μαρία Γιαννακούρου τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για τις συμβουλές της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Προσέφερε σημαντική καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της έρευνας, ενώ ήταν πάντα πρόθυμη να συζητήσει μαζί μου τους προβληματισμούς και τις απορίες μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Δημήτριο Τσιμογιάννη για την αμέριστη βοήθεια που προσέφερε από την αρχή μέχρι και το πέρας της διπλωματικής μου εργασίας. Ήταν το άτομο που, με μεγάλη αφοσίωση, συνέβαλε στην εκμάθηση πολλών νέων, για εμένα, εργαστηριακών τεχνικών και μεθόδων. Ήταν στο πλευρό μου σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε στο ταξίδι της έρευνας μου και προσπαθούσε με κάθε ευκαιρία να μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις του.

Ευχαριστώ πολύ την Κοινωνική Συνεταιριστική Επιχείρηση KANNABIO ΚΟΙΝΣΕΠ για την παραχώρηση της πρώτης ύλης για τις ανάγκες των πειραμάτων της διπλωματικής εργασίας και την εταιρεία NFA (Natural Food Additives) για την παροχή της τεχνογνωσίας στο αντικείμενο της έρευνας.

Θα ήθελα ακόμη να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, που ήταν διαθέσιμα να προσφέρουν ανά πάσα στιγμή οποιαδήποτε βοήθεια. Ευχαριστώ πολύ για τη στήριξη και τη βοήθεια το Στράτο και τη Δήμητρα, οι οποίοι είναι οι συνάδελφοι μαζί με τους οποίους μοιραστήκαμε παράλληλα την εμπειρία της διπλωματικής εργασίας στους ίδιους εργαστηριακούς πάγκους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου για την ενθάρρυνση και την υποστήριξή τους. Ένα ακόμη μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου και τις αδερφές μου. Η οικογένειά μου, μου προσφέρει ανιδιοτελώς όλα αυτά τα χρόνια την αγάπη, την υποστήριξη και τη δυνατότητα να κυνηγήσω μια δικιά μου νέα ευκαιρία.

Περίληψη

Η βιομηχανική κάνναβη (*Cannabis Sativa L.*) είναι ένα φυτό της οικογένειας των κανναβοειδών (*cannabaceae*). Στο φυτό περιέχονται διάφορες οικογένειες βιοδραστικών ενώσεων όπως είναι τα φλαβονοειδή, τα τερπένια, οι φυτοστερόλες και τα αλκαλοειδή. Ωστόσο, η κατηγορία ενώσεων που ξεχωρίζει για την παρουσία της είναι αυτή των κανναβινοειδών. Κανναβινοειδή, όπως είναι η κανναβιδιόλη, συγκεντρώνουν σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της συμμετοχής του σε βιολογικές δράσεις που ρυθμίζονται μέσω του ανθρώπινου ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Η εκχύλιση στερεού- υγρού, η οποία εφαρμόζεται στην παρούσα διπλωματική, αποτελεί μια διεργασία μέσω της οποίας μπορούν να παραληφθούν και να απομονωθούν επιλεγμένες βιοδραστικές ενώσεις από το φυτό σε ένα εκχύλισμα, με τη χρήση ενός συγκεκριμένου διαλύτη. Με κατάλληλη επεξεργασία του εκχυλίσματος και την απαραίτητη τυποποίηση στα επίπεδα της συγκέντρωσης, οι απομονωμένες βιοδραστικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν στη συνέχεια σε ένα τελικό προϊόν.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ανάκτησης των βιοδραστικών συστατικών του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa L.*) μέσω της διεργασίας της εκχύλισης, ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων εκχυλισμάτων ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική τους δράση και η βελτιστοποίηση των συνθηκών κατά την ακετονική εκχύλιση.

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε αποξηραμένη βιομηχανική κάνναβη η οποία παραλήφθηκε από την KANNABIO ΚΟΙΝΣΕΠ το Νοέμβριο του 2022. Μετά τον προσδιορισμό του περιεχομένου της πρώτης ύλης σε υγρασία (10,1 g υγρασίας/ 100 g of material) και σε σπόρους (3,9 g σπόρων/ 100 g of material), ακολούθησε κονιοποίηση και κοσκίνιση της φυτικής πρώτης ύλης σε μέγεθος σωματιδίων μικρότερων των 850 μm. Για αρχή, πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές εξαντλητικές εκχυλίσεις ανοιχτού συστήματος (σε σταθερή κλίνη εκχύλισης). Η πρώτη εκχύλιση έγινε με τη χρήση ακετόνης ως διαλύτη, με σκοπό την παραλαβή των μη πολικών συστατικών. Η δεύτερη κατά σειρά εκχύλιση έγινε με τη χρήση απιονισμένου νερού ως διαλύτη για την παραλαβή των πολικών συστατικών. Οι αποδόσεις των δύο εκχυλίσεων σε στερεά βρέθηκαν ίσες με 55 mg Total Solids/ g of material για την ακετονική και 214 mg Total Solids/ g of material για την υδατική εκχύλιση. Τα δύο είδη εκχυλισμάτων υποβλήθηκαν σε αναλύσεις μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό τους σε ολικά φαινολικά συστατικά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση του ακετονικού εκχυλίσματος βρέθηκε ίση με 124 mg gallic acid/ g ξηρού εκχυλίσματος (ή ανά g Total Solids- TS), ενώ εκείνη του υδατικού εκχυλίσματος ίση με 68 mg gallic acid/ g TS. Επίσης, προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου της ελεύθερης σταθερής ρίζας DPPH σε ισοδύναμα Trolox. Η αντιοξειδωτική δράση του ακετονικού εκχυλίσματος βρέθηκε ίση με 96 mg Trolox/ g TS, ενώ του υδατικού εκχυλίσματος ίση με 119 mg Trolox/ g TS. Μέσω της ανάλυσης του ακετονικού εκχυλίσματος της βιομηχανικής κάνναβης με τη χρήση της μεθόδου HPLC-DAD, αποδείχθηκε η παρουσία κανναβινοειδών στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Η συγκέντρωση των ολικών κανναβινοειδών εκφράστηκε σε ισοδύναμα CBD και προσδιορίστηκε στα 329 mg CBD/ g TS. Τα δύο κύρια κανναβινοειδή που ταυτοποιήθηκαν στο ακετονικό εκχύλισμα είναι η CBD (56% της συγκέντρωσης των ολικών κανναβινοειδών) και το CBDA (34% της συγκέντρωσης των ολικών κανναβινοειδών). Αντίστοιχα, η ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος απέδειξε ότι σε αυτό περιλαμβάνονται κατά αποκλειστικότητα ενώσεις της οικογένειας των φλαβονοειδών. Η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών εκφράστηκε σε ισοδύναμα ρουτίνης και προσδιορίστηκε στα 62 mg rutin/ g TS. Οι επιμέρους συνεισφορές του κάθε φλαβονοειδούς

που ταυτοποιήθηκε στην ολική συγκέντρωση είναι οι ακόλουθες: γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (47%), γλυκουρονίδιο της απιγενίνης (17%), βιτεξίνη (11%) και οριεντίνη (5%).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη της ακετονικής και της υδατικής εκχύλισης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu για τον υπολογισμό των στιγμιαίων συγκεντρώσεων σε ολικά φαινολικά συστατικά. Όσον αφορά στην ακετονική εκχύλιση ανοιχτού συστήματος, παρατηρήθηκε ότι η στιγμιαία συγκέντρωση του φρέσκου εκχυλίσματος, ξεκινώντας από υψηλές τιμές συγκεντρώσεων, έφθινε με την πάροδο του χρόνου και προσέγγιζε την τιμή 0. Για ροή διαλύτη- ακετόνης ίση με 5,5 mL/min και σε χρόνο εκχύλισης 9 λεπτών, υπολογίστηκε ότι έχει γίνει ανάκτηση του 68% της διαθέσιμης συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών. Με την προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick, προέκυψε ότι η εκχύλιση πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικά στάδια κινητικών 1^{ης} τάξης. Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί σε εκείνο της έκπλυσης με σταθερά ρυθμού ίση με $k_1=0,0895$ (min^{-1}), και το δεύτερο σε εκείνο της διάχυσης με μια μικρότερη σταθερά ρυθμού ίση με $k_2=0,0075$ (min^{-1}). Το χρονικό σημείο τομής των δύο κινητικών ορίζεται ως χρόνος έκπλυσης και βρέθηκε ίσος με 10,6 min. Στο χρόνο έκπλυσης υπολογίστηκε ότι έχει εκχυλιστεί το 71,5% της διαθέσιμης συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών. Μια κινητική μελέτη με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, πραγματοποιήθηκε μέσω της εφαρμογής της μεθόδου HPLC-DAD. Μέσω της μελέτης αυτής, υπολογίστηκε ότι επιτυγχάνεται ανάκτηση του 78% της διαθέσιμης συγκέντρωσης των ολικών κανναβινοειδών σε χρόνο εκχύλισης 9 λεπτών. Με την προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης των κανναβινοειδών στον 2^ο νόμο του Fick, προέκυψε ότι η εκχύλιση τους πραγματοποιείται ομοίως σε δύο διαφορετικά στάδια κινητικών 1^{ης} τάξης. Η σταθερά του ρυθμού του σταδίου της έκπλυσης ήταν ίση με $k_1=0,1068$ (min^{-1}), και του δεύτερου σταδίου της διάχυσης ίση με $k_2=0,0043$ (min^{-1}). Ο χρόνος έκπλυσης βρέθηκε ίσος με 6,5 min. Στο χρόνο έκπλυσης υπολογίστηκε ότι έχει εκχυλιστεί το 78,5% της διαθέσιμης συγκέντρωσης των ολικών κανναβινοειδών.

Η κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε κλειστό σύστημα (εκχύλιση διαλείποντος έργου), εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πλήρη διαβροχή του φυτικού υλικού. Τα αποτελέσματα μέσω της ανάλυσης με την μέθοδο Folin-Ciocalteu έδειξαν ότι η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο, μέχρι να σταθεροποιηθεί σε μια συγκεκριμένη μέγιστη τιμή συγκέντρωσης- πλατό. Με την προσαρμογή της κινητικής της υδατικής εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick, προέκυψε ότι η εκχύλιση ολοκληρώνεται με το τέλος του σταδίου της έκπλυσης, καθώς η σταθερά ρυθμού του 2^{ου} σταδίου είναι πολύ κοντά στο 0. Η σταθερά του ρυθμού του σταδίου της έκπλυσης είναι $k_1=0,2118$ (min^{-1}). Ο χρόνος έκπλυσης βρέθηκε ίσος με 6,3 min. Στο χρόνο έκπλυσης υπολογίστηκε ότι έχει εκχυλιστεί το 78,6% της διαθέσιμης συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών. Μέσω της μεθόδου HPLC-DAD, παρατηρήθηκε ότι η υδατική εκχύλιση των ολικών φλαβονοειδών ακολουθεί αντίστοιχη πορεία με αυτή των ολικών φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος αλλά και η συγκέντρωση του τελικού συνολικού υδατικού εκχυλίσματος εμφανίστηκε να είναι μειωμένη για διάφορους χρόνους εκχύλισης, πιθανότατα λόγω δέσμευσης των φλαβονοειδών και σχηματισμού δεσμών με φυσικά πολυμερή που συνυπάρχουν στο υδατικό εκχύλισμα.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών ροών στο διάστημα 3-10 mL/min (ή ισοδύναμα 150-500 mL/min/kg of material) διαλύτη- ακετόνης στην κινητική της ακετονικής εκχύλισης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε ένα από τα δύο στάδια της εκχύλισης (έκπλυση, διάχυση) με τον υπολογισμό διαφορετικών χαρακτηριστικών μεγεθών που αφορούν στην εκχύλιση των ολικών φαινολικών συστατικών. Όσον αφορά στο στάδιο της έκπλυσης, έχει ήδη παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια του εκχυλίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό

των διαθέσιμων φαινολικών. Η σταθερά του ρυθμού του σταδίου της έκπλυσης k_1 βαίνει αυξανόμενη με την αύξηση της ροής. Ο χρόνος έκπλυσης μειώνεται σε συνάρτηση με την αύξηση της ροής του διαλύτη, τείνοντας ασυμπτωτικά στην τιμή των 5 λεπτών. Ο όγκος του συνολικού εκχυλίσματος που παραλαμβάνεται από την εκχύλιση 1 kg βιομηχανικής κάνναβης (1 kg of material) μέχρι και το χρόνο έκπλυσης επίσης μειώνεται με την αύξηση της ροής του διαλύτη και λαμβάνει ελάχιστη τιμή ίση με 2,65 L για τιμή ροής ίση με 500 mL/min. Η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά που παραλαμβάνεται στο χαρακτηριστικό χρόνο έκπλυσης κάθε εκχύλισης δεν παρουσίασε εξάρτηση από την τιμή της ροής και είχε μέση τιμή ίση με 5,85 g gallic acid/ kg of material. Ως βέλτιστη ροή διαλύτη επιλέγεται αυτή των 500 mL/min/kg of material, καθώς με τη συνθήκη αυτή εξασφαλίζεται ο ελάχιστος δυνατός χρόνος έκπλυσης (5,3 min) και ο ελάχιστος δυνατός συνολικά χρησιμοποιούμενος όγκος διαλύτη (5,15 L/kg of material).

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και για το στάδιο της διάχυσης. Η βέλτιστη ροή διαλύτη βρέθηκε να είναι αυτή των 353 mL/min/kg of material, καθότι με τη ροή αυτή παρατηρήθηκε η μέγιστη συνεισφορά του δεύτερου σταδίου στην τελική ολική συγκέντρωση εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (17%) και ο ελάχιστος δυνατός χρησιμοποιούμενος όγκος διαλύτη κατά το στάδιο της διάχυσης (19,15 L) για κάθε 1 kg εκχυλιζόμενης βιομηχανικής κάνναβης.

Καταληκτικά, η εκχύλιση 1 kg βιομηχανικής κάνναβης σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου με ροή ακετόνης 500 mL/min υπολογίστηκε ότι θα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εκχυλίσματος συγκέντρωσης 125 mg gallic acid/ g TS, με απόδοση ανάκτησης ίση με 77% των ολικών διαθέσιμων φαινολικών συστατικών, σε χρόνο 5,3 λεπτά, με τη χρήση 5,15 L διαλύτη ακετόνης. Αν είναι επιθυμητή η περαιτέρω αύξηση του ποσοστού της ανάκτησης, τότε η βέλτιστη ροή προσδιορίστηκε στα 353 mL/min, και για κάθε αύξηση του ποσοστού της ανάκτησης κατά 1% υπολογίστηκε ότι απαιτούνται 1,05 L ακετόνης. Προκειμένου να γίνει η επιλογή του τελικού σημείου της εκχύλισης, για μια εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα, απαιτείται η γνώση συμπληρωματικών μεγεθών και η κατασκευή μιας συνολικής συνάρτησης κόστους.

Mapping of bioactive compounds of industrial hemp and production of extracts for industrial applications

Georgios Theocharis, Diploma Thesis

National Technical University of Athens, School of Chemical Engineering, Laboratory of Food Chemistry and Technology

Abstract

Industrial hemp (*Cannabis Sativa L.*) belongs to the *cannabaceae* family of plants. Hemp contains bioactive compounds such as flavonoids, terpenes, plant sterols and alkaloids. However, a distinguished compound class of the plant is the cannabinoids' group. Cannabinoids, such as cannabidiol, have stimulated the scientific interest thanks to their involvement in numerous biological functions which are regulated by the human endocannabinoid system. Solid-liquid extraction, which is applied in this thesis, is a process through which selected bioactive compounds can be obtained and isolated from the plant in an extract, using a specific solvent. Ensuring the appropriate treatment of the extract and the necessary standardization of concentration levels, the isolated bioactive compounds have the potential to be subsequently incorporated into a final product.

The aim of this thesis was to study the recovery of the bioactive components of the industrial hemp plant (*Cannabis Sativa L.*) through the extraction process, to characterize the extracts produced in terms of total phenolic content and antioxidant activity and to find the optimal solvent flow during acetone extraction.

The raw material used was dried industrial hemp, which was received by KANNABIO in November of year 2022. After determining the moisture content (10,1 g moisture/ 100 g of material) and seed content (3,9 g seeds/ 100 g of material) of the raw material, the plant raw material was pulverized and sieved to a particle size of less than 850 μm . To start with, two successive open-system exhaustive extractions (in a fixed extraction bed) were carried out. The first extraction was carried out using acetone as solvent to obtain the non-polar components. The second extraction, in series, was carried out using de-ionized water as solvent to obtain the polar components. The solids' yields of the two extractions were found to be equal to 55 mg Total Solids/ g of material for the acetone extraction and 214 mg Total Solids/ g of material for the aqueous extraction. The two types of extracts were subjected to analysis utilizing the Folin-Ciocalteu method, for the determination of the total phenolic content expressed in gallic acid equivalents. The concentration of the acetone extract was determined equal to 124 mg gallic acid/g dry extract (or per g Total Solids - TS), while that of the aqueous extract was determined equal to 68 mg gallic acid/g TS. The antioxidant capacity was also determined through the DPPH free radical method and expressed in Trolox equivalents. The total antioxidant capacity of the acetone extract was measured up to 96 mg Trolox/g TS, while that of the aqueous extract up to 119 mg Trolox/g TS. Through the analysis of the acetone extract of industrial hemp using the HPLC-DAD method, the presence of cannabinoids in this extract was demonstrated. The concentration of total cannabinoids was expressed in CBD equivalents and was equal to 329 mg CBD/g TS. The two main cannabinoids identified in the acetone extract were CBD (56 % of the total cannabinoid concentration) and CBDA (34 % of the total cannabinoid concentration). On the other hand, the analysis of the aqueous extract revealed that it contains exclusively compounds of the flavonoid family. The concentration of

total flavonoids was expressed in rutin equivalents and was calculated at 62 mg rutin/g TS. The individual contributions of each identified flavonoid to the total concentration are: luteolin glucuronide (47 %), apigenin glucuronide (17 %), vitexin (11 %) and orientin (5 %).

Afterwards, the kinetic study of acetone and aqueous extraction was carried out. In particular, the Folin-Ciocalteu method was used to calculate the instantaneous concentrations in total phenolic content. Regarding the open-system acetone extraction, it was observed that the instantaneous concentration of the fresh extract, starting from high concentration values, reached over time and approached the value of 0. For a solvent (acetone) flow rate equal to 5.5 mL/min and an extraction time of 9 min, it was estimated that 68% of the available concentration of total phenolic components has been recovered. By fitting the kinetics of acetone extraction of total phenolic components to Fick's 0 law, it was derived that the extraction takes place in two different stages of 1st order kinetics. The first stage corresponds to that of leaching with a rate constant equal to $k_1 = 0,0895 \text{ (min}^{-1}\text{)}$, and the second to that of diffusion with a lower rate constant equal to $k_2 = 0,0075 \text{ (min}^{-1}\text{)}$. The intersection of the two kinetics is defined as the leaching time and was calculated at 10,6 min. It was estimated that, during that time span, 71,5 % of the available concentration of total phenolic components had been extracted. A kinetic study, with higher selectivity than the Folin-Ciocalteu method, was performed by applying the HPLC-DAD method. Through this study, it was estimated that 78 % of the available concentration of total cannabinoids was recovered in an extraction time of 9 minutes. By fitting the kinetics of acetone extraction of cannabinoids to Fick's 2nd law, it was found that their extraction is similarly carried out in two different stages of 1st order kinetics. The rate constant of the leaching stage was equal to $k_1 = 0,1068 \text{ (min}^{-1}\text{)}$, and the rate constant of the second stage of diffusion was equal to $k_2 = 0,0043 \text{ (min}^{-1}\text{)}$. The leaching time was found to be equal to 6,5 min. It was estimated that, during that time span, 78,5 % of the available concentration of total cannabinoids has been extracted.

The kinetic study of aqueous extraction was successfully carried out in a closed system (batch extraction), thus ensuring complete wetting of the plant material. The results delivered by the Folin-Ciocalteu method revealed that the instantaneous concentration of total extract in total phenolic components increases as a function of time, until it stabilizes at a certain maximum concentration value- plateau. By fitting the kinetics of aqueous extraction of total phenolic components to Fick's 2nd law, it was observed that the extraction is completed at the end of the leaching stage, as the rate constant of the 2nd stage is very close to 0. The rate constant of the leaching stage is $k_1=0,2118 \text{ (min}^{-1}\text{)}$. The leaching time was found to be equal to 6,3 min. During that time, it was calculated that 78,6 % of the available concentration of total phenolic components has been extracted. Through the HPLC-DAD method, it was observed that the aqueous extraction of total flavonoids follows a similar path as that of total phenolic constituents. However, the instantaneous concentration of the total extract as well as the concentration of the final total aqueous extract appeared to be decreased for different extraction times, probably due to flavonoids' binding and bond formation with natural polymers coexisting in the aqueous extract.

In addition, the effect of different flow rates in the range of 3-10 mL/min (or equivalently 150- 500 mL/min/kg of material) of solvent (acetone) on the kinetics of acetone extraction was studied. The calculative study was carried out separately for each of the two extraction steps (leaching, diffusion) by computing characteristic descriptors related to the extraction of total phenolic components. Regarding the leaching stage, it has already been observed that during the leaching stage the largest proportion of the available phenolics is extracted. The rate constant of the leaching stage k_1 increases with increasing flow rate. The leaching time decreases with increasing solvent flow rate, tending asymptotically to a value of 5 minutes. The volume of the total extract obtained from the extraction of 1 kg of industrial hemp up to

the leaching time also decreases with increasing solvent flow rate and reaches a minimum value of 2,65 L for a flow rate equal to 500 mL/min/kg of material. The concentration of total extract in phenolic components obtained at the typical leaching time of each extraction showed no dependence on the flow rate and had an average value equal to 5,85 mg gallic acid/g of material. The optimum solvent flow rate chosen is that of 500 mL/min/kg of material, as this condition ensures the minimum possible leaching time (5,3 min) and the minimum possible total solvent volume used (5,15 L).

A similar study was carried out for the diffusion stage. The optimum solvent flow rate was found to be 353 mL/min/kg of material, as this flow rate resulted to the maximum contribution of the second stage to the final total phenolic concentration of the extract (17 %) and the minimum possible solvent volume used during the diffusion stage (19,15 L) for every 1 kg of extracted industrial hemp.

In conclusion, the extraction of 1 kg of industrial hemp in a semi-continuous extractor with an acetone flow rate of 500 mL/min was estimated to result in the production of an extract of 125 mg gallic acid/g TS, with a recovery yield percentage equal to 77 % of the total available phenolic components, within 5,3 min of extraction time, using 5,15 L of acetone as a solvent. If a further increase in recovery percentage is desired, then the optimum flow rate was determined to be 353 mL/min. For each 1% increase in recovery yield percentage, it was calculated that 1,05 L of acetone was required. For an industrial scale application, the knowledge of complementary parameters and the construction of an overall cost function is required in order to select the end point of the extraction.

Περιεχόμενα

1. Η βιομηχανική κάνναβη	10
1.1 Το φυτό και οι βιομηχανικές χρήσεις του.....	10
1.2 Η κάνναβη στα τρόφιμα.....	14
1.3 Η δυναμική της <i>C. Sativa</i> στη βιομηχανία των καλλυντικών	16
1.4 Ιδιότητες και δράσεις	17
1.5 Βιοδραστικά συστατικά.....	18
1.5.1 Κανναβινοειδή.....	18
1.5.2 Φλαβονοειδή	23
1.5.3 Τερπένια.....	24
1.5.4 Φυτοστερόλες	24
1.5.5 Αλκαλοειδή.....	24
1.5.6 Λιπαρά οξέα.....	24
1.5.7 Κηροί.....	25
1.6 Φαινολικές ενώσεις.....	25
2. Η εκχύλιση.....	26
2.1 Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης	29
2.1.1 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες	29
2.1.2 Εκχύλιση Soxhlet	29
2.1.3 Υδρο-ατμοαπόσταξη	31
2.2 Μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης	35
2.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE)	35
2.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE)	39
2.2.3 Εκχύλιση υπεγκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE).....	41
2.2.4 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (Pressurized Liquid Extraction, PLE)	43
2.2.5 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed Electric Field Extraction, PEFE) ...	44
3. Πειραματικό μέρος	45
3.1 Στόχος.....	45
3.2 Σχεδιασμός Πειραμάτων	45
3.3 Διάγραμμα ροής πειραμάτων	47
3.4 Πρώτες ύλες - Αντιδραστήρια - Συσκευές	47
3.4.1 Η πρώτη ύλη	47
3.4.2 Αντιδραστήρια	48

3.4.3 Συσκευές και όργανα.....	48
3.5 Πειραματικές τεχνικές και αναλυτικές μέθοδοι	52
3.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας της φυτικής πρώτης ύλης.....	52
3.5.2 Προσδιορισμός αναλογίας σπόρων της φυτικής πρώτης ύλης.....	53
3.5.3 Εξαντλητική εκχύλιση ανοιχτού συστήματος	53
3.5.4 Κινητική μελέτη της εκχύλισης ανοιχτού συστήματος	54
3.5.5 Κινητική μελέτη της εκχύλισης κλειστού συστήματος	55
3.5.6 Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα	56
3.5.7 Προσδιορισμός ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	57
3.5.8 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH.....	59
3.5.9 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (HPLC-DAD).....	61
3.5.9.i Ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών	64
3.5.9.ii Ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών	64
4. Αποτελέσματα- Επεξεργασία- Σχολιασμός.....	65
4.1 Προσδιορισμός υγρασίας της φυτικής πρώτης ύλης.....	65
4.2 Προσδιορισμός αναλογίας σπόρων της φυτικής πρώτης ύλης.....	65
4.3 Αποτελέσματα εξαντλητικής εκχύλισης	65
4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης εκχυλισμάτων εξαντλητικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου HPLC-DAD	69
4.5 Κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης	78
4.5.1 Κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών	78
4.5.2 Κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης των κανναβινοειδών	83
4.6 Κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης	87
4.6.1 Κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών	87
4.6.2 Κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης των φλαβονοειδών	91
4.7 Μελέτη της επίδρασης της ροής του διαλύτη στην κινητική της ακετονικής εκχύλισης	94
5. Συμπεράσματα- Προτάσεις.....	108
6. Βιβλιογραφία	111

1. Η βιομηχανική κάνναβη

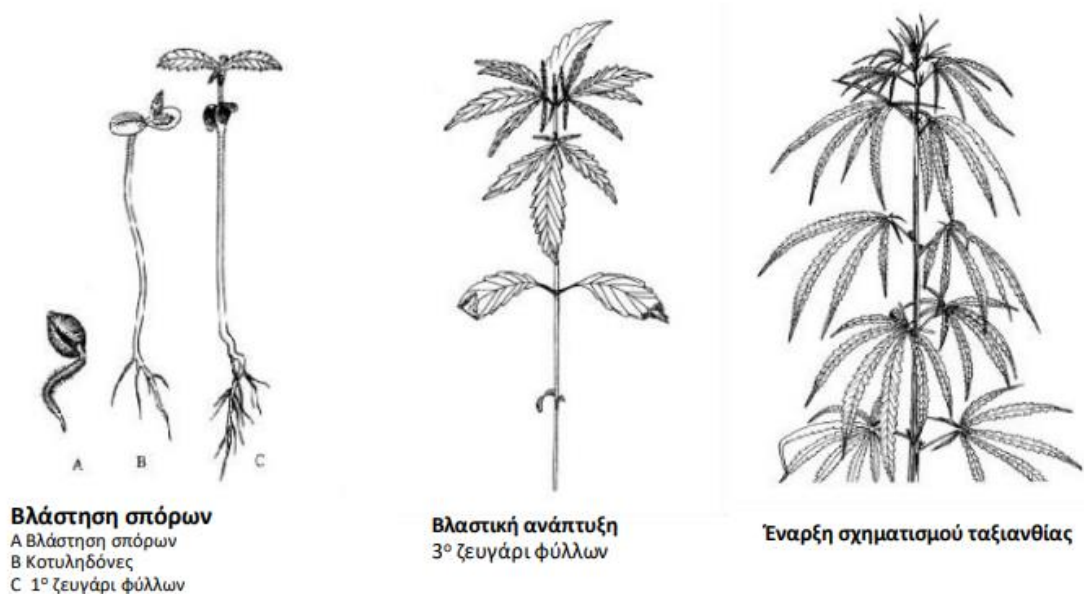
1.1 Το φυτό και οι βιομηχανικές χρήσεις του

Η *Cannabis Sativa L.* (ή αλλιώς βιομηχανική κάνναβη) είναι ένα φυτό της οικογένειας των κανναβοειδών (*cannabaceae*). Παρά τη συνεχιζόμενη συζήτηση για το θέμα, εάν το γένος κάνναβης αντιπροσωπεύεται από ένα ή περισσότερα είδη, αυτή τη στιγμή θεωρείται ως ένα είδος (*Cannabis sativa L.*) με τρία υποείδη (*Cannabis sativa L. subspecies sativa* και *cannabis sativa L. subspecies indica*, *Cannabis sativa L. subspecies ruderalis*). Είναι ένα μονοετές φυτό, το οποίο σημαίνει ότι φυτρώνει, αναπτύσσεται, ανθίζει, παράγει σπόρο και ολοκληρώνει το βιολογικό του κύκλο εντός μιας καλλιεργητικής περιόδου (Pellati, et al., 2018). Η καλλιέργεια του φυτού εντοπίστηκε αρχικά στην Κεντρική Ασία κατά τη Νεολιθική Εποχή (10.000 π.Χ.- 2.200 π.Χ.). Ωστόσο, η καλλιέργεια επεκτάθηκε σε όλον τον κόσμο λόγω της προσαρμοστικότητάς του. Η βιομηχανική κάνναβη είναι ένα φυτό εαρινής σποράς η οποία απαιτεί καλά στραγγιζόμενα εδάφη πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία και υγρασία. Η καλλιέργεια της κάνναβης μπορεί να γίνει και χωρίς τη χρήση ζιζανιοκτόνων, καθώς, λόγω της γρήγορης και μεγάλης ανάπτυξης των φυτών, έχουν μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα έναντι των ζιζανίων (Struik, et al., 2000). Η χρήση της συστήνεται για εφαρμογή σε συστήματα αμειψισποράς (η μη καλλιέργεια του ίδιου είδους σε δύο διαδοχικές καλλιεργητικές περιόδους). Παράλληλα, μπορεί να βελτιώσει τη δομή των εδαφών που καλλιεργείται, λόγω του ριζικού της συστήματος που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε μεγάλο βάθος (Piotrowski and Carus, 2011). Σχεδόν όλες οι καλλιεργούμενες ποικιλίες κάνναβης είναι συνήθως δίοικες, δηλαδή τα αρσενικά και θηλυκά άνθη βρίσκονται σε διαφορετικά φυτά. Τα αρσενικά άνθη, που συνήθως είναι λιγότερα σε αριθμό, απελευθερώνουν τη γύρη και στη συνέχεια μαραίνονται. Η γύρη που απελευθερώνει ένα αρσενικό φυτό έχει τη δυνατότητα να επικονιάσει ένα πολύ μεγάλο αριθμό φυτών. Στις δίοικες ποικιλίες, τα αρσενικά φυτά ολοκληρώνουν τον κύκλο τους εφόσον ρίξουν τη γύρη τους. Τα θηλυκά φυτά παραμένουν ζωντανά και ωριμάζουν (Εικόνα 1) (Amaducci et al., 2014). Ο βιολογικός κύκλος ανάπτυξης της κάνναβης (Keller et al., 2001) χωρίζεται σε τέσσερα βασικά στάδια: της βλάστησης του σπόρου, της βλαστικής ανάπτυξης, της άνθησης (Εικόνα 2) και της γήρανσης. Οι σπόροι βλαστάνουν 3-7 ημέρες μετά από τη σπορά. Τα φύλλα της κάνναβης είναι έμμισχα, οδοντωτά, άνισα, επιμήκη με 3-11 φυλλάρια ανά φύλλο.



Εικόνα 1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά κάνναβης (www.illustratedgarden.org).

A. Αρσενικό Άνθος - Inflorescence of male (staminate) plant, **B.** Θηλυκό άνθος – Fruiting female (pistillate) plant, **1.** Αρσενικό άνθος, **2.** Στήμονας (ανθήρας και νήμα), **3.** Στήμονας, **4.** Γυρεόκοκκοι, **5.** Θηλυκό άνθος με τα βράκτια, **6.** Θηλυκό άνθος χωρίς τα βράκτια, **7.** Θηλυκό άνθος όπου φαίνεται η ωοθήκη (διαμήκης τομή), **8.** Σπόρος (αχαίνιο) με βράκτια, **9.** Σπόρος χωρίς βράκτια, **10.** Σπόρος (πλευρική προβολή), **11.** Σπόρος (εγκάρσια τομή), **12.** Σπόρος (διαμήκης τομή), **13.** Σπόρος χωρίς περικάρπιο (αποφλοιωμένος)



Εικόνα 2. Τα τρία πρώτα στάδια ανάπτυξης του φυτού της κάνναβης (Κοσμίδης, 2022).

Η ιατρική χρήση των παρασκευασμάτων που προέρχονται από το φυτό *Cannabis Sativa* L., έχει πολύχρονη ιστορία. Τα πρώτα στοιχεία αναφέρουν τη χρήση της κάνναβης στην Κίνα από το 4000 π.Χ., όπου η καλλιέργεια αποσκοπούσε στη χρήση σπόρων ως τροφή και στην παραγωγή ινών. Στη συνέχεια, η χρήση της εξαπλώθηκε σε ολόκληρη την Ασία, τη Μέση Ανατολή και την Αφρική. Από το 2000 έως το 1400 π.Χ., η κάνναβη χρησιμοποιήθηκε στην Ινδία για θεραπευτικούς, θρησκευτικούς και ψυχαγωγικούς λόγους. Στην Ελλάδα υπάρχουν αναφορές από τον Ηρόδοτο, το Δημόκριτο και το Διοσκουρίδη, σχετικά με τη χρήση κάνναβης σε ανάμειξη με φύλλα άλλων φυτών, σε συνδυασμό με κρασί ή τσάι, στην παρασκευή υφασμάτων και σχοινιών, καθώς και στη χρήση του στη θεραπευτική (Bonini et al., 2018).

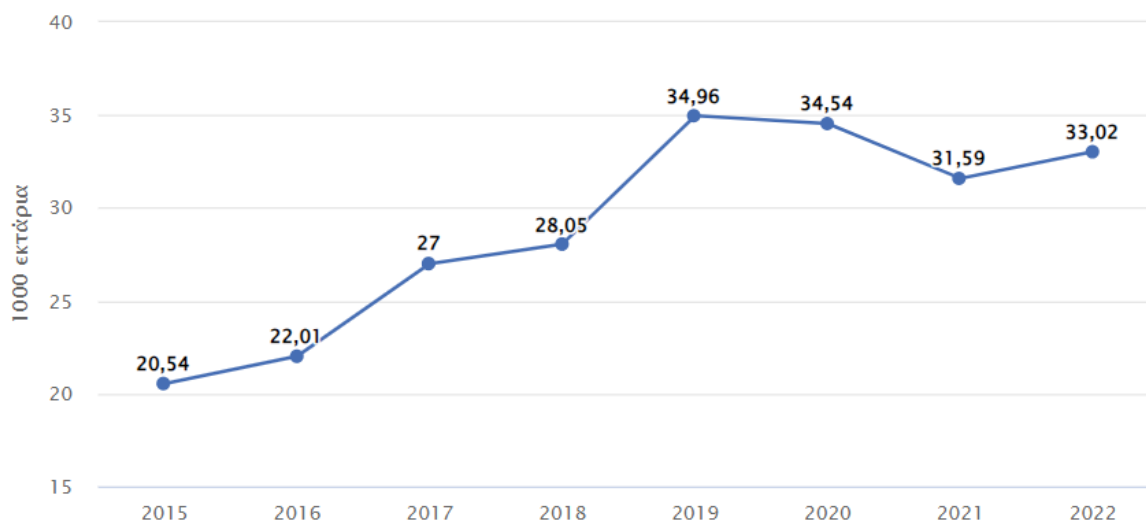
Κατά τον Μεσαίωνα, η κάνναβη ήταν γνωστή σε όλη την Ευρώπη ως θεραπευτικό, διατροφικό και ευφορικό φυτό και ως πρώτη ύλη στην κατασκευή ρούχων. Από τότε είχε ξεκινήσει και η καλλιέργεια στην Ελλάδα, η οποία συνεχίστηκε κατά την περίοδο της Τουρκοκρατίας, όπου γινόταν οργανωμένη καλλιέργεια κλωστικής κάνναβης, έως και το τέλος του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Το 1936 απαγορεύτηκε στην Ελλάδα η χρήση και η καλλιέργεια της κάνναβης, οπότε τα ελληνικά κανναβουργεία κήρυξαν πτώχευση και έκλεισαν.

Το ενδιαφέρον για τις δράσεις του φυτού αναζωπυρώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 με την ανακάλυψη του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος με τους αντίστοιχους υποδοχείς στον ανθρώπινο εγκέφαλο και το υπόλοιπο σώμα. Ως σύστημα, εμπλέκεται στον έλεγχο σημαντικών βιολογικών λειτουργιών, όπως η γνώση, η μνήμη, ο πόνος, ο ύπνος και η ανοσολογική λειτουργία (Pisanti et al., 2017).

Πλέον, η καλλιέργεια της βιομηχανικής κάνναβης είναι δημοφιλής σε ολόκληρη την έκταση της Ευρώπης. Συγκεκριμένα, η έκταση γης που προορίζεται για την καλλιέργεια του φυτού έχει σημειώσει αύξηση στην Ευρωπαϊκή Ένωση από 19.970 εκτάρια (ha) (δηλαδή 199.700 m²) το 2015 σε 34.960 εκτάρια (ha) (349.600 m²) το 2019, που μεταφράζεται σε

αύξηση κατά 75%. Παράλληλα, η παραγωγή του φυτού αυξήθηκε από 94.120 tons σε 152.820 tons (αύξηση κατά 62,4%). Η τάση της συνολικής έκτασης καλλιέργειας απεικονίζεται στο Διάγραμμα 1. Ο μεγαλύτερος παραγωγός είναι η Γαλλία, καθώς διαθέτει μερίδιο που αντιστοιχεί στο 70% της παραγωγής. Ακολουθούν οι Κάτω Χώρες (Βέλγιο, Ολλανδία, Λουξεμβούργο) με ποσοστό 10% και η Αυστρία με ποσοστό 4%.

Διάγραμμα 1. Έκταση γης της Ε.Ε. που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια κάνναβης (Ευρωπαϊκή Επιτροπή/ Agriculture and rural development/ Κάνναβη).



Οι κύριες χρήσεις της βιομηχανικής κάνναβης στη σημερινή εποχή αποτυπώνονται παρακάτω:

1. Κλωστούφαντουργία: οι ίνες του φυτού έχουν παρόμοιες ιδιότητες με αυτές που έχει το λινάρι. Στα πλαίσια που θέτει η Ε.Ε. προς την μετάβαση σε μια πράσινη και περισσότερο βιώσιμη κυκλική οικονομία, ενθαρρύνεται η αναζήτηση νέων υλικών και οικονομικών μοντέλων προς αυτήν την κατεύθυνση.
2. Τομέας κατασκευών: κατασκευαστικά υλικά όπως το σκυρόδεμα κάνναβης (Lime Hemp Concrete- LHC), μαλλί κάνναβης και μονωτικές ινοσανίδες.
3. Παραγωγή χαρτιού: οι μίσχοι του φυτού χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χαρτιού από κάνναβη. Το χαρτί αυτό δεν απαιτεί επεξεργασία λεύκανσης με τοξικές χημικές ουσίες και μπορεί να ανακυκλωθεί έως και 7 με 8 φορές.
4. Τρόφιμα και ζωοτροφές: οι σπόροι του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης ξεχωρίζουν για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, φυτικές ίνες και ω3- λιπαρά.
5. Προϊόντα υγείας και καλλυντικά: τα εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης (τα οποία περιέχουν κανναβιδιόλη (Cannabidiol- CBD) μπορούν να ενσωματωθούν σε καλλυντικά, προϊόντα υγείας και τρόφιμα.

Η κάνναβη καλλιεργείται κυρίως για βιομηχανικές χρήσεις και υπάρχουν 75 διαφορετικές ποικιλίες κάνναβης που έχουν καταχωριστεί στον κατάλογο της ΕΕ. Λόγω του πολύ χαμηλού επιπέδου της τετραϋδροκανναβινόλης (Tetrahydrocannabinol- THC), η

κάνναβη που συμμορφώνεται με τις διατάξεις της Κοινής Γεωργικής Πολιτικής δεν χρησιμοποιείται για την παραγωγή ναρκωτικών.

Σύμφωνα με το άρθρο 189 του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1308/2013, όλες οι εισαγωγές κάνναβης υπόκεινται επί του παρόντος σε απαίτηση πιστοποιητικού εισαγωγής. Επιπλέον:

- η ακατέργαστη κάνναβη που υπάγεται στον κωδικό Σ.Ο. 5302 10 πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε THC που δεν υπερβαίνει το 0,3 % w/w.
- οι σπόροι κάνναβης που προορίζονται για σπορά πρέπει να συνοδεύονται από αποδεικτικό από το οποίο προκύπτει ότι η περιεκτικότητα της σχετικής ποικιλίας σε THC δεν υπερβαίνει το 0,3 % w/w.
- οι σπόροι κάνναβης που δεν χρησιμοποιούνται για σπορά μπορούν να εισάγονται μόνο κατόπιν άδειας των χωρών της ΕΕ και οι εγκεκριμένοι εισαγωγείς πρέπει να προσκομίζουν αποδεικτικά στοιχεία ότι οι σπόροι έχουν τεθεί σε κατάσταση που αποκλείει τη χρήση για σπορά·
- οι χώρες της ΕΕ μπορούν επίσης να εφαρμόζουν πιο περιοριστικούς κανόνες σύμφωνα με τις Συνθήκες της ΕΕ και τις διεθνείς υποχρεώσεις ([Ευρωπαϊκή Επιτροπή/ Agriculture and rural development/ Κάνναβη](#)).

1.2 Η κάνναβη στα τρόφιμα

Τη σημερινή εποχή, σημειώνεται αυξημένο ενδιαφέρον για την κάνναβη και τα προϊόντα τροφίμων που περιέχουν παράγωγά της σε κάποια μορφή. Τα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα περιέχουν κάνναβη σε μορφή σπόρων, αλεύρου και ελαίου ή εκχυλίσματος. Η συγκέντρωση των κανναβινοειδών στο έλαιο εξαρτάται από την ποικιλία και το είδος της επεξεργασίας του σπόρου ως πρώτη ύλη. Το γεγονός ότι οι περιεκτικότητες του φυτού σε κανναβινοειδή εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις ανά καλλιεργήσιμη περιοχή (για την ίδια ποικιλία), καθιστά την επεξεργασία του φυτού δύσκολη. Για το λόγο αυτό, υπάρχει η ανάγκη για αυστηρό έλεγχο των ποικιλιών και των μεθόδων καλλιέργειας προκειμένου να εξασφαλισθεί μεγαλύτερη ομοιογένεια.

Οι κανονισμοί σχετικά με την επιτρεπόμενη συγκέντρωση των κανναβινοειδών σε προϊόντα τροφίμων διαφέρουν από χώρα σε χώρα ανά τον κόσμο. Οι νομικοί περιορισμοί αφορούν στη Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC). Μερικά παραδείγματα ορίων ανά χώρα, τα οποία εκφράζονται σε mg Δ9-THC/kg τελικού προϊόντος ή ppm, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Όρια συγκέντρωσης τετραϋδροκανναβινόλης στα τρόφιμα (ppm).

	Oil from Seeds	Seeds	Total Content in Food
Germany total content of Δ9-THC and Δ9-THCA	5	-	0.02-10
Italy total content of Δ9-THC and Δ9-THCA	5	2	2
Switzerland Δ9-THC	20	10	-
Australia, New Zealand total content of Δ9-THC and Δ9-THCA	10	5	<5
Croatia Δ9-THC	-	-	2-20
Denmark Δ9-THC	10	5	0.5

Στην Ευρώπη, ποικιλίες βιομηχανικής κάνναβης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή τροφίμων υπό την προϋπόθεση ότι το ολικό περιεχόμενο σε Δ9-THC και Δ9-THCA στους ανθούς (από τους οποίους δεν έχει αφαιρεθεί η ρητίνη) να είναι μικρότερο του 0,2% σε ξηρή βάση πρώτης ύλης (Κανονισμός (ΕΥ) 1307/2013). Από όλα τα μέρη του φυτού, αποκλειστικά οι σπόροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή τροφίμων. Υπόλοιπα μέρη του φυτού, όπως τα φύλλα και οι ανθοί, ανήκουν στην κατηγορία των καινοτόμων τροφίμων βάσει του κανονισμού 2015/2283 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου της 25^{ης} Νοεμβρίου του 2015. Η οικογένεια των καινοτόμων τροφίμων περιλαμβάνει: (α) τρόφιμα με νέες ή τροποποιημένες μοριακές δομές, (β) τρόφιμα που προέρχονται από μικροοργανισμούς, μύκητες, φύκη και ολόκληρα φυτά ή εκχυλίσματα αυτών.

Όσον αφορά στα εκχυλίσματα του φυτού, η κατάλληλη επιλογή μορφής στην οποία περιέχονται τα κανναβινοειδή είναι αρκετά σημαντική. Τα κανναβινοειδή πρέπει να είναι επαρκώς διαλυτά και να μην επηρεάζουν το σχηματισμό του τελικού προϊόντος. Τα εκχυλίσματα τα οποία περιέχουν Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη ή κανναβιδιόλη συνήθως διαλύονται σε εδώδιμα έλαια (όπως π.χ. ελαιόλαδο ή λάδι καρύδας). Ωστόσο, η χρήση των εκχυλισμάτων αυτών στην επεξεργασία απαιτεί το σχηματισμό ενός μίγματος ελαιώδους και υδατικής φάσης, δηλαδή ενός γαλακτώματος. Στη συνέχεια, γίνεται χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών (γαλακτωματοποιητών), η επιλογή του οποίου εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του γαλακτώματος και η δομή του μορίου της ελαιώδους φάσης. Ως ουσίες μπορεί να είναι πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Για να αποτραπεί η υποβάθμιση των κανναβινοειδών και να γίνει ελεγχόμενη η απελευθέρωση τους χρησιμοποιούνται βοηθητικές ουσίες ως λιπιδικές μήτρες. Συγκεκριμένα, για την περίπτωση των κανναβινοειδών χρησιμοποιούνται τα φωσφολιπίδια.

Φαινόμενα όπως η θέρμανση και η αποθήκευση για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα του ελαίου από τους σπόρους κάνναβης προκαλούν ταγγισμό (οξειδωση των λιπών). Το έλαιο

περιέχει όξινες μορφές κανναβινοειδών, με το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) να περιέχεται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Γενικότερα, ο λόγος CBDA/CBD είναι ένας δείκτης της αποθήκευσης του ελαίου σε σωστές συνθήκες, ή της ποιότητας της φυτικής πρώτης ύλης. Η επεξεργασία της πρώτης ύλης του φυτού σε αυξημένες θερμοκρασίες όπως η ξήρανση, η θέρμανση, η καύση προκαλεί αλλαγές στα κανναβινοειδή. Συγκεκριμένα, τα καρβοξυλικά οξέα μετατρέπονται στις αντίστοιχες ουδέτερες μορφές τους μέσω της αποκαρβοξυλίωσης.

Στη βιομηχανία τροφίμων, η κύρια διεργασία επεξεργασίας των σπόρων κάνναβης είναι η ακόλουθη: οι σπόροι εκθλίβονται για την παραλαβή ελαίου και στη συνέχεια αλέθονται προς την παρασκευή αλεύρου. Επίσης, χρησιμοποιούνται ως πηγή πρωτεϊνών και φυτικών ινών και μπορούν να προστεθούν σε ενεργειακές μπάρες, επιδόρπια γιαουρτιού και αρτοπαρασκευάσματα. Μεταξύ άλλων, έχουν καταγραφεί: (α) σχεδιασμός παραγωγικής διαδικασίας για την παραγωγή πραλίνας και σοκολάτας με σπόρους κάνναβης, (β) χρήση ελαίου σπόρων και αυτούσιων σπόρων κάνναβης για την παραγωγή ψωμιού, (γ) παραγωγή αλεύρου κάνναβης. Τα οφέλη που προέρχονται από την κατανάλωση προϊόντων που περιέχουν έλαιο κάνναβης δεν έχουν εντοπιστεί και εξακριβωθεί πλήρως. Μέχρι στιγμής, τα οφέλη περιλαμβάνουν τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και της αρτηριακής πίεσης (Kanabus et al., 2021).

1.3 Η δυναμική της *C. Sativa* στη βιομηχανία των καλλυντικών

Οι σπόροι της βιομηχανικής κάνναβης χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε καλλυντικές φόρμουλες (και ειδικότερα σε φόρμουλες φροντίδας μαλλιών) χάρη στο υψηλό περιεχόμενό τους σε έλαιο. Το έλαιο των σπόρων χαρακτηρίζεται για το πλούσιο προφίλ σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως τα ω3 και ω6 λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά αυτά προσφέρουν θρέψη και ενυδάτωση στα μαλλιά, κάνοντας τα μαλακότερα και πιο απαλά. Επιπλέον, αποτρέπει τη ξηρότητα και το σχηματισμό ψαλίδας.

Το έλαιο μπορεί να εφαρμοσθεί απευθείας στο τριχωτό της κεφαλής ή ως μάσκα μαλλιών. Το έλαιο μπορεί επίσης να ενσωματωθεί σε σαμπουάν και προϊόντα τύπου conditioner.

Πέραν των λιπαρών οξέων, το έλαιο κάνναβης είναι πλούσιο σε καροτενοειδή, τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη και την υγεία των μαλλιών. Καροτενοειδή όπως το β-καροτένιο ενδυναμώνουν τη ρίζα των μαλλιών και τα προστατεύουν από την UV- ακτινοβολία και λοιπές περιβαλλοντικές επιβαρύνσεις. Άλλα καροτενοειδή όπως η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη μπορούν να βελτιώσουν την ενυδάτωση του δέρματος, να ενισχύσουν την επούλωση των πληγών, να προωθήσουν την παραγωγή κολλαγόνου και ελαστίνης από τον οργανισμό.

Το έλαιο περιέχει επίσης και χλωροφύλλη (σε συγκεντρώσεις 100- 230 μg/g). Η ένωση αυτή ενισχύει την ανάπτυξη των ιστών και διαθέτει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, καθιστώντας το πιθανά χρήσιμο στη θεραπεία δερματικών παθήσεων όπως η ακμή και το έκζεμα.

Στο έλαιο υπάρχουν ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή, τερπένια, καροτενοειδή, χλωροφύλλες και φυτοστερόλες που συνεισφέρουν στην αντιφλεγμονώδη και αντιγηραντική δράση. Το έλαιο απορροφάται αρκετά γρήγορα χωρίς να φράσσει τους πόρους του δέρματος. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φόρμουλες αντηλιακών, κρεμών και λοσιόν σχεδιασμένων για να καταπραΰνουν το δέρμα (Fordjour et al., 2023).

1.4 Ιδιότητες και δράσεις

- Αντιμικροβιακή Ιδιότητα

Κανναβινοειδή όπως η κανναβιδιόλη και η τετραϋδροκανναβινόλη είναι ουσίες με βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση ενάντια σε Gram θετικά βακτήρια. Συγκεκριμένα, το έλαιο που παραλαμβάνεται από τους σπόρους του φυτού, μέσω εκχύλισης με τη χρήση του πετρελαϊκού αιθέρα ως διαλύτη, εμφανίζει αντιβακτηριδιακή δράση κατά Gram θετικών βακτηρίων και περισσότερο ήπια δράση κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. Για το λόγο αυτό, τα εκχυλίσματα των σπόρων μπορούν να βρουν εφαρμογή ως φυσικά συντηρητικά τροφίμων και καλλυντικών. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα κανναβινοειδή είναι περισσότερο δραστικά στην καταπολέμηση σχηματισμού βακτηριακών αποικιών στην οδοντική πλάκα. Επίσης, η χρήση τους συνδυαστικά με αντιβιοτικές ουσίες όπως η ερυθρομυκίνη, βανκομυκίνη ή καναμυκίνη μπορεί να ενισχύσει την αντιβακτηριδιακή δράση ενάντια στο βακτήριο της *Eschericia coli*. Εκχυλίσματα αιθανόλης από τα φύλλα του φυτού βρέθηκαν να αναστέλλουν τη ανάπτυξη μυκήτων όπως η *Candida Albicans*, *Candida krusei* και *Aspergillus niger*.

- Αντικαρκινική Ιδιότητα

Τα κανναβινοειδή, τα οποία αποτελούν την κύρια ομάδα ενεργών μεταβολιτών στο φυτό της βιομηχανικής κάνναβης, προσδίδουν στο φυτό την ικανότητα να χρησιμοποιείται για ιατρικές χρήσεις. Τα παράγωγα των κανναβινοειδών έχουν βρεθεί να καταστέλλουν την επιβίωση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, διακόπτοντας την επικοινωνία και τη λειτουργία μεταξύ των κυττάρων. Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω του οποίου κανναβινοειδή όπως η κανναβιδιόλη και τετραϋδροκανναβινόλη εκφράζουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες δεν έχει εξακριβωθεί. Πιο συγκεκριμένα, πεπτίδια που προέρχονται από τη βιομηχανική κάνναβη ίσως αποτελούν ένας τρόπος θεραπείας του καρκίνου του ήπατος. Κανναβινοειδή όπως η κανναβιδιόλη και η κανναβιγερόλη μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη των κυττάρων του καρκίνου του μαστού, χωρίς να είναι επιβλαβή προς τα υγιή κύτταρα. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι κατά κύριο λόγο συνδεδεμένος με το κάπνισμα και την μακροχρόνια έκθεση στο αέριο ραδόνιο. Η αποτελεσματικότητα της κανναβιδιόλης υπέρ της παρεμπόδισης της ανάπτυξης του καρκίνου έχει παρατηρηθεί σε in vivo πειράματα.

- Δράση κατά της επιληψίας

Η κανναβιδιόλη και η κανναβιδιβαρίνη έχουν εμφανίσει αντισπασμωδικές ιδιότητες. Ο FDA (Food and Drug Administration) έχει εγκρίνει την κυκλοφορία του EPIDIOLX, ενός φαρμάκου που προέρχεται από τη βιομηχανική κάνναβη και το οποίο συνταγογραφείται για τη θεραπεία δύο ακραίων μορφών επιληψίας (σύνδρομο Lennon- Gastaut και σύνδρομο Dravet).

- Δράση κατά της νόσου Parkinson

Οι νευρώνες της ντοπαμίνης στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου έχει αποδειχθεί ότι εξουδετερώνουν τη νόσο Parkinson, η οποία συχνά συνδέεται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και το οξειδωτικό στρες. Η νόσος συνδέεται με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα μέσω των υποδοχέων CB1, CB2 που βρίσκονται στα βασικά γάγγλια. Οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζουν τα επίπεδα ντοπαμίνης.

- Δράση κατά των γαστρεντερικών διαταραχών

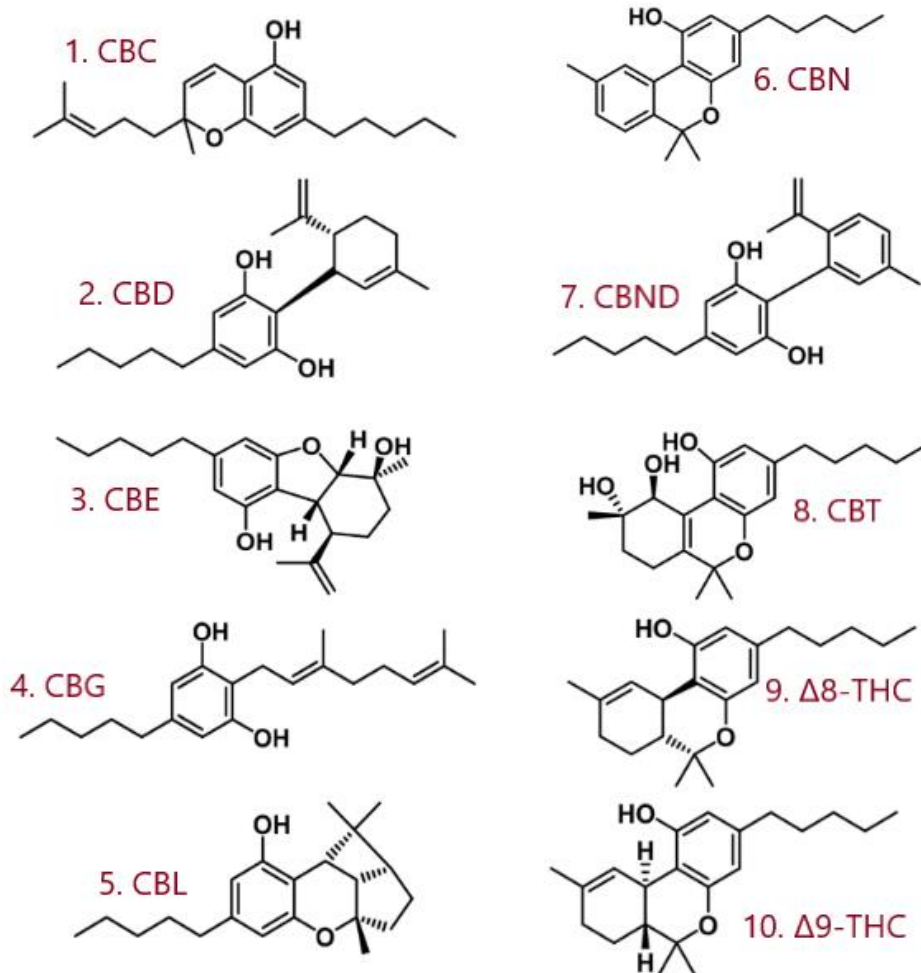
Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα συνδέεται με το έντερο και ελέγχει τη διαδικασία της πέψης και την ανοσολογική απόκριση. Τα ενδοκανναβινοειδή βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου, ενώ η βιομηχανική κάνναβη χρησιμοποιείται από ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο της ελκώδους κολίτιδας. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τετραϋδροκανναβινόλη μπορεί να καταπολεμήσει τη νόσο του Chron (τοπική εντερίτιδα). Ωστόσο, υπάρχει η ανάγκη να καθοριστούν συγκεκριμένες δοσολογίες για τη χρήση της (Fordjour, et al., 2023).

1.5 Βιοδραστικά συστατικά

Μέχρι και σήμερα, όσον αφορά στο φυτό της *Cannabis Sativa L.*, έχουν αναγνωρισθεί και απομονωθεί 566 διαφορετικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές, οι οποίες απαντώνται κυρίως στα φύλλα και τους ανθούς του φυτού, κατηγοριοποιούνται σε 18 διαφορετικά ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Εξ αυτών, 125 ενώσεις ανήκουν στην οικογένεια των κανναβινοειδών, 198 χαρακτηρίζονται ως μη κανναβινοειδή και 120 τερπένια. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί 2 αλκαλοειδή, 34 φλαβονοειδή, 42 φαινόλες και 3 στερόλες.

1.5.1 Κανναβινοειδή

Τα κανναβινοειδή αποτελούν μια ομάδα ενώσεων που διαθέτουν το χαρακτηριστικό τερπενοφαινολικό σκελετό με 21 άτομα άνθρακα. Στην ομάδα αυτή μπορούν να ανήκουν κύρια κανναβινοειδή, παράγωγα αυτών ή προϊόντα μετασχηματισμού. Μια περαιτέρω κατηγοριοποίηση μπορεί να γίνει σε 10 τάξεις ενώσεων: κανναβιχρωμίνη (CBC), κανναβιδιόλη (CBD), κανναβιελοσοΐνη (CBE), κανναβιγερόλη (CBG), κανναβικυκλόλη (CBL), κανναβινόλη (CBN), κανναβινοδιόλη (CBND), κανναβιτριόλη (CBT), Δ8-τρανς- τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁸-THC), Δ9-τρανς- τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁹-THC) και σε μια επιπλέον τάξη ανάμικτου- τύπου κανναβινοειδή (όπως η κανναβιφουράνη, η κανναβιχρωμανόνη κ.α.) (Radwan et al., 2021).

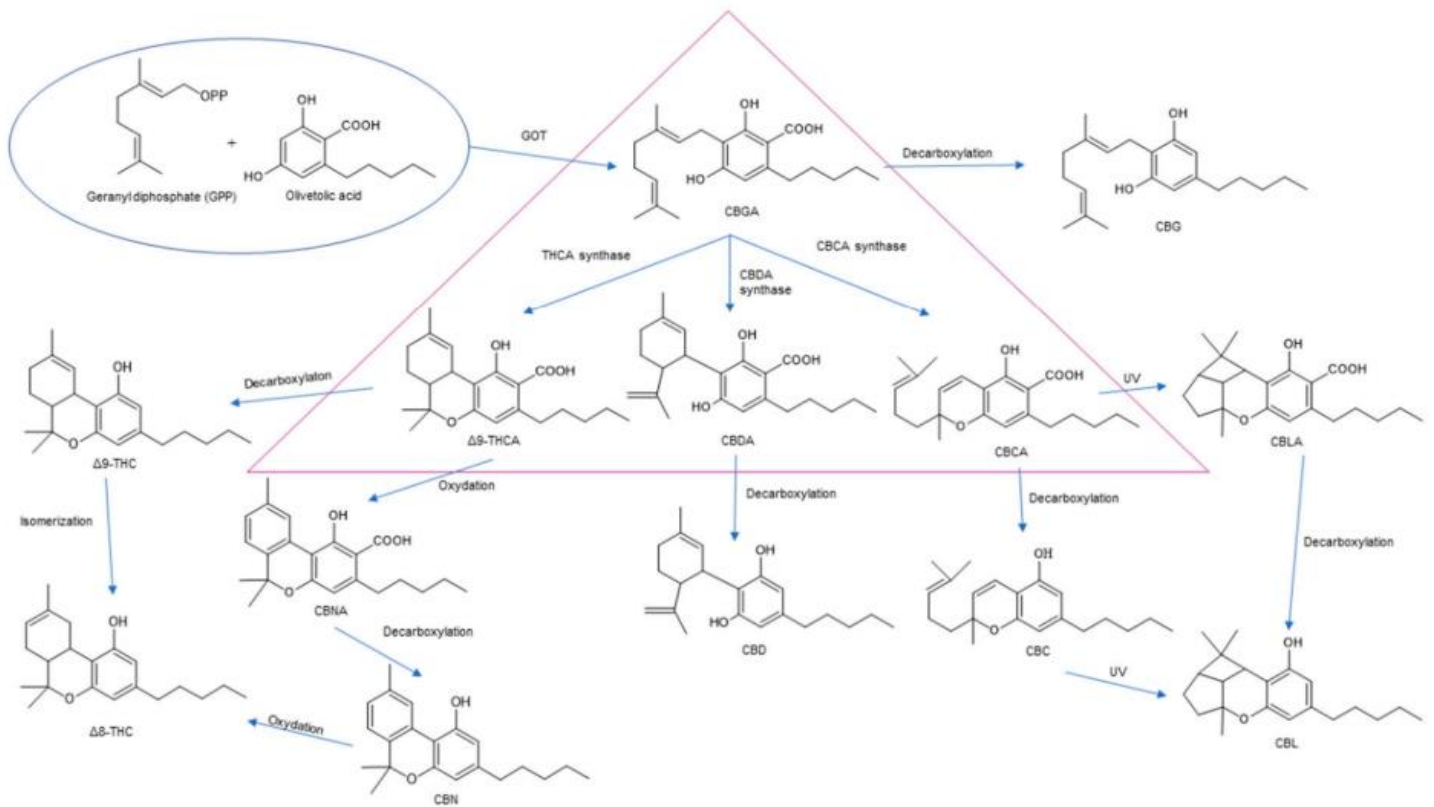


Εικόνα 3. Οι 10 τάξεις ενώσεων των κανναβινοειδών στο φυτό της κάνναβης (Fordjour et al., 2023)

Το φυτό της κάνναβης συνθέτει τις ενώσεις των κανναβινοειδών με τη μορφή των αντίστοιχων οξέων, τα οποία ονομάζονται και προ-κανναβινοειδή. Η σύνθεση και η συσσώρευση τους γίνεται σε εκκριτικές κοιλότητες στο τρίχωμα που διαθέτει στο εξωτερικό των φύλλων του. Η φάση της έκκρισης του τριχώματος συνδέεται άμεσα με το χρώμα του. Χαρακτηριστικά, τα προ-κανναβινοειδή βρίσκονται στην υψηλότερη συγκέντρωση όταν το χρώμα του τριχώματος είναι κίτρινο. Ίχνη προ-κανναβινοειδών υπάρχουν και σε άλλα μέρη του φυτού όπως τους σπόρους, τις ρίζες και τη γύρη (Helcman et al., 2022).

Αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ότι το πρώτο βήμα βιοσύνθεσης των κανναβινοειδών αποτελεί ο σχηματισμός του ελαιολικού οξέος. Η σύνθεση του κανναβιγερολικού οξέος (CBGA) πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης του ελαιολικού οξέος και του διφωσφορικού γερανυλεστέρα (GPP) παρουσία του ενζύμου GOT (prenylase geranyl diphosphate:olivetolate geranyltransferase). Πέραν του κανναβιγερολικού οξέος, παράγεται και κανναβιγεροβανικό οξύ. Οι δύο αυτές ενώσεις αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πολλών άλλων κανναβινοειδών που παράγονται και υπάρχουν στο φυτό. Έπειτα, μετά και από το βήμα της ισοπρενυλίωσης, ενεργοποιείται το ένζυμο της οξειδωτικής κυκλάσης. Η ενεργοποίηση αυτή πυροδοτεί μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων. Το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) μετατρέπεται σε Δ9-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (Δ9-THCA) μέσω της κατάλυσης από τη συνθάση του

τετραϋδροκανναβινολικού οξέος. Αντίστοιχα, η δράση του ενζύμου της συνθάσης του κανναβινολικού οξέος, το κανναβιγερολικό οξύ μετατρέπεται σε κανναβινολικό οξύ (CBDA). Παράλληλα, η δράση της συνθάσης του κανναβιχρωμικού οξέος καταλύει την αντίδραση σχηματισμού του κανναβιχρωμικού οξέος. Ως αποτέλεσμα της αποκαρβοξυλίωσης των ενώσεων αυτών, παράγονται οι εξής ενώσεις: Δ9- τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), κανναβινόλη (CBD) και κανναβιχρωμίνη (CBC) (Kanabus et al., 2021).

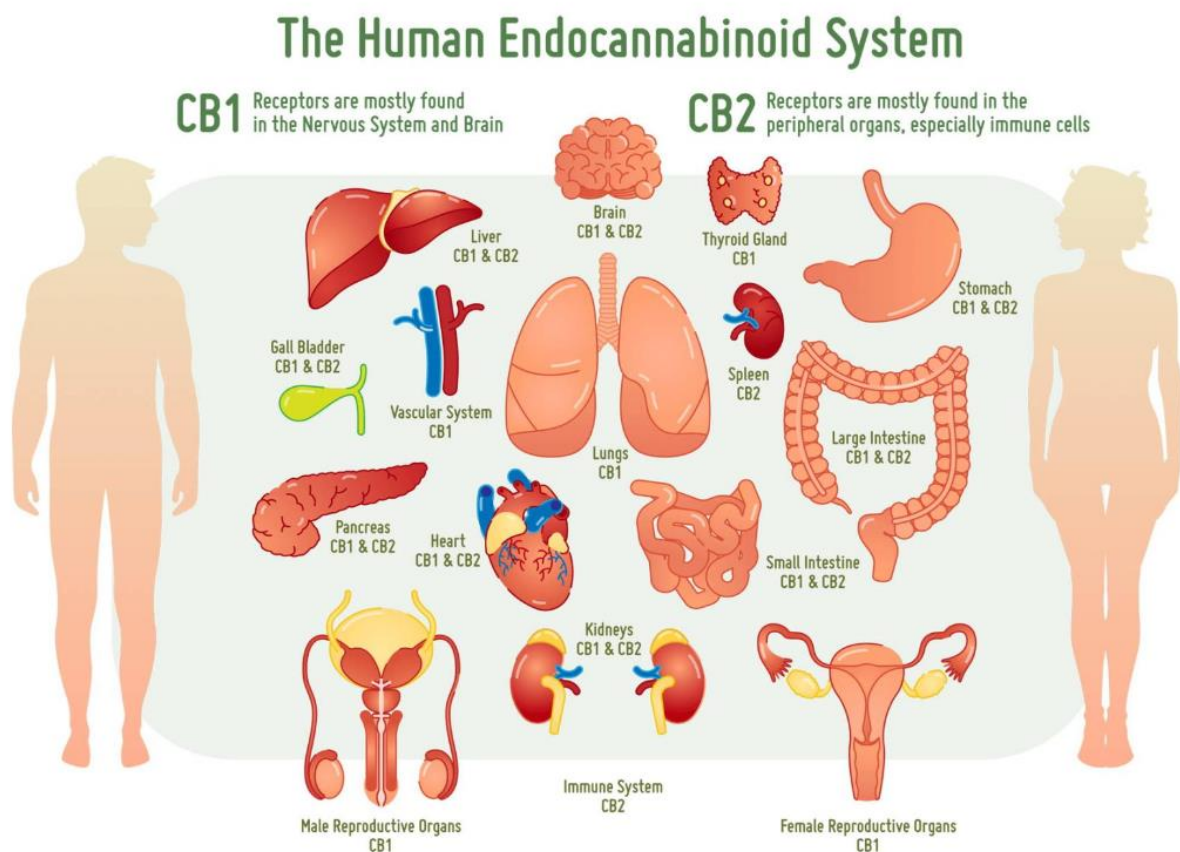


Εικόνα 4. Μονοπάτι βιοσύνθεσης των κύριων κανναβινοειδών.

Ενδοκανναβινοειδές σύστημα

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (ΕΚΣ), γνωστό και ως ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών, αποτελεί ένα σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού το οποίο ελέγχει ένα ευρύ μεταβολικό δίκτυο. Η μελέτη του συστήματος ξεκίνησε μετά την αποσαφήνιση της δομής της τετραϋδροκανναβινόλης στη δεκαετία του '60 και αργότερα συνδυάστηκε με τη ανακάλυψη των αντίστοιχων υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης και των ενζύμων. Το ενδιαφέρον πίσω από την μελέτη στάθηκε η ανάγκη για την εύρεση εναλλακτικών θεραπειών κατά του άγχους και της κατάθλιψης.

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα συνίσταται από ενδοκανναβινοειδή λιπίδια (eCBs), πεπτιδια-διαμεσολαβητές, τους αντίστοιχους τους υποδοχείς τύπου 1 και 2 (CB1 και CB2), μεταβολικά ένζυμα και μεμβρανικούς μεταφορείς. Οι υποδοχείς CB1, CB2 είναι συγκεκριμένα υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G (G protein- coupled receptors: GCPRs) (de Melo Reis et al., 2021). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν τη λειτουργία μεσάζοντα μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού κυτταρικού περιβάλλοντος. Μετά την ενεργοποίησή τους, τίθεται σε λειτουργία μια αλληλουχία δράσεων: διαφοροποιούνται τα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου και καλίου, ενεργοποιούνται ένζυμα- κινάσες (τύπου mitogen- activated protein kinases/ MAPK και extracellular signal-regulated kinases 1,2/ ERK1, ERK2). Οι μεταβολές αυτές, σε επίπεδο μεταγωγής σημάτων, έχουν ως αποτέλεσμα τον έλεγχο της σύνθεσης της κυτοκίνης και της ρύθμισης της μετάγραφής της. Τα λιπίδια- ενδοκανναβινοειδή παράγονται ενδογενώς από τα φωσfolιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης τα οποία περιέχουν αραχιδονικό οξύ (AA) με σκοπό την παραγωγή της ανανδαμίδης (AEA) και της 2-αραχιδονυλογλυκερόλης (AG). Η AEA δρα ως αγωνιστής των υποδοχέων CB1, CB2, εμφανίζοντας μεγαλύτερη σχετική συγγένεια με τον CB1 υποδοχέα. Από την άλλη, η 2-AG παρουσιάζει υψηλότερη δραστικότητα συγκριτικά με την ανανδαμίνη (AEA), έχοντας τη δυνατότητα να συνδεθεί με τους δύο υποδοχείς στο ίδιο επίπεδο ευκολίας.



Εικόνα 4. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα του ανθρώπου ([Image Link](#))

Ο υποδοχέας CB1 βρίσκεται σε αδένες και όργανα πολλών συστημάτων όπως: νευρικό σύστημα-εγκέφαλος, σκελετικό σύστημα-σπονδυλική στήλη, πεπτικό σύστημα-ήπαρ/πάγκρεας, γαστρεντερικό σύστημα- λεπτό και παχύ έντερο, αναπαραγωγικό σύστημα. Ο υποδοχέας CB2 συναντάται συχνότερα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Από την άλλη, τα κανναβινοειδή που προέρχονται από φυτικές πηγές (ονομάζονται και φυτοκανναβινοειδή), με την τετραϋδροκανναβινόλη και την κανναβιδιόλη να ξεχωρίζουν, αποτελούν αντικείμενο έντονης μελέτης λόγω της επίδρασης στη λειτουργία του εγκεφάλου. Η έκθεση του οργανισμού σε κανναβινοειδή σε διάφορα στάδια της ζωής όπως το προγεννητικό, το περιγεννητικό (αμέσως μετά τη γέννηση) και το εφηβικό μπορεί να εμφανίσουν συνεργετική δράση στην πλαστικότητα των νευρώνων. Με τον τρόπο αυτό, οι νευρώνες έχουν τη ικανότητα να τροποποιούν την ισχύ της σύνδεσης-επικοινωνίας τους.

Η κανναβιδιόλη διαθέτει ικανή αντιφλεγμονώδη, αγχολυτική, αντικαταθλιπτική, αντιψυχωσική, αντισπασμωδική, αντιοξειδωτική και αντineοπλασματική δράση. Επίσης, παρουσιάζει θεραπευτικές ιδιότητες υπέρ του εγκεφάλου, με την μείωση της φθοράς που σχετίζεται με νευρο-εκφυλιστικές ή ισχαιμικές συνθήκες (de Melo Reis et al., 2021).

1. CBDA

Το κανναβιδιολικό οξύ (Cannabidiolic Acid- CBDA) είναι το επικρατέστερο προ-κανναβινοειδές το οποίο υπάρχει στη βιομηχανική κάνναβη. Το CBDA αποκαρβοξυλιώνεται και μετατρέπεται σε CBD μέσω της ξήρανσης του φυτού ή μέσω θερμικής επεξεργασίας (Fordjour et al., 2023). Παρουσιάζει μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με την κανναβιδιόλη, καθώς μπορούν να επιτευχθούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του στην κυκλοφορία του αίματος (για χορήγηση από τη στοματική οδό). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς και αναλγητική δράση σε συνδυαστική χορήγηση με δόσεις τετραϋδροκανναβινόλης. In vivo πειράματα έχουν αποδείξει ότι το CBDA έχει την ικανότητα να δρα κατά της ναυτίας και του εμετού, ενώ η αντικαρκινική δράση του έχει παρατηρηθεί σε in vitro πειράματα (Helcman et al., 2022). Σε αναλύσεις που έγιναν σε διάφορες ποικιλίες βιομηχανικής κάνναβης, η περιεκτικότητα του CBDA στους ανθούς του φυτού κυμαίνεται στο διάστημα 0,011- 8,825 %w/w ή 0,011—8,825 g CBDA/ 100 g φυτού (ανθού) (Glivar et al., 2020).

2. CBD

Η κανναβιδιόλη είναι μια λιπόφιλη ένωση, η απορρόφηση της οποίας γίνεται κατά βάση στο λεπτό έντερο. Μετά την απορρόφηση, παρατηρείται έντονα το φαινόμενο πρώτης διόδου. Ως εκ τούτου, η βιοδιαθεσιμότητα για χορήγηση δια της στοματικής οδού είναι χαμηλή. Υπάρχουν πάνω από 50 διαφορετικοί μεταβολίτες CBD, τα οποία είναι προϊόντα οξειδωσης, υδροξυλίωσης, σύζευξης με γλυκουρονικό οξύ και εποξειδωσης. Η χορήγηση CBD, ενεργοποιεί μια σειρά δράσεων στον οργανισμό οι οποίες οδηγούν στην ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της κανναβιδιόλης συνδέεται άμεσα με την αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση. Ο συνδυασμός των ιδιοτήτων αυτών παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία νευρο-εκφυλιστικών ασθενειών. Μέσα από μετρήσεις της δράσης μέσω της μεθόδου της κυκλικής βολταμετρίας και της αντίδρασης Fenton, βρέθηκε ότι η CBD έχει αντιοξειδωτική δράση παρόμοιας ισχύος με αυτήν του συνθετικού εμπορικού αντιοξειδωτικού βουτυλο-υδροξυτολουένιο (butylhydroxytoluene- BHT). Επίσης, συγκριτικά με την τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ, είναι πιο δραστικό νευρο-προστατευτικό αντιοξειδωτικό. Παρενέργειες (όπως το αίσθημα κατάθλιψης, η μειωμένη όρεξη για φαγητό και η διαταραχή στη διαδικασία της πέψης) μπορούν να εμφανισθούν, αλλά σπάνια. Σε οριοθετημένες ημερήσιες δοσολογίες (μικρότερες των 20 mg/kg/day, δηλαδή 1400 mg CBD ημερησίως για έναν άνθρωπο 70 κιλών), η πιθανότητα εμφάνισης τους είναι αρκετά μειωμένη. Σε αναλύσεις που έγιναν σε διάφορες ποικιλίες βιομηχανικής κάνναβης, η περιεκτικότητα της CBD στους ανθούς του φυτού κυμαίνεται στο διάστημα 0,011- 8,825 %w/w ή 0,112—2,582 g CBD/ 100 g φυτού (ανθού) (Glivar et al., 2020).

1.5.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή, ως χημικές ενώσεις, έχουν χαρακτηριστική δομή που αποτελείται από ένα σκελετό τριών δακτυλίων C₆-C₃-C₆. Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 20 διαφορετικά φλαβονοειδή σε διαφορετικά σημεία του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης (μεταξύ άλλων στα φύλλα, τους ανθούς, τους σπόρους και τους καρπούς), η πλειοψηφία των οποίων ανήκουν στις φλαβανόλες και φλαβόνες. Φλαβόνες όπως η κανναφλαβίνη A, B και C βρίσκονται κατά αποκλειστικότητα στα φύλλα και τους ανθούς του φυτού. Καθότι τα φλαβονοειδή, ως χημικές ουσίες, διατελούν και φυτοπροστατευτικό ρόλο, η παραγωγή τους από το ίδιο το φυτό εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η βροχόπτωση, η υγρασία και το κλίμα. Έτσι, ανάλογα με τα ερεθίσματα από το περιβάλλον, υπάρχουν γενετικές τροποποιήσεις από τα κύτταρα του φυτού με σκοπό την προσαρμογή και την επιβίωση του. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι το υψόμετρο στην περιοχή της καλλιέργειας επηρεάζει τα επίπεδα συγκέντρωσης των κανναφλαβινών. Κάποια από τα φλαβονοειδή τα οποία έχουν βρεθεί είναι: η οριεντίνη, η βιτεξίνη, ο γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ο γλυκοζίτης της απιγενίνης και η κερκετίνη.

Σχετικά με τις κανναφλαβίνες: πέραν της αντιοξειδωτικής ικανότητας που διαθέτουν και μοιράζονται και με άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών, διαθέτουν και αντιφλεγμονώδη δράση. Μια πρώτη παρατήρηση έγινε το 1981, όταν ενώσεις που περιείχονταν σε εκχυλίσματα φύλλων βιομηχανικής κάνναβης (χωρίς την παρουσία κανναβινοειδών) μπορεί να επηρεάζουν την παραγωγή προσταγλανδίνης E2 (PGE2). Άλλη έρευνα απέδειξε ότι οι κανναφλαβίνες που περιείχονταν σε αιθανολικά εκχυλίσματα φύλλων βιομηχανικής κάνναβης κατέστειλε τον προφλεγμονώδη παράγοντα TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), προκάλεσε την παραγωγή της PGE2 σε τεχνητά καλλιεργημένα αρθρικά κύτταρα. Πιο πρόσφατα, in vivo ενζυμικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι κανναφλαβίνες A και B εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες μέσω του περιορισμού της δράσης του ενζύμου της PGE2- 1-συνθάσης και της 5-λιποξυγενάσης. Ο περιορισμός αυτός οδηγεί στη μείωση της παραγωγής της PGE-2 και του λευκοτριενίου αντίστοιχα. Συγκριτικά με την ασπιρίνη, εμφανίζει 30 φορές μεγαλύτερη δράση στην καταστολή της απελευθέρωσης της PGE2 σε μελέτη που έγινε σε ρευματοειδή κύτταρα.

Ο νευροπροστατευτικός ρόλος της κανναφλαβίνης A ερευνήθηκε σε νευρωνικά κύτταρα PC12. Σε συγκεντρώσεις ίσες ή μικρότερες των 10 μM, παρατηρήθηκε ότι η κανναφλαβίνη A βελτίωσε τη βιωσιμότητα των νευρωνικών κυττάρων ενάντια στη κυτοτοξικότητα που προκαλείται από την αμυλοείδωση (Aβ). Αυτό συμβαίνει καθώς μειώνεται η συσσώρευση του αμυλοειδούς Aβ και ο σχηματισμός των αμυλοειδών ινιδίων.

Για τις αντικαρκινικές ιδιότητες έγινε αναφορά στην μελέτη του πρενυλιωμένου ισομερούς της κανναφλαβίνης B, η επίσης γνωστή ως ισοκανναφλαβίνη B. Η ισοκανναφλαβίνη B είναι ικανή να καταστέλλει τη ταχεία αναπαραγωγή των T47-D ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού (που ελέγχονται από τα οιστρογόνα) μέσω της αναστολής του G0/G1 κυτταρικού κύκλου. Η θεραπεία με ισοκανναφλαβίνη B προκάλεσε καθυστέρηση τόσο στην τοπική όσο και στην μεταστατική καρκινική εξέλιξη και αύξησε το διάστημα επιβίωσης των πειραματόζων που έπασχαν από καρκίνο στο πάγκρεας. Ωστόσο, η χρήση του σε φαρμακευτική μορφή απαιτεί μια σειρά μεταβατικών ερευνών για τη χορήγηση σε ανθρώπους.

Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε in vivo όσο και in silico (δηλαδή σε υπολογιστικό περιβάλλον) έχουν σημειωθεί και αντιπαρασιτικές ικανότητες. Ειδικότερα, οι κανναφλαβίνες A και B παρουσίασαν ήπια αντιλειτουργική δράση ενάντια στους

προμαστιγώτες του παράσιτου *Leishmania donovani*. Η κανναφλαβίνη Α εμφάνισε, επίσης, ήπια ανασταλτική δράση ενάντια στο παράσιτο *Trypanosoma brucei brucei* (Bautista et al.,2021).

1.5.3 Τερπένια

Τα τερπένια είναι αρωματώδεις ενώσεις οι οποίες βρίσκονται σε πολλά φυτά υπό την μορφή αιθέριου ελαίου και έχουν διπλό σκοπό: α) την προσέλκυση των εντόμων-επικονιαστών και β) την προστασία από φυτοφάγους οργανισμούς. Στη βιομηχανική κάνναβη έχουν αναγνωριστεί παραπάνω από 200 τερπένια, η απομόνωση των οποίων γίνεται μέσω της διεργασίας της υδρο-ατμοαπόσταξης. Η περιεκτικότητα του φυτού σε τερπένια ποικίλλει ανάλογα με την καλλιέργεια και μπορεί να φτάσει μέχρι και το 10% (w/w) σε επιλεκτικές σοδειές. Τα τερπένια, ως ενώσεις, αποτελούν προϊόντα δράσης κάποιων ενζύμων που ονομάζονται συνθάσες. Οπότε, η χημική ποικιλομορφία των τερπενίων στο φυτό συσχετίζεται άμεσα με την παρουσία (ή μη) των κωδικοποιητικών αυτών ενζύμων. Πέραν της παρουσίας των ενζύμων, καθοριστικό ρόλο παίζει και η ύπαρξη συγκεκριμένων πρόδρομων ενώσεων οι οποίες δρουν ως υποστρώματα. Για παράδειγμα, ο γερανυλοπυροφωσφορικός εστέρας (GPP) (που είναι ένα ισοπρενοειδές 10 ατόμων άνθρακα) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τα μονοτερπενοειδή. Από την άλλη, ο φαρνεσυλοπυροφωσφορικός εστέρας (FPP) (που είναι ένα ισοπρενοειδές 15 ατόμων άνθρακα) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τα σεσκιτερπένια που παρουσιάζονται στο φυτό.

1.5.4 Φυτοστερόλες

Φυτοστερόλες όπως είναι η καμπεστερόλη, σιτοστερόλη και σιγμαστερόλη έχουν εντοπιστεί στις ρίζες του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης. Οι γλυκοζίτες της σιτοστερόλης μπορούν να εκχυλιστούν από τις ρίζες τα φύλλα με τη χρήση μίγματος διαλυτών μεθανόλης-χλωροφορμίου.

1.5.5 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή, γενικότερα, αποτελούν μέρος του χημικού αμυντικού μηχανισμού που χρησιμοποιούν τα φυτά ενάντια στην κατανάλωση από τους φυτοφάγους οργανισμούς. Η βιομηχανική κάνναβη μπορεί να περιέχει αλκαλοειδή της οικογένειας της ινδόλης. Στην παρουσία των συστατικών αποδίδονται ιδιότητες του φυτού όπως η αναλγητική, η αντιμικροβιακή και η αντικαρκινική. Σε αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1975, έγινε απομόνωση 4 αλκαλοειδών με το όνομα κανναβιμίνη Α,Β,С και D, ενώ ανακαλύφθηκε και ένα νέο αλκαλοειδές με το όνομα κανναβισατιβίνη.

1.5.6 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα συμμετέχουν σε διαδικασίες του ανθρώπινου του μεταβολισμού χάρης στην ύπαρξη χαρακτηριστικών δραστικών ομάδων (όπως το καρβοξύλιο). Μερικά λιπαρά οξέα που βρίσκονται στους σπόρους της κάνναβης είναι ω3 λιπαρά όπως το λινολενικό και ισολινολενικό οξύ και ω6 λιπαρά οξέα όπως το λινολεϊκό, καπρωϊκό, καπρυλικό, μυριστικό, παλμιτολεϊκό, παλμιτικό, μαργαρικό, ολεϊκό, στεαρικό, αραχιδικό ισοαραχιδικό και βεχενικό οξύ. Η περιεκτικότητα των σπόρων σε έλαιο κυμαίνεται στα επίπεδα του 30-35% σε ξηρή βάση

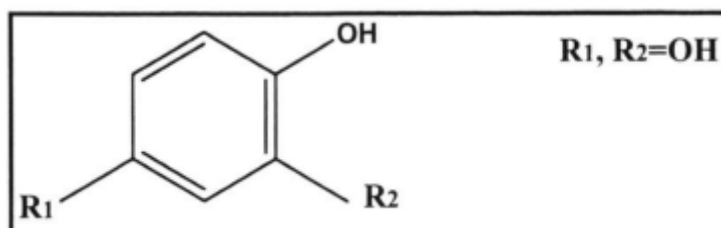
σπόρων και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας του φυτού. Άλλα μέρη του φυτού όπως οι ανθοί και τα φύλλα έχουν μικρότερη περιεκτικότητα σε έλαιο σε ποσοστό 8-16%. Αυτό καθιστά τους σπόρους ως την κύρια πηγή ελαίου. Ως προϊόν- έλαιο μαγειρέματος, το έλαιο κάνναβης διακρίνεται για τα χαμηλά επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων (0,9%) από τα περιεχόμενα τριγλυκερίδια και τα υψηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (80%).

1.5.7 Κηροί

Τα φυτά συνθέτουν χημικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες είναι μη-πτητικές και έχουν υδροφοβικό χαρακτήρα που ονομάζονται κηροί. Οι κηροί έχουν ως στόχο τη μόνωση των φύλλων και των στελεχών του φυτού ενάντια στην αφυδάτωση τους και διάφορες ασθένειες. Επιπλέον, δρουν προστατευτικά ως προς τα τερπένια και τα κανναβινοειδή του φυτού. Η περιεκτικότητα σε κηρούς στους ανθούς είναι τριπλάσια σε σύγκριση με τα φύλλα (Fordjour, et al., 2023).

1.6 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών μαζί με τα τερπενοειδή και τα αλκαλοειδή. Προέρχονται βιοσυνθετικά από το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων. Ο όρος «δευτερογενή προϊόντα» οφείλεται στην πορεία της βιοσύνθεσής τους και όχι στη σημασία τους για τα φυτά. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια κατηγορία χημικών ενώσεων οι οποίες φέρουν στο μόριο τους έναν βενζολικό δακτύλιο στον οποίο βρίσκονται υποκατεστημένες μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες (Εικόνα 5). Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται συνήθως πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι συνήθως υδατοδιαλυτές γιατί εμφανίζονται τις περισσότερες φορές ως γλυκοζίτες δηλαδή ενωμένες με σάκχαρα (μέσω γλυκοζιπικού δεσμού) και βρίσκονται συνήθως στο κενοτόπιο των φυτικών κυττάρων. Μια χαρακτηριστική ιδιότητα των φαινολικών υδροξυλομάδων είναι η οξύτητά τους, που οφείλεται στην τάση διάσπασης του δεσμού μεταξύ οξυγόνου και υδρογόνου προς σχηματισμό του αρνητικά φορτισμένου ιόντος φαινοξειδίου. Το φαινοξείδιο παρουσιάζει αυξημένη υδατοδιαλυτότητα, κυρίως υπό την παρουσία απλών μεταλλοκατιόντων π.χ. νατρίου ή αμμωνίου.



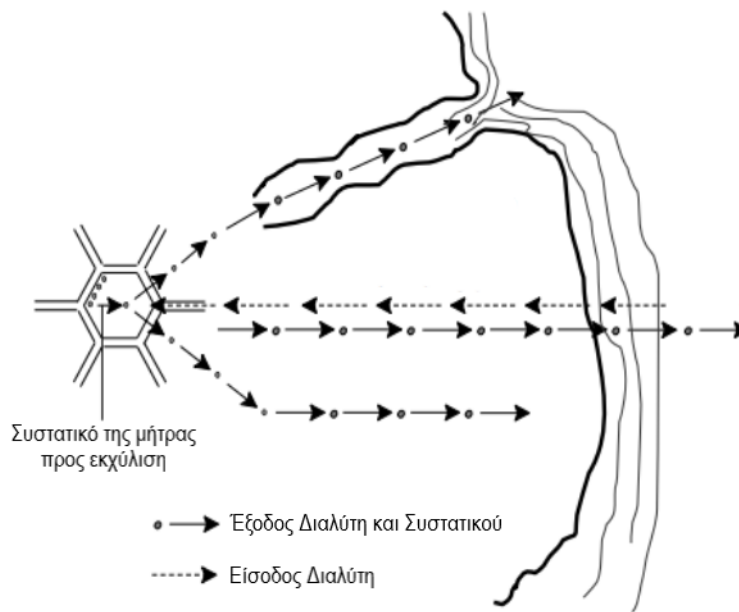
Εικόνα 5. Βενζολικός δακτύλιος που περιέχει μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες

Μερικές από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των φαινολών:

- ο απεντοπισμός του ιόντος φαινοξειδίου, δηλαδή η κίνηση του αρνητικού φορτίου στον αρωματικό δακτύλιο και ο σχηματισμός ημικινονικών ανιόντων όπου το φορτίο βρίσκεται σε άτομο άνθρακα αντί σε άτομο οξυγόνου. Τέτοια αρνητικά φορτισμένα κέντρα μπορούν να έλξουν θετικά φορτισμένες (ηλεκτρονιόφιλες) αλκυλικές ομάδες.
- η δυνατότητα του ιόντος φαινοξειδίου να αποβάλει ένα ακόμα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσει μια ρίζα που επίσης εμφανίζει το φαινόμενο του απεντοπισμού. Δύο τέτοιες ρίζες μπορούν να ακολουθήσουν μια διαδικασία γνωστή ως οξειδωτική σύζευξη όπου σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα ή άνθρακα-υδρογόνου.
- η ικανότητα του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με άλλα μόρια με αλληλεπίδραση του όξινου (θετικά φορτισμένου) φαινολικού υδρογόνου και βασικών (αρνητικά φορτισμένων) κέντρων των άλλων μορίων, π.χ. η αλληλεπίδραση μεταξύ καφεΐνης και τριών μορίων γαλλικού οξέος (Προεστός, 2005).

2. Η εκχύλιση

Η εκχύλιση αποτελεί μια διεργασία διαχωρισμού ή απομόνωσης συστατικών από φυσικές πρώτες ύλες η οποία στηρίζεται σε φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών (όπως η πολικότητα και η διαλυτότητα). Τα διαχωριζόμενα συστατικά κατανέμονται σε δύο μη-αναμίξιμες φάσεις. Η πρώτη φάση αντιστοιχεί στο εκχυλιζόμενο υλικό (στερεό ή υγρό) και η δεύτερη στο διαλύτη εκχύλισης (υγρό ή αέριο). Η εκχύλιση είναι μια διεργασία ισορροπίας, δηλαδή η κινητήρια δύναμη για την μεταφορά μάζας από την μία φάση στην άλλη είναι η διαφορά στη συγκέντρωση ενός ή περισσοτέρων συστατικών (Τσιμογιάννης et al., 2022). Στη βιομηχανία τροφίμων η πλειοψηφία των εφαρμογών εκχύλισης αφορούν στην εκχύλιση στερεού-υγρού. Η εκχύλιση συστατικών από μια στερεή πρώτη ύλη είναι μια σύνθετη διεργασία, η οποία βρίσκει τα θεμέλιά της στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας μέσω της διεπιφάνειας στερεού-υγρού. Το στερεό είτε περιέχει εκ φύσης του μια υγρή φάση είτε εμποτίζεται από το διαλύτη, με τη διάχυση της υγρής φάσης στο εσωτερικό του στερεού να είναι το καθοριστικό στάδιο της διεργασίας. Από τη στιγμή που ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό (όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 5), πραγματοποιούνται μια σειρά βημάτων-σταδίων που επηρεάζουν το διαχωρισμό των συστατικών από το στερεό και την παραλαβή τους στον κύριο υλικό όγκο του διαλύτη. Τα βήματα αυτά είναι τα εξής:



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης συστατικού από στερεά σωματίδια με χρήση διαλύτη (Ωραιοπούλου, 2020).

1. Είσοδος του διαλύτη στην μήτρα του στερεού υλικού.
2. Διαλυτοποίηση των συστατικών- στόχων που είναι επιθυμητό να παραληφθούν.
3. Μεταφορά των συστατικών προς το εξωτερικό της μήτρας του στερεού υλικού.
4. Μεταφορά του συστατικού από την εξωτερική επιφάνεια του στερεού προς τον κύριο όγκο του διαλύτη μέσω του υμένα που περιβάλλει το στερεό.
5. Μετακίνηση του συστατικού με τον κύριο όγκο του διαλύτη.
6. Διαχωρισμός του εκχυλίσματος (δηλαδή του συστήματος διαλύτη και διαλυμένου συστατικού) από το στερεό.

Για ένα συγκεκριμένο υλικό, ο ρυθμός εκχύλισης (δηλαδή της μεταφοράς από τη στερεά φάση στην υγρή και τον κύριο όγκο του διαλύτη) εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το μέγεθος των σωματιδίων (κοκκομετρία) του στερεού, το είδος του διαλύτη, η θερμοκρασία εκχύλισης και η ανάδευση του συστήματος.

Το μέγεθος των σωματιδίων επιδρά στο ρυθμό με δύο διαφορετικούς τρόπους. Αρχικά, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνει τη συνολική διαθέσιμη επιφάνεια επαφής μεταξύ στερεού και διαλύτη. Ταυτόχρονα, μειώνεται και η απόσταση την οποία πρέπει να «διανύσει» το εκχυλιζόμενο συστατικό προκειμένου να φτάσει στην επιφάνεια, αυξάνοντας έτσι το ρυθμό εκχύλισης.

Το είδος του διαλύτη αποτελεί μια σημαντική παράμετρος για τη διεργασία της εκχύλισης. Η επιλογή του διαλύτη γίνεται σε συμφωνία με τη φύση του συστατικού- στόχου που απομακρύνεται, δηλαδή πρέπει να παρουσιάζει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα. Επίσης, είναι επιθυμητό ο διαλύτης να έχει μικρό ιξώδες ώστε να εξασφαλίζεται η καλή κυκλοφορία του στο εσωτερικό του υλικού.

Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί εν γένει αύξηση της διαλυτότητας του συστατικού στο διαλύτη. Επιπλέον, στη περίπτωση εκχύλισης στερεού- υγρού, ο συντελεστής διάχυσης στο στερεό αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης στην εκχύλιση στερεού- υγρού διευκολύνει τη διάχυση και μειώνει την αντίσταση στη μεταφορά μάζας στη διεπιφάνεια στερεού- υγρού (Brennan et al., 1976).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η εκχύλιση ενός συστατικού από τη μικροδομή του υλικού- πρώτης ύλης διέπεται από εσωτερικά φαινόμενα διάχυσης. Θεωρώντας ότι η εξωτερική αντίσταση μεταφοράς μάζας αμελητέα, η συγκέντρωση των συστατικών στο διαλύτη στο εσωτερικό του στερεού σωματιδίου ισούται με τη συγκέντρωσή τους στο κύριο όγκο του διαλύτη. Η υπολειμματική συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στη μήτρα περιγράφεται από τον 2^ο νόμο του Fick μέσω της παρακάτω εξίσωσης 1^{ης} τάξης ως προς το χρόνο εκχύλισης:

$$\ln(C_{\infty} - Ct) = \ln(C_{\infty} - C_0) - k * t \quad (1)$$

όπου C_{∞} : η συγκέντρωση σε εκχυλιζόμενα συστατικά (εκφρασμένη σε mg/g αρχικής πρώτης ύλης) στο διάλυμα που λαμβάνεται σε άπειρο χρόνο, όπου έχει επέλθει η ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων,

C_t : η συγκέντρωση σε εκχυλιζόμενα συστατικά (mg/g αρχικής πρώτης ύλης) στο διάλυμα για κάθε χρονική στιγμή t της εκχύλισης

C_0 : η συγκέντρωση σε εκχυλιζόμενα συστατικά (mg/g αρχικής πρώτης ύλης) στο διάλυμα την χρονική στιγμή $t=0$ της εκχύλισης

k : η σταθερά ρυθμού (1/min) της διεργασίας της εκχύλισης

t : ο χρόνος εκχύλισης (min)

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες εκχυλίσεων στερεού- υγρού με βάση τη σχέση που διατηρούν ο διαλύτης και η πρώτη ύλη κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

Η πρώτη κατηγορία είναι εκείνη της εκχύλισης κλειστού συστήματος. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τεχνικές μέσω των οποίων δημιουργούνται ισορροπίες των συγκεντρώσεων των εκχυλιζόμενων ουσιών μεταξύ της πρώτης ύλης και του διαλύτη. Σε πρακτικό επίπεδο, η πρώτη ύλη βρίσκεται σε ανάμιξη με το διαλύτη εκχύλισης σε ένα κλειστό σύστημα που οδηγεί το σύστημα πρώτης ύλης- διαλύτη σε ισορροπία. Οι τεχνικές που περιλαμβάνονται στη κατηγορία αυτή εφαρμόζονται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα για τη παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων και αυτό γιατί εν συνεχεία δεν απαιτείται απομάκρυνση του νερού ως διαλύτη. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ερυθρή οينوποίηση στην οποία υποβάλλονται τα σταφύλια. Η εκχύλιση κλειστού συστήματος χωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες τεχνικών:

- ο Στη διαβροχή, όπου το περιεχόμενο νερό της πρώτης ύλης λαμβάνει το ρόλο του διαλύτη εκχύλισης, αφού πρώτα η πρώτη ύλη έχει μετατραπεί σε ένα εναιώρημα κυττάρων.

- ο Στην εμβροχή, όπου η ξηρή πρώτη ύλη δεδομένης κοκκομετρίας έρχεται σε επαφή με το διαλύτη για μεγάλο χρονικό διάστημα (με χρήση ανάδευσης ή όχι).

Η δεύτερη κατηγορία είναι εκείνη της εκχύλισης σε ανοιχτό σύστημα. Χαρακτηριστικό των περιπτώσεων αυτών είναι η διατήρηση υψηλής διαφοράς συγκέντρωσης μεταξύ στερεής και υγρής φάσης, οπότε δεν επιτυγχάνεται η ισορροπία και υπάρχει διαρκώς η κινητήρια δύναμη (δηλαδή η διαφορά συγκέντρωσης) για την μεταφορά μάζας.

Συνήθως, οι τεχνικές βασίζονται στην εξίκμαση. Στην εξίκμαση η πρώτη ύλη είναι τοποθετημένη σε σταθερή κλίνη, την ίδια ώρα που ο διαλύτης της εκχύλισης τροφοδοτείται στο εσωτερικό της. Ο φρέσκος διαλύτης διέρχεται από τους πόρους του υλικού, εκχυλίζει τα συστατικά και εξέρχεται από το σύστημα ως εκχύλισμα (Τσιμογιάννης, et al., 2022).

2.1 Συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

2.1.1 Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες

Η εκχύλιση με χρήση οργανικών διαλυτών είναι μία διεργασία σχεδιασμένη για να διαχωρίσει τα διαλυτά συστατικά από μία στερεή μήτρα (φυτόμαζα) σε μία υγρή (διαλύτης) μέσω της διάχυσης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες σχεδιασμού μιας διεργασίας εκχύλισης. Κάποιοι από τους παράγοντες που πρέπει να εξεταστούν για την ορθή επιλογή διαλύτη παρουσιάζονται παρακάτω (Azmir et al., 2013):

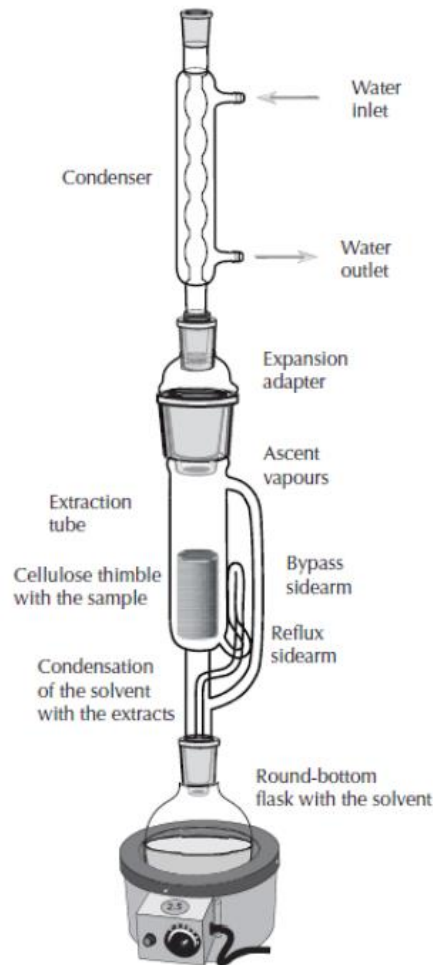
- Η πολικότητα της ένωσης στόχου σε σχέση με την πολικότητα του διαλύτη
- Η μοριακή συγγένεια μεταξύ διαλύτη και διαλυμένης ουσίας
- Η διευκόλυνση της μεταφοράς μάζας
- Η χρήση συνδιαλύτη
- Το περιβαλλοντικό αντίκτυπο
- Η τοξικότητα
- Το κόστος

2.1.2 Εκχύλιση Soxhlet

Η συσκευή Soxhlet είναι σχεδιασμένη ώστε, μέσω συνεχούς εκχύλισης, μια ουσία της στερεής πρώτης ύλης να μπορεί να εκχυλιστεί με πολύ αποτελεσματικό τρόπο. Με την συσκευή Soxhlet, πραγματοποιούνται αυτόματα (συνεχώς) πολλαπλές εκχυλίσεις χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη, ο οποίος εξατμίζεται και συμπυκνώνεται μέσω μιας ανακύκλωσης στην συσκευή. Η συσκευή Soxhlet αποτελείται από τα παρακάτω μέρη (Εικόνα 6):

- ❖ Συμπυκνωτής αναρροής ο οποίος ψύχεται με νερό.
- ❖ Το φυσίγγιο Soxhlet, στο οποίο τοποθετείται το προς εκχύλιση στερεό.

- ❖ Η στήλη εκχύλισης Soxhlet, στο εσωτερικό της οποίας τοποθετείται το φυσίγγιο με το προς εκχύλιση στερεό. Η στήλη συνοδεύεται από ένα σιφώνιο, μέσω του οποίου ο διαλύτης επιστρέφει μετά την εκχύλιση στην φιάλη.
- ❖ Σφαιρική φιάλη με μέγεθος 3 έως 4 φορές το μέγεθος της στήλης εκχύλισης.



Εικόνα 6. Διάταξη συσκευής εκχύλισης Soxhlet.

Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται στο φυσίγγιο. Ακολούθως, το φυσίγγιο εισάγεται στη στήλη εκχύλισης. Η σφαιρική φιάλη πληρώνεται με διαλύτη έως το μισό του όγκου της. Στο εσωτερικό της προστίθενται κόκκοι πορσελάνης προς υποβοήθηση του βρασμού, και ξεκινάει η θέρμανση. Θερμαινόμενος ο διαλύτης εξατμίζεται και οι ατμοί ανέρχονται μέσω της στήλης εκχύλισης στο τμήμα που ψύχεται από το νερό. Εκεί οι ατμοί συμπυκνώνονται και εισέρχονται στάγδην στην στήλη εκχύλισης όπου βρίσκεται το φυσίγγιο με το προς εκχύλιση στερεό υλικό. Οι εκχυλίσιμες ουσίες διαλύονται τότε στον διαλύτη. Μέσω του σιφωνιού, όταν η στήλη πληρωθεί με επαρκή ποσότητα διαλύτη, ο διαλύτης που περιέχει τις διαλυμένες ουσίες εισέρχεται στην σφαιρική φιάλη όπου τοποθετήθηκε εξ αρχής. Εκεί επαναθερμαίνεται και εξατμίζεται εκ νέου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, έως ότου θεωρηθεί ότι ολοκληρώθηκε (Isac-Garcia et al., 2016).

2.1.3 Υδρο-ατμοαπόσταξη

Η υδρο-ατμοαπόσταξη αποτελεί μία παραδοσιακή τεχνική για την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών, κυρίως αιθέριων ελαίων από φυτά. Η ιδιότητα που εκμεταλλεύεται η μέθοδος αυτή είναι η μεγαλύτερη σχετική πτητικότητα σε σύγκριση με το νερό. Αρχικά, το στερεό τοποθετείται σε ένα ακίνητο διαμέρισμα μέσα στον αποστακτήρα. Στη συνέχεια προστίθεται επαρκής ποσότητα νερού, η οποία με θέρμανση έρχεται σε βρασμό. Το θερμό νερό και ο ατμός δρουν ως οι κύριοι παράγοντες για την απελευθέρωση των βιοδραστικών συστατικών από τον ιστό του φυτού. Στη συνέχεια, το μίγμα υδρατμών και αιθέριου ελαίου του φυτού, ψύχονται με χρήση ψυχρού ρεύματος νερού και συμπυκνώνονται. Το συμπυκνωμένο δείγμα ρέει από το συμπυκνωτή σε ένα διαχωριστή, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του αιθέριου ελαίου και των βιοδραστικών συστατικών από το νερό (Ravi et al.,2021).

Η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών και πιο συγκεκριμένα φαινολικών συστατικών από το φυτό της βιομηχανικής κάνναβης αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνών. Μερικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2. Αποτελέσματα συμβατικής εκχύλισης βιομηχανικής κάνναβης με χρήση διαλυτών.

Ποικιλία Φυτού	Μέρος Φυτού	Διαλύτης Εκχύλισης	Συνθήκες Επεξεργασίας	Περιεκτικότητα σε Συστατικά	Αντιοξειδωτική Δράση	Πηγή
Futura 75	Σπόροι	Αιθανόλη:80 % (και Νερό:20%)	10 mL (διαλύτη)/g (υλικού), 4 °C (θερμοκρασία εκχύλισης), 3 h (χρόνος εκχύλισης)	TPC: 2,33 mg GAE/g ξηρού εκχ. TFC: 2,93 mg QE/g ξηρού εκχ.	Αλληλεπίδραση εκχυλίσματος με τη ρίζα DPPH: 40%	Frassinetti et al., 2018
Futura 75	Σπόροι	Μεθανόλη:80%	5 mL/g, 3 h	TPC: 80,4 mg GAE/g ξηρού εκχ. TFC: 92,8 mg RE/g ξηρού εκχ.	IC 50 (DPPH): 0,15 mg/mL	Lesma et. Al., 2014
Carmagnola	Σπόροι	Μεθανόλη:80%	5 mL/g, 3 h	TPC: 67,0 mg GAE/g ξηρού εκχ. TFC: 97,8 mg RE/g ξηρού εκχ.	IC 50 (DPPH): 0,17 mg/mL	Lesma et. Al., 2014
Felina 32	Σπόροι	Μεθανόλη:80%	5 mL/g, 3 h	TPC: 72,7 mg GAE/g ξηρού εκχ. TFC: 109,0 mg RE/g ξηρού εκχ.	IC 50 (DPPH): 0,10 mg/mL	Lesma et. Al., 2014
Helena	Υπέργεια μέρη φυτού	Αιθανόλη:30,50,70,90%	20 mL/g, 20 °C, 24 h	Επιλογή διαλύτη: Αιθανόλη 50% , TPC: 2,33 mg GAE/g ξηρού εκχ. ,TFC: 2,93 mg QE/g ξηρού εκχ.	Μέγιστη αντιρριζική ικανότητα για το διαλύτη Αιθανόλη 50%	Drinic et al., 2018
-	Αλεύρι σπόρων	1. Μεθανόλη:80,100% 2. Αιθανόλη:100% 3. Ακετόνη: 80,100% 4. Μεθανόλη-Ακετονη- Νερό (M.A.N.) :35-35-30 %	16,6 mL/g, 25 °C, 1 h	1. Επιλογή διαλύτη: M.A.N. TPC: 7,33 mg GAE/g υλικού TFC: 2,93 mg LUE/g ξηρού υλικού) 2. Κερκετίνη: 104,11 mg/ 100 g υλικού σε εκχυλίσματα M.A.N. 3. Λουτεολίνη: 46,11 mg/100g υλικού σε εκχυλίσματα M.A.N.	Αλληλεπίδραση εκχυλίσματος M.A.N. με τη ρίζα DPPH: 16,79%	Teh et al., 2014
-	Φύλλα	1. Ακετόνη:50,100% 2. Μεθανόλη:50,100%	10 mL/g, 20 °C, 2-8-18 h	1. Αύξηση σε TPC με αύξηση του χρόνου εκχύλισης 2. Επιλογή συνθηκών: Μεθανόλη, 18 h (TPC: 0,890 mg GAE/g υλικού)	Αντιοξειδωτική δράση έναντια σε: <i>S. aures</i> , <i>C.</i> <i>albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Mkpenie et al., 2012

Helena	Αλεύρι σπόρων	CD: Υδατικά διαλύματα (1-40%)	5-15,2 mL/g, 20-60 °C, 3 h	1. Επιλογή συνθηκών: 15,2 g /mL, 32,1 % CD, 28 °C 2. TPC: 4,5 mg GAE/ g ξηρού εκχ.	Αντιοξειδωτική δράση: 12,4 μmol TRE/g ξηρού εκχ. στις βέλτιστες συνθήκες (32,1% CD, 15,2 ml/g, 28 °C)	Mourtzinios et al., 2018
-	Ανθοί και φύλλα	Μεθανόλη	30 mL/g, 40 min	1.Canniprene: 2,09 mg/g ξηρού εκχ. 2.Cannflavin A: 0,28 mg/g ξηρού εκχ. 3.Cannflavin B: 0,11 mg/g ξηρού εκχ.	Αντιφλεγμονώδης δράση	Allegrone et al., 2017
-	Φύλλα	Αιθανόλη, Μεθανόλη, Οξικός αιθυλεστέρας, Χλωροφόρμιο, Ακετόνη, Εξάνιο, Νερό	4 mL/g, 20 °C, 72 h	Επιλογή διαλύτη: Μεθανόλη TPC: 36,42 mg GAE/g ξηρού εκχ. TFC: 59,03 mg QE/g ξηρού εκχ.	Αλληλεπίδραση εκχυλ. με DPPH: 55,57% (Ακετόνη), 54,51% (Αιθανόλη), 49,50% (Μεθανόλη)	Ahmed et al., 2019
Futura 75	Ανθοί	Αιθανόλη	5 mL/g, 20 °C, 30 d	1.TPC: 125,12 mg GAE/ g ξηρού εκχ. 2.Ροζμαρινικό Οξύ: 328,21 μg/g ξηρού εκχ. 3.Λουτεολίνη: 127,67 μg/g ξηρού εκχ.	DPPH: 32,43 mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος	Palmieri et al., 2020
			5 mL/g, 100 °C, 2-6 h	1.TPC: 124,25 mg GAE/ g ξηρού εκχ. 2.Λουτεολίνη: 753,01 μg/g ξηρού εκχ. 3.Απιγενίνη: 54,22 μg/g ξηρού εκχ.	DPPH: 31,54 mg TE/g ξηρού εκχυλίσματος	

*CD: υδατικό διάλυμα της 2-υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης, CE:ισοδύναμα κατεχίνης, IC50: η συγκέντρωση εκχυλίσματος που επιτρέπει αναστολή/μείωση ελεύθερων ιόντων, GAE: ισοδύναμα γαλλικού οξέος, LUE: ισοδύναμα λουτεολίνης, QE: ισοδύναμα κερκετίνης, RE: ισοδύναμα ρουτίνης, TFC: ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή, TPC: ολικό φαινολικό περιεχόμενο

Το ενδιαφέρον των μελετών επικεντρώνεται στη ανάκτηση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στη βιομηχανική κάνναβη. Τα περισσότερα πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων που αντιστοιχούν στον Πίνακα 1, έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου και αφορούν σε παραπροϊόντα επεξεργασίας του φυτού (από μονάδες παραγωγής υφάσματος) (Lesma et al., 2014), (Drinic et al., 2018), (Teh et al., 2014), (Mkpenie et al., 2012), (Ahmed et al., 2019), (Palmieri et al., 2020). Αυτό που παρατηρήθηκε (Palmieri et al., 2020) είναι ότι με αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο στο εκχύλισμα που παραλαμβάνεται. Επιπλέον, μελετήθηκε και η εκχύλιση με τη χρήση ενός οικολογικού διαλύτη, της 2-υδροξυλο-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (Dharte et al., 2015). Γενικότερα, οι κυκλοδεξτρίνες είναι φορείς οι οποίοι μπορούν να αυξάνουν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων διαλυμένων ουσιών στο νερό. Η αποτελεσματικότητα της χρήσης του διαλύτη έχει ελεγχθεί προηγουμένως στην εκχύλιση φαινολών από αμπέλι (Rajha et al., 2015).

Χαρακτηριστικές παράμετροι της εκχύλισης, όπως είναι ο λόγος διαλύτη προς στερεό υλικό είχαν διαφορετικές τιμές από μελέτη σε μελέτη. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι υπάρχει ένα ερευνητικό κενό στο κομμάτι της μελέτης και εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας της διαδικασίας της εκχύλισης. Η επίδραση του χρόνου εκχύλισης κατά την εκχύλιση με την τεχνική της διαβροχής σε θερμοκρασία δωματίου μελετήθηκε από τους Mkpenie et al. (2012). Αυτό που βρέθηκε ως αποτέλεσμα είναι η αύξηση του φαινολικού φορτίου κατά 60% με αύξηση του χρόνου εκχύλισης από 2 σε 8 ώρες. Η αυξητική τάση στο ολικό φαινολικό φορτίο παρατηρείται της και με την αθηση της θερμοκρασίας εκχύλισης. Συγκεκριμένα, η ηθςόδοση της εκχύλισης αυξάνεται κατά 2 φορές με αύξηση του χρόνου εκχύλισης από 2 σε 6 ώρες για τηηηζερίππωση της εκχύλισης Soxhlet ανθών βιομηχανικής κάνναβης (Palmieri et al., 2020).

Αυτό που εύκολα γίνεται κατανοητό είναι ότι το προφίλ των βιοδραστικών συστατικών που υπάρχουν στο φυτό εξαρτάται από το τμήμα του φυτού και από τις συνθήκες καλλιέργειάς του. Οι Lesma et al. (2014) μελέτησαν το περιεχόμενο σπόρων σε φαινόλες και φλαβονοειδή μέσω εκχύλισης απελαιωμένων σπόρων με τη χρήση ενός διαλύματος μεθανόλης:νερού-80:20 (v/v) ως διαλύτη. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο βρέθηκε στο διάστημα συγκέντρωσης 67 με 80,4 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού εκχυλίσματος.

Όσον αφορά στο άλευρο από σπόρους, σε μια μελέτη από τους Teh et al. (2014) έγινε έλεγχος της επίδρασης της χρήσης διαφορετικών διαλυτών. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν ως διαλύτες η μεθανόλη (80 και 100 %), η ακετόνη (80 και 100%), η αιθανόλη (100%) και ένα μίγμα διαλυτών μεθανόλη-ακετόνη-νερό (35-35-30 % v/v/v). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ο χρόνος εκχύλισης ήταν 1 ώρα. Με κριτήριο την μέγιστη ανάκτηση σε φαινόλες, το μίγμα μεθανόλης- ακετόνης- νερού προσέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα. Ακολουθεί η ακετόνη (80%) και η μεθανόλη (80%).

Οι Mkpenie et al. (2012) μελέτησαν την εκχύλιση φύλλων βιομηχανικής κάνναβης με χρήση καθαρών διαλυτών μεθανόλης και ακετόνης και των αντίστοιχων διαλυμάτων τους με χρήση 50% v/v νερού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακετόνη ως διαλύτης εκχύλισης ήταν καταλληλότερος από την μεθανόλη για χρόνο εκχύλισης ίσο με 2 ώρες. Ωστόσο, αυξάνοντας το χρόνο εκχύλισης σε 8 και 12 ώρες η επιλογή αυτή αναιρείται. Αυτό γιατί η χρήση καθαρής μεθανόλης προσέφερε υψηλότερη απόδοση (0,89 mg γαλλικού οξέος/g υλικού), δηλαδή 2 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της καθαρής ακετόνης (0,416 mg γαλλικού οξέος/g υλικού). Η χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη βρέθηκε να είναι η πιο αποδοτική επιλογή στην περίπτωση

εκχύλισης μέσω διαβροχής σε φύλλα βιομηχανικής κάνναβης και σε μελέτη που έγινε από τους Ahmed et al. (2019).

Οι Mourtzinou et al. (2018) προσέγγισαν την εκχύλιση αλεύρου κάνναβης (αποτελούμενο από σπόρους και φύλλα) με μια καινοτόμο μέθοδο. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ένα υδατικό διάλυμα 2-υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (CD). Η βέλτιστη συγκέντρωση του διαλύματος σε κυκλοδεξτρίνη ήταν 32,1% v/v, καθώς η συνθήκη αυτή απέφερε την υψηλότερη απόδοση σε φαινόλες ακόμη και σε σύγκριση με διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και το νερό.

Η χρήση της αιθανόλης ως διαλύτη σε διαφορετικές αναλογίες (30, 50, 70, 90%) μελετήθηκε από τους Drinic et al. (2018). Ως παράγοντες αξιολόγησης της επίδρασης των διαφορετικών αναλογιών μετρήθηκαν η απόδοση της εκχύλισης, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή. Η χρήση του διαλύτη της αιθανόλης (50%) παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή απόδοση της εκχύλισης 15,68 w%, ολικό φαινολικό περιεχόμενο ίσο με 17,05 mg γαλλικού οξέος/ g υλικού και ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή ίσο με 11,20 mg κατεχίνης/ g υλικού.

Στις περισσότερες των μελετών, η αντιοξειδωτική δράση των παραγόμενων εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε κυρίως μέσω *in vitro* πειραμάτων. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων συσχετίζεται εν γένει με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Ως εκ τούτου, οι παράμετροι βελτιστοποίησης ακολουθούν παρόμοια πορεία σχεδιασμού (Isidore et al.,2021).

Σε μελέτη που έγινε από το Εθνικό Ινστιτούτο της Αμερικής National Institute on Drug Abuse, η αιθανόλη είναι ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης για την μετέπειτα παρασκευή φαρμακευτικών μορφών. Συγκεκριμένα, θερμή αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή και απομόνωση των κανναβινοειδών από το φυτό της βιομηχανικής κάνναβης (Thomas et al.,2016). Άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται γενικά για την παραλαβή των κανναβινοειδών και ειδικότερα των όξινων κανναβινοειδών (π.χ. κανναβιδιολικό οξύ) σε θερμοκρασία δωματίου είναι το εξάνιο, η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη και το μίγμα μεθανόλης/χλωρομεθυλενίου (Brighentia et al.,2019).

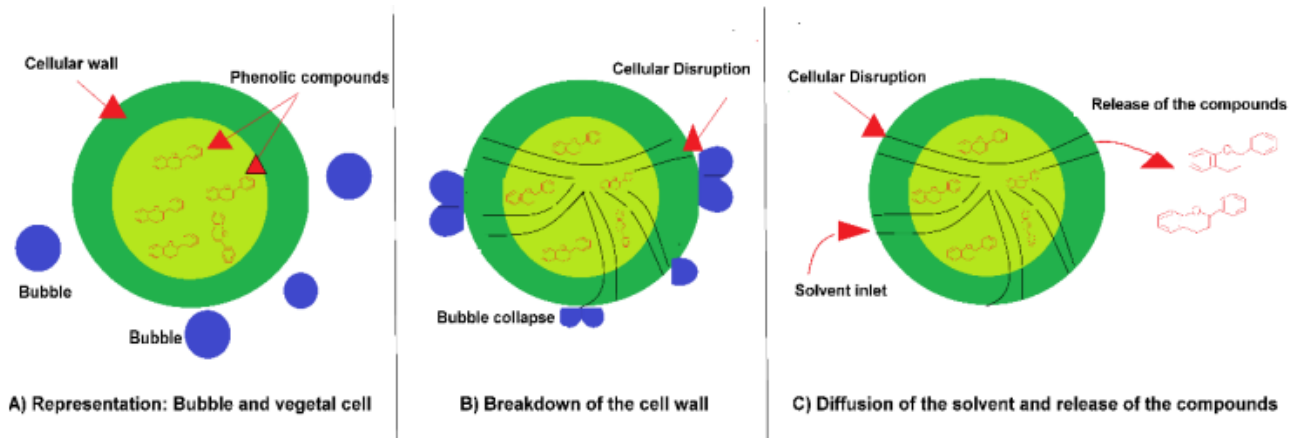
Όσον αφορά στην εκχύλιση ελαίου από τους σπόρους, η χρήση του εξανίου έχει συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον χάρη στο χαμηλό κόστος και την υψηλή αποτελεσματικότητα. Μέσω της μελέτης βελτιστοποίησης που πραγματοποιήθηκε από τους Kostic et al. (2013), βρέθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης ήταν σε θερμοκρασία 70 °C, με λόγο διαλύτη προς σπόρους ίσο με 10:1 και χρόνο εκχύλισης ίσο με 10 λεπτά. Η απόδοση σε έλαιο με αυτές ως συνθήκες λειτουργίας ήταν 29,06 g/100 g σπόρων.

2.2 Μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης

2.2.1 Εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπέρηχους (UAE) αποτελεί αντικείμενο έρευνας και ανάπτυξης και χαρακτηρίζεται ως μία πράσινη καινοτόμος τεχνολογία. Οι υπέρηχοι περιλαμβάνουν μηχανικά κύματα που διαδίδονται μέσα στο προς εκχύλιση στερεό. Η αρχή των υπέρηχων αποδίδεται στο φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης. Κατά τη διάρκεια της

εφαρμογής των υπερήχων, ένα υπερηχητικό κύμα συναντά ένα υγρό μέσο και παράγονται διαμήκη κύματα. Έτσι, σχηματίζονται περιοχές εναλλασσόμενων κυμάτων συμπίεσης και αραιώσης (διαστολή), που μεταφέρονται στα μόρια του μέσου. Η διαστολή δημιουργεί φυσαλίδες στο υγρό και παράγει αρνητική πίεση. Η έκταση της αρνητικής πίεσης εξαρτάται από τη φύση και την καθαρότητα του υγρού. Μια δυναμική ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της κατάρρευσης των φυσαλίδων αποκαθίσταται σε μια σταθερή ένταση υπερήχων. Όταν οι φυσαλίδες σπηλαίωσης καταρρέουν κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα, η υψηλή πίεση και η θερμοκρασία δημιουργούν κύματα κρούσης που κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια, επιτρέποντας τη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα. Παράλληλα, υπάρχει διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος και μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της στερεής μήτρας. Έτσι, πλέον γίνεται ευκολότερη η παράσυρση των εκχυλιζόμενων συστατικών από τη μήτρα λόγω της αύξησης της επαφής μεταξύ των δύο φάσεων (στερεής και υγρής) (Χανιώτη, 2019).



Εικόνα 7. Γραφική απεικόνιση μηχανισμού δράσης των υπερήχων (A) αρχική κατάσταση φυσαλίδων και φυτικού κυττάρου (B) διάρρηξη κυτταρικού τοιχώματος και κατάρρευση των φυσαλίδων (C) Διάχυση του διαλύτη και εκχύλιση των συστατικών (Medina- Torres et al., 2017)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) παρουσιάζονται οι κυριότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την εκχύλιση με χρήση υπερήχων για παραλαβή φαινολικών συστατικών.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα εκχύλισης UAE της βιομηχανικής κάνναβης.

Ποικιλία Φυτού	Μέρος Φυτού	Διαλύτης Εκχύλισης	Συνθήκες Επεξεργασίας	Περιεκτικότητα σε Συστατικά	Αντιοξειδωτική Δράση	Πηγή
Kompoti, Tiborszallasi, Antal, Carmagnola Cs	Ανθοί	Μεθανόλη	150 mL/g υλικού, 4 °C, 30 min	1. Ολικές πολυφαινόλες: 743,5 mg/kg υλικού (Carmagnola Cs) 2. Κανναφλαβίνη A: 72,9 mg/kg υλικού (Tiborszallasi) 3. Κανναφλαβίνη B 98,8 mg/kg υλικού (Antal)	Αλληλεπίδραση με ρίζα DPPH: 63,6 mmol Trolox/kg υλικού (Carmagnola Cs)	Izzo et al., 2020
Ermes, Santhica 27, Ermo	Ανθοί	Μεθανόλη	100 mL/g υλικού, 50 °C, 1 h	Κανναφλαβίνη A: 0,024% (ξηρής μάζας υλικού)	-	Calzolari et al., 2017
Skunk, Fourway, Kompoliti, Fasamo	Καρποί	Μεθανόλη (50%): Χλωροφόρμιο- 1:1	80 mL/g υλικού, 10 min	TFC: 0,06 mg/ 100 mg υλικού	-	Flores- Sanchez et al., 2008
	Σπόροι			1. TFC: 1,67 mg/ 100 mg υλικού 2. Κύρια φλαβονοειδή: βιτεξίνη, Λουτεολίνη, απιγενίνη		
	Βράκτια			TFC: 2,18 mg/100 mg υλικού		
	Φύλλα			1. TFC: 2,54 mg/ 100 mg υλικού 2. Κύρια φλαβονοειδή: οριεντίνη, βιτεξίνη, ισοβιτεξίνη, λουτεολίνη, καμφερόλη, απιγενίνη		

	Ανθοί			1. TFC: 1,56 mg/ 100 mg υλικού 2. Κύρια флаβονοειδή: κερκετίνη, λουτεολίνη, καμφερόλη σε αρσενικούς ανθούς		
Futura 75, Kc virtus, Carmagnola Cs, Villanova	Ανθοί	Νερό	50 mL/g υλικού, 60 °C, 10 min	1. TFC: 8,1 mg GAE/ g ξηρού εκχ. (Futura 75, Villanova) 2. TFC: 6,3 mg RE/g ξηρού εκχ. (Kc virtus)	1. Αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση 2. Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων (Futura 75)	Ferrante et al., 2019
Hungary	Μίγμα φύλλων, ανθών και φλοιοί σπόρων	Μεθανόλη 20,50,80%	20 mL/g υλικού, 90-120-150 W, 5-10-15 min	1. Βέλτιστες συνθήκες: Μεθανόλη 80%, 130 W, 15 min 2. TPC: 312,452 mg GAE/g υλικού TFC: 32,254 mg QE/g υλικού	FRAP: 17,84 mM ισοδύναμα ασκορβικού οξέος/g υλικού	Agarwal et al., 2018
Futura 75	Ανθοί	Αιθανόλη	5 mL/g υλικού, 15 min	1. TPC: 110,30 mg GAE/g ξηρού εκχ. 2. Γαλλικό οξύ: 35,10 μg/g ξηρού εκχ. 3. Λουτεολίνη: 1384 μg/g ξηρού εκχ.	Αλληλεπίδραση με ρίζα DPPH: 63,6 mg TE/g ξηρού εκχ.	Palmieri et al., 2020

*FRAP: ferric reducing antioxidant power GAE: ισοδύναμα γαλλικού οξέος, LUE: ισοδύναμα λουτεολίνης, QE: ισοδύναμα κερκετίνης, RE: ισοδύναμα ρουτίνης, TFC: ολικό περιεχόμενο σε флаβονοειδή, TPC: ολικό φαιολικό περιεχόμενο TE: ισοδύναμα Trolox

Οι Agarwal et al. (2018) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της εκχύλισης υποβοηθούμενης από υπερήχους για την παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από το φυτό της βιομηχανικής κάνναβης. Ως παράμετροι λειτουργίας, μελετήθηκαν ο χρόνος εκχύλισης, η ισχύς των υπερήχων και η συγκέντρωση του διαλύτη της μεθανόλης. Ο χρόνος εκχύλισης και η συγκέντρωση του διαλύτη έχουν σημαντική επίδραση στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, ο συνδυασμός μεγάλου χρόνου επεξεργασίας και αυξημένης ισχύος έχουν αρνητική επίδραση στο ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες και φλαβονοειδή. Η αύξηση της έντασης των κυμάτων των υπερήχων οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας της εκχύλισης και συνεπώς σε καταστροφή και υποβάθμιση των συστατικών- στόχων που είναι οι φαινόλες. Σε σύγκριση με τη συμβατική εκχύλιση, η υποβοήθηση μέσω χρήσης υπερήχων μπορεί να διπλασιάσει το ολικό περιεχόμενο σε φαινόλες και φλαβονοειδή.

Οι μελέτες που έχουν γίνει μπορεί να αφορούν διαφορετικά μέρη του φυτού πέρα από διαφορετικές ποικιλίες. Για το λόγο αυτό, η σύγκριση μεταξύ αποτελεσμάτων πρέπει να γίνεται με προσοχή. Οι Izzo et al. (2020) αξιολόγησαν την ανάκτηση φαινολών από τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες φυτού. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο λαμβάνει τιμές από 10,510 μέχρι 48,875 mg γαλλικού οξέος/g υλικού. Σε άλλες έρευνες βρέθηκαν τιμές φαινολικού περιεχομένου 4,7-8,1 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού εκχυλίσματος (Ferrante et al., 2019) και 110,30 mg gallic acid/g ξηρού εκχυλίσματος (Palmieri et al., 2020).

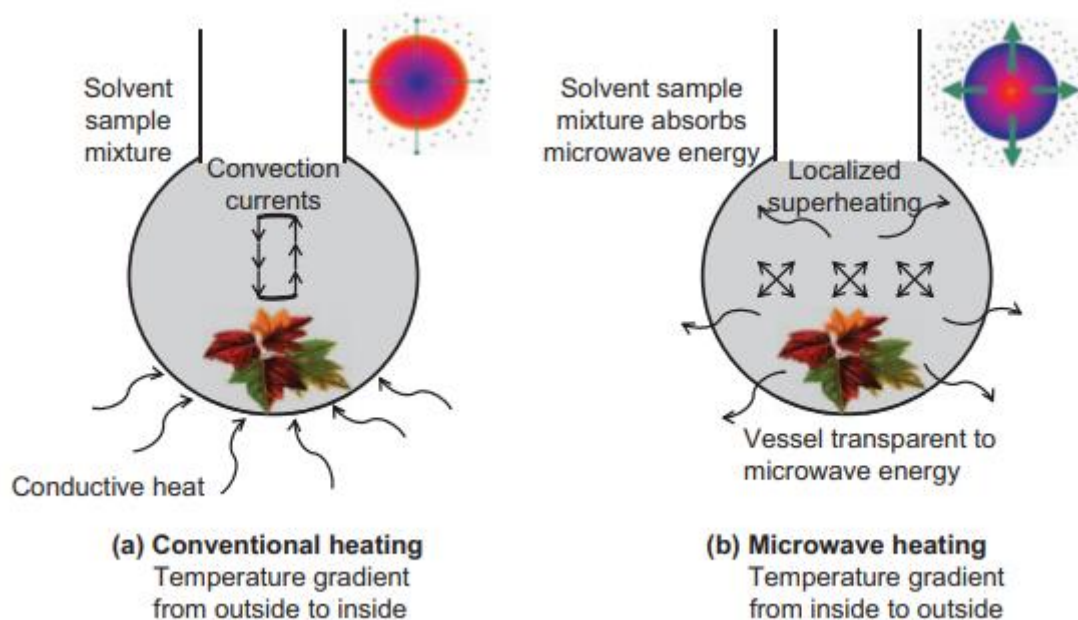
Η κυρίαρχη κατηγορία φαινολικών συστατικών που υπάρχει στους ανθούς του φυτού είναι τα φλαβονοειδή, καθώς αντιστοιχούν κατά προσέγγιση στο 80% (w/w) των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιούνται στο φυτό. Οι φλαβόνες κανναφλαβίνη Α και Β ξεχωρίζουν ανάμεσα στα φλαβονοειδή του φυτού. Οι συγκεντρώσεις τους ποικίλουν και κυμαίνονται στο διάστημα συγκέντρωσης 61,8- 84,5 mg/kg υλικού (Izzo et al., 2020). Σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Calzolari et al. (2017) η συγκέντρωση της κανναφλαβίνης Α στο φυτό βρέθηκε ίση με 240 mg/kg υλικού. Μεταξύ των άλλων φλαβονοειδών που ταυτοποιήθηκαν είναι ο γλυκοζίτης της κερκετίνης και η κατεχίνη. Τα φαινολικά οξέα (όπως το καφεϊκό, π-κουμαρικό και φερουλικό οξύ) συγκροτούν μεγάλο ποσοστό των ολικών πολυφαινολών (μεταξύ 18,6- 29,7 % w/w).

2.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE)

Η υποβοηθούμενη εκχύλιση με μικροκύματα αποτελεί μία καινοτόμα μέθοδος απομόνωσης και ανάκτησης ουσιών από φυτικής προέλευσης υλικά. Η συχνότητα των μικροκυμάτων κυμαίνεται από 0,3 έως 300 GHz. Τα κύματα μπορούν να διεισδύσουν σε ορισμένα υλικά και να αλληλεπιδράσουν με πολικά συστατικά εντός των υλικών, όπως το νερό. Ως μέθοδος εκχύλισης στερεού-υγρού συγκεντρώνει πλεονεκτήματα όπως: χαμηλότερος χρόνος εκχύλισης, μικρότερη χρήση διαλύτη, επιλεκτικότητα και ελεγχόμενη διαδικασία θέρμανσης. Στη MAE, η επιτάχυνση της διαδικασίας και η υψηλή απόδοση εκχύλισης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ενός συνεργιστικού συνδυασμού δύο φαινομένων μεταφοράς που λειτουργούν προς την ίδια κατεύθυνση, της θερμότητας και της μάζας. Στις συμβατικές εκχυλίσεις, η μεταφορά θερμότητας συμβαίνει από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος του μέσου. Αντίθετα, στην περίπτωση της MAE η μεταφορά μάζας γίνεται από μέσα προς τα έξω. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι σε μία συμβατική διαδικασία η θερμότητα μεταφέρεται από το

μέσο θέρμανσης στο εσωτερικό του στερεού υλικού, στη MAE η θερμότητα διασκορπίζεται σε όλο τον όγκο του ακτινοβολούμενου μέσου.

Η περιεχόμενη υγρασία στο στερεό υλικό αποτελεί το στόχο της θέρμανσης με μικροκύματα. Όταν τα σωματίδια του νερού θερμανθούν μέσα στο φυτικό κύτταρο λόγω του φαινομένου των μικροκυμάτων, εξατμίζονται και ασκούν μεγάλη πίεση στο κυτταρικό τοίχωμα. Συνεπώς το κυτταρικό τοίχωμα διογκώνεται, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τη ρήξη του κυττάρου. Έτσι, απελευθερώνονται τα βιοδραστικά συστατικά στον περιβάλλοντα διαλύτη, αυξάνοντας την απόδοση εκχυλίσμων συστατικών. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να ενταθεί ακόμη περισσότερο αν ο διαλύτης που περιβάλλει τη μήτρα του φυτού έχει καλύτερη θερμική απόδοση υπό την επίδραση των μικροκυμάτων (Χανιώτη, 2019).



Εικόνα 7. Θέρμανση με αγωγή σε συμβατική εκχύλιση (a) σε σύγκριση με τη θέρμανση με τη χρήση μικροκυμάτων στην MAE (Destandau et al., 2013).

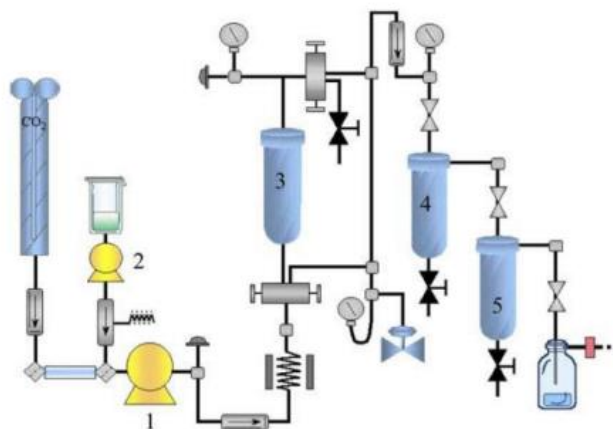
Οι Drinic et al. (2019) μελέτησαν την εκχύλιση φαινολικών συστατικών της βιομηχανικής κάνναβης υποβοηθούμενης από μικροκύματα με τη χρήση της αιθανόλης ως διαλύτη σε διαφορετικές αναλογίες (30, 50, 70 % v/v). Παράμετροι όπως ο λόγος της μάζας στερεού προς τον όγκο του διαλύτη και η συγκέντρωση της αιθανόλης βρέθηκαν να έχουν σημαντική επίδραση στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης στο διαλύτη έδειξε να επηρεάζει αρνητικά την απόδοση σε ολικές φαινόλες, ενώ το αντίθετο ισχύει για τα ολικά φλαβονοειδή. Ωστόσο, οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας για την εκχύλιση των φαινολών ταυτίζονται με τις βέλτιστες συνθήκες παραγωγής εκχυλισμάτων με τη μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο κυμαίνεται στο διάστημα 0,8499-2,7060 mg γαλλικού οξέος/mL εκχυλίσματος, το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή στο διάστημα 0,4707-1,4246 mg κατεχίνης/mL εκχυλίσματος. Οι συνθήκες όπου επιτυγχάνεται μέγιστη ανάκτηση ταυτόχρονα σε ολικές φαινόλες και φλαβονοειδή προσδιορίστηκαν μέσω σχεδιασμού επιφανειών απόκρισης (RSM- Response Surface Methodology) και είναι οι εξής:

συγκέντρωση αιθανόλης- 47,6%, χρόνος εκχύλισης- 10 λεπτά και λόγος μάζας στερεού υλικού/όγκο διαλύτη- 5 g/mL.

2.2.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Ως κρίσιμο σημείο μίας καθαρής ουσίας, ορίζεται η υψηλότερη θερμοκρασία και πίεση στην οποία η ουσία μπορεί να υπάρχει σε ισορροπία ατμών–υγρού. Σε θερμοκρασίες και πιέσεις πέραν αυτού του σημείου, σχηματίζεται ένα ομογενές ρευστό, το οποίο είναι γνωστό ως υπερκρίσιμο ρευστό. Τα υπερκρίσιμα ρευστά διαθέτουν βελτιωμένες ιδιότητες μεταφοράς μάζας σε σχέση με αυτές των υγρών, διότι η πυκνότητά τους ρυθμίζεται με μεταβολή της πίεσης και της θερμοκρασίας. Τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν τη διεισδυτική δύναμη ενός αερίου, ιδιότητα που τα καθιστούν αποτελεσματικούς και εκλεκτικούς διαλύτες. Τα υπερκρίσιμα ρευστά παράγονται θερμαίνοντας ένα αέριο πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία του ή συμπιέζοντας ένα υγρό πάνω από την κρίσιμη πίεσή του. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση συστατικών από πολλά φυτά και μικροβιολογικά δείγματα.

Κατά τη διαδικασία της υπερκρίσιμης εκχύλισης, η πρώτη ύλη τοποθετείται στο δοχείο εκχύλισης. Εκεί η θερμοκρασία και η πίεση ρυθμίζονται στις επιθυμητές συνθήκες. Στο δοχείο ασκείται πίεση από το ρευστό μέσω αντλίας. Στη συνέχεια, το ρευστό μαζί με τα διαλυμένα συστατικά οδηγούνται στους διαχωριστήρες, όπου συλλέγονται από το κάτω μέρος αυτών. Την ίδια στιγμή, το ρευστό αναγεννάται και ανακυκλώνεται ή απελευθερώνεται στο περιβάλλον. Τα μέρη και η διάταξη της συσκευής εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Συσκευή εκχύλισης με χρήση υπερκρίσιμων ρευστών, Μέρη συσκευής: (1) Αντλία CO₂, (2) Αντλία ρύθμισης ροής, (3) Εκχυλιστήρας, (4) και (5) Διαχωριστήρες.

Ως υπερκρίσιμα ρευστά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενώσεις όπως το αιθυλένιο, μεθάνιο, άζωτο, ξένο ή φθοράνθρακες. Ωστόσο, τα περισσότερα συστήματα διαχωρισμού χρησιμοποιούν διοξείδιο του άνθρακα. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα πραγματοποιείται στην υπερκρίσιμη περιοχή του CO₂, σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από τις αντίστοιχες κρίσιμες του αερίου CO₂ (31,1 °C και 7,4 MPa), και αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο της χρήσης οργανικών διαλυτών.

Σε έρευνα που έγινε από τους Jokic et al. (2022) μελετήθηκε η εκχύλιση βιομηχανικής κάνναβης με τη χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (sCO₂- supercritical CO₂) ως διαλύτη με στόχο την παραλαβή των κανναβινοειδών και των τερπενίων. Δύο είναι οι καθοριστικές παράμετροι της διεργασίας της εκχύλισης: η θερμοκρασία και η πίεση. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) παρουσιάζεται η απόδοση της εκχύλισης (εκφρασμένη σε ποσοστό: μάζας ξηρού εκχυλίσματος (g) προς μάζα αρχικής πρώτης ύλης (g)) σε σχέση με τις συνθήκες εκχύλισης. Ο χρόνος εκχύλισης ήταν 30 λεπτά.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα απόδοσης εκχύλισης βιομηχανικής κάνναβης με υπερκρίσιμο CO₂.

A/A	Πίεση (Bar)	Θερμοκρασία (°C)	Απόδοση Εκχύλισης (%)
1	320	40	6,16
2	220	35,9	5,67
3	220	50	5,53
4	120	40	3,20
5	220	64,1	6,39
6	78,6	50	0,75
7	220	50	5,85
8	320	60	8,83
9	120	60	2,31
10	361,4	50	8,79
11	220	50	5,80
12	220	50	5,62
13	220	50	5,39

Για εφαρμογή πιέσεων στο διάστημα 78,6- 361,4 bar, η απόδοση εκχύλισης ποικίλει από 0,76 έως 8,83%. Στο κρίσιμο σημείο η πίεση του αερίου είναι 74 bar, οπότε η πίεση των 78,6 bar είναι μόλις πάνω από την κρίσιμη τιμή. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι για μεγαλύτερες πιέσεις μεγαλύτερες είναι και οι τιμές των αποδόσεων. Από την άλλη, το άνω όριο της τιμής της θερμοκρασίας δεν επηρεάζει ακόμη και τις πιο θερμοευαίσθητες ενώσεις. Ως ζευγάρι βέλτιστων συνθηκών επιλέγεται αυτό της πίεσης των 320 bar και της θερμοκρασίας 60 °C.

Τώρα, όσον αφορά στην ανάκτηση των κανναβινοειδών σε σχέση με την εφαρμογή των ίδιων 13 συνθηκών λειτουργίας, τα αποτελέσματα είναι τα εξής και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5). Το περιεχόμενο είναι εκφρασμένο σε ποσοστό % της μάζας του συστατικού (g) προς την μάζα της αρχικής πρώτης ύλης (υλικού) (g).

Πίνακας 5. Περιεχόμενο εκχυλισμάτων βιομηχανικής κάνναβης σε ολικό CBD (εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO₂).

A/A	Πίεση (Bar)	Θερμοκρασία (°C)	Συγκέντρωση Total CBD (%)
1	320	40	30,21
2	220	35,9	27,54
3	220	50	23,04
4	120	40	6,34
5	220	64,1	22,12
6	78,6	50	16,44
7	220	50	31,87
8	320	60	30,92
9	120	60	11,93
10	361,4	50	15,73
11	220	50	25,25
12	220	50	26,84
13	220	50	27,71

Αυτό που εύκολα παρατηρείται είναι ότι υψηλότερες θερμοκρασίες οδήγησαν σε αύξηση του περιεχομένου σε κανναβιδιόλη (CBD). Από την άλλη, η αύξηση της πίεσης προκάλεσε αύξηση στη συγκέντρωση μέχρι την πίεση των 250 bar. Από το σημείο αυτό και έπειτα, αύξηση της πίεσης οδήγησε σε ελαφριά μείωση της συγκέντρωσης. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν το ζεύγος συνθηκών για το οποίο η συγκέντρωση CBD έλαβε την μέγιστη τιμή της (31,87 %) είναι: πίεση ίση με 220 bar και θερμοκρασία 50 °C.

Μετά από βελτιστοποίηση της διεργασίας (μέσω σχεδιασμού επιφανειών απόκρισης-RSM) με στόχο την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης ταυτόχρονα με την υψηλότερη συγκέντρωση (Total CBD) στο τελικό εκχύλισμα, ως βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βρέθηκαν οι εξής: πίεση ίση με 284,78 bar και θερμοκρασία ίση με 60 °C.

2.2.4 Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό (Pressurized Liquid Extraction, PLE)

Η αρχή της εκχύλισης με πεπιεσμένο υγρό βασίζεται στην αρχή Le Chatelier και στην ισοστατική αρχή. Αφορά την εισαγωγή του δείγματος σε θάλαμο και εφαρμογή υψηλής πίεσης, συνήθως 100-1000 MPa με θερμοκρασία 50-200 °C για μικρά χρονικά διαστήματα. Σκοπός είναι η παραμονή του διαλύτη σε συνθήκες πέρα από το κανονικό σημείο βρασμού του. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η πίεση παραμένει σταθερή και επιτρέπει στο διαλύτη να βρίσκεται σε υγρή μορφή σε υψηλή θερμοκρασία πολύ κοντά στην υπερκρίσιμη περιοχή του. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας ευνοεί: i) την αύξηση της ικανότητας των διαλυτών να διαλυτοποιούν τα ανακτώμενα συστατικά, ii) την αύξηση των συντελεστών διάχυσης, iii) τη ρήξη των δυνάμεων συνοχής μεταξύ των συστατικών και του υλικού, iv) τη μείωση του ιξώδους του διαλύτη και v) την ελάττωση της επιφανειακής τάσης (Χανιώτη, 2019).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Kitryte et al (2018) η εκχύλιση βιομηχανικής κάνναβης με πεπιεσμένο υγρό χρησιμοποιήθηκε ως ένα από τα στάδια που ακολουθούνται για την επεξεργασία της πρώτης ύλης για την απομόνωση κανναβινοειδών. Η

επεξεργασία περιλαμβάνει αρχικά εκχύλιση με χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ως διαλύτη, στη συνέχεια εκχύλιση με χρήση πεπτισμένου υγρού για την παραλαβή φαινολικών συστατικών και τελικά εκχύλιση υποβοηθούμενη από ένζυμα προκειμένου να γίνει διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος. Κατά την εκχύλιση με τη χρήση πεπτισμένου υγρού ως διαλύτη χρησιμοποιήθηκε η ακετόνη σε βελτιστοποιημένες συνθήκες εκχύλισης (100 °C, 45 min). Ακολούθησε εκχύλιση με διαλύτη αιθανόλη στις ίδιες συνθήκες. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των ακετονικών εκχυλισμάτων ήταν 5,02 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού εκχυλίσματος, ενώ το αντίστοιχο μέγεθος για την αιθανολική εκχύλιση ήταν 23,52 mg γαλλικού οξέος/g ξηρού εκχυλίσματος. Η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι και τους 100 °C βρέθηκε να ευνοεί την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, με την εκχύλιση στους 130 °C παρατηρείται μεταβολή στο χρώμα του εκχυλίσματος η οποία μπορεί να αποδοθεί στην θερμική υποβάθμιση των συστατικών.

2.2.5 Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία (Pulsed Electric Field Extraction, PEFE)

Η εφαρμογή των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) βασίζεται στο φαινόμενο της ηλεκτροδιάτρησης δηλαδή τον σχηματισμό προσωρινών ή μόνιμων πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Το φαινόμενο της ηλεκτροδιάτρησης λαμβάνει χώρα όταν τα κύτταρα υπόκεινται στην εφαρμοζόμενη τάση που δημιουργείται εντός του ηλεκτρικού πεδίου. Όταν αυτή ξεπεράσει το κρίσιμο διαμεμβρανικό δυναμικό, ξεκινά ο σχηματισμός πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Τα κύτταρα που συμμετέχουν σε αυτή τη διεργασία μπορεί να είναι ζωικά, φυτικά ή μικροβιακά. Εξαιτίας του μεγαλύτερου τους μεγέθους τα δύο πρώτα έχουν μικρότερη κρίσιμη ένταση ηλεκτρικού πεδίου για την έναρξη της ηλεκτροδιάτρησης (0,5-2 kV *cm⁻¹) συγκριτικά με τα τελευταία (10-14 kV* cm⁻¹).

Οι εφαρμογές των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στη διεργασία της εκχύλισης σκοπεύουν στο να καταστούν διαπερατές οι κυτταρικές μεμβράνες, με στόχο τη βελτίωση μεταφοράς συστατικών από το εσωτερικό των κυττάρων. Το PEF μπορεί να αυξήσει τη μεταφορά μάζας κατά την εκχύλιση λόγω καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης των φυτικών υλικών, ενισχύοντας την απόδοση της διεργασίας και μειώνοντας το χρόνο της εκχύλισης. Το PEF εφαρμόστηκε για να βελτιώσει την απελευθέρωση των ουσιών-στόχων από ένα φυτικό ιστό υποβοηθώντας την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Η επεξεργασία με PEF σε μέτριο ηλεκτρικό πεδίο (500 και 1000 V/cm για 10⁻⁴ -10⁻² s) βρέθηκε ότι προκαλεί βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη του φυτικού ιστού με μικρή αύξηση της θερμοκρασίας. Για αυτό το λόγο, το PEF είναι δυνατόν να προκαλεί ελάχιστη υποβάθμιση των θερμο-ευαίσθητων ενώσεων. Επίσης, το PEF μπορεί να εφαρμοστεί σε φυτικά υλικά ως διαδικασία προ-κατεργασίας πριν από τη συμβατική εκχύλιση (Χανιώτη, 2019).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Teh et al. (2014), μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) στην εκχύλιση πολυφαινολών από πρώτη ύλη απελαιωμένων σπόρων βιομηχανικής κάνναβης. Ως διαλύτης της εκχύλισης χρησιμοποιείται η μεθανόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0, 5, 10%. Ο χρόνος εκχύλισης ήταν 10, 20, 30 sec, η συχνότητα των παλμών 30, 40, 50 Hz και η διαφορά δυναμικού που εφαρμόστηκε 30, 40, 50 V. Σε συνέχεια της εκχύλισης με παλμικά ηλεκτρικά πεδία, τα φαινολικά συστατικά των δειγμάτων υποβλήθηκαν σε εκχύλιση (δεύτερο στάδιο) μέσω

εφαρμογής υπερήχων ισχύος 200 W, σε θερμοκρασία 70 °C και χρόνο εκχύλισης 20 λεπτά. Το φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων έλαβε τιμές στο διάστημα 467,5- 1013 mg γαλλικού οξέος/g υλικού, ενώ το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή στο διάστημα 6,36- 15,13 mg λουτεολίνης/g υλικού. Μέσω εφαρμογής και σχεδιασμού της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (RSM) γίνεται βελτιστοποίηση των τεσσάρων παραμέτρων της διεργασίας. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων είναι: συγκέντρωση μεθανόλης 10% χρόνος εκχύλισης 10 sec, η συχνότητα των παλμών 30 Hz και η διαφορά δυναμικού 30 V. Για τις τιμές αυτές τα περιεχόμενα: (α)σε φαινόλες ήταν 1025,57 mg γαλλικού οξέος/g υλικού, (β)σε φλαβονοειδή ήταν 15,76 mg λουτεολίνης/g υλικού.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Στόχος

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της ανάκτησης των βιοδραστικών συστατικών του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa L.*) μέσω της εκχύλισης. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνται με τη χρήση πολικών και μη πολικών διαλυτών προκειμένου να παραληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερα διαλυτά συστατικά. Στη συνέχεια, σκοπός είναι ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων εκχυλισμάτων ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιοξειδωτική τους δράση. Σε δεύτερο στάδιο, γίνεται μελέτη της κινητικής της εκχύλισης για κάθε χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Για την περίπτωση της εκχύλισης των μη πολικών συστατικών (κυρίως των κανναβινοειδών) ένας επιπλέον στόχος είναι η εύρεση της βέλτιστης συνθήκης- ροής διαλύτη για την παραλαβή της μέγιστης συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών (άρα και κανναβινοειδών) στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και χρησιμοποιώντας το ελάχιστο δυνατό όγκο διαλύτη.

3.2 Σχεδιασμός Πειραμάτων

Πρώτο βήμα είναι η παραλαβή της πρώτης ύλης. Καθότι η αναλογία σε σπόρους στην παραληφθείσα πρώτη ύλη δεν ήταν προκαθορισμένη από τον παραγωγό με τη συσκευασία, εμφανίζεται η ανάγκη προσδιορισμού της αναλογίας των σπόρων στη συνολική φυτική πρώτη ύλη. Στη συνέχεια, ένα άλλο φυσικό χαρακτηριστικό που αφορά στην πρώτη ύλη και προσδιορίζεται είναι και η περιεκτικότητα της σε υπολειμματική υγρασία, η οποία έχει απομείνει μετά τη διεργασία ξήρανσης από τον παραγωγό.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένας παράγοντας που επηρεάζει τη διεργασία της εκχύλισης στερεού- υγρού είναι το μέγεθος των σωματιδίων του στερεού. Μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων του στερεού συνεπάγεται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής μεταξύ των δύο

διαφορετικών φάσεων και αύξηση του ρυθμού της εκχύλισης. Για το λόγο αυτό, η φυτική πρώτη ύλη (όπως παραλήφθηκε) κονιοποιείται σε μικρότερο μέγεθος σωματιδίων.

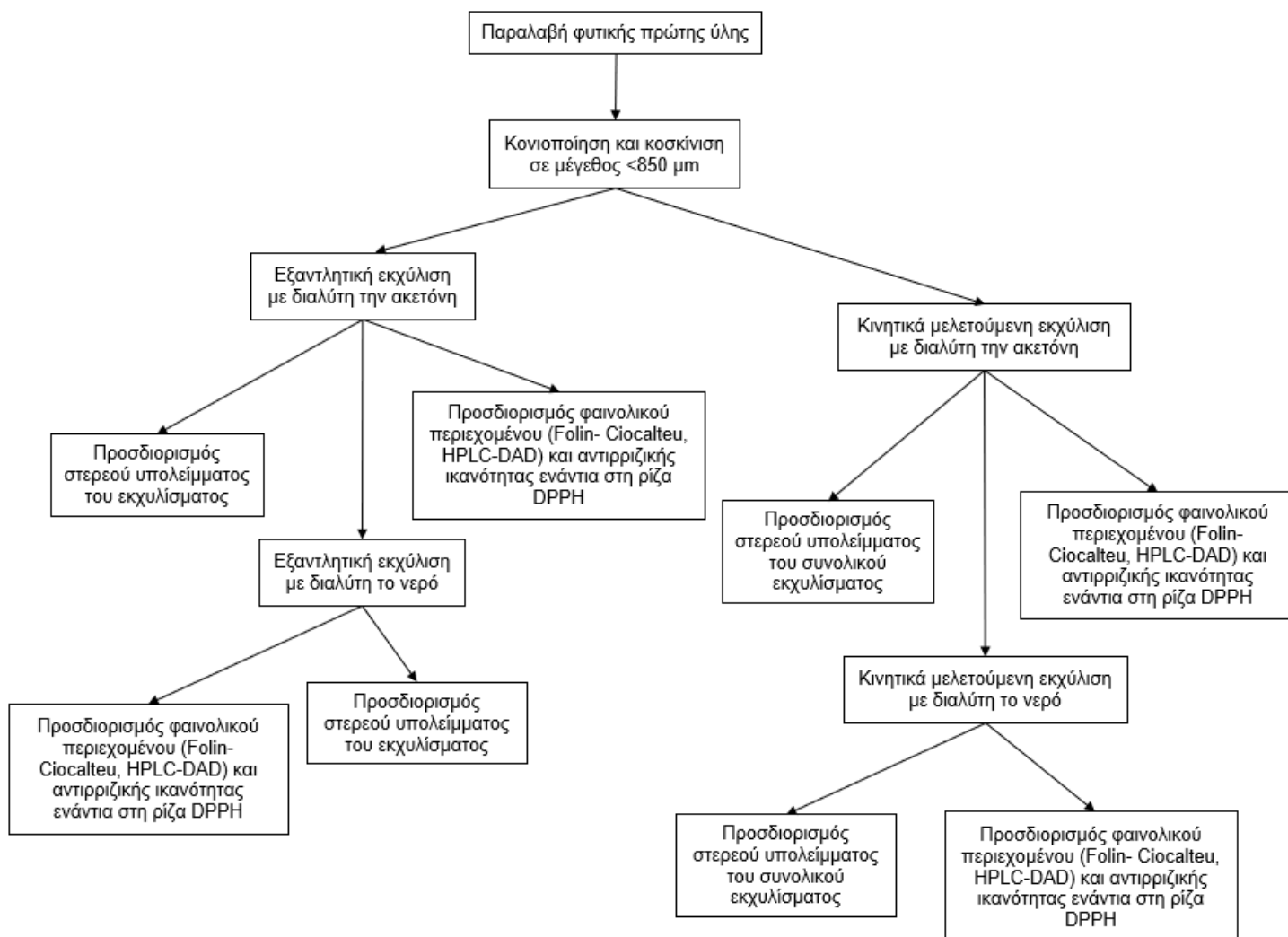
Η βιομηχανική κάνναβη είναι μια πρώτη ύλη πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά. Δύο κύριες κατηγορίες των βιοδραστικών συστατικών της είναι τα φλαβονοειδή και τα κανναβινοειδή. Κοινό χαρακτηριστικό των κατηγοριών αυτών είναι ότι ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των φαινολικών συστατικών, με τη διαφορά ότι τα κανναβινοειδή είναι λιπόφιλα μόρια (λόγω της παρουσίας του τερπενίου στο τερπενοφαινολικό σκελετό τους) ενώ τα φλαβονοειδή υπό την μορφή γλυκοζιδίων είναι υδατοδιαλυτά. Για το λόγο αυτό, γίνεται και κατάλληλη επιλογή του διαλύτη εκχύλισης. Για την παραλαβή των μη πολικών συστατικών χρησιμοποιείται ως διαλύτης η ακετόνη, ενώ για την παραλαβή των πολικών συστατικών χρησιμοποιείται ως διαλύτης το απιονισμένο νερό.

Επόμενο βήμα είναι η πραγματοποίηση εξαντλητικών εκχυλίσεων τόσο για την εκχύλιση μη πολικών όσο και για την εκχύλιση πολικών συστατικών με την τεχνική του ανοιχτού συστήματος (σε σταθερή κλίση εξίκμασης). Τα δύο είδη εκχυλίσεων πραγματοποιούνται διαδοχικά, με πρώτη την ακετονική και στη συνέχεια την υδατική εκχύλιση. Η εξαντλητική εκχύλιση δεν έχει παραγωγική αξία σε μεγάλη κλίμακα, όμως σε αναλυτικό επίπεδο προσφέρει την πληροφορία για τη συγκέντρωση ενός συστατικού στο εκχύλισμα που λαμβάνεται σε άπειρο χρόνο. Η συγκέντρωση αντιστοιχεί στην μέγιστη δυνατή που μπορεί να επιτευχθεί και χαρακτηρίζει τόσο την πρώτη ύλη όσο και το εκχύλισμα ως προς τη συγκέντρωση τους σε αυτό το συστατικό. Η πληροφορία αυτή είναι χρήσιμη για την μελέτη της κινητικής της εκχύλισης μέσω της εξίσωσης (1). Επιπλέον, γίνεται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των κύριων βιοδραστικών συστατικών που υπάρχουν στα παραγόμενα εκχυλίσματα μέσω της χρωματογραφικής ανάλυσης HPLC-DAD.

Ακολουθούν οι κινητικές μελέτες των εκχυλίσεων των μη πολικών και πολικών συστατικών με την τεχνική του ανοιχτού συστήματος. Επιπλέον, θα εφαρμοστεί και η τεχνική του κλειστού συστήματος για λόγο που θα αναλυθεί στη συνέχεια. Η μελέτη της εξέλιξης της διεργασίας της εκχύλισης προσφέρει σημαντικές πληροφορίες που αφορούν στο βέλτιστο χρόνο εκχύλισης της πρώτης ύλης. Οι στιγμιαίες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος αρχικά είναι αρκετά υψηλές στα εκχυλιζόμενα συστατικά και με την εξέλιξη της εκχύλισης φθίνουν και τείνουν ασυμπτωτικά στο μηδέν. Μετά από ένα χρονικό σημείο, όμως, η συνέχιση της εκχύλισης είναι ασύμφορη καθώς το συνολικό εκχύλισμα θα αραιώνεται. Οι δειγματοληψίες του στιγμιαίου εκχυλίσματος γίνονται ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Επίσης, γίνεται μελέτη της κινητικής εκχύλισης των κύριων βιοδραστικών συστατικών που υπάρχουν στα παραγόμενα εκχυλίσματα μέσω της χρωματογραφικής ανάλυσης HPLC-DAD.

Μια επιπλέον ενότητα της διπλωματικής εργασίας περιλαμβάνει τη μελέτη της επίδρασης που έχει η ταχύτητα ροής του διαλύτη που τροφοδοτείται στη σταθερή κλίση εξίκμασης για την περίπτωση της εκχύλισης των μη πολικών συστατικών. Για την επιλογή μιας βέλτιστης συνθήκης- ροής χρησιμοποιούνται παράμετροι αξιολόγησης όπως ο χρόνος εκχύλισης, ο όγκος και η συγκέντρωση εκχυλίσματος.

3.3 Διάγραμμα ροής πειραμάτων



Εικόνα 9. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.

3.4 Πρώτες ύλες- Αντιδραστήρια- Συσκευές

3.4.1 Η πρώτη ύλη

Η φυτική πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία αποτελείται από διαφορετικά αποξηραμένα μέρη του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης (σπόρους, φύλλα, ανθούς), προέρχεται από καλλιέργειες στην περιοχή της Κοκκίνας Μαγνησίας και παραχωρήθηκε από την Κοινωνική Συνεταιριστική Επιχείρηση KANNABIO ΚΟΙΝΣΕΠ το Νοέμβριο του 2022.

3.4.2 Αντιδραστήρια

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής (αντιρριζικής) ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Folin-Ciocalteu (Carlo Erba Regents, Spain), ανθρακικό νάτριο (Penta Chemicals, Czech Republic) και η ρίζα DPPH (2,2,- diphenyl-1- picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, Germany). Για την ακετονική εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε ακετόνη βιομηχανικής χρήσης (Lachner, Czech Republic), ενώ για την υδατική εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό (από στήλη ιοντοεναλλαγής εγκατεστημένη στο εργαστήριο). Για τις καμπύλες αναφοράς της μεθόδου Folin-Ciocalteu και DPPH, χρησιμοποιήθηκαν γαλλικό οξύ (98% w/w), (Merck Schuchardt OHG, Germany) και 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 98% (Trolox) (Aldrich Chemistry, Denmark). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της κανναβιδιόλης μέσω της υγρής χρωματογραφίας HPLC-DAD χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα CBD 1,0 mg/mL C-045-1ML (Supelco ®). Για την αραίωση του πρότυπου διαλύματος CBD χρησιμοποιείται ισοπροπανόλη ποιότητας HPLC (Fisher Chemical, Leicestershire, UK). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της ρουτίνης χρησιμοποιήθηκε ρουτίνη σε στερεή μορφή (Merck, Darmstadt, Germany). Το νερό, το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη και το τριφθοροξικό οξύ που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές αναλύσεις, ήταν επίσης ποιότητας HPLC (Fisher Chemical, Leicestershire, UK).

3.4.3 Συσκευές και όργανα

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιούνται τα παρακάτω όργανα και συσκευές:

Οι απαιτούμενες ζυγίσεις μικρών ποσοτήτων γίνονται σε ζυγό με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (XT-220A, Precisa, Switzerland), ενώ οι ζυγίσεις μεγαλύτερων ποσοτήτων σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων (620C, Precisa, Switzerland).

Για την κονιοποίηση της πρώτης ύλης σε μέγεθος σκόνης χρησιμοποιείται οικιακό μπλέντερ. Το επιθυμητό μέγεθος σκόνης είναι 850 μm (ή μικρότερο), και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται κόσκινο ανοίγματος 850 μm.

Για την επίτευξη διαφόρων ξηράσεων των δειγμάτων φυτού και των εκχυλισμάτων χρησιμοποιείται φούρνος (WTBE28, Binder, Germany), η ρύθμιση θερμοκρασίας του οποίου γίνεται ανάλογα με τη χρήση: στους 100 °C προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως το νερό των υδατικών εκχυλισμάτων για τον προσδιορισμό του περιεχομένου τους σε ολικά στερεά και στους 40 °C για την απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη για τον προσδιορισμό του στερεού υπολείμματος των εκχυλισμάτων. Επιπλέον, για τις σταθμικές αναλύσεις μετά την παραμονή των δειγμάτων στο φούρνο τα τελευταία τοποθετούνται σε ξηραντήρα με σφαιρίδια αφυγραντικού υλικού silica gel για την απορρόφηση της υγρασίας, μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Οι εκχυλίσεις ανοιχτού συστήματος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας πραγματοποιούνται σε σταθερή κλίση και είναι ημιδιαλείποντος έργου. Πιο συγκεκριμένα, οι εκχυλίσεις γίνονται με μία διάταξη που αποτελείται από έναν κυλινδρικό, ανοξειδωτο

εκχυλιστήρα όγκου περίπου 90 mL. Ο καθαρός διαλύτης βρίσκεται σε αρχικά σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 mL. Η ροή του διαλύτη στον εκχυλιστήρα επιτυγχάνεται με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας (Millipore, Bedford, Massachusetts) και σωληνώσεων σιλικόνης. Η αντλία έχει ρυθμιστή ροής και μανόμετρο για τον έλεγχο της πίεσης. Η συλλογή του εκχυλίσματος γίνεται σε βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο των 200 mL. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 10) παρουσιάζεται η σχετική διάταξη.



Εικόνα 10. Διάταξη εκχύλισης ημιδιαλείποντος έργου.

Οι εκχυλίσεις κλειστού συστήματος (διαλείποντος έργου) γίνονται σε ποτήρι ζέσεως 800 mL. Το σύστημα στερεού-υγρού βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια ενός ηλεκτρικού μοτέρ και μίας προπέλας (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Διάταξη εκχύλισης διαλείποντος έργου.

Προκειμένου να γίνει διαχωρισμός του εκχυλίσματος από το στερεό χρησιμοποιούνται διάταξη διήθησης υπό κενό, διηθητικό χαρτί και φίλτρα 0,45 μm.

Για τις απαραίτητες φωτομετρήσεις των πειραμάτων που απαιτούν η μέθοδος Folin Ciocalteu και η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται το φωτόμετρο Hitachi U2900.



Εικόνα 12. Φωτόμετρο Hitachi U2900.

Οι αναλύσεις για την ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών και των φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων γίνεται με χρήση υγρού χρωματογράφου υψηλής απόδοσης με αντλία βαθμωτής έκλουσης HP1100, ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (DAD Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) και στήλη ZORBAX Eclipse XDB-C18, διαστάσεων 5 μm , 250 mm x 4.6 mm).



Εικόνα 13. Διάταξη HPLC-DAC και υπολογιστής με πρόγραμμα επεξεργασίας αποτελεσμάτων.

3.5 Πειραματικές τεχνικές και αναλυτικές μέθοδοι

3.5.1 Προσδιορισμός υγρασίας της φυτικής πρώτης ύλης

Σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως των 100 mL προστίθεται ποσότητα υλικού (πρώτης ύλης) περίπου 3 g χρησιμοποιώντας τον αναλυτικό ζυγό. Σημειώνεται η ακριβής μέτρηση του ζυγού συνολικά για το σκεύος και το υλικό (αρχική μικτή μάζα). Το ποτήρι ζέσεως το οποίο πλέον περιέχει το υλικό τοποθετείται εντός του φούρνου στους 100 °C για 24 ώρες. Μετά το πέρας του διαστήματος αυτού, το σκεύος αφαιρείται προσεκτικά από το φούρνο και αφήνεται για 20 min στο ξηραντήρα. Το σκεύος, το οποίο πλέον περιέχει το υλικό απαλλαγμένο από την υγρασία, ζυγίζεται εκ νέου (τελική μικτή μάζα). Η απώλεια της μάζας οφείλεται στην απομάκρυνση της υγρασίας. Η διαδικασία προσδιορισμού επαναλαμβάνεται για ακόμη μια φορά.

$$\text{Υγρασία \%} = \frac{\text{αρχική μικτή μάζα (g)} - \text{τελική μικτή μάζα (g)}}{\text{μάζα φυτού που ζυγίστηκε (g)}} * 100\% \quad (2)$$

3.5.2 Προσδιορισμός αναλογίας σπόρων της φυτικής πρώτης ύλης

Αρχικά, συλλέγεται σε προζυγισμένο ποτήρι ζέσεως μια ποσότητα υλικού γύρω στα 10- 15 g υλικού από 5 διαφορετικά σημεία της συσκευασίας (προκειμένου να αντιπροσωπεύει όλο το δείγμα του φυτικού υλικού). Σημειώνεται η μάζα του υλικού που συλλέχθηκε (με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων). Το υλικό απλώνεται σε μια καθαρή επιφάνεια εργασίας και ακολουθεί διαχωρισμός των σπόρων με τη χρήση μιας μεταλλικής τσιμπίδας. Οι σπόροι συλλέγονται σε αλουμινόχαρτο και ζυγίζονται στον αναλυτικό ζυγό των τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Η διαδικασία προσδιορισμού πραγματοποιείται εις διπλούν.

$$\text{Σπόρος \%} = \frac{\text{μάζα σπόρων (g)}}{\text{συνολική μάζα φυτού (g)}} * 100\% \quad (3)$$

3.5.3 Εξαντλητική εκχύλιση ανοιχτού συστήματος

Οι εξαντλητικές εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω της εφαρμογής της μεθόδου του ανοιχτού συστήματος έλαβαν χώρα σε εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης (εξικμαστήρα). Αρχικά, ζυγίζονται στο ζυγό ακρίβειας δύο δεκαδικών ψηφίων 20 g ξηρής σκόνης πρώτης ύλης και έπειτα τοποθετούνται στον εκχυλιστήρα (σημειώνεται η ακριβής ποσότητα). Για να αποφευχθεί η μεταφορά ξένων σωματιδίων στο τελικό εκχύλισμα, πριν την έξοδο του από τον εκχυλιστήρα (από την κορυφή του κυλίνδρου) τοποθετείται βαμβάκι (σε στρώση πάχους 0,5 cm περίπου) ως αδρανές διηθητικό υλικό. Μετά την προσθήκη του φυτικού υλικού, ο κενός όγκος που προκύπτει, πληρώνεται με βαμβάκι μέχρι και τον πυθμένα του κυλίνδρου, χωρίς να ασκηθεί κάποια μηχανική πίεση. Ο εκχυλιστήρας κλείνει με ένα βιδωτό καπάκι. Η σύνδεση των δύο μερών στεγανοποιείται με πλαστικό δακτύλιο. Το σύστημα του εκχυλιστήρα τοποθετείται σε κατακόρυφη θέση. Ο καθαρός διαλύτης εισέρχεται από τον πυθμένα του κυλίνδρου με τη βοήθεια της αντλίας, διαβρέχει το υλικό και εκχυλίζει τα συστατικά του. Το εκχύλισμα εξέρχεται από την κορυφή του κυλίνδρου και διερχόμενο από την πλαστική σωλήνωση της εξόδου, συλλέγεται σε βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο των 200 mL. Ο διαλύτης και το εκχύλισμα εισέρχεται και εξέρχεται αντίστοιχα με τη βοήθεια λάστιχου σιλικόνης. Οι εκχυλίσεις διακόπτονται όταν παρατηρηθεί ότι το φρέσκο εκχύλισμα της δεδομένης χρονικής στιγμής έχει πρακτικά αποχρωματιστεί (δηλαδή όταν είναι πλέον πολύ αραιό).

Η ογκομετρική παροχή του διαλύτη στην κλίνη ρυθμίζεται σε επίπεδα περίπου 3 mL/min. Ως έναρξη του χρόνου εκχύλισης ορίζεται η χρονική στιγμή που εξέρχεται από τον εκχυλιστήρα η πρώτη σταγόνα εκχυλίσματος. Η πίεση σε όλες τις εκχυλίσεις διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα 0,2-0,5 bar. Πέρα από την εκχύλιση του φυτικού υλικού με τη συγκεκριμένη διάταξη για τη μελέτη του εκχυλίσματος, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας γίνεται καταγραφή του όγκου του εκχυλίσματος σε διάφορους χρόνους με στόχο τον έλεγχο ύπαρξης σταθερού ρυθμού καθόλη τη διάρκεια της.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι η ακετόνη και το απιονισμένο νερό. Αρχικά, πραγματοποιείται ακετονική εκχύλιση και παραλαμβάνεται ένα χαρακτηριστικό πράσινο

εκχύλισμα (Εικόνα 14). Μετά την ολοκλήρωση της, το φυτικό υλικό και συνεπώς η διάταξη του εξικμαστήρα παραμένει ως έχει και τροφοδοτείται ο νέος διαλύτης (απιονισμένο νερό), οπότε και ξεκινά η υδατική εκχύλιση. Αυτό που παρατηρείται αρχικά στην έξοδο του συστήματος είναι ένα ενδιάμεσο εκχύλισμα ακετόνης-νερού. Αυτό είναι λογικό, καθότι το νερό ως νέος διαλύτης αντικαθιστά την ακετόνη στο εσωτερικό των πόρων του υλικού ωθώντας την ακετόνη (μαζί και τα υπολειπόμενα εκχυλιζόμενα συστατικά στην έξοδο). Το ενδιάμεσο αυτό εκχύλισμα συλλέγεται χωριστά. Το παραγόμενο καθαρό υδατικό εκχύλισμα έχει αρχικά καφέ-χρυσό χρώμα (Εικόνα 10).

Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, το ακετονικό εκχύλισμα ογκομετρείται, μεταφέρεται σε βάζο και διατηρείται στο ψυγείο στους 4 °C. Από την άλλη, το υδατικό εκχύλισμα, μετά την ογκομέτρησή του, αποθηκεύεται σε πλαστικό μπουκάλι και σε καταψύκτη στους -25 °C. Ο όγκος του εκχυλίσματος (που ταυτίζεται με τον όγκο του διαλύτη που χρησιμοποιείται) χρησιμεύει στον υπολογισμό του λόγου της μάζας υλικού προς εκχύλιση προς τον όγκο διαλύτη m/V (g/mL), το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος για την εκχύλιση. Το κάθε πείραμα εξαντλητικής εκχύλισης, για κάθε διαλύτη (ακετόνη και νερό) γίνεται εις διπλούν.



Εικόνα 14. Ακετονική εκχύλιση ανοιχτού συστήματος.

3.5.4 Κινητική μελέτη της εκχύλισης ανοιχτού συστήματος

Για την κινητική μελέτη της εκχύλισης σε εκχυλιστήρα σταθερής κλίνης, ισχύει εν γένει ό,τι και για την περίπτωση της εξαντλητικής εκχύλισης, με ορισμένες διαφορές. Πλέον, υπάρχουν συγκεκριμένα χρονικά σημεία στα οποία γίνεται δειγματοληψία όγκου 1 mL του φρέσκου εκχυλίσματος από την έξοδο του εκχυλιστήρα σε κωδικοποιημένους σωλήνες Eppendorf των 2,5 mL. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να υπάρξει αργότερα μια αντιπροσωπευτική προσέγγιση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης με την εφαρμογή μιας εκ των μεθόδων ανάλυσης του δείγματος. Όλες τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές, το εκχύλισμα συλλέγεται στο βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο των 200 mL, όπως γίνεται και στην εξαντλητική εκχύλιση. Παράλληλα με τη δειγματοληψία, σημειώνεται και ο συνολικός όγκος του συλλεχθέντος εκχυλίσματος για κάθε χρονική στιγμή που αντιστοιχεί σε δειγματοληψία. Μια άλλη διαφορά βρίσκεται και στο ενδιάμεσο σημείο μεταξύ της αλλαγής του διαλύτη εκχύλισης: Η παρουσία του ενδιάμεσου εκχυλίσματος δεν είναι επιθυμητή κατά την κινητική μελέτη της εκχύλισης. Αν υποθεθεί ότι ακολουθείται η διαδικασία όπως και στην εξαντλητική, θα προέκυπτε ξανά ένα ενδιάμεσο εκχύλισμα. Ωστόσο, η παρουσία του ενδιάμεσου έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι τόσο εύκολα διακριτό το χρονικό σημείο που έχει πλέον απομακρυνθεί πλήρως το υπολειπόμενο ακετονικό εκχύλισμα και ξεκινά η υδατική εκχύλιση. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, οι δύο εκχυλίσεις δεν πραγματοποιούνται απευθείας και διαδοχικά. Μετά την ολοκλήρωση της ακετονικής εκχύλισης, αποσυνδέεται η διάταξη, αφαιρείται προσεκτικά το υλικό και αδειάζεται σε ένα προζυγισμένο αλουμινένιο ταψί.

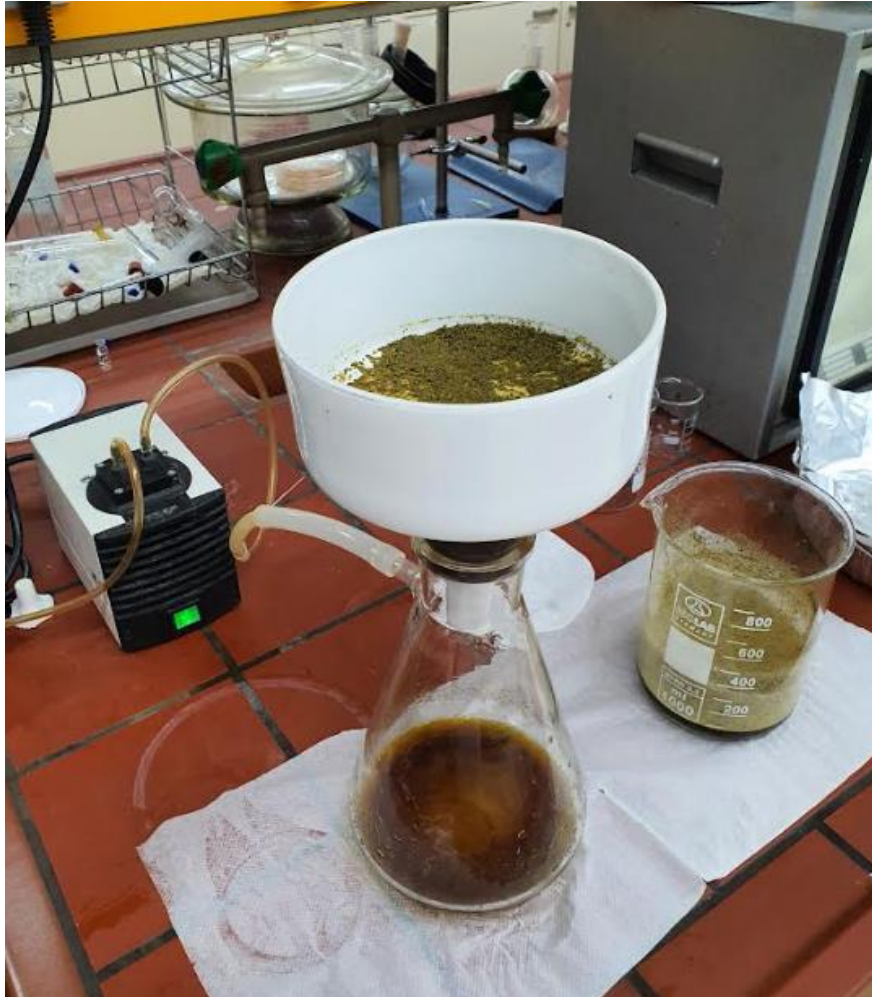
Το ταψί οδηγείται στο φούρνο στους 40 °C για 30 min, προς απομάκρυνση του διαλύτη της ακετόνης που υπάρχει στο υλικό. Ακολουθεί εκ νέου ζύγιση του φυτικού υλικού, το οποίο είναι πλέον απαλλαγμένο τόσο από τα μη-πολικά συστατικά όσο και από την υπολειμματική ακετόνη. Το υλικό αυτό τοποθετείται ξανά εντός του εξικμαστήρα και πραγματοποιείται υδατική εκχύλιση με διαλύτη απιονισμένο νερό. Από εκεί και έπειτα, ακολουθούνται τα ίδια βήματα που αναφέρθηκαν και παραπάνω για την ακετονική εκχύλιση.

3.5.5 Κινητική μελέτη της εκχύλισης κλειστού συστήματος

Για λόγο που θα αναλυθεί στη συνέχεια της διπλωματικής εργασίας, για την περίπτωση της υδατικής εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε και κινητική μελέτη σε κλειστό σύστημα. Το φυτικό υλικό που παραλαμβάνεται μετά από την απομάκρυνση του διαλύτη της ακετόνης ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων. Ο σχεδιασμός του πειράματος ακολουθεί μια βασική λογική: τη διατήρηση του λόγου της μάζας υλικού προς εκχύλιση προς τον όγκο διαλύτη m/V (g/mL) ίδιο με εκείνο που προέκυψε για την εξαντλητική υδατική εκχύλιση. Το στερεό αναμιγνύεται με το διαλύτη, και η εκχύλιση γίνεται υπό συνεχή ανάδευση (Εικόνα 11). Για την κινητική μελέτη, σε καθορισμένα χρονικά σημεία γίνεται δειγματοληψία όγκου 1 mL από το ποτήρι ζέσεως με τον εξής τρόπο: με τη χρήση μιας σύριγγας λαμβάνεται δείγμα από το δοχείο. Προκειμένου να διαχωριστεί το εκχύλισμα από το στερεό, χρησιμοποιείται φίλτρο 0,45 μm. Το εκχύλισμα συλλέγεται σε κωδικοποιημένους σωλήνες Eppendorf των 2,5 mL.

Το τελικό σημείο της εκχύλισης ορίζεται πλέον χρονικά (καθότι ο όγκος δεν μεταβάλλεται). Το τελικό χρονικό σημείο ορίζεται στις 2 h εμπειρικά και βάσει και του χρονικού διαστήματος εντός του οποίου ολοκληρώνεται η εξαντλητική εκχύλιση. Μετά το τέλος της

εκχύλισης και με σκοπό το διαχωρισμό του στερεού από το συνολικό τελικό εκχύλισμα, χρησιμοποιείται ως μέθοδος η διήθηση υπό κενό (Εικόνα 15). Όπως σε όλες τις περιπτώσεις εκχύλισης, γίνεται ογκομέτρηση του τελικού εκχυλίσματος. Οι συνθήκες διατήρησης είναι οι ίδιες σε κάθε είδος εκχύλισης (εξαρτώνται μόνο από το είδος του διαλύτη).



Εικόνα 15. Διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του υδατικού εκχυλίσματος.

3.5.6 Προσδιορισμός στερεών υπολειμμάτων στα εκχυλίσματα

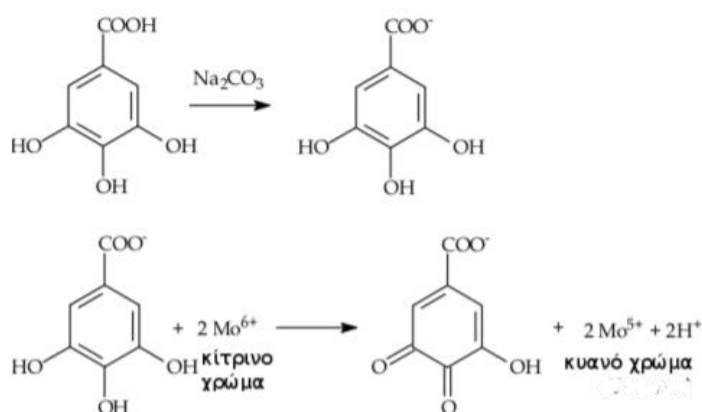
Για την εκάστοτε εκχύλιση, υπάρχει η ανάγκη εύρεσης της απόδοσης της σε ολικά στερεά, ή με άλλα λόγια τον προσδιορισμό των στερεών που ανέκτησε ο διαλύτης. Για τον σκοπό αυτό, ογκομετρείται με σιφώνιο πληρώσεως συγκεκριμένη ποσότητα εκχυλίσματος (όγκος εκχυλίσματος) και εισάγεται σε προζυγισμένο (σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών) πυρίμαχο περιέκτη (αρχική μάζα). Στη συνέχεια, το δείγμα και ο περιέκτης οδηγείται στο φούρνο (100 °C, 24 h) και έπειτα στον ξηραντήρα για 20 min. Τέλος, ο περιέκτης

και το στερεό υπόλειμμα (τελική μικτή μάζα) ζυγίζεται στον αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών και τα ολικά εκχυλισμένα στερεά προσδιορίζονται από την σχέση:

$$\text{Ολικά Στερεά (Total Solids - TS)} \left(\frac{g}{L_{\text{εκχυλίσματος}}} \right) = \frac{\text{τελική μικτή μάζα (g)} - \text{αρχική μάζα (g)}}{\text{όγκος εκχυλίσματος (L)}} \quad (4)$$

3.5.7 Προσδιορισμός ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των ολικών φαινολών στα εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης, ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Συγκεκριμένα το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 765 nm και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Bancuta et al. ,2016).

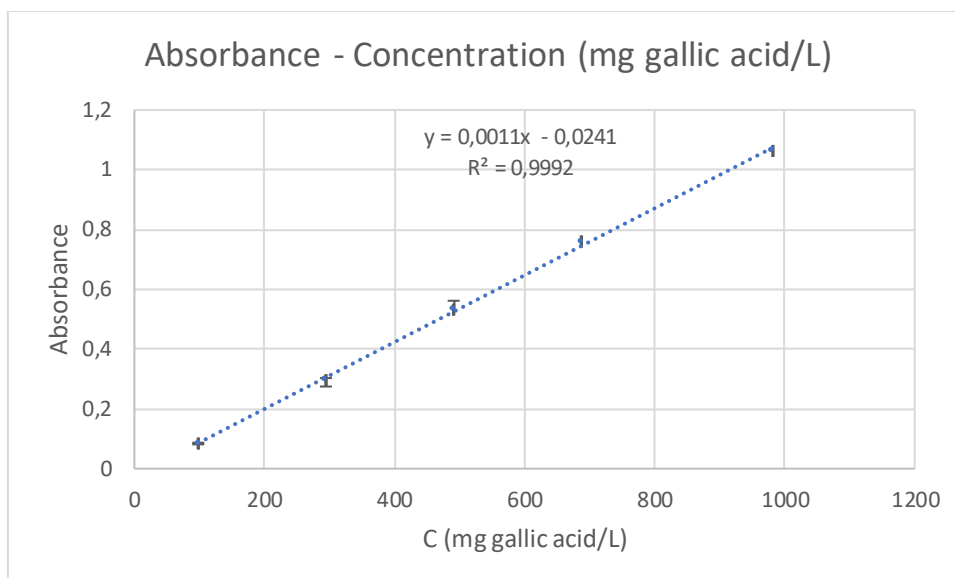


Εικόνα 16. Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός e^- .

Η επίτευξη του αλκαλικού περιβάλλοντος επιτυγχάνεται με την προσθήκη κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Για την παρασκευή αυτού, σε 800 mL απιονισμένο νερό διαλυτοποιούνται 200 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου με τη βοήθεια ήπιας ανάδευσης και θέρμανσης σε θερμαντική πλάκα. Η θέρμανση του διαλύματος συνεχίζεται έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το ανθρακικό νάτριο και επιτευχθεί ήπιος βρασμός. Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο για 24 h με σκοπό το σχηματισμό κρυστάλλων. Για την έναρξη του σχηματισμού των κρυστάλλων, προστίθενται επιπλέον κρύσταλλοι ανθρακικού νατρίου αν είναι απαραίτητο. Τέλος, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και το διήθημα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L, όπου και πληρώνεται με απιονισμένο H_2O έως την χαραγή. Το διάλυμα αυτό μένει σταθερό και κατάλληλο για χρήση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Για τη μέτρηση των ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 7,9 mL απιονισμένο νερό, 0,1 mL του δείγματος ανάλυσης που έχει παρασκευαστεί (ή αραιωθεί) με το διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε εκχύλιση και 0,5 mL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Μετά από χρονικό διάστημα επώασης 30 sec – 8 min προστίθεται 1,5 mL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 και πραγματοποιείται ανάδευση των δειγμάτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο και ένα τυφλό δείγμα στο οποίο αντί για 0,1 mL αραιωμένου εκχυλίσματος τοποθετούνται 0,1 mL απιονισμένου νερού, για την διόρθωση στο σφάλμα της τιμής της απορρόφησης που οφείλεται στην πιθανή απορρόφηση των αντιδραστηρίων. Τα δείγματα επωάζονται για 2 h απουσία φωτός, καθώς το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu θεωρείται φωτοευαίσθητο και στη συνέχεια αναδεύονται με χρήση vortex. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 765 nm σε φωτόμετρο (Hitachi U2900).

Για την ποσοτικοποίηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς με τη χρήση γαλλικού οξέος ως φαινολικό υπόστρωμα. Αρχικά, για την παρασκευή διαλύματος γαλλικού οξέος, ζυγίζεται ποσότητα γαλλικού οξέος της τάξεως των 100 mg σε αναλυτικό ζυγό. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ακολουθεί διαλυτοποίηση αυτών με 20 mL αιθανόλη (EtOH) και στην συνέχεια γίνεται προσθήκη απιονισμένου νερού ως την χαραγή (πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης C). Στη συνέχεια, σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, προστίθενται 1, 3, 5 και 7 mL από το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος και ακολουθεί αραιώση με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Έτσι, προκύπτουν διαλύματα με περιεκτικότητες 0,7C- 0,5C- 0,3C- 0,1C. Εν συνεχεία, ακολουθείται το πρωτόκολλο της μεθόδου Folin-Ciocalteu για τα τέσσερα παραπάνω διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (συν για το πρότυπο διάλυμα), επωάζονται και τέλος φωτομετρούνται στα 765 nm. Οι μετρήσεις που προκύπτουν αποτελούν τα δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς, βάσει της οποίας εκφράζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε ολικές φαινολικές ενώσεις. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε κάθε σημείο του διαγράμματος αντιστοιχεί στον αντίστοιχο μέσο όρο των δύο μετρήσεων. Η μονάδα μέτρησης είναι mg gallic acid (GAE)/L (όπου GAE= ισοδύναμα γαλλικού οξέος). Η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει παρουσιάζεται παρακάτω (Διάγραμμα 2):



Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

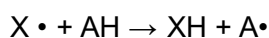
Προκύπτει μια γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης (-) (A) και συγκέντρωσης (mg gallic acid/L) (C) με συντελεστή προσαρμογής ($R^2=0,9992$):

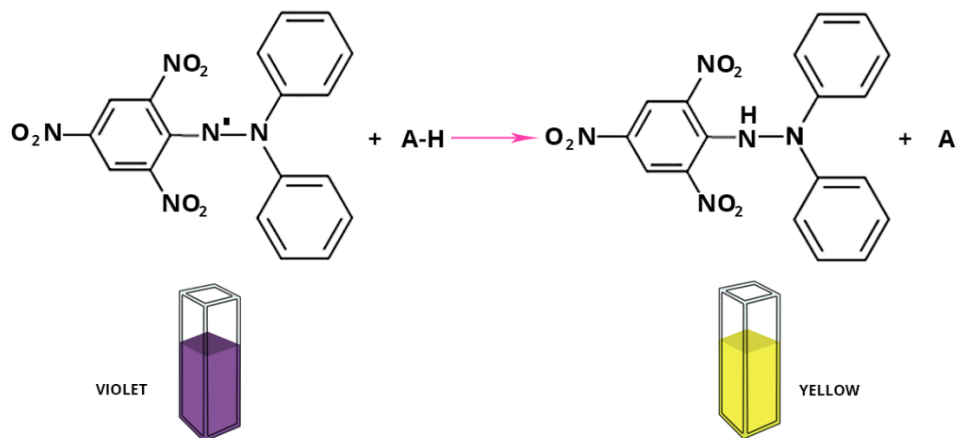
$$A = 0,0011 * C - 0,0241 \quad (4)$$

3.5.8 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH

Το μόριο του 1,1 διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH) αποτελεί μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, λόγω της δυνατότητας του ελεύθερου ηλεκτρονίου να μετακινείται στο μόριο, ούτως ώστε αυτό να μη διμερίζεται, πράγμα που συμβαίνει στις περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Η μετακίνηση του ηλεκτρονίου είναι ακόμα υπεύθυνη για την πρόσδοση στη ρίζα ενός χαρακτηριστικού ιώδους χρώματος. Το διάλυμα έχει μέγιστη απορρόφηση σε διάλυμα μεθανόλης στα 515 nm.

Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμιγνύεται με ένα διάλυμα μιας ουσίας η οποία μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, τότε το DPPH μετατρέπεται στο υδρογωνομένο παράγωγό του, χάνοντας το ιώδες του χρώμα. Αν συμβολιστεί με $X \cdot$ το μόριο του DPPH και με AH το μόριο δότης, τότε η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:





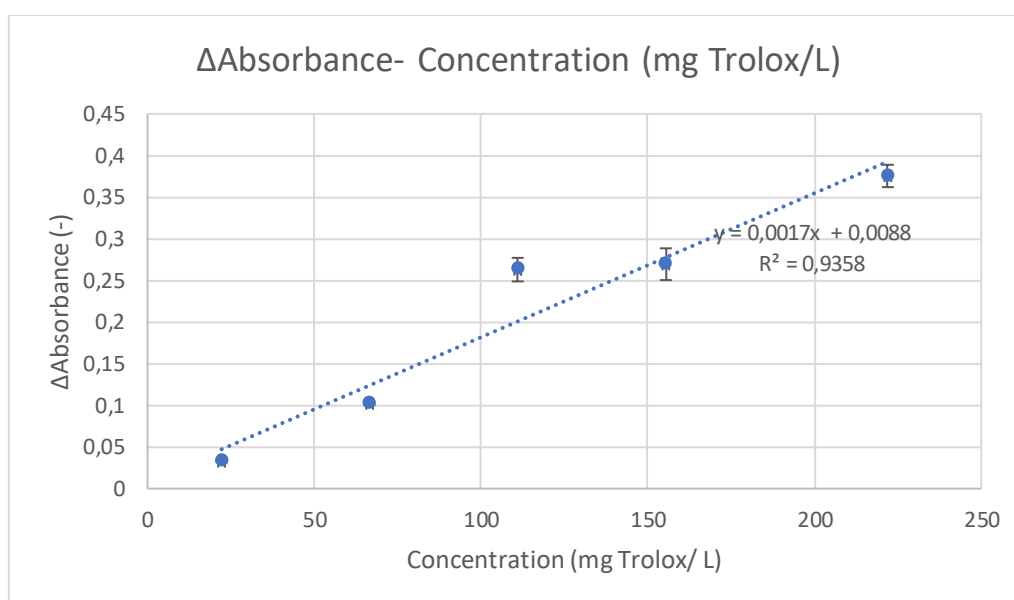
Εικόνα 17. Η δέσμευση του μονήρους ηλεκτρονίου της ρίζα DPPH[•] από μόριο αντιοξειδωτικού ([Image Link](#)).

όπου το ΧΗ είναι η παράγωγη μορφή και Α[•] είναι η ελεύθερη ρίζα που παράγεται από αυτή την αντίδραση. Η ρίζα αυτή στη συνέχεια θα συμμετάσχει σε επιπλέον αντιδράσεις που ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία, δηλαδή τα μόρια DPPH που αποχρωματίζονται από 1 μόριο δότη Η. Η αντίδραση αυτή μπορεί να συσχετιστεί με τις αντιδράσεις που συμβαίνουν σε ένα οξειδωτικό σύστημα. Η ρίζα του DPPH προσομοιάζει τις υπεροξειδικές ρίζες που σχηματίζονται στα τρόφιμα αλλά και σε βιολογικά συστήματα και οι οποίες δεσμεύονται από την ουσία ΑΗ, δηλαδή το αντιοξειδωτικό.

Το πρωτόκολλο της μεθόδου DPPH περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα (Brand-Williams et al., 1995) : Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα DPPH. Ζυγίζονται 2,5 mg DPPH στον αναλυτικό ζυγό και προστίθενται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα, ακολουθεί προσθήκη ποσότητας μεθανόλης, έντονη ανάδευση για την πλήρη διάλυση του DPPH και τέλος προσθήκη επιπλέον μεθανόλης μέχρι τη χαραγή. Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, προστίθενται 3,9 mL από το διάλυμα DPPH και 100 μL του προσ-ανάλυση δείγματος και ακολουθεί ανάδευση σε vortex. Στη συνέχεια, μετά από παραμονή σε σκοτεινό μέρος για 30 min, μετράται η απορρόφηση (A1) του διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U2900) στα 515 nm. Για αρχή, μηδενίζεται η ένδειξη του φωτομέτρου χρησιμοποιώντας καθαρή μεθανόλη και έπειτα μετράται η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος (A2) το οποίο παρασκευάστηκε προσθέτοντας 100 μL μεθανόλης σε 3,9 mL DPPH. Αυτό που μετράται σε κάθε περίπτωση ήταν η διαφορά απορρόφησης ΔΑ= (A2)-(A1) του κάθε δείγματος από το τυφλό δείγμα.

Για την επεξεργασία των απορροφήσεων που προσδιορίζονται από την παραπάνω διαδικασία και την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων σε μια συγκέντρωση απαιτείται η κατασκευή καμπύλης αναφοράς βάση της οποίας οι διαφορές των απορροφήσεων (A2)- (A1) των δειγμάτων που προκύπτουν εκφράζονται σε ισοδύναμη δράση μιας κοινά αποδεκτής ουσίας. Η κοινά αποδεκτή ουσία είναι το Trolox. Το διάλυμα του Trolox σε μεθανόλη χρησιμοποιείται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, ζυγίστηκαν 0,0222 g Trolox και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με μεθανόλη. Από αυτό το διάλυμα προστέθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL όγκοι ίσοι με 1, 3, 5, 7 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη. Έτσι, προκύπτουν διαλύματα με περιεκτικότητες 22,2 mg Trolox/L, 66,6 mg Trolox /L, 111,0 mg Trolox /L, 155,4 mg Trolox /L. Εν συνεχεία, ακολουθείται το πρωτόκολλο της μεθόδου DPPH για τα τέσσερα παραπάνω διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (συν για το πρότυπο διάλυμα). Οι μετρήσεις που προκύπτουν αποτελούν τα δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς, βάσει της οποίας εκφράζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εκχυλίσματος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε κάθε σημείο του διαγράμματος αντιστοιχεί στον αντίστοιχο μέσο όρο των δύο μετρήσεων. Η μονάδα μέτρησης είναι mg Trolox/ L. Η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει παρουσιάζεται παρακάτω (Διάγραμμα 3):



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς trolox με τη μέθοδο DPPH (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Προκύπτει μια γραμμική σχέση μεταξύ μεταβολής απορρόφησης (-) (ΔA) και συγκέντρωσης (mg Trolox/L) (C) με συντελεστή προσαρμογής ($R^2=0,9358$):

$$A = 0,0017 * C - 0,0088 \quad (5)$$

3.5.9 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (HPLC-DAD)

Η χρωματογραφία αποτελείται από τη στατική και την κινητή φάση. Η στατική φάση παραμένει σταθερή μέσα στη στήλη και μπορεί να είναι υγρό με μεγάλο ιξώδες που είναι δεσμευμένο στο εσωτερικό ενός τριχοειδούς σωλήνα ή στην επιφάνεια στερεών σωματιδίων (Harris, 2010). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη, ή μίγμα διαλυτών ενώ η στατική από πορώδες στερεό ή υγρό ενσωματωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Το προς ανάλυση δείγμα έρχεται σε επαφή με τις δύο φάσεις και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός λόγω της διαφορετικής φυσικοχημικής συγγένειας που εμφανίζουν τα συστατικά του με την κάθε φάση. Ο βαθμός αλληλεπίδρασης των μορίων με την κάθε φάση ορίζεται από διάφορα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, το φορτίο, την πηχτικότητα και τη διαλυτότητα. Ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, τα διάφορα συστατικά του μίγματος εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους (Skoog et al., 2007).

Το χρωματογράφημα είναι ένα διάγραμμα που απεικονίζει την απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου έκλουσης. Ο χρόνος κατακράτησης t_r της εκάστοτε ουσίας είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την εισαγωγή του διαλύματος στη στήλη μέχρι την άφιξη της ένωσης στον ανιχνευτή. Για τον βέλτιστο διαχωρισμό δύο ενώσεων απαιτείται διαφορά στους χρόνους έκλουσης μεταξύ των κορυφών τους και στενότητα των κορυφών. Επομένως, η αύξηση της διαφοράς των χρόνων έκλουσης και οι στενές κορυφές είναι σημάδια επιτυχημένου χρωματογραφικού διαχωρισμού (Harris, 2010).

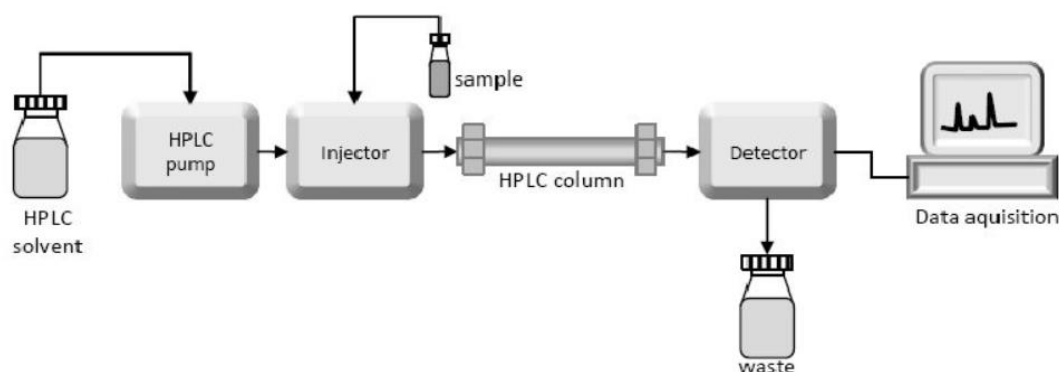
Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) αποτελεί παραλλαγή της κλασικής χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και μειώνει σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιείται, ως αναλυτική μέθοδος, η HPLC αντίστροφης φάσης. Στην περίπτωση αυτή, η στατική φάση είναι μη πολική και η κινητή πολική. Οι πολικές ενώσεις εκλούνται πρώτες και με σταδιακή μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης εκλούνται τα λιγότερο πολικά μόρια.

Η εργαστηριακή διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποτελεί μια τυπική διάταξη HPLC και περιλαμβάνει κατά σειρά τα παρακάτω μέρη:

1. Περιέκτες διαλυτών: Φιάλες στις οποίες είναι αποθηκευμένοι οι διαλύτες, μίγμα των οποίων θα αποτελέσει την κινητή φάση.
2. Απαερωτής κενού: Εξασφαλίζει την πλήρη απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη στήλη.
3. Αντλία: Εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης στο σύστημα, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
4. Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη στήλη και εισάγει το δείγμα στη ροή της κινητής φάσης.
5. Χρωματογραφική στήλη: Επιτυγχάνει το διαχωρισμό του μίγματος στα συστατικά του και είναι θερμοστατούμενη. Ακριβώς πριν, έχει τοποθετηθεί σε σειρά μια «προστήλη» η οποία λειτουργεί ως προστασία, αφού έχει τη δυνατότητα κατακράτησης τυχόντων στερεών υπολειμμάτων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν σημαντική βλάβη στη λειτουργία της χρωματογραφικής στήλης.
6. Ανιχνευτής: Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (Diode Array Detector, DAD). Το παραγόμενο από

τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρείται η απορρόφηση του φωτός σε διάφορα (προκαθορισμένα) μήκη κύματος. Άλλος ευρέως χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ο ανιχνευτής ορατούυπεριώδους (UV/Vis Detector). Ακολουθούν αρκετοί ακόμη όπως οι αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detectors), οι φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detectors, MS Detectors), οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detectors) κ.α.

7. Καταγραφικό: Καταγράφει συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης το μετρούμενο σήμα και το προωθεί στον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.
8. Συλλέκτης αποβλήτων: Φιάλη όπου καταλήγει η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος.



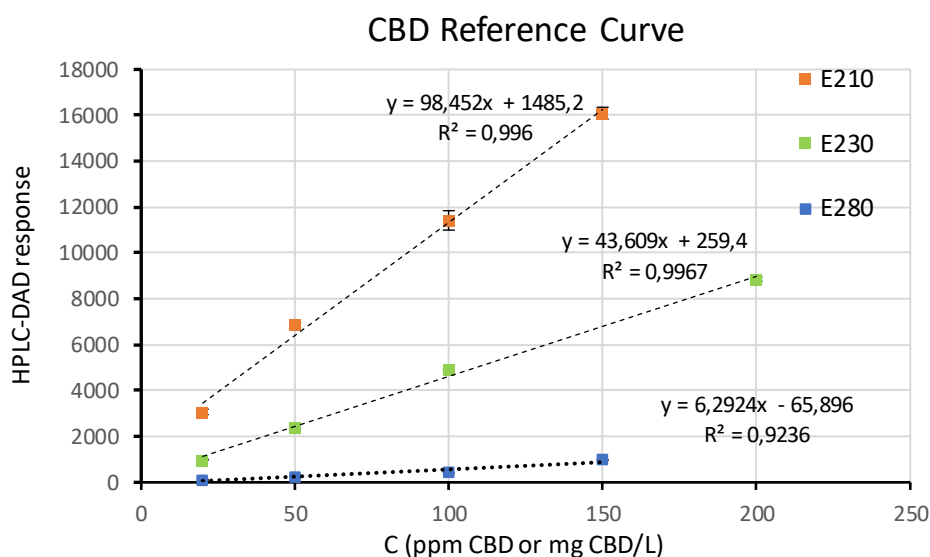
Εικόνα 18. Τα μέρη και η διάταξη ενός αναλυτή HPLC ([Image Link](#)).

Χρησιμοποιήθηκαν δύο παραλλαγές της ίδιας μεθόδου ανάλυσης για τα δύο είδη διαφορετικών εκχυλισμάτων (υδατικών και ακετονικών). Η πρώτη παραλλαγή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών των υδατικών εκχυλισμάτων της βιομηχανικής κάνναβης. Οι αναλύσεις της συγκεκριμένης μεθόδου έχουν διάρκεια 70 λεπτά. Η κινητή φάση έχει ροή 1 mL/min και περιλαμβάνει μείγμα τριών διαλυτών με μεταβαλλόμενη σύσταση κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ο διαλύτης A είναι νερό ποιότητας HPLC οξιμισμένο με 0,2% TFA, ο διαλύτης B είναι μεθανόλη ποιότητας HPLC οξιμισμένη με 0,2% TFA και ο C ακετονιτρίλιο οξιμισμένο με 0.2% TFA. Η αρχική σύσταση του μείγματος διαλυτών είναι 90% A, 6% B και 4% C. Στη συνέχεια με γραμμική μεταβολή οι περιεκτικότητες αλλάζουν σε 85% A, 9% B, 6% C στα 5 λεπτά. Έπειτα, στα 30 λεπτά ανάλυσης οι περιεκτικότητες μεταβάλλονται σε 71% A, 17,4% B και 11,6% C. Τέλος, στα 60 λεπτά και μέχρι το πέρας της ανάλυσης η σύσταση του διαλύματος των διαλυτών ρυθμίζεται στα 0% A, 85% B, 15% C. Η δεύτερη παραλλαγή χρησιμοποιείται για την ανάλυση των ακετονικών εκχυλισμάτων, καθώς περιέχουν κανναβινοειδη (μη πολικές ενώσεις). Η μέθοδος αυτή έχει διάρκεια 80 λεπτά και διαθέτει τα ίδια χαρακτηριστικά με την παραπάνω μέθοδο, για τα πρώτα 60 λεπτά της ανάλυσης. Έπειτα, για δέκα λεπτά από τα 65 μέχρι τα 75 λεπτά πραγματοποιείται πλύση της στήλης με βουτανόλη ποιότητας HPLC (διαλύτης D σε αναλογία 100%) με ροή 0,7 mL/min. Σκοπός της πλύσης αυτής είναι η απομάκρυνση των πολύ άπολων συστατικών (χλωροφύλλες, λιπίδια, κηρώδη). Σε περίπτωση που τα συστατικά αυτά παγιδευτούν στη στήλη, θα την καταστρέψουν με την πάροδο των αναλύσεων. Τέλος, στα 76 λεπτά η σύσταση του διαλύματος διαλυτών μεταβάλλεται σε 85% B και 15% C με ροή 1 mL/min.

Ο ανιχνευτής DAD στην περίπτωση της 1^{ης} παραλλαγής ρυθμίστηκε στα εξής μήκη κύματος: 230 nm, 280 nm, 320 nm, 360 nm, 664 nm, ενώ σε αυτήν της 2^{ης} παραλλαγής στα 210 nm, 230 nm, 280 nm, 296 nm, 445 nm.

3.5.9.i Ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών

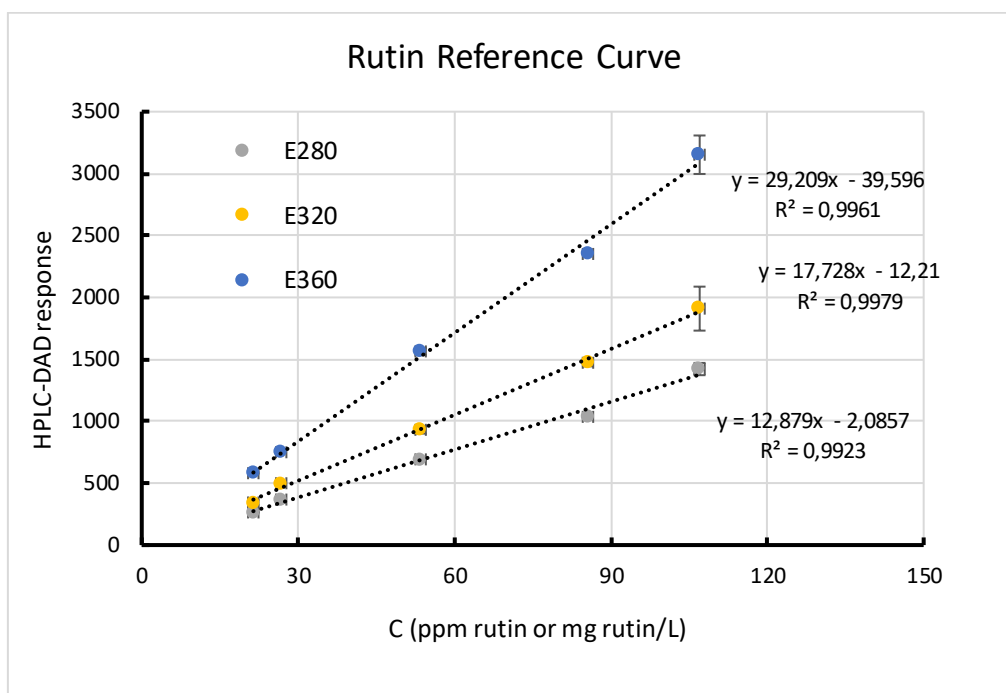
Για την ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών, κυρίως δηλαδή της κανναβιδιόλης (CBD) και του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA) χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα κανναβιδιόλης (CBD) συγκέντρωσης C=1000 ppm ή 10³ mg/L. Όγκος 1 mL πρότυπου διαλύματος αραιώνεται σε τελικό όγκο 5 mL με τη χρήση διαλύτη ισοπροπανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL, οπότε προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 200 ppm. Έπειτα, διεξάγονται τρεις διαδοχικές αραιώσεις 0,75C- 0,5 C- 0,25 C- 0,1 C. Κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει η παρακάτω πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 4) απόκρισης (-) συναρτήσεως της συγκέντρωσης (mg CBD/L) για τρία διαφορετικά μήκη κύματος (210, 230 και 280 nm).



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς κανναβιδιόλης (CBD).

3.5.9.ii Ποσοτικοποίηση των φλαβονοειδών

Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα ρουτίνης συγκέντρωσης 214 ppm. Έπειτα, διεξάγονται πέντε διαδοχικές αραιώσεις 0,5C- 0,4C- 0,25C- 0,125C- 0,1C. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ανάλυση των δειγμάτων με την 2^η μέθοδο. Κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει η παρακάτω πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 4) απόκρισης (-) συναρτήσεως της συγκέντρωσης (mg CBD/L) για τρία διαφορετικά μήκη κύματος (280, 320 και 360 nm).



Διάγραμμα 5. Καμπύλη αναφοράς ρουτίνης.

4. Αποτελέσματα- Επεξεργασία- Σχολιασμός

4.1 Προσδιορισμός υγρασίας φυτικής πρώτης ύλης

Η περιεχόμενη υγρασία της αρχικής φυτικής πρώτης ύλης που προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου που αναφέρθηκε παραπάνω και της σχέσης (2) είναι ίση με $10,1 \pm 0,1$ % w/w (g νερού/100 g φυτικής πρώτης ύλης).

4.2 Προσδιορισμός αναλογίας σπόρων της φυτικής πρώτης ύλης

Η αναλογία των σπόρων στην αρχική φυτική πρώτη ύλη που προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου που αναφέρθηκε παραπάνω και της σχέσης (3) είναι ίση με $3,9 \pm 0,3$ w/w (g σπόρων/100 g φυτικής πρώτης ύλης).

4.3 Αποτελέσματα εξαντλητικής εκχύλισης

Σημείωση: Η μορφή υπό την οποία λαμβάνεται το εκχύλισμα δεν είναι απευθείας εμπορικά αξιοποιήσιμη, καθότι υπάρχει η ανάγκη να απομακρυνθεί πρώτα ο διαλύτης (η παρουσία του δεν είναι επιθυμητή στο τελικό προϊόν). Η απομάκρυνση του διαλύτη γίνεται συνήθως με εξάτμιση (αρκεί η διεργασία αυτή να μην επιδρά στα βιοδραστικά συστατικά του εκχυλίσματος). Μετά την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη, προκύπτει μια ξηρή στερεή σκόνη. Έτσι, υπάρχει η ανάγκη ύπαρξης μιας διαφορετικής έκφρασης της συγκέντρωσης (π.χ. των ολικών φαινολικών συστατικών), πέραν της έκφρασης που προκύπτει μετά την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου (π.χ. Folin- Ciocalteu) στο δείγμα του εκχυλίσματος (π.χ. mg gallic acid/L of extract). Αξιοποιώντας τις αναλύσεις προσδιορισμού στερεού υπολείμματος και γνωρίζοντας τον όγκο των παραγόμενων εκχυλισμάτων, προκύπτει η έκφραση συγκέντρωσης (mg gallic acid/g Total Solids-TS) ή οποία ως όρος είναι γνωστή και ως εκλεκτικότητα της εκχύλισης. Επιπλέον, γνωρίζοντας τον όγκο των παραγόμενων εκχυλισμάτων και την αρχική ποσότητα της φυτικής πρώτης ύλης που εκχυλίστηκε, προκύπτει και η έκφραση (π.χ. mg gallic acid/g of material) που χαρακτηρίζει το περιεχόμενο της ή των ουσιών επί του αρχικού υλικού.

Μια άλλη έκφραση που χρησιμοποιείται και χαρακτηρίζει την κάθε εκχύλιση είναι και η απόδοση σε ολικά στερεά και έχει μονάδα (mg Total Solids/g of material) και η οποία μπορεί να αναχθεί και σε ποσοστό %.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 6,7) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στα πειράματα της εξαντλητικής εκχύλισης για τους δύο χρησιμοποιούμενους διαλύτες (ακετόνη και νερό). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε ως αποτέλεσμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων συν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών.

Αρχικά, παρουσιάζεται το ολικό φαινολικό φορτίο κάθε εκχυλίσματος:

Πίνακας 6. Απόδοση σε Ολικά Στερεά (TSY) και Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) για τους δύο χρησιμοποιούμενους διαλύτες (ακετόνη και νερό).

	Διαλύτης: Ακετόνη	Διαλύτης: Νερό
TSY (mg TS/g of material)	55 ± 2	214 ± 11
TPC (mg gallic acid/L)	249 ± 24	566 ± 43
TPC (mg gallic acid/g TS)	124 ± 14	68 ± 2
TPC (mg gallic acid/g of material)	7,8 ± 1,3	14,7 ± 1,1

Η συγκέντρωση των ολικών στερεών που προσδιορίζεται από τη σχέση (4) είναι 2,01 g TS/L of extract για την ακετονική εκχύλιση και 8,32 g TS/L of extract για την υδατική εκχύλιση. Γνωρίζοντας τον όγκο του εκάστοτε παραγόμενου εκχυλίσματος αλλά και την αρχική μάζα φυτικής πρώτης ύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση, προκύπτει το μέγεθος της απόδοσης σε στερεά. Η απόδοση σε στερεά είναι ίση με 55 mg TS/g of material για την ακετονική εκχύλιση και ίση με 214 mg TS/g of material για την υδατική εκχύλιση. Αυτό σημαίνει ότι το νερό ως διαλύτης ανακτά περισσότερα στερεά σε σχέση με την ακετόνη.

Η συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες είναι ίση με 566 mg gallic acid/L, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση του ακετονικού εκχυλίσματος είναι 249 mg gallic acid/L. Η συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος σε ολικές φαινόλες εκφρασμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι ίση με 14,7 σε mg gallic acid/ g of material, η οποία είναι μεγαλύτερη της

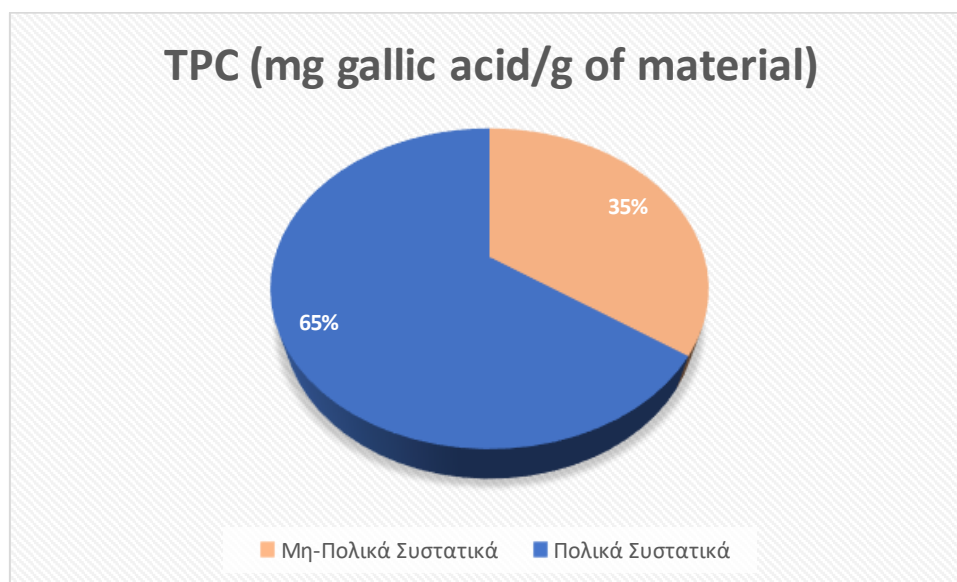
αντίστοιχης συγκέντρωσης για το ακετονικό εκχύλισμα (7,8 mg gallic acid/ g of material). Ωστόσο, η σχέση αυτή αναστρέφεται όταν το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά συστατικά εκφραστεί ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος, καθώς στο ακετονικό εκχύλισμα αντιστοιχούν 124 mg gallic acid/g TS και στο υδατικό 68 mg gallic acid/g TS. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στη διαφορά των δύο εκχυλίσεων ως προς τις αποδόσεις σε στερεά.

Συγκριτικά, το μέσο ολικό φαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίστηκε από τους Izzo et al. (2020) σε μεθανολικά εκχυλίσματα θηλυκών ανθών βιομηχανικής κάνναβης διαφορετικών ποικιλιών βρισκόταν στο διάστημα 26,2- 33,2 mg gallic acid/g of material. Ως προς τις αποδόσεις σε ολικά στερεά, οι Drinic et al. (2018) προσδιόρισαν την απόδοση εκχύλισης σε ολικά στερεά υδατικών εκχυλισμάτων στο 16,9 % (δηλαδή 169 mg TS/g of material) και αιθανολικών/ υδατικών εκχυλισμάτων (90% αιθανόλη) στο 8,16 % (δηλαδή 81,6 mg TS/g of material).

Επιπλέον, μπορεί να γίνει και χαρακτηρισμός ως προς τα ολικά φαινολικά συστατικά και την απόδοση σε στερεά συνολικά για τα πολικά και μη πολικά συστατικά συνολικά. Έτσι προκύπτει:

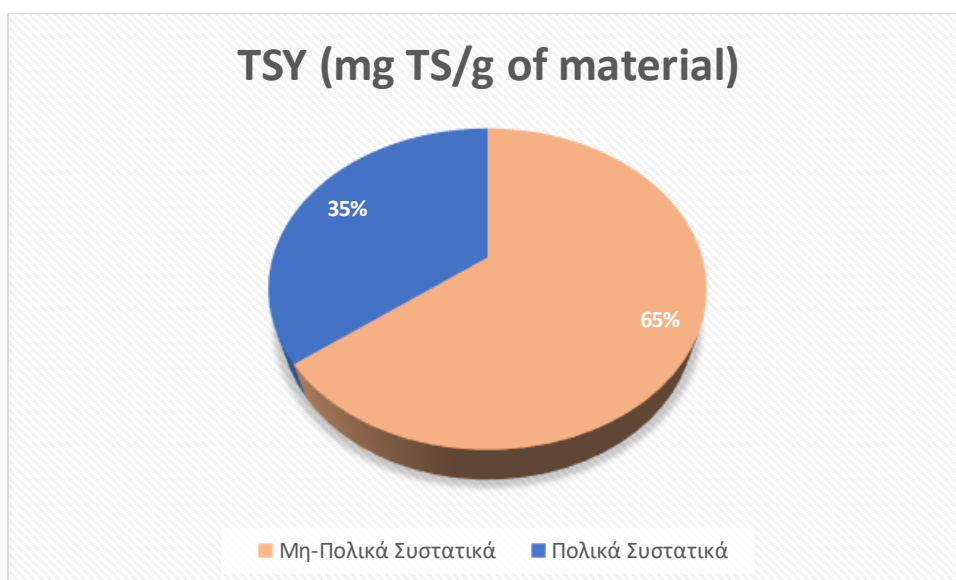
- TPC: 22,5 mg gallic acid/g of material
- TSY: 269 mg TS/g of material ή 26,9%.

Το ποσοστό συνεισφοράς του κάθε διαλύτη για κάθε χαρακτηριστικό μέγεθος αποτυπώνεται στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 6 και 7):



Διάγραμμα 6. Ποσοστό συνεισφοράς πολικών και μη πολικών συστατικών στη συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών (mg gallic acid/g of material).

Η υδατική εκχύλιση συνεισφέρει κατά 65% στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφρασμένο σε mg gallic acid/g of material. Αντίστοιχα, η ακετονική εκχύλιση συνεισφέρει κατά 35%.



Διάγραμμα 7. Ποσοστό συνεισφοράς πολικών και μη πολικών συστατικών στη ολική απόδοση σε στερεά (mg TS/g of material).

Η ακετονική εκχύλιση συνεισφέρει κατά 65% στην ολική απόδοση σε ολικά στερεά εκφρασμένη σε mg TS/ g of material. Αντίστοιχα, η υδατική εκχύλιση συνεισφέρει κατά 35%.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εκχυλίσματος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε ως αποτέλεσμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων συν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών.

Πίνακας 7. Αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) για τους δύο χρησιμοποιούμενους διαλύτες (ακετόνη και νερό).

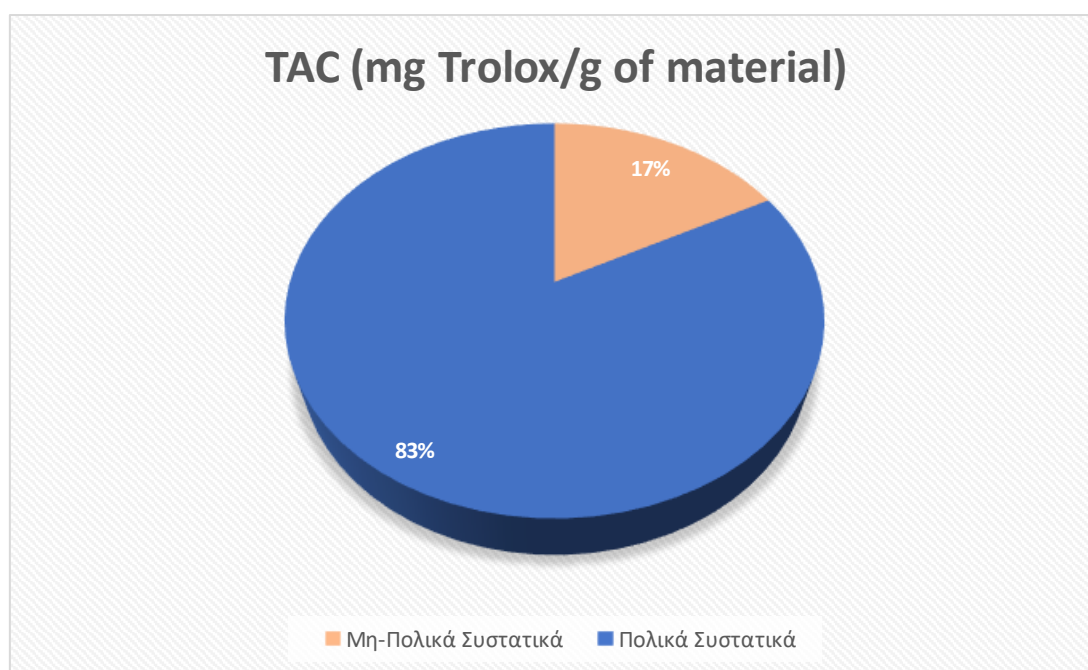
	Διαλύτης: Ακετόνη	Διαλύτης: Νερό
TAC (mg Trolox/L)	235 ± 5	992 ± 53
TAC (mg Trolox/g TS)	96 ± 5	119 ± 4
TAC (mg Trolox/g of material)	5,2 ± 0,2	25 ± 2

Η αντιοξειδωτική ικανότητα, εκφρασμένη ανά όγκο εκχυλίσματος, του υδατικού εκχυλίσματος είναι ίση με 992 mg Trolox/L , ενώ του ακετονικού εκχυλίσματος ίση με 235 mg Trolox/L. Η αντίστοιχη ιδιότητα εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος, είναι 119 mg Trolox/g TS για το υδατικό εκχύλισμα και 96 mg Trolox/g TS για το ακετονικό εκχύλισμα. Κατά τρίτον, η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mg Trolox/g of material, είναι ίση με 25 mg Trolox/g of material για το υδατικό εκχύλισμα και 5,2 mg Trolox/g of material για το ακετονικό εκχύλισμα.

Συγκριτικά, η μέση ολική αντιοξειδωτική δράση που προσδιορίστηκε από τους Izzo et al. (2020) σε μεθανολικά εκχυλίσματα θηλυκών ανθών βιομηχανικής κάνναβης διαφορετικών ποικιλιών βρισκόταν στο διάστημα 11,7- 15,9 mg Trolox/g of material.

Επιπλέον, μπορεί να γίνει και χαρακτηρισμός ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα για τα πολικά και μη πολικά συστατικά συνολικά. Έτσι προκύπτει ότι η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) είναι ίση με 30,2 mg Trolox/g of material.

Το ποσοστό συνεισφοράς του κάθε διαλύτη στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8:



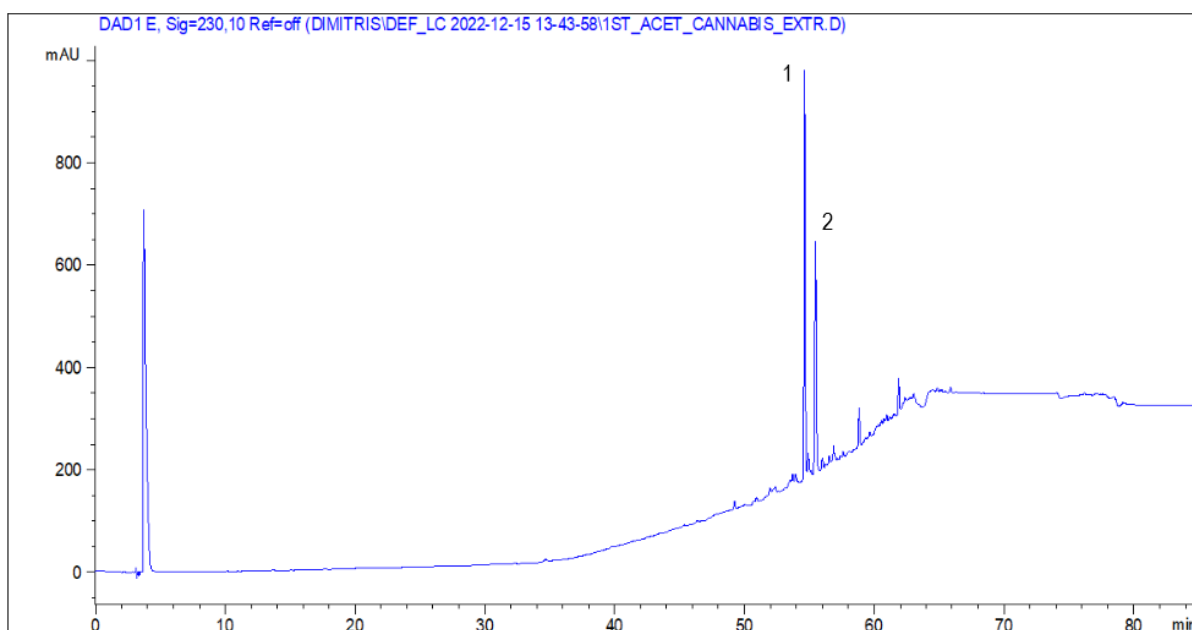
Διάγραμμα 8. Ποσοστό συνεισφοράς πολικών και μη πολικών συστατικών στη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (mg Trolox/g of material).

Η υδατική εκχύλιση συνεισφέρει κατά 83% στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mg Trolox/g of material. Αντίστοιχα, η ακετονική εκχύλιση συνεισφέρει κατά 17%.

4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης εκχυλισμάτων εξαντλητικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου HPLC-DAD

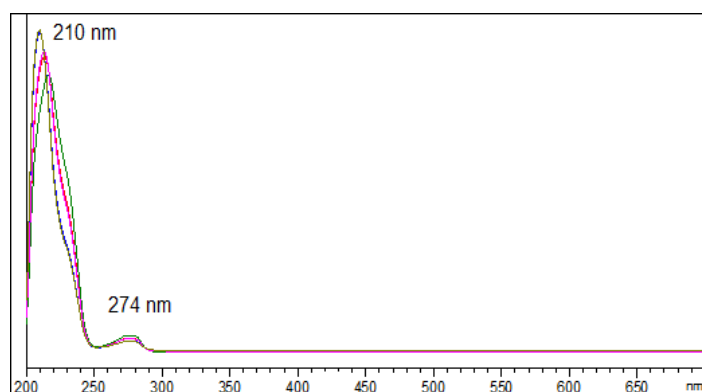
Τα εκχυλίσματα που λήφθηκαν από τις εξαντλητικές εκχυλίσεις με τη χρήση της ακετόνης και του νερού, αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD) για να ταυτοποιηθούν τα επιμέρους συστατικά τους, αλλά και να γίνουν οι ποσοτικοποιήσεις τους με βάση τις ήδη υπάρχουσες καμπύλες αναφοράς.

Παρακάτω παρουσιάζεται το χρωματογράφημα στα 230 nm μετά την ανάλυση του ακετονικού εκχυλίσματος (Εικόνα 19).

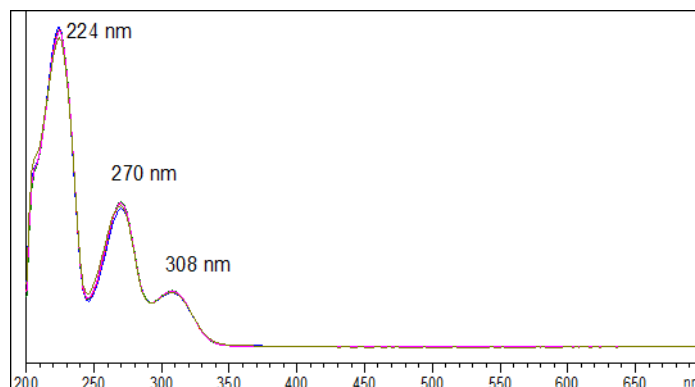


Εικόνα 19. Χρωματογράφημα ακετονικού εκχυλίσματος βιομηχανικής κάνναβης, με δύο κύριες κορυφές 1,2 (230 nm).

Η ακετόνη είναι ένας μη πολικός διαλύτης και εμφανίζει συγγένεια με την οικογένεια των κανναβινοειδών (όντας μη πολικά μόρια). Μετά την ανάλυση των ακετονικών εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου HPLC-DAD, παρατηρούνται δύο κύριες κορυφές 1,2 στο χρωματογράφημα των 230 nm. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί σε χρόνο έκλουσης 54,5 min και η δεύτερη σε χρόνο 55,3 min. Παρακάτω (Εικόνες 20,21) παρουσιάζονται τα δύο φάσματα που αντιστοιχούν στις δύο αυτές κορυφές:

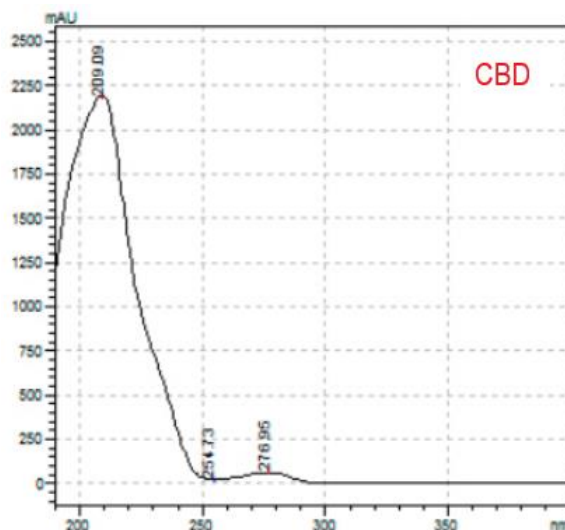


Εικόνα 20. Φάσμα απορρόφησης που αντιστοιχεί στην 1^η κορυφή (ακετονικό εκχύλισμα).



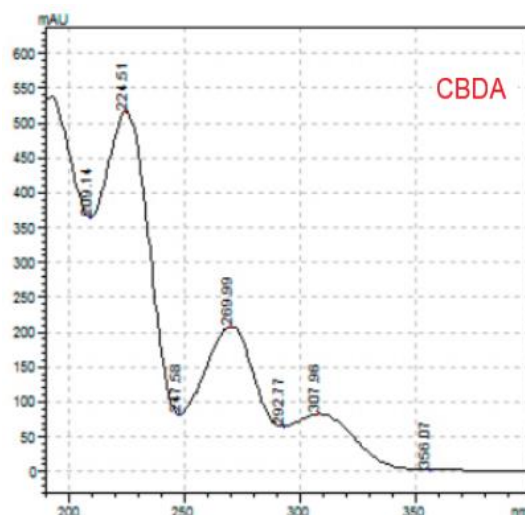
Εικόνα 21. Φάσμα απορρόφησης που αντιστοιχεί στην 2^η κορυφή (ακετονικό εκχύλισμα).

Βιβλιογραφικά, το φάσμα της Εικόνας 20 με κορυφές περίπου στα 210 και 274 nm, αντιστοιχεί σε αυτό της κανναβιδιόλης στο φάσμα του υπεριώδους (Ryu et al, 2021), το οποίο απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 22):



Εικόνα 22. Φάσμα απορρόφησης της κανναβιδιόλης (Ryu et al, 2021).

Το φάσμα της Εικόνας 21, με τρεις κορυφές περίπου στα 224, 270, 308 nm, αντιστοιχεί σε αυτό του κανναβιδιολικού οξέος στο φάσμα του υπεριώδους (Ryu et al, 2021), το οποίο απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Φάσμα απορρόφησης του κανναβιδιολικού οξέος (Ryu et al, 2021).

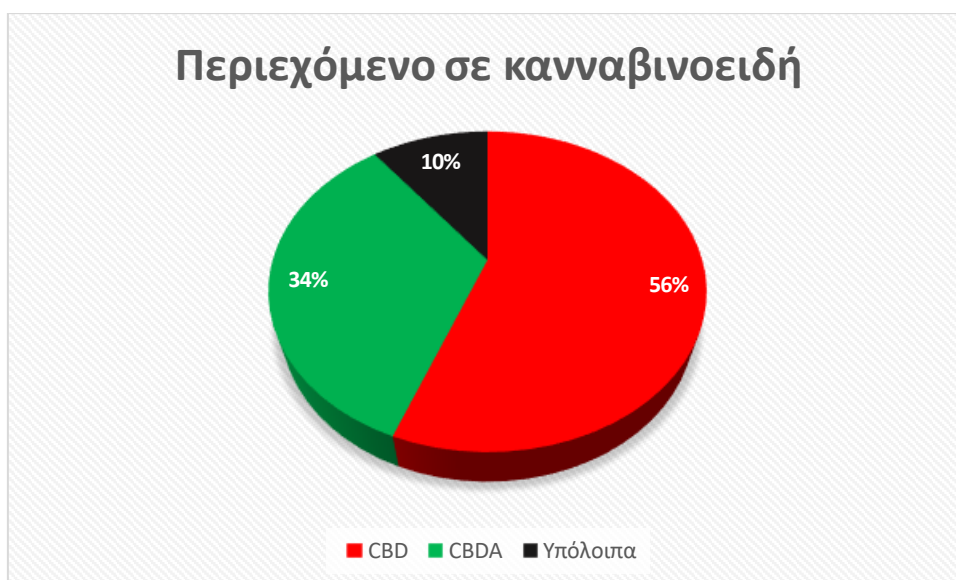
Η ποσοτικοποίηση των δύο κύριων κανναβινοειδών, καθώς και των λοιπών κανναβινοειδών τα οποία βρίσκονται σε ίχνη στο ακετονικό εκχύλισμα γίνεται σε ισοδύναμα κανναβιδιόλης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε ως αποτέλεσμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων συν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8):

Πίνακας 8. Ολικό περιεχόμενο σε κανναβινοειδή του ακετονικού εκχυλίσματος.

Cannabinoids' Content (mg CBD/L)	876 ± 93
Cannabinoids' Content (mg CBD/g TS)	329 ± 22
Cannabinoids' Content (mg CBD/g of material)	27 ± 4

Το ολικό περιεχόμενο του ακετονικού εκχυλίσματος σε κανναβινοειδή είναι 876 mg CBD/L. Για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν και προηγουμένως, χρησιμοποιούνται και άλλες εκφράσεις συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση των κανναβινοειδών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι 329 mg CBD/g TS, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι 27 mg CBD/g of material, δηλαδή 2,7% w/w. Η συγκέντρωση αυτή των κανναβινοειδών (2,7% w/w) περιλαμβάνεται στο διάστημα τιμών των δειγμάτων που μελετήθηκαν από τους Glivar et al. (2020), το οποίο ήταν 0,010- 8,108 % w/w.

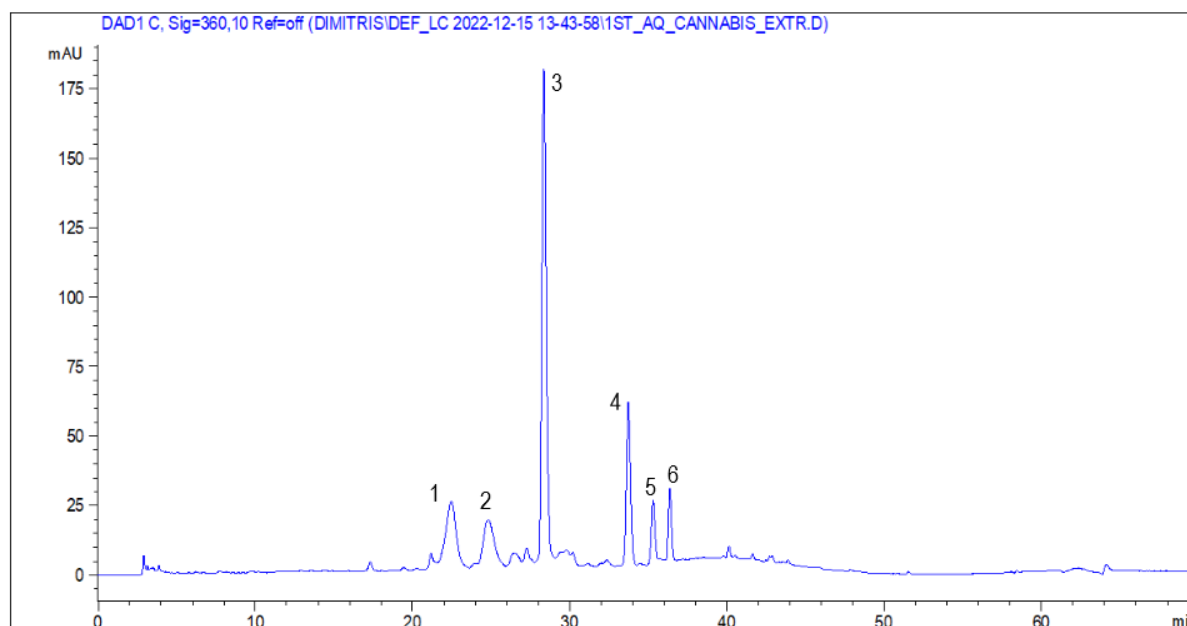
Η συνεισφορά των δύο κύριων συστατικών στο ολικό περιεχόμενο ανέρχεται στο 90%, με το 56% της συγκέντρωσης σε κανναβινοειδή να αντιστοιχεί στη παρουσία της κανναβιδιόλης (1,51 % w/w) και το 34% να αντιστοιχεί σε εκείνη του κανναβιδιολικού οξέος (0,92 % w/w) , οπότε ο λόγος CBD/CBDA είναι ίσος με 1,66. Το υπόλοιπο 10% αντιστοιχεί στην παρουσία άλλων μη- ταυτοποιημένων κανναβινοειδών τα οποία υπάρχουν σε μικροποσότητες- ίχνη (traces). Η κατανομή απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9. Κατανομή του περιεχομένου σε κανναβινοειδή του ακετονικού εκχυλίσματος.

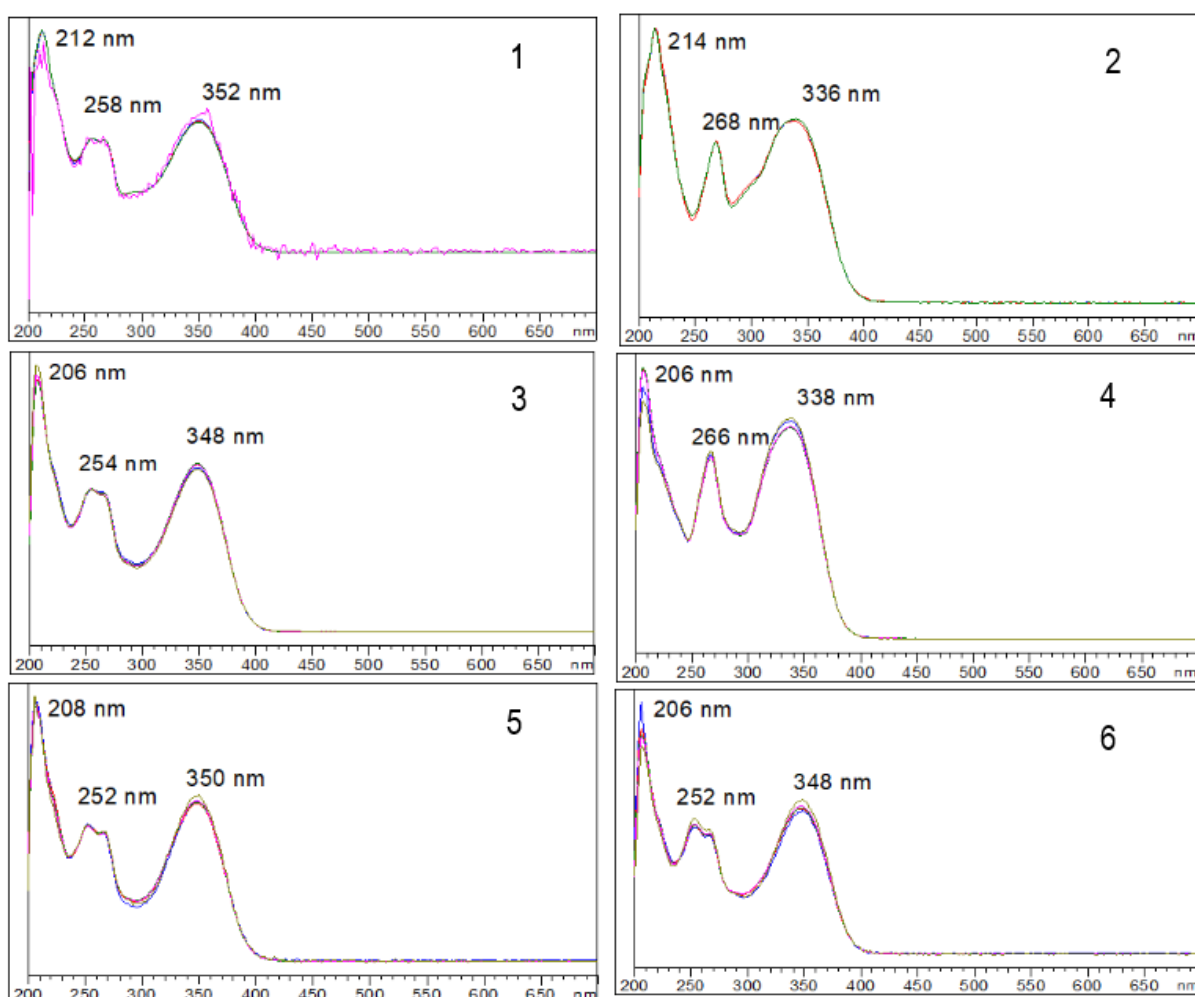
Οι Gilvar et al. (2020) προσδιόρισαν τη συγκέντρωση του κανναβιδιολικού οξέος και της κανναβιδιόλης σε δείγματα φύλλων βιομηχανικής κάνναβης της ποικιλίας Finola. Οι τιμές των συγκεντρώσεων ήταν 1,409 % w/w (CBDA) και 1,545 % w/w (CBD), ενώ το ολικό περιεχόμενο σε κανναβινοειδή βρέθηκε ίσο με 2,781 % w/w, τιμή που βρίσκεται σε αντίστοιχα επίπεδα με το 2,7 % w/w που προσδιορίστηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας.

Παρακάτω παρουσιάζεται το χρωματογράφημα στα 360 nm μετά την ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος (Εικόνα 24):



Εικόνα 24. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος βιομηχανικής κάνναβης, με έξι κύριες κορυφές 1-6. (360 nm)

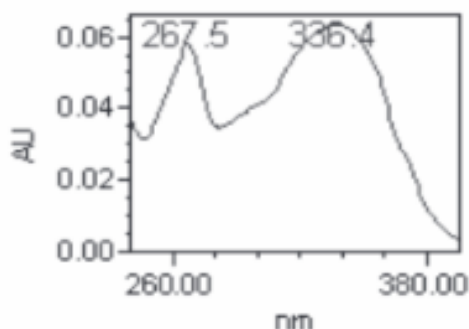
Μετά την ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων μέσω της μεθόδου HPLC-DAD, παρατηρούνται έξι κύριες κορυφές 1-6 στο χρωματογράφημα των 360 nm. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί σε χρόνο έκλουσης 22,4 min, η δεύτερη σε χρόνο 24,7 min, η τρίτη σε 28,4 min, η τέταρτη σε 33,7 min, η πέμπτη σε 35,7 min και η έκτη σε 36,4 min. Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται τα φάσματα που αντιστοιχούν σε αυτές τις έξι κορυφές. Αποτελούν τυπικά φάσματα φλαβονοειδών από την υποκατηγορία των φλαβονών (Τσιμογιάννης, 2008).



Εικόνα 25. Φάσματα απορρόφησης που αντιστοιχούν στις έξι κορυφές (υδατικό εκχύλισμα).

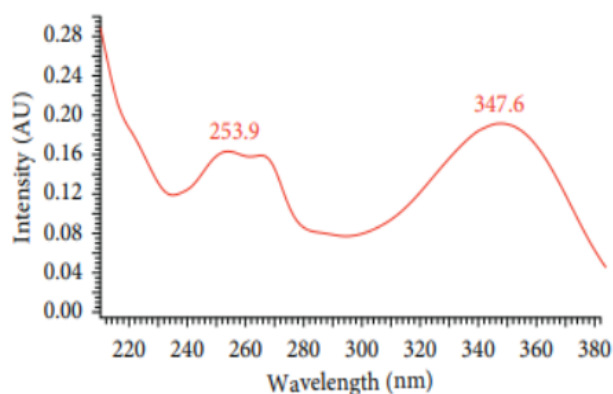
Βιβλιογραφικά, το 2^ο φάσμα της Εικόνας 23 με κορυφές περίπου στα 214, 268 και 336 nm αντιστοιχεί σε αυτό της βιτεξίνης (8-β-D-glucopyranosyl-arigenin), η οποία αποτελεί

γλυκοζίτη της απιγενίνης. Το φάσμα απορρόφησης (Reimberg et al., 2009) απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 26):



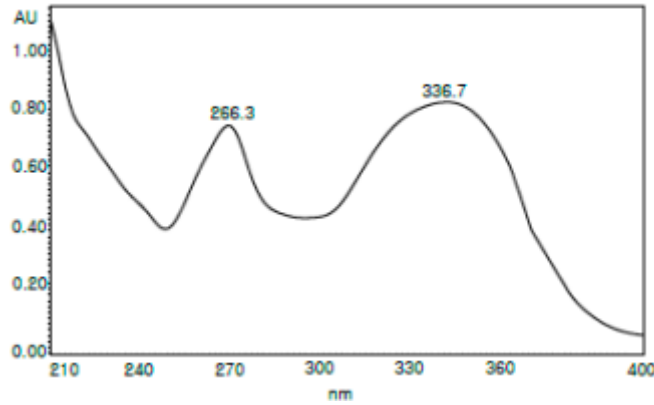
Εικόνα 26. Φάσμα απορρόφησης της βιτεξίνης (Reimberg et al., 2009).

Το 3^ο φάσμα της Εικόνας 25 με κορυφές περίπου στα 206, 254 και 348 nm αντιστοιχεί σε αυτό του γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης (luteolin 7-O-β glucuronide), ουσία η οποία σύμφωνα με τους Murai et al. (2009) εμφανίζει τις δύο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος στα 255 και 347 nm. Το συγκεκριμένο φάσμα δεν βρέθηκε ως εικόνα στη βιβλιογραφία. Παρουσιάζεται όμως, για συγκριτικούς λόγους, το φάσμα του αντίστοιχου γλυκοζίτη της λουτεολίνης (7-O-β-D-luteolin glucoside). Το φάσμα απορρόφησης (Xue et al., 2021) απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 27):



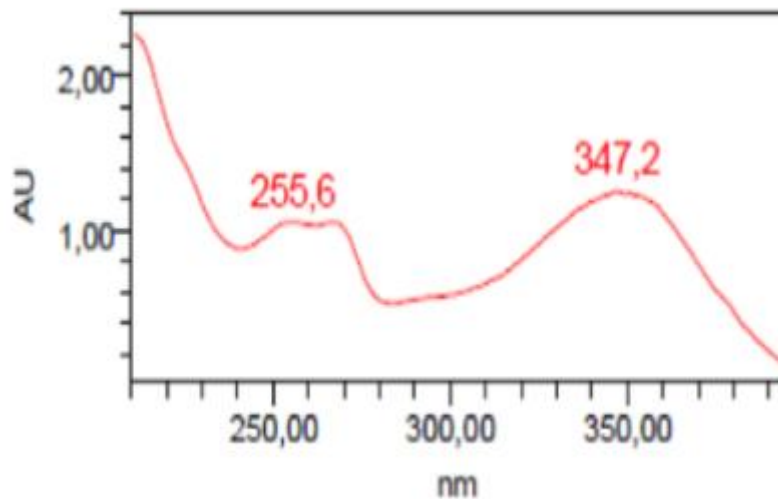
Εικόνα 27. Φάσμα απορρόφησης του γλυκοζίτη της λουτεολίνης (7-O-β-D-luteolin glucoside) (Xue et al., 2021).

Το 4^ο φάσμα της Εικόνας 25 με κορυφές περίπου στα 206, 266 και 338 nm αντιστοιχεί σε αυτό του γλυκουρονιδίου της απιγενίνης (arigenin 7-O-β glucuronide), ουσία η οποία σύμφωνα με τους Murai et al. (2009) εμφανίζει τις δύο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος στα 268 και 334 nm. Για συγκριτικούς σκοπούς ως προς τη μορφή του φάσματος, παρατίθεται και το φάσμα του διγλυκουρονιδίου της απιγενίνης (arigenin 7-O-β diglucuronide). Το φάσμα απορρόφησης (Kim et al., 2018) απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 28):



Εικόνα 28. Φάσμα απορρόφησης του διγλυκουρονιδίου της απιγενίνης (*apigenin 7-O-β diglucuronide*) (Kim et al., 2018) .

Το 6^ο κατά σειρά φάσμα της Εικόνας 25 με κορυφές περίπου στα 206, 252 και 348 nm αντιστοιχεί σε αυτό της οριεντίνης (8-β-D-glucopyranosyl-luteolin), η οποία αποτελεί γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Το φάσμα απορρόφησης (Reis et al., 2020) απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 29):



Εικόνα 29. Φάσμα απορρόφησης της οριεντίνης (Reis et al., 2020).

Η παρουσία των φλαβονοειδών της βιτεξίνης, του γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης, του γλυκουρονιδίου της απιγενίνης και της οριεντίνης σε εκχυλίσματα μεθανόλης- νερού του φυτού της βιομηχανικής κάνναβης παρατηρήθηκε από τους Vanhoenacker et al. (2002).

Τα φάσματα 1 και 5 (Εικόνα 25) αντιστοιχούν σε ουσίες για τις οποίες δεν έχει γίνει ταυτοποίηση. Ωστόσο, η ομοιότητα στην μορφή των φασμάτων με εκείνο της οριεντίνης (γλυκοζίτη της λουτεολίνης) και του γλυκουρονιδίου της λουτεολίνης υποδηλώνει ότι η αγλυκόνη του συγκεκριμένου φλαβονοειδούς κατά πάσα πιθανότητα ταυτίζεται με τη λουτεολίνη.

Η ποσοτικοποίηση των παραπάνω φλαβονοειδών και ορισμένων ιχνών τα οποία επίσης υπάρχουν στο υδατικό εκχύλισμα γίνεται σε ισοδύναμα ρουτίνης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε ως αποτέλεσμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων συν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9):

Πίνακας 9. Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή του υδατικού εκχυλίσματος.

Flavonoids' Content (mg rutin/L)	515 ± 71
Flavonoids' Content (mg rutin/g TS)	62 ± 5
Flavonoids' Content (mg rutin/g of material)	13,2 ± 1,9

Το ολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή είναι 515 mg rutin/L. Η συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι 62 mg rutin/g TS, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι 13,2 mg rutin/g of material, δηλαδή 1,32% w/w.

Το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή υδατικών εκχυλισμάτων ανθών βιομηχανικής κάνναβης βρέθηκε ίσο με 12,51 mg rutin/g of material από τους Motiejauskaite et al. (2023).

Η συνεισφορά των ουσιών που ταυτοποιήθηκαν στο ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή ανέρχεται σε ποσοστό ίσο με 80%. Το 47% της συγκέντρωσης σε φλαβονοειδή αντιστοιχεί στο γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης, το 17% αντιστοιχεί στο γλυκουρονίδιο της απιγενίνης, το 11% στη βιτεξίνη και το 5% στην οριεντίνη. Το υπόλοιπο 20% αντιστοιχεί στην παρουσία άλλων μη- ταυτοποιημένων φλαβονοειδών τα οποία υπάρχουν σε μικροποσότητες- ίχνη (traces). Η κατανομή αυτή απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 10).

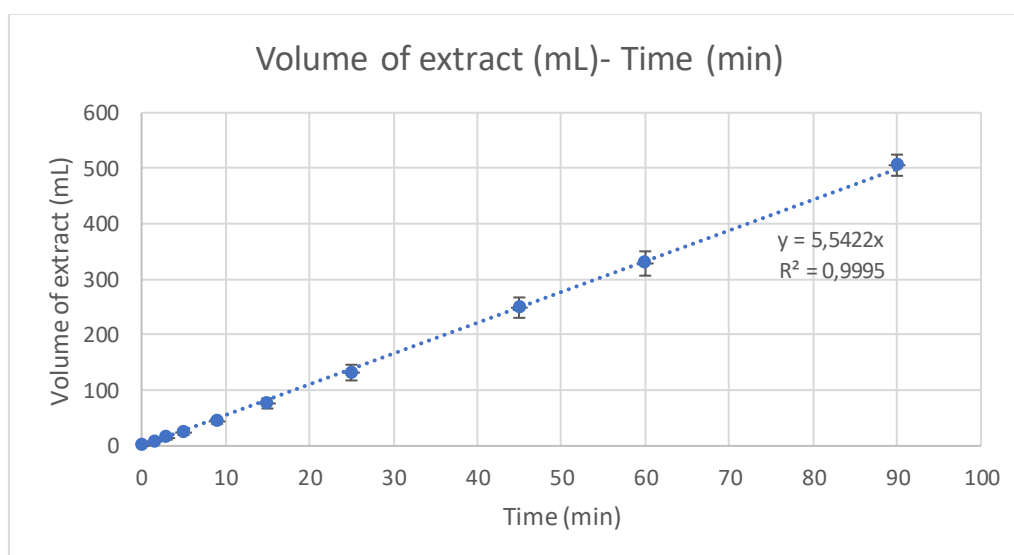


Διάγραμμα 10. Κατανομή του περιεχομένου σε φλαβονοειδή του υδατικού εκχυλίσματος.

4.5 Κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης

4.5.1 Κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών

Για την κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης ακολουθήθηκε η μεθοδολογία κινητικής μελέτης ανοιχτού συστήματος που αναλύθηκε προηγουμένως στο πειραματικό μέρος. Η δειγματοληψία του φρέσκου ακετονικού εκχυλίσματος έγινε σε προκαθορισμένους χρόνους. Συγκεκριμένα, οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν στα: 0–1,5–3–5–9–15–25–45–60–90 min της εκχύλισης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε κάθε σημείο των Διαγραμμάτων 11-15 αντιστοιχεί στον αντίστοιχο μέσο όρο των δύο μετρήσεων. Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται ο όγκος του συνολικού εκχυλίσματος (mL) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 11):

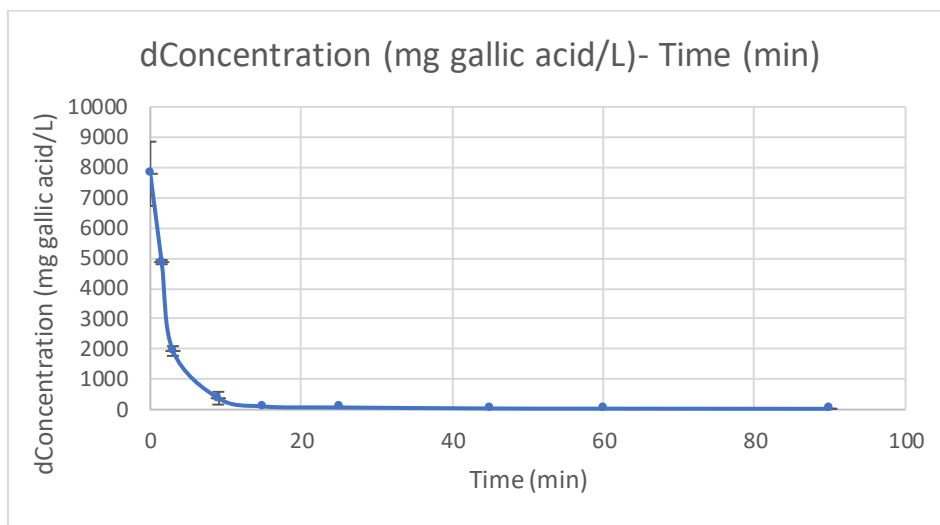


Διάγραμμα 11. Όγκος του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Αυτό που παρατηρείται είναι ότι ο όγκος του συνολικού εκχυλίσματος αυξάνεται γραμμικά συναρτήσει του χρόνου σύμφωνα με τη σχέση $y=5,5422 \cdot x$ με συντελεστή προσαρμογής $R^2 = 0,9995$. Η κλίση του παραπάνω διαγράμματος (Διάγραμμα 11) αντιπροσωπεύει το ρυθμό εκροής του εκχυλίσματος (η οποία ισοδυναμεί με την ροή εισόδου του διαλύτη), ο οποίος είναι σταθερός και περίπου ίσος με 5,5 mL/min.

Τα δείγματα που έχουν παραληφθεί με την κωδικοποιημένη δειγματοληψία αλλά και από το συνολικό τελικό εκχύλισμα αραιώνονται καταλλήλως και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανάλυση μέσω της μεθόδου Folin- Ciocalteu. Για παράδειγμα, το δείγμα που αντιστοιχεί σε

χρόνο εκχύλισης 0 min αραιώθηκε σε συγκέντρωση C/10 για την ανάλυση του. Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της στιγμιαίας (για κάθε χρονική στιγμή) συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (mg gallic acid/L) σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12. Στιγμιαία συγκέντρωση του ακετονικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Αυτό που παρατηρείται είναι ότι για αρχικούς χρόνους εκχύλισης τα στιγμιαία ακετονικά εκχυλίσματα είναι πυκνά σε ολικά φαινολικά συστατικά (άρα και κανναβινοειδή) που αντιστοιχούν σε μεγάλες τιμές συγκέντρωσης σε mg gallic acid/L. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, η πρώτη ύλη απογυμνώνεται από τα φαινολικά συστατικά και τα στιγμιαία εκχυλίσματα γίνονται όλο και πιο αραιά. Στα τελικά στάδια της εκχύλισης η συγκέντρωση προσεγγίζει την τιμή 0.

Η συγκέντρωση που έχει υπολογιστεί μέχρι στιγμής αντιστοιχεί στη στιγμιαία συγκέντρωση του εκχυλίσματος. Προκειμένου να βρεθεί η συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος κάθε χρονική στιγμή ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα (Μέθοδος των Τραπεζίων):

- Αρχικά υπολογίζεται το μέγεθος dConcentration (mg gallic acid/g of material). Για τον υπολογισμό αυτόν, απαραίτητη είναι η γνώση της αραιώσης που έχει γίνει προηγουμένως στο δείγμα ανάλυσης. Με αυτή τη γνώση, υπολογίζεται ο πραγματικός όγκος του αρχικού στιγμιαίου εκχυλίσματος που υποβάλλεται σε ανάλυση, αφού είναι καθορισμένο μέσω της μεθοδολογίας Folin-Ciocalteu ότι χρησιμοποιείται 0,1 mL ή 100 μ L (αραιωμένου) δείγματος. Για παράδειγμα, για την αραιώση C/10 του χρόνου 0 min, ο πραγματικός όγκος (V_{sample} - μ L) του χρησιμοποιούμενου-για την ανάλυση- στιγμιαίου (0 min) εκχυλίσματος είναι $0,1 \text{ mL}/10 = 0,01 \text{ mL}$ ή 10 μ L. Ένα δεύτερο μέγεθος το οποίο χρησιμοποιείται είναι η μάζα της πρώτης ύλης (Material-g) που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση, η οποία είναι ίση με 20 g για την περίπτωση αυτή. Σειρά έχει ο υπολογισμός:

$$d\text{Concentration (mg gallic acid/g of material)} = \frac{d\text{Concentration (mg gallic acid/L)} * V_{\text{sample}} (\mu\text{L}) * 10^{-6}}{\text{Material (g)}}$$

- b. Στη συνέχεια υπολογίζεται το μέγεθος dC/dV (mg gallic acid/L/g of material) που εκφράζει την παράγωγο της συνάρτησης της συγκέντρωσης $d\text{Concentration}$ (mg gallic acid/g of material) ως προς τον όγκο V_{sample} (L). Ο υπολογισμός που γίνεται είναι ο εξής:

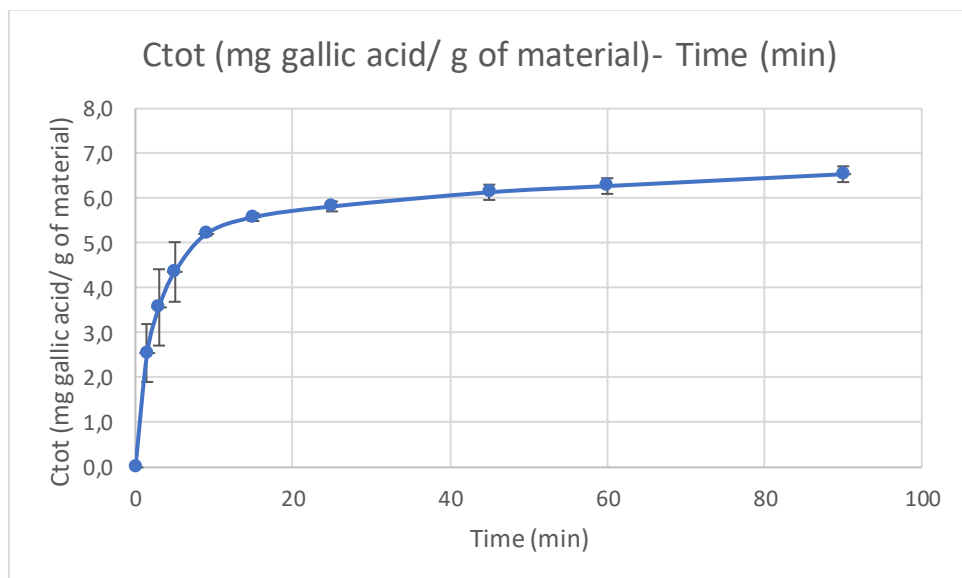
$$dC/dV \text{ (mg gallic acid/ L /g of material)} = \frac{d\text{Concentration (mg gallic acid/L)} * 10^6}{V_{\text{sample}} (\mu\text{L})}$$

- c. Ο υπολογισμός του εμβαδού E μεταξύ της γραφικής παράστασης dC/dV (mg gallic acid/L/g of material)- συνολικός όγκος του εκχυλίσματος V (L) και της ευθείας X των αξόνων για κάθε δύο διαδοχικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας αντιστοιχεί στη συγκέντρωση εκχυλίσματος που ανακτάται στο διάστημα αυτό. Ο υπολογισμός του εμβαδού αυτού γίνεται με τη μέθοδο των τραπεζίων. Αν γίνουν οι συμβολισμοί $H_0, H_{1,5}$ κ.ο.κ. για την τιμή του μεγέθους dC/dV , $V_0, V_{1,5}$ κ.ο.κ. για την τιμή του συνολικού όγκου συλλεχθέντος εκχυλίσματος κάθε χρονική στιγμή, τότε αντιστοίχως :

$$E_{1,5} \text{ (mg gallic acid/ g of material)} = (H_{1,5} + H_0) * (V_{1,5} - V_0) * 10^{-3} / 2 \text{ κ.ο.κ.}$$

- d. Αν συμβολιστεί η συγκέντρωση που ανακτάται μεταξύ 0 και 1,5 min ως $C_{1,5}$, μεταξύ 1,5 και 3 min ως C_3 κ.ο.κ., τότε για παράδειγμα η συνολική στιγμιαία συγκέντρωση στα 15 min της εκχύλισης θα είναι C_{15} (mg gallic acid/g of material) = $E_{1,5} + E_3 + E_5 + E_9 + E_{15} = C_9 + E_{15}$. Αντιστοίχως, η συνολική στιγμιαία συγκέντρωση υπολογίζεται για οποιοδήποτε άλλο σημείο.

Μετά από την εφαρμογή των παραπάνω βημάτων προκύπτει η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα της στιγμιαίας συγκέντρωσης του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} (mg gallic acid/ g of material) σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 13):



Διάγραμμα 13. Στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

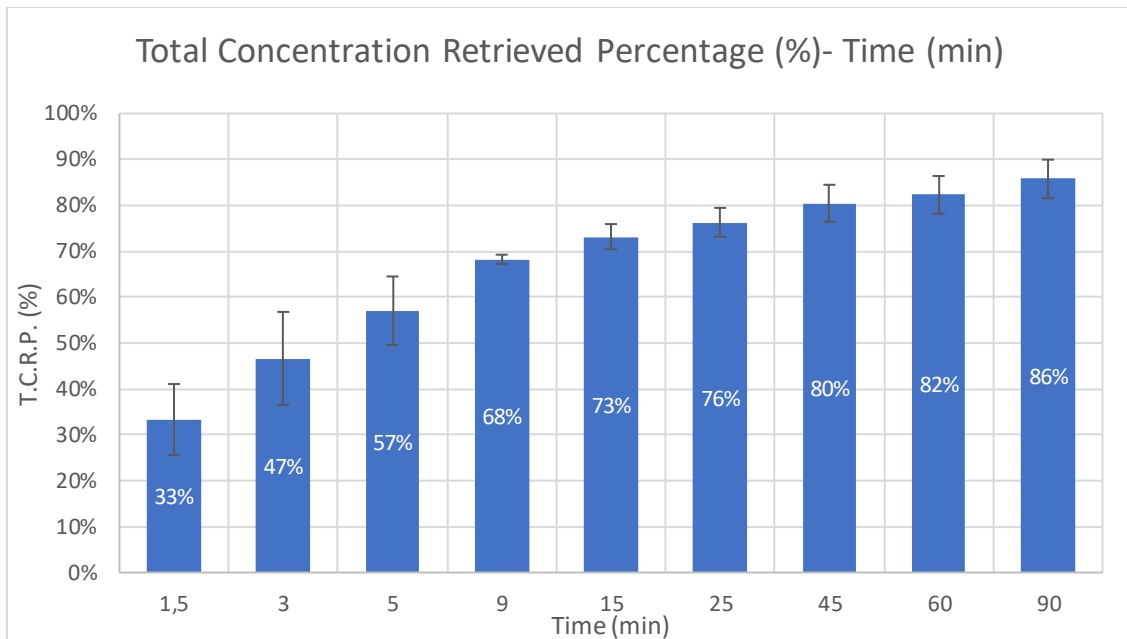
Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Επισημαίνεται ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε ως αποτέλεσμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων συν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών.

Πίνακας 10. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και Απόδοση σε Ολικά Στερεά (TSY) του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη ακετονική εκχύλιση.

TSY (mg TS/g of material)	48,5 ± 0,6
TPC (mg gallic acid/ L)	296 ± 4
TPC (mg gallic acid/ g TS)	153 ± 1
TPC (mg gallic acid/ g of material)	7,6 ± 0,2

Η απόδοση της συγκεκριμένης εκχύλισης σε ολικά στερεά είναι 48,5 mg TS/g of material ή 4,85%. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του ακετονικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι 296 mg gallic acid/L. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι 153 mg gallic acid/g TS, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι 7,6 mg gallic acid/g of material.

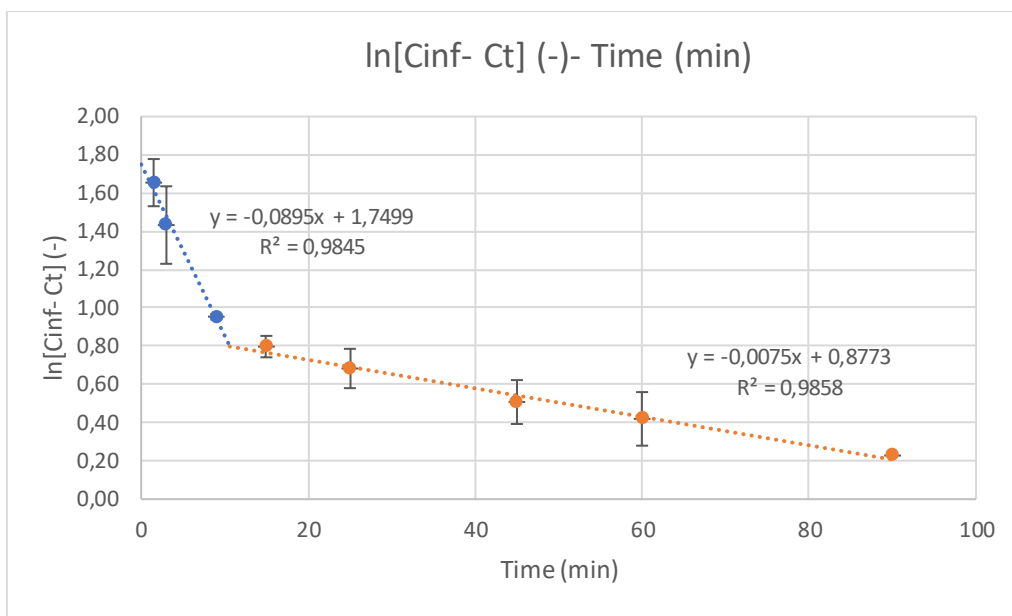
Το ποσοστό (%) της συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (το 100% αντιστοιχεί στη συγκέντρωση C= 7,6 mg gallic acid/g of material- Πίνακας 10) που ανακτάται κάθε χρονική στιγμή συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) παρουσιάζεται παρακάτω (Διάγραμμα 14):



Διάγραμμα 14. Ποσοστό της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών που ανακτάται (Total Concentration Retrieved Percentage- T.C.R.P.) (%) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Αυτό που παρατηρείται είναι η ανάκτηση της «διαθέσιμης» συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών κατά 68% σε χρόνο 9 λεπτών, ή η ανάκτηση τους σε ποσοστό 73% σε χρονικό διάστημα 15 λεπτών.

Επόμενο βήμα είναι η προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης στο 2^ο νόμο του Fick (Εξίσωση 1). Ως C_{inf} χρησιμοποιείται η τιμή συγκέντρωσης 7,8 mg gallic acid/ g of material, που προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος εξαντλητικής ακετονικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου Folin- Ciocalteu (Πίνακας 6). Προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα $\ln[C_{inf} - C_t]$ (-) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 15):



Διάγραμμα 15. Προσαρμογή της κινητικής ακετονικής εκχύλισης των φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Παρατηρείται ένα προφίλ δύο διαφορετικών κινητικών. Η πρώτη «γρήγορη» κινητική (μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή κλίση της ευθείας) αντιστοιχεί στο στάδιο της έκπλυσης (μπλε διακεκομμένη γραμμή). Στο στάδιο αυτό εκχυλίζονται οι άμεσα προσβάσιμες μη πολικές ουσίες, δηλαδή από τις εξωτερικές θέσεις κάθε σωματιδίου της πρώτης ύλης. Η δεύτερη «αργή» κινητική (μικρότερη κατά απόλυτη τιμή κλίση της ευθείας) αντιστοιχεί στο στάδιο της διάχυσης της διαλυμένης ουσίας που βρίσκεται στο εσωτερικό του φυτικού ιστού (πορτοκαλί διακεκομμένη γραμμή).

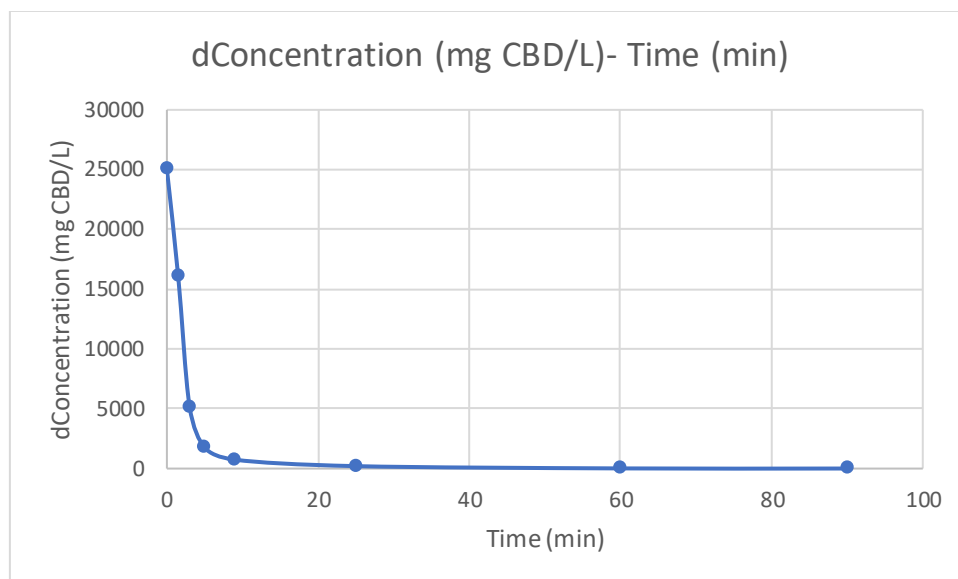
Οι δύο κινητικές προσαρμόζονται σε γραμμικά μοντέλα με συντελεστές προσαρμογής 0,9845 και 0,9858 αντίστοιχα. Οι σταθερές των ρυθμών είναι $k_1=0,0895 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της έκπλυσης και $k_2=0,0075 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της διάχυσης, με τον λόγο $k_1/k_2= 11,9$.

Το χρονικό σημείο τομής των δύο κινητικών ονομάζεται χρόνος έκπλυσης (leaching time) (min) και ισούται με 10,6 min, ενώ η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} στην έναρξη του 2^{ου} σταδίου είναι ίση με 5,58 mg gallic acid/g of material. Επομένως, στο χρόνο αυτό έχει εκχυλιστεί το 71,5% της ολικής συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά.

4.5.2 Κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης των κανναβινοειδών

Επιλεγμένα δείγματα από τη δειγματοληψία που έγινε προηγουμένως αναλύθηκαν και μέσω της μεθόδου HPLC-DAD. Σκοπός είναι η κινητική μελέτη της εκχύλισης των κανναβινοειδών. Συγκεκριμένα, προς ανάλυση οδηγούνται τα δείγματα που αντιστοιχούν σε χρόνους εκχύλισης: : 0–1,5–3–5–9–25–60–90 min.

Η στιγμιαία συγκέντρωση του ακετονικού εκχυλίσματος σε κανναβινοειδή (mg CBD/L) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) απεικονίζεται στο Διάγραμμα 16.



Διάγραμμα 16. Η στιγμιαία παραλαμβανόμενη συγκέντρωση ακετονικού εκχυλίσματος σε κανναβινοειδή (μέσω ανάλυσης HPLC) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης.

Η εκχύλιση των κανναβινοειδών ακολουθεί αντίστοιχη πορεία με εκείνη των ολικών φαινολικών συστατικών. Για αρχικούς χρόνους εκχύλισης, τα στιγμιαία εκχυλίσματα έχουν υψηλές συγκεντρώσεις σε κανναβινοειδή που αντιστοιχούν σε μεγάλες τιμές συγκέντρωσης σε mg CBD/L. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, η στιγμιαία συγκέντρωση των παραγόμενων εκχυλισμάτων γίνεται όλο και χαμηλότερη προσεγγίζοντας την τιμή 0.

Η στιγμιαία συγκέντρωση του ολικού ακετονικού εκχυλίσματος σε κανναβινοειδή υπολογίζεται μέσω της Μεθόδου των Τραπεζίων που αναλύθηκε παραπάνω.

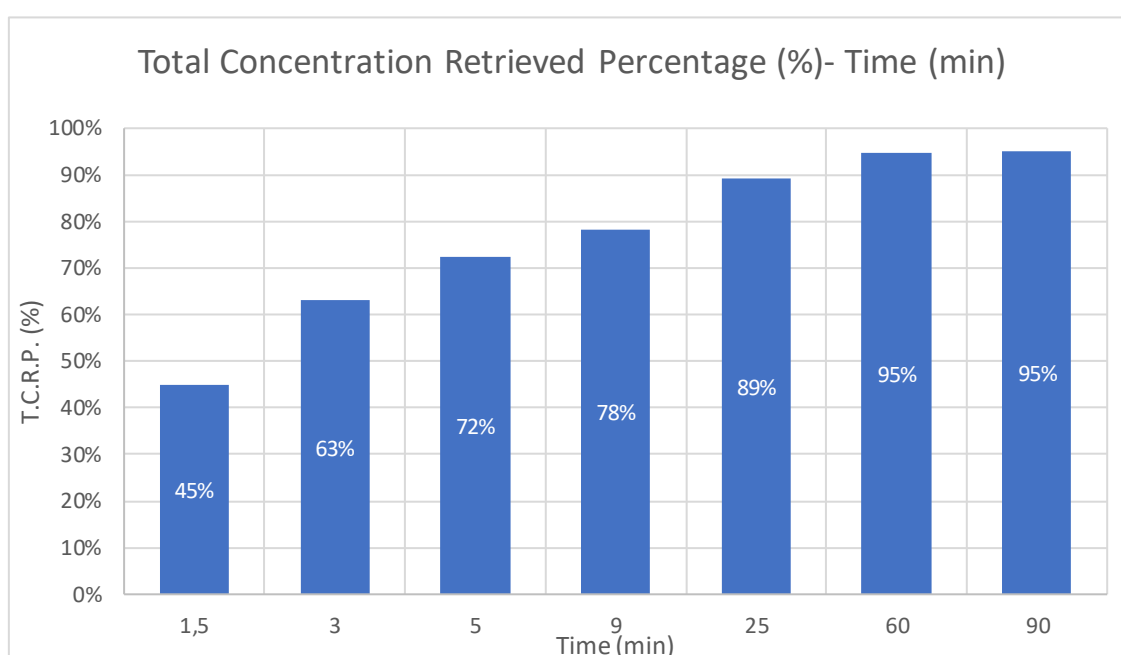
Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα (Πίνακας 11):

Πίνακας 11. Ολικό περιεχόμενο σε κανναβινοειδή του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη ακετονική εκχύλιση.

Cannabinoids' Content (mg CBD/ L)	779
Cannabinoids' Content (mg CBD/ g TS)	414
Cannabinoids' Content (mg CBD/ g of material)	20,5

Το ολικό περιεχόμενο του ακετονικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι 779 mg CBD/L. Η συγκέντρωση των ολικών κανναβινοειδών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι 414 mg CBD/g TS, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι 20,5 mg CBD/g of material.

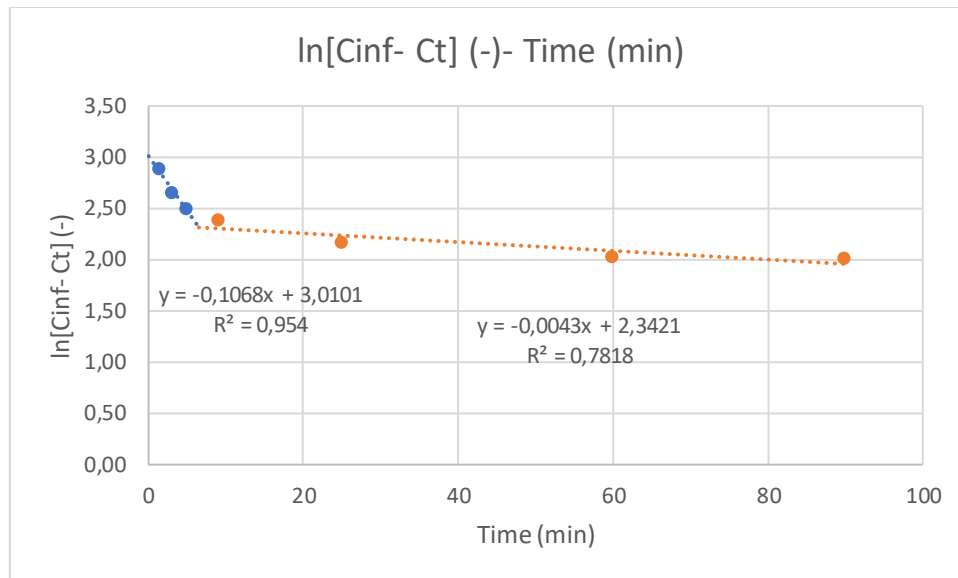
Το ποσοστό (%) της συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε κανναβινοειδή (το 100% αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του συνολικού τελικού εκχυλίσματος C= 20,5 mg CBD/g of material- Πίνακας 11) που ανακτάται κάθε χρονική στιγμή συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) παρουσιάζεται παρακάτω:



Διάγραμμα 17. Ποσοστό της συγκέντρωσης κανναβινοειδών που ανακτάται (Total Concentration Retrieved Percentage- T.C.R.P.) (%) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min).

Αυτό που παρατηρείται είναι η ανάκτηση της τελικής συγκέντρωσης των κανναβινοειδών επιτυγχάνεται κατά 78% σε χρόνο 9 λεπτών.

Ακολουθεί η προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης των κανναβινοειδών στο 2^ο νόμο του Fick (Εξίσωση 1). Ως C_{inf} χρησιμοποιείται η τιμή συγκέντρωσης 27,0 mg CBD/g of material, που προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος της εξαντλητικής ακετονικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου HPLC-DAD. Προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα $\ln[C_{inf} - C_t]$ (-) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 18):



Διάγραμμα 18. Προσαρμογή της κινητικής ακετονικής εκχύλισης των κανναβινοειδών (μέσω ανάλυσης HPLC) στον 2^ο νόμο του Fick.

Σε αντιστοιχία με την εικόνα που λήφθηκε μέσω του προσδιορισμού των ολικών φαινολικών συστατικών, παρατηρείται ξανά ένα προφίλ δύο διαφορετικών κινητικών.

Οι δύο κινητικές προσαρμόζονται σε γραμμικά μοντέλα με συντελεστές προσαρμογής 0,954 και 0,7818 αντίστοιχα. Ο συντελεστής προσαρμογής για τη δεύτερη κινητική είναι σε χαμηλό επίπεδο. Αυτό είναι σύνηθες σε περιπτώσεις που η ευθεία έχει πολύ μικρή κλίση. Οι σταθερές των ρυθμών είναι $k_1=0,1068 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της έκπλυσης και $k_2=0,0043 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της διάχυσης, με τον λόγο $k_1/k_2= 24,8$.

Ο χρόνος έκπλυσης (leaching time) (min) ισούται με 6,5 min, ενώ η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} κατά την έναρξη του 2^{ου} σταδίου είναι ίση με 16,1 mg CBD/g of material. Επομένως, στο χρόνο αυτό έχει εκχυλιστεί το 78,5% της ολικής συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε κανναβινοειδή.

Αυτό που παρατηρείται είναι ότι:

- α) η σταθερά του ρυθμού k_1 της πρώτης κινητικής είναι μεγαλύτερη (κατά απόλυτη τιμή) κατά την εκχύλιση των κανναβινοειδών σε σχέση με την εκχύλιση των ολικών φαινολικών.
- β) η σταθερά του ρυθμού k_2 της δεύτερης κινητικής είναι μικρότερη (κατά από απόλυτη τιμή) κατά την εκχύλιση των κανναβινοειδών σε σχέση με την εκχύλιση των ολικών φαινολικών.

Η διαφοροποίηση αυτή αποτυπώνεται εντονότερα στους λόγους k_1/k_2 για τις δύο περιπτώσεις. Ο λόγος k_1/k_2 εκφράζει το πόσο ταχύτερο είναι το στάδιο της έκπλυσης από εκείνο της διάχυσης. Ο λόγος k_1/k_2 είναι 11,9 για την περίπτωση της εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών, την ίδια ώρα που το ίδιο μέγεθος για την εκχύλιση των κανναβινοειδών ισούται με 24,8.

Ως συμπέρασμα, εξάγεται ότι η εκχύλιση των κανναβινοειδών ολοκληρώνεται γρηγορότερα σε σύγκριση με των ολικών φαινολικών συστατικών. Συγκεκριμένα, η εκχύλιση των διαθέσιμων κανναβινοειδών ολοκληρώνεται κατά 78,5% στο τέλος του σταδίου της

έκπλυσης (σε χρόνο 6,5 min), ενώ η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών ολοκληρώνεται κατά 71,5% στο τέλος του σταδίου της έκπλυσης (σε χρόνο 10,6 min).

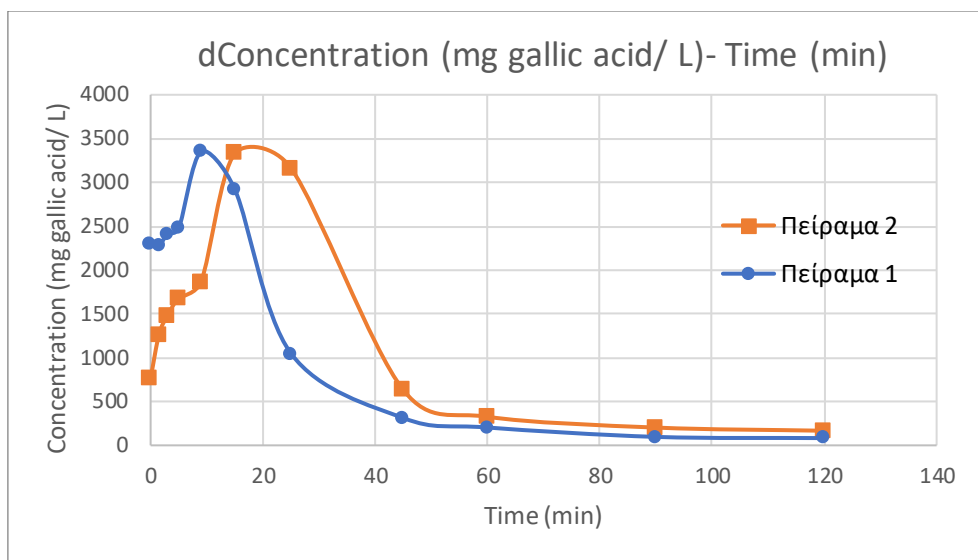
Γενικά η εκχύλιση των κανναβινοειδών από την ακετόνη περιγράφεται με καλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα των αναλύσεων HPLC-DAD που αφορούν εκλεκτικά στα κανναβινοειδή, γεγονός αναμενόμενο. Η ανάλυση Folin-Ciocalteu για τις ολικές φαινόλες είναι λιγότερο εκλεκτική και αφορά όλα τα φαινολικά συστατικά. Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματά της είχαν πολύ καλή γραμμική προσαρμογή, και προσδιόρισαν με αρκετά καλή ακρίβεια την ολοκλήρωση του σταδίου της έκπλυσης. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu οδήγησε σε λιγότερο ακριβή συμπεράσματα κατά το στάδιο της διάχυσης. Έτσι, ενώ μέσω HPLC διαπιστώθηκε ότι η εκχύλιση είχε πρακτικά ολοκληρωθεί στα 25 min ανακτώντας το 89 % των διαθέσιμων κανναβινοειδών, μέσω Folin-Ciocalteu το 90 % ανάκτησης θα προέκυπτε σε χρόνο άνω των 90 min, γεγονός που θα είχε σοβαρό αντίκτυπο στην κατανάλωση διαλύτη π.χ. σε μια βιομηχανική εφαρμογή. Πάντως, η μέθοδος Folin-Ciocalteu αποτελεί μια χρήσιμη ανάλυση, καθώς δεν απαιτεί πολύ εξειδικευμένο εξοπλισμό και είναι απλή στην εφαρμογή της. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως προσφέροντας δυνατότητες σύγκρισης με άλλες ερευνητικές ομάδες που ενδεχομένως χρησιμοποιούν πολύ διαφορετικά πρωτόκολλα εκχύλισης.

4.6 Κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης

4.6.1 Κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης των ολικών φαινολικών συστατικών

Αρχικά, για την κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης ακολουθήθηκε η γνωστή μεθοδολογία κινητικής μελέτης ανοιχτού συστήματος. Η δειγματοληψία του φρέσκου υδατικού εκχυλίσματος έγινε σε προκαθορισμένους χρόνους. Συγκεκριμένα, οι χρόνοι δειγματοληψίας ήταν στα: 0–1,5–3–5–9–15–25–45–60–90–120 min της εκχύλισης.

Τα δείγματα που έχουν παραληφθεί με τη κωδικοποιημένη δειγματοληψία αλλά και από το συνολικό τελικό εκχύλισμα αραιώνονται καταλλήλως και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανάλυση μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Εν συνεχεία, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της στιγμιαίας (για κάθε χρονική στιγμή) συγκέντρωσης του εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (mg gallic acid/L) σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 19). Στο παρακάτω διάγραμμα αποτυπώνονται τα αποτελέσματα μαζί και για τα δύο πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.



Διάγραμμα 19. Στιγμαία συγκέντρωση υδατικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης.

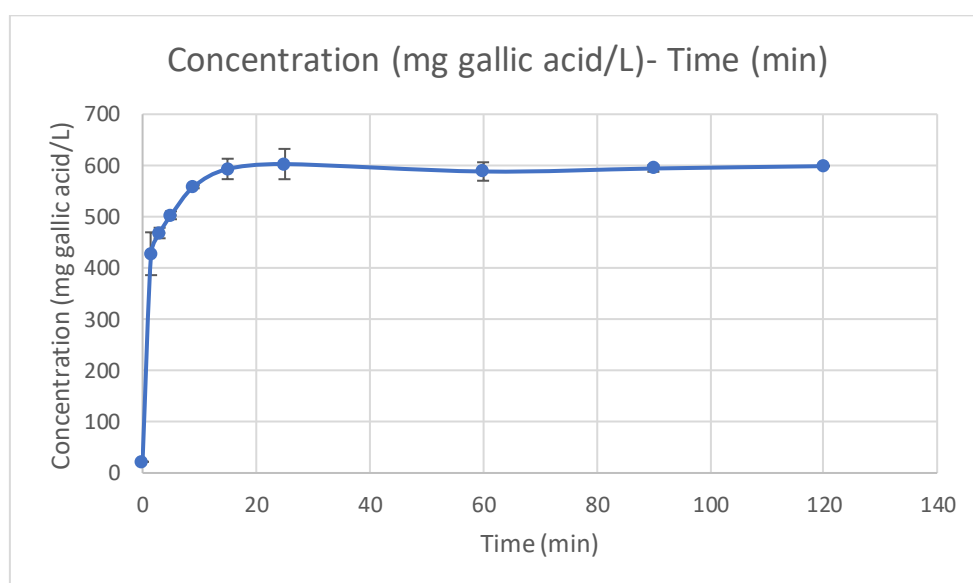
Αυτό που παρατηρείται, για αρχή, είναι μια εντελώς διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με την ακετονική εκχύλιση. Στους αρχικούς χρόνους εκχύλισης (0 min) δεν αντιστοιχούν πλέον οι μέγιστες τιμές συγκέντρωσης, καθώς η καμπύλη της γραφικής παράστασης εμφανίζει μια υστέρηση στην εμφάνιση του ολικού μεγίστου. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί ως εξής: το νερό, ως διαλύτης, δεν έχει διαβρέξει πλήρως το φυτικό υλικό πριν την έναρξη της διαδικασίας της εκχύλισης και την έξοδο των πρώτων σταγόνων εκχυλίσματος. Η διαβροχή παρουσιάζει βελτίωση σε μετέπειτα στάδιο, οπότε εκχυλίζονται και περισσότερα διαλυτά συστατικά, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την τιμή της στιγμιαίας συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος (μέγιστο καμπύλης). Ωστόσο, η εξέλιξη της διαβροχής του φυτικού υλικού πραγματοποιείται με μη ελεγχόμενο τρόπο, με αποτέλεσμα τη σημαντική διαφοροποίηση των δύο πειραμάτων, τα οποία δεν μπορούν να θεωρηθούν επαναλήψιμα (όπως προκύπτει και από το Διάγραμμα 19). Ως εκ τούτου, επηρεάζεται η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, τα οποία δεν μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Αυτό που παρατηρήθηκε πειραματικά μετά την αποσυναρμολόγηση της κλίνης του εκχυλιστήρα (εξικμαστήρα) είναι ότι η διαβροχή του νερού δεν είχε γίνει μέχρι τον κεντρικό οριζόντιο άξονα του κυλίνδρου της κλίνης. Στην πραγματικότητα, το νερό είχε διαβρέξει μόνο την αρχική σπιάδα του φυτικού υλικού του πυθμένα της κλίνης. Στη συνέχεια, ο διαλύτης κατευθύνθηκε περιφερειακά του κυλίνδρου, φτάνοντας στην κορυφή της κλίνης και την έξοδο του συστήματος χωρίς να έχει διαβρέξει πλήρως το υλικό. Συνεπώς, δεν πραγματοποιήθηκε πλήρης εκχύλιση όλων των διαθέσιμων εκχυλιζόμενων συστατικών. Η προβληματική αυτή συμπεριφορά οφείλεται στη διόγκωση των σωματιδίων του φυτικού υλικού μετά τη διαβροχή από το νερό, εμποδίζοντας έτσι τη διέλευση του διαλύτη.

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της διαβροχής που παρουσιάστηκε, επιστρατεύτηκε η τεχνική της εκχύλισης σε κλειστό σύστημα. Όπως προαναφέρθηκε, ο σχεδιασμός του πειράματος ακολουθεί μια βασική λογική: τη διατήρηση του λόγου της μάζας υλικού προς εκχύλιση προς τον όγκο διαλύτη m/V (g/mL) ίδιο με εκείνο που προέκυψε για την εξαντλητική υδατική εκχύλιση. Καθότι στην περίπτωση της υδατικής εξαντλητικής εκχύλισης, ο όγκος του εκχυλίσματος που παραλήφθηκε ήταν ίσος με 450 mL και η αρχική μάζα της

πρώτης ύλης ίση με 20 g, ο λόγος m/V διατηρείται στο επίπεδο 1:22,5 και για την εκχύλιση αυτή. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε κάθε σημείο των Διαγραμμάτων 20-21 αντιστοιχεί στον αντίστοιχο μέσο όρο των δύο μετρήσεων.

Τα δείγματα που έχουν παραληφθεί με την κωδικοποιημένη δειγματοληψία αλλά και από το συνολικό τελικό εκχύλισμα αραιώνονται καταλλήλως και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανάλυση μέσω της μεθόδου Folin- Ciocalteu. Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της στιγμιαίας συγκέντρωσης του συνολικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (mg gallic acid/L) σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 20).



Διάγραμμα 20. Στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού υδατικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Παρατηρείται ότι η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά αυξάνει σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης, μέχρις ότου η συγκέντρωση να φτάσει σε μια τιμή- πλατό, γύρω από την οποία και σταθεροποιείται.

Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού υδατικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Επισημαίνεται ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, οπότε ως αποτέλεσμα παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων συν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών.

Πίνακας 12. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και Απόδοση σε Ολικά Στερεά (TSY) του συνολικού υδατικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη υδατική εκχύλιση.

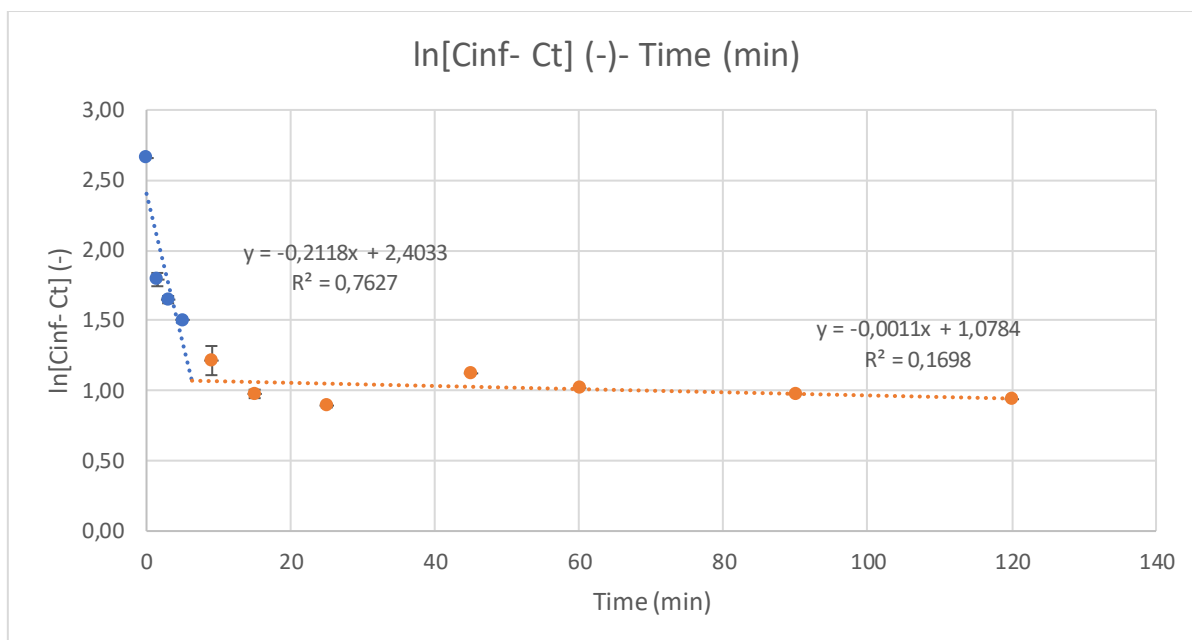
TSY (mg TS/g of material)	190 ± 1
TPC (mg gallic acid/ L)	574 ± 21
TPC (mg gallic acid/ g TS)	76 ± 3
TPC (mg gallic acid/ g of material)	14,4 ± 0,5

Η απόδοση της συγκεκριμένης εκχύλισης σε ολικά στερεά είναι 190 mg TS/g of material. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι 574 mg gallic acid/L. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι 76 mg gallic acid/g TS, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι 14,4 mg gallic acid/g of material.

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακας 12) με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξαντλητική υδατική εκχύλιση (με τη μέθοδο του ανοιχτού συστήματος) και πιο συγκεκριμένα την τιμή της συγκέντρωσης εκφρασμένης σε mg gallic acid/g, αυτή κυμαίνεται στο ίδιο επίπεδο για τις δύο περιπτώσεις. Ελαφρώς μειωμένη για την περίπτωση του κλειστού συστήματος εμφανίζεται η απόδοση της εκχύλισης σε ολικά στερεά.

Το ποσοστό (%) της συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά (το 100% αντιστοιχεί στη συγκέντρωση $C = 14,4 \text{ mg gallic acid/g of material}$ - Πίνακας 12) που ανακτάται σε χρόνο 5 min είναι ίσο με 70%.

Ακολουθεί η προσαρμογή της κινητικής της υδατικής εκχύλισης των φαινολικών συστατικών στο 2^ο νόμο του Fick (Εξίσωση 1). Ως C_{inf} χρησιμοποιείται η τιμή συγκέντρωσης 14,7 mg gallic acid/ g of material, που προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος της εξαντλητικής υδατικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου Folin- Ciocalteu. Προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα $\ln[C_{inf} - C_t]$ (-) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 21):



Διάγραμμα 21. Προσαρμογή κινητικής υδατικής εκχύλισης των φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick (οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων).

Παρατηρείται και πάλι το προφίλ των δύο κινητικών.

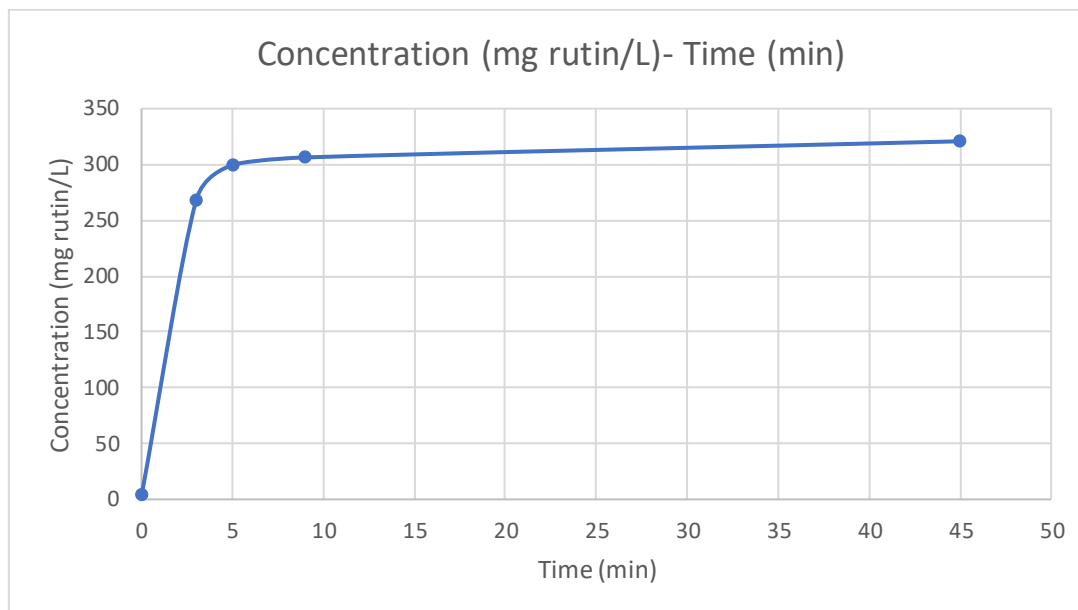
Οι δύο κινητικές προσαρμόζονται σε γραμμικά μοντέλα με συντελεστές προσαρμογής 0,7627 και 0,1698 αντίστοιχα. Ο συντελεστής προσαρμογής για τη δεύτερη κινητική είναι σε αρκετά χαμηλό επίπεδο, καθώς η ευθεία έχει σχεδόν μηδενική κλίση. Οι σταθερές των ρυθμών είναι $k_1=0,2118$ (min^{-1}) για το στάδιο της έκπλυσης και $k_2=0,0011$ (min^{-1}) για το στάδιο της διάχυσης, με τον λόγο $k_1/k_2=192,5$. Η τιμή του λόγου αυτού είναι αρκετά μεγάλη καθώς η τιμή του παρονομαστή του κλάσματος είναι πολύ κοντά στο 0.

Το χρονικό σημείο τομής των δύο κινητικών, δηλαδή ο χρόνος έκπλυσης (leaching time) (min) ισούται με 6,3 min, ενώ η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} κατά την έναρξη του δευτέρου σταδίου είναι ίση με 11,32 mg gallic acid/g of material. Επομένως, στο χρόνο αυτό έχει εκχυλιστεί το 78,6% της ολικής συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά.

4.6.2 Κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης των φλαβονοειδών

Επιλεγμένα δείγματα από τη δειγματοληψία που έγινε προηγουμένως αναλύθηκαν και μέσω της μεθόδου HPLC-DAD. Σκοπός είναι η κινητική μελέτη της εκχύλισης των φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, προς ανάλυση οδηγούνται τα δείγματα που αντιστοιχούν σε χρόνους εκχύλισης: : 0–3–5–9–45 min.

Η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού υδατικού εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή (mg rutin/L) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 22):



Διάγραμμα 22. Στιγμιαία συγκέντρωση συνολικού υδατικού εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης.

Η εκχύλιση των φλαβονοειδών ακολουθεί αντίστοιχη πορεία με εκείνη των ολικών φαινολικών συστατικών. Για αρχικούς χρόνους εκχύλισης, τα στιγμιαία συνολικά εκχυλίσματα έχουν χαμηλή συγκέντρωση σε φλαβονοειδή. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς αυξάνεται ο χρόνος εκχύλισης, η στιγμιαία συνολική συγκέντρωση των παραγόμενων εκχυλισμάτων γίνεται όλο και υψηλότερη προσεγγίζοντας μια μέγιστη τιμή- πλατό.

Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού υδατικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα (Πίνακας 13):

Πίνακας 13. Ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή του συνολικού υδατικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη υδατική εκχύλιση.

Flavonoids' Content (mg rutin/ L)	265
Flavonoids' Content (mg rutin/ g TS)	35
Flavonoids' Content (mg rutin/ g of material)	6,6

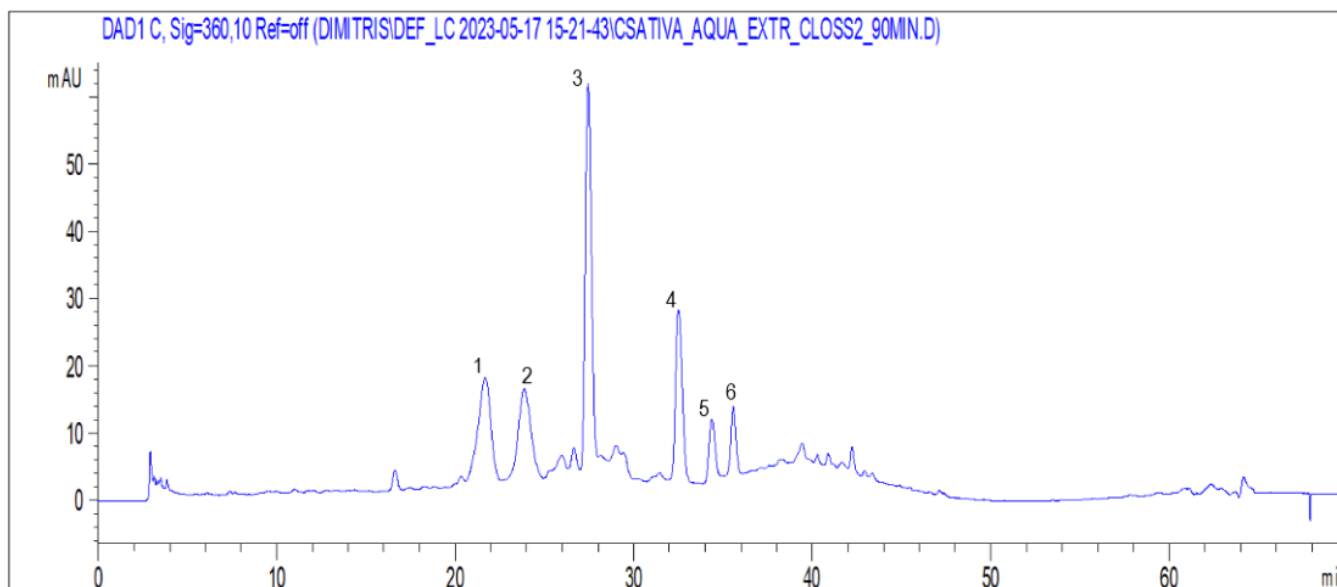
Το ολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι 265 mg rutin/L. Η συγκέντρωση των ολικών κανναβινοειδών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι 35 mg rutin/g TS, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι 6,6 mg rutin/g of material.

Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα (Πίνακας 13) με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξαντλητική υδατική εκχύλιση (με τη μέθοδο του ανοιχτού συστήματος) και πιο συγκεκριμένα την τιμή της συγκέντρωσης εκφρασμένης σε mg rutin/g of material, αυτή εμφανίζεται να είναι αρκετά μειωμένη (6,6 mg rutin/ g of material) για την περίπτωση του κλειστού συστήματος σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή συγκέντρωσης του ανοιχτού συστήματος (13,2 mg rutin/ g of material).

Μετά από την κατάτμηση την οποία έχει υποστεί η φυτική πρώτη ύλη και την κονιοποίηση, διαφορετικά συστατικά που υπάρχουν σε ξεχωριστά μέρη του φυτικού κυττάρου όπως ένζυμα, φλαβονοειδή, πρωτεΐνες και φυσικά πολυμερή βρίσκονται να συνυπάρχουν ταυτόχρονα σε ένα υδατικό διάλυμα με την εκχύλιση του κλειστού συστήματος. Παράλληλα με την εκχύλιση τους, τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στο εκχύλισμα ενδέχεται να σχηματίζουν δεσμούς με πρωτεΐνες και με μακρομόρια (φυσικά πολυμερή) που επίσης παραλαμβάνονται στο τελικό εκχύλισμα μέσω της υδατικής εκχύλισης όπως είναι η λιγνίνη, η κυτταρίνη. Ο σχηματισμός των δεσμών αυτών πιθανότατα να ευνοείται από την ύπαρξη κατάλληλων ενζύμων.

Για παράδειγμα, η σύνδεση μεταξύ φλαβονοειδών και πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση του φυτού του λυσίανθου (Quideau, 2006). Φλαβονοειδή όπως η ταξιφολίνη, η κερκετίνη, η απιγενίνη και η λουτεολίνη έχουν βρεθεί να σχηματίζουν με τη λιγνίνη υβριδικές ενώσεις, οι οποίες ονομάζονται φλαβονολιγνάνες (Rencoret et al., 2022).

Άρα, εκτιμάται ότι τα διαθέσιμα φλαβονοειδή του εκχυλίσματος δεν βρίσκονται όλα σε ελεύθερη μορφή και δεν μπορούν να διαχωριστούν και να ταυτοποιηθούν μέσω της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας. Έτσι, μόνο τα μη συζευγμένα φλαβονοειδή ταυτοποιούνται ως φλαβονοειδή. Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση των φλαβονοειδών παρουσιάζει μείωση. Αυτό αποτυπώνεται και στα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά την ανάλυση μέσω HPLC του ολικού εκχυλίσματος της υδατικής εκχύλισης του κλειστού συστήματος. Στην Εικόνα 30 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της ανάλυσης αυτής.



Εικόνα 30. Χρωματογράφημα υδατικού εκχυλίσματος βιομηχανικής κάνναβης, με έξι κύριες κορυφές 1-6. (360 nm)

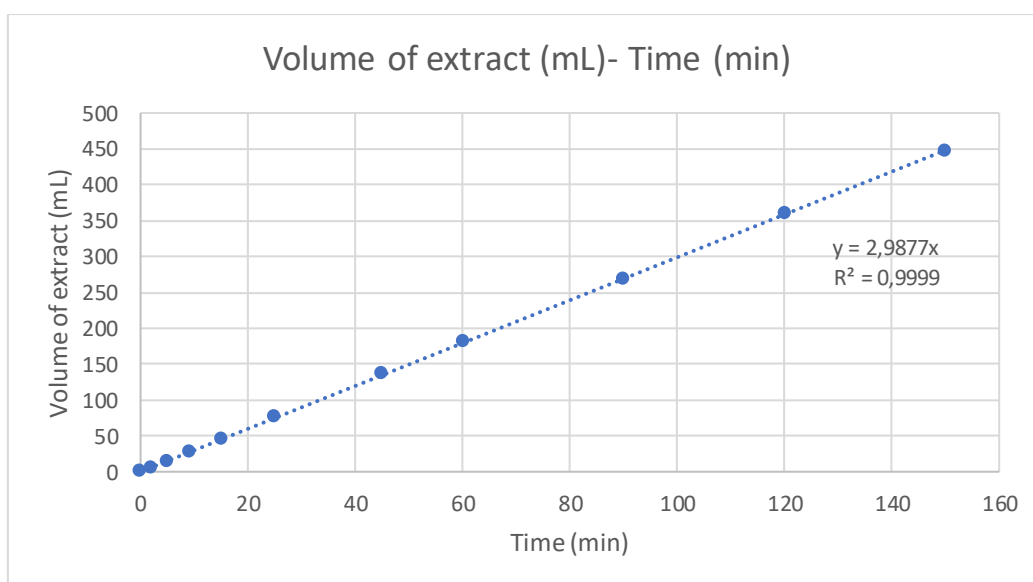
Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που αντιστοιχούν στην 3^η και 4^η κορυφή είναι ίσες με 2,3 rutin/g of material και 1,1 mg rutin/g of material. Χαρακτηριστικά, οι αντίστοιχες τιμές για τις ίδιες κορυφές μετά από την ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος της εξαντλητικής εκχύλισης ήταν 6,2 mg rutin/g of material και 2,2 mg rutin/g of material αντίστοιχα.

4.7 Μελέτη της επίδρασης της ροής του διαλύτη στην κινητική της ακετονικής εκχύλισης

Ο ρυθμός εισροής (ή πιο απλά ροή) του διαλύτη στο ανοιχτό σύστημα αποτελεί μια παράμετρο που μπορεί να επηρεάσει τη διεργασία της εκχύλισης. Η περιοχή τιμών ροής που σαρώθηκε μέσω των πειραμάτων αντιστοιχεί στο διάστημα 3-10 mL/min, ή 150-500 mL/min/kg of material εάν ο ρυθμός εισροής αναχθεί στη μάζα της αρχικής πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση.

Ως πηγή δεδομένων χρησιμοποιούνται και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το διπλό πείραμα που έγινε για την κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης σε ανοιχτό σύστημα. Για το πείραμα αυτό, η μέση ροή του διαλύτη ήταν περίπου 5,5 mL/min ή 277 mL/min/kg of material.

Αρχικά, ρυθμίστηκε ροή διαλύτη (ακετόνης) στο επίπεδα των 3 mL/min. Καθότι η επιβολή της ροής δεν γίνεται αυτοματοποιημένα, η ρύθμιση πραγματοποιείται χειροκίνητα μέσω της αύξησης της πίεσης στην έξοδο της περισταλτικής αντλίας. Η δειγματοληψία φρέσκου στιγμιαίου εκχυλίσματος πραγματοποιείται στους εξής χρόνους εκχύλισης: 0–2–5–9–15–25–45–60–90–120–150 min. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα του όγκου του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος που έχει συλλεχθεί (mL) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 23).



Διάγραμμα 23. Όγκος του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης ($U=3 \text{ mL/min}$).

Η κλίση, η οποία αντιστοιχεί στη ροή του διαλύτη, ισούται με $2,99 \text{ mL/min}$. Η τιμή αυτή είναι αρκετά κοντά στην επιθυμητή ροή των 3 mL/min .

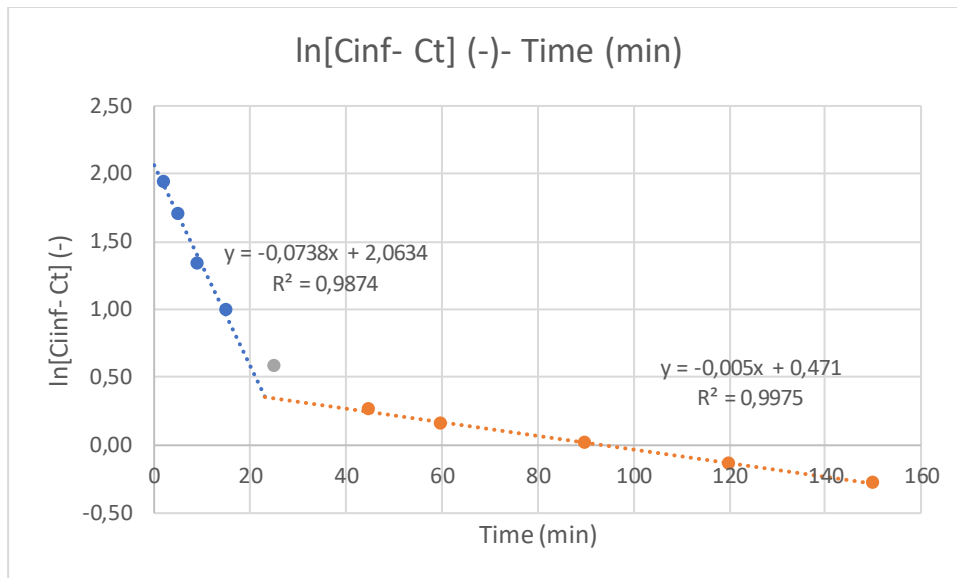
Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού υδατικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα (Πίνακας 14):

Πίνακας 14. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και Απόδοση σε Ολικά Στερεά (TSY) του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη ακετονική εκχύλιση ($U=3 \text{ mL/min}$).

TSY (mg TS/g of material)	56
TPC (mg gallic acid/ L)	315
TPC (mg gallic acid/ g TS)	120
TPC (mg gallic acid/ g of material)	7,2

Η απόδοση της συγκεκριμένης εκχύλισης σε ολικά στερεά είναι $56 \text{ mg TS/g of material}$. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι $315 \text{ mg gallic acid/L}$. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι $120 \text{ mg gallic acid/g TS}$, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι $7,2 \text{ mg gallic acid/g of material}$.

Μετά από την γνωστή πλέον διαδικασία της επεξεργασίας των μετρήσεων, ακολουθεί η προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης στο 2^ο νόμο του Fick (Εξίσωση 1). Ως C_{inf} χρησιμοποιείται η τιμή συγκέντρωσης $7,8 \text{ mg gallic acid/ g of material}$, που προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος εξαντλητικής ακετονικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα $\ln[C_{inf}-C_t]$ (-) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 24):



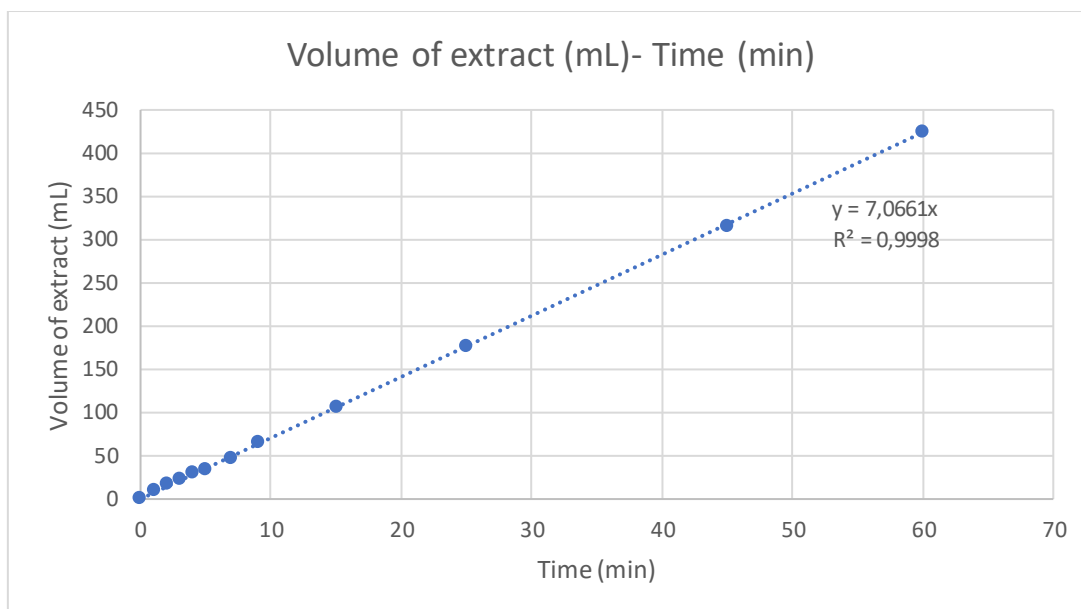
Διάγραμμα 24. Προσαρμογή της κινητικής ακετονικής εκχύλισης ($U=3 \text{ mL/min}$) των φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick.

Παρατηρείται το προφίλ των δύο κινητικών (1^ο στάδιο της έκπλυσης και 2^ο στάδιο της διάχυσης). Το σημείο που αντιστοιχεί στη δειγματοληψία στα 25 λεπτά της εκχύλισης αποκλείστηκε, καθώς θεωρείται ότι δεν συμμετέχει σε κανένα από τα δύο στάδια της εκχύλισης. Η συνάρτηση $\ln[C_{iinf}- C_t]$ (-) λαμβάνει αρνητικές τιμές για χρόνους μεγαλύτερους από 90 λεπτά. Αυτό είναι λογικό, από τη στιγμή που η διαφορά των δύο συγκεντρώσεων γίνεται μικρότερη του $1 \text{ mg gallic acid/g of material}$. Αυτό σημαίνει ότι η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος προσεγγίζει την τιμή C_{iinf} της εξαντλητικής εκχύλισης.

Οι δύο κινητικές προσαρμόζονται σε γραμμικά μοντέλα με συντελεστές προσαρμογής 0,9874 και 0,9975 αντίστοιχα. Οι σταθερές των ρυθμών είναι $k_1=0,0738 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της έκπλυσης και $k_2=0,005 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της διάχυσης, με τον λόγο $k_1/k_2= 14,8$.

Ο χρόνος έκπλυσης (leaching time) (min) ισούται με 23,1 min, ενώ η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} στην έναρξη του 2^{ου} σταδίου είναι ίση με 6,01 mg gallic acid/g of material. Επομένως, στο χρόνο αυτό έχει εκχυλιστεί το 83,5% της ολικής συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά.

Σειρά έχει η ρύθμιση ροής διαλύτη (ακετόνης) στα επίπεδα των 7 mL/min. Η δειγματοληψία στιγμιαίου εκχυλίσματος πραγματοποιείται στους εξής χρόνους εκχύλισης: 0–1–2–3–4–5–7–9–15–25–45–60 min. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα του όγκου του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος που έχει συλλεχθεί (mL) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 25).



Διάγραμμα 25. Όγκος του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης ($U=7 \text{ mL/min}$).

Η κλίση, η οποία αντιστοιχεί στη ροή του διαλύτη, ισούται με $7,07 \text{ mL/min}$. Η τιμή αυτή είναι αρκετά κοντά στην επιθυμητή ροή των 7 mL/min .

Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού υδατικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα (Πίνακας 15):

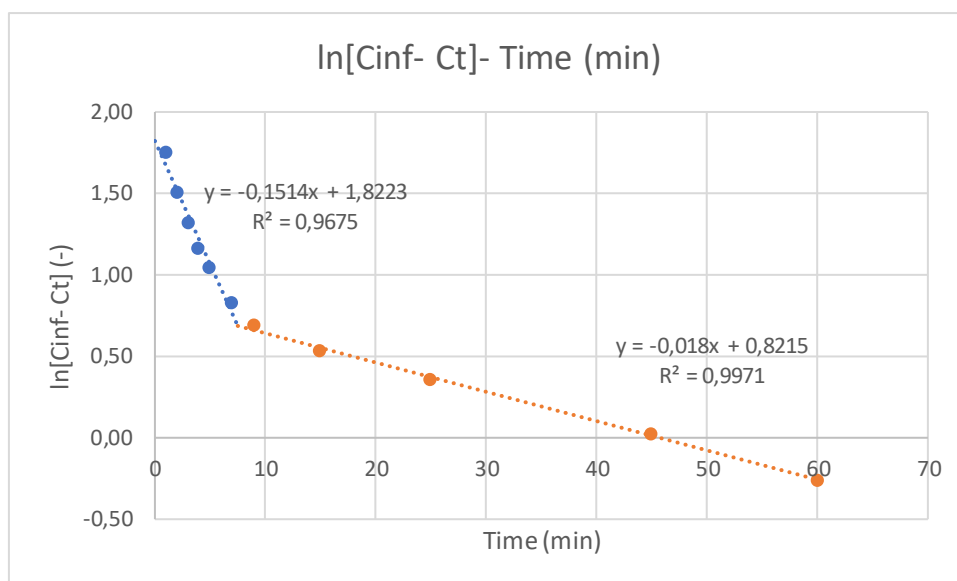
Πίνακας 15. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και Απόδοση σε Ολικά Στερεά (TSY) του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη ακετονική εκχύλιση ($U=7 \text{ mL/min}$).

TSY (mg TS/g of material)	64
TPC (mg gallic acid/ L)	365
TPC (mg gallic acid/ g TS)	114,7
TPC (mg gallic acid/ g of material)	8,0

Η απόδοση της συγκεκριμένης εκχύλισης σε ολικά στερεά είναι $64 \text{ mg TS/g of material}$. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι $365 \text{ mg gallic acid/L}$. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι $114,7 \text{ mg gallic acid/g TS}$, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι $8,0 \text{ mg gallic acid/g of material}$.

Στη συνέχεια γίνεται προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης στο 2^ο νόμο του Fick (Εξίσωση 1). Ως C_{inf} χρησιμοποιείται η τιμή συγκέντρωσης $7,8 \text{ mg gallic acid/ g of material}$, που προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος εξαντλητικής ακετονικής

εκχύλισης μέσω της μεθόδου Folin- Clocalteu. Προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα $\ln[C_{inf}-C_t]$ (-) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 26):

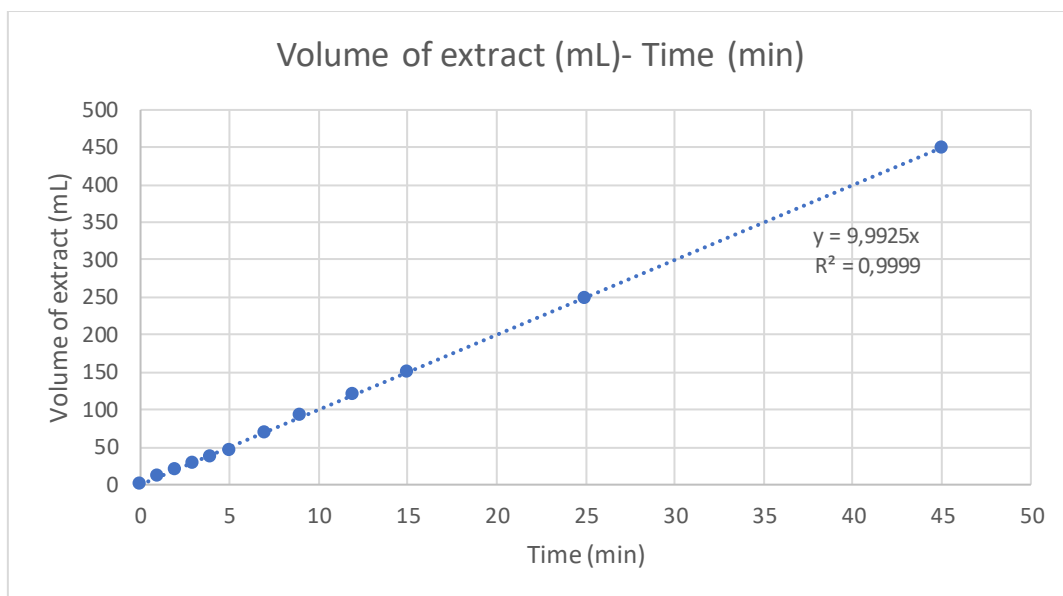


Διάγραμμα 26. Προσαρμογή της κινητικής ακετονικής εκχύλισης ($U=7 \text{ mL/min}$) των φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick.

Παρατηρείται το προφίλ των δύο κινητικών που αντιστοιχούν στα δύο στάδια της εκχύλισης. Οι δύο κινητικές προσαρμόζονται σε γραμμικά μοντέλα με συντελεστές προσαρμογής 0,9675 και 0,9971 αντίστοιχα. Οι σταθερές των ρυθμών είναι $k_1=0,1514 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της έκπλυσης και $k_2=0,018 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ για το στάδιο της διάχυσης, με τον λόγο $k_1/k_2= 8,4$.

Ο χρόνος έκπλυσης (leaching time) (min) ισούται με 7,5 min, ενώ η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} στην έναρξη του 2^{ου} σταδίου είναι ίση με 5,81 mg gallic acid/g of material. Επομένως, στο χρόνο αυτό έχει εκχυλιστεί το 73% της ολικής συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά.

Εν συνεχεία, γίνεται ρύθμιση της ροής διαλύτη (ακετόνης) στα επίπεδα των 10 mL/min. Η δειγματοληψία στιγμιαίου εκχυλίσματος πραγματοποιείται στους εξής χρόνους εκχύλισης: 0–1–2–3–4–5–7–9–12–15–25–45 min. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα του όγκου του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος που έχει συλλεχθεί (mL) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 27).



Διάγραμμα 27. Όγκος του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης ($U=10 \text{ mL/min}$).

Η κλίση, η οποία αντιστοιχεί στο ρυθμό εισροής του διαλύτη, ισούται με $9,99 \text{ mL/min}$. Η τιμή αυτή είναι αρκετά κοντά στην επιθυμητή ροή των 10 mL/min .

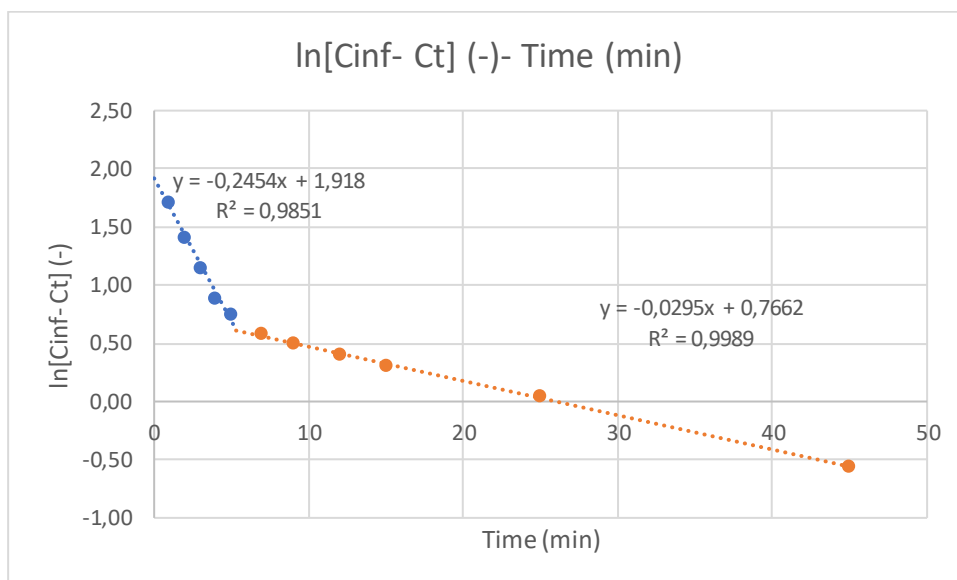
Μετά την ανάλυση του τελικού συνολικού υδατικού εκχυλίσματος που συλλέγεται προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα (Πίνακας 16):

Πίνακας 16. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και Απόδοση σε Ολικά Στερεά (TSY) του συνολικού ακετονικού εκχυλίσματος μετά από την κινητικά μελετούμενη ακετονική εκχύλιση ($U=10 \text{ mL/min}$).

TSY (mg TS/g of material)	48
TPC (mg gallic acid/ L)	319
TPC (mg gallic acid/ g TS)	142,4
TPC (mg gallic acid/ g of material)	7,4

Η απόδοση της συγκεκριμένης εκχύλισης σε ολικά στερεά είναι $48 \text{ mg TS/g of material}$. Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του υδατικού εκχυλίσματος του συγκεκριμένου πειράματος είναι $319 \text{ mg gallic acid/L}$. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών εκφρασμένη ανά μάζα ξηρού εκχυλίσματος είναι $142,4 \text{ mg gallic acid/g TS}$, ενώ η συγκέντρωση ανηγμένη ανά μάζα πρώτης ύλης είναι $7,4 \text{ mg gallic acid/g of material}$.

Στη συνέχεια γίνεται προσαρμογή της κινητικής της ακετονικής εκχύλισης στο 2^ο νόμο του Fick (Εξίσωση 1). Ως C_{inf} χρησιμοποιείται η τιμή συγκέντρωσης 7,8 mg gallic acid/ g of material, που προέκυψε από την ανάλυση του εκχυλίσματος εξαντλητικής ακετονικής εκχύλισης μέσω της μεθόδου Folin- Ciocalteu. Προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα $\ln[C_{inf}-C_t]$ (-) συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης (min) (Διάγραμμα 28):



Διάγραμμα 28. Προσαρμογή της κινητικής ακετονικής εκχύλισης ($U=10$ mL/min) των φαινολικών συστατικών στον 2^ο νόμο του Fick.

Παρατηρείται το προφίλ των δύο κινητικών που αντιστοιχούν στα δύο στάδια της εκχύλισης. Οι δύο κινητικές προσαρμόζονται σε γραμμικά μοντέλα με συντελεστές προσαρμογής 0,9851 και 0,9989 αντίστοιχα. Οι σταθερές των ρυθμών είναι $k_1=0,2454$ (min^{-1}) για το στάδιο της έκπλυσης και $k_2=0,0295$ (min^{-1}) για το στάδιο της διάχυσης, με τον λόγο $k_1/k_2= 8,3$.

Ο χρόνος έκπλυσης (leaching time) (min) ισούται με 5,3 min, ενώ η στιγμιαία συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος C_{tot} στην έναρξη του 2^{ου} σταδίου είναι ίση με 6,01 mg gallic acid/g of material. Επομένως, στο χρόνο αυτό έχει εκχυλιστεί το 81% της ολικής συγκέντρωσης του ακετονικού εκχυλίσματος σε ολικά φαινολικά συστατικά.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 17,18) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές ορισμένων χαρακτηριστικών μεγεθών:

- των σταθερών των ρυθμών k_1 και k_2 (1/min) και των λόγων των σταθερών k_1/k_2 (-) συναρτήσει της ροής του διαλύτη- Flow (mL/min ή mL/min/kg of material) στον Πίνακα 17

- των χρόνων έκπλυσης (t_{leach}) (min), των συνολικών όγκων των εκχυλισμάτων που έχουν παραληφθεί στο χρόνο έκπλυσης (mL) και των συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων στην αρχή του 2^{ου} σταδίου της εκχύλισης (mg gallic acid/g of material) συναρτήσει του - Flow (mL/min ή mL/min/ kg of material) στον Πίνακα 18.

Μαζί με την κλασική μονάδα ροής (mL/min) χρησιμοποιείται και η αντίστοιχη έκφραση ανηγμένη ανά μάζα εκχυλιζόμενης πρώτης ύλης. Με δεδομένο ότι η εκχυλιζόμενη μάζα για κάθε εκχύλιση είναι σταθερή και ίση με 20 g, υπάρχει αναλογία μεταξύ των δύο εκφράσεων.

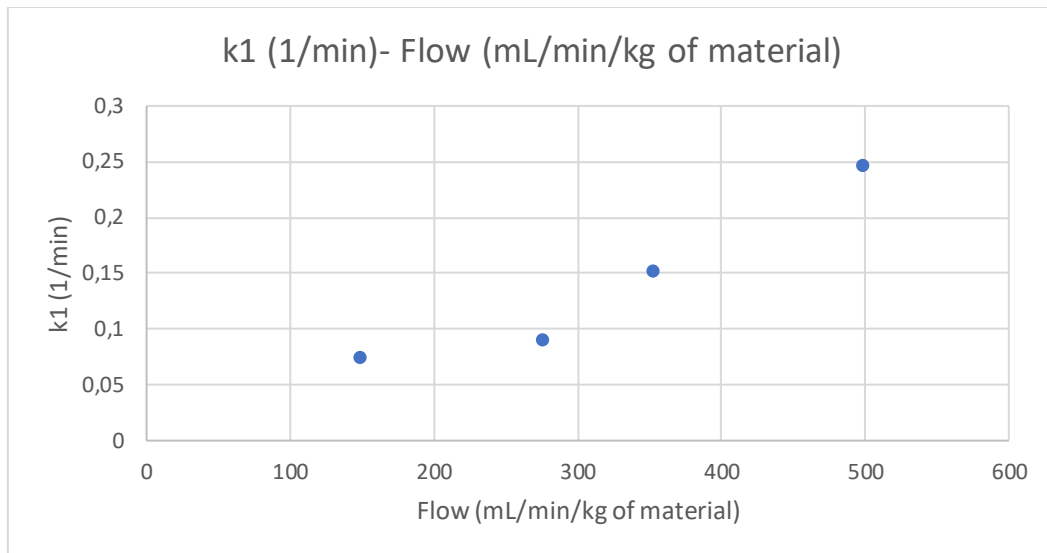
Πίνακας 17. Οι σταθερές των ρυθμών k_1 και k_2 και των λόγων των σταθερών k_1/k_2 - k_Ratio συναρτήσει της ροής του διαλύτη- Flow.

Flow (mL/min)	Flow (mL/min*kg of material)	k_1 (1/min)	k_2 (1/min)	k_Ratio (-)
3,0	149	0,07	0,005	14,8
5,5	277	0,09	0,008	11,9
7,1	353	0,15	0,018	8,4
10,0	500	0,25	0,030	8,3

Πίνακας 18. Οι χρόνοι έκπλυσης (t_{leach}), οι συνολικοί όγκοι των εκχυλισμάτων που έχουν παραληφθεί στο χρόνο έκπλυσης και οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων στην αρχή του 2^{ου} σταδίου της εκχύλισης συναρτήσει της ροής του διαλύτη- Flow.

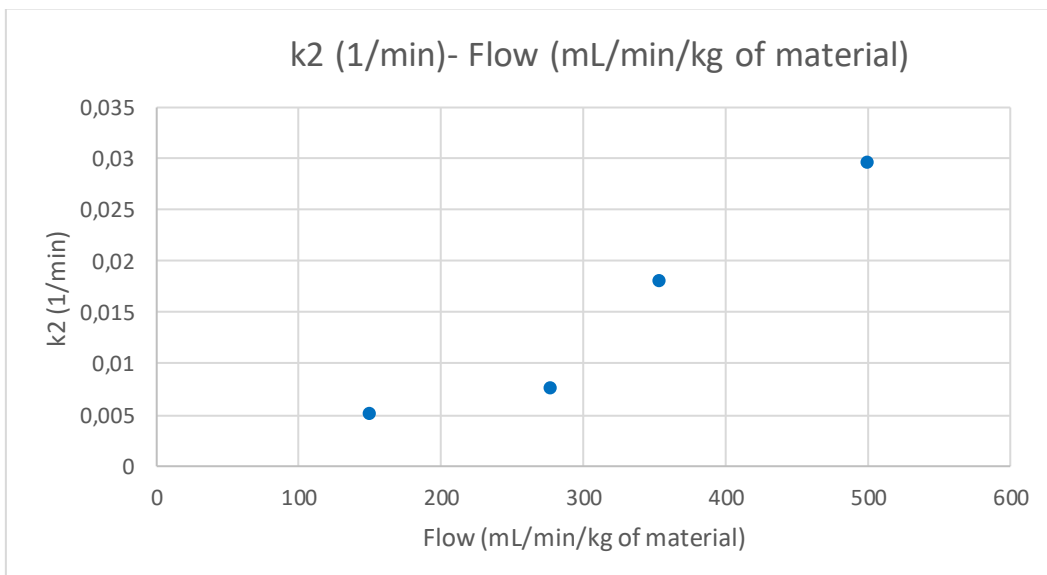
Flow (mL/min)	Flow (mL/min*kg of material)	t_{leach} (min)	Vol. of extract @ t_{leach} (mL)	C @start_ k_2 (mg gallic acid/g of material)
3,0	149	23,1	69,0	6,01
5,5	277	10,6	58,7	5,64
7,1	353	7,5	53,0	5,81
10,0	500	5,3	53,0	6,01

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διαγράμματα 29-30) αποτυπώνονται διαγραμματικά οι σχέσεις των σταθερών των ρυθμών k_1, k_2 (1/min) με τη ροή του διαλύτη (mL/min/kg):



Διάγραμμα 29. Η σταθερά του ρυθμού k_1 (1/min) συναρτηθεί της ροής του διαλύτη (mL/min/kg of material).

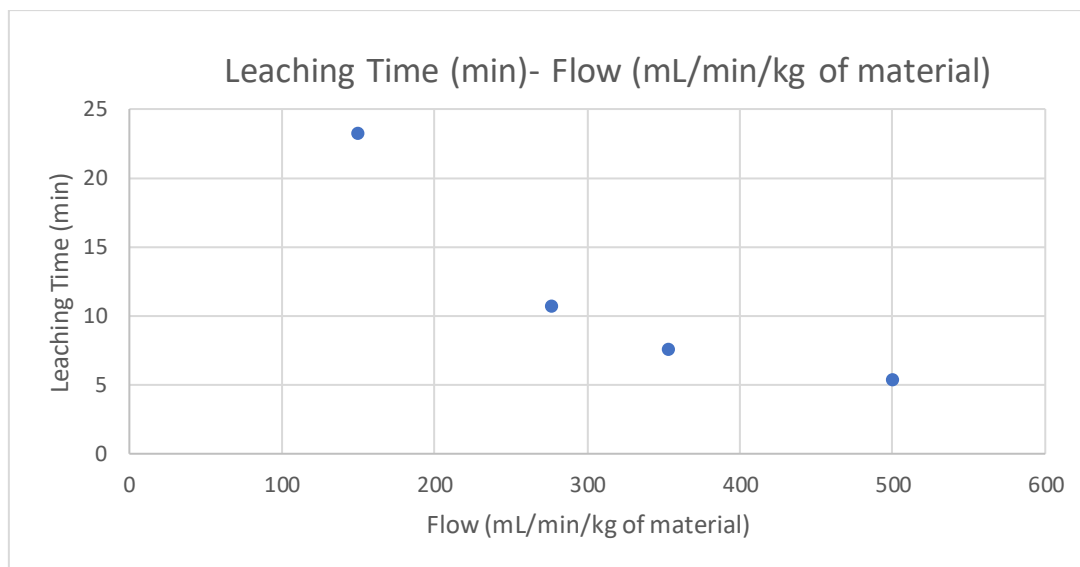
Η σταθερά του ρυθμού του 1^{ου} σταδίου της εκχύλισης (στάδιο της έκπλυσης) δείχνει να αυξάνεται όσο αυξάνεται η ροή του διαλύτη, αρχικά με μικρότερο ρυθμό (μικρότερη κλίση) μέχρι και τη τιμή ροής (277 mL/min/kg of material). Από το σημείο αυτό και έπειτα, ο ρυθμός k_1 δείχνει να αυξάνεται με σχετικά μεγαλύτερο ρυθμό.



Διάγραμμα 30. Η σταθερά του ρυθμού k_2 (1/min) συναρτηθεί της ροής του διαλύτη (mL/min/kg of material).

Αντίστοιχη συμπεριφορά συναρτήσεως της ροής του διαλύτη παρουσιάζεται να έχει και η σταθερά του 2^{ου} σταδίου της εκχύλισης (σταδίου της διάχυσης).

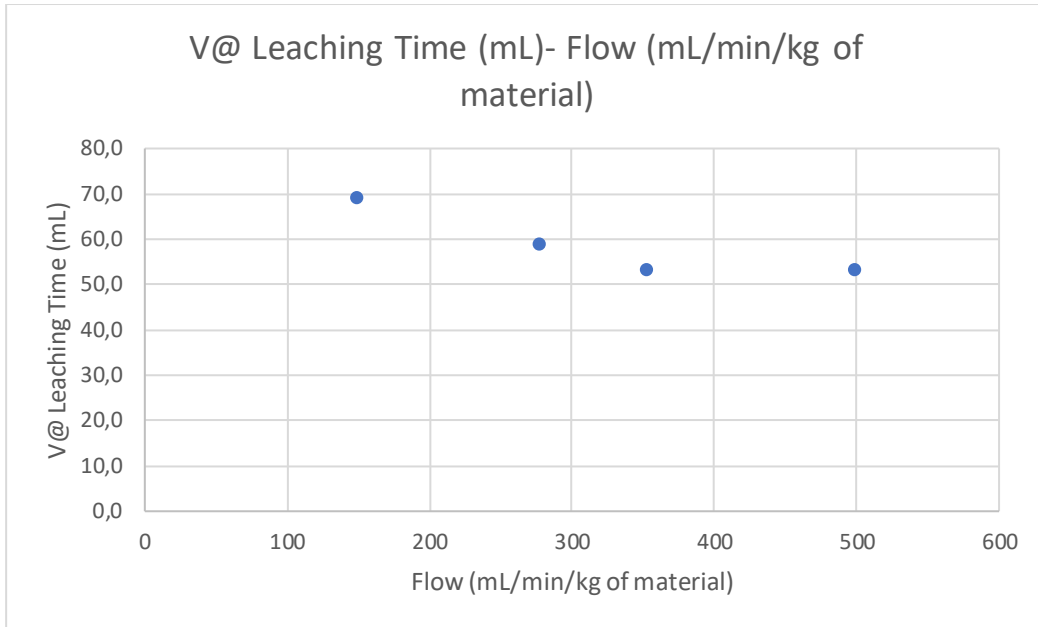
Η γραφική παράσταση του χρόνου έκπλυσης (min) συναρτήσεως της ροής του διαλύτη (της ακετόνης) (mL/min/kg of material) παρουσιάζεται παρακάτω (Διάγραμμα 31):



Διάγραμμα 31. Ο χρόνος έκπλυσης (min) συναρτήσεως της ροής του διαλύτη (mL/min/kg of material).

Παρατηρείται ότι ο χρόνος έκπλυσης μειώνεται με εκθετικό ρυθμό με την αύξηση της ροής του διαλύτη και τείνει ασυμπτωτικά στην τιμή χρόνου έκπλυσης 5 min για υψηλές τιμές ροής.

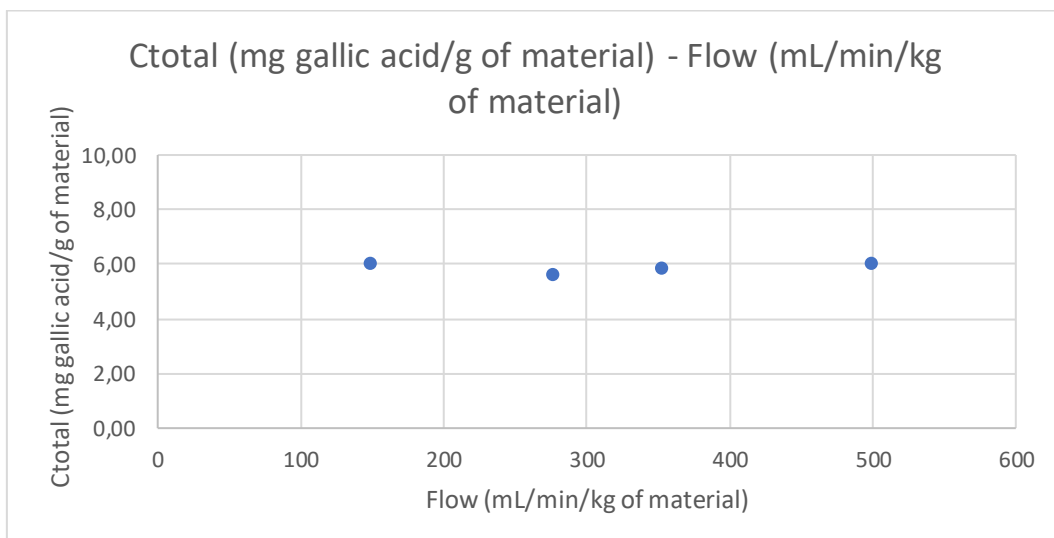
Το διάγραμμα του συνολικού όγκου εκχυλίσματος που έχει συλλεχθεί στο χρόνο έκπλυσης (mL) σε συνάρτηση με τη ροή του διαλύτη (mL/min/kg of material) απεικονίζεται παρακάτω (Διάγραμμα 32):



Διάγραμμα 32. Ο συνολικός όγκος εκχυλίσματος που έχει συλλεχθεί στο χρόνο έκπλυσης (mL) συναρτήσει της ροής του διαλύτη (mL/min/kg of material).

Ο συνολικός όγκος που έχει συλλεχθεί στο χρόνο έκπλυσης μειώνεται με την αύξηση της ροής του διαλύτη και λαμβάνει ελάχιστη τιμή ίση με 59 mL, τιμή στην οποία δείχνει να σταθεροποιείται για υψηλές τιμές ροής.

Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα της συγκέντρωσης του ολικού ακετονικού εκχυλίσματος στο χρόνο έκπλυσης κάθε εκχύλισης (mg gallic acid/g of material) σε συνάρτηση με τη ροή του διαλύτη (mL/min/kg of material) (Διάγραμμα 33).



Διάγραμμα 33. Η συγκέντρωση του ολικού ακετονικού εκχυλίσματος στο χρόνο έκπλυσης κάθε εκχύλισης (mg gallic acid/g of material) σε συνάρτηση με τη ροή του διαλύτη (mL/min/kg of material).

Αυτό που παρατηρείται είναι μια σταθερή συμπεριφορά όσον αφορά στην ανακτώμενη συγκέντρωση σε σχέση με τη ροή εισόδου του διαλύτη. Το πειραματικό σφάλμα μεταξύ των συγκεντρώσεων είναι ίσο με $3,5\% < 10\%$. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι μετρήσεις δεν διαφέρουν μεταξύ τους και ότι αντιπροσωπεύουν την ίδια τιμή συγκέντρωσης.

Το κοινό σημείο σύγκρισης όλων των εκχυλίσεων αποτελεί η ανάλυση στο χρόνο έκπλυσης, καθώς το σημείο αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως εκείνο στο οποίο η εκχύλιση σταματά να είναι αποδοτική, καθώς έχει ολοκληρωθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό η παραλαβή των εκχυλιζόμενων συστατικών.

Στη βέλτιστη συνθήκη ροής διαλύτη ιδανικά θα παραλαμβάνεται το εκχύλισμα με τη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση σε φαινορικά συστατικά (mg gallic acid/g of material) με τον μικρότερο δυνατό όγκο συνολικού εκχυλίσματος. Με αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζεται η βιωσιμότητα μιας πιθανής βιομηχανικής εκχύλισης η οποία θα βασιστεί στην εκχύλιση σταθερή κλίνης με διαλύτη την ακετόνη. Αριστοποιούνται δηλαδή οι συνθήκες της εκχύλισης με την επίτευξη της βέλτιστης απόδοσης, χρησιμοποιώντας τον ελάχιστο όγκο διαλύτη και δαπανώντας μετέπειτα την ελάχιστη δυνατή ενέργεια προκειμένου να απομακρυνθεί ο διαλύτης από το εκχύλισμα (συνήθως γίνεται μέσω εξάτμισης). Επίσης, επιθυμητό είναι οι δύο προηγούμενες συνθήκες να συνδυάζονται και με τον μικρότερο δυνατό χρόνο ολοκλήρωσης της εκχύλισης.

Στο Διάγραμμα 33 παρατηρείται ότι η ανακτώμενη συγκέντρωση σε φαινορικά συστατικά, ανηγμένη στην μονάδα της πρώτης ύλης, είναι σταθερή σε κάθε περίπτωση. Άρα, η επιλογή βασίζεται στους παράγοντες του όγκου εκχυλίσματος και του χρόνου ολοκλήρωσης. Με βάση τα παραπάνω, ως βέλτιστος ρυθμός εισροής διαλύτη επιλέγεται εκείνος των 10 mL/min ή 500 mL/min/kg of material. Σε αυτήν τη συνθήκη παραλαμβάνεται ο ελάχιστος όγκος εκχυλίσματος (53 mL) στον μικρότερο χρονικό διάστημα (5,3 min) (που αντιστοιχεί στο χρόνο έκπλυσης).

Με βάση τις παραπάνω άριστες συνθήκες για κάθε 1 kg εκχυλιζόμενης βιομηχανικής κάνναβης εξασφαλίζεται ανάκτηση σε ολικά φαινορικά συστατικά ίση με 6,01 g gallic acid, επιτυγχάνοντας την παραλαβή του 77% του διαθέσιμου φαινολικού περιεχομένου (το οποίο έχει υπολογιστεί με βάση την εξαντλητική εκχύλιση) παραλαμβάνοντας μόλις 2,65 L πυκνού ακετονικού εκχυλίσματος και σε χρόνο 5,3 min από την έναρξη παραλαβής εκχυλίσματος.

Εδώ βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί ότι η υπάρχει και ποσότητα ακετόνης απορροφημένη από τη φυτική ύλη στη σταθερή κλίνη. Η ποσότητα αυτή ανέρχεται κατά μέσο όρο σε 2,5 L/kg εκχυλιζόμενης κάνναβης. Άρα, μετά το πέρας της εκχύλισης για κάθε 1 kg εκχυλισμένης κάνναβης θα χρήζουν διαχείρισης και τα συγκεκριμένα 2,5 L ακετόνης. Για να είναι βιώσιμη οικονομικά και περιβαλλοντικά η διεργασία, η ακετόνη αυτή πρέπει να ανακτηθεί, οπότε απαιτείται η εξάτμιση και παραλαβή για επαναχρησιμοποίηση συνολικά 5,15 L ακετόνης/kg εκχυλιζόμενης κάνναβης. Άρα ο λόγος V/m του όγκου χρησιμοποιούμενου διαλύτη προς την μάζα πρώτης ύλης (L:kg) είναι 5,15:1.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Sain et al. (2020), η εκχύλιση βιομηχανικής κάνναβης υπό τις εξής συνθήκες: λόγος V/m 10:1 (L:kg), θερμοκρασία εκχύλισης ίση με 45 °C, χρόνος εκχύλισης ίσος με 5 min και διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη:νερό (1:3 v/v) είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή εκχυλίσματος με συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά ίση με 5,2 mg gallic acid/g of material.

Κρίνοντας βάσει των αποτελεσμάτων που προσέφερε η μελέτη βελτιστοποίησης της συγκεκριμένης εργασίας (1^η περίπτωση) και των αποτελεσμάτων της παραπάνω βιβλιογραφικής αναφοράς (2^η περίπτωση), ως περισσότερο συμφέρουσα επιλογή χαρακτηρίζεται εκείνη της 1^{ης} περίπτωσης, καθώς προσφέρει τελικό εκχύλισμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης, με χαμηλότερες απαιτήσεις σε διαλύτη, μικρότερο λόγο V/m, σε χαμηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης και στον ίδιο περίπου χρόνο εκχύλισης.

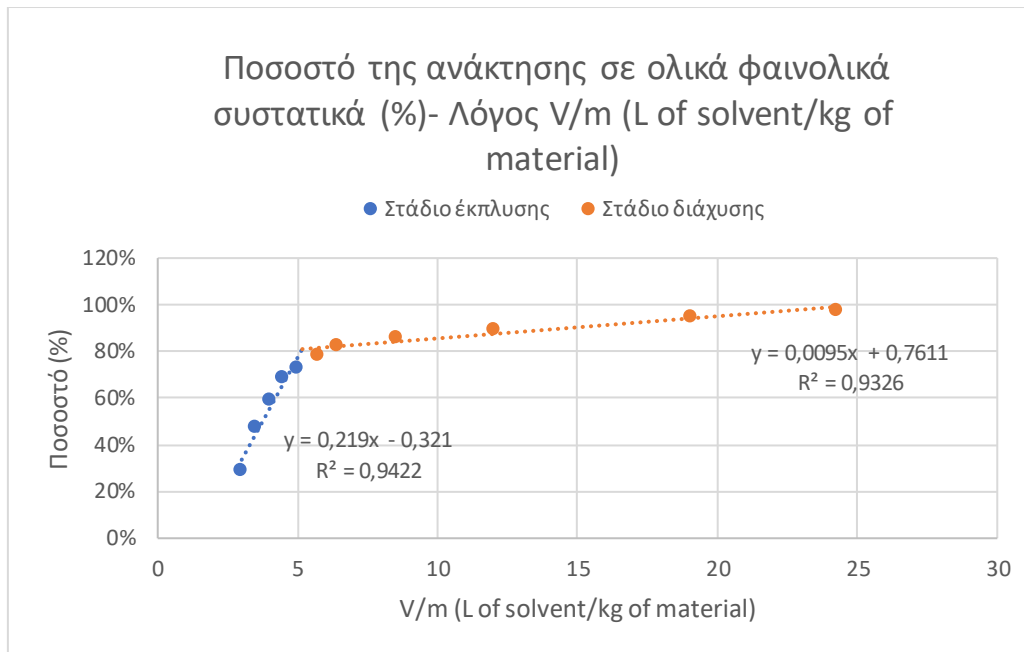
Αντίστοιχη μελέτη βελτιστοποίησης της συνθήκης ρυθμού εισροής του διαλύτη γίνεται ξεχωριστά και για το 2^ο στάδιο της εκχύλισης. Τα χαρακτηριστικά μεγέθη που υπολογίζονται είναι: i) το ποσοστό συνεισφοράς του 2^{ου} σταδίου στην τελική συγκέντρωση του συνολικού εκχυλίσματος (δηλαδή μετά και το τέλος του 2^{ου} σταδίου) και ii) ο όγκος εκχυλίσματος που παραλαμβάνεται κατά τη διάρκεια του 2^ο σταδίου της εκχύλισης. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 19) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές των μεγεθών αυτών:

Πίνακας 19. Οι συνολικοί όγκοι των εκχυλισμάτων που παραλαμβάνονται κατά το 2^ο στάδιο της εκχύλισης και τα ποσοστά συνεισφοράς του 2^{ου} σταδίου στην τελική συγκέντρωση του εκχυλίσματος συναρτήσει της ροής του διαλύτη- Flow.

Flow (mL/min)	Flow (mL/min*kg of material)	Contribution_k2 (%)	V_received@k2 (mL)
3,0	149	14,6%	375
5,5	277	14,7%	440
7,1	353	17,4%	371
10,0	500	16,9%	397

Με βάση τα παραπάνω, η βέλτιστη συνθήκη ροής διαλύτη αποκλειστικά για το 2^ο στάδιο είναι αυτή των 7 mL/min ή 353 mL/min/kg of material. Στη συνθήκη αυτή, κατά το στάδιο της διάχυσης συνεισφέρει περισσότερο στην τελική συγκέντρωση (17,4%), ενώ ταυτόχρονα παραλαμβάνεται ο μικρότερος δυνατός όγκος εκχυλίσματος (371 mL).

Τα αποτελέσματα ενός θεωρητικού συνδυασμού της βέλτιστης συνθήκης ροής για κάθε ένα στάδιο για την πραγματοποίηση μίας ενιαίας εκχύλισης, δηλαδή των 10 mL/min για το πρώτο στάδιο (μέχρι δηλαδή τα πρώτα 5,3 min της εκχύλισης) και των 7 mL/min για το δεύτερο στάδιο μέχρι τα 60 min της εκχύλισης περιγράφονται από το παρακάτω διάγραμμα. Το Διάγραμμα 34 εκφράζει τη σχέση του ποσοστού της ανάκτησης σε ολικά φαινολικά συστατικά (δηλαδή το 100% αντιστοιχεί στην ανάκτηση των φαινολικών συστατικών που επιτυγχάνεται με την εξαντλητική εκχύλιση) σε συνάρτηση με το λόγο V/m (L of solvent/kg of material).



Διάγραμμα 34. Το ποσοστό της ανάκτησης σε ολικά φαινολικά συστατικά του συνδυασμού των βέλτιστων συνθηκών της ακετονικής εκχύλισης (%) συναρτήσει του λόγου V/m (L of solvent/kg of material).

Στο τέλος του πρώτου σταδίου προκύπτει, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα τελικό συνολικό εκχύλισμα συγκέντρωσης 6,01 mg gallic acid/g of material (77% ανάκτηση σε ολικά διαθέσιμα φαινολικά συστατικά), έχοντας χρησιμοποιήσει 5,15 L διαλύτη ακετόνης για 1 kg εκχυλιζόμενης βιομηχανικής κάρναβης και σε χρόνο 5,3 min. Από αυτό το σημείο και έπειτα, και ενώ λαμβάνει χώρα το στάδιο της διάχυσης, για κάθε αύξηση της ανάκτησης κατά μία ποσοστιαία μονάδα (1%), χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί επιπλέον 1,05 L ακετόνης. Η αναλογία αυτή δείχνει να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του 2^{ου} σταδίου, καθώς το ποσοστό της ανάκτησης αυξάνει γραμμικά σε σχέση με το λόγο V/m σύμφωνα με τη σχέση $y = 0,0095 \cdot x + 0,7611$ με συντελεστή προσαρμογής $R^2 = 0,9326$.

Έτσι, στο τέλος και του δεύτερου σταδίου, η συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά είναι ίση με 7,64 g gallic acid (98% ανάκτηση σε ολικά διαθέσιμα φαινολικά συστατικά) παραλαμβάνοντας συνολικά 24,3 L (5,15 L από το 1^ο στάδιο συν 19,15 L από το 2^ο στάδιο) πυκνού ακετονικού εκχυλίσματος για κάθε 1 kg εκχυλιζόμενης βιομηχανικής κάρναβης και σε συνολικό χρόνο 60 min από την έναρξη παραλαβής εκχυλίσματος.

Για την επιλογή ενός σημείου ως τελικό για την διεργασία της εκχύλισης στις βέλτιστες συνθήκες θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν και άλλα μεγέθη σε μια συνάρτηση κόστους όπως είναι το κόστος του διαλύτη και το λειτουργικό κόστος της εγκατάστασης (συσκευές όπως η αντλία και ο εξατμιστήρας έχουν συγκεκριμένες ενεργειακές απαιτήσεις).

5. Συμπεράσματα- Προτάσεις

Η βιομηχανική κάνναβη, ως πρώτη ύλη, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον χάρη στην πληθώρα των εφαρμογών στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Μέρη του φυτού όπως τα φύλλα, οι ανθοί και οι σπόροι αποτελούν πηγές βιοδραστικών συστατικών. Οι ενώσεις αυτές, όπως κατ' εξοχήν είναι τα κανναβινοειδή, συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές δράσεις του ανθρώπινου οργανισμού. Για το λόγο αυτό, εφαρμογές που αφορούν σε προϊόντα φαρμάκων, διατροφής και καλλυντικών σημειώνουν σημαντική εμπορική αξία.

Μετά από την ανάλυση και χαρακτηρισμό των παραγόμενων εκχυλισμάτων βρέθηκε ότι φαινορικά συστατικά του φυτού μπορούν να παραληφθούν τόσο με τη χρήση ακετόνης όσο και με τη χρήση του νερού, ενώ συγκεκριμένα τα υδατικά εκχυλίσματα σημείωσαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Μετά από ανάλυση μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, βρέθηκε ότι τα κύρια συστατικά του ακετονικού εκχυλίσματος αποτελούν τα κανναβινοειδή, η συγκέντρωση των οποίων βρέθηκε ίση με 329 mg CBD/ g TS. Το κύριο κανναβινοειδές είναι η κανναβιδιόλη, η οποία απαντάται σε ποσοστό 56% στο ακετονικό εκχύλισμα. Η κύρια κατηγορία συστατικών που υπάρχουν στα υδατικά εκχυλίσματα είναι εκείνη των φλαβονοειδών με συγκέντρωση 62 mg rutin/ g TS. Το γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης υπερέχει, καθώς απαντάται σε ποσοστό 47%.

Μέσω της κινητικής μελέτης της ακετονικής εκχύλισης, σε εκχυλιστήρα ημιδιαλείποντος έργου, βρέθηκε ότι η στιγμιαία συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του παραλαμβανόμενου εκχυλίσματος μειώνεται εκθετικά συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Συγκεκριμένα, η κινητική προσαρμόστηκε στον 2^ο νόμο του Fick και σε ένα προφίλ δύο διαφορετικών κινητικών. Το καθοριστικό στάδιο της διεργασίας της εκχύλισης είναι εκείνο της έκπλυσης (1^ο στάδιο) για την ακετονική εκχύλιση των ολικών φαινολικών συστατικών. Αυτό σημαίνει ότι μετά το πέρας του 1^{ου} σταδίου της ακετονικής εκχύλισης έχει συγκεντρωθεί το μεγαλύτερο ποσοστό της ολικής διαθέσιμης συγκέντρωσης του φυτού. Συγκεκριμένα, ανακτήθηκε το 68% της ολικής διαθέσιμης συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών σε χρόνο εκχύλισης ίσο με 9 λεπτά.

Η κινητική μελέτη της ακετονικής εκχύλισης έγινε επιπλέον και με την ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών μέσω της μεθόδου HPLC-DAD. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της HPLC-DAD, αποδείχτηκε ότι η εκχύλιση των κανναβινοειδών ακολουθεί παρόμοια συμπεριφορά με εκείνη των ολικών φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, η σταθερά του ρυθμού k_1 του σταδίου της έκπλυσης παρουσίασε, συγκριτικά, μεγαλύτερη τιμή και η σταθερά του ρυθμού k_2 του σταδίου της διάχυσης μικρότερη τιμή. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι τα κανναβινοειδή εκχυλίζονται γρηγορότερα σε σχέση με τα ολικά φαινορικά συστατικά, γεγονός που αποτυπώνεται και στην έκφραση του ποσοστού της συγκέντρωσης των κανναβινοειδών που ανακτάται συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Συγκεκριμένα, σε χρόνο εκχύλισης ίσο με 9 λεπτά ανακτήθηκε το 78% της ολικής διαθέσιμης συγκέντρωσης.

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο σημείο, τα κανναβινοειδή σαν ουσίες συντίθενται και αποθηκεύονται σε εκκριτικές κοιλότητες που βρίσκονται στο τρίχωμα του φυτού, το οποίο συναντάται στο εξωτερικό των φύλλων του φυτού. Ως εκ τούτου, ο διαλύτης της ακετόνης δεν χρειάζεται να διεισδύσει στο εσωτερικό του σωματιδίου της φυτικής πρώτης ύλης προκειμένου να εκχυλίσει τα διαθέσιμα κανναβινοειδή. Το καθοριστικό στάδιο δεν είναι αυτό της διάχυσης, αλλά εκείνο της έκπλυσης. Αυτό αποδεικνύεται και μέσω της μελέτης της

κινητικής της εκχύλισης, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κανναβινοειδών (όπως και των ολικών φαινολικών συστατικών) εκχυλίζεται κατά το στάδιο της έκπλυσης.

Η κινητική μελέτη της υδατικής εκχύλισης κατέστη δυνατή μέσω εκχύλισης διαλείποντος έργου σε δοχείο ανάδευσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι η υδατική εκχύλιση των ολικών φαινολικών συστατικών καθορίζεται από το στάδιο της έκπλυσης, ενώ η σταθερά του ρυθμού του σταδίου της διάχυσης έχει σχεδόν μηδενική τιμή. Όσον αφορά στο συνολικό υδατικό εκχύλισμα που συλλέγεται, το ολικό φορτίο κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη τιμή του εκχυλίσματος της εξαντλητικής εκχύλισης, ωστόσο η συγκέντρωση σε ολικά φλαβονοειδή εμφανίζεται να είναι μειωμένη. Με δεδομένο ότι οι αναλύσεις μέσω της HPLC απέδειξαν ότι το υδατικό εκχύλισμα περιέχει σχεδόν κατά αποκλειστικότητα φλαβονοειδή ως φαινολικές ενώσεις, η μείωση αυτή δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, από τη στιγμή που το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δεν παρουσιάζει μείωση. Όπως περιγράφηκε, η φαινόμενη μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φλαβονοειδών πιθανότατα οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών μεταξύ φλαβονοειδών και φυσικών πολυμερών που υπάρχουν τόσο στο φυτό όσο και στο εκχύλισμα.

Η μελέτη της επίδρασης της ροής του διαλύτη (ακετόνης) στην ακετονική εκχύλιση των ολικών φαινολικών συστατικών προσέφερε πληροφορίες σχετικά με το πως μεταβάλλονται χαρακτηριστικά μεγέθη της εκχύλισης. Το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος των φαινολικών συστατικών (και ταυτόχρονα των κανναβινοειδών) εκχυλίζονται κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου (έκπλυσης), οδήγησε για αρχή στην μελέτη της εκχύλισης μέχρι το τέλος του πρώτου σταδίου μέσω του προσδιορισμού μεγεθών όπως είναι: η σταθερά του ρυθμού του σταδίου της έκπλυσης, ο χρόνος έκπλυσης, η ανακτώμενη συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά και ο ανακτώμενος όγκος εκχυλίσματος στο χρόνο αυτό σε συνάρτηση με τη ροή του διαλύτη. Η σταθερά του ρυθμού του σταδίου της έκπλυσης βαίνει αυξητικά με την αύξηση της ροής. Αντίθετα, ο χρόνος έκπλυσης και ο ανακτώμενος όγκος εκχυλίσματος στο χρόνο αυτό μειώνονται με την αύξηση της ροής του διαλύτη. Ο χρόνος έκπλυσης τείνει ασυμπτωτικά στην τιμή των 5 min, ενώ ο ανακτώμενος όγκος εκχυλίσματος στο χρόνο έκπλυσης λαμβάνει ελάχιστη τιμή ίση με 2,6L/kg εκχυλιζόμενης πρώτης ύλης. Όσον αφορά στην ανακτώμενη συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά συστατικά στο χρόνο έκπλυσης, αυτή δεν παρουσιάζει εξάρτηση από την τιμή της ροής του διαλύτη. Ως βέλτιστη συνθήκη ροής επιλέγεται εκείνη των 500 mL/min/kg εκχυλιζόμενης πρώτης ύλης, καθώς στην περίπτωση αυτή συνδυάζονται ως παράγοντες ο ελάχιστος δυνατός χρόνος έκπλυσης και ο ελάχιστος δυνατός ανακτώμενος όγκος εκχυλίσματος στο χρόνο έκπλυσης. Έτσι, με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών της διεργασίας εκχύλισης σε 1 kg βιομηχανικής κάνναβης θα παραληφθούν 6,01 g gallic acid (αντιστοιχεί σε ανάκτηση του 77% των ολικών διαθέσιμων φαινολικών συστατικών), σε χρόνο 5,3 min, με τη χρήση 5,15 L διαλύτη ακετόνης.

Σε δεύτερο χρόνο, αντίστοιχη μελέτη και εύρεση βέλτιστης συνθήκης ροής του διαλύτη πραγματοποιείται και για το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης, δηλαδή της διάχυσης. Ως βέλτιστη ροή διαλύτη επιλέγεται εκείνη των 353 mL/min/kg εκχυλιζόμενης πρώτης ύλης. Η επιλογή αυτή αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσοστό συνεισφοράς του 2^{ου} σταδίου στην τελική συγκέντρωση του ολικού εκχυλίσματος και στον ελάχιστο δυνατό όγκο ανακτώμενου εκχυλίσματος κατά τη διάρκεια του 2^{ου} σταδίου της εκχύλισης.

Δηλαδή η πραγματοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης σε 1 kg βιομηχανικής κάνναβης στις βέλτιστες συνθήκες του κάθε σταδίου, θα έχει ως αποτέλεσμα την παραλαβή

7,64 g gallic acid (αντιστοιχεί σε ανάκτηση του 98% των ολικών διαθέσιμων φαινολικών συστατικών), σε χρόνο 60 min, με τη χρήση 24,3 L διαλύτη ακετόνης.

Η επιλογή του τελικού σημείου της εκχύλισης μπορεί να κριθεί εν τέλει από μια συμπληρωματική μελέτη που θα περιλαμβάνει και την επίδραση άλλων παραγόντων, όπως είναι τα ενεργειακά κόστη χρήσης του διαθέσιμου εξοπλισμού.

Ακολουθούν μερικές προτάσεις που βρίσκονται σε συνάφεια με την εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών από το φυτό της βιομηχανικής κάνναβης για μελλοντική έρευνα στο συγκεκριμένο θέμα. Αρχικά, η πραγματοποίηση πλήρους ταυτοποίησης των συστατικών των ακετονικών και υδατικών εκχυλισμάτων, η παραγωγή των οποίων έγινε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, με χρήση τη χρήση τεχνικών ανάλυσης GC-MS και LC-MS. Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο σχεδιασμός ενός τελικού προϊόντος ελαίου κανναβιδιόλης (τύπου CBD oil) ως συμπλήρωμα διατροφής. Τα κανναβινοειδή τα οποία περιέχονται στη ξηρή σκόνη του ακετονικού εκχυλίσματος (που μπορεί να προκύψει μετά την απομάκρυνση της ακετόνης με εξάτμιση) έχουν την δυνατότητα να ενσωματωθούν σε ένα λιπιδικό φορέα όπως είναι το ελαιόλαδο. Αντίστοιχη θα ήταν και η λογική στην περίπτωση σχεδιασμού μιας καλλυντικής κρέμας, με την ενσωμάτωση του ξηρού εκχυλίσματος π.χ. σε ένα ενεργό λιπιδικό φορέα όπως είναι τα λιποσώματα. Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί η εκχύλιση με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών (όπως π.χ. η μεθανόλη) ή και διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης με σκοπό την παραλαβή συγκεκριμένων συστατικών- στόχων, τα οποία δεν βρέθηκαν παραλαμβάνονται από το νερό και την ακετόνη, όπως χαρακτηριστικά είναι οι κανναφλαβίνες Α και Β. Μια επιπλέον πρόταση για μελέτη είναι και η πραγματοποίηση ατμοαπόσταξης του φυτού, με σκοπό την παραλαβή και την ανάλυση του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο της βιομηχανικής κάνναβης συγκεντρώνει μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον και αποτελεί ένα δημοφιλές προϊόν με βάση τη βιομηχανική κάνναβη. Τέλος, σε συνέχεια της μελέτης και εύρεσης της βέλτιστης ροής του διαλύτη της ακετόνης, η μελέτη κλιμάκωσης της διεργασίας της ακετονικής εκχύλισης σε βιομηχανική κλίμακα θα μπορούσε να προσφέρει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη βιωσιμότητα ενός τέτοιου εμπορικού εγχειρήματος.

6. Βιβλιογραφία

Pellati F., Bringham V., Sperlea J., Marchetti L., Bertelli D., Benvenuti S. 2018. New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in Cannabis sativa L. (hemp). p. 1-3

Struik, P.C. S. Amaducci, M.J. Bullard, n.C. Stutterheim, G. Venturi, H.T.H. Cromack. 2000. Agronomy of fibre hemp (Cannabis sativa L.) in Europe. Industrial Crops and Products. 11. p. 107-118

Piotrowski, S. M. Carus. 2011. Ecological benefits of hemp and flax cultivation and products. Nova institute. 5.

Amaducci, S., D. Scordia, F.H. Liu, S.L. Cosentino. 2014. Key cultivation techniques for hemp in Europe in China. Industrial Crops and Products. 06:041.

Keller A., Leupin M., Mediavilla V., Wintermantel E. 2001. Influence of the growthstage of industrial hemp on chemical and physical properties of fibres. Industrial Crops Production. 13, p. 35 – 48

Κοσμίδης Σ., 2022. Συνδυασμένη επίδραση βιοκόμποστ (biocompost) και βιοδιεγέρτη στα χαρακτηριστικά του ριζικού συστήματος της κάνναβης (Cannabis sativa L.), Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών- Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής- Εργαστήριο Γεωργίας, σελ. 16 -21

Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al., (2018) Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. Journal of Ethnopharmacology.

Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. Pharmacology and Therapeutics. (2017)

[Ευρωπαϊκή Επιτροπή/ Agriculture and rural development/ Κάνναβη](#)
(τελευταία πρόσβαση στις 4/8/2023)

Regulation (EU) 1307/2013. Available online:
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:347:0608>
(τελευταία πρόσβαση στις 4/8/2023)

Regulation (EU) 2015/2283. Available online:
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2283&from=EN>
(τελευταία πρόσβαση στις 4/8/2023)

Kanabus J, Bryła M, Roszko M, Modrzewska M, Pierzgalski A. Cannabinoids—Characteristics and Potential for Use in Food Production. Molecules. 2021; 26(21):6723.

Fordjour E., Manful C. F., Sey A. A., Javed R., Pham H. T., Thomas R., Cheema M. 2023. Cannabis: a multifaceted plant with endless potentials. Memorial University of Newfoundland. p. 2-28

Radwan M. M., Chandra S., Gul S., ElSohly M. A. 2021. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. University of Mississippi. p. 2

Helcman, M., Šmejkal, K. 2022. Biological activity of Cannabis compounds: a modern approach to the therapy of multiple diseases. *Phytochem Rev* 21, p. 429–470

de Melo Reis R. A., Isaac A. R., Freitas H. R., de Almeida M. M., Schuck P. F., Ferreira G. C., Andrade-da-Costa B. Lara., Trevenzoli I. H. 2021. Quality of Life and a Surveillant Endocannabinoid System Vol.15. *Frontiers in Neuroscience*. p. 1-3

Glivar T., Eržen J., Kreft S., Zagožen M., Čerenak A., Čeh B., Benković E. T. 2020. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Industrial Crops and Products*, Volume 145. p. 5-7

Bautista JL, Yu S, Tian L. Flavonoids in *Cannabis sativa*: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology. *ACS Omega*. 2021 Feb 18;6(8):5119-5123.

Χαράλαμπος Προεστός, 2005, Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών αρωματικών φυτών, Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Ωραιοπούλου Β., Μηχανική Τροφίμων/ Βιβλίο Μαθήματος. 2020. 9^ο Εξάμηνο, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ. Σελ. 253-258

Τσιμογιάννης Δ., Μπιζύμης Α. 2022. Άσκηση 4/ Εκχύλιση στερεού- υγρού: Παραλαβή βιοδραστικών συστατικών από φυτικά υλικά. Μηχανική Τροφίμων Εργαστηριακές Ασκήσεις/ 9^ο Εξάμηνο Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Σελ. 23- 29

Brenna J.G., Butters J.R., Cowell N.D., Lilly A.E.V. 1976. *Food Engineering Operations*. 2nd Edition. Applied Science Publishers Ltd. London. p. 175- 207

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahrul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436

Isac-García J., Dobado J.A., Calvo-Flores F.G, Martínez-García H., 2016. Chapter 7: Basic Operation Experiments. In “Experimental Organic Chemistry: Laboratory Manual”, Elsevier, London, U.K.

Ravi K., Anil K. 2021. Advancements in steam distillation system for oil extraction from peppermint leaves. *Materials Today: Proceedings*, Volume 47, Part 17. p 5794-5799

Frassinetti, S.; Moccia, E.; Caltavuturo, L.; Gabriele, M.; Longo, V.; Bellani, L.; Giorgi, G.; Giorgetti, L. Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chem*. 2018, 262, 56–66

Lesma, G.; Consonni, R.; Gambaro, V.; Remuzzi, C.; Roda, G.; Silvani, A.; Vece, V.; Visconti, G.L. Cannabinoid-free *Cannabis sativa* L. grown in the Po valley: Evaluation of fatty acid profile, antioxidant capacity and metabolic content. *Nat. Prod. Res*. 2014, 28, 1801–1807

Drinic, Z.; Vidovic, S.; Vladic, J.; Koren, A.; Kiproviski, B.; Sikora, V. Effect of Extraction Solvent on Total Polyphenols Content and Antioxidant Activity of Industrial Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *Lek. Sirovine* 2018, 17–21

Teh, S.-S.; Bekhit, A.E.-D.; Birch, J. Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants* 2014, 3, 67–80

Mkpenie, V.N.; Essien, E.E.; Udoh, I.I. Effect of Extraction Conditions on Total Polyphenol Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Cannabis sativa* L. *EJEAFChe* 2012, 11, 300–307

Mourtzinou, I.; Menexis, N.; Iakovidis, D.; Makris, D.P.; Goula, A. A Green Extraction Process to Recover Polyphenols from Byproducts of Hemp Oil Processing. *Recycling* 2018, 3, 15

Allegrone, G.; Pollastro, F.; Magagnini, G.; Tagliatela-Scafati, O.; Seegers, J.; Koeberle, A.; Werz, O.; Appendino, G. The Bibenzyl Canniprene Inhibits the Production of Pro-Inflammatory Eicosanoids and Selectively Accumulates in Some *Cannabis sativa* Strains. *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 731–734.

Ahmed, M.; Ji, 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. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 2019, 17, 6961–6979

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

Isidore E, Karim H, Ioannou I. Extraction of Phenolic Compounds and Terpenes from *Cannabis sativa* L. By-Products: From Conventional to Intensified Processes. *Antioxidants*. 2021; 10(6):942

Thomas, B. F.; Pollard, G. T. Preparation and Distribution of Cannabis and Cannabis-Derived Dosage Formulations for Investigational and Therapeutic Use in the United States *Front. Pharmacol.* 2016

Brighentia, V.; Pellatía, F.; Steinbach, M.; Marana, D.; Benvenuti, S. Development of a New Extraction Technique and HPLC Method for the Analysis of Non-Psychoactive Cannabinoids in Fiber-Type *Cannabis Sativa* L. (Hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017. 143, 228–236

Kostic, M. D.; Jokovic, N. M.; Stamenkovic, O. S.; Rajkovic, K. M.; Milic, P. S.; Veljkovic, V. B. Optimization of Hempseed Oil Extraction by N-Hexane. *Ind. Crops Prod.* 2013. 48, 133–143

Σοφία Χανιώτη, 2019, Εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης φυτικών λιπαρών και βιοδραστικών συστατικών τους, Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Σχολή Χημικών Μηχανικών

Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, Sánchez-Contreras A, Pacheco N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*. 2017; 7(3):47

Izzo, L.; Castaldo, L.; Narváez, A.; Graziani, G.; Gaspari, A.; Rodríguez-Carrasco, Y.; Ritieni, A. Analysis of Phenolic Compounds in Commercial *Cannabis sativa* L. Inflorescences Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules* 2020, 25, 631

Calzolari, D.; Magagnini, G.; Lucini, L.; Grassi, G.B.; Appendino, G.; Amaducci, S. High added-value compounds from *Cannabis* threshing residues. *Ind. Crops Prod.* 2017, 108, 558–563

Flores-Sanchez, I.J.; Verpoorte, R. PKS Activities and Biosynthesis of Cannabinoids and Flavonoids in *Cannabis sativa* L. *Plants*. *Plant Cell Physiol.* 2008, 49, 1767–1782

Ferrante, C.; Recinella, L.; Ronci, M.; Menghini, L.; Brunetti, L.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Di Iorio, L.; Carradori, S.; Tirillini, B.; et al. Multiple pharmacognostic characterization on hemp commercial cultivars: Focus on inflorescence water extract activity. *Food Chem. Toxicol.* 2019, 125, 452–461

Agarwal, C.; Máthé, K.; Hofmann, T.; Csóka, L. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. Optimized by Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* 2018, 83, 700–710.

Destandau, E. & Michel, T. & Elfakir, C. (2013). Microwave-Assisted Extraction. 10.1039/9781849737579-00113.

Drinic, Z.; Vladic, J.; Koren, A.; Zeremski, T.; Stojanov, N.; Kiproviski, B.; Vidovic, S. Microwave-assisted extraction of cannabinoids and antioxidants from *Cannabis sativa* aerial parts and process modeling. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2020, 95, 831–839.

Jokić S, Jerković I, Pavić V, Aladić K, Molnar M, Kovač MJ, Vladimir-Knežević S. Terpenes and Cannabinoids in Supercritical CO₂ Extracts of Industrial Hemp Inflorescences: Optimization of Extraction, Antiradical and Antibacterial Activity. *Pharmaceuticals.* 2022; 15(9):1117

Kitryte, V.; Bagdonaite, D.; Rimantas Venskutonis, P. Biorefining of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) threshing residues into cannabinoid and antioxidant fractions by supercritical carbon dioxide, pressurized liquid and enzyme-assisted extractions. *Food Chem.* 2018, 267, 420–429

Teh, SS., Niven, B.E., Bekhit, A.ED.A. et al. The Use of Microwave and Pulsed Electric Field as a Pretreatment Step in Ultrasonic Extraction of Polyphenols from Defatted Hemp Seed Cake (*Cannabis sativa*) Using Response Surface Methodology. *Food Bioprocess Technol* 7, 3064–3076 (2014).

Bancuta, O.R., Chilia, A., Bancuta, I., Ion, R.-M., Setnescu, R., Setnescu, T., Gheboianu, A., 2016. Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics* 61, 1255–1264

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30

Harris, D.C. (2010). Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Τόμος ΙΙ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch; *Principles of Instrumental Analysis*, Edition 6 Illustrated, Publisher, Thomson Brooks/Cole, 2007

Ryu, B.R.; Islam, M.J.; Azad, M.O.K.; Go, E.-J.; Rahman, M.H.; Rana, M.S.; Lim, Y.-S.; Lim, J.-D. Conversion Characteristics of Some Major Cannabinoids from Hemp (*Cannabis sativa* L.) Raw Materials by New Rapid Simultaneous Analysis Method. *Molecules* 2021, 26, 4113.

Δημήτριος Τσιμογιάννης, 2008, Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών, Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Σχολή Χημικών Μηχανικών

Reimberg, Maria & Colombo, Renata & Yariwake, Janete. (2009). Multivariate analysis of the effects of soil parameters and environmental factors on the flavonoid content of leaves of *Passiflora incarnata* L., Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19. 853-859.

Murai, Y., Takemura, S., Kitajima, J., & Iwashina, T. (2009). Geographic variation of phenylethanoids and flavonoids in the leaves of *Plantago asiatica* in Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B. Botany*, 35, 131-140.

Gen Xue, Meijuan Zhu, Ning Meng, Jianli Guan, Jide Zhang, Jing Yang, Yuefei Wang, Ying Cui, Xin Chai, "Integrating Study on Qualitative and Quantitative Characterization of the Major Constituents in Shuanghuanglian Injection with UHPLC/Q-Orbitrap-MS and UPLC-PDA", *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2021, Article ID 9991363, 11 pages, 2021.

Kim J, Kang H, Choi H, Jo A, Oh D-R, Kim Y, Im S, Lee S-G, Jeong K-I, Ryu G-C, et al. Aqueous Extract of *Perilla frutescens* var. *acuta* Relaxes the Ciliary Smooth Muscle by Increasing NO/cGMP Content In Vitro and In Vivo. *Molecules*. 2018; 23(7):1777.

Reis, Adriana & Moura, Hélia & Silva, Breno & De Oliveira, Alaide & Brandão, Geraldo. (2020). Antiviral activity and chemical characterization of *Cissus erosa* (Vitaceae) ethanol extracts. *Rodriguésia*. 71.

Vanhoenacker G, Van Rompaey P, De Keukeleire D, Sandra P. Chemotaxonomic features associated with flavonoids of cannabinoid-free cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) in relation to hops (*Humulus lupulus* L.). *Nat Prod Lett*. 2002 Feb;16(1):57-63.

Motiejauskaitė D, Ullah S, Kundrotaitė A, Žvirdauskienė R, Bakšinskaitė A, Barčauskaitė K. Isolation of Biologically Active Compounds from *Cannabis sativa* L. Inflorescences by Using Different Extraction Solvents and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Antioxidants*. 2023; 12(5):998.

Quideau, S. (2006), *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. Edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. *Angewandte Chemie International Edition*, 45

Rencoret J, Rosado MJ, Kim H, Timokhin VI, Gutiérrez A, Bausch F, Rosenau T, Potthast A, Ralph J, Del Río JC. Flavonoids naringenin chalcone, naringenin, dihydrotricin, and tricetin are lignin monomers in papyrus. *Plant Physiol*. 2022 Jan 20; 188(1): 208-219

Šain, A., Matešić, N., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Valinger, D. & Gajdoš Kljusurić, J. (2020). OPTIMIZATION OF ETHANOL/WATER SOLVENT EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPONENTS ORIGINATING FROM INDUSTRIAL HEMP (*Cannabis sativa* L.). *Hrana u zdravlju i bolesti*, 9 (1), 30-39.