ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάλυση Συστατικών Αιθερίων Ελαίων και Εκχυλισμάτων από Είδη του Γένους *Pistacia*

ΤΑΤΙΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κατερινόπουλος Ε. Χαράλαμπος (Επιβλέπων)

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σμόνου Ιουλία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11

2. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Pistacia* 13

2.1 Η Γήρανση της Ρητίνης 15

2.2 Οξείδωση 16

2.3 Αποχρωματισμός Ρητινών (Κιτρίνισμα) 19

4. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ 21

4.1 Χαρακτηριστικά 21

4.2 Ο ρόλος στη φύση 22

4.2.1 α-Πινένιο Βιολογική δράση 23

5.1 Βασικές Αρχές 24

5.2 Οργανολογία GC-MS 24

5.3 Χρόνος Κατακράτησης (Retention Indices – RI) 26

6. ΤΕΡΠΕΝΙΑ 28

6.1 Βιοσύνθεση Τερπενίων 28

6.1.1 Βιοσύνθεση μεβαλονικού οξέος 28

6.1.2 Βιοσύνθεση Μονοτερπενίων 30

6.1.3 Βιοσύνθεση Σεσκιτερπενίων 32

6.1.4 Διτερπένια 33

6.1.5 Σεστετερπένια 33

6.1.6 Βιοσύνθεση Τριτερπενίων 34

6.2 *Pistacia lentiscus* L. : Τριτερπένια και θραυμάτωση MS 37

6.2.1 12-Ακόρεστα Ολεανένια και Ουρσένια 38

6.2.2 28-Νορ-17(18)-Ολεανένια 39

6.2.3 18-Ολεανένια 40

6.2.4 8- και 7- Τιρουκαλλένια (Ισομαστιχο- και Μαστιχο- Παράγωγα) 42

6.2.5 Δαμμαράνια 44

6.2.6 Λουπάνια 46

6.2.7 12-Λουπένια 47

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 48

8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 49

***8.1 Pistacia Lentiscus* var. *Chia*-Διαχωρισμός Όξινου και Βασικού Κλάσματος** ... 49

8.2 *Pistacia Lentiscus* L. – Διαχωρισμός Όξινου και Βασικού Κλάσματος 52

8.3 Μεθυλίωση Όξινου Κλάσματος-Παρασκευή Διαζωμεθάνιου 52

8.3.1 Σύνθεση Νιτροζομεθυλουρίας..... 52

8.3.2 Χρήση Νιτροζομεθυλουρίας για την παραγωγή διαζωμεθανίου και μεθυλίωση... 53

8.4 Αιθέριο έλαιο της *Pistacia lentisus* L. από την Κρήτη..... 54

8.5 Πειραματικές Συνθήκες Ανάλυσης..... 54

8.6 *Pistacia lentiscus* L. από την Νότια Κρήτη-Ρητίνη..... 56

8.6.1 Χρωματογραφική Ανάλυση και Προσδιορισμός του Τριτερπενικού Κλάσματος της Ρητίνης……..... 56

8.6.2 Ανάλυση Των Ουδέτερων Συστατικών..... 56

8.6.3 Φάσματα Μάζας 1ης Ομάδας Ουδέτερων Συστατικών..... 58

8.6.4 Ανάλυση της 2ης Ομάδας Ουδέτερων συστατικών-οι Μεθυλεστέρες..... 62

8.7 Ανάλυση του Αιθέριου Ελαίου της Ρητίνης & των Φύλλων της *Pistacia lentiscus* L. από τη Νότια Κρήτη 69

8.7.1 Αιθέριο Έλαιο Ρητίνης..... 69

8.7.2 Αιθέριο Έλαιο Φύλλων 74

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... 81

REFERENCES 82

Στα αδέλφια μου: Κωστή, Ιωάννα και Κατερίνα

Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, αλλά και για την υλικοτεχνική υποστήριξη, όπως επίσης και τον υπεύθυνο καθηγητή μου κύριο Κατερινόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια και το πολύ θετικό κλίμα που είχαμε στο εργαστήριο!

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου επειδή είναι αυτοί που είναι, τις συγκατοίκους μου και τους φίλους μου από Ηράκλειο και μη, για την ηθική και όχι μόνο στήριξη!

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Στέλιο από το Χωστόσπηλιο για τη γνωριμία μου με τη μαστίχα της Κρήτης και για τη φιλοξενία του στη συλλογή των δειγμάτων!

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Επώνυμο / Όνομα**:**	Κωνσταντινίδη Τατιανή
Τόπος γέννησης :	Αθήνα
Διεύθυνση:	Γαλάτειας Καζαντζάκη 4 ,Ηράκλειο
Τηλέφωνο:	6971827323
Ημερομηνία γέννησης:	18/121985

Εκπαίδευση

2004-2010 Φοίτηση στο τμήμα Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

2010 Πανεπιστήμιο Pardubice, Τσεχία

Εκπόνηση πτυχιακής εργασίας με τίτλο «Διαχωρισμός πολικών ενώσεων με χρήση Χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων(HILIC) σε Τριχοειδή Μονολιθική Στήλη»

2010-2014 Μεταπτυχιακό πρόγραμμα Πανεπιστημίου Κρήτης στο πρόγραμμα «Σύνθεση και Απομόνωση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα». Διπλωματική διατριβή με τίτλο «Ανάλυση εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων ειδών του γένους Pistacia»

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά Proficiency (University of Cambridge, University of Michigan)

Γερμανικά Zertifikat (Goethe Institut)

Συνέδρια & Σεμινάρια

2011	Συμμετοχή ως εθελόντρια στο ESOC που πραγματοποιήθηκε το 2011 στην Κρήτη (17th European Symposium on Organic Chemistry)
2013	Συμμετοχή στο σεμινάριο «Καινοτόμες Γεωργικές Επιχειρήσεις στον Τομέα των Φαρμακευτικών και Αρωματικών Φυτών», διοργάνωσης Agro-Know Technologies σε συνεργασία με την APIVITA και το μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης/Πανεπιστήμιο Κρήτης

CURRICULUM VITAE

Personal information

Surname / Name:	Tatiani Konstantinidi
Place of birth:	Athens
Address:	4 Galateia Kazantzakis, Heraklion
Phone:	6971827323
Date of birth:	18/12/1985

Education

2004-2010	Studies at the Chemistry Department of the Aristotle University of Thessaloniki
2010	University of Pardubice, Czech Republic Dissertation titled "Separation of polar compounds using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in Monolithic Capillary Column “
2010-2014	Graduate Program, University of Crete in the "Synthesis and Isolation of Natural Products with Biological Activity." M.Sc. thesis titled "Analysis of extracts and essential oils of species of the genus *Pistacia*» (pending)

Languages

English	Proficiency (University of Cambridge, University of Michigan)
German	Zertifikat (Goethe Institut)

Conferences and Seminars

2011	Participation as a volunteer at ESOC held in 2011 in Crete (17th European Symposium on Organic Chemistry)
2013	Participation in the seminar "Innovative Companies in the Agricultural Sector of Medicinal and Aromatic Plants", organized Agro-Know Technologies in collaboration with APIVITA and the Natural History Museum / University of Crete

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Pistacia lentiscus L.* της οικογένειας των ανακαρδοειδών είναι ένα μικρό αειθαλές δέντρο που φύεται στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου. Από τον κορμό του φυτού παράγεται μια ρητίνη με αξία θεραπευτική –και όχι μόνο- , αναγνωρισμένη από αρχαιοτάτων χρόνων. Είναι αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή. Σήμερα εκτός από θεραπευτικό χρησιμοποιείται ως άρτυμα και ως πρώτη ύλη υψηλής ποιότητας βερνικιού. Τα χρησιμοποιούμενα μέρη του φυτού είναι η ρητίνη και τα φύλλα, καθώς επίσης και οι καρποί. Η χημική σύσταση της ρητίνης αποτελείται από το πολυμερές β-πολυμυρκένιο, το τριτερπενικό κλάσμα και το αιθέριο έλαιο. Στα περισσότερα είδη *P. lentiscus* το τριτερπενικό κλάσμα αποτελείται από ένα ουδέτερο και ένα όξινο κλάσμα. Στο τριτερπενικό κλάσμα όμως της *P.lentiscus* από τη νότια Κρήτη απομονώθηκε μόνο ουδέτερο κλάσμα, το οποίο-όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση GC/MS- περιείχε ουδέτερα συστατικά που βρίσκονται στη ρητίνη δέντρων *P. lentiscus* καθώς επίσης και μεθυλεστέρες, των οποίων όμως μόνο τα αντίστοιχα οξέα απαντώνται σε ρητίνες *P.lentiscus* από άλλες ποικιλίες (πχ *P. lentiscus* var. *Chia*) και σε άλλες περιοχές. Από την ανάλυση του τριτερπενικού κλάσματος βρέθηκαν 16 ενώσεις από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν οι 10: έξι ουδέτερες ενώσεις και τέσσερις μεθυλεστέρες. Τα αιθέρια έλαια από τη ρητίνη και τα φύλλα αποστάχθηκαν σε μικροαποστακτήρα και σε αυτοσχέδιο επαγγελματικό αποστακτήρα αντίστοιχα. Η ανάλυση με GC-MS έδειξε 21 συστατικά στο αιθέριο έλαιο της ρητίνης και 58 στων φύλλων. Από αυτά ταυτοποιήθηκαν τα 17 και τα 51 αντίστοιχα. Στο αιθέριο έλαιο της ρητίνης το α-πινένιο αποτελεί το 94,56 %, ενώ σε άλλες αναφορές δεν ξεπερνάει το 79%.

ABSTRACT

Pistacia lentiscus L., a plant that belongs to the family of *Anacardiaceae,* is a small evergreen tree native to the Mediterranean region. The trunk of the plant produces a resin with therapeutic value - and not only - recognized since ancient times. It is an antioxidant and antimicrobial substance. Today, apart from its therapeutic use, it is known as a flavoring and as a raw material of high quality lacquer. The parts of the plant that are exploited by the industry are its resin, leaves, and fruits. The chemical composition of the resin is made of polymer β-polymyrcene, the triterpene fraction, and the essential oil. In most species, the *P. lentiscus* triterpene fraction comprises a neutral and an acidic fraction. However, the triterpene fraction of *P. lentiscus* from southern Crete contained only the neutral fraction, which-as assessed by GC/MS-contained neutral ingredients commonly found in the *P. lentiscus* resins, as well as methyl esters of triterpenic acids that are detected in their acid-free form in resins of other varieties (e.g. *P. lentiscus* var. *Chia*) in other regions. In the analysis of the triterpene fraction, 16 compounds were detected of which 10 were identified: six neutral compounds and four methyl esters.

The essential oils of the resin and leaves samples were collected by the use of a microdistillator and an improvised professional distillation system, respectively. Analysis by GC-MS showed 21 essential oil components in the resin sample and 58 in the leaves sample. 17 Components were identified from the former sample and 51 components from the latter, respectively. The resin-produced essential oil comprises 94.56% α-pinene, a value that never exceeded 79% in any literature report.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Pistacia lentiscus* L. της οικογένειας των ανακαρδοειδών είναι ένα μικρό αειθαλές δέντρο που φύεται στην ευρύτερη περιοχή της μεσογείου από την Τουρκία ως το Μαρόκο. Το ρετσίνι του φυτού είναι γνωστό ως μαστίχα. Το ρετσίνι αυτό εκκρίνεται φυσιολογικά από το δέντρο και έχει ως βασική λειτουργία την επούλωση της ‘’πληγής’’ από την οποία εκκρίθηκε. Έχει μεγάλη φαρμακευτική αξία και έχει χρησιμοποιηθεί από αρχαιοτάτων χρόνων ως θεραπευτικό στην Ελλάδα αλλά και σε πολλές άλλες χώρες, όπως στην Κίνα στην Ινδία[1] και στην Αίγυπτο. Το είδος που φύεται στο νησί της Χίου είναι ιδιαίτερο και μοναδικό στη σύσταση και στην οσμή.

Εικόνα 1. Ρητίνη ‘’ρέει’’ από δέντρο *Pistacia lentiscus*

Από το φυτό χρησιμοποιείται η ρητίνη, το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα αλλά και τη ρητίνη, ενώ από τους καρπούς παράγεται ένα πολύ πλούσιο εδώδιμο λάδι. Το λάδι είναι πλούσιο σε καροτενοειδή, α-τοκοφερόλη και ακόρεστα λιπαρά οξέα,[2] στοιχεία που το καθιστούν καλό επουλωτικό.[3] Επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το ‘’μαστιχόνερο’’, το υδατικό

απόσταγμα της απόσταξης του αιθέριου ελαίου. Έχει επίσης κάποιες αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες, αλλά παρουσιάζει τελείως διαφορετική σύσταση από αυτή του αιθέριου ελαίου.[4]

Η ρητίνη-ιδιαίτερα της ποικιλίας Chia- χρησιμοποιείται ως τσίχλα για μάσημα, ως άρτυμα σε γλυκά και ποτά, σε φαρμακευτικά σκευάσματα και εκχυλίσματα,[5] ενώ πρόσφατα άρχισε να εκτιμάται εμπορικά η αξία της στην κοσμετολογία. Η μαστίχα φέρεται ως επουλωτική,[6] αντιοξειδωτική και με καλές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Δρα προστατευτικά στο γαστρεντερικό σύστημα και ενάντια στο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού,[7] κατά του σακχαροδιαβήτη και προστατεύει από κολικούς και από δυσπεψία.[8] Επίσης γίνονται εκτεταμένες μελέτες οι οποίες δείχνουν προς το παρόν στοιχεία ότι η μαστίχα δρά ως πιθανό φάρμακο κατά του καρκίνου,[9] κατά των ελκών του στομάχου.[10,11]

Το αιθέριο έλαιο των φύλλων είναι αντιβακτηριακό[12], πλούσιο σε αντιοξειδωτικά[13] και έχει ευχάριστη μυρωδιά μαστίχας.

Στην παραδοσιακή ιατρική η μαστίχα χρησιμοποιείται για την προστασία της στοματικής κοιλότητας,[14] ως επουλωτικό, αντισηπτικό, για εντριβές ενάντια σε κρυολογήματα και φυσικά για την προστασία και θεραπεία του στομάχου.

Το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα και τη ρητίνη των διαφόρων ειδών της *Pistacia lentiscus* διαφέρουν σημαντικά ως προς τη σύσταση αλλά και την περιεκτικότητα σε διάφορα συστατικά. Το αιθέριο έλαιο ης μαστίχας Χίου αλλά και άλλων περιοχών αποτελεί περίπου 1-3% επί του καθαρού βάρους της. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από την ποιότητα και την ηλικία της μαστίχας. ‘Γηρασμένη’’ ρητίνη περιέχει μικρότερο ποσοστό αιθέριου ελαίου από ότι η πιο φρέσκια. Η ποσότητα όμως που μπορεί να αποσταχθεί από τη μαστίχα αυξάνεται έως και 50% με την προσθήκη 13% H_2PO_3.[15] Επίσης η περιεκτικότητα των συστατικών του αιθέριου ελαίου ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα την περιοχή και την περίοδο συλλογής.[16] Στην μαστίχα Χίου το ποσοστό του α-πινένιου έχει αναφερθεί σε ποσοστά από 21.7[17] έως 78.9 % .[18] Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων επικρατούν συστατικά όπως η τερπινεν-4-όλη, η α-τερπινεόλη και το β-καρυοφυλλένιο.[19]

Εκτός από τη θεραπευτική της αξία η μαστίχα χρησιμοποιούνταν (και χρησιμοποιείται ακόμα) από παλιά σε υψηλής ποιότητας βερνίκια, ειδικά για πίνακες ζωγραφικής.[20] Σε μια τελείως διαφορετική χρήση, αναλογίες συστατικών αντίστοιχα με της μαστίχας έχουν βρεθεί σε αρχαίες αιγυπτιακές μούμιες-απόδειξη ότι χρησιμοποιούνταν στο μίγμα της ταρίχευσης.[21,22]

Η αρχαιότερη πληροφορία για την Μαστίχα, προέρχεται κατά τον 5ο αιώνα π.Χ. από τον Ηρόδοτο (484-420 π.Χ.), ο οποίος αναφέρει χαρακτηριστικά ότι στην αρχαία Ελλάδα μασούσαν το αποξηραμένο ρητινώδες υγρό που ρέει από το φλοιό τον μαστιχόδεντρον[23,24] συγκλίνοντας σε έναν κοινό όρο για την μαστίχα αυτόν της «σχινικής ρητίνης». Οι πληροφορίες για το μαστιχόδενδρο, τη μαστίχα και το μαστιχέλαιο στα συγγράμματα των ανωτέρω, αφορούν κυρίως τις θεραπευτικές τους ιδιότητες και όχι λεπτομέρειες καλλιέργειας, συγκομιδής, χρήσης ή διακίνησής της. Για τη μαστίχα έχουν γίνει αναφορές από σημαντικά πρόσωπα των αρχαίων χρόνων. Από Έλληνες και Λατίνους γιατρούς, όπως ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ.), ο Διοσκουρίδης (1ος αιώνας μ.Χ.), και ο Γαληνός (131-202 μ.Χ.), αλλά και από ιστορικούς όπως ο Θεόφραστος (372-287 π.Χ.) και ο Πλίνιος (23-79 μ.Χ.).[25]

2. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Pistacia*

Δέντρα του γένους *Pistacia* συναντώνται στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου και στη Μέση Ανατολή. Είναι αειθαλείς θάμνοι που ευδοκιμούν σε ξηρά βραχώδη εδάφη. Διάφορα είδη περιλαμβάνουν την *Pistacia vera*, την *Pistacia lentiscus L.* και την *Pistacia terebinthus* L. Η μαστίχα είναι η ρητινώδης έκκριση του σχίνου του γένους *Pistacia lentiscus* της οικογένειας *Anacardiacaea.* Ανώτερης ποιότητας θεωρείται το ρετσίνι της *Pistacia lentiscus var Chia*, ποικιλία που φύεται αποκλειστικά στο νότιο τμήμα της Χίου. Ωστόσο η μαστίχα που παράγεται από τα μαστιχόδεντρα της υπόλοιπης μεσογείου έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για διάφορους σκοπούς θεραπευτικούς και μη.

Εικόνα 2. Δέντρα *Pistacia lentiscus var.Chia* από την Χίο και *Pistacia terebinthus* από την Κύπρο

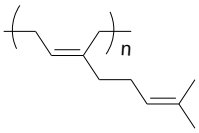
Τα είδη τον γένους *Pistacia* είναι έξι, όλα δίοικα δένδρα ή θάμνοι με ρητινώδη φλοιό και είναι τα εξής:

1. *Pistacia terebinthus*: Μικρό φυλλοβόλο δένδρο ή θάμνος που συναντάται σε όλες τις παραμεσόγειες περιοχές, μέχρι και την Πορτογαλία. Η ρητίνη που παράγει χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς.
2. *Pistacia atlantica*: Παρόμοιο με το προηγούμενο με περιορισμένη όμως εξάπλωση στην Βορειοανατολική Ελλάδα, ευρωπαϊκή Τουρκία και Κριμαία.
3. *Pistacia palestina*: Επίσης μικρό φυλλοβόλο δέντρο ή θάμνος. Συναντάται στις παραμεσόγειες περιοχές του Ισραήλ, Συρία και Παλαιστίνη.
4. *Pistacia vera*: Παρόμοιο με τα προηγούμενα, καλλιεργούμενο για τα βρώσιμα σπέρματα του στην Συρία, Μικρά Ασία και Βόρεια Ευρώπη.
5. *Pistacia chinensis*: Φυλλοβόλο δένδρο μέχρι 20 μ. ύψος, ελάχιστα γνωστό αλλά και ιδιαίτερα ευαίσθητο. Βρίσκεται στην κεντρική Κίνα και χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό.
6. *Pistacia lentiscus*: Μικρό αειθαλές δένδρο ή θάμνος που ευδοκιμεί στις ξηρές και ανοιχτές περιοχές ης Μεσογείου μέχρι και την Πορτογαλία.

Το είδος *Pistacia* προέρχεται από την κεντρική Ασία από όπου τα διάφορα είδη του γένους εξαπλώθηκαν γύρω από η Μεσόγειο και αποτελούν βασικά στοιχεία της μεσογειακής χλωρίδας. Πολλά είδη *Pistacia* παράγουν ρητίνη σε κάποιο βαθμό, όμως, μόνο δύο από αυτά, η *Pistacia lentiscus* και η *Pistacia atlantica* αξιοποιήθηκαν από αρχαιοτάτων χρόνων για την παραγωγή και εμπορία αυτού του προϊόντος.

ΤΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ

Αμέσως μετά τη χάραξη του σχίνου η υγρή μαστίχα αρχίζει να αναπτύσσει μια πολυμερικής φύσης ουσία, που στην αρχή είναι αρκετά μαλακή αλλά σκληραίνει με την πάροδο του χρόνου. Το πολυμερές αυτό που παράγεται γενικότερα σε όλη την συνομοταξία της οικογένειας των φυτών *Pistacia lentiscus* έχει αναφερθεί να είναι το cis-1,4 β-πολυμυρκένιο[26] και αποτελεί προϊόν πολυμερισμού από το μονοτερπένιο μυρκένιο.



cis-1,4-β-πολυμυρκένιο

2.1 Η Γήρανση της Ρητίνης

Η γήρανση της μαστίχας και γενικότερα των τριτερπενικών ρητινών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην οξείδωση, στον σταυρωτό πολυμερισμό και στην αποσύνθεση των ενώσεων της.[27,28] Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να γίνουν παρουσία φωτός είτε απουσία του.[29] Όλες οι παραπάνω συνεισφέρουν στην γήρανση αλλά η οξείδωση είναι ο σημαντικότερος παράγοντας και μπορεί να περιγράφει γενικά με τις παρακάτω αυτο-οξειδωτικές αλυσιδωτές αντιδράσεις μέσω ριζών.[30,31]

Έναρξη: **R-H + X** (εκκινητής) $\longrightarrow$ **R• + X-H** **(i)**

Διάδοση: **R• + O_2** $\longrightarrow$ **ROO•** **(ii)**
ROO• + R-H $\longrightarrow$ **ROOH + R•** **(iii)**

Παρεμπόδιση: **ROOH** $\longrightarrow$ **RO• + •OH** **(iv)**

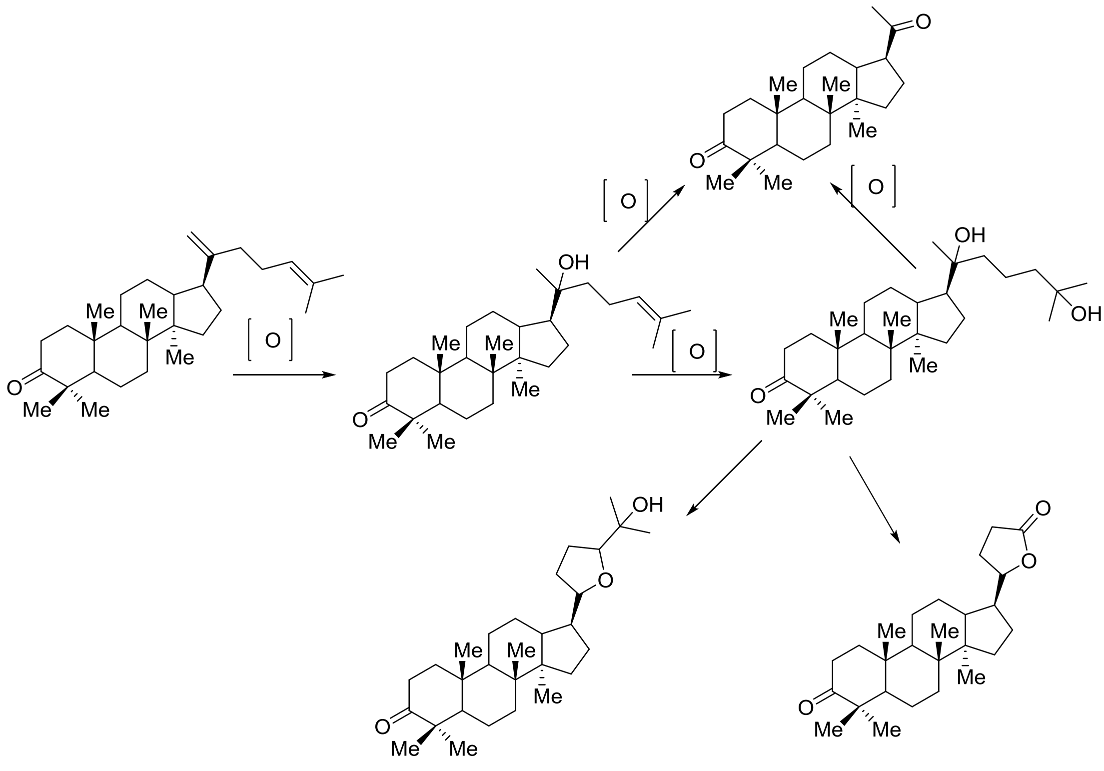
Τερματισμός: **RO• + R'O•** $\longrightarrow$ **ROOR'** **(v)**
RO• + R'• $\longrightarrow$ **ROR'** **(vi)**
R +R'• $\longrightarrow$ **RR'** **(vii)**

Όταν δημιουργηθεί η ρίζα **(i)** αντιδρά αμέσως με ένα διαθέσιμο μόριο οξυγόνου **(ii)**. Οι παραγόμενες υπεροξυ- ρίζες είναι σχετικά σταθερές και καθοριστικές για το στάδιο **(iii)** που είναι και το καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης. Η απόσπαση υδρογόνου από ένα μόριο στο

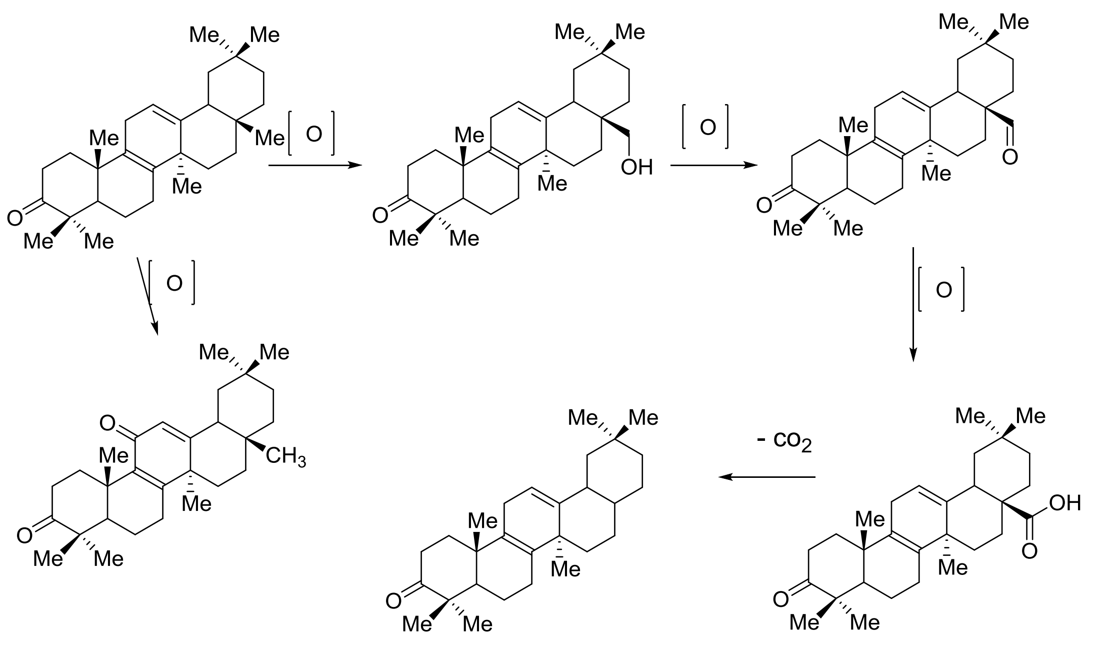
στάδιο **(iii)** ανταγωνίζεται επίσης με ην προσθήκη στους διπλούς δεσμούς, που δίνει το πρώτο βήμα στον αποχρωματισμό της ρητίνης. Ομολυτική διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων επάγεται με θερμότητα ή με φως εξαρτωμένου από την ενέργεια που απαιτείται στην **(iv)**, που παράγει αλκόξυ- ρίζες RO• , που είναι ιδιαίτερα δραστικές με αλκοόλες, αιθέρες και κετόνες. Μερικά από τα γνωστά προϊόντα οξείδωσης των φυσικών ρητινών, παρόλο που δεν αναμένονται από την διαδικασία των παραπάνω αντιδράσεων, υπάρχουν ενδείξεις ότι σχετίζονται με δευτερεύουσες αντιδράσεις αυτο-οξείδωσης.

2.2 Οξείδωση

Η οξείδωση στις φυσικές ρητίνες συμβαίνει και κατά την διάρκεια της ημέρας, αλλά και της νύχτας.[29] Μάλιστα έχει αποδειχτεί πως ο ρυθμός οξείδωσης τη νύχτα είναι ταχύτερος. Καταναλώνοντας οξυγόνο μέσω αντιδράσεων αυτο-οξείδωσης οδηγούμαστε σε προϊόντα που έχουν υδροξυ-, αιθερικές, καρβονυλικές και καρβόξυ- χαρακτηριστικές ομάδες. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η συνολική ποσότητα των τριτερπενοειδών μειώνεται συνεχώς προς την παραγωγή προϊόντων οξείδωσης. Η φυσική γήρανση οδηγεί σε οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας των τερπενοειδών με δαμμαρανικό ανθρακικό σκελετό στις θέσεις C-11, C-17 και C-28 (Σχήμα 1) αλλά και σε ολεανικούς και ουρσενικούς ανθρακικούς σκελετούς (Σχήμα 2). Παρεμφερή προϊόντα οξείδωσης έδωσε η τεχνητή γήρανση των τριτερπενοειδών ρητινών σε λάμπα φθορισμού και λάμπα ξένου χωρίς τις συχνότητες εκπομπής του υπεριώδους.

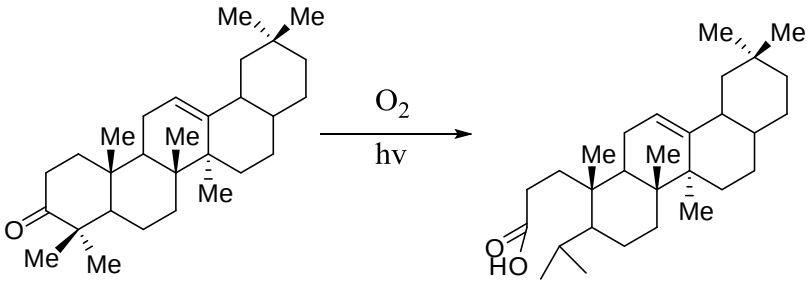


Σχήμα 1. Οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας τριτερπενίων με δαμμαρανικό σκελετό



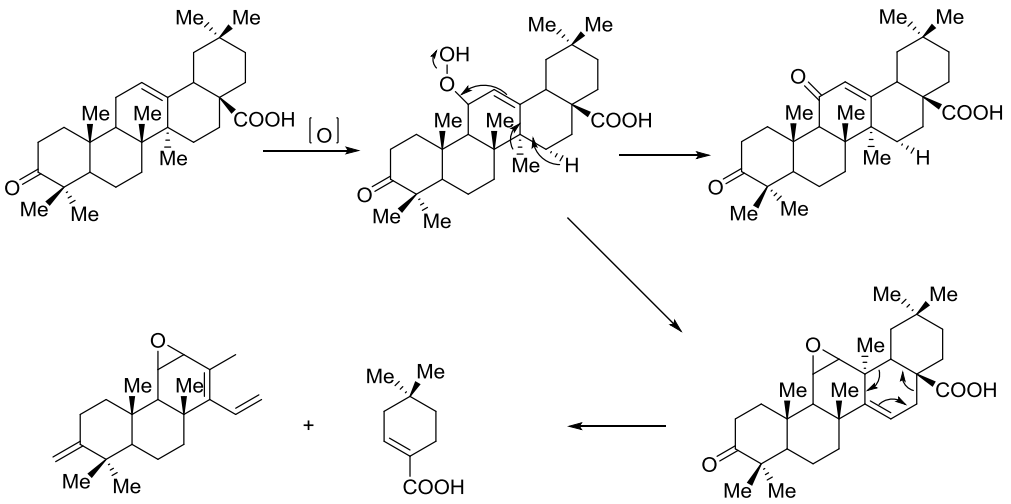
Σχήμα 2. Οξείδωση σε τριτερπένια με ολεανονικό σκελετό

Σε τεχνητή γήρανση σε υπεριώδες φώς παρατηρήθηκε η οξείδωση των τριτερπενοειδών δαμμαρανικού σκελετού στη θέση C-2 του δακτυλίου A (Σχήμα 3), κάτι το οποίο δεν παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες.[27]



Σχήμα 3. Οξείδωση δαμμαρανικού σκελετού μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία

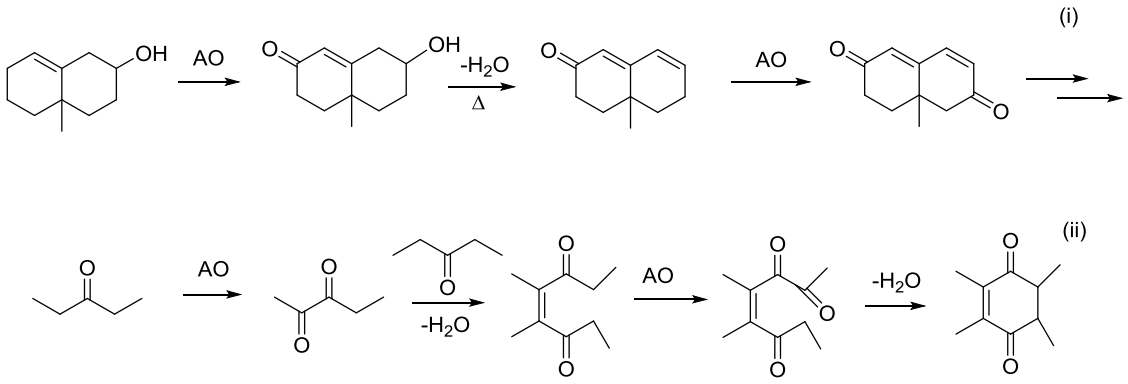
Τα περισσότερα προϊόντα είναι κετόνες που σχεδόν όλες οξειδώνονται περαιτέρω σε καρβοξυλικά οξέα μέσω αντιδράσεων τύπου Norrish. Απευθείας ακτινοβόληση πίσω από ένα γυάλινο παράθυρο, το οποίο δεν επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολίας με συχνότητα 310-315 nm δεν οδηγεί σε προϊόντα οξείδωσης του A δακτυλίου. Μια καινοτόμα διαδικασία αναπτύχτηκε για την τεχνητή γήρανση τριτερπενικών ρητινών σε διάλυμα με επακόλουθη ακτινοβόληση σε λάμπα φθορισμού. Η διαδικασία αυτή δίνει τα ίδια προϊόντα οξείδωσης με αυτά των φυσικών ρητινών. Αν το πολυμερές της ρητίνης αφαιρεθεί[32] η οξείδωση γίνεται εντονότερη και γρηγορότερη. Σύμφωνα με τα παραπάνω η εμπορικά διαθέσιμη ρητίνη (ακόμη και η φρέσκια) είναι κατά αρκετά μεγάλο βαθμό οξειδωμένη, για αυτό μελετούνται δείγματα αναφοράς για την διαδικασία γήρανσης κάτω από διαφορετικές συνθήκες, οι οποίες περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες. Ακόρεστες οξειδωμένες ενώσεις μπορούν να παραχθούν από την οξειδωτική μετατόπιση ενώσεων με ολεανονικούς ή ουρσανικούς ανθρακικούς σκελετούς, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ταραξερενίων (Σχήμα 4). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα αμυρίνης παρουσία φωτός.[33] Στην αντίστοιχη αντίδραση με ολεανονικό οξύ υπήρξαν ανάλογα αποτελέσματα. Οι ενώσεις με ταραξανικό σκελετό μπορούν εύκολα να δώσουν αντίδραση αντίστροφης Diels-Alder.[34] Παρόλα αυτά δεν έχουν βρεθεί ταραξερένια στις τριτερπενικές ρητίνες, αν και η ύπαρξή τους είναι πολύ πιθανή καθώς το ενδιάμεσο III σχηματίζεται εξαιρετικά εύκολα μέσω αυτο-οξείδωσης. Επίσης, το 11-οξο-ολεανονικό οξύ είναι πολύ συνηθισμένο στις φυσικές ρητίνες. Άρα η παρακάτω σειρά αντιδράσεων είναι αρκετά πιθανή.[35,36]



Σχήμα 4. Οξείδωση ενώσεων με ολεανονικούς ή ουρσανικούς ανθρακικούς σκελετούς

2.3 Αποχρωματισμός Ρητινών (Κιτρίνισμα)

Ο αποχρωματισμός είναι το εμφανές οπτικό φαινόμενο που παρατηρείται στις γηρασμένες ρητίνες και οφείλεται στις ακόρεστες κετόνες που σχηματίζονται κατά την αυτο-οξείδωση και απορροφούν στο μπλε 400-490 nm.[27,28] Σε πειραματικές διαδικασίες τεχνητής γήρανσης παρατηρήθηκε το εξής αξιοπερίεργο. Το κιτρίνισμα συμβαίνει στο σκοτάδι και όχι κατά την έκθεση τους στο φως, όπου η αυτο-οξείδωση είναι πολύ ισχυρότερη. Τα χρωμοφόρα του κιτρινίσματος δημιουργούνται με δυο τρόπους (Σχήμα 5):



Σχήμα 5. Δημιουργία χρωμοφόρων του κιτρινίσματος

(i) Σε μια διαδικασία δυο σταδίων που απαιτεί αλλυλική οξείδωση των διπλών δεσμών και απόσπαση της υδροξυλομάδας, που επεκτείνει την ακορεστότητα και οδηγεί στις συζυγιακές δικετόνες με επικείμενη αυτο-οξείδωση.

(ii) Συνδυασμός αντιδράσεων συμπύκνωσης συμπεριλαμβανομένης της αντίδρασης διμερισμού δυο κετονών, που με αυτο-οξείδωση δίνουν κίτρινου χρώματος ακόρεστες κετόνες. Τα προαναφερθέντα κίτρινα προϊόντα είναι αυτά που πιθανόν προκαλούν την ισχυρή απορρόφηση του πολυμερικού κλάσματος των ρητινών στα 400 nm. Αυτή η υπόθεση συμφωνεί με ενδείξεις που λένε ότι το κιτρίνισμα συνδέεται με το μεγάλο μοριακό βάρος των τριτερπενικών ρητινών. Το κιτρίνισμα γίνεται κατά κύριο λόγο στο σκοτάδι. Ρητίνες που εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία «λευκαίνονται» ακόμα και σε μικρά χρονικά διαστήματα έκθεσης. Οι διαδικασίες που συντελούνται δεν είναι ακόμα πολύ κατανοητές, και τα χρωμοφόρα που υπάρχουν δεν έχουν αναγνωριστεί πλήρως. Μερικές ενδείξεις για αυτή την υπόθεση προέρχονται από την υπέρυθρη φασματοσκοπία IR, καθώς μετά τη γήρανση των ρητινών έχουμε απορρόφηση στην περιοχή απορρόφησης των ακόρεστων καρβονυλικών ενώσεων. Η απορρόφηση αυτή είναι πιο έντονη μετά από θέρμανση. Αλλά δεν είναι ξεκάθαρο το πώς γίνεται αυτό απουσία φωτός γιατί υπήρχε η πεποίθηση πως η διαδικασία είναι φωτοεξαρτώμενη.

4. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

4.1 Χαρακτηριστικά

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά έλαια, που παράγονται από ορισμένα φυτά και είναι υπεύθυνα για τη χαρακτηριστική οσμή τους. Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά, εύφλεκτα, πτητικά σε κανονική θερμοκρασία και δεν αφήνουν κηλίδα σε διηθητικό χαρτί, σε αντίθεση με τα λιπαρά έλαια. Είναι άχρωμα έως υποκίτρινα με ελάχιστες εξαιρέσεις όπως το γαρυφαλέλαιο που είναι κιτρινοκαστανόχρωμο και όσα περιέχουν αζουλένιο, τα οποία είναι μπλε. Κατά την παραμονή τους επί πολύ χρόνο σκουραίνουν, ρητινοποιούνται και αλλοιώνεται η οσμή τους. Αιτία γι' αυτό είναι οι αυτό-οξειδώσεις, ο πολυμερισμός και οι υδρολύσεις των εστέρων. Η υγρασία, η θερμοκρασία και το φως επηρεάζουν τα αιθέρια έλαια γι' αυτό πρέπει να φυλάσσονται σε μικρά, γεμάτα και καλά κλεισμένα και προστατευμένα από το φως και τη θερμοκρασία δοχεία. Η πυκνότητα τους είναι γενικά χαμηλότερη του νερού. Χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη διάθλασης. Τα περισσότερα είναι οπτικώς ενεργά με στροφική ικανότητα που είναι συνήθως πολύτιμη διαγνωστική ιδιότητα. Είναι ελάχιστα διαλυτά στο νερό, ενώ είναι διαλυτά στον αιθέρα, πετρελαϊκό αιθέρα, αλκοόλη και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και στα έλαια.

Αποτελούνται από διάφορες οργανικές ενώσεις, κυρίως απο μονο- και σεσκιτερπένια, περιέχουν όμως και φαινυλοπροπανοειδή, θειούχες ή αζωτούχες ενώσεις, αλεικυκλικούς υδρογονάνθρακες κλπ. Το χαρακτηριστικό άρωμα κάθε αιθέριου ελαίου είναι συνισταμένη όλων των συστατικών του, αλλά πολλές φορές η παρουσία ενός μόνο συστατικού σε αναλογία 1% ή και μικρότερη, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αρώματος.

Πολλά αιθέρια έλαια ή συστατικά αυτών βρίσκουν εφαρμογή στην αρωματοποιία αλλά και στην ιατροφαρμακευτική. Αιθέρια έλαια ή μίγματα αυτών χρησιμοποιούνται σε σκευάσματα για διάφορες παθήσεις ή για καλλωπιστικούς σκοπούς.

Σε πολλά είδη η σύσταση του αιθέριου ελαίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του έτους, γεγονός που καθορίζει και την εποχή συλλογής του φυτού. Συχνά οι μεταβολές στη σύσταση όσο και στην απόδοση σε αιθέριο έλαιο συνδέονται με τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν τους διάφορους μήνες του έτους (διάρκεια ηλιοφάνειας, θερμοκρασία, υγρασία) ή ακόμη και με επιμολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς (ιδιαίτερα κατά τους μήνες με υψηλή βροχόπτωση). Σε κάθε περίπτωση η εποχή συλλογής επιλέγεται βάσει του επιθυμητού συνδυασμού σύστασης και απόδοσης σε αιθέριο έλαιο.

4.2 Ο ρόλος στη φύση

Ο ακριβής ρόλος των αιθέριων ελαίων δεν έχει γίνει ακόμη γνωστός, υπάρχουν όμως πολλές υποθέσεις κάποιες από αυτές είναι οι παρακάτω:

Προστασία του φυτού :

Μίγματα τερπενοειδών (όπως η λιναλοόλη και το λιμονένιο) ή άλλων ουσιών συσσωρεύονται συνήθως σε κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση όπως αδενώδεις τρίχες ή αδένες, με τη μορφή αιθέριων ελαίων. Οι δομές αυτές, είτε έχουν καθαρά αμυντικούς ρόλους, αφού τα προϊόντα τους παρουσιάζουν τοξική ή απωθητική δράση έναντι παθογόνων και φυτοφάγων, είτε συμβάλλουν στην προσέλκυση των επικονιαστών ή των φυτοφάγων.

Ως φερομόνες διαφόρων εντόμων :

Ορισμένα μονοτερπένια, συστατικά αιθερίων ελαίων δρουν ως φερομόνες εντόμων όπως η γερανιόλη, το μυρκένιο , το λιμονένιο και το α– και β–πινένιο.

Έναρξη αμυντικών μηχανισμών φυτού :

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ορισμένα πτητικά συστατικά, μεταξύ αυτών και τερπένια, διαδραματίζουν ρόλο σημάτων συναγερμού, αφού ελευθερώνονται από τραυματισμένους φυτικούς ιστούς και επάγουν αμυντικούς μηχανισμούς σε γειτονικά, μη τραυματισμένα φυτά

- μειώνουν την απώλεια του νερού με την διαπνοή.
- προσελκύουν τα έντομα, που μαζεύουν τη γύρη και βοηθούν έτσι στην αναπαραγωγή και επικονίαση.
- έχουν αντισηπτικές ιδιότητες και ενεργούν κατά των βακτηρίων, των μυκήτων και των ζυμών.
- για να τα βοηθήσουν να επηρεάσουν άλλα φυτά που αναπτύσσονται στην ίδια περιοχή (αλληλοπάθεια),
- ως αποθήκες ενέργειας
- για την επούλωση πληγών

- λόγω των διάφορων συστατικών που διαθέτουν έχουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες

4.2.1 α-Πινένιο Βιολογική δράση

Το α-πινένιο είναι συστατικό των αιθέριων ελαίων. Περιέχεται σε μεγάλα ποσοστά στα αιθέρια έλαια των κωνοφόρων και των φυτών με ρητινώδεις εκκρίσεις, όπως επίσης και στο αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου και του ευκαλύπτου. Αυτό είναι και το συστατικό που προσδίδει στα αιθέρια έλαια και στα εκχυλίσματα των παραπάνω σημαντικές ιδιότητες όπως η αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση.

Ως αντιοξειδωτικό βοηθά στην προστασία των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται από το ελεύθερο οξυγόνο και με τον ίδιο τρόπο διασφαλίζει την καλύτερη επούλωση των πληγών.[37]

Στα περισσότερα φυτά απαντώνται και τα δύο εναντιομερή του α-πινένιου, μόνο όμως το (+)-α-πινένιο παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.[38]

5. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS)

5.1 Βασικές Αρχές

Από τις αρχές τις δεκαετίας του '70 ξεκίνησαν οι πρώτες αναλύσεις για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων σε φρούτα και λαχανικά, με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας (GC). Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής ήταν ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας FID (Flame Ionization Detector).

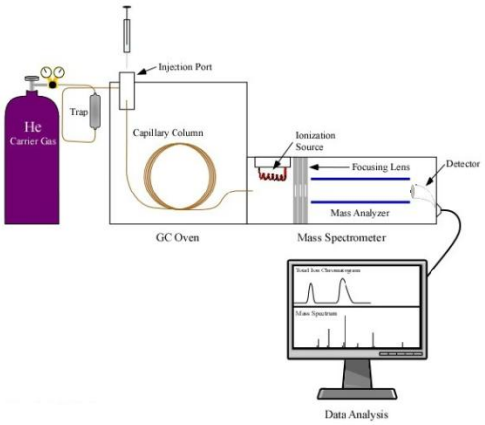
Η φασματοσκοπία μαζών είναι ίσως η τεχνική που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τη δομή ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων δειγμάτων καθώς και την ισοτοπική αναλογία σε δείγματα. Εντούτοις, η χρησιμότητα της στην ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων περιορίζεται λόγω του μεγάλου πλήθους παραγόμενων θραυσμάτων διαφορετικών τιμών m/z. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές στις οποίες φασματογράφοι μαζών συζευγνύονται με συστήματα διαχωρισμού. Όταν δυο ή περισσότερες τεχνικές ή όργανα διαχωρισμού συνδέονται για την δημιουργία ενός νέου και αποτελεσματικότερου οργάνου, τότε η προκύπτουσα τεχνική συχνά αναφέρεται ως «συζευγμένη τεχνική» (hyphenated technique). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύζευξη της αέριας χρωματογραφίας με τη φασματοσκοπία μαζών (GC-MS) μια τεχνική που έχει γίνει ένα από τα χρησιμότερα εργαλεία για την ανάλυση πολύπλοκων οργανικών και βιοχημικών μιγμάτων.

5.2 Οργανολογία GC-MS

Στην αέρια χρωματογραφία, ο διαχωρισμός των πτητικών συστατικών βασίζεται στην κατανομή μεταξύ ενός πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο).

Αρχικά τα δείγματα εισάγονται στον αέριο χρωματογράφο, όπου το μίγμα των συστατικών εξαερώνεται. Τα συστατικά κινούνται μέσα στη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες (χρόνος κατακράτησης), που εξαρτώνται από την τάση των ατμών τους και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Ο χρόνος παραμονής στην κινητή φάση, δηλαδή στο φέρον αέριο, είναι σταθερά ίδιος για όλα τα συστατικά του μίγματος και ονομάζεται νεκρός χρόνος tm . Πρακτικά, επομένως, ο χρόνος κατακράτησης μπορεί να εκφρασθεί ως η διαφορά του απόλυτου χρόνου κατακράτησης και του νεκρού χρόνου για μια συγκεκριμένη στήλη. Οι διαχωριζόμενες ενώσεις κατόπιν εισέρχονται απευθείας στο φασματογράφο μάζας. Οι ουσίες που εισέρχονται στο φασματογράφο μαζών θραυσματοποιούνται σε ιόντα (ion fragments). Η θραυσματοποίηση των ενώσεων είναι δυνατόν να γίνει με διάφορους τρόπους,

αλλά συνήθως επιτυγχάνεται με ακτινοβόληση με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων-Electron Impact).



Εικόνα 5, Διάταξη αέριου χρωματογράφου συνδυασμένου με φασματογράφο μάζας (GC-MS)

Τα αέρια μόρια τα οποία εξέρχονται από τη στήλη διαχωρισμού του αέριου χρωματογράφου, εισέρχονται στην πηγή ιονισμού του φασματογράφου μαζών. Εκεί βομβαρδίζονται με μία δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας (70 eV), η οποία είναι αρκετή για να προκαλέσει την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο, καθώς και να οδηγήσει στη διάσπαση συγκεκριμένων χημικών δεσμών. Το πρωταρχικό προϊόν θραυσματοποίησης είναι μονοφορτισμένα θετικά ιόντα ($M^{+\bullet}$). Το M αντιπροσωπεύει το μόριο της ουσίας και το $M^{+\bullet}$ το μοριακό ιόν της. Το μοριακό ιόν της εμπεριέχει αρκετή ενέργεια, η οποία οδηγεί στην διάσπαση χημικών δεσμών και στην δημιουργία νέων θετικών ιοντικών θραυσμάτων.

$$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$$

Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή των ιόντων ωθούνται στον αναλυτή μαζών, επιταχυνόμενα από μια σειρά ηλεκτροδίων. Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι αναλυτών μαζών, όπως ο αναλυτής μαγνητικού τομέα απλής και διπλής εστίασης (magnetic sector single and double focusing), ο τετράπολος αναλυτής (quadrupole), ο αναλυτής παγίδας ιόντων (ion trap) και ο αναλυτής χρόνου πτήσης (time-of-flight). Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z. Το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος, ως συνάρτηση του λόγου m/z, ονομάζεται φάσμα μαζών. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα φορτίο ίσο με τη μονάδα, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το «μοριακό βάρος» του ιόντος. Το μοριακό βάρος εκφράζεται σε μονάδες ατομικής μάζας (amu, atomic mass units) με βάση το ισότοπο του ^{12}C, που κατά συνθήκη αντιστοιχεί ακριβώς σε 12,000000 amu.

Η ένταση των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή καταγράφονται και παρουσιάζονται με τη μορφή του συνόλου των εντάσεων των ιόντων (TIC: Total Ion Current) ως γράφημα παρόμοιο με εκείνο ενός τυπικού αέριου χρωματογράφου. Πιο συγκεκριμένα στον άξονα Y παρουσιάζεται η ένταση του συνόλου των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή, ενώ στον άξονα X παρουσιάζεται ο χρόνος ή αριθμοί σάρωσης (scan numbers). Σε κάθε αριθμό σάρωσης, το όργανο έχει σαρώσει ένα πλήρες εύρος περιοχής λόγων m/z (π.χ. 40-500 m/z). Τα φασματόμετρα μαζών μπορούν να ρυθμιστούν έτσι, ώστε να σαρώνουν ένα εύρος m/z από 10 φορές/s μέχρι 1 φορά/s. Επομένως, κάθε αριθμός σάρωσης αντιστοιχεί με ένα φάσμα μάζας σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνονται τα φάσματα μαζών ολικής σάρωσης (full scan).

Η ταυτοποίηση των ουσιών δεν γίνεται μόνο με βάση τους χρόνους κατακράτησης αλλά επιβεβαιώνεται και με το φάσμα μάζας τους. Συγχρόνως, το σύστημα ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης, όπου είναι καταχωρημένα τα πρότυπα φάσματα μερικών χιλιάδων ενώσεων υποδεικνύεται μετά από σύγκριση εάν κάποιο συστατικό της ανάλυσης είναι καταγεγραμμένο στη βιβλιοθήκη (data bank).

5.3 Χρόνος Κατακράτησης (Retention Indices – RI)

Ο καθορισμός της ταυτότητας των συστατικών είναι ο κύριος σκοπός της ποιοτικής ανάλυσης και γι' αυτό έχει αναπτυχθεί ένας σημαντικός αριθμός τεχνικών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην χρωματογραφία. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πληροφορία για μια συγκεκριμένη κορυφή είναι η συμπεριφορά κατακράτησης είτε ως χρόνος κατακράτησης, είτε ως διορθωμένος χρόνος κατακράτησης. Ακόμα, εξαιρετικά χρήσιμη είναι η αρχή του χρόνου κατακράτησης, κατά την οποία ο διορθωμένος χρόνος κατακράτησης σχετίζεται με έναν αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης ενός επιλεγμένου πρότυπου συστατικού.

Στον υπολογισμό του χρόνου κατακράτησης των συστατικών χρησιμοποιείται μια ομόλογη σειρά ζυγών υδρογονανθράκων (C8-C24). Τα κανονικά αλκάνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολύ καλά αποτελέσματα ως συστατικά αναφοράς καθώς βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είναι εξαιρετικά σταθερά και εμφανίζουν τις λιγότερες ανωμαλίες. Επιπλέον η χρήση μιας οποιασδήποτε άλλης ομόλογης σειράς ενώσεων σε συνθήκες προγραμματιζόμενης λειτουργίας παρουσιάζει πολλές αποκλίσεις από τη γραμμικότητα χρόνου έκλουσης, αριθμού ατόμων C. Η απόκλιση αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη για τις ομόλογες σειρές πολικών ενώσεων και αυτός είναι ένας επιπλέον λόγος για την επιλογή της ομόλογης σειράς n-αλκανίων. Ο χρόνος κατακράτησης δίνεται από τον παρακάτω τύπο σύμφωνα με την εργασία τον Van den Dool & Kratz (1963):[39]

$$\mathrm{RI} = (100 \times n) + 100 \times \left[\frac{Rt_X - Rt_{Cn}}{Rt_{Cn+1} - Rt_{Cn}} \right] \qquad \text{(I)}$$

Όπου:

n: ο αριθμός των άνθρακα του υδρογονάνθρακα που προηγείται του συστατικού

Rt_x: ο χρόνος κατακράτησης (RI) του υπό εξέταση συστατικού

Rt_{Cn}: ο χρόνος κατακράτησης του υδρογονάνθρακα προηγείται του συστατικού

Rt_{Cn}+1: ο χρόνος κατακράτησης του υδρογονάνθρακα που έπεται του συστατικού

6. ΤΕΡΠΕΝΙΑ

6.1 Βιοσύνθεση Τερπενίων[40]

Στον φυτικό κόσμο μια πολύ μεγάλη κατηγορία ενώσεων με κοινή βιοσυνθετική προέλευση είναι τα τερπένια. Πρόκειται για ενώσεις που αποτελούνται από ισοπρενικές ομάδες, δομικές μονάδες πέντε ατόμων άνθρακα, οι οποίες με κατάλληλο συνδυασμό και σύνδεση με αλληλουχία ‘’κεφαλή-ουρά’’ οδηγούν σε σκελετούς με C5,C10,C15…C40. Ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενίων που αποτελούν το μόριό τους, τα τερπένια χωρίζονται σε κατηγορίες, ενώ ανάλογα με το βαθμό οξείδωσής τους μπορεί να είναι υδρογονάνθρακες, αλδεΰδες, κετόνες, φαινόλες και οξείδια. Κάθε κατηγορία προκύπτει από μια συγκεκριμένη μητρική ένωση. Τερπένια υπάρχουν σε όλα τα μέρη των ανώτερων φυτών, σε μύκητες, φύκη, λειχήνες αλλά και σε εκκρίματα εντόμων. Σπάνια είναι ζωικής προέλευσης. Αρκετά τερπένια χρησιμοποιούνται σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης - όπως καλλυντικά, φάρμακα, απορρυπαντικά και τρόφιμα (μενθόλη, καμφορά, βιταμίνη Α, λιμονένιο, β-καροτένιο κα). Συνοψίζοντας τα παραπάνω ο Leopold Ruzicka, τιμηθείς με το βραβείο Nobel το 1939 για την εργασία του στον τομέα των τερπενίων, διατύπωσε το 1953 το «**βιογενετικό κανόνα του ισοπρενίου»:**

i) Όλα τα τερπένια είναι μόρια με δομή πολλαπλάσια της μονάδας του ισοπρενίου

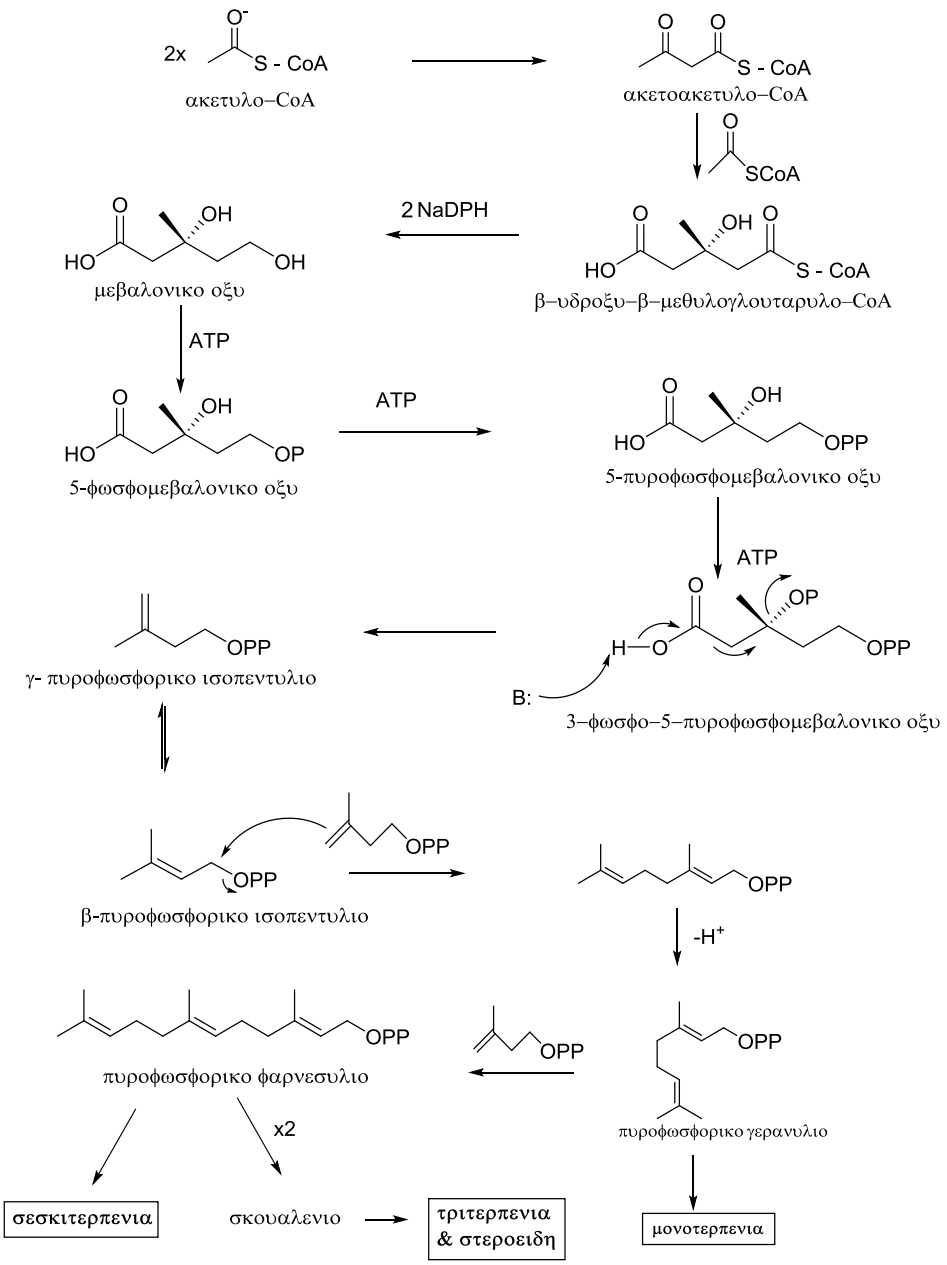
ii) Οι μονάδες του ισοπρενίου στα μόρια των τερπενίων συνδέονται **‘’κεφαλή-ουρά’’**

iii) Μια αρχικά σχηματισμένη δομή μπορεί στη συνέχεια, με διάφορες ενζυματικές πορείες, να αναδιαταχθεί με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ποικιλίας σκελετών με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα

6.1.1 Βιοσύνθεση μεβαλονικού οξέος

Το βασικό ενδιάμεσο για τη βιοσύνθεση μονάδων ισοπρενίου στη φύση είναι το **μεβαλονικό οξύ.** Η βιοσύνθεση του μεβαλονικού οξέος ξεκινά από το ακέτυλο-CoA. Δύο μόρια της βασικής αυτής μονάδας συμπυκνώνονται με αντίδραση τύπου Claisen προς ακετοακέτυλο-CoA. Μαζί με ένα άλλο ακέτυλο-CoA υφίστανται αλδολική συμπύκνωση και ακολούθως υδρόλυση, δίνοντας ως προϊόν το 3-ύδροξυ-3-μέθυλο-γλουτάρυλο-CoA. Αυτό παράγει μεβαλονικό οξύ με αναγωγή της θειολεστερικής ομάδας από δύο μόρια NADPH. Το

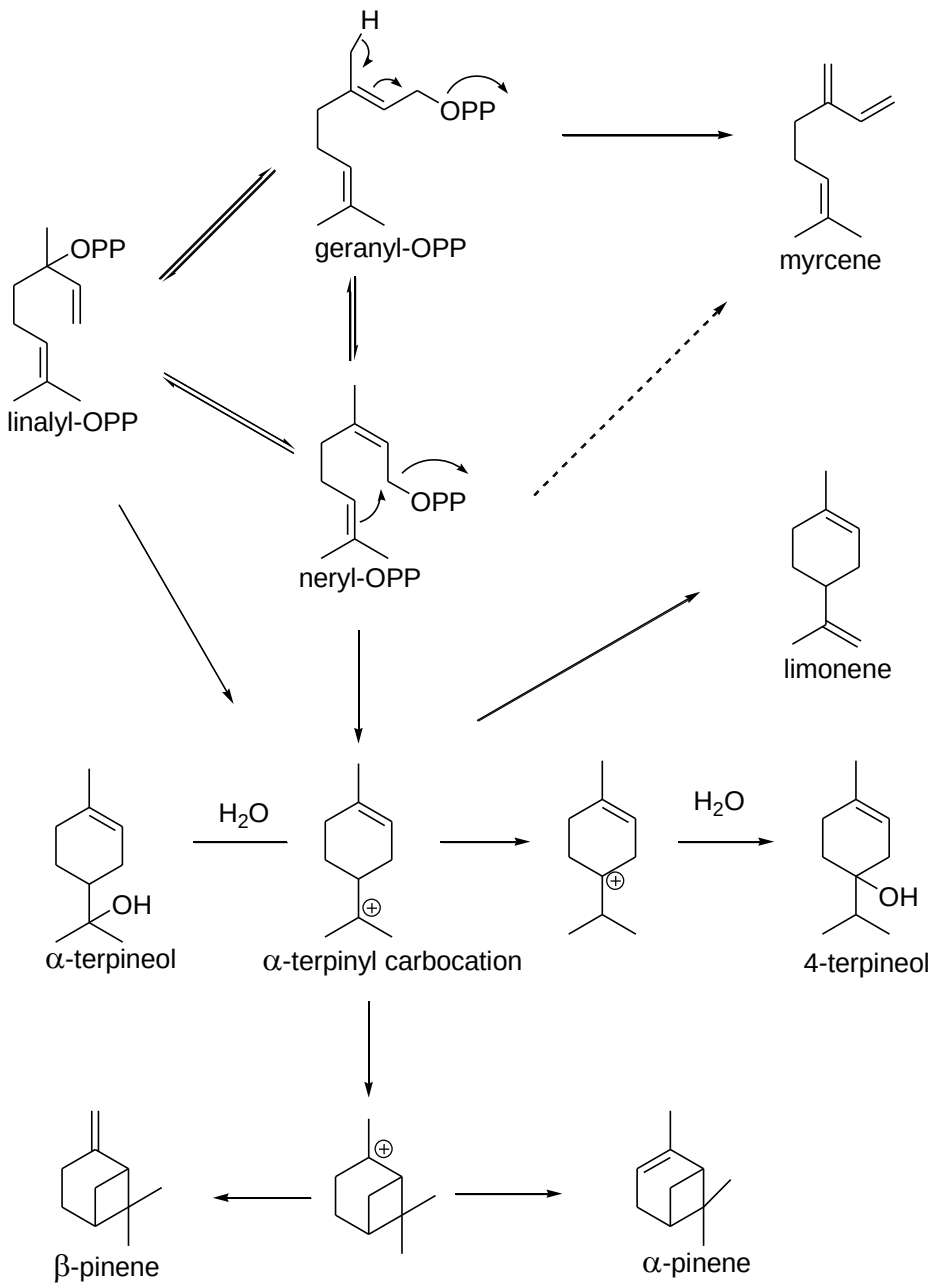
μεβαλονικό μετατρέπεται σε πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο μέσω 2 συνεχόμενων φωσφορυλιώσεων από ATP και μιας ταυτόχρονης αποκαρβοξυλίωσης και απόσπασης. Σχηματίζεται έτσι το γ-πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο. Στη βιοσύνθεση των τερπενίων, το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο κατέχει βασικό ρόλο αφού περιέχει την απαραίτητη για τη βιοσύνθεση τους ενεργή μονάδα ισοπρενίου. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει πως τα C_{10} και C_{15} πυροφωσφορικά αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις των μόνο- και σεσκιτερπενίων, αντίστοιχα.



Σχήμα 5. Βιοσύνθεση μεβαλονικού οξέος

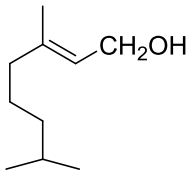
6.1.2 Βιοσύνθεση Μονοτερπενίων

Τα μονοτερπένια αποτελούνται από δύο μονάδες ισοπρενίου (C10). Κύρια πηγή των μονοτερπενίων είναι τα φυτά, απαντώνται όμως και σε εκκρίσεις εντόμων. Μητρική τους ένωση είναι ο πυροφωσφορικός εστέρας της γερανιόλης. Τα αιθέρια έλαια των φυτών αποτελούνται σε πολύ μεγάλο ποσοστό από μονοτερπένια. Διακρίνονται σε άκυκλα, μονοκυκλικά και δικυκλικά.

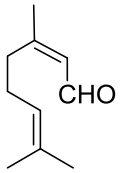


Σχήμα 6. Βιοσύνθεση ορισμένων μονοτερπενίων

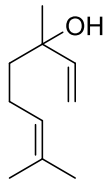
α) Άκυκλα :



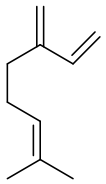
γερανιολη



κιτραλη

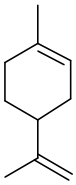


λιναλοολη

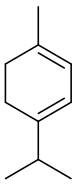


μυρκενιο

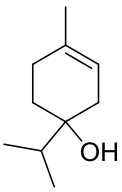
β) Μονοκυκλικά :



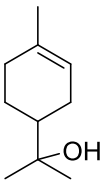
λιμονενιο



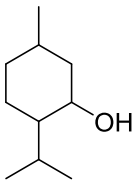
α–τερπινενιο



τερπινεν–4–ολη

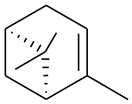


α–τερπινεολη



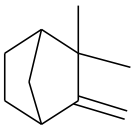
μενθολη

γ) Δικυκλικά :

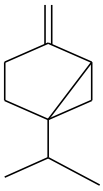


α–πινενιο

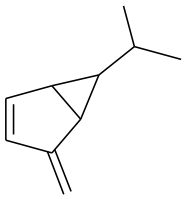
β–πινενιο



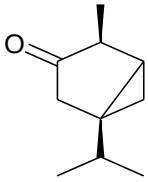
καμφενιο



σαμπινενιο



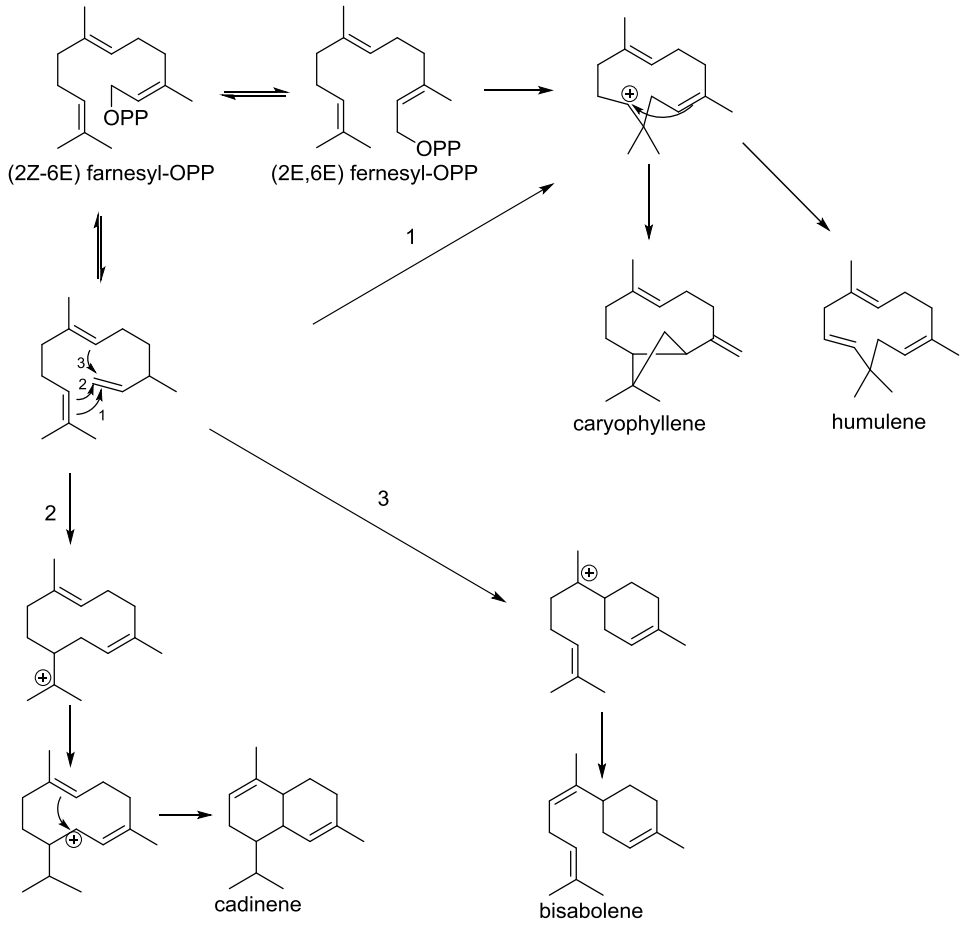
θουγια–2,4(10)–ενιο



α–θουγιονη

6.1.3 Βιοσύνθεση Σεσκιτερπενίων

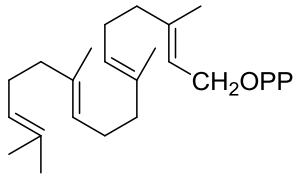
Τα σεσκιτερπένια αποτελούνται από τρείς μονάδες ισοπρενίου, δηλαδή 15 άτομα άνθρακα. Μητρική τους ένωση είναι ο πυροφωσφορικός εστέρας της φαρνεσόλης. Μαζί με τα μονοτερπένια αποτελούν τα βασικά συστατικά των αιθέριων ελαίων. Απαντώνται όμως και σε μύκητες και στις εκκρίσεις ορισμένων εντόμων. Ανάλογα με τον αριθμό δακτυλίων τους χωρίζονται σε άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά και τρικυκλικά.



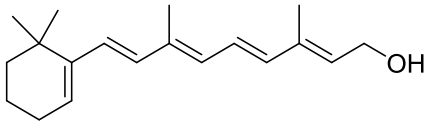
Σχήμα 7. Βιοσύνθεση ορισμένων σεσκιτερπενίων

6.1.4 Διτερπένια

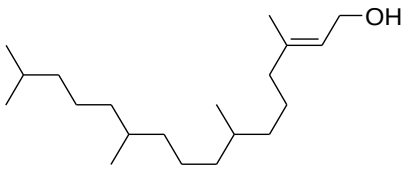
Τα διτερπένια αποτελούνται από τέσσερις μονάδες ισοπρενίου, δηλαδή 20 άτομα άνθρακα. Μητρική τους ένωση είναι ο φωσφορικός εστέρας της γερανυλογερανιόλης. Απαντώνται στα ανώτερα φυτά και στους μύκητες, αλλά κυρίως στις ρητίνες των κωνοφόρων, αλλά δεν αποστάζουν με υδρατμούς. Χαρακτηριστικό των διτερπενίων είναι οι λίγοι αντιπροσωπευτικοί σκελετοί που έχουν βρεθεί στη φύση αλλά και η ύπαρξη και των δύο στερεοχημικών αντίποδων. Ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων που περιέχει ο σκελετός τους διακρίνονται σε άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά, τρικυκλικά και τετρακυκλικά.



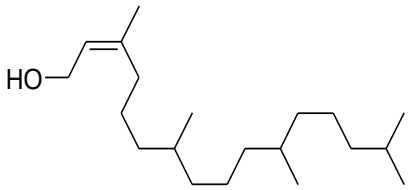
Geranylgeranyl diphospahate



Retinol (Vitamin A)



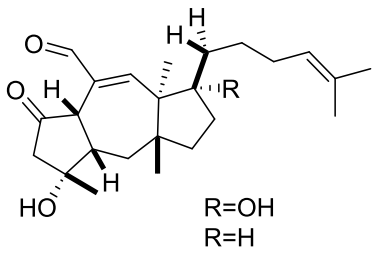
trans-phytol



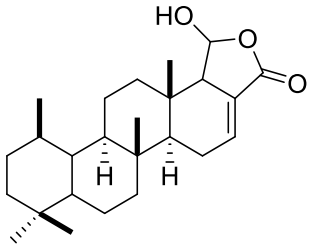
cis-phytol

6.1.5 Σεστετερπένια

Τα σεστετερπένια αποτελούνται από πέντε μονάδες ισοπρενίου, δηλαδή από 25 άτομα άνθρακα. Είναι η σπανιότερη ομάδα τερπενίων με τις λιγότερες αντιπροσωπευτικές ενώσεις. Η πρόδρομη ουσία τους είναι η γερανυλοφαρνεσόλη. Απαντώνται σε μύκητες, θαλάσσιους σπόγγους, λειχήνες και στις εκκρίσεις κάποιων εντόμων. Παράδειγμα αποτελούν οι οφιομπιολίνες και η σκαλαρίνη.



ophiobolins



scalarin

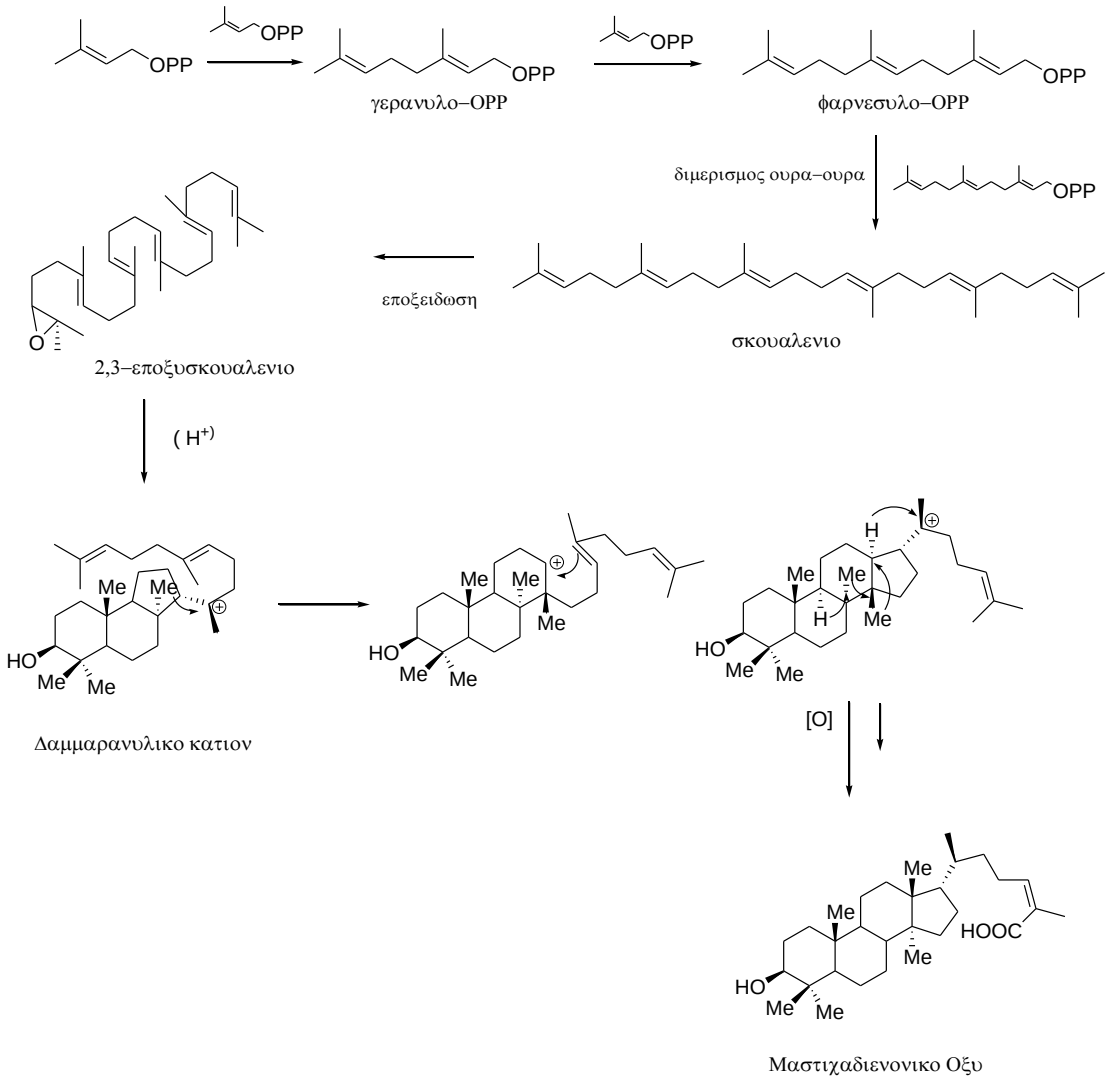
6.1.6 Βιοσύνθεση Τριτερπενίων

Τα τριτερπένια αποτελούνται από έξι μονάδες ισοπρενίου, δηλαδή από τριάντα άτομα άνθρακα. Είναι η πιο διαδεδομένη τάξη τερπενίων στη φύση όπου συναντώνται ως γλυκοζίτες ή σε ελεύθερη κατάσταση, παρόλα αυτά έχει περιορισμένο αριθμό αντιπροσωπευτικών σκελετών. Πρόδρομή τους ένωση είναι το σκουαλένιο. Η πρώτη παρατήρηση ισοπρενοειδούς ουσίας στο ζωικό βασίλειο ήταν η απομόνωση σκουαλενίου από ηπατέλαιο καρχαριοειδών. Το σκουαλένιο είναι επίσης πρόδρομη ουσία των στερολών και των στεροειδών.

Κυκλοποιήσεις του σκουαλενίου στους ζωικούς οργανισμούς πραγματοποιούνται με οξείδωση του σκουαλενίου προς εποξείδιο σε έναν τελικό διπλό δεσμό. Με πρωτονίωση του εποξειδίου, αυτό ανοίγει και δημιουργείται έτσι το χαρακτηριστικό -OH στη θέση στον C3 των τριτερπενίων σε ισημερινή θέση. Επίσης δημιουργείται ένα καρβοκατιόν, το οποίο προσβάλλεται από τον διπλανό του διπλό δεσμό κοκ, αποτελώντας έτσι το σημείο έναρξης των κυκλοποιήσεων με αποτέλεσμα τέσσερις ή πέντε δακτυλίους.

Ανάλογα με τη διάταξη του σκουαλένιου κατά την κυκλοποίησή του προκύπτει αντίστοιχο προϊόν. Οι σημαντικότερες διατάξεις είναι :

1) Ανάκλιντρο-λουτήρας-ανάκλιντρο-λουτήρας
2) Ανάκλιντρο-ανάκλιντρο-ανάκλιντρο-λουτήρας

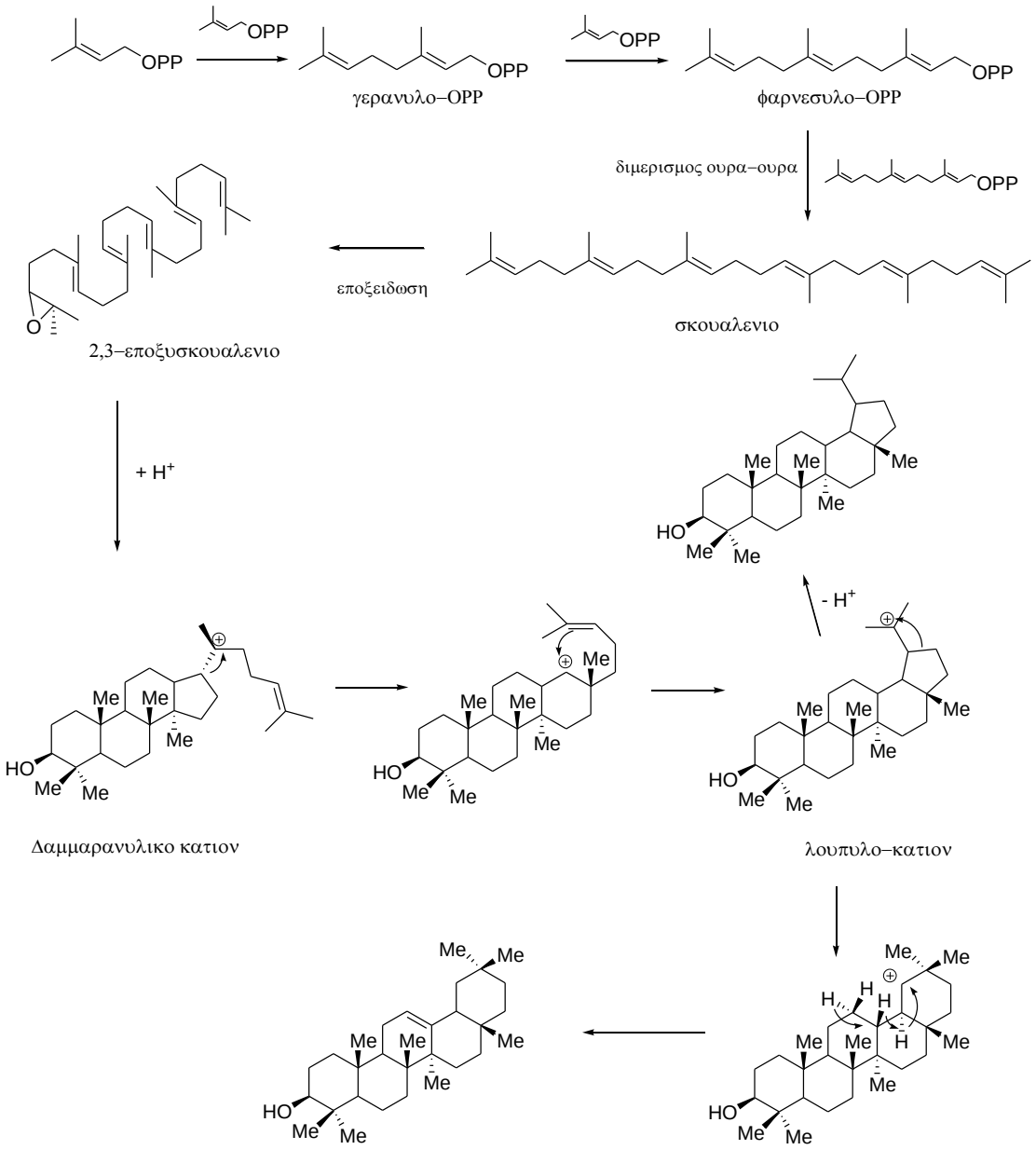


Σχήμα 8. Βιοσύνθεση μαστιχαδιενονικού οξέος

Το καρβοκατιόν που καθορίζει τη δημιουργία του τετρακυκλικού σκελετού είναι το δαμμαρινυλο-κατιόν.

Ακολούθως περιγράφεται το βιοσυνθετικό μονοπάτι των πεντακυκλικών β-τριτερπενίων, όπως είναι τα ολεανένια και τα λουπένια.

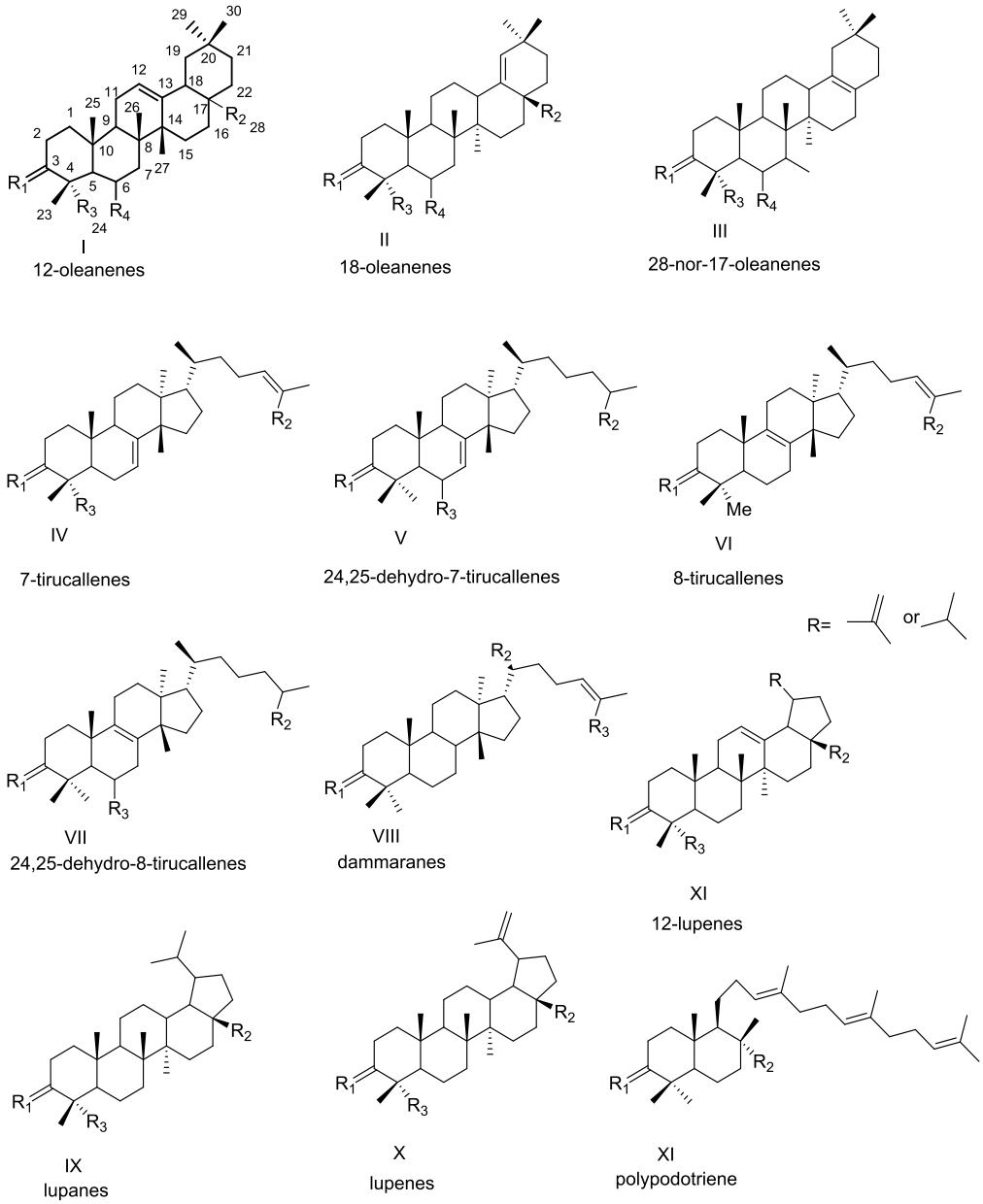
Το καρβοκατιόν που καθορίζει τη δημιουργία του πεντακυκλικού σκελετού είναι το λούπυλο-κατιόν.



Σχήμα 9. Βιοσυνθετικό μονοπάτι των πεντακυκλικών β-τριτερπενίων

6.2 *Pistacia lentiscus* L. : Τριτερπένια και θραυμάτωση MS

Σύμφωνα με παλιές αλλά και σύγχρονες αναφορές, το ρετσίνι από δέντρα *Pistacia lentiscus* [41,42,43,44,45,46,47,48] περιέχει τριτερπένια, τα οποία είναι παράγωγα συγκεκριμένων σκελετικών δομών. Κάθε ένας από αυτούς τους τριτερπενικούς σκελετούς παρουσιάζει διαφορετική θραυσματοποίηση μάζας. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι διαφορετικοί υποκαταστάτες δίνουν διαφορετικά m/z, μας βοηθά στο να αναγνωρίσουμε το είδος της ένωσης που έχουμε καθώς επίσης και το είδος των υποκαταστατών.

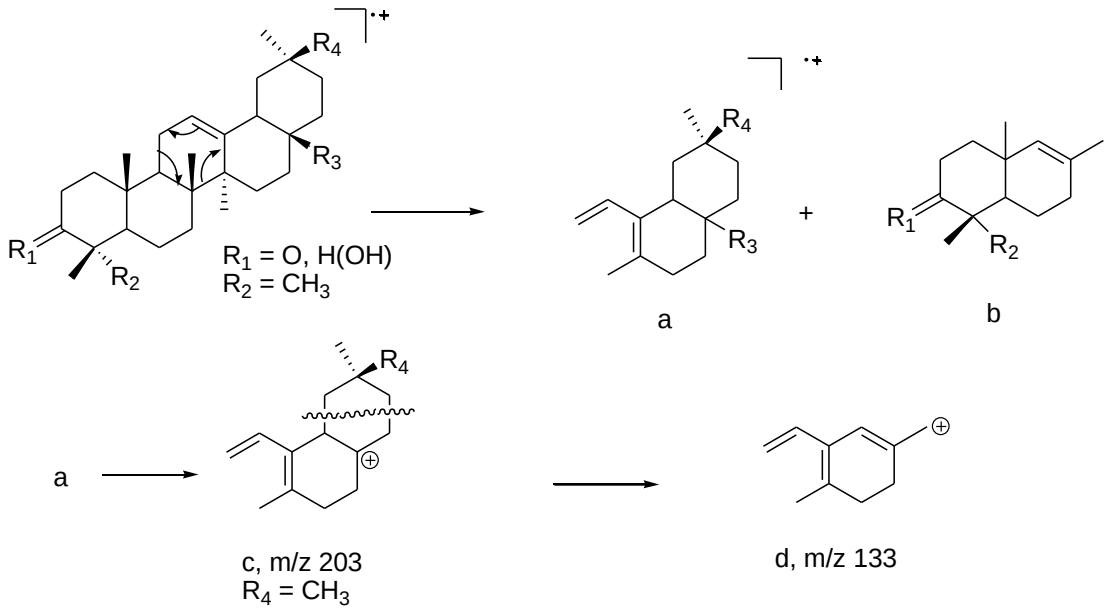


Σχήμα 10. Δομές ανθρακικών σκελετών τριτερπενίων που απαντώνται ως συστατικά στο *P. lentiscus*

6.2.1 12-Ακόρεστα Ολεανένια και Ουρσένια

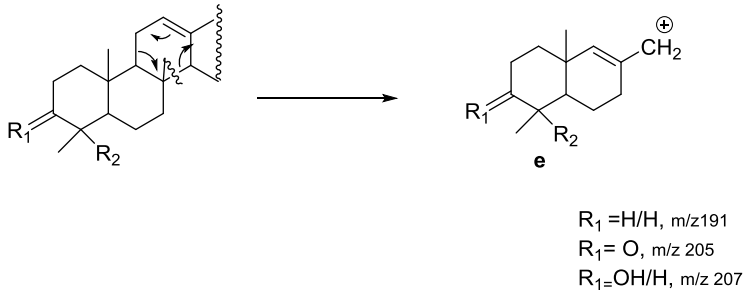
Τα 12-ακόρεστα ολεανένια έχουν πολύ χαρακτηριστική θραυσμάτωση[49] η οποία οφείλεται σε μια αντίδραση αντίστροφης Diels-Alder στον δακτύλιο C δίνοντας το χαρακτηριστικό ιόν α. Η θραυσμάτωση της αντίστροφης Diels-Alder είναι πολύ χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την ένδειξη της ύπαρξης του 12(13) διπλού δεσμού των α και β-αμυρινών. Το ιόν α δίνει με περαιτέρω θραυσμάτωση το ιόν c με m/z 203, στο μέθυλο-ολεανένιο είναι 262, ενώ για τις β-αμυρίνη και β-αμυρόνη είναι 218. Το ιόν c (m/z 203) παρουσιάζεται και στις δύο περιπτώσεις, ενώ οι ομάδες που δημιουργούνται (απόσπαση της εστερικής ομάδας –$COOCH_3$ (m/z 59) και μιας μεθυλομάδας –CH_3 (m/z 15), χάνονται. Σε ενώσεις με τον C17 υποκατεστημένο με μεθύλιο, το ιόν α υπερτερεί κατά πολύ από το c. Αν όμως ο υποκαταστάτης είναι καρβομεθόξυ ομάδα, τότε υπάρχουν σχεδόν ισόποσα τα ιόντα αυτά (α και c). Περαιτέρω σχάση του ιόντος c -στο πάνω μέρος των 12-ολεανενίων- δημιουργεί το μικρής έντασης ιόν d. Άρα **οι εντάσεις των ιόντων α και c υποδηλώνουν τη φύση του υποκαταστάτη του C17** (αρίθμηση όπως στη δομή I, Σχήμα 10)**.**

Εδώ το ιόν c συνοδεύεται πάντα από ένα λιγότερο έντονο ιόν, με δεκατέσσερις μονάδες μάζας λιγότερες (189 m/z), ενώ το ιόν α συνοδεύεται από μια χαμηλής έντασης κορυφή, με δεκατρείς μονάδες μάζας λιγότερες (π.χ. για το methyl oleanolate είναι 262-14=249 m/z). Το ιόν c υφίσταται περαιτέρω αποδόμηση, χάνει εβδομήντα μονάδες μάζας και δίνει το ιόν d (συνήθως χαμηλής έντασης). Η υποκατάσταση στον δακτύλιο A ή B δεν μεταβάλλει την μάζα του ιόντος α (Σχήμα 11). Τα παραπάνω αφορούν στο πάνω μέρος του μορίου του 12-ολεανένιου.



Σχήμα 11. Χαρακτηριστικά θραύσματα 12-ακόρεστων ολεανενίων, αποδιδόμενα σε αντίστροφη Diels-Alder

Υπάρχει ακόμη ένα ιόν (c) το οποίο είναι από τα πιο χαρακτηριστικά θραύσματα των πεντακυκλικών τριτερπενίων και εξαρτάται από τη φύση των υποκαταστών των δακτυλίων A και B. Το ιόν c είναι χαμηλής έντασης στα 12- ακόρεστα ολεανένια.



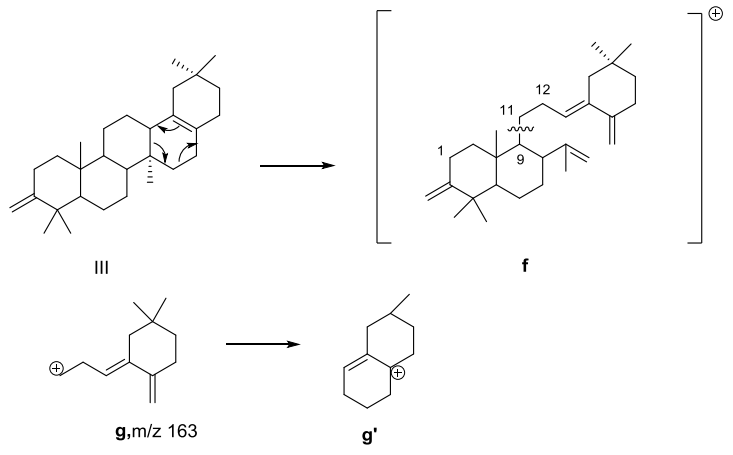
Σχήμα 12. Χαρακτηριστικά θραύσματα των πεντακυκλικών τριτερπενίων

Συνοψίζοντας στα 12- ακόρεστα ολεανένια εμφανίζονται χαρακτηριστικές κορυφές στα :

203, 189,133 m/z (οφειλόμενα σε αντίστροφη Diels Alder)
207 (αν R_1=OH), 205 (αν R_1=O), 191 (αν R_1=H/H)-χαμηλής εντάσεως κορυφές

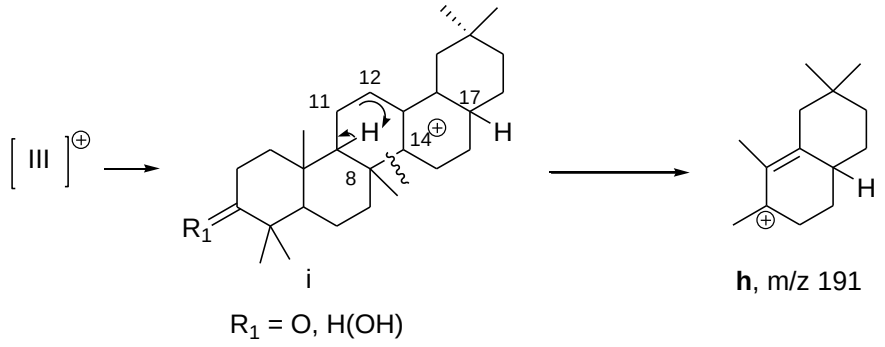
6.2.2 <u>28-Νορ-17(18)-Ολεανένια</u>

Τα πιο χαρακτηριστικά και σε μεγαλύτερη αφθονία θραύσματα στα 28-νορ-17(18)-ολεανένια (163 m/z) οφείλονται σε αντίστροφη αντίδραση Diels Alder. Άνοιγμα του δακτυλίου D με αντίστροφη Diels Alder, δίνει το ενδιάμεσο f. Δύο δεσμοί είναι πιθανό να διασπαστούν περαιτέρω, οι 9-11 και οι 11-12. Όταν διασπάται ο 9-11, σχηματίζεται το ιόν g (m/z 163, Σχήμα 13), το οποίο μετασχηματίζεται στο πιο σταθερό ιόν g΄.



Σχήμα 13. Θραυσμάτωση 28-νορ-17-ολεανενίων, λόγω αντίστροφης Diels Alder

Η δεύτερη υψηλότερη κορυφή στο φάσμα εμφανίζεται στα 191 m/z (h, Σχήμα 14), και το θραύσμα πιθανότατα προκύπτει από τη σχάση των δεσμών 11-12 και 8-14. Όποια και αν είναι η υποκατάσταση των δακτυλίων A και B, **τα βασικά θραύσματα των 28-νορ-17(18)-ολεανονίων είναι τα m/z 163 και 191.**

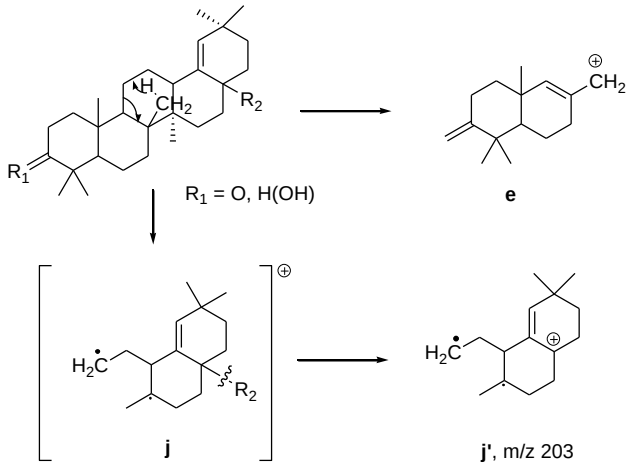


Σχήμα 14. Τα βασικά θραύσματα των 28-νορ-17(18)-ολεανονίων

6.2.3 <u>18-Ολεανένια</u>

Η προτεινόμενη θραυσματοποίηση εδώ δίνεται με βάση τις πιο αντιπροσωπευτικές ενώσεις, όπως ο μορωνικός μεθυλεστέρας (R_1=O, R_2= $COOCH_3$), ο μορωλικός μεθυλεστέρας (R_1=OH/H, R_2=$COOCH_3$), το 18-ολεανένιο (R_1=H/H, R_2=CH_3), και η οξική γερμανικόλη (R_1=OAc, R_2=CH_3). Όλες οι παραπάνω ενώσεις χάνουν τον υποκαταστάτη του C 17, λόγω αλλυλικής ενεργοποίησης, χάρη στον διπλό δεσμό των 18-19. Η διάσπαση του δακτυλίου C,

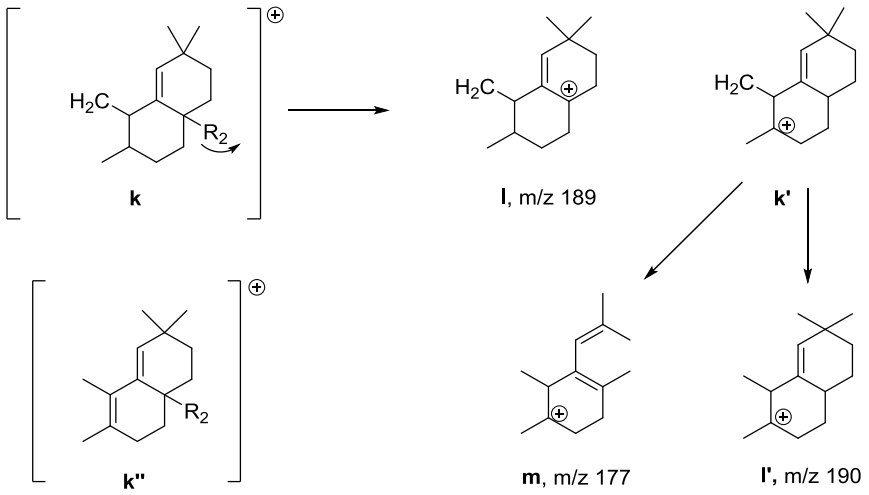
δίνει το χαρακτηριστικό θραύσμα e (m/z 205 για παράγωγα με R_1=O, 207 όταν R_1=OH, 191 όταν R_1=H/H), ενώ ένα ιόν (Σχήμα 15, j), σχηματίζεται κατά την ίδια διάσπαση, χωρίς μετάθεση υδρογόνου (m/z 262 για τον μορωνικό και μορωλικό μεθυλεστέρα και m/z 218 για το 18-ολεανένιο) .



Σχήμα 15. Προτεινόμενη θραυσματοποίηση στα 18-Ολεανένια

Το θραύσμα j, χάνει επιπλέον τον υποκαταστάτη του C17 δίνοντας το j' (m/z 203 σε όλες τις περιπτώσεις). Στα 18-ολεανένια το θραύσμα m/z 189 εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη ένταση, ακολουθούμενο από το 203, ενώ η φύση του R_1 υποκαταστάτη αναγνωρίζεται από την ύπαρξη των m/z 191, 207 ή 205.

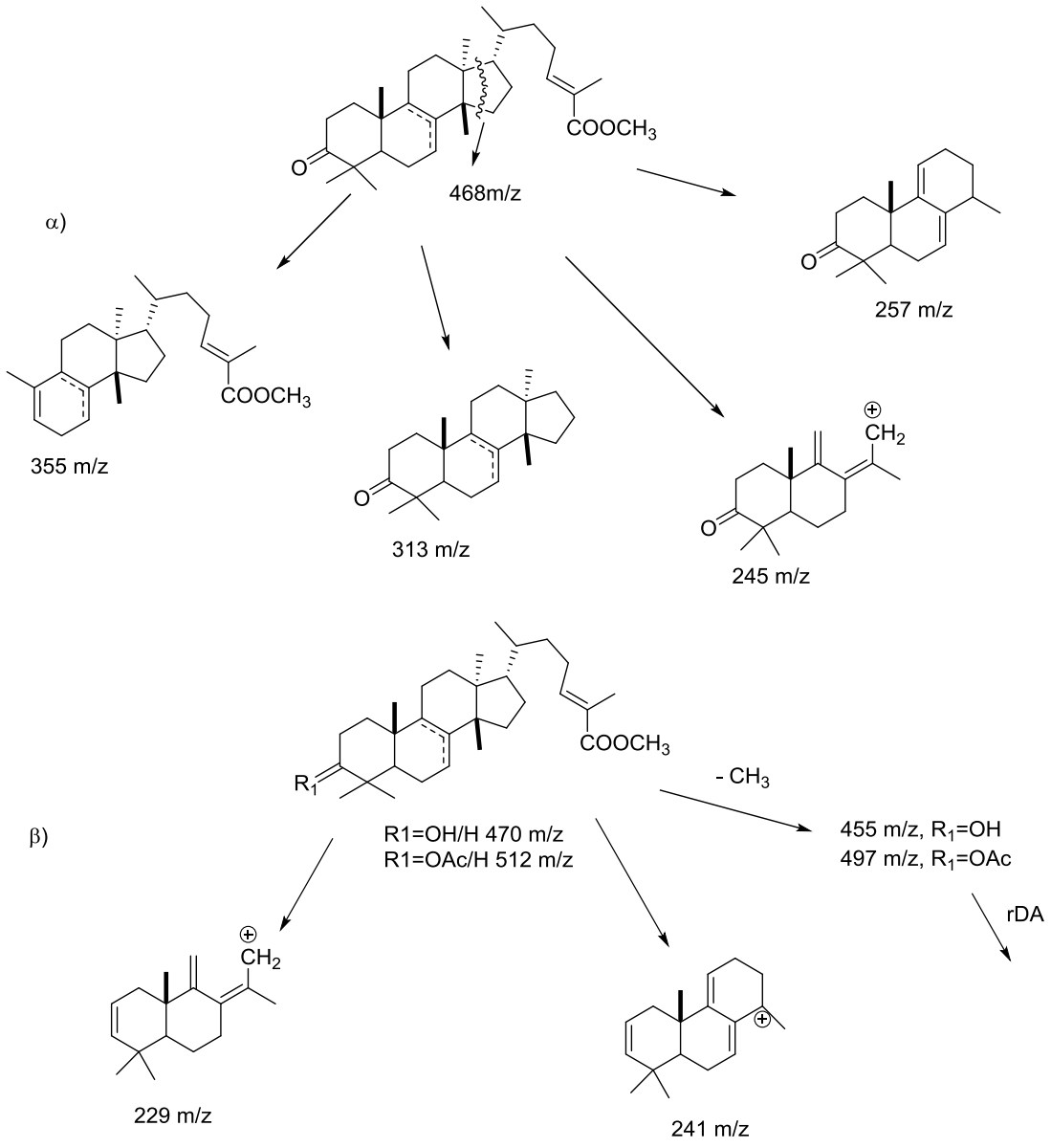
Εναλλακτικά σχάση του 11-12 διπλού δεσμού (με η χωρίς μετατόπιση υδριδίου) δίνοντας τα ιόντα k, k' (Σχήμα 16, m/z 204, 205 για 18-ολεανένια με R_2=CH_3, m/z 248, 249 για R_2=$COOCH_3$ και l, l' αντίστοιχα με απομάκρυνση του υποκαταστάτη C17. Στα 18-ολεανένια με μεθύλιο στον άνθρακα 17 (R_2), εμφανίζεται μια κορυφή στα m/z 177.



Σχήμα 16. Εναλλακτική θραυσμάτωση 18- ακόρεστων ολεανίων

6.2.4 <u>8- και 7- Τιρουκαλλένια (Ισομαστιχο- και Μαστιχο- Παράγωγα)</u>

Παλαιότερες αναφορές[50] χαρακτηρίζουν τα Ισομαστιχο- και Μαστιχο- παράγωγα ως μόρια με λανοστανικό σκελετό, ωστόσο ξέρουμε πλέον ότι αυτό είναι λάθος και είναι πλέον γνωστό το ότι πρόκειται για παράγωγα τιρουκαλλενίων.[44]



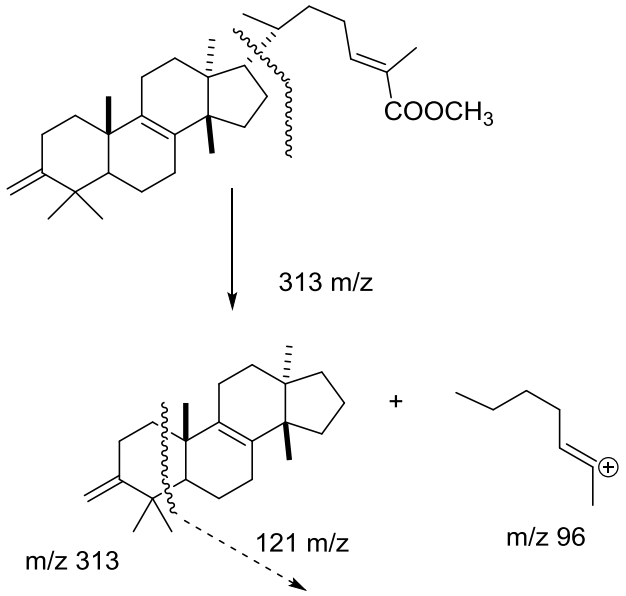
Σχήμα 17. βασικές θραυσματώσεις στα τιρουκαλλένια

Οι βασικές θραυσματώσεις παρουσιάζονται στο σχήμα 17α για R_1=O και στο σχήμα 17β για R_1=OH/H ή OAc/H.

Χαρακτηριστικά θραύσματα των 7- και 8-τιρουκαλλενίων είναι στα m/z 95, 55, 257, 315 και 249. Τα ιόντα στα m/z 121 και 241 υποδεικνύουν ισομαστίχα-παράγωγα (8-τιρουκαλλένια), ενώ τα m/z 127 και 227 υποδεικνύουν μαστίχα-παράγωγα (7-τιρουκαλλένια). Το ιόν στα m/z 257 αντιστοιχεί σε θραυσμάτωση τύπου [M-πλευρικής αλυσίδας του δακτυλίου D-CH_3]$^+$, ενώ στα m/z 313 προκύπτει από την απόσπαση της [M-πλευρικής αλυσίδας]$^+$.

Τα επιμερή μόρια διαφέρουν από τα αρχικά μόνο στη θέση του 3-υδροξυλίου, το οποίο έχει να κάνει με τη δυνατότητα απόσπασης ενός μορίου νερού από το μοριακό ιόν. Το α-επιμερές προτείνεται από την ύπαρξη του m/z 189, ενώ το β-επιμερές από την ύπαρξη του m/z 161. Όταν το m/z [M-18] δεν είναι υψηλής έντασης, τότε προτείνεται αξονική διευθέτηση β τύπου, ενώ όταν είναι υψηλής έντασης προτείνεται αξονική διευθέτηση τύπου α.

Έτσι από την προτεινόμενη θραυσμάτωση για τα τιρουκαλλένια παίρνουμε τα ιόντα m/z 95 και 55 σε μεγάλη αφθονία καθώς επίσης και το ιόν στα m/z 121 (Σχήμα 18), το οποίο είναι χαρακτηριστικό για τα 8-τιρουκαλλένια.



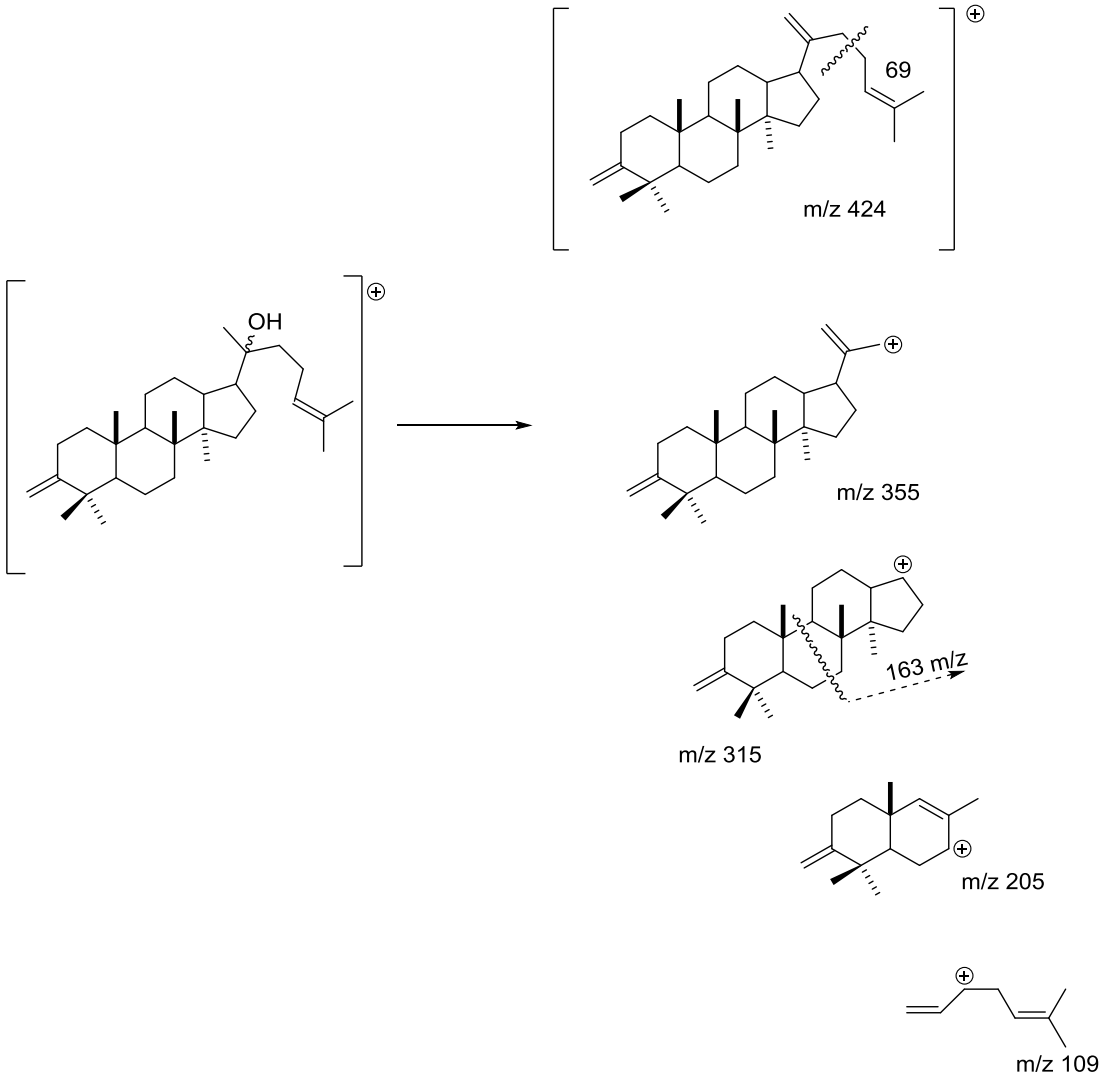
Σχήμα 18. Προτεινόμενη θραυσμάτωση για την εξήγηση της παρουσίας των ιόντων m/z 95, 55, 121 στα τιρουκαλλένια

6.2.5 Δαμμαράνια

Διάνοιξη πλευρικής αλυσίδας του δαμμαρανικού σκελετού της υδροξυδαμμαρενόνης (Σχήμα 10, R_1=O, R_3=CH_3, R2=(OH)CH_3), στον άνθρακα 17 δίνει ιόν m/z 315 και όχι όπως λανθασμένα έχει αναφερθεί[51] στο παρελθόν σε m/z 355. Διάνοιξη του δακτυλίου C ακολουθούμενη από μεταφορά υδριδίου στον δαμμαρανικό σκελετό, δίνει ιόν με m/z 205 (Σχήμα 19). Χαρακτηριστικό και σε αφθονία είναι επίσης το ιόν με m/z 109 . Στο Σχήμα 19

φαίνεται επίσης η θραυσμάτωση των ιόντων m/z 69, 355 και 163, τα οποία είναι χαρακτηριστικά για τα δαμμαρανικά παράγωγα.

Κατά τη γήρανση της ρητίνης, παρατηρήθηκαν ορισμένα οξειδωμένα δαμμαρανικά παράγωγα εκεί όπου η πλευρική αλυσίδα ήταν φουρανικό παράγωγο. Εδώ διάνοιξη του δακτυλίου C ακολουθούμενη από μεταφορά υδριδίου δίνει επίσης θραύσμα m/z 205 (Σχήμα 19).Τα θραύσματα m/z 399 και η μητρική κορυφή στα m/z 143 είναι χαρακτηριστικά για αυτού του τύπου τα μόρια (οξιτιλλόνες), που προκύπτουν από τη σχάση της πλευρικής αλυσίδας. Το θραύσμα στα m/z 143 υποδεικνύει την ύπαρξη μιας υδροξυ-προπυλο-μεθυλο-τετραϋδροφουρανικής πλευρικής αλυσίδας.

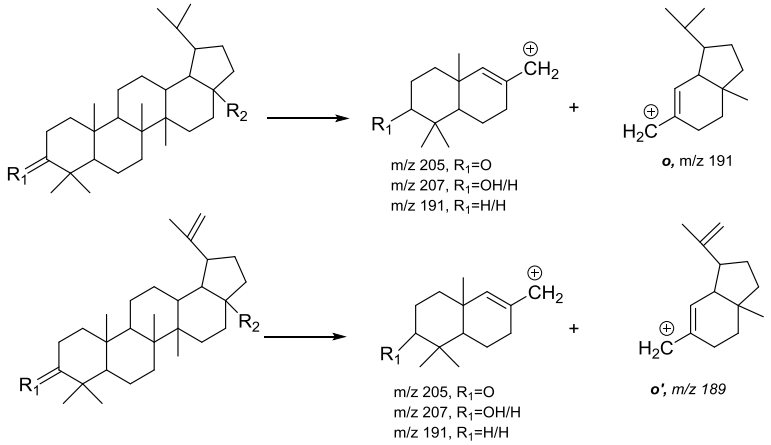


Σχήμα 19. Χαρακτηριστική θραυσμάτωση της υδροξυδαμμαρενόνης και γενικά των δαμμαρανίων

6.2.6 Λουπάνια

Τα λουπάνια χαρακτηρίζονται από τον πενταμελή δακτύλιο Ε, στον οποίο συνδέεται μια ισοπρόπυλο- ή ισοπροπένυλο- ομάδα στον άνθρακα 19 (σχήμα 20). Η απώλεια αυτών των ομάδων έχει ως αποτέλεσμα την αποχώρηση m/z 43, κυρίως σε λίγο-υποκατεστημένα μόρια. Η 3-Λουπανόνη είναι η πιο αντιπροσωπευτική ένωση αυτής της ομάδας (Σχήμα 10, IX, R_1=O, R_2=CH_3) . Υφίσταται απώλεια ενός μεθυλίου (*m/z* 411), και μια ισοπροπυλο-ομάδας (m/z 383). Σε μεγαλύτερη αφθονία στα λουπάνια με κορεσμένη ή ακόρεστη πλευρική αλυσίδα είναι το θραύσμα *e* (Σχήμα 15), στα *m/z* 205 όταν R_1=O, ή m/z 207 όταν R_1=OH/H. Το θραύσμα προκύπτει όπως στα 12- και τα 18-ολεανένια. Στα λουπάνια με κορεσμένες πλευρικές αλυσίδες, το υψηλής έντασης θραύσμα στα m/z 191 αποδίδεται στην δομή *o* (Σχήμα 20) είναι η πιο έντονη κορυφή, ενώ στα κορεσμένα λουπάνια με ακόρεστη πλευρική αλυσίδα όπως η 3-λουπενόνη (Σχ.10, X, όπου R_1=O, R_2=CH_3) , το θραύσμα στα m/z 191 μετασχηματίζεται σε m/z 189 (Σχήμα 20, *o΄*). Έτσι όταν έχουμε κορυφή στα m/z 191, το μόριο έχει κορεσμένη πλευρική αλυσίδα, ενώ όταν έχουμε κορφή στα m/z 189, προτείνεται ότι το μόριο έχει κορεσμένη πλευρική αλυσίδα**.**

Τα λουπάνια ξεχωρίζουν από τα 12-ολεανένια από το ιόν *e* που βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στα λουπάνια και από τα 18-ολεανένια από την **σχετική αφθονία κορυφών τους**. Στα λουπάνια είναι στα m/z 205 ή 207 ακολουθούμενα από τα m/z 191 ή 189, ενώ στα 18-ολεανένια είναι στα m/z 189, ακολουθούμενο από την κορυφή στα m/z 203 - η οποία δεν υπάρχει στα λουπάνια- και m/z 205 ή 207.



Σχήμα 20. Χαρακτηριστική θραυσμάτωση λουπανίων με κορεσμένη και ακόρεστη πλευρική αλυσίδα

6.2.7 12-Λουπένια

Παρόλο που η αντίστροφη αντίδραση Diels- Alder είναι πολύ χαρακτηριστική στη θραυσμάτωση των 12-ακόρεστων ολεανίων, των ουρσανίων και στις τάξεις των αμυρινών, στα λουπάνια πραγματοποιείται σε πολύ μικρό βαθμό.

Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές των 12-λουπενίων εμφανίζονται στα m/z 187, 189, 201 και 203 στα παράγωγα με α) R_1=O, R_2=CH_3, R_3=C_3H_5 και R_1=OAc, R_2=CH_3, R_3=C_3H_5 , ενώ στα παράγωγα με β) R_1=OH, R_2=CH_3, R_3=C_3H_7 , κορυφές παρατηρούνται στα m/z 189, 191 και 204. Στα 12-Λουπένια δεν παρατηρείται το ιόν *e* (Σχήμα 12).

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα εργασία γίνεται η ανάλυση των συστατικών της ρητίνης του δέντρου *Pistacia lentiscus L.* από τη νότια Κρήτη. Σκοπός της εργασίας είναι :

- Ο προσδιορισμός των συστατικών του τριτερπενικού κλάσματος

- Η σύγκριση των ευρημάτων με το τριτερπενικό κλάσμα της *Pistacia lentiscus* var *Chia*

- Η απόσταξη αιθέριων ελαίων από τη ρητίνη και τα φύλλα και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους

- Η σύγκριση του αιθέριου ελαίου της *Pistacia lentiscus* L. με αιθέρια έλαια της *P. lentiscus* var *Chia*

8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

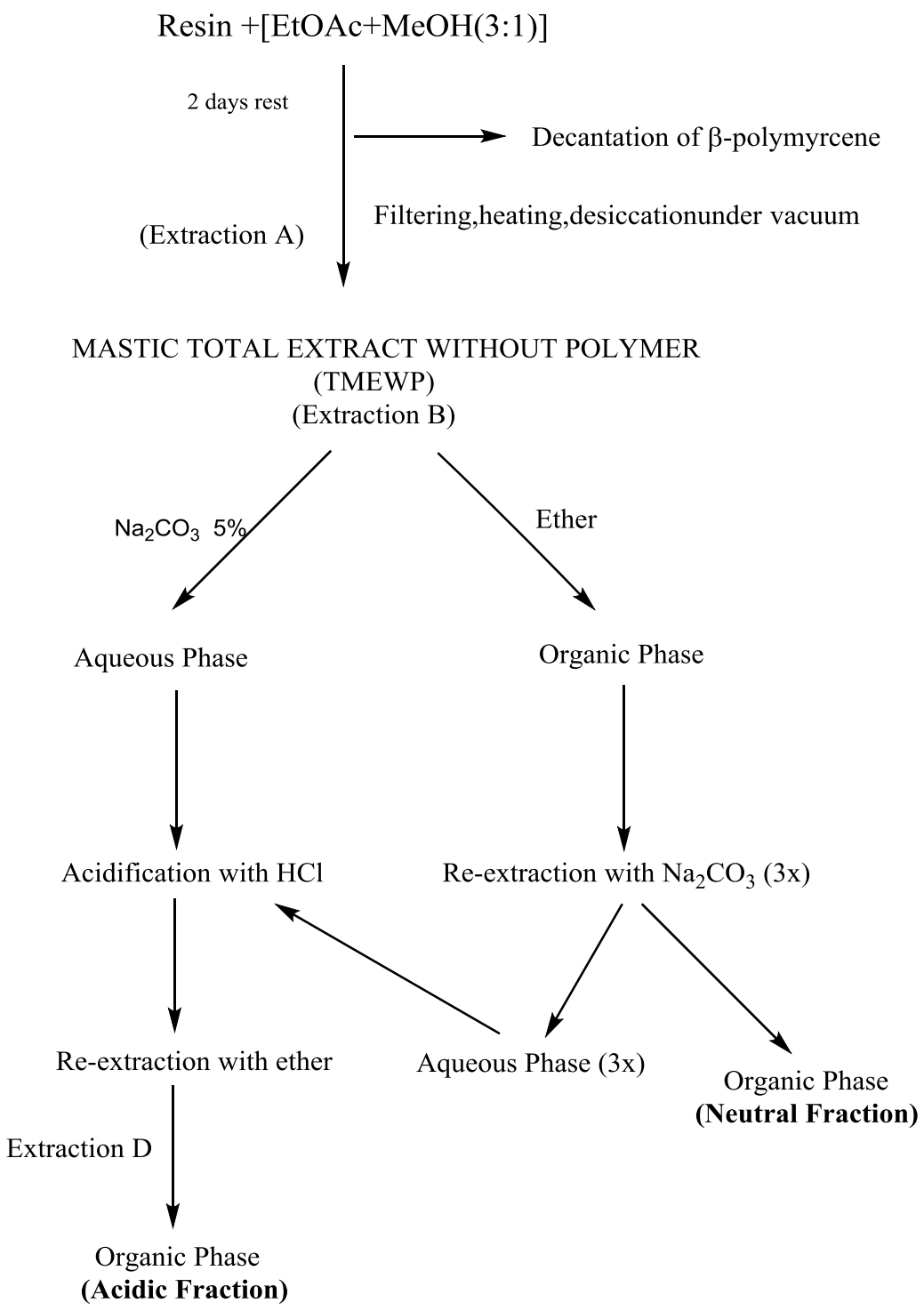
8.1 Pistacia Lentiscus var. *Chia*-Διαχωρισμός Όξινου και Βασικού Κλάσματος

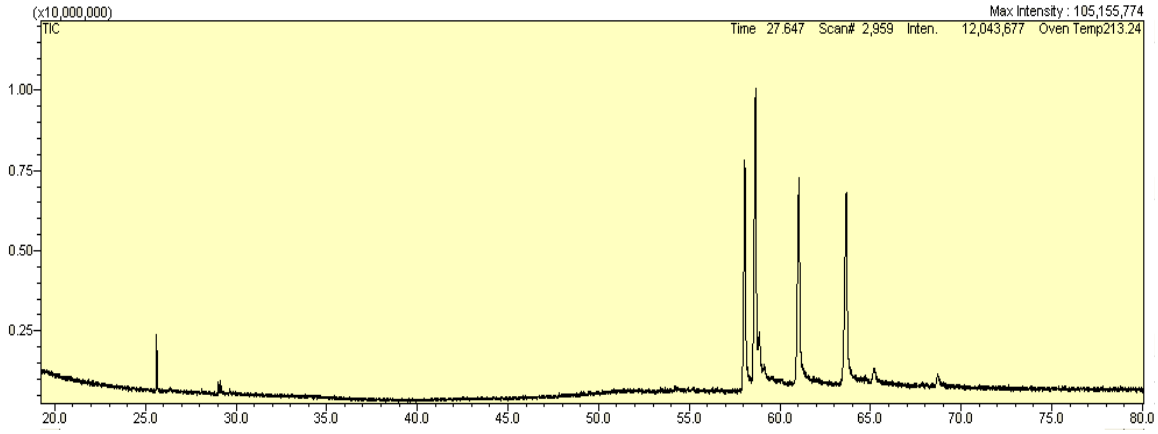
Η μαστίχα που χρησιμοποιήθηκε εστάλη στο εργαστήριο από την Ένωση μαστιχοπαραγωγών Χίου.

Ποσότητα 100 g από τα δάκρυα της μαστίχας διαλύθηκε σε 100 mL οξικό αιθυλεστέρα. Έπειτα προστέθηκαν 300 ml μεθανόλη και προέκυψε αιώρημα. Το μίγμα αφέθηκε για 2 ημέρες ώστε να διαχωριστεί το πολυμερές, β-πολυμυρκένιο. Μετά το πέρας των δύο ημερών το πολυμερές σχημάτιζε μια εμφανή στρώση στον πυθμένα της κωνικής φιάλης, οπότε το διάλυμα διαχωρίστηκε από το πολυμερές με διήθηση. Το διάλυμα αποστάχθηκε αρχικά υπό κενό (rotary evaporator) και, όταν απομακρύνθηκε σχεδόν όλος ο διαλύτης, σε αντλία ισχυρού κενού. Έτσι απομονώθηκε το TMEWP (***Total Mastic Extract Without Polymer***).

Στο TMEWP προστέθηκαν 750 mL διαιθυλαιθέρα προς πλήρη διάλυση του στερεού. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε υδατικό δ/μα ανθρακικού νατρίου 5% w/v. Με αυτό το διάλυμα έγιναν τέσσερις εκχυλίσεις της οργανικής στοιβάδας, με 250 mL τη φορά. Η οργανική φάση μετά τις εκχυλίσεις ξηράνθηκε με θειικό νάτριο και θειικό μαγνήσιο. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε rotary evaporator και στην αντλία κενού. ελήφθη έτσι ***το ουδέτερο κλάσμα*** της μαστίχας, ένα στερεό, υποκίτρινο, κρυσταλλικό προϊόν.

Η υδατική φάση που περιείχε το όξινο κλάσμα, ήταν χωρισμένη σε δύο φάσεις, μια ανοιχτόχρωμη και μια πιο σκούρα. Οξινίστηκε με πυκνό HCl 37%, έως pH=5, ώστε να πρωτονιωθούν τα όξινα συστατικά. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα, στον οποίο διαλύθηκε η κολλώδης μάζα που είχε σχηματιστεί. Το όξινο κλάσμα μεταφέρθηκε στην οργανική φάση. Το διάλυμα ξηράνθηκε και τοποθετήθηκε στον ρότορα και κατόπιν στην αντλία κενού και έτσι απομονώθηκε το λευκό κρυσταλλικό προϊόν –***το όξινο κλάσμα*** της μαστίχας.[52,53]


Resin +[EtOAc+MeOH(3:1)]
2 days rest
Decantation of β-polymyrcene
Filtering,heating,desiccationunder vacuum
(Extraction A)
MASTIC TOTAL EXTRACT WITHOUT POLYMER
(TMEWP)
(Extraction B)
Na2CO3 5%
Ether
Aqueous Phase
Organic Phase
Acidification with HCl
Re-extraction with Na2CO3 (3x)
Re-extraction with ether
Aqueous Phase (3x)
Organic Phase
(Neutral Fraction)
Extraction D
Organic Phase
(Acidic Fraction)



Εικόνα 6, Χρωματογράφημα (GC) των μεθυλιωμένων όξινων της *Pistacia lentiscus* var. *Chia*

Εικόνα 7, Χρωματογράφημα (GC) των μεθυλιωμένων όξινων συστατικών της *Pistacia lentiscus* var. *Chia,* από προηγούμενη εργασία στο εργαστήριό μας[53]

Ο διαχωρισμός που περιγράφηκε προηγουμένως καθώς και η διαδικασία μεθυλίωσης των τριτερπενικών οξέων ακολουθήθηκε και από τον συνάδελφο Α. Κοκολάκη στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης του.[53] Η διαδικασία επαναλήφθηκε με σκοπό να επιβεβαιώσει την επαναληψιμότητα της απομόνωσης του όξινου κλάσματος. Τα φάσματα μάζας των κύριων συστατικών ταυτίζονται. Οι διαφορές στα Rt των ενώσεων οφείλονται σε διαφορετικό θερμοπρογραμματισμό στο GC, ενώ διαφορές στις περιεκτικότητες των συστατικών οφείλονται στην φυσιολογική διακύμανση των περιεκτικοτήτων των συστατικών της μαστίχας λόγω διαφόρων μεταβλητών (όπως περίοδος συλλογής, και ηλικία ρητίνης).

8.2 *Pistacia Lentiscus* L. – Διαχωρισμός Όξινου και Βασικού Κλάσματος

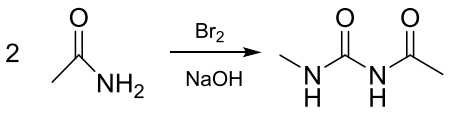
Η ρητίνη συλλέχθηκε από σχίνους της περιοχής του "Αι Γιάννη" στην περιοχή Αστερουσίων στο νότιο Ηράκλειο (N 34°56'42'' / E 25°03'18''). Το ρετσίνι ήταν ρευστό και υποκίτρινο. Σε σημεία επαφής κλαδιών είχε μεγάλη ποσότητα ρητίνης χρώματος κίτρινο-καφέ, το οποίο συλλέχθηκε. Το αιθέριο έλαιο αποστάχθηκε από ρητίνη 12 μηνών, ενώ το τριτερπενικό κλάσμα απομονώθηκε από φρέσκια ρητίνη (τριών ημερών).

Αρχικά ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την χιώτικη μαστίχα, αλλά στην τελική οργανική φάση η οποία θεωρητικά θα περιείχε όξινα συστατικά, δεν εμφανίστηκε προϊόν. Επαναλήφθηκε η διαδικασία με ορισμένες αλλαγές. Το ανθρακικό νάτριο 5% αντικαταστάθηκε από NaOH 6N, ενώ στην οξίνιση προστέθηκε πυκνό HCl έως pH=2. Απομονώθηκε ένα πολύ μικρό ποσοστό «όξινου κλάσματος», του οποίου όμως το TLC ήταν ακριβώς ίδιο με του ουδέτερου κλάσματος. *Έτσι οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν όξινα συστατικά και τελικά μελετήθηκε το κλάσμα που απομονώθηκε ως ουδέτερο.*

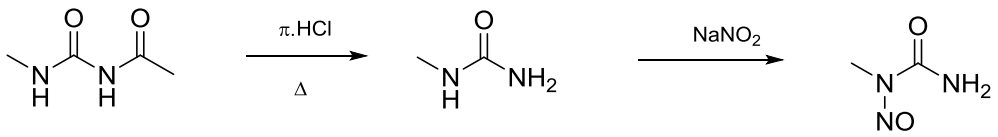
8.3 Μεθυλίωση Όξινου Κλάσματος-Παρασκευή Διαζωμεθάνιου

8.3.1 Σύνθεση Νιτροζομεθυλουρίας

(α) Σύνθεση Ακετυλομεθυλουρίας: Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL που περιέχει διάλυμα ακεταμιδίου (5,9 g, 0,1 mol) σε Br_2 (8,8 g-2.81 mL, 0,055 mol), προστίθεται πολύ αργά διάλυμα NaOH (4 g σε 16 mL H_2O) και αναδεύεται αργά με γυάλινη ράβδο. Παρατηρείται ο σχηματισμός ενός κίτρινου διαλύματος που θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 100-150 °C μέχρι το διάλυμα αρχίσει να αφρίσει. Μετά η θέρμανση συνεχίζεται για 5 επιπλέον λεπτά. Η κρυστάλλωση του προϊόντος γίνεται σχεδόν αμέσως μετά το άφρισμα. Παρατηρείται μια χρωματική αλλαγή από κίτρινο σε κοκκινωπό. Η κρυστάλλωση ολοκληρώνεται σε παγόλουτρο επί 30 λεπτά. Η ακετυλομεθυλουρία είναι το κίτρινο κρυσταλλικό ίζημα, που λαμβάνεται με διήθηση σε βρύση κενού. Η διήθηση πρέπει να γίνει με το ήδη υπάρχον διήθημα χωρίς προσθήκη νερού, γιατί η έκπλυση με νερό (ακόμα και κρύο) θα διαλυτοποιήσει τους κρυστάλλους της ακετυλομεθυλουρίας. Η απόδοση της αντίδρασης είναι ποσοτική.

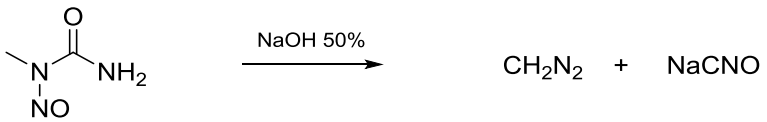


(β) Σύνθεση της Νιτροζομεθυλουρίας : Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL προστίθεται η ακετυλομεθυλουρία (4,8 g, 0,04 mol) μαζί με 5 mL πυκνό διάλυμα HCl. Η ανάδευση γίνεται με γυάλινη ράβδο μέχρι να διαλυθεί το διάλυμα υπό θέρμανση σε υδατόλουτρο. Η θέρμανση συνεχίζεται για 5 ακόμη λεπτά μετά την διάλυση (συνολικά απαιτούνται περίπου 15 λεπτά). Μετά στο διάλυμα προστίθεται νερό, σε ποσότητα ανάλογη του όγκου του διαλύματος και ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο. Όσο το διάλυμα είναι ακόμη ψυχρό προστίθεται διάλυμα $NaNO_2$ (3,8 g σε 5,5 mL H_2O) με πολύ προσοχή (αργά). Μετά το διάλυμα αφήνεται να ψυχθεί για αρκετά λεπτά σε παγόλουτρο, όπου παρατηρείται η δημιουργία των κιτρινωπών κρυστάλλων της νιτροζομεθυλουρίας. Στην συνέχεια τα στερεά διηθούνται σε κενό βρύσης και γίνεται έκπλυση με το διήθημα χωρίς την χρήση κρύου νερού. Η απόδοση της αντίδρασης είναι ποσοτική.



8.3.2 Χρήση Νιτροζομεθυλουρίας για την παραγωγή διαζωμεθανίου και μεθυλίωση

Σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα με παχύ τοίχωμα διαμέτρου σωλήνος 0,1 cm τοποθετείται πυκνό διάλυμα NaOH 50% και σε ύψος περίπου 2 cm. Στην συνέχεια προστίθεται ποσότητα διαιθυλαιθέρα σε ανάλογο ύψος. Κατόπιν προστίθενται σε μικρές ποσότητες οι κρύσταλλοι της νιτροζομεθυλουρίας (200 mg, 0,02 mmol) με γυάλινη ράβδο και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Η νιτροζομεθυλουρία αντιδρά με το διάλυμα NaOH 50%, παράγοντας διαζωμεθάνιο το οποίο εκλύεται και διαλύεται στον διαιθυλαιθέρα. Παρατηρείται ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα στην αρχή που σταδιακά μετατρέπεται σε έντονο κίτρινο. Το σύστημα χρησιμοποιείται απ' ευθείας για την παραγοντοποίηση των όξινων συστατικών όπου, μετά την πάροδο μισής ώρας, έχει μεθυλιώσει όλες τις καρβοξυλικές ομάδες.



8.4 Αιθέριο έλαιο της *Pistacia lentisus* L. από την Κρήτη

Για την απόσταξη της ρητίνης, πρώτη ύλη συλλέχθηκε από 3 δέντρα της περιοχής του «Αϊ Γιάννη» στο νότιο Ηράκλειο (N 34°56'42", E 25°03'18") και αποθηκεύτηκε στους -20 ^{o}C. Η απόσταξη πραγματοποιήθηκε 6 μήνες μετά τη συλλογή με μικροαποστακτήρα. Τα φύλλα συλλέχθηκαν την ίδια περίοδο και αφού ξηράνθηκαν υπό σκιά, αποστάχθηκαν με αυτοσχέδιο ανοξείδωτο αποστακτήρα. Η πρώτη ύλη φυλάχθηκε σε σκοτεινό μέρος. Χαρακτηριστικό είναι ότι το ρετσίνι δεν έπηξε στο βαθμό που πήζει και σκληραίνει η μαστίχα Χίου. Υδροαπόσταξη 8,7 γραμμαρίων ρητίνης απέδωσε 0.268 γραμμάρια αιθέριου ελαίου (ποσοστό 3,08%). Η ανάλυση των κορυφών των φασμάτων μάζας έγινε με τη βοήθεια των δεδομένων της βιβλιοθήκης NIST του προγράμματος GC/MS, δεδομένων βιβλιογραφίας και του συντελεστή κατακράτησης Kovats Index.[54,55] Ο συντελεστής κατακράτησης Kovats Index υπολογίστηκε με βάση τον τύπο Van der Dool[39] και τους χρόνους κατακράτησης των συστατικών σε σύγκριση με μείγμα αλκανίων C7-C40 της SUPELCO (PA, USA).

8.5 Πειραματικές Συνθήκες Ανάλυσης

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των συστατικών στο GC-MS έγινε με ένα επιλεκτικό ανιχνευτή μάζας τύπου Shimadzu GCMS-QP 5050 συνδεδεμένο με σύστημα πληροφοριών. Ο αέριος χρωματογράφος (Shimadzu GC-17A), ήταν συνδεδεμένος με μία τριχοειδή στήλη (στατική φάση 5% Supelco, SBP-5, διαστάσεων 30m x 0,25 mm x 0,25 μm film thickness) και με την πηγή των ιόντων. Για την μεταφορά του δείγματος στην στήλη, χρησιμοποιήθηκε auto-injector τύπου Shimadzu AOC - 20i. Η θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος (injector) 250 °C, θερμοκρασία ανίχνευσης 230 °C. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο (He), υπό πίεση 0,8 atm. Οι συνθήκες ιονισμού στον θάλαμο ιονισμού ήταν οι ακόλουθες: ενέργεια ιόντων 70 eV, θερμοκρασία πηγής ιόντων 195°C, εύρος μάζας 45-500 m/z, χρόνος σάρωσης 1,4 /decade, ηλεκτρονικός πολλαπλασιαστής τάσης 1680 mV.

Για τον διαχωρισμό των τριτερπενικών οξέων και των συστατικών των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοπρογραμματιζόμενης χρωματογραφίας. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα προγράμματα ανάλυσης:

<u>Για την 1^{η} ομάδα ουδέτερων συστατικών και τους μεθυλεστέρες της *P. lentiscus* var *Chia*</u>: Η αρχική θερμοκρασία ήταν 50 ^{o}C, η οποία διατηρήθηκε για 5 λεπτά. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά με ρυθμό 5 ^{o}C/λεπτό, μέχρι τους 240 ^{o}C , όπου παρέμεινε σταθερή για 5 λεπτά. Μετά συνεχίστηκε η σταδιακή αύξηση με τον ίδιο ρυθμό έως τους 300

^{o}C όπου παρέμεινε σταθερή για 30 λεπτά. Η συνολική διάρκεια του προγράμματος είναι 80 λεπτά.

Για την 2^{η} ομάδα ουδέτερων συστατικών- Μεθυλεστέρες : Η αρχική θερμοκρασία ήταν 50 ^{o}C, η οποία διατηρήθηκε για 5 λεπτά. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά με ρυθμό 10 ^{o}C/λεπτό, μέχρι τους 280 ^{o}C , όπου παρέμεινε σταθερή για 70 λεπτά. Η συνολική διάρκεια του προγράμματος είναι 98 λεπτά.

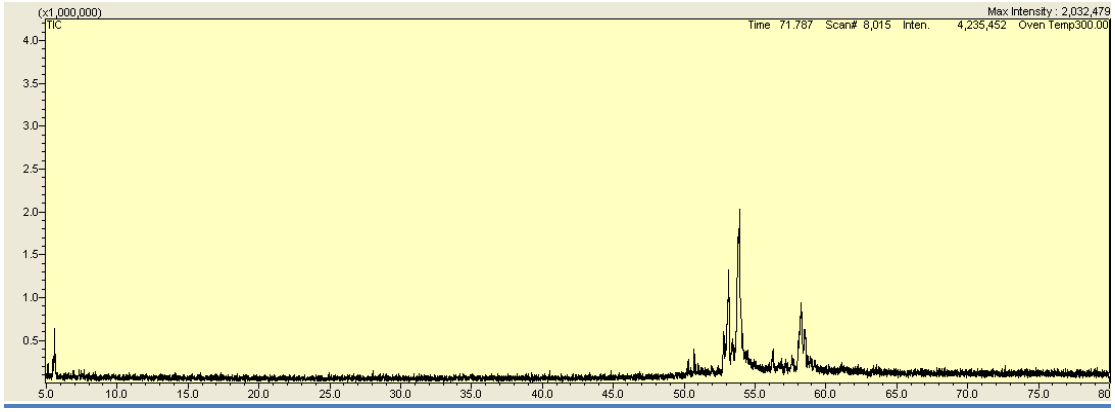
Για τα αιθέρια έλαια : Η αρχική θερμοκρασία ήταν 50 ^{o}C, η οποία διατηρήθηκε για 5λεπτά. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά με ρυθμό 10 ^{o}C/λεπτό, μέχρι τους 280 ^{o}C, όπου παρέμεινε σταθερή για 20 λεπτά. Η συνολική διάρκεια του προγράμματος είναι 48 λεπτά.

8.6 *Pistacia lentiscus* L. από την Νότια Κρήτη-Ρητίνη

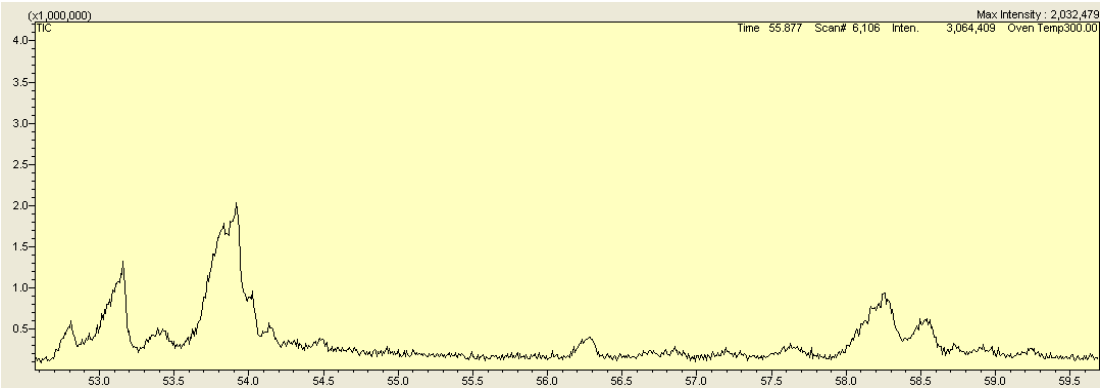
8.6.1 Χρωματογραφική Ανάλυση και Προσδιορισμός του Τριτερπενικού Κλάσματος της Ρητίνης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως,, μετά τις εκχυλίσεις το αναμενόμενο «όξινο κλάσμα» της μαστίχας έδειξε TLC ίδιο με το ουδέτερο κλάσμα. Παρόλα αυτά στη λιγοστή ποσότητα που απομονώθηκε ως όξινο κλάσμα προστέθηκε διαζωμεθάνιο. Και πάλι το TLC φάνηκε ίδιο (με μια μικρή μόνο παρέκκλιση πιθανότατα λόγω μεθυλίωσης κάποιου φαινολικού υδροξυλίου). **Το συμπέρασμα που εξάχθηκε είναι ότι η ρητίνη της *Pistacia lentiscus* L. *δεν περιλαμβάνει ελεύθερα τριτερπενικά οξέα. Πράγματι, στην ανάλυση GC-MS αποδείχθηκε ότι τα όξινα συστατικά της ρητίνης P. lentiscus* var *Chia απαντώνται ως μεθυλεστέρες στη ρητίνη της κρητικής Pistacia lentiscus* L.**

8.6.2 Ανάλυση Των Ουδέτερων Συστατικών

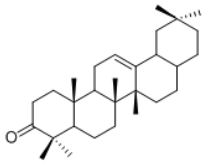


Εικόνα 8. Χρωματογράφημα TIC της 1ης ομάδας ουδέτερων συστατικών της ρητίνης της *P. lentiscus* L. από τη νότια Κρήτη

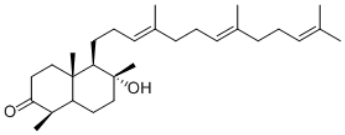


Εικόνα 9. Λεπτομέρεια της εικόνας 8, κορυφές 1ης ομάδας ουδέτερων συστατικών της ρητίνης της *P. lentiscus* L. από τη νότια Κρήτη

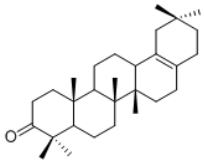
Κατά την ανάλυση του δείγματος βρέθηκαν δέκα ουσίες από τις οποίες ταυτοποιήθηκαν έξι, γνωστές από τη βιβλιογραφία.[48]



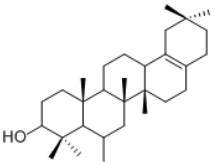
28-νορολεαν-12-εν-3-όνη



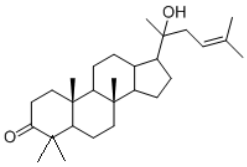
3-οξο-8-υδροξυπολυποδο-13E,17E,21-τριένιο



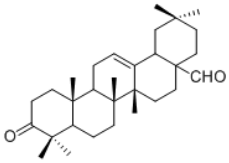
28-νορολεαν-17-εν-3-όνη



3β-υδροξυ-6-μεθυλο-28-νορολεαν-17-ένιο



υδροξυδαμμαρενόνη



ολεανονική αλδεύδη

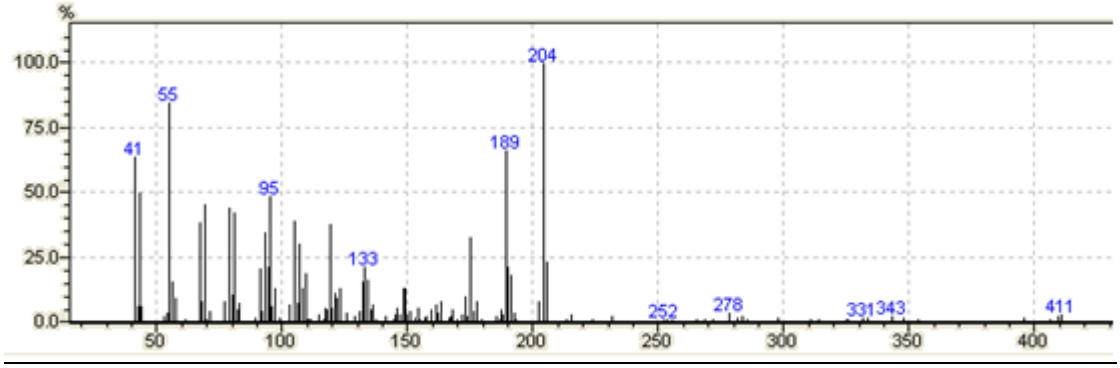
Σχήμα 21. Ταυτοποιημένες ουδέτερες ενώσεις από το ουδέτερο κλάσμα της *Pistacia lentiscus* L.

Α/Α	Rt	Όνομα Ένωσης	Δομή (Σχήμα 10)	M^+	% Περιεκτικότητα στο TMEWP
1	52.808	28-Νορολεαν-12-εν-3-όνη	I	410	5.55
2	53.159	(8R)-3-Οξο-υδροπολυποδο-13E,17E,21-τριένιο[i]	XI	424	2.29
3	53.391	Παράγωγο 28-νορολεαν-17(18)-ένιο	VIII	426	6.55
4	53.832	28-Νορολεαν-17-εν-3-όνη	III	424	9.19
5	53.918	3β-Υδροξυ-6-μεθυλο-28-νορολεαν-17-ένιο	III	426	4.09
6	54.024	Μη ταυτοποιημένη		408	1.47
7	54.135	28-Νορολεαν-12,17-εν-3-όλη	III, Δ12, Διπλός Δεσμός	424	0.93
8	56.282	Μη ταυτοποιημένο	II		Trace
9	58.255	Υδροξυδαμμαρενόνη	VIII	442	1.28
10	58.539	Ολεανονική Αλδεύδη	I	438	1.86

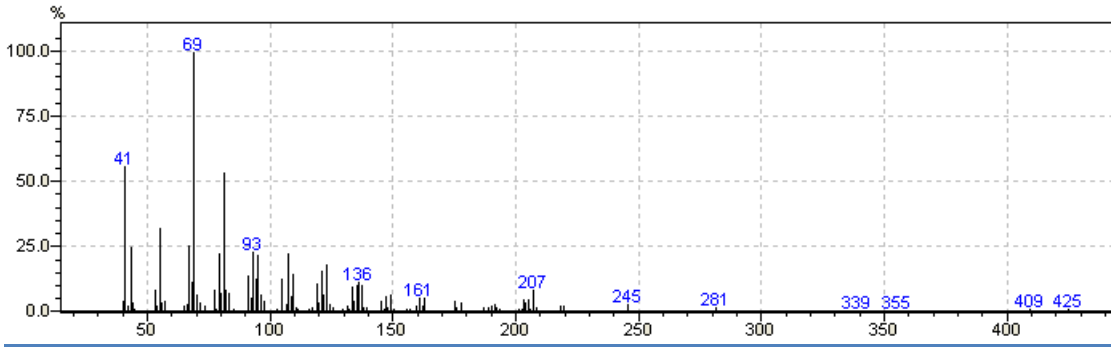
[i] Franz-Josef Marner, Antje Freyer, Johann Lex *Triterpenoids from gum mastic, the resin of Pistacia lentiscus*, **1991**, Phytochemistry, 30, 3709–3712

8.6.3 Φάσματα Μάζας 1ης Ομάδας Ουδέτερων Συστατικών

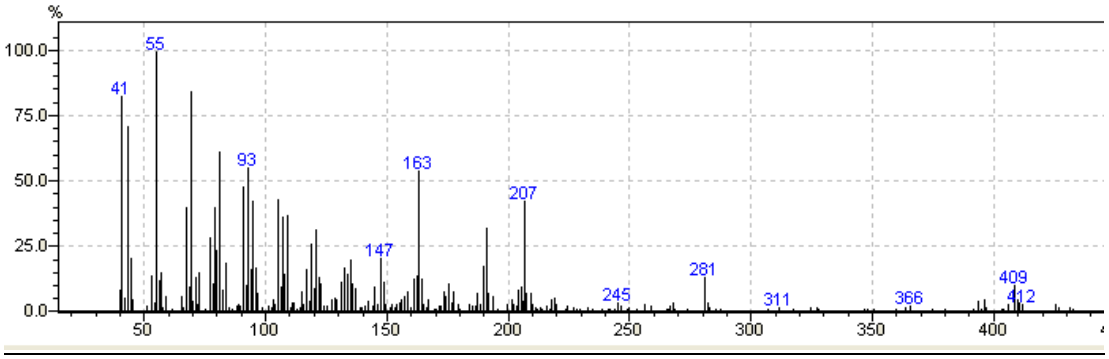
Στα ακόλουθα φάσματα τα μοριακά ιόντα εμφανίζονται στο $[M+1]^+$, πάντα δηλαδή είναι αυξημένα κατά μια μονάδα μάζας.



Εικόνα 10. Φάσμα μάζας της 28-Νορολεαν-12-εν-3-όνης

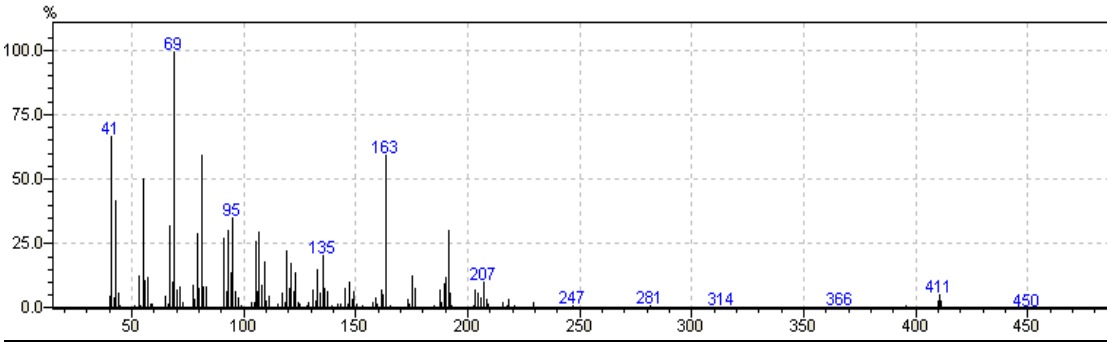


Εικόνα 11. Φάσμα μάζας του (8R)-3 οξο-υδροπολύποδο-13E, 17E, 21-τριένιου

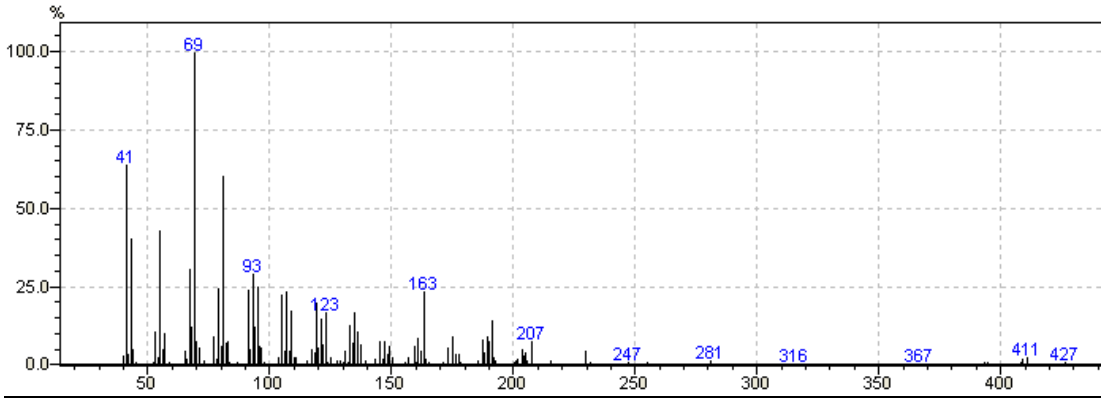


Εικόνα 12. Φάσμα μάζας παραγώγου 28-νορ-17(18)-ολεανίου

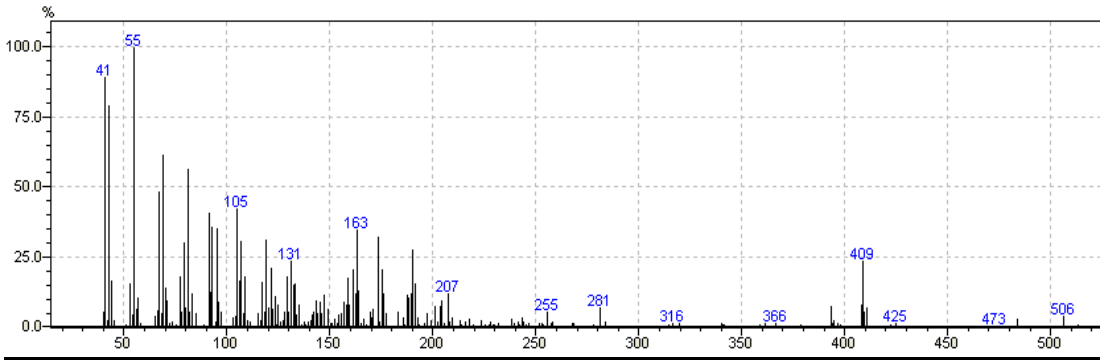
Στα 28-νορ-17(18)ολεανένια χαρακτηριστικά θραύσματα εμφανίζονται στα m/z 163 και 191 ενώ στα m/z 207, εμφανίζουν χαρακτηριστική κορυφή όταν έχουν R_1=OH (Σχήμα 10).



Εικόνα 13. Φάσμα μάζας της 28-νορολεαν-17-εν-3-όνης

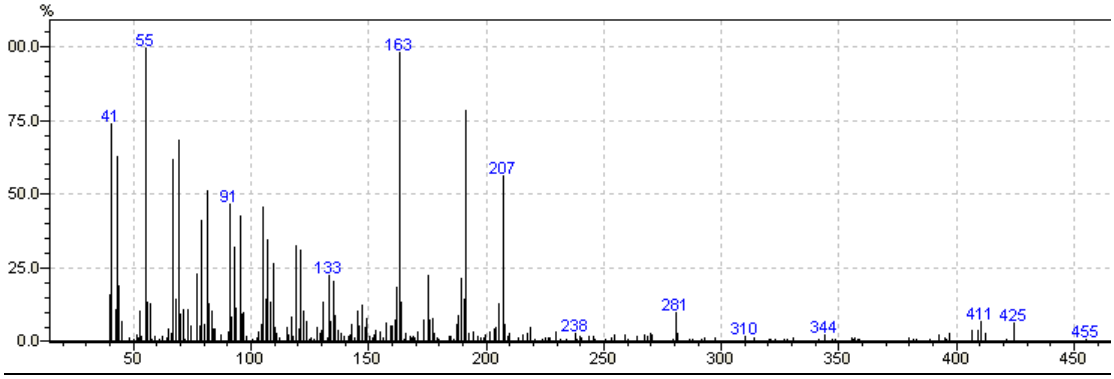


Εικόνα 14. Φάσμα μάζας του 3β-υδροξυ-6-μέθυλο-28-νορολεαν-17-ένιου

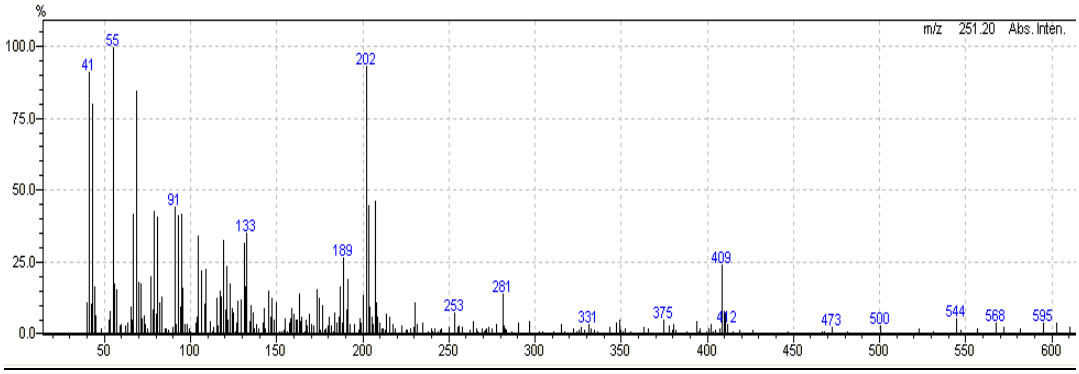


Εικόνα 15. Φάσμα της μη ταυτοποιημένης ένωσης

Πρόκειται επίσης για μόριο με σκελετό 28-νορ-17(18)-ολεανίου. Επειδή το μοριακό ιόν είναι στα m/z 409 (άρα το μοριακό βάρος του μορίου είναι 408), κατά πάσα πιθανότητα έχουμε 28-νορολεαν-διένιο.

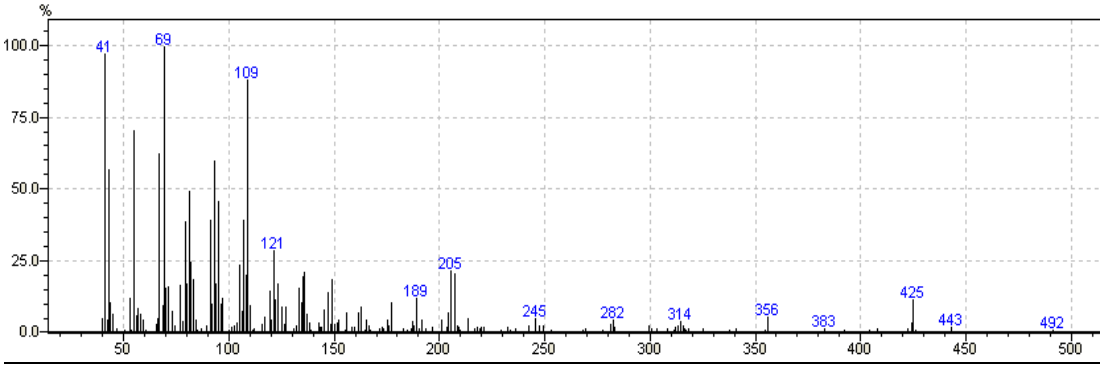


Εικόνα 16. 28-Νορολεαν-12,17-διεν-3-όλη ή 3β-ακετοξυ-28-νορολεαν-17-ένιο

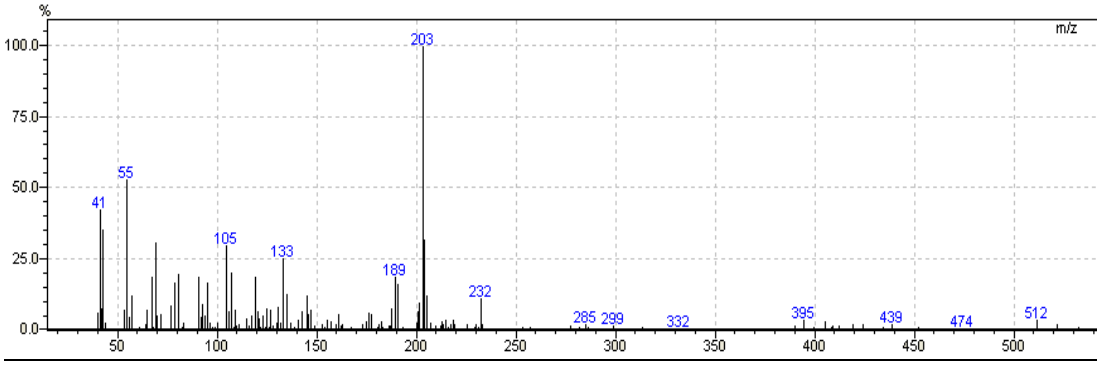


Εικόνα 17. Μη ταυτοποιημένο 18-ολεανένιο

Κατά πάσα πιθανότητα το μόριο αυτό είναι 18-ολεανένιο. Η πολύ έντονη κορυφή στα m/z 202, παραπέμπει στη χαρακτηριστική κορυφή των 18-ολεανίων στα m/z 203. Επίσης η κορυφή στα m/z 189 είναι χαρακτηριστική στα 18-ολεανένια.

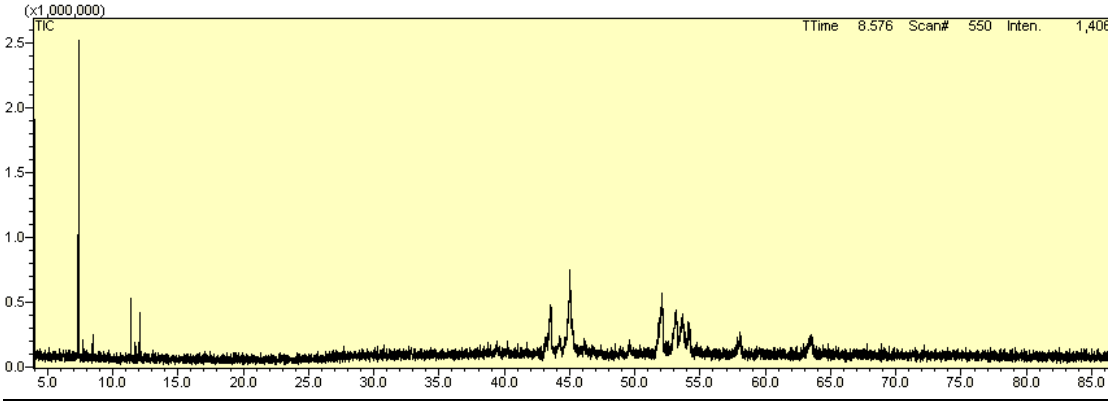


Εικόνα 18. Διυδροξυδαμμαράνιο

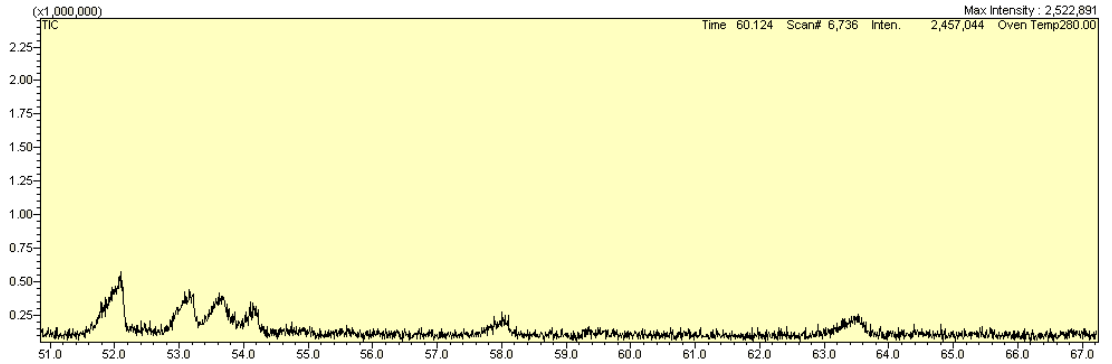


Εικόνα 19. Ολεανονική αλδεΰδη

8.6.4 Ανάλυση της 2ης Ομάδας Ουδέτερων συστατικών-οι Μεθυλεστέρες



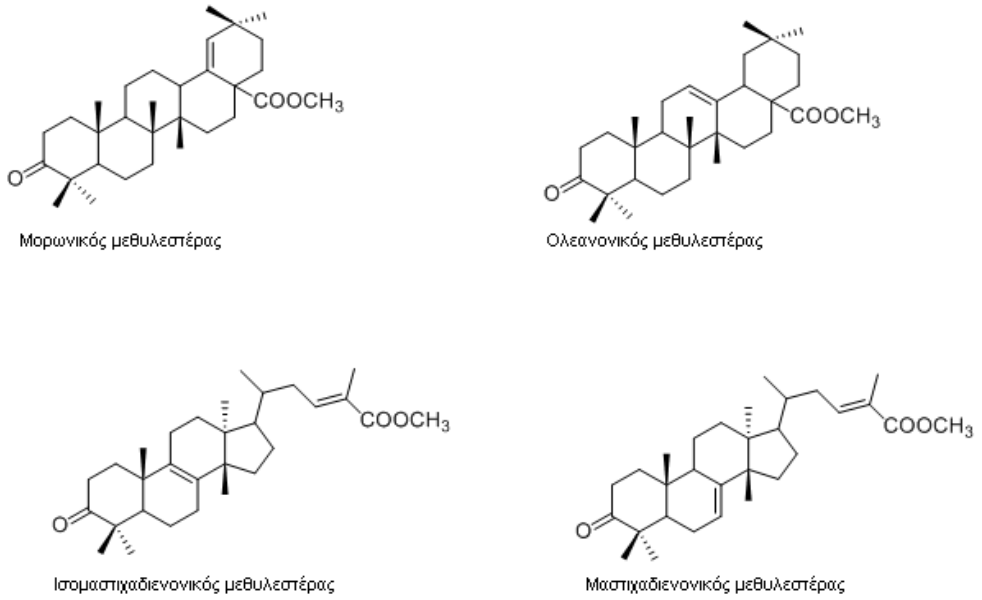
Εικόνα 20. Χρωματογράφημα GC των συστατικών της *P .Lentiscus* L. χωρίς το πολυμερές



Εικόνα 21. Οι μεθυλεστέρες της *P. lentiscus* L.

Το συγκεκριμένο φάσμα επιλέχθηκε για χρωματογραφική ανάλυση γιατί οι τριτερπενικοί μεθυλεστέρες που περιέχονται σε αυτό διαχωρίστηκαν καλύτερα από ότι στην προηγούμενη ανάλυση και για αυτό τον λόγο η ταυτοποίηση των συστατικών ήταν ευκολότερη και ακριβέστερη. Οι πρώτες κορυφές στο χρωματογράφημα (R_t 7-13 min) αναγνωρίστηκαν ως συστατικά που απαντώνται και στο χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου και τα οποία παρέμειναν στο δείγμα μετά την επεξεργασία του συγκεκριμένου δείγματος. Η πρώτη και μεγαλύτερη κορυφή είναι το α-πινένιο και δείχνει την αφθονία του εν λόγω συστατικού στο αιθέριο έλαιο. Ακόμη και στο συνολικό εκχύλισμα αποτελεί το βασικό συστατικό σε ποσοστό 36,7%. Η επόμενη ομάδα κορυφών (R_t 43-47 min) ανήκει στα ουδέτερα συστατικά που αναλύθηκαν στο προηγούμενο χρωματογράφημα. Τα «μεθυλιωμένα όξινα» συστατικά, *στην πραγματικότητα οι μεθυλεστέρες που αποτελούν φυσικά συστατικά του μίγματος,* εκλούονται μετά τα 51 λεπτά του προγράμματος.

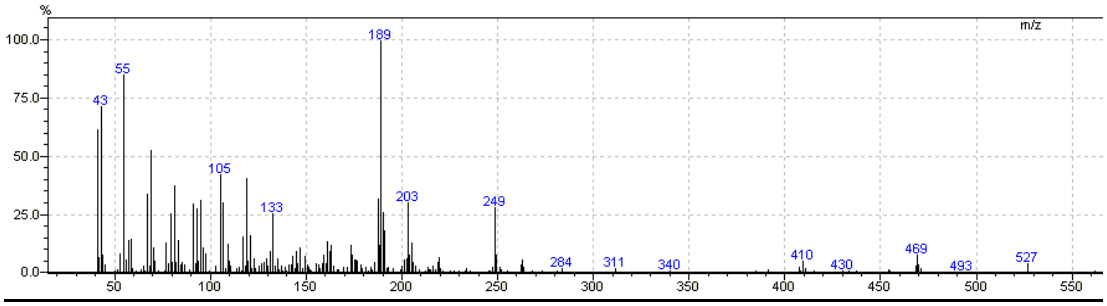
Κατά την ανάλυση, από τα έξι συστατικά που εκλούονται μετά τα 51 λεπτά του προγράμματος ταυτοποιήθηκαν τέσσερις ουσίες ενώ δύο δεν ταυτοποιήθηκαν. Και εδώ το μοριακό ιόν εμφανίζεται ως $[M+1]^+$.



Σχήμα 22. Ταυτοποιημένοι μεθυλεστέρες

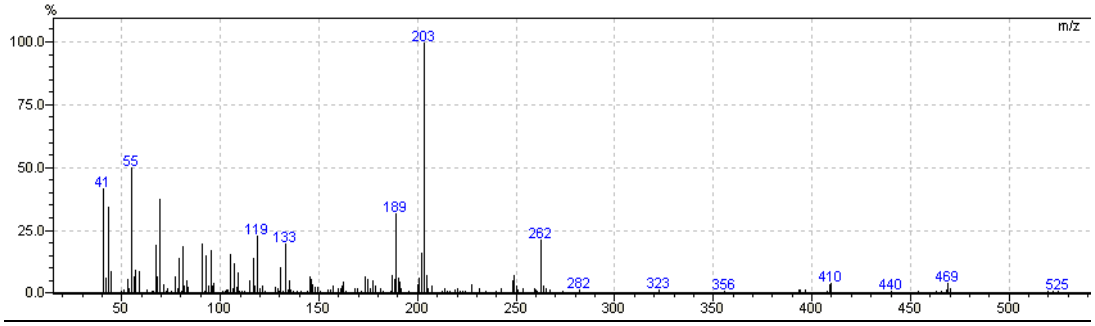
Rt	Όνομα	M^+	%
52.091	Μορωνικός μεθυλεστέρας	468	6.82
53.160	Ολεανονικός μεθυλεστέρας	468	4.97
53.616	Παράγωγο δαμμαρανίου-Μεθυλεστέρας	468	4.57
54.099	Ισομερές ολεανονικού μεθυλεστέρα	468	3.59
58.009	Ισομαστιχαδιενονικός μεθυλεστέρας	468	2.28
63.535	Μαστιχαδιενονικός μεθυλεστέρας	468	2.56

8.6.5 Φασματα Μάζας 2ης Ομάδας Ουδέτερων Συστατικών-οι Μεθυλεστέρες



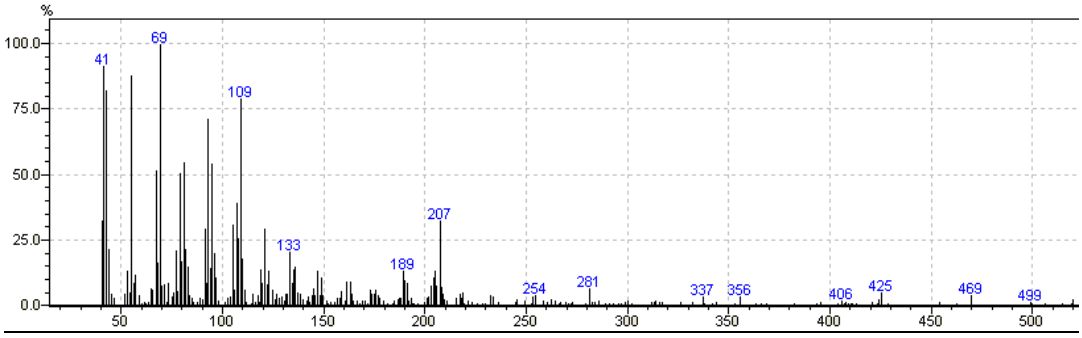
Εικόνα 22. Μορωνικός μεθυλεστέρας

Η θραυσμάτωση του μορωνικού μεθυλεστέρα είναι χαρακτηριστική για ένα 18-ολεανένιο. Υψηλότερης έντασης είναι η κορυφή στα m/z 189 και ανεξάρτητη από τους υποκαταστάτες. Ακολουθείται από την m/z 203. Όλες οι βασικές κορυφές στο φάσμα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία.



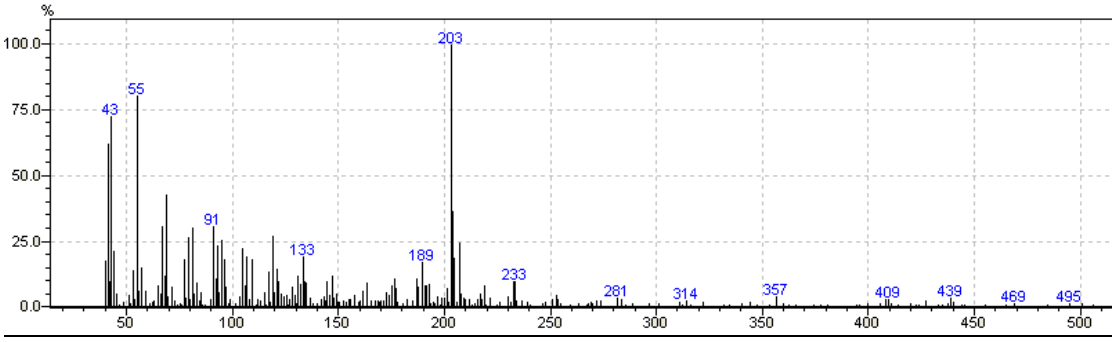
Εικόνα 23. Ολεανονικός μεθυλεστέρας

Αντίθετα από τον μορωνικό μεθυλεστέρα εδώ το μεγαλύτερης έντασης ιόν είναι το m/z 203 και ακολουθείται από το m/z189. Αυτή η θραυσματωση είναι χαρακτηριστική για τα 12-ολεανένια, σύμφωνα με το σχήμα 11. Και εδώ οι κορυφές συμφωνούν απόλυτα με τη βιβλιογραφία.



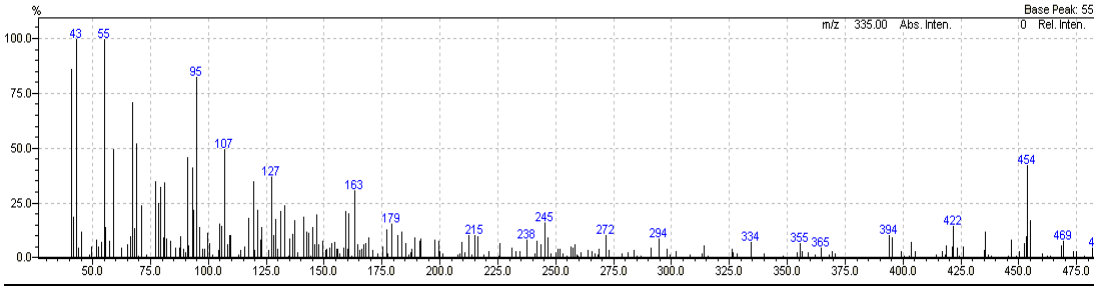
Εικόνα 24. Δαμμαρανικό παράγωγο, μεθυλεστέρας

Εδώ βλέπουμε τις κορυφές που χαρακτηρίζουν τον δαμμαρανικό σκελετό όπως την m/z 109 αλλά και την m/z 69 και την χαμηλότερης έντασης m/z 163. Στα δαμμαράνια το m/z 207 είναι χαρακτηριστική κορυφή όταν R_1=OH/H (Σχήμα 10), όμως κάτι τέτοιο δεν δικαιολογείται από το μοριακό ιόν M^+ 469, το οποίο υποδεικνύει αντιθέτως την ύπαρξη μεθυλεστέρα.



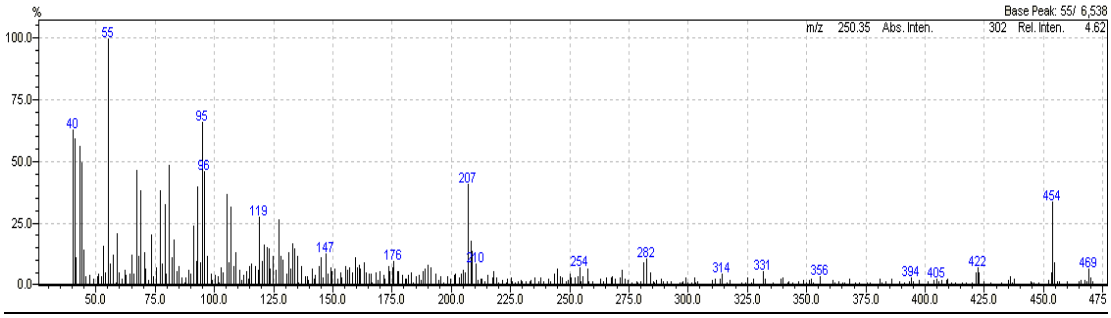
Εικόνα 25. Ισομερές ολεανονικού μεθυλεστέρα

Σε αυτό το φάσμα βλέπουμε μια κλασική περίπτωση 18-ολεανενίου και συγκεκριμένα μεθυλεστέρα. Μια βασική διαφορά από το φάσμα του ολεανονικού μεθυλεστέρα είναι η απουσία του θραύσματος m/z 262. Αντί αυτού βλέπουμε κορυφή στα m/z 232.



Εικόνα 26, Ισομαστιχαδιενονικός μεθυλεστέρας

Από το ισομαστιχαδιενονικό οξύ περιμένουμε αφθονία στο θραύσμα m/z 454, το οποίο αντιστοιχεί στο απομεθυλιωμένο μόριο. Αντίθετα από τα υπόλοιπα μόρια με ολεανονικό σκελετό, εδώ το απομεθυλιωμένο ιόν εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα. Χαρακτηριστικές είναι επίσης η πρωτονιωμένη κορυφή στα m/z 422 αλλά και οι m/z 245 και m/z 355. Συνολικά το φάσμα συμφωνεί με τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 27. Μαστιχαδιενονικός μεθυλεστέρας

Και εδώ το απομεθυλιωμένο όξινο θραύσμα είναι αρκετά σταθερό ώστε να μας δώσει έντονη κορυφή στα m/z 454. Το ιόν m/z 207 προκύπτει από την περαιτέρω θραυσμάτωση κάποιου άλλου πολύ δραστικού θραύσματος.

Στον επόμενο συγκριτικό πίνακα παρατίθενται τα τριτερπενικά συστατικά που απομονώθηκαν από τα δύο υποείδη.

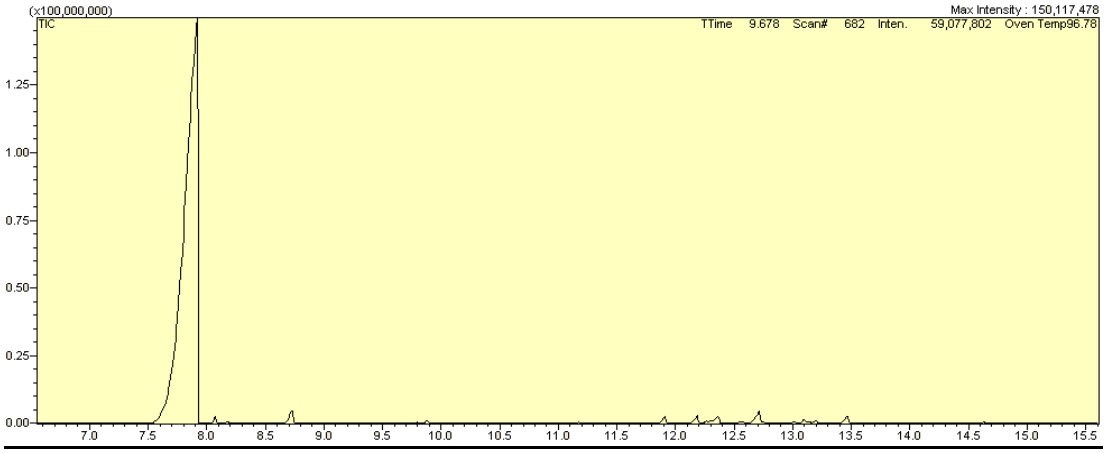
α/α	Τριτερπενική Ένωση	*P. lentiscus* var *Chia*	*P. lentiscus* L.
1	11-Όξο-3β-υδροξυ-28-νορολεαν-17-εν-6-μεθυλεστέρας	√	-
2	Μορωνικός μεθυλεστέρας	√	√
3	Ολεανονικός μεθυλεστέρας	√	√
4	Παράγωγο δαμμαρανικού μεθυλεστέρα		√
5	Ισομερές ολεανονικού μεθυλεστέρα	-	√
6	3β-Ακετοξυ-6β-υδροξυ-ολεαν-18-εν-28-ολικός μεθυλεστέρας	√	-
7	3β-Ακετοξυ-6β-υδροξυ-διυδρο-ισομαστιχαδιενολικός μεθυλεστέρας	√	-
8	Ισομαστιχαδιενονικός μεθυλεστέρας	√	√
9	3-Επι-ισομαστιχαδιενολικός μεθυλεστέρας	√	-
10	Μαστιχαδιενονικός μεθυλεστέρας	√	√
11	3β-Ολεαν-12,18-διεν-3-ολικός μεθυλεστέρας	√	-
12	(8R)-3-Οξο-υδροπολυποδο-13E,17E,21-τριένιο	-	√
13	Λουπενόνη	√	-
14	3β-Υδροξυ-6β-υδροξυμεθυλο-28-νορ-ολεαν-17-εν-6-άλη	√	-
15	3β-Υδροξυ-28-νορολεαν-17-εν-6-άλη	√	-
16	Τιρουκαλλόλη	√	-
17	3-Μεθοξυ-28-νορολεαν-12 ένιο	√	-
18	Δαμμαραδιενόνη	√	-
19	28-Νορολεαν-12-εν-3-όνη	√	√
20	β-Αμυρόνη	√	-
21	Ολεαν-18-εν-3-όνη	√	-
22	Παράγωγο 28-νορολεαν-17(18)-ένιο	-	√
23	28-Νορολεαν-17-εν-3-όνη	√	√

24	28-Νορολεαν-12,17-διεν-3-όνη	√	-
25	6-Μεθυλ-28-νορολεαν-17-εν-3-όνη	√	-
26	3-Μεθοξυ-28-νορολεαν-17-ένιο	√	-
27	3β-Ακετοξυ-28-νορολεαν-17-ένιο	√	-
28	3-Όξο-28-νορολεαν-17-εν-6-άλη	√	-
29	3β-Υδροξυ-6-μέθυλ-28-νορολεαν-17-ένιο	√	√
30	Ολεαν-18-εν-3-όλη	√	
31	Μη ταυτοποιημένο τριτερπένιο	-	√
32	Μη ταυτοποιημένο συστατικό	-	√
33	Μη ταυτοποιημένο τριτερπένιο	-	√
34	3β-Υδρόξυ-δαμμαρανικό παράγωγο	√	-
35	20,24-Εποξυ-25-υδροξυ-δαμμαρεν-3-όνη	√	-
36	Υδροξυδαμμαρενόνη	√	√
37	28-Νορ-17-ολεανεν-3-όλη	√	-
38	Ολεανονική αλδεύδη	√	√
39	Ισομαστιχαδιενολική αλδεύδη	√	-
40	11-Όξο-β-αμυρινο-οξικός αιθυλεστέρας	√	-
41	Νορ-λουπεόνη	√	-

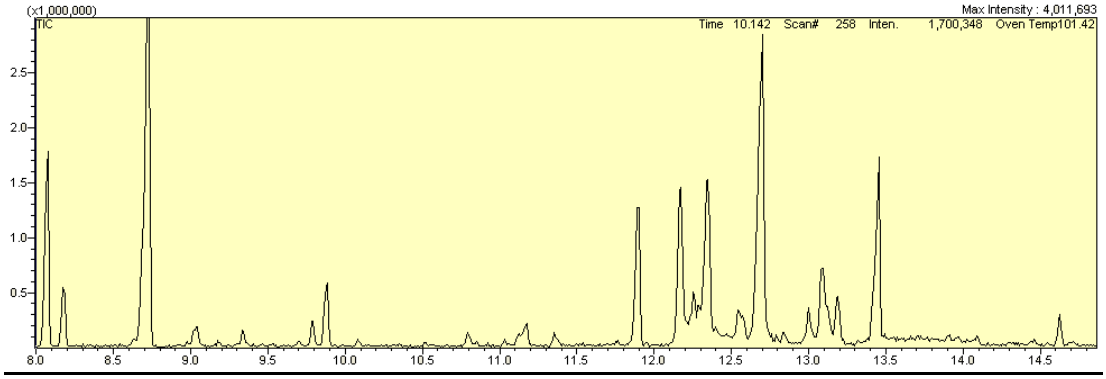
Το τριτερπενικό κλάσμα της *P. lentiscus* L. αποτελεί το 48,91% του αποπολυμερισμένου κλάσματος. Σε αυτό βρέθηκαν δέκα κοινά συστατικά με το ουδέτερο και όξινο κλάσμα της *P. lentiscus* var *Chia*. Το α-πινένιο αποτελεί το 36,7 % του συνολικού επεξεργασμένου κλάσματος.

8.7 Ανάλυση του Αιθέριου Ελαίου της Ρητίνης & των Φύλλων της *Pistacia lentiscus* L. από τη Νότια Κρήτη

8.7.1 Αιθέριο Έλαιο Ρητίνης



Εικόνα 28. GC-MS *Pistacia lentiscus* L. Αιθέριο Έλαιο Ρητίνης



Εικόνα 29. Αιθέριο Έλαιο Ρητίνης, χωρίς το α-πινένιο (περιοχή Rt: 8-15 min)

Pistacia lentiscus L. : Περιεχόμενα Συστατικά στο Αιθέριο Έλαιο της Ρητίνης

Α/Α	Συστατικό	Rt	Ποσοστό %	KI*	KI'
1	α-Πινένιο	7.913	94.56	939	948
2	Καμφένιο	8.072	0.34	954	954
3	Θουγια-2,4(10)-διένιο	8.177	0.09	960	958
4	β-Πινένιο	8.728	0.92	979	980
5	1-π-Μενθένιο	9.703	0.01	1026	1022
6	ο-Κυμένιο	9.790	0.06	1026	1026
7	Λιμονένιο	9.882	0.12	1028	1030
8	Τερπινολένιο	11.128	0.03	1088	1090
9	6-Καμφενόλη	11.174	0.05	1110	1092
10	α-Καμφολενάλη	11.906	0.36	1126	1127
11	trans- Πινοκαρβεόλη	12.183	0.54	1139	1140
12	trans - Περμπενόλη	12.264	0.07	1144	1144
13	Πιθανώς σαμπινόλη	12.309	0.11	-	1146
14	Μη ταυτοποιημένο	12.359	0.38	-	1148
15	Μη ταυτοποιημένο	12.554	0.11	-	1157
16	Μη ταυτοποιημένο	12.713	1.00	-	1165
17	μ-κυμεν-8-όλη	13.015	0.09	1179	1179
18	α-Τερπινεόλη	13.097	0.30	1188	1183
19	Μυρτενάλη	13.198	0.15	1195	1203
20	Βερμπενόνη	13.468	0.57	1205	1198
21	Οξικό βορνύλιο	14.633	0.06	1285	1189

* KI΄ - Πειραματική τιμή Kovats Index συστατικού, KI - Kovats Index βιβλιογραφίας[39]

Σύγκριση των αιθερίων ελαίων της *Pistacia lentiscus L.* και της *Pistacia lentiscus var Chia*[56]

Α/Α	*Συστατικό*	*P. lentiscus L.* %	*P. lentiscus* var *Chia* %
1	α-Πινένιο	94,6	66,48
2	Καμφένιο	0,34	0,83
3	Θουγια-2,4(10)διένιο	0,09	0,41
4	Σαμπινένιο	-	0,28
5	β-Πινένιο	0,92	3,29
6	Μυρκένιο	-	8,34
7	1-π Μενθένιο	0,01	-
8	ο-Κυμένιο	0,06	-
9	π-Κυμένιο	-	0,33
10	Λιμονένιο	0,12	1,26
11	Μεθυλο-ο-κρεσόλη	-	1,17
12	*cis* Οξείδιο της λιναλοόλης	-	0,08
13	α-Τερπινολένιο	0,03	0,14
14	6-Καμφενόλη	0,05	-
15	α-Καμφολενάλη	0,36	-
16	*trans* Πινοκαρβεόλη	0,54	-
17	*trans* Βερμπενόλη	0,07	-
18	Σαβινόλη (δυνητική ταυτοποίηση)	0,11	-
19	Μη ταυτοποιημένο	0,38	-
20	Μη ταυτοποιημένο	0,11	-
21	Μη ταυτοποιημένο	1	-
22	μ-Κυμεν-8-όλη	0,09	-
23	Λιναλοόλη	-	2,84
24	Αλδεΰδη του α-καμφολένιου	-	0,72
25	Τερπιν-4-όλη	-	0,07

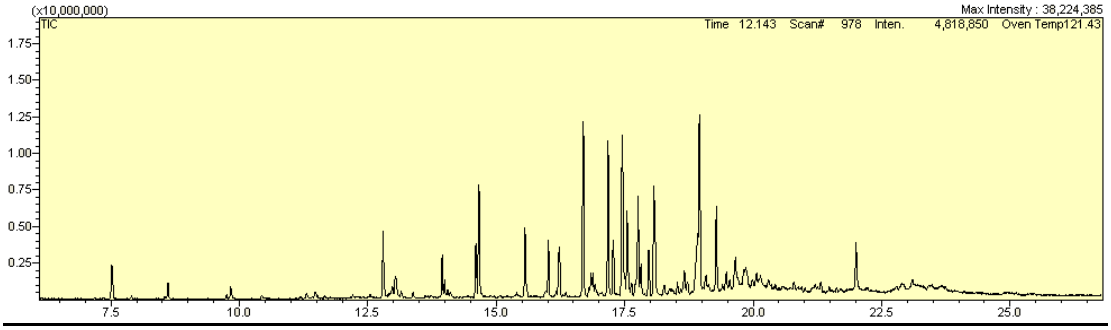
26	α-Τερπινεόλη	0,3	0,28
27	Μυρτενάλη	0,15	-
28	Μυρτενόλη	-	0,61
29	Βερμπενόνη	0,57	0,88
30	Οξικό Βορνύλιο	0,06	-
31	*trans*-Καρβεόλη	-	0,17
32	Z-Ανηθόλη	-	0,06
32	E-Ανηθόλη	-	0,47
34	2-Ενδεκανόνη	-	0,13
35	Μεθυλοευγενόλη	-	0,07
36	*trans* Καρυοφυλλένιο	-	2,04
37	α-Χουμουλένιο	-	0,21
38	Z-Μεθυλο-ισοευγενόλη	-	0,07
39	E-Μεθυλο-ισοευγενόλη	-	0,5
	Σύνολο %	**99,2 %**	**92,73%**

Το αιθέριο έλαιο της ρητίνης της *P. lentiscus* αποτελείται 100% από μονοτερπένια, από τα οποία κυριαρχεί σε ποσοστό 94,56% το α-πινένιο, δηλαδή αποτελείται σχεδόν εξολοκλήρου από το συστατικό αυτό. Σύγκριση της τιμής αυτής με βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι είναι το μόνο αιθέριο έλαιο της *P. Lentiscus,* από οποιαδήποτε περιοχή, το οποίο περιέχει α-πινένιο σε τόσο υψηλό ποσοστό. Σε πολύ μικρότερα ποσοστά περιέχεται το το β-πινένιο (0,92%), η βερμπενόνη (0,57%), α-καμφολενάλη (0,36%), η trans-πινοκαρβεόλη (0,54%), το καμφένιο (0,34%), καθώς και ένα μη αναγνωρίσιμο συστατικό σε ποσοστό 1%.

Αντίθετα, το αιθέριο έλαιο της *P. lentiscus* var. *Chia*, περιέχει και σεσκιτερπένια. Βιβλιογραφικά δεδομένα[16,17,18,56,57,58,59] δείχνουν ποσοστά 66,48% σε α-πινένιο και μη αμελητέες ποσότητες από μυρκένιο (8,34%), β-πινένιο (3,29%), λιναλοόλη (2,84%), trans καρυοφυλλένιο (2,04%), λιμονένιο (1,26%), μεθυλο-ο-κρεσόλη (1,17%), βερμπενόνη (0,88%) και καμφένιο (0,83%). Το αιθέριο έλαιο της *P. lentiscus* var *Chia* έχει μεγαλύτερη ποικιλία όχι μόνο σε σεσκιτερπένια, αλλά και σε μονοτερπένια.

Συνολικά εντοπίστηκαν 8 κοινές ενώσεις στο αιθέριο έλαιο της ρητίνης των δύο ειδών. Ωστόσο το αιθέριο έλαιο των δύο ειδών έχει αρκετά παρόμοιο άρωμα. Αυτό ίσως σημαίνει ότι ένας συνδυασμός των κοινών συστατικών είναι εν μέρει υπεύθυνος για το ξεχωριστό άρωμα της μαστίχας.

8.7.2 Αιθέριο Έλαιο Φύλλων



Εικόνα 30, GC-MS των φύλλων της *Pistacia lentiscus* var *Chia*

Pistacia lentiscus L. Περιεχόμενα Συστατικά στο Αιθέριο Έλαιο Φύλλων

Α/Α	**Συστατικό**	**R_t**	**AREA%**	**KI**	**KI'**
1	α-Πινένιο	7.520	1.55	939	933
2	α- Φενχένιο	7.902	0.13	952	948
3	Σαμπινένιο	8.551	0.11	975	975
4	β- Πινένιο	8.612	0.68	979	977
5	π- Κυμένιο	9.752	0.17	1024	1029
6	Λιμονένιο	9.835	0.57	1029	1034
7	Δίυδρολιναλοόλη	11.312	0.22	1090	1109
8	Μη ταυτοποιημένο	11.479	0.35	-	1118
9	cis- Θουγίονη	12.208	0.11	1102	1155
10	Πινοκαρβόνη	12.547	0.10	1164	1173
11	Τερπινεν-4-όλη	12.800	2.92	1174	1186
12	Κρυπτόνη	12.977	0.53	1185	1195
13	α-Τερπινεόλη	13.038	1.55	1188	1198
14	Μυρτενάλη	13.149	0.30	1195	1204
15	Βερμπενόνη	13.381	0.24	1205	1219
16	Εξανοϊκό ισοαμύλιο	13.948	1.57	1246	1256

17	Μη ταυτοποιημένο	13.994	0.64	1246	1259
18	Οξικό βορνύλιο	14.605	2.10	1288	1298
19	2-Ενδεκανόνη	14.661	4.39	1293	1302
20	Οξικό α-τερπινύλιο	15.560	3.01	1349	1360
21	Σεκσκιτερπένιο (μη ταυτοποιημένο)	15.964	0.41	-	1386
22	α-Κοπανένιο	16.015	2.20	1376	1389
23	β-Μπουρμπονένιο	16.167	0.12	1388	1399
24	β-Ελεμένιο	16.227	2.35	1390	1403
25	Μέθυλοευγενόλη	16.350	0.22	1403	1413
26	Z-Καρυοφυλλένιο	16.693	7.09	1408	1438
27	Βενζυλικό ισοαμύλιο	16.844	0.35	1433	1449
28	Οκτανοϊκό ισοαμύλιο	16.879	0.90	1442	1452
29	Μη ταυτοποιημένο	16.925	0.94	1442	1455
30	α- Χουμουλένιο	17.176	6.06	1454	1474
31	Αλλοαρομανδρένιο	17.278	2.24	1460	1482
32	γ-Μουουρολένιο	17.454	7.92	1479	1495
33	Γερμακρένιο Δ	17.550	3.63	1485	1502
34	cis-β-Γουαένιο	17.634	0.60	1492	1508
35	γ-Αμορφένιο	17.708	0.63	1495	1514
36	α-Μουουρολένιο	17.760	4.40	1500	1518
37	β-Μπισαμπολένιο	17.817	1.26	1505	1522
38	γ- Καδινένιο	17.971	1.80	1513	1533
39	δ- Καδινένιο	18.071	6.49	1522	1541
40	α- Καδινένιο	18.271	0.55	1538	1556
41	α-Καλακορένιο	18.373	0.15	1545	1563
42	Ελεμικίνη	18.406	0.25	1557	1566
43	Μη ταυτοποιημένο	18.527	0.49	-	1575
44	Μη ταυτοποιημένο	18.592	0.21	-	1580

45	3-Εξανοϊκό βενζόλιο	18.661	1.33	1566	1585
46	Μη ταυτοποιημένο	18.720	0.58	-	1589
47	Σπαθουλενόλη	18.916	3.95	1578	1604
48	Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	18.956	8.03	1583	1607
49	2-α-Θουγιοψανόλη	19.080	1.11	1587	1618
50	Εποξείδο του χουμουλενίου ΙΙ	19.286	3.60	1608	1635
51	cis-Καδιν-4-εν-7-όλη	19.474	0.79	1636	1651
52	α-Μουουρολόλη	19.652	2.55	1646	1665
53	α-Καδινόλη	19.820	0.90	1654	1679
54	cis-Καλαμενεν-10-όλη	19.863	0.99	1661	1683
55	trans-Καλαμενεν-10-όλη	19.987	0.26	1669	1693
56	cis -14-νορ-Μουουρολ-5-εν-4-όνη	20.791	0.42	1689	1760
57	Μη ταυτοποιημένο	22.004	2.22	-	1847
58	Ισοδικυκλογερμακρένιο	22.900	0.77	1734	1903

* KI΄ - Πειραματική τιμή Kovats Index συστατικού, KI - Kovats Index βιβλιογραφίας[39]

Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων της *P. lentiscus* L. ταυτοποιήθηκαν 51 από τα 58 συστατικά . Εδώ το μεγαλύτερο ποσοστό των συστατικών αποτελείται από σεσκιτερπένια (καρυοφυλλένιο, α-χουμουλένιο, δ-καδινένιο) και σε επίσης μεγάλο ποσοστό από οξείδια αυτών (πχ οξείδιο του καρυοφυλλενίου και του χουμουλενίου). Επίσης περιέχεται μεγάλο ποσοστό μη τερπενικών ενώσεων όπως η 2-ενδεκανόνη και ισοαμυλικοί εστέρες. Σε μικρότερα ποσοστά ξεχωρίζουν τα μονοτερπένια τερπινεν-4-όλη, α-τερπινεόλη, ενώ εδώ το α-πινένιο βρίσκεται σε ποσοστό 1.55%, ποσοστό πολύ μικρότερο από ότι στα υπόλοιπα μέρη της *P. lentiscus L.*που μελετήθηκαν. Αντίστοιχη σύσταση έχουν τα φύλλα *P. lentiscus* πολλών περιοχών,[57,58,59] ωστόσο, τόσο τα συστατικά, όσο και οι περιεκτικότητες κυμαίνονται.

Σύγκριση του αιθέριου ελαίου των φύλλων της *Pistacia lentiscus L.* και της *Pistacia lentiscus* var *Chia*

Α/Α	*Συστατικό*	*P. lentiscus L %*	*P. lentiscus var Chia %*
1	3-Εξενόλη	-	*0.48*
2	α-Πινένιο	1.55	0.78
3	α- Φενχένιο	0.13	-
4	Μυρκένιο	-	20.58
5	Σαμπινένιο	0.11	-
6	β- Πινένιο	0.68	0.14
7	α-Φελλανδρένιο	-	0.38
8	Οξική 3-εξεν-1-όλη	-	0.21
9	α-Τερπινένιο	-	0.13
10	π- Κυμένιο	0.17	0.06
11	Λιμονένιο	0.57	-
12	Δίυδρολιναλοόλη	0.22	-
13	Μη ταυτοποιημένο	0.35	-
14	cis- Θουγιόνη	0.11	-
15	Πινοκαρβόνη	0.10	-
16	β-Φελλανδρένιο	-	1.43
17	Ε-β-Οκιμένιο	-	0.08
18	Βουτανοϊκό οξύ-3-μεθυλο-βουτυλεστέρας	-	0.11
19	γ-Τερπινένιο	-	0.13
20	α-Τερπινολένιο	-	0.18
21	2-Εννεάνιο	-	0.17
22	Λιναλοόλη	-	0.17
23	Τερπινεν-4- όλη	2.92	0.18
24	Κρυπτόνη	0.53	-

25	Βουτανοϊκό οξύ3-εξανοϊκός εστέρας	-	0.13
26	α-Τερπινεόλη	1.55	1.27
27	Μυρτενάλη	0.30	-
28	Βερμπενόνη	0.24	-
29	Εξανοϊκό ισοαμύλιο	1.57	-
30	Μη ταυτοποιημένο	0.64	-
31	Οξικό βορνύλιο	2.10	-
32	Μυρτενόλη	-	0.06
33	cis-3-Εξεν-2-μεθυλο-βουτάνιο	-	0.09
34	2-Ενδεκανόνη	4.39	0.39
35	Οξικό α-τερπινύλιο	3.01	-
36	Σεκσκιτερπένιο	0.41	-
37	α-Υλανγκένιο	-	0.08
37	α-Κοπανένιο	2.20	0.78
39	β-Μπουρμπονένιο	0.12	0.11
40	β-Κουμπεμπένιο	-	0.21
41	β-Ελεμένιο	2.35	0.69
42	Μέθυλοευγενόλη	0.22	-
43	trans-καρυοφυλλένιο	7.09	8.33
44	Βενζυλικό ισοαμύλιο	0.35	-
45	Οκτανοϊκό ισοαμύλο	0.90	-
46	Μη ταυτοποιημένο	0.94	-
47	2-Μέθυλο-βούτυλο-βενζόλιο	-	0.14
48	α- Χουμουλένιο	6.06	3.60
49	Άλλο-αρομανδρένιο	2.24	0.82
50	γ-Μουουρολένιο	7.92	-
51	Γερμακρένιο Δ	3.63	13.30
52	β-Σελινένιο	-	0.23

53	Λεδένιο	-	0.35
54	cis-β-Γουαιένιο	0.60	-
55	γ-Αμορφένιο	0.63	-
56	α-Μουουρολένιο	4.40	-
57	β-Μπισαμπολένιο	1.26	-
58	α-Μουουρολένιο	-	2.44
59	Ε,Ε-Φαρνεσένιο	-	0.32
60	γ- Καδινένιο	1.80	0.82
61	δ- Καδινένιο	6.49	7
62	Καδιν-1,4-διένιο	-	0.55
63	α-Καδινένιο	0.36	0.55
64	Ελεμόλη	-	0.2
65	α-Καλακορένιο	0.15	-
66	Ελεμικίνη	0.25	-
67	Μη ταυτοποιημένο	0.49	-
68	Μη ταυτοποιημένο	0.21	-
69	3-Εξανοϊκό βενζόλιο	1.33	-
70	Μη ταυτοποιημένο	0.58	-
71	Σπαθουλενόλη	3.95	-
72	Γερμακρένιο Β	-	0.38
73	Νερολιδόλη	-	0.15
74	Βενζυλική-3-εξεν-1-όλη	-	0.24
75	Σπαθουλενόλη	-	0.2
76	Οξέιδιο του καρυοφυλλενίου	8.03	0.41
77	Torreyol	-	2.07
78	γ-Ευδεσμόλη	-	2.1
79	επι-α-Καδινόλη	-	5.86
80	β-Ευδεσμόλη	-	0.92

81	2-α-Θουγιοψανόλη	1.11	-
82	Εποξείδο του χουμουλενίου ΙΙ	3.60	-
83	cis-Καδιν-4-εν-7-όλη	0.79	-
84	α-Μουουρολόλη	2.55	-
85	α-Καδινόλη	0.90	7.33
86	Βενζοϊκός βενζυλεστέρας	-	0.15
87	Σαλικυλικός βενζυλεστέρας	-	0.07
88	cis-Καλαμενεν-10-όλη	0.99	-
89	trans-Καλαμενεν-10-όλη	0.26	-
90	14-νορ-Μουουρολ-5-εν-4όνη	0.42	-
91	Μη ταυτοποιημένο	2.22	-
92	Ισοδικυκλογερμακρένιο	0.77	-
	Σύνολο	95.74	87.36

Από τον κατάλογο των 92 συστατικών που εμφανίζονται τουλάχιστον σε ένα υποείδος, εμφανίζονται μόνο 18 κοινά συστατικά με αρκετά διαφορετικά ποσοστά στο κάθε υποείδος. Τα συστατικά αυτά αποτελούν το 52,52% της *P. lentiscus* L. και το 46,56 % της *Pistacia lentiscus* var *Chia*. Χαρακτηριστικό είναι ότι στα φύλλα από την Κρήτη δεν απομονώθηκε καθόλου μυρκένιο-το οποίο όμως είναι το πιο βασικό συστατικό των φύλλων από τη Χίο.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε το τριτερπενικό κλάσμα και τα αιθέρια έλαια της ρητίνης και των φύλλων της *P. lentiscus* L. από τη νότια Κρήτη.

- Στο τριτερπενικό κλάσμα βρέθηκαν 16 συστατικά, από τα οποία ταυτοποιήθηκαν τα 10.

- Διαπιστώθηκε ότι οι μεθυλεστέρες που βρέθηκαν στη ρητίνη της *P. lentiscus* L. από τη νότια Κρήτη, σε άλλα είδη συναντώνται ως ελεύθερα τριτερπενικά οξέα.

- Είναι η πρώτη φορά που αναφέρονται οι συγκεκριμένοι τριτερπενικοί μεθυλεστέρες από κάποιο είδος *Pistacia lentiscus*.

- Συγκριτικά με την ρητίνη της *P. lentiscus var Chia*, ταυτοποιήθηκαν με GC-MS έξι κοινά ουδέτερα συστατικά, ενώ τέσσερα ακόμη ταυτοποιήθηκαν στην κρητική ποικιλία ως μεθυλεστέρες.

- Απομονώθηκε το αιθέριο έλαιο από τη ρητίνη και τα φύλλα της *Pistacia lentiscus* L και μελετήθηκαν με GC-MS, όπου βρέθηκε ότι αποτελούνται από 21 και 58 συστατικά αντίστοιχα.

- Στο αιθέριο έλαιο της ρητίνης ταυτοποιήθηκαν συνολικά 17 συστατικά, με βασικό συστατικό της τάξης του 94,56 %, το α-πινένιο. Στο ολικό κλάσμα χωρίς το πολυμερές (TMEWP) το α-πινένιο αποτελεί το 36,7 % .

- Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται τόσο υψηλό ποσοστό α-πινένιου σε αιθέριο έλαιο είδους *P. lentiscus*.

- Έγινε σύγκριση με το αιθέριο έλαιο της μαστίχας Χίου, όπου το α-πινένιο υπάρχει σε ποσοστό 66,48 %. Συνολικά στα δύο αιθέρια έλαια ταυτοποιήθηκαν 8 κοινά συστατικά. Επίσης αντίθετα από τη χιώτικη, στην κρητική ποικιλία δεν βρέθηκαν σεσκιτερπένια.

- Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων της κρητικής μαστίχας ταυτοποιήθηκαν 51 συστατικά, από τα οποία τα 18 απαντώνται και στην μαστίχα Χίου.

REFERENCES

[1] Nahida, Ansari, S.H., Siddiqui, A.N. *Pistacia lentisus: A Review on Phytochemistry and*

[2] Mezni, F., Khouja, M.L., Gregoire, S., Khaldi, A., Berdeaux, O. *Effect of growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid composition of Pistacia lentiscus edible oil*, Natural Product Research **2014**, 28 (16), 1225-1230

[3] Djerrou, Z., Maameri, Z., Hamdi-Pacha, Y., Serakta, M., Riachi, F., Djaalab, H., Boukeloua, A. *Effect of virgin fatty oil of Pistacia lentiscus on experimental burn wound's healing in rabbits,* African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, **2010**, 7 (3), 258-263

[4] Paraschos, S., Magiatis, P., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Papadopoulou, C., Skaltsounis, A.-L. *Chemical investigation and antimicrobial properties of mastic water and its major constituents,* Food Chemistry, **2011,** 129 (3), 907-911

[5] Assimopoulou, A.N., Zlatanos, S.N., Papageorgiou, V.P. *Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates,* Food Chemistry **2005**, 92 (4), 721-727

[6] Soulioti, I., Papadopoulou, M. *Antioxidant and anti-inflammatory properties of pistacia lentiscus linn: Recent scientific research in wound healing*, Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, International Edition **2013,** 27 (3), 107-116

[7]Huwez, F.U., Thirlwell, D., Cockayne, A., Ala'Aldeen, D.A.A. *Mastic gum kills Helicobacter pylori,* New England Journal of Medicine, **1998**, 339 (26), 1946

[8] Dabos, K.J., Sfika, E., Vlatta, L.J., Frantzi, D., Amygdalos, G.I., Giannikopoulos, G. *Is Chios mastic gum effective in the treatment of functional dyspepsia? A prospective randomised double-blind placebo controlled trial,* Journal of Ethnopharmacology , **2010**, 127 (2), 205-209

[9] Giaginis, C., Theocharis, S. *Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum* Nutrition and Cancer, **2011**, 63 (8), 1174-1184.

[10] Al-Habbal, M.J., Al-Habbal, Z., Huwez, F.U. *A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer,* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, **1984**, 11 (5), 541-544

[11] Al-Said, M.S., Ageel, A.M., Parmar, N.S., Tariq, M. *Evaluation of mastic, a crude drug obtained from Pistacia lentiscus for gastric and duodenal anti-ulcer activity* Journal of Ethnopharmacology, **1986**, 15 (3), 271-278

[12] Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Izumi, S., Hirata, T *Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species* **2003**, Fitoterapia 74 (1-2), 170-176

[13] Kivçak, B., Akay, S., Demirci, B., Başer, K.H.C. *Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of Pistacia lentiscus, Pistacia lentiscus var. chia, and Pistacia terebinthus from Turkey*, Pharmaceutical Biology **2004,** 42 (4-5), 360-36

[14] Sáez, J.M., López, J., Romero, M. *The historical roots of popular practices in oral health: Pistacia lentiscus in Cartagena, Murcia (Spain),* Journal of the History of Dentistry **2005**, 53 (3), 109-12.

[15] Kokolakis, A.K., Kouvarakis, A.N., Katerinopoulos, H.E. *Effect of hydrodistillation with phosphoric acid on the yield of Chios mastic gum essential oil*, Flavour and Fragrance Journal **2010,** *25*, 48-53

[16] Zrira, S.; Elamrani, A.; Benjilali, B., *Chemical composition of the essential oil of Pistacia lentiscus L. from Morocco - A seasonal variation,* Flavour and Fragrance Journal **2003,** 18 (6), 475-480

[17] Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Izumi, S., Hirata, T. *Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species,* Fitoterapia **2003,** 74, (1–2), 170–176

[18] Papageorgiou, V.P., Sagreros, A.N, Moses, R. *GLC-MS computer analysis of the essential oil of mastic gum.* Chimika Chronika , New Series **1981**,10,119-124

[19] Bachrouch, O., Mediouni-Ben Jemâa, J., Wissem, A.W., Marzouk, B., Abderraba, M. *Composition and insecticidal activity of essential oil from Pistacia lentiscus L. against Ectomyelois ceratoniae Zeller and Ephestia kuehniella Zeller (Lepidoptera: Pyralidae),* Journal of Stored Products Research **2010**, 46 (4), pp. 242-247

[20] Cartoni, G., Russo, M.V., Spinelli, F., Talarico, F. *Characterisation of fresh and aged terpenic resins by micro-FTIR and GC-MS analyses of varnishes in XVI-XVII centuries paintings*, Annali di Chimica, **2003**, 93 (11), 849-861

[21] Nicholso T.M., Gradl M., Welte B., Metzger M., Push M.C. Albert K., *Enlightening the past: Analytical proof for the use of Pistacia exudates in ancient embalming resins*, Journal of Separation Science, **2011,** 134, (23), 3364-3371

[22] Modugno, F., Ribechini, E., Colombini, M.P. *Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry,* Rapid Communications in Mass Spectrometry **2006**, 20, (11),1787-800.

[23] Θωμάς Σαββίδης, *Το μαστιχόδεντρο της Χίου*, εκδ. Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, **2000**

[24] Stauffer, D. *Chewing gum: An ancient and modern forest product,* Forest Chemicals Review **2002**, 112 (4), 9

[25] Paraschos, S., Mitakou, S., Skaltsounis, A.-L. *Chios gum mastic: A review of its biological activitie*s, Current Medicinal Chemistry, **2012**, 19 (14), 2292-2302

[26] Van Den Berg, K.J., Van Der Horst, J., Boon, J.J., Sudmeijer, O.O. *Cis-1,4-poly-β-myrcene; The structure of the polymeric fraction of mastic resin (Pistacia lentiscus L.) elucidated,* Tetrahedron Letters **1998**, 39, (17), 2645–2648

[27] De la E. R., *Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin,* Studies in Conservation **1988**, 33, b 53-70.

[28] Van der Doelen, G. A. *Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes,* **1999** PhD Thesis University of Amsterdam

[29] Dietemann, P., Kúilin, M., White, R., Sudano, C., Knochenmuss, K, Zenobi, R. Z. Dark *Harvesting of Triterpenes Resins used for Varnishes,* Z. Kunsttechnol. Konserv. **2005**, 19, 117-128.

[30] Scott, *G. Atmospheric oxidation and antioxidants*, Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam, **1993**

[31] Feller, R. L. *Accelerated Aging: Photochemical and Thermal Aspects,* **1994** Ed. D. Berland, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, USA

[32] Koller, J., Baumer, U., Grosser, D., Schmid, E. In *Arbeitshefie des Bαyerischen Landesamtes f u r Denkmαlpflege,* Walch, K., Koller, J., Eds., Karl M. Lipp Verlag: Munchen, **1997**; Vol. 81, 347-358.

[33] Agata, I., Corey, E. J., Hortmαnn, A. G.; Klein, J., Proskow, S., Ursprung, J. J. *Oxidative Rearrangements of Pentacyclic Triterpenes. A Method for the Synthesis of Certain Naturally Occurring Triterpenes from a- and β-Amyrin* , Journal of Organic Chemistry **1965,** 30, 1698

[34] Melera, A., Arigoni, D., Eschenmoser, A., Jeger, O., Ruzicka, *L.* Helvetica. Chimica Acta. Acta **1956,** 39, 441.

[35] Van der Doelen, G. A., Van den Berg, K. J., Boon, J. J.; Shibayama, N., de la Rie, R. E., Genuit, W. J. L. *Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry*, Journal of Chromatography. A **1998**, 809, 21-37.

[36] Van der Doelen, G. A., Van den Berg, K. J., Boon, J. J. *Comparative chromatographic and massspectrometric studies of triterpenoid varnishes: Fresh material and aged samples from paintings,* Studies in Conservation **1998,** 43, 249-264

[37] Martin, A. *The use of antioxidants in healing,* Dermatologic Surgery (**1996**) , 22 (2), 156-160

[38] Rivas da Silva, A.C., Monteiro Lopes P.,Barros de Azevedo M.M., Machado Costa D.C., Sales Alviano C., Sales Alviano D. *Biological Activities of a-Pinene and β-Pinene Enantiomers Molecules* **2012**, *17* (6), 6305-6316

[39] Van den Dool, H., Kratz, P. D. *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography*, Journal of Chromatography. **1963**, 11, 463-471

[40] Βαλεντίνη Ιγνατιάδου Ραγκούση, *Χημεία Φυσικών προϊόντων*, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα **2009**

[41] Barton D.H.R., Seoane E. Triterpenoids. Part XXII. *The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid,* Journal of the Chemistry Society **1956**, 4150–4157

[42] Colombini MP., Modugno F., Giannarelli S., Fuoco R., Matteini M. *GC-MS characterization of paint varnishes,* Microchemical Journal **2000**, 67, 385–396.

[43] Mills J.S., White, R. *The identity of the resins from the Late Bronze Age shipwreck at Ulu Burun (Kas),* Archaeometry **1989**, 31, 37– 44.

[44] Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou M.N., Apazidou K.K., , Psarros E.E., *Gas-chromatographic mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum,* Journal of Chromatography A **1997**, 769, 263–273.

[45] Seoane E. *Crystalline constituents of gum mastic*, Journal of the Chemical Society **1956**, 4158–4160.

[47] Dietemann P., Kalin M., Zumbuhl S., Knochenmuss R., Wulfert S., Zenobi R. *A mass spectrometry and electron paramagnetic resonance study of photochemical and thermal aging of triterpenoid varnishes*, Analytical Chemisty **2001**, 73, 2087–2096.

[48] Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. *GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of pistacia species.Part I. Pistacia lentiscus var Chia,* Biomedical Chromatography **2005**, 19, 285-311.

[49] Budzikiewicz H., Wilson J.M., Djerassi C. *Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XXXI .Pentacyclic triterpenes*, Journal of the American Chemical Society **1963**, 853688-3699.

[50] Regert M., Rolando C. *Identification of archaeological adhesives using direct inlet electron ionization mass spectrometry*, Analytical Chemistry **2002**, 74, 965–975.

[51] Van der Doelen G.A., van den Berg K.J., Boon J.J., Shibayama N., de la Rie E.R., Genuit W.J.L. *Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry*, Journal of Chromatography A **1998**, 809, 21– 37.

[52] Paraschos, S., Magiatis, P., Mitakou, S., Petraki, K., Kalliaropoulos, A., Maragkoudakis, P., Mentis, A.; Sgouras D., Skaltsounis. A. L. *In Vitro And In Vivo Activity Of Chios Mastic Gum Extracts And Constituents Against Helicobacter pylori,* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **2007,** *51*, 551-559

[53] Kokolakis, A. Master's Thesis, Archives of the University of Crete, Greece, **2008**

[54] Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Edition, Allure Publishing Co., Carol Stream, IL, 1995

[55] NIST chemistry web book http://webbook.nist.gov/chemistry/ Accessed 17.09.2014

[56]Magiatis, P., Meliou E., Skaltsounis, A-L., Chinou, I. B., Mitaku, S. *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. Chia*, Planta Medica **1999**, 65 (8), 749-752

[57] Lo Presti, M., Sciarrone, D., Crupi, M.L., Dugo, G., Mondello, L. *Evaluation of the volatile and chiral composition in Pistacia lentiscus L. essential oil*, Flavour and Fragrance Journal **2008**, 23, (4), 249–257,

[58] Douissa, F.B., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Mariotte, A.-M., Dijoux-Franca, M.-G. *New study of the essential oil from leaves of Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) from Tunisia*, Flavour and Fragrance Journal **2005**, 20 (4), 410-414

[59] Kivçak, B., Akay, S., Demirci, B., Başer, K.H.C. *Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of Pistacia lentiscus, Pistacia lentiscus var. chia, and Pistacia terebinthus from Turkey*, Pharmaceutical Biology **2004**, 42 (4-5), 360-366