



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Ανάπτυξη μεθόδου παραλαβής και ανάλυσης του
τριτερπενικού κλάσματος και αιθερίου ελαίου της Μαστίχας



Κωνσταντίνος Σιαφάκας

Χημικός

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: “Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων”

Επιβλέπων Καθηγητής: Αλέξανδρος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Αθήνα, 2019

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:

Απομόνωση- Ανάπτυξη- Παραγωγή και έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος εργασίας:

Ανάπτυξη μεθόδου παραλαβής και ανάλυσης του τριτερπενικού κλάσματος και αιθερίου ελαίου της Μαστίχας

Φοιτητής:

Κωνσταντίνος Σιαφάκας

A.M: 171904

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αλέξανδρος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου

Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη

Ευχαριστίες

- Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κα. Σοφία Μητάκου και την επίκουρη καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Μαρία Χαλαμπαλάκη για την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν και την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.
- Το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων και επιβλέπων καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη για την επιλογή του να μετάσχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών και την ευκαιρία που μου έδωσε μέσω της ανάθεσης του συγκεκριμένου θέματος, καθώς και το το συνεχές ενδιαφέρον, τις καταλυτικές συμβουλές της και την βοήθεια συγγραφής της παρούσας εργασίας
- Ευχαριστω εκ βαθέων τον μεταδιδάκτορα Αποστόλη Αγγελή για το γεγονός ότι υπήρξε πάντα δίπλα μου όποτε τον χρειάστηκα, για τις συμβουλές του τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, για την υπομονή και το αμέριστο ενδιαφέρον του. Δίχως την καθοδήγησή του όλα θα έμοιαζαν πιο δύσκολα.
- Τον μεταδιδάκτορα Λευτέρη Πετράκη για την βοήθειά του στην παραλαβή και επεξεργασία του αιθερίου ελαίου, καθώς και τις συμβουλές του στην διαδικασία επεξεργασίας του αιθερίου ελαίου.
- Τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Μιχαηλίδη για την βοήθεια του στα πειράματα CPC, αλλά και την γενικότερη συμβολή του στην ένταξη μου στο εργαστήριο.
- Την συνάδελφο Μόνικα Αντωνιάδη για την συμβολή της στην ένταξή μου στο εργαστήριο, την βοήθειά της και τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού
- Τον Dr. Dieter Brueck για τις μελέτες εύρεσης του μοριακού βάρους του πολυμερούς
- Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους μεταπτυχιακούς συναδέλφους και τους διδακτορικούς φοιτητές του εργαστηρίου, χωρίς την παρουσία και την παρέα των οποίων τα δύο αυτά χρόνια δεν θα ήταν τόσο ενδιαφέροντα.

- Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την συμπαράστασή τους, τις συμβουλές και την αρωγή τους σε όλη αυτή την προσπάθεια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ΣΚΟΠΟΣ	9
Abstract	11
Συνομειύσεις	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
1.1 Pistacia Lentiscus var. Chia - Μαστίχα Χίου	17
1.1.1. Γενικές γνώσεις.....	17
1.1.2 Ειδικότερα στοιχεία για το είδος Pistacia Lentiscus var. Chia	18
1.1.3 Καλλιέργεια-Τρόποι συγκομιδής.....	20
1.2 Εθνοφαρμακολογία	24
1.3 Χημική σύσταση ρητίνης.....	26
1.3.1. Κατεργασία της Μαστίχας Χίου - εκχυλιστικές μέθοδοι, μέθοδοι απόσταξης, απομόνωση	26
1.3.2. Συστατικά ρητίνης	27
1.3.2.1 Πολυμερές	27
1.3.2.2. Πτητικά Συστατικά	28

1.3.2.3. Τριτερπενικό κλάσμα	31
1.3.2.4. Φαινολικές Ενώσεις	33
1.3.2.5. Άλλες Ενώσεις.....	34
1.4. Αναλυτικές μέθοδοι για την επεξεργασία της μαστίχας Χίου	35
1.5. Βιολογικές Δράσεις	37
1.5.1. Αντιοξειδωτική	37
1.5.2. Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση	38
1.5.3. Αντιφλεγμονώδης δράση.....	40
1.5.4. Αντικαρκινική δράση	41
1.5.5. Καρδιοπροστατευτική δράση	42
1.5.6. Ηπατοπροστατευτική δράση	43
1.5.7. Άλλες δράσεις της μαστίχας.....	44
1.6. Χρήσεις στην ιατρική – φαρμακευτική και προϊόντα.....	44
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
2.1. Τεχνικές και Μέθοδοι.....	48
2.1.1 Χρωματογραφία κατ'αντιρροή (Countercurrent Chromatography-CCC)	48
2.1.2. Υδραπόσταξη.....	57

2.1.3 Απόσταξη υποβοηθούμενη με Μικροκύματα (Microwave assisted extraction)	59
2.1.4. Αέριος Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)	60
2.2. Παραλαβή και ανάλυση αιθερίων ελαίων	65
2.2.1. Παραλαβή αιθερίου ελαίου	65
2.2.2. Ανάλυση με GC-MS αιθερίου ελαίου και υδροσόλης.....	69
2.2.3. Κλασμάτωση αιθερίου ελαίου με CPC	76
2.2.4. Ανάλυση κλασμάτων με GC-MS	83
2.2.5. Συμπεράσματα	89
2.3. Επεξεργασία κολοφωνίου - Απομόνωση και ταυτοποίηση πολυμερούς.....	90
2.3.1. Απομόνωση πολυμερούς.....	90
2.3.2. Ταυτοποίηση πολυμερούς	92
2.3.3. Συμπεράσματα	97
2.4. Επεξεργασία-Ανάλυση Τριτερπενικού κλάσματος μαστίχας και Απομόνωση ελάσσονων συστατικών	99
2.4.1. Παραλαβή τριτερπενικού κλάσματος	99
2.4.2. Κλασμάτωση Τριτερπενικού κλάσματος με rh-zone/step gradient μέθοδο στο CPC100	
2.4.3. Ανάλυση κλασμάτων CPC και ταυτοποίηση των κύριων μεταβολιτών του τριτερπενικού κλάσματος	105
2.4.4. Απομόνωση και ταυτοποίηση ελασσόνων συστατικών.....	121

2.4.5. Συμπεράσματα	153
2.5. Συμπεράσματα-Προοπτικές Μαστίχας	155
Βιβλιογραφία.....	158

ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ΣΚΟΠΟΣ

Η Μαστίχα Χίου είναι μία ελαιορητίνη η οποία εκκρίνεται από τον κορμό και τα κλαδιά των δέντρων του είδους *Pistacia Lentiscus var. Chia* (Anacardiaceae). Αναφορές υπάρχουν από την αρχαιότητα (500 π.χ.) για την χρήση της ως άρτυμα, ως καλλυντικό παράγοντα, αλλά κυρίως ως πιθανό φαρμακευτικό σκεύασμα, λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων της σε γαστρεντερικές διαταραχές. Τα δέντρα του γένους *Pistacia* είναι ευρέως διαδεδομένα στην λεκάνη της Μεσογείου, αλλά η ρητίνη της μαστίχας είναι ξεχωριστό χαρακτηριστικό των δέντρων που ευδοκιμούν στο νησί της Χίου και ειδικότερα στο νοτιότερο τμήμα του (*Pistacia Lentiscus var. Chia*). Η παραγωγή στο σύνολό της προέρχεται από τα 24 χωριά της Χίου (μαστιχοχώρια), όπου η καλλιέργεια των μαστιχόδεντρων και η συλλογή της ρητίνης της μαστίχας είναι μέρος της πολιτιστικής κληρονομιάς τους. Η παραλαβή της ρητίνης της μαστίχας είναι αποτέλεσμα των ρηχών τομών που γίνονται στο φλοιό και στον κορμό του δέντρου με ειδικά εργαλεία που λέγονται “τιμητήρια”. Οι τομές γίνονται συνήθως κατά τη διάρκεια του Ιουλίου και του Αυγούστου, ενώ η συλλογή της ρητίνης πραγματοποιείται στα τέλη του Αυγούστου και τον Σεπτέμβριο (1,2).

Εξαιτίας της υψηλής οικονομικής και φαρμακευτικής αξίας της μαστίχας από το 1997 έχει χαρακτηριστεί ως προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) από την Ευρωπαϊκή Ένωση (European Commission, 1997), ενώ το 2014 η τεχνογνωσία της καλλιέργειας της μαστίχας εγγράφηκε στον κατάλογο της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της UNESCO. Επίσης το 2015, η ρητίνη (μαστίχα) από το είδος *Pistacia Lentiscus L.* αναγνωρίστηκε ως παραδοσιακό φάρμακο φυτικής προέλευσης από τον EMA (Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων) με θεραπευτικές ενδείξεις για ήπιες δυσπεπτικές διαταραχές, δερματικές φλεγμονές και επούλωση μικρών πληγών. Η μαστίχα έχει χρησιμοποιηθεί από τόσο στη λαϊκή θεραπευτική όσο και στην σύγχρονη ιατρική. Η διαχρονικότητα της χρήσης της, αποδεικνύεται μέσω των αναφορών της σε γραπτά του Διοσκουρίδη, του Γαληνού, του Πληνίου και άλλα γραπτά της

κλασικής εποχής. Επιπλέον κατά τη διάρκεια της βυζαντινής και της μεσαιωνικής περιόδου η μαστίχα Χίου κατείχε μία ιδιαίτερη θέση στην παραδοσιακή φαρμακευτική. Πλέον, έχει αναγνωρισθεί επισήμως από τις φαρμακοποιίες της Ευρώπης και της Ασίας(3).

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε προς την μαστίχα τη δεκαετία του 1980 με την δημοσίευση των πρώτων μελετών, οι οποίες αναφέρονταν στις ευεργετικές ιδιότητες της σε γαστροεντερικές φλεγμονές και συγκερκιμένα σε αυτές που προκαλούνται από το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (4). Εκτοτέ, περισσότερες από 80 ενώσεις που παράγονται από την μαστίχα, έχουν ταυτοποιηθεί. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως εκχυλίσματα από διάφορα μέρη του φυτού έχουν μελετηθεί για ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων όπως αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αναλγητικές, αντιδιαβητικές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η μαστίχα είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ομαδοποιούνται στο «οξινο» και «ουδέτερο» κλάσματος, ενώ περιέχει αιθέριο έλαιο και, σε υψηλό ποσοστό, ένα αδιάλυτο πολυμερές, παράγωγο του α- μυρκενίου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη απλής και γρήγορης μεθοδολογίας για την απομόνωση και παραλαβή του πολυμερούς της μαστίχας, με στόχο την ανάπτυξη εύκολων μεθοδολογιών για την περαιτέρω φυτοχημική μελέτη ελασσόνων τριτερπενικών ενώσεων καθώς και η κλασμάτωση του αιθερίου ελαίου της ρητίνης, με καινοτόμες εκχυλιστικές και χρωματογραφικές τεχνικές.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικές τεχνικές για την ανάλυση, κλασμάτωση και απομόνωση των διαφόρων συστατικών της μαστίχας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε: α) Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC) για την λήψη των πρώτων αναλυτικών προφίλ των κλασμάτων της ρητίνης, β) η Χρωματογραφία Φυγοκέντρου Κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography, CPC) για την κλασμάτωση της ρητίνης της μαστίχας, γ) Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector, HPLC-DAD) για την λήψη του αναλυτικού προφίλ κλάσματος της ρητίνης της μαστίχας, δ) Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία παρασκευαστικής κλίμακας

συζευγμένης με συστοιχία διόδων (prep-HPLC-DAD) και δ) Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας παρασκευαστικής κλίμακας (prep-TLC) για την απομόνωση ενώσεων από κλάσματα της ρητίνης.

Abstract

Chios mastic is an olive resin secreted from the trunk and branches of *Pistacia Lentiscus* var. *Chia* (Anacardiaceae). There have been reports since antiquity (500 BC) of its use as a perfume, as a cosmetic agent, but mainly as a potential medicinal product because of its therapeutic properties in gastrointestinal disorders. *Pistacia* trees are widespread in the Mediterranean basin, but the mastic resin is a distinctive feature of the trees that thrive on the island of Chios and especially in its southernmost part (*Pistacia Lentiscus* var. *Chia*). The production as a whole comes from the 24 villages of Chios (mastic villages), where the cultivation of mastic and the collection of mastic resin are part of their cultural heritage. Receiving the mastic resin is the result of the huge incisions made in the coma and the trunk of the tree with special tools called tariffs. The incisions are usually made during July and August, while the resin is harvested in late August and September(1,2).

Due to the high economic and medicinal value of mastic since 1997 it has been designated as a product of the European Union Protected Designation of Origin (PDO), while in 2014 mastic cultivation know-how was included in the UNESCO Intangible Cultural Heritage List. Also in 2015, mastic resin from the species *Pistacia Lentiscus* L. was recognized as a traditional herbal medicine by EMEA (European Medicines Agency) with therapeutic indications for mild dyspepsia, skin inflammation and small wound healing. Mastic has been used by both folk therapists and modern medicine. The timelessness of its use is evidenced by its references to the writings of Dioscurides, Galen, Peloponnese and other classical writings. In addition, during the Byzantine and Medieval periods, Chios mastic had a special place in traditional medicine. It has now been officially recognized by European and Asian pharmacopoeias(3).

The interest of the scientific community turned to mastic in the 1980s with the publication of the first studies, which referred to its beneficial properties in gastrointestinal inflammation and concomitant with those caused by *Helicobacter pylori* (4). Since then, more than 80 mastic-derived compounds have been identified. It is important to note that extracts from various parts of the plant have been studied for a wide range of pharmacological properties such as antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, antidiabetic, cardioprotective, anticancer both in vitro and in vivo. Mastic is rich in secondary metabolites, which are grouped into the "acidic" and "neutral" fractions, containing essential oil and, to a large extent, an insoluble polymer, an anthracene derivative.

The purpose of the present study is to develop a simple and rapid methodology for the isolation and acceptance of mastic polymer, with the aim of developing easy methodologies for further phytochemical study of minor triterpenic compounds as well as fractionation of the essential oil of resin and nitro resin techniques.

In the present study, chromatographic techniques were used to analyze, fractionate and isolate the various constituents of mastic. Specifically, we used: a) TLC to obtain the first detailed profiles of the resin fractions, b) Centrifugal Partition Chromatography (CPC) for the fractionation of the mastic resin, c) High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector (HPLC-DAD) for obtaining the analytical fraction profile of mastic resin, (d) High Performance Liquid Chromatography Prepared Scale (HP-D) and (d) preparative-layer thin-layer chromatography (prep-TLC) to isolate compounds from resin fractions.

Συντομεύσεις

^{13}C NMR	Πείραμα NMR πυρήνων άνθρακα 13
^1H NMR	Πείραμα NMR πρωτονίου μίας διάστασης
Br	Ευρεία
BuOH	Βουτανόλη
CHCl_3	Χλωροφόρμιο
CDCl_3	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CD_3OD	Δευτεριωμένη μεθανόλη
COSY	Correlation Spectrometry
CPC	Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Centrifugal Partition Chromatography)
$^{\circ}\text{C}$	Βαθμοί Κελσίου
d	Διπλή
dd	Διπλή διπλή
ddd	Διπλή διπλή διπλή

δ	Χημική μετατόπιση
DCM	Διχλωρομεθάνιο
C	Άνθρακας
EI	Βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια (Electron Ionisation)
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Αιθανόλη
ESI	Ηλεκτρονιοψεκασμός
H	Υδρογόνο
Hex	Εξάνιο
H ₂ O	Νερό
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
<i>J</i>	Σταθερά σύζευξης

λ	Μήκος κύματος
m	Πολλαπλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
MeOH	Μεθανόλη
min	Λεπτά (minutes)
MS	Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)
m/z	Αναλογία μάζας προς φορτίο
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance)
O	Οξυγόνο
<i>p</i> -	<i>Para</i>
ppm	Parts per million
Prep TLC	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
q	Τετραπλή (quartet)
RP	Αντίστροφης φάσης
s	Απλή κορυφή σε φάσματα πρωτονίου NMR
t	Τριπλή (triplet)

TLC Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)

UV Υπεριώδες

Vis ορατό (visible)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Pistacia Lentiscus var. Chia - Μαστίχα Χίου

1.1.1. Γενικές γνώσεις

Το γένος Pistacia ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae και αποτελείται από 11 είδη: *P. vera*, *P. khinjuk*, *P. terebinthus*, *P. palaestina*, *P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. lentiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. mexicana*, *P. Texana*, *P. Aethiopica*, τα οποία είναι δένδρα ή θάμνοι (5). Τα είδη του γένους αυτού είναι αειθαλείς ή φυλλοβόλοι θάμνοι και δέντρα που χαρακτηρίζονται ως δίοικα ξηροφυτικά και αναπτύσσονται 8 με 10 μέτρα. Τα περισσότερα από αυτά είναι φυλλοβόλα, με το φύλλωμά τους να είναι περσειδές με ελλειπτικά έως στρογγυλά ωοειδή ρητινώδη φύλλα(6). Η *Pistacia Lentiscus L.* είναι ένας αειθαλής θάμνος, η ταξιανθία του οποίου είναι συμπαγής και μοιάζει με στάχυ. Τα άνθη της είναι κίτρινα ή μωβ και ο φέρων καρπός έχει διάμετρο 4 mm. Φύεται στις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου, της Πορτογαλίας και της τροπικής Αφρικής(εικόνα 1)(7).



Εικόνα 1: Απεικόνιση των περιοχών που φύεται το

είδος *Pistacia Lentiscus* στον πλανήτη

1.1.2 Ειδικότερα στοιχεία για το είδος *Pistacia Lentiscus* var. *Chia*

Η βοτανική περιγραφή *Pistacia Lentiscus* var. *Chia* αντιστοιχεί στο καλλιεργούμενο είδος *P. Lentiscus* L. που αναπτύσσεται στο νησί της Χίου και συγκεκριμένα νότια του νησιού στην περιοχή των μαστιχοχωρίων όπως ονομάζεται (1). Η μοναδική αυτή αντιστοίχιση της ονομασίας με την προέλευση των δέντρων οφείλεται στην ικανότητα των μαστιχόδεντρων της νότιας Χίου να παράγουν ρητίνη σε επαρκή ποσότητα και κατάλληλη ποιότητα, πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά, σε αντίθεση με την ρητίνη που παράγεται από δέντρα που καλλιεργούνται σε άλλες περιοχές της Ελλάδας και της υφηλίου (8). Το κλίμα στα μαστιχοχώρια, στο νότιο τμήμα του νησιού της Χίου, εκεί όπου ευνοείται η καλλιέργεια των μαστιχόδεντρων, είναι θερμό και ξηρό (εικόνα 2). Αυτό το κομμάτι του

νησιού οριοθετείται από μια συγκεκριμένη γραμμή που ενώνει τα χωριά Λιθί, Άγιος Γεώργιος Συκούσης και Θυμιανά στη βόρεια πλευρά του, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται εκτός από την μακρόχρονη παράδοση και σε κάποια στοιχεία του εδάφους και του κλίματος που ευνοούν την καλλιέργεια του μαστιχόδεντρου στο συγκεκριμένο τμήμα του νησιού.

Αυτή η μοναδικότητα φαίνεται να οφείλεται σε τρεις συγκεκριμένους παράγοντες:

- Το κλίμα της περιοχής, που οφείλεται στη μορφολογία του εδάφους της περιοχής
- Από τα αρχαία χρόνια οι καλλιεργητές των σχίνων της Χίου εντόπιζαν τα δέντρα με μεγαλύτερη ποσότητα και καλύτερη ποιότητα ρητίνης και τα πολλαπλασίαζαν με μεθοδικό τρόπο και έτσι αυτό οδήγησε στην δημιουργία ευγονισμού. Στη διάρκεια των χρόνων ο ευγονισμός αυτός δημιούργησε ένα είδος σχίνου το οποίο είναι υπερπαραγωγικό σε ρητίνη και έχει εξελιχθεί σε μια πολύ ξεχωριστή ποικιλία με το όνομα *Pistacia Lentiscus var. Chia*
- Η συστηματοποίηση της καλλιέργειας και παραγωγής της μαστίχας από τους αρχαίους Χιώτες ακόμα που το τυποποίησαν σαν προϊόν και το εμπορευματοποίησαν (9).



Εικόνα 2: απεικόνιση της οριοθέτησης της δυνατότητας καλλιέργειας του μασιχόδεντου.

1.1.3 Καλλιέργεια-Τρόποι συγκομιδής

Το είδος *Pistacia Lentiscus var. Chia* ή σχίνος είναι ένας αειθαλής θάμνος που φτάνει σε ύψος τα 2 με 3 μέτρα και αναπτύσσεται με αργό ρυθμό. Η παραγωγή της μαστίχας είναι δυνατή μόνο μετά τον πέμπτο ή έκτο χρόνο της φύτευσης και η απόδοσή της φτάνει το μέγιστο όριο της μετά τον δέκατο πέμπτο χρόνο της ηλικίας του δέντρου. Η μέση απόδοση της παραγωγής του δέντρου σε μαστίχα είναι 150 με 180 γραμμάρια. Η πλήρης ανάπτυξη του δέντρου υφίσταται στα 40 με 50 χρόνια και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 5 μέτρα. Μετά τα 70 χρόνια του δέντρου η παραγωγή σε μαστίχα μειώνεται σημαντικά, ενώ ο μέγιστος χρόνος ζωής του δέντρου είναι

πάνω από 100 χρόνια. Τα δέντρα που κυρίως καλλιεργούνται είναι τα αρσενικά μαστιχόδεντρα λόγω της μεγαλύτερης παραγωγικότητάς τους.

Η καλλιέργεια της μαστίχας περιγράφεται από τα παρακάτω στάδια, ως ακολουθούν:

Οι προκαταρτικές εργασίες, το χωμάτισμα, το πρώτο κέντημα, η πρώτη συλλογή, το δεύτερο κέντημα, η δεύτερη τελική συλλογή, η προκατεργασία της εμπορικής ετοιμασίας και η εμπορική κατεργασία. Η παραγωγική διαδικασία έχει μείνει αναλλοίωτη στο πέρασμα καθώς είναι συνδεδεμένη άμεσα με την παράδοση του νησιού και γι αυτό το λόγο πέρασε το 2014 στον κατάλογο της άυλης πολιτιστικής κληρονομιάς της ανθρωπότητας (10).

- **Οι προκαταρτικές εργασίες** αφορούν την προετοιμασία των δέντρων που πρόκειται να κεντηθούν και την προετοιμασία του περιβάλλοντος εδάφους. Ξεκινάει από το Δεκέμβριο με την λίπανση των σχίνων και συνεχίζει στα μέσα του Ιανουαρίου μέχρι τον Φεβρουάριο με το κλάδεμα των χαμηλών κλαδιών. Τον Μάρτιο και τον Απρίλιο γίνεται το σκάψιμο του εδάφους για την απομάκρυνση τυχόν ζιζανίων. Πριν το κέντημα και την πρώτη συλλογή το έδαφος γύρω από το βλαστό ελευθερώνεται από τυχόν άλλα φυτά και από τα μέσα Ιουνίου μέχρι τις αρχές Ιουλίου γίνεται το καθάρισμα και η ισοπέδωση του εδάφους ώστε οι σταγόνες μαστίχας που θα πέσουν στο έδαφος να μπορούν να συλλεχθούν σχετικά εύκολα.
- **Το χωμάτισμα** αφορά την κάλυψη του εδάφους με ασπρόχωμα το οποίο αποτελείται από ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3) και είναι αδρανές υλικό, ώστε να μην επηρεάζονται οι φυσικές και χημικές ιδιότητες της μαστίχας και η καθαρότητά της.

Αυτό γίνεται με σκοπό οι σταγόνες της μαστίχας που πέφτουν πάνω του να αποκτούν λαμπρότητα, να στερεοποιούνται και να μαζεύονται ευκολότερα.

- **Το πρώτο κέντημα** ξεκινάει τον Ιούλιο και διαρκεί έως τον Αύγουστο. Γίνεται με συγκεκριμένα εργαλεία που ονομάζονται <<κεντητήρια>>. Οι τομές έχουν συγκεκριμένο μήκος, βάθος και αριθμό ανάλογα με το μέγεθος και την ηλικία κάθε δέντρου. Το κέντημα γίνεται νωρίς το πρωί και δύο φορές την εβδομάδα, ενώ συνεχίζεται για 5-6 εβδομάδες, με αποτέλεσμα η μαστίχα εξέρχεται από τον φλοιό.
- **Η πρώτη συλλογή** γίνεται μετά τις 15 Αυγούστου και η στερεοποίησή της γίνεται 15-20 μέρες μετά το πρώτο κέντημα. Η συλλογή γίνεται τις πρώτες πρωινές ώρες με εργαλεία που λέγονται <<τιμητήρια>> αφού σταθεροποιηθεί η μαστίχα. Πρώτα συλλέγεται η χοντρή μαστίχα, η αλλιώς <<πίτα>>, η μαστίχα που έχει πήξει στον κορμό του δέντρου, τα λεγόμενα <<δάκρυα>>, και αυτή που κρέμεται από τα κλαδιά του δέντρου, ή αλλιώς <<φλισκάρια>>. Έπειτα συλλέγεται σε ξύλινα κιβώτια και αποθηκεύεται σε δροσερούς χώρους, όπου και καθαρίζεται για να παραδοθεί στην Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (Ε.Μ.Χ.).



Εικόνα 3: από την διαδικασία συλλογής της ρητίνης μαστίχας

1.2 Εθνοφαρμακολογία

Ήδη οι πρώτες αναφορές για την χρήση της μαστίχας βρίσκονται σε γραπτά του *Ηρόδοτου* τον 5^ο αιώνα π.Χ., όπου αναφέρει ότι οι λωρίδες λινού που χρησιμοποιούνταν για να καλύπτουν τους νεκρούς ήταν εμποτισμένες “σε ένα κόμμα που χρησιμοποιούσαν οι Αιγύπτιοι αντί της κόλλας”(11). Επιστημονικά στοιχεία από αιγυπτιακές μούμιες του 7^{ου} αιώνα π.Χ. ενισχύουν αυτή την αναφορά, αφού αποδεικνύουν ότι η ρητίνη του είδους *Pistacia Lentiscus L.* ήταν από τα βασικά συστατικά της ταρίχευσης, γεγονός που δείχνει την ευρεία κατανομή της ρητίνης στους πολιτισμούς όλης της λεκάνης της μεσογείου, καθώς και στοιχεία από δείγματα που έχουν συλλεχθεί από μέρη ταφής εκείνης της εποχής (12,13). Η μαστίχα συνεχίζει να αφήνει τα ίχνη της στην ιστορία καθώς τον 1^ο αιώνα μ.Χ. περιγράφεται η χρήση της από τον φιλόσοφο και συγγραφέα *Πλήνιο* σαν στοιχείο αρωματισμού του κρασιού στους αμφορείς με τους οποίους μεταφερόταν (14,15).

Η πιο σημαντική πρώιμη εργασία όσον αφορά την αναφορά για τη χρήση της μαστίχας ως φυτοθεραπευτικό προϊόν είναι του *Διοσκουρίδη* τον 1^ο αιώνα μ.Χ. το “*De Materia Medica*”. Ο συγγραφέας αναφέρει ξεκάθαρα τα διάφορα προϊόντα που προκύπτουν από τη μαστίχα καθώς και τις θεραπευτικές τους ιδιότητες όπως κατά γαστροεντερικών διαταραχών, ως δερματοπροστατευτικό προϊόν και σαν αρωματικό και καθαριστικό για τη στοματική κοιλότητα (16). Επίσης αναφορές στο έργο του υπάρχουν και από τον γιατρό *Γαληνό* της Περγάμου, ο οποίος αναφέρει τα ωφέλιμα χαρακτηριστικά ενάντια σε στομαχόπονους, δυσεντερίες, αλλά και ως αντίδοτο σε τσιμπήματα φιδιών (17).

Επίσης αναφορές υπάρχουν και από την βυζαντινή περίοδο στο γραπτό κείμενο “*Δυνάμερον*” του γιατρού *Νικόλαου Μυρσιού* (18,19). Επιπλέον αρχαιολογικές μελέτες αποκαλύπτουν τη χρήση της ρητίνης της μαστίχας για τη θεραπεία της δυσπεψίας, τον καθαρισμό της στοματικής κοιλότητας, αλλά και για πυρετό και διάρροια από την εβραϊκή κοινότητα του Καΐρου (20,21). Το 1346 και υπό την κατοχή των Γενοβέζων μία εμπορική εταιρεία, η Μαόνα, αναπτύσσει για πρώτη φορά εμπορική δραστηριότητα με την

μαστίχα. Σε μία ανάγκη οι Γενοβέζοι να προστατέψουν τα οικονομικά συμφέροντά τους, επιβάλλουν αυστηρά μέτρα στους παραγωγούς και τους κατοίκους του νησιού. Λόγω όμως αυτής τη δραστηριότητας, οι απαιτήσεις σε μαστίχα στη Ευρώπη και την Ασία φθάνουν στο απόγειό τους κι έτσι δημιουργούνται πολλές αναφορές για την χρήση της μαστίχας σε παραδοσιακές θεραπευτικές συνταγές σε όποιο πολιτισμό έχει συνδέσεις με την λεκάνη της Μεσογείου. (Ierapetritis, 2010). Έτσι επηρεαζόμενοι κυρίως από το *“De Materia Medica”*, διάφορα φαρμακευτικά κείμενα γεννιούνται αυτήν την περίοδο, όπως τα *“Ιατροσόφια”* της Κύπρου (22,23) και το Σέρβικης καταγωγής *“Chilandar Medicinal Codex”* (24). Ακόμα και σε γραπτά του Κολόμβου στην βασίλισσα Ισαβέλλα δείχνουν την παρουσία της μαστίχας στον Νέο Κόσμο (25).

Από το 1566 και έπειτα δηλαδή κατά τη διάρκεια της Οθωμανικής κατοχής του νησιού υπάρχουν αναφορές για την χρήση της μαστίχας σε πολλές φαρμακευτικές συνταγές. Μία από αυτές είναι το *“βάλσαμο της Ιερουσαλήμ”* που παράχθηκε και δημοσιεύτηκε επίσημα από τον *Menzani* το 1719 και συμπεριλήφθηκε σε πολλές φαρμακοποιίες μέχρι τον 20ο αιώνα (26). Το 1939 ιδρύεται η Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (Ε.Μ.Χ.) και ξεκινάει μία καινούρια περίοδος για το εμπόριο της μαστίχας, όπου ο αγροτικός αυτός συνεταιρισμός διατηρεί τα αποκλειστικά δικαιώματα για την διαχείριση της μαστίχας στην Ελλάδα και στο εξωτερικό και σήμερα, με την βοήθεια της θυγατρικής *Mediterra S.A.* διαχειρίζεται την ανάπτυξη, παραγωγή, προώθηση και διαφήμιση των προϊόντων της μαστίχας (27).

Σήμερα η ακατέργαστη μαστίχα της Χίου πωλείται σε τοπικές μικρές αγορές σαν αρωματική ύλη (28), φυτοθεραπευτικό προϊόν με ενδείξεις κυρίως για γαστρεντερικές διαταραχές (29,30) ενώ παράλληλα, αναφορές της Ε.Μ.Χ δηλώνουν πως περισσότεροι από 100 τόνοι ακατέργαστης ρητίνης εξάγονται παγκοσμίως (9).

Χρονιά ορόσημο αποτελεί το 2015 για την ιστορία της μαστίχας, αφού ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) εκδίδει μονογραφία περιγράφοντας την χρήση της ρητίνης της μαστίχας ως παραδοσιακό φυτοθεραπευτικό, με πρώτη ένδειξη για την θεραπεία ήπιων διαταραχών του πεπτικού και με δεύτερη ένδειξη θεραπεία δερματικών φλεγμονών και μικρών πληγών (31).

1.3 Χημική σύσταση ρητίνης

Η ρητίνη της μαστίχας περιέχει τρεις κύριες κατηγορίες χημικών ενώσεων: το πολυμερές, τις πτητικές ενώσεις (αιθέριο έλαιο) και το τριτερπενικό κλάσμα (32). Οι πτητικές ενώσεις απαρτίζουν το αιθέριο έλαιο της μαστίχας το ποίο παραλαμβάνεται με την διαδικασία της υδραπόσταξης. Το πολυμερές και το τριτερπενικό κλάσμα μαζί απαρτίζουν το κολοφώνιο, το οποίο είναι το υποπροϊόν που μένει μετά την απόσταξη και την παραλαβή του αιθερίου ελαίου. Επίσης έχει αναφερθεί και η παρουσία κάποιων φαινολικών ενώσεων έπειτα από την ανάλυση και απομόνωσή τους (33).

1.3.1. Κατεργασία της Μαστίχας Χίου - εκχυλιστικές μέθοδοι, μέθοδοι απόσταξης, απομόνωση

Η ρητίνη της μαστίχας είναι αδιάλυτη στο νερό και τους πολικούς διαλύτες, οπότε οι πιο κατάλληλοι διαλύτες για την κατεργασία της είναι οι άπολοι διαλύτες. Οι πρώτες προσπάθειες για εκχύλιση της μαστίχας έχουν καταγραφεί από τους *Barton & Seoane et al.* το 1956, οι οποίοι διαχώρισαν το τριτερπενικό κλάσμα με τη χρήση του διαιθυλεθέρα και της μεθανόλης σε δύο μέρη: το όξινο και το ουδέτερο (34). Πρόσφατα έγινε ένα πείραμα για την απομάκρυνση του αδιάλυτου πολυμερούς από τον *Paraschos et al.* το 2007.

Η διαδικασία που οδήγησε στον προσδιορισμό της δομής του πολυμερούς από τον *Van Den Berg et al.* το 1998 περιελάμβανε την εκχύλιση του πολυμερούς με διχλωρομεθάνιο (DCM), την κατακρήμνιση με μεθανόλη και την παρακολούθησή του με

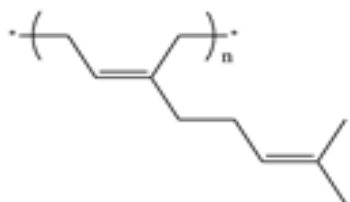
Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (Size Exclusion Chromatography)(SEC) (35). Το αιθέριο έλαιο της μαστίχας συλλέγεται με τη διαδικασία της υδραπόσταξης με απόδοση περίπου 1% με 3% του βάρους της ρητίνης, και για την ανάλυση και απομόνωση των πτητικών συστατικών της η μέθοδος GC-MS έχει εφαρμοστεί από πολλές ομάδες ερευνητών (36–39). Σε ένα άλλο πείραμα έχει αποδειχτεί η αυξανόμενη επιρροή της παρουσίας του H_3PO_4 κατά τη διάρκεια της υδραπόσταξης στην απόδοση της παραγωγής του αιθερίου ελαίου (40). Επίσης στο πείραμα που έγινε από τον *Χγνος et al.* το 2018 η μέθοδος των υπερκρίσιμων υγρών (SFE) εφαρμόστηκε για την παραλαβή των πτητικών ουσιών με διαλύτη εκχύλισης το διοξείδιο του ανθρακά, χωρίς την χρήση συνδιαλύτη (32). Οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες απομονώθηκαν από την *Kaliora et al.* το 2004 παραλήφθηκαν με εκχύλιση σε μείγμα μεθανόλης/νερού σε αναλογία 60:40 v/v. Το εκχύλισμα κλασματώθηκε μέσω της RP HPLC και οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο GC-MS (33). Επιπλέον για την απομόνωση του ολεανονικού οξέος, ώστε να εξεταστούν οι φαρμακολογικές ιδιότητες των βιοδραστικών ενώσεων ως PPARγ ανταγωνιστές, εφαρμόστηκε η ημιπαρασκευαστική μέθοδος της HPLC (41).

1.3.2. Συστατικά ρητίνης

1.3.2.1 Πολυμερές

Το κλάσμα του πολυμερούς είναι ένα 1,4-πολυ-β-μυρκένιο που έχει cis διαμόρφωση κατά 75 % περίπου στο σύνολο του πολυμερούς (35). Αποτελεί περίπου το 25 % του συνόλου της ρητίνης και μαζί με το τριτερπενικό κλάσμα δημιουργούν ένα σκληρό κολλώδες υπόλειμμα μετά την διαδικασία της υδραπόσταξης για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου που λέγεται κολοφώνιο. Μετά από

ανάλυση με GC-MS και συγκρίσεις TLC μεταξύ του Ολικού Εκχυλίσματος της Μαστίχας(OEM) και του Ολικού Εκχυλίσματος του Κολοφωνίου(OEK), συμπεραίνεται ότι εκτός των πτητικών ουσιών το κολοφώνιο και η μαστίχα της Χίου σαν σύνολο περιέχουν τις ίδιες ουσίες (8,35,42).



cis-1,4-poly-β-myrcene

1.3.2.2. Πτητικά Συστατικά

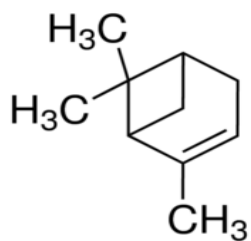
Με τη διαδικασία της υδραπόσταξης παραλαμβάνεται το αιθέριο έλαιο της μαστίχας καθώς και η συμπυκνωμένη υδατική φάση της υδροσόλης που είναι το μαστιχόνερο και περιέχει κι αυτό μερικές απ'τις πτητικές ενώσεις αυξημένης πολικότητας και διαλυτότητας στο νερό. Οι πτητικές ενώσεις αποτελούν περίπου το 3% του βάρους της ρητίνης, όταν συλλέγεται με τον παραδοσιακό τρόπο, ενώ είναι περίπου 13% του βάρους της όταν συλλέγεται σε υγρή κατάσταση (39) και διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, τα οξυγονωμένα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια. Η σύσταση τους έχει μελετηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες με τη μέθοδο GC-MS (36,37,39,43). Έχουν ταυτοποιηθεί περί τις 69 με 72 ενώσεις, και εκτός από μικρές διαφορές με διαφορετικά δείγματα και διαφορετικές παραλαβές τους, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το α-πινένιο (66-77%), το μυρκένιο (8-10%) και το β-πινένιο (3-4%) είναι τα κύρια συστατικά που αποτελούν σε πολλές περιπτώσεις το 90% της ποσότητας του

ελαίου (36–39). Πιο συγκεκριμένα, οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν το 50%, τα οξυγονωμένα μονοτερπένια αποτελούν το 20% και τα σεσκιτερπένια το 25% του ελαίου (32).

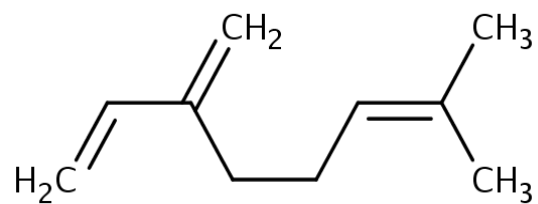
Πίνακας 1: Παρουσίαση ποσοστών πτητικών συστατικών στο αιθέριο έλαιο

Κύρια Συστατικά	Ποσοστό %	Άλλα συστατικά	Ποσοστό %
α-pinene	66	Thuja-2,4-(10)-diene	0.41
myrcene	8	Sabinene	0.28
β-pinene	3	Methyl-o-cresol	1.17
Άλλα συστατικά	Ποσοστό %	Άλλα συστατικά	Ποσοστό %
tricyclene	0.14	p-Mentha-1,5dien-8-ol	0.96
camphene	0.83	Terpin-4-ol	0.07
α-Terpineol	0.28	Myrtenol	0.61
Verbenone	0.88	trans-Carveol	0.17
Z-Anethole	0.06	E-Anethole	0.47
p-Cymene	0.33	Limonene	1.26
cis-Linalool oxide	0.08	α-Terpinolene	0.14

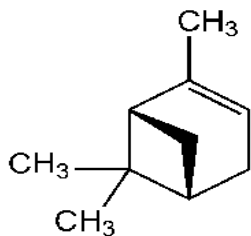
Linalool	2.84	α -Campholene aldehyde	0.72
trans-Pinocamphone	0.07	2-Undecanone	0.13
Methyleugenol	0.07	Trans- Caryophyllene	2.04
α -Humulene	0.21	Z-Methylisoeugenol	0.07
E-Methylisoeugenol	0.50		



α -pinene



myrcene



β-pinene

1.3.2.3. Τριτερπενικό κλάσμα

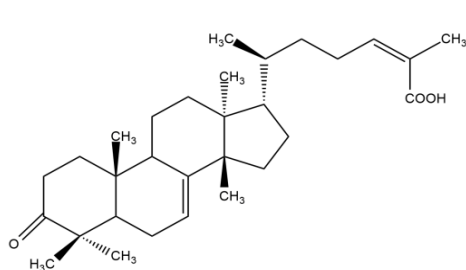
Το τριτερπενικό κλάσμα της μαστίχας αποτελείται κυρίως από τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τριτερπένια, τα οποία είναι παράγωγα των : 12-ολεανένιο, 18-ολεανένιο, 28-νορ-17-ολεανένιο, 7-τιρουκαλένιο, 24,25-δευδρο-7-τιρουκαλένιο, 8-τιρουκαλένιο, 24,25-δευδρο-8-τιρουκαλένιο, δαμμαρένιο, λουπίνιο, λουπένιο και 12-λουπένιο (44). Οι κύριες ενώσεις του όξινου κλάσματος είναι το μαστιχαδιενονικό οξύ (MNA) (12%), το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (IMNA) (12%), το ολεανονικό οξύ (OA) (6%) και το μορονικό οξύ (MA) (4%) (44,45).

Το όξινο κλάσμα των τριτερπενίων χρωματογραφήθηκε από τους *Barton & Seoane* σε στήλη πυριτίου και εκλούστηκε με βενζόλιο και 1:3 αιθέρα-βενζόλιο. Με αυτή τη μέθοδο, απομόνωσαν πρώτη φορά το μαστιχαδιενονικό οξύ (MNA), το ολεανονικό οξύ (OA) και το ισομαστιχαδιενονικό οξύ (IMNA) (46). Επίσης κατάφεραν να απομονώσουν την τιρουκαλλόλη από το ουδέτερο κλάσμα της μαστίχας (46). Επίσης έχει πραγματοποιηθεί η απομόνωση της τιρουκαλλόλης και της βουτυροστερόλης από την *Loizou et al.* (47).

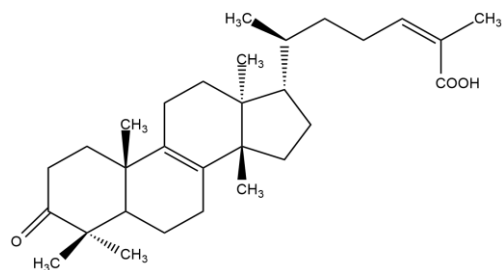
Πίνακας 2: Παρουσίαση ποσοστών των κυριότερων συστατικών των τριτερπενίων της ρητίνης της μαστίχας

Όξινο κλάσμα τερπενίων	Ποσοστό %
Masticadienonic acid	12
Isomasticadienonic acid	12
Oleanonic acid	6
Oleanolic acid	-

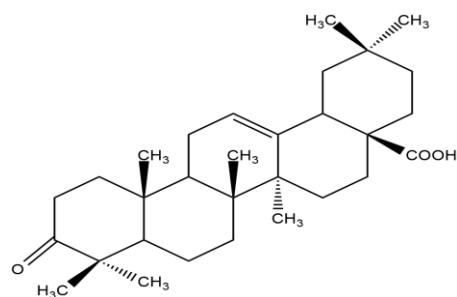
Moronic acid	4
Masticadienolic acid	1
Isomasticadienolic acid	1
3-O-Acetyl-3-epi(iso)masticadienolic acid	-
3,4-Seco-28-norolean-12-en-3-oic acid	-
18-α-H-Oleanonic acid	-
3-Epi-(iso)masticadienolic acid	-



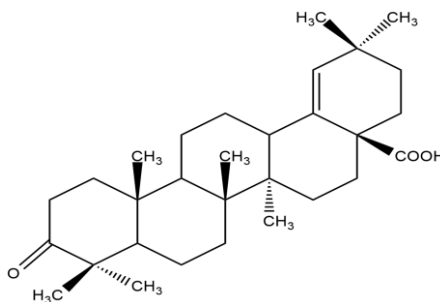
masticadienolic acid



isomasticadienonic acid



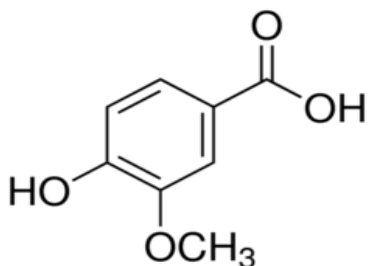
oleanonic acid



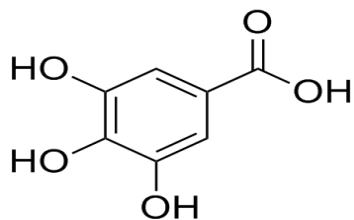
moronic acid

1.3.2.4. Φαινολικές Ενώσεις

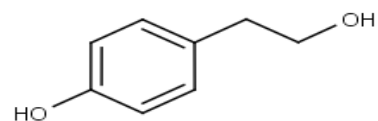
Η παρουσία απλών φαινολικών ενώσεων αναφέρθηκε από την *Kaliora et al.* το 2004, . Η ρητίνη εκχυλίστηκε με ένα μίγμα μεθανόλης/νερού, το εκχύλισμα κλασματώθηκε με την μέθοδο της RP HPLC και τα κλάσματα αναλύθηκαν με την μέθοδο του GC-MS. Ορισμένες από τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, είναι η τυροσόλη και κάποια οξέα όπως το βανιλλικό, το γαλλικό, το *trans*-κινναμικό, το ο-κουμαρικό και τα πρωτοκατεχικά οξέα (33).



vanillic acid



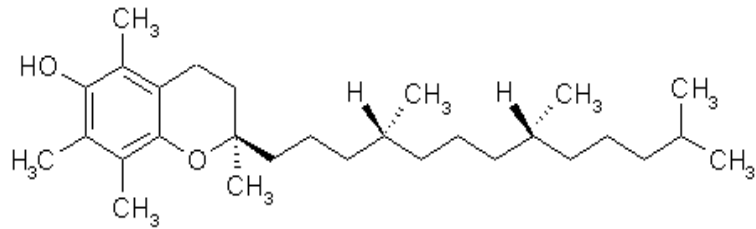
gallic acid



tyrosol

1.3.2.5. Άλλες Ενώσεις

Η α-τοκοφερόλη είναι μία άλλη ένωση που έχει ανιχνευθεί στην ρητίνη της μαστίχας από τους *Κίνζακ και Akay et al.* το 2005 με τις μεθόδους των HPLC, GC-MS, TLC-πυκνομέτρησης and χρωματομετρίας (48).



α-tocopherol

1.4. Αναλυτικές μέθοδοι για την επεξεργασία της μαστίχας Χίου

Οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τον ποιοτικό έλεγχο της μαστίχας επικεντρώνονται στην εκχύλιση της ρητίνης με άπολους διαλύτες, κλασμάτωση των συστατικών της και ανάλυσή τους με GC-MS. Σημαντική δυσκολία αποτελεί η έλλειψη σε εμπορικά πρότυπα των κύριων συστατικών της ρητίνης, κυρίως όπως το μαστιχαδιενονικό οξύ και το ισομαστιχαδιενονικό οξύ. Η νοθεία επίσης της μαστίχας είναι ένα συχνό φαινόμενο. Συνήθως γίνεται πρόσμιξη με χαμηλότερης ποιότητας προϊόντα όπως είναι η Ιρανική μαστίχα, η οποία κυκλοφορεί με ετικέτα της E.M.X. Τέτοια φαινόμενα δυστυχώς παρατηρούνται σε πολλές χώρες της μέσης ανατολής όπως είναι η Συρία, Αίγυπτος, Πακιστάν, Σαουδική Αραβία αλλά και στην Τουρκία ή στην Κύπρο όπου η μαστίχα Χίου πωλείται παράνομα, και χωρίς ετικέτα ή συσκευασία.

Στην προσπάθεια να καταρτιστεί ένα κανονιστικό πλαίσιο για την ρητίνη η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ορίζει ως ελάχιστο ποσοστό στην ρητίνη της μαστίχας τα 10 ml/kg αιθερίου ελαίου και την Επίσης η ρητίνη της μαστίχας περιγράφεται ως υποκίτρινο ή πρασινοκίτρινο, μη ομοιόμορφο, σφαιρικό, διαυγές ή αδιαφανές, σκληρό και υαλώδες θραύσμα.

Η μέθοδος GC-MS φαίνεται να αποτελεί την μέθοδο της επιλογής πολλών ερευνητών ρητινωδών υλικών. Σε παλαιότερη έρευνα έχει παρουσιαστεί η λεπτομερής ανάλυση με GC-MS των τετρακυκλικών και πεντακυκλικών τριτερπενίων που περιέχονται στη ρητίνη της μαστίχας και η σύγκριση μεταξύ ρητινών, που έχουν συλλεγεί με τον παραδοσιακό τρόπο και σε υγρή μορφή (44,49).

Οι πιο διαδεδομένες και έγκυρες μέθοδοι ανάλυσης και ποσοτικοποίησης των πτητικών ενώσεων του αιθερίου ελαίου είναι το GC-MS και το GC-FID (36–39).

Επιπλέον άλλη μία σημαντική μελέτη έχει πραγματοποιηθεί υπολογίζοντας την αναλογία των κύριων συστατικών, α-πινένιο και μυρκένιο συγκρίνοντας το αυθεντικό αιθέριο έλαιο με τα εμπορικά ανάλογα καθώς και την αναλογία των εναντιομερών (-)/(+) –α-πινένιο και (-)-α-πινένιο/μυρκένιο. Στόχος της μελέτης αυτής είναι να εφαρμοστεί μία μέθοδος για την ανίχνευση της νοθείας χρησιμοποιώντας τη μέθοδο GC-MS με χειρόμορφη στήλη (50). Έτσι προτάθηκαν οι αναλογίες των ($\leq 1:100$) και (1.9:100-11:100) για τις αναλογίες συγκεντρώσεων των (-)/(+) –α-πινένιο και (-)-α-πινένιο/μυρκένιο αντίστοιχα, οι οποίες μπορούν να λειτουργούν ως δείκτες για την αυθεντικότητα ενός αιθερίου ελαίου μαστίχας (50). Μία ποσοτική μέθοδος, που αναπτύχθηκε επίσης για την οριοθέτηση των επιπέδων αυθεντικότητας, είναι ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των α-πινένιο και β-μυρκένιο και η σύγκρισή τους με ανάλυση GC-MS ενός αυθεντικού αιθερίου ελαίου (43).

Στην αναζήτηση της ανάπτυξης μίας ποσοτικής μεθόδου για την ανάλυση της ρητίνης της μαστίχας με χρήση εμπορικών πρότυπων ενώσεων ο *Jin et al.* το 2017 ανέπτυξε μία αποτελεσματική μέθοδο για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας ολεανονικού οξέος στην μαστίχα. Είναι η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον Ποιοτικό Έλεγχο της Μαστίχας της Χίου και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η HPLC με ανιχνευτή UV-Vis για τον ποσοτικό έλεγχο του OA και η GC-MS για την ποιοτική ανάλυση του τριτερπενικού κλάσματος. Ο συνδυασμός των HPLC και UV-Vis επικυρώθηκε με τη χρήση του OA ως προτύπου ένωσης και οι εξεταζόμενες παράμετροι ήταν η εκλεκτικότητα, η επαναληψιμότητα η γραμμικότητα, η ευαισθησία και η ακρίβεια. (51).

Μία ακόμα αναλυτική μέθοδος που προτάθηκε από τον *Xynos et al.* το 2018, για την ανάλυση και ταυτοποίηση των τριτερπενικών οξέων της μαστίχας είναι η τεχνική HPLC-HRMS/MS καθώς και η GC-MS για την ανάλυση των ουδέτερων τριτερπενίων και των πτητικών ενώσεων του αιθερίου ελαίου που έχουν παραληφθεί με εκχύλιση υπερκρίσιμων ρευστών (32).

1.5. Βιολογικές Δράσεις

1.5.1. Αντιοξειδωτική

Μελέτες σε διάφορες ρητίνες με βιολογικές ιδιότητες έχουν αποδείξει ότι η ρητίνη της μαστίχας και το αιθέριο έλαιό της παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση κι έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν φυσικά συντηρητικά στην βιομηχανία τροφίμων και στα καλλυντικά. Σε συνδυασμό και με άλλα πρόσθετα μπορεί να διεκδικήσει σπουδαίο ρόλο στην διατήρηση της ποιότητας στα τρόφιμα (52). Από την μελέτη (53) ενθαρρύνθηκε η χρήση της μαστίχας Χίου και του αιθερίου ελαίου της σε προϊόντα αρτοποιίας ως συντηρητικά, γιατί αποδείχτηκε η δράση τους έναντι στην ανάπτυξη πρωτεολυτικών στελεχών του *Clostridium botulinum*. Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε *in vitro* αποδείχτηκε ή αποτελεσματικότητα της μαστίχας Χίου απέναντι στην οξείδωση της LDL που επάγεται παρουσία χαλκού (54) Επίσης εκχύλισμα της μαστίχας σε πείραμα που έγινε σε κύτταρα της αορτής αρουραίων, μειώνει την δράση του καρκινικού παράγοντα νέκρωσης α (TNF-α) και αναστέλλει την πρωτεΐνη κινάση C (PKC), τα οποία αμφότερα φαίνεται να επηρεάζουν την ενεργοποίηση της διαδικασίας οξείδωσης (55). Σε μία άλλη μελέτη που έγινε *in vitro* το πολικό εκχύλισμα της μαστίχας παρεμπόδισε την απόπτωση σε καλλιέργεια περιφερειακών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMCs), απεκατέστησε τα επίπεδα του GSH και ρύθμισε μειωτικά την έκφραση CD36, ακόμα και στα επίπεδα mRNA. Η οξειδωμένη LDL(oxLDL) προκαλεί τον θάνατο των PBMCs και μειώνει τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης (GSH), ενώ αυξάνει την

έκφραση του CD36 παράγοντα, ενός σημαντικού στοιχείου στον σχηματισμό αθηρωματικών αφρωδών κυττάρων (56). Κάποια συστατικά της μαστίχας όπως το ολεανονικό και το ολεανολικό οξύ θεωρούνται ότι δρουν ως διαμορφωτές των υποδοχέων που ενεργοποιούνται με πολλαπλασιαστή υπεροξειδίου (PPARs). Τα τελευταία (PPARs) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που συμβάλουν σε διάφορες σημαντικές μεταβολικές διαδικασίες, όπως είναι ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, μηχανισμός ο οποίος ενδέχεται να είναι ο λόγος της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της μαστίχας της χίου (57). Η σύγκριση μεταξύ της βιολογικής δράσης στο σάλιο, μετά από μάσηση 5 διαφορετικών ειδών τσίχλας έδειξε ότι η μαστίχα Χίου είναι η πιο αποτελεσματική έναντι της οξείδωσης της LDL (54). Η ενθυλάκωση των κλασμάτων της μαστίχας σε λιποσώματα απέδειξε για ακόμα μία φορά την αντιοξειδωτική ικανότητα της ρητίνης ενώ το πιο δραστικό κλάσμα ήταν το όξινο και η ενθυλάκωση ξεκίνησε μετά την αφαίρεση του πολυμερούς (58). Αργότερα σε μία κλινική μελέτη διερευνήθηκε η βιοδιαθεσιμότητα των τερπενίων και η πιθανή αντιοξειδωτική ικανότητά τους μετά από του στόματος χορήγηση. Μετά την χορήγηση των τερπενίων οι δείκτες του οξειδωτικού στρες στο σώμα μειώνονται σημαντικά, ενώ η οξειδωμένη LDL μειώνεται επίσης πολύ μετά από μία ώρα χορήγησης μαστίχας (59).

1.5.2. Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση

Μία από τις πρώτες παραδοσιακές χρήσεις της μαστίχας της Χίου ήταν για την θεραπεία των γαστρεντερικών διαταραχών. Στο πεδίο της αντιμικροβιακής έρευνας οι πρώτες μελέτες επικεντρώνονταν σε γαστρεντερολογικά μοντέλα φλεγμονς και πιο συγκεκριμένα σε αυτά που προκαλούνταν από το ελικοβακτήριο του πυλωρού *Helicobacter pylori* (4). Μελέτες in vitro που έγιναν σε καλλιέργειες στελεχών του ελικοβακτηρίου με αιθανολικά εκχυλίσματα της μαστίχας έδειξαν ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου παρεμποδίστηκε ακόμα και σε πολύ μικρή συγκέντρωση του εκχυλίσματος (60). Επίσης μετά από την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης σημειώθηκαν μεταβολές την δομή του απομονωμένου ελικοβακτηρίου μετά την χορήγηση του αιθανολικού

εκχυλίσματος (61) και αυτές οι μορφολογικές αλλαγές ήταν πιο ορατές στην περιοχή του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου. Πιθανόν για την δράση αυτή να ευθύνονται κάποιες υδροφιλικές πρωτεΐνες που λέγονται αραβινογαλακτάνες (AGPs) που βρίσκονται στην μαστίχα. Υδατικά εκχυλίσματα που περιέχουν αραβινογαλακτάνες παρουσίασαν αναστολή -του ελικοβακτηριδίου (62). Το όξινο κλάσμα της μαστίχας και ειδικά τα -κύρια τριτερπενικά οξέα της έδειξαν μεγαλύτερη ικανότητα στην παρεμπόδιση 11 κλινικών στελεχών του ελικοβακτηρίου. Επίσης το 1984 έγιναν κλινικές δοκιμές σε κλινικό στάδιο, μετά από χορήγηση από του στόματος μαστίχας σε ασθενείς και αποδείχτηκε ότι ανακούφιζε τους πόνους που δημιουργούνταν από το δωδεκαδάχτυλο (4). Μία μελέτη *in vivo* σε ποντίκια έδειξε ότι η μαστίχα σαν θεραπεία από μόνη της δεν σκότωνε τα στελέχη SS1 του ελικοβακτηρίου (63). Μία τυχαία ελεγχόμενη κλινική δοκιμή στην επίδραση της μαστίχας στο ελικοβακτηρίδιο (45) έδειξε θετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, η μονοθεραπεία σε υψηλές δόσεις με μαστίχα δεν εξαφάνισε το ελικοβακτήριο σε αποδεκτό βαθμό, παρ'όλα αυτά η μαστίχα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εναλλακτική θεραπεία σε ασθενείς που αρνούνται να υποβληθούν στο καθεστώς τριπλής θεραπείας με αντιβιοτικά. Και ακόμα μία μελέτη έδειξε ότι η μαστίχα δεν μείωσε το παθογόνο σε ασθενείς και παρέμειναν θετικοί στο ελικοβακτήριο (64). Εκτός της δράσης τους έναντι στο *H. pylori* η ρητίνη της μαστίχας και το αιθέριο έλαιό της μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξάλειψη και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα το έλαιο είναι αποτελεσματικό έναντι σε μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται από τρόφιμα όπως τα *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas fragi* και *Salmonella enteritidis*. Επιπροσθέτως το υδατικό εκχύλισμα της μαστίχας έχει δείξει αντιμυκητιασική δράση έναντι στα *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* και *Trichophyton violaceum* (29). Έπειτα από κλασμάτωση της ρητίνης πειράματα έδειξαν ότι και το ουδέτερο αλλά και το όξινο κλάσμα της μαστίχας είναι αποτελεσματικά στο φυτοπαθογόνο Μύκητα *Rhizoctonia solani* (Duru et al., 2003). Σε παρόμοια μελέτη αποδείχτηκε η αποτελεσματικότητα του αιθερίου ελαίου έναντι έξι βακτηρίων *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) τεσσάρων Gram-αρνητικών βακτηρίων: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 227853) και τριών μυκήτων (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Torulopsis glabrata*). Σε σύγκριση με το αιθέριο έλαιο κλαδιών και

φύλλων, το αιθέριο από τη ρητίνη ήταν πιο αποτελεσματικό (37). Σε μία άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση αιθερίων ελαίων και κάθε κλάσμα δοκιμάστηκε έναντι διαφορετικών βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*) με τη μέθοδο της διάχυσης σε δίσκο. και η αντιμικροβιακή δράση αποδόθηκε στη συνέργεια πολυάριθμων συστατικών(36). Το μαστιχόνερο, παρεμποδίζει την ανάπτυξη ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών και την *Candida spp* (3).

Η μαστίχα της Χίου επίσης μπορεί να συνισφέρει, όπως κάποιες μελέτες έχουν δείξει, στην στοματική υγιεινή αποτρέποντας ή μειώνοντας την ανάπτυξη παθογόνων στελεχών που προκαλούν τερηδόνα ή οδοντική σήψη (65). Μία μελέτη *in vitro* απέδειξε την αποτελεσματικότητα της μαστίχας έναντι του *Streptococcus mutans*, ενός παθογόνου του στόματος (66). Μία πιο πρόσφατη μελέτη απέδειξε τις αντιμικροβιακές ιδιότητες της μαστίχας έναντι σε πολλά στοματικά και περιοδοντικά παθογόνα όπως: *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans [Sm]*, *Streptococcus oralis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* και *Prevotella nigrescens* με τη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ και προτείνεται η χρήση της μαστίχας ως αντιβακτηριακού παράγοντα στην πρόληψη της περιοδοντικής ασθένειας (67). Επιπλέον η μαστίχα της Χίου σε μορφή τσίχλας μειώνει την ποσότητα της οδοντικής πλάκας. Οι μετρήσεις επιβεβαιώθηκαν με κλινική μελέτη μέσω της μάσησης 3 γραμμαρίων μαστίχας 3 φορές την ημέρα για πέντε μέρες και κατέληξε στη μείωση 30 % της ποσότητας της οδοντικής πλάκας στην πλευρά της στοματικής κοιλότητας που έγινε η μάσηση σε σύγκριση με την άλλη πλευρά (68).

1.5.3. Αντιφλεγμονώδης δράση

Οι προσταγλαδίνες, και η ισταμίνη είναι μερικοί από τους παράγοντες που ευθύνονται για τις φλεγμονές και άτομα με χρόνιες ασθένειες, όπως άσθμα, κυστική ίνωση και ψωρίαση εμφανίζουν υψηλά ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακών προβλημάτων (69).

Και οι δύο μορφές της μαστίχας, ρητίνη και αιθέριο έλαιο, φαίνεται να παρουσιάζουν ανασταλτική δράση σε δύο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη του νιτρικού οξειδίου (NO) και της προσταγλαδίνης (PGE₂), τα οποία είναι η NO συνθάση και η κυκλοξυγενάση (COX)-2 (70). Το NO και η PGE₂ είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση φλεγμονών στον οργανισμό. Μία μελέτη που έγινε σε ποντίκια απέδειξε ότι η ρητίνη αναστέλλει το οίδημα του ποδιού που προκαλείται από την καρραγενάνη με ένα τρόπο εξαρτώμενο από την δόση (71). Επιπλέον σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ενεργή νόσο του Crohn, η ένδειξη της ενεργότητας και τα επίπεδα του πλάσματος σε ιντερλευκίνη-6(IL-6) και C-δραστική πρωτεΐνη (CRP) μειώθηκαν σε ένα μεγάλο βαθμό σε μία πιλοτική μελέτη μετά από μία θεραπεία με κάψουλες μαστίχας για 4 εβδομάδες (6 κάψουλες την ημέρα σε 0.37g/κάψουλα) (72). Τελικώς σε μία κλινική δοκιμή σε ασθενείς που υπέφεραν από την φλεγμονώδη νόσο του εντέρου η μαστίχα παρεμπόδισε την αύξηση στο αίμα σε ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία θεωρούνται προγνωστικός δείκτης της νόσου (59).

1.5.4. Αντικαρκινική δράση

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει την πιθανή αντικαρκινική δράση συστατικών της μαστίχας και συγκεκριμένα έχουν υπάρξει ενδείξεις για την δράση έναντι στον καρκίνο του προστάτη. Το εκχύλισμα της μαστίχας σε DMSO προκάλεσε την ανάπτυξη ενός κατασταλτικού γονιδίου του καρκίνου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης μασπίνης, που ευθύνεται κυρίως για την παρεμπόδιση της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων στον προστάτη, σύμφωνα με *in vitro* μελέτες (He et. Al.) Μία άλλη μελέτη δείχνει την δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές εντέρου, ενός εξανικού εκχυλίσματος της μαστίχας, που αποδίδεται στην ενεργοποίηση ενζύμων που λέγονται κασπάσες (73). Επίσης και το αιθέριο έλαιο παρουσιάζει κατασταλτική συμπεριφορά στον καρκίνο εντέρου σε μελέτες που έχουν γίνει *in vitro* και *in vivo* σε ποντίκια με στοματική χορήγηση μαστίχας (74). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις για την δράση του μαστιχελαίου έναντι σε κάποιες μορφές -λευχαιμίας. Το έλαιο της μαστίχας φαίνεται ότι αναστέλλει την

περαιτέρω ανάπτυξη του καρκίνου μέσω της μειωτικής ρύθμισης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (75). Στην θεραπεία ποντικών με καρκίνο Lewis του πνεύμονα ο πληθυσμός των καρκινικών κυττάρων μειώθηκε και σε *in vivo* και σε *in vitro* μελέτη. Η περαιτέρω διερεύνηση αποκάλυψε ότι το μαστιχέλαιο μείωσε την εκδήλωση των καρκινικών παραγόντων τους καρκινικούς παράγοντες και προκάλεσε την απόπτωση των κυττάρων (76). Σε μία άλλη μελέτη σε ποντίκια με καρκίνο του πνεύμονα αποδείχτηκε ότι το μαστιχέλαιο επιδεικνύει αντιμεταστατικές ιδιότητες και μπορεί να παίζει σπουδαίο ρόλο στην παρεμπόδιση του σχηματισμού νέων αγγειακών δικτύων που είναι υπεύθυνα για την μετάσταση του καρκίνου (77).

1.5.5. Καρδιοπροστατευτική δράση

Πέρα από τις παραπάνω ιδιότητές της η μαστίχα φαίνεται να μειώνει και τις πιθανότητες εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και η πιο πιθανή εξήγηση για αυτή τη λειτουργία εξηγείται από την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της μαστίχας και την πρόληψη της συσσώρευσης της οξειδωμένης LDL στα κύτταρα που μπορεί να προκαλέσει αθηροσκλήρωση (56). Μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής έδειξε ότι το ουδέτερο κλάσμα και ειδικά η ένωση τρουκαλόλη μπορεί να οδηγήσει σε μείωση δύο πολύ σημαντικών μορίων προσκόλλησης (VCAM-1 and ICAM-1), τα οποία σχετίζονται με την πρώιμη εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης καθώς οδηγούν σε συσσώρευση των μονοκυττάρων στο εσωτερικό στρώμα των αρτηριών (47). Επίσης σε μία μελέτη που έγινε *in vivo* σε αρουραίους, με τη δράση της μαστίχας μειώθηκε η χοληστερόλη του πλάσματος, η LDL-χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια, πιθανώς λόγω συνεργιστικής δράση του καμφενίου και άλλων ενώσεων της μαστίχας (78). Ενώ σε κάποια άλλη μελέτη που έγινε *in vivo* σε κουνέλια, ακολούθησαν μία δίετα με ουδέτερο κλάσμα μαστίχας και μία με κλάσμα μαστίχας χωρίς πολυμερές. Και τα δύο εκχυλίσματα φαίνεται να ελαχιστοποιούν το μέγεθος του εμφράγματος σε κανονικά ταϊζόμενα αναισθητοποιημένα κουνέλια, όπως επίσης και τα δύο παρουσίασαν αντιαθηρωματικές και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες σε

υπερχοληστερολεμικά κουνέλια (79). Τέλος η σκόνη της μαστίχας της Χίου θα μπορούσε να έχει ηπατοπροστατευτική και καρδιοπροστατευτική δράση σε ανθρώπους, λόγω της μείωσης που παρατηρήθηκε στο σέρουμ της χοληστερόλης, της LDL-χοληστερόλης, στην αναλογία της ολικής χοληστερόλης/HDL-χοληστερόλης, στη λιποπρωτεΐνη (α), απολιποπρωτεΐνη A-1, απολιποπρωτεΐνη Β, SGOT, SGPT και στα γαμμα – GT επίπεδα στην ομάδα που έκανε κατάποση 5 γραμμαρίων σκόνης μαστίχας καθημερινά (80).

1.5.6. Ηπατοπροστατευτική δράση

Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν αποδείξει την ηπατοπροστατευτική δράση της μαστίχας. Σε αρσενικούς αρουραίους Wistar λεγινε χορήγηση από του στόματος μαστίχα Χίου. Τα ένζυμα CYP1A1 and CYP1A2, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιομετατροπή πολλών χημικών στο συκώτι και την ενεργοποίηση πολλών προκαρκινογόνων, και η μεταγραφική τους διαδικασία δεν παρουσίασε καμία αύξηση σε σύγκριση με τα ανάλογα αποτελέσματα που παρατηρούνται μετά την μέση ημερήσια κατανάλωση καφεΐνης (81). Σε μία άλλη μελέτη μετά τη θεραπεία διαβητικών αρουραίων με μαστίχα Χίου παρουσιάστηκε βελτίωση στη λειτουργία του συκωτιού μειώνοντας τα επίπεδα της τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT) και την τρανσαμινάση της ασπαρτάμης (AST) κι επίσης σημειώθηκε σημαντική μείωση στην γλυκόζη του αίματος, γεγονός που μαλλον αποδίδεται στην επαγωγή της παραγωγής της ινσουλίνης από τα β-κύτταρο του παγκρέατος (82).

1.5.7. Άλλες δράσεις της μαστίχας

Άλλες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η μαστίχα επιφέρει κι άλλες ευεργετικές ιδιότητες στον οργανισμό, όπως η ανακούφιση των συμπτωμάτων ασθενών που πάσχουν από λειτουργική δυσπεψία, και καούρες (45).

Η μαστίχα έχει άριστες συγκολλητικές ιδιότητες U.S.P. (CTB), ενώ η μαστισόλη έχει ακόμα πιο δυνατή συγκολλητική ικανότητα (83). Σε μελέτη των ίδιων συγγραφέων ο συνδυασμός του mastisol και των ταινιών Steri προσφέρει καλύτερη συγκολλητική συμπεριφορά από τις συγκολλητικές μεθόδους των άλλων ομάδων (84). Τέλος σε μία μελέτη των η μάσηση τσίχλας με μαστίχα Χίου για 4 ώρες από τον ίδιο άνθρωπο μπορεί να είναι φυσική πηγή υδραργύρου και βελτιώνει τη λειτουργία του προστάτη και την σεξουαλικότητα των ανδρών(85).

1.6. Χρήσεις στην ιατρική – φαρμακευτική και προϊόντα

Μετά την παραγωγή και την κατεργασία της μαστίχας όσον αφορά τον καθαρισμό, την ταξινόμηση και την κατάταξή της ανάλογα με το μέγεθος και το χρώμα του κόκκου η E.M.X. την χρησιμοποιεί κάθε μέρος της για την παραγωγή προϊόντων, μερικά από τα οποία είναι (45) :

- Μαστίχα Χίου ή αλλιώς τα “δάκρυα” της μαστίχας που διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες την χονδρή μαστίχα, την μεσαία μαστίχα και την ψιλή μαστίχα (9)
- Το κολοφώνιο περιέχει όλα τα μη πτητικά στοιχεία της μαστίχας και είναι το σύνολο του πολυμερούς μαζί με το τριτερπενικό κλάσμα της μαστίχας. Είναι το στερεό κολλώδες υπόλειμμα που μένει στο τέλος της απόσταξης για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου και βρίσκει εφαρμογή στην χημική βιομηχανία για την παρασκευή συνθετικού καουτσούκ, πλαστικών, ελαστικών, χρωμάτων, βερνικιών και χειρουργικών νημάτων.
- Μαστιχέλαιο: το οποίο είναι το αιθέριο έλαιο της μαστίχας και παραλαμβάνεται με απόσταξη με υδρατμούς ή υδραπόσταξη της ρητίνης της μαστίχας. Η αναλογία όγκου (μαστιχελαίου/βάρος μαστίχας) κυμαίνεται από 1 έως 3 %. Είναι προϊόν με πολύ έντονο και χαρακτηριστικό άρωμα, κυρίως γιατί περιέχει τα πτητικά συστατικά της μαστίχας, από τα οποία τα πιο κύρια είναι το α-πινένιο, το β-πινένιο και το μυρκένιο. Η μέθοδος απόσταξης που χρησιμοποιείται από την Ε.Μ.Χ. είναι η απόσταξη με υδρατμούς. Η χαμηλή ικανότητα παραγωγής μεγάλης ποσότητας μαστιχελαίου, λόγω της μικρής απόδοσής του, το καθιστά ένα ακριβό προϊόν προς πώληση. Λόγω του αρώματος που προσδίδει καθώς και της αντισηπτικής και συντηρητικής του δράσης χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών και αρωμάτων.
- Το μαστιχόνερο: που είναι το αρωματικό νερό που παραλαμβάνεται μαζί με το αιθέριο έλαιο κατά την διαδικασία της υδραπόσταξης ή της απόσταξης με υδρατμούς και διαχωρίζεται από αυτό λόγω μεγαλύτερου ειδικού βάρους. Τα περισσότερα από τα συστατικά του είναι ίδια με αυτά του αιθερίου ελαίου και κάποια που είναι λιγότερο πτητικά που είναι σε μικρότερες ποσότητες στο έλαιο είτε απουσιάζουν εντελώς από αυτό. Κάποια κύρια συστατικά του όσο και το ίδιο σαν σύνολο παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι θετικών και αρνητικών Gram βακτηρίων όσο και κατά κάποιων μυκήτων. Επίσης χρησιμοποιείται στη ζαχαροπλαστική ως αρωματικό ύδωρ (8)
- Σκόνη και κάψουλες μαστίχας Χίου, οι οποίες έχουν εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων ως ειδικό τρόφιμο και αποτελούν προϊόντα θεραπείας (9)

- Τσίχλα: είναι η μοναδική παγκοσμίως με φυσική πρώτη ύλη, την ρητίνη της μαστίχας Χίου, αντί για πολυμερείς συνθετικές ουσίες όπως οι περισσότερες τσίχλες (8)
- Το μοσχολίβανο: που πρόκειται για μίγμα ρητίνης, κολοφωνίου και άλλων συστατικών και εμπλουτίζεται με διάφορα άλλα φυσικά αρώματα και λόγω της υψηλής ποιότητας του αρώματος που αναδίδει χρησιμοποιείται ως θυμίαμα.
- Άρωμα μαστιχελαίου που είναι αραιωμένο μαστιχέλαιο σε ελαιώδη βάση
- Άλλα προϊόντα που αφορούν την στοματική υγιεινή (οδοντόκρεμα, στοματικό διάλυμα), καλλυντικά προϊόντα (κρέμες προσώπου και σώματος, σαμπουάν, σαπούνια) και διατροφικά προϊόντα (λικέρ, γλυκίσματα, λουκούμια, παραδοσιακά προϊόντα)



Τσίχλα με προσθετικό μαστίχας Χίου



Κάψουλες μαστίχας ως συμπληρώματα διατροφής



Μασίχα Χίου σε σκόνη

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Τεχνικές και Μέθοδοι

2.1.1 Χρωματογραφία κατ'αντιρροή (Countercurrent Chromatography-CCC)

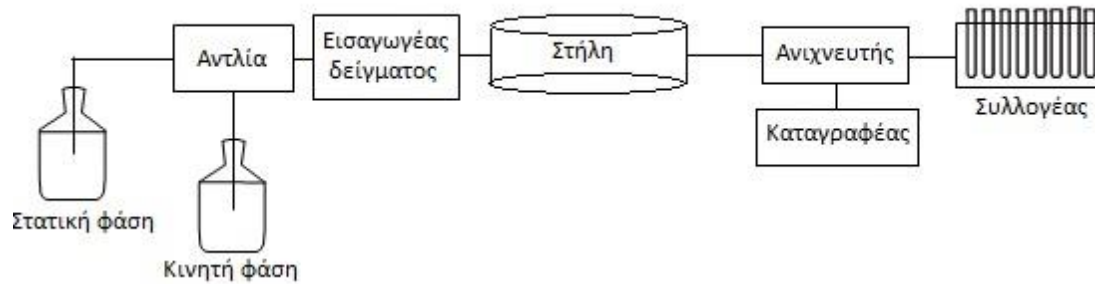
Η χρωματογραφία κατ'αντιρροή είναι μία μορφή υγρής-υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιεί μία κινητή και μία στατική φάση, οι οποίες και οι δύο βρίσκονται σε υγρή μορφή. Με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται ο διαχωρισμός ουσιών που έχουν διαφορετική κατανομή σε κάθε φάση (στατική ή κινητή). Η ονομασία είναι αυτή που χρησιμοποιείται βάσει ευκολίας μιας και δεν έχει να κάνει με την πραγματικότητα, αφού δεν θα ήταν δυνατό να υπάρξει στατική φάση εάν υπήρχε αντιρροή, ώστε να μην υπάρξει σύγχυση λόγω της πληθώρας των δημοσιεύσεων που έχουν χρησιμοποιήσει αυτή την ονομασία έως σήμερα (86).

Ο διαχωρισμός των ουσιών εξαρτάται από τους συντελεστές κατανομής τους στην κάθε φάση. Ο συντελεστής κατανομής σύμφωνα με τους *Berthelot* και *Jugfleish* εκφράζει μία πολύ σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα, την υδροφοβικότητα. Συμβολίζεται ως $K_{o/w}$ και εκφράζει το λόγο των συγκεντρώσεων της ουσίας στις δύο φάσεις του συστήματος οκτανόλης/νερού. Όσο αυξάνεται ο λόγος, τόσο αυξάνεται και η υδροφοβικότητα, ενώ αντίστοιχα όσο μειώνεται, τόσο μειώνεται η υδροφοβικότητα (87) Στην διαδικασία της χρωματογραφίας κατ'αντιρροή ο συντελεστής κατανομής χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ικανότητας των διφασικών συστημάτων να διαχωρίσουν τις ουσίες σε ένα μίγμα, ενώ είναι εφικτό να προβλεφθεί και η σειρά έκλυσης των ουσιών, καθώς και ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση κάθε ουσίας (86).

- Οργανολογία

Τα κύρια μέρη της χρωματογραφίας κατ'αντιρροής είναι τα εξής :

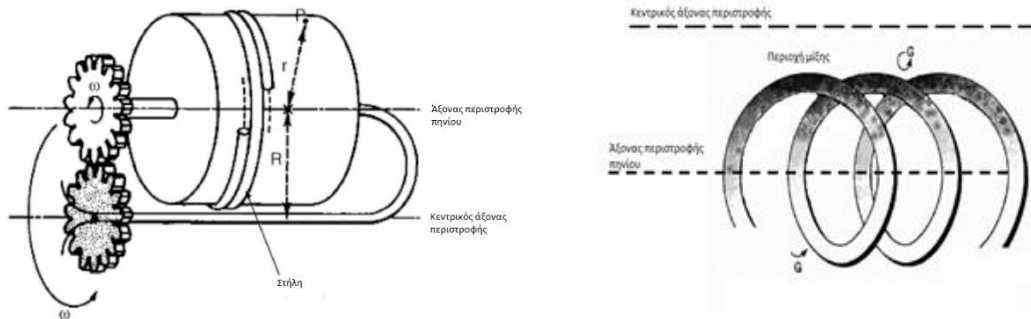
- Αντλία για την εισαγωγή των διαλυτών
- Εισαγωγέας δείγματος
- Περιστρεφόμενη στήλη χρωματογραφίας
- Ανιχνευτής
- Καταγραφέας



Εικόνα 4: Αναπαράσταση οργανολογίας συσκευής FCPC

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι α) αναλυτικές χωρητικότητας 10 έως 100 ml, β) ημιπαρασκευαστικές χωρητικότητας 200 έως 500 ml, γ) παρασκευαστικές χωρητικότητας 1 έως 5 λίτρων και δ) τελευταία έχουν εμφανιστεί στήλες χωρητικότητας άνω των 5 λίτρων που αποσκοπούν στην βιομηχανική χρήση (88). Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως UV, όμως εξαιτίας της ικανότητας τους να ανιχνεύουν μόνο ουσίες που απορροφάνε στο υπεριώδες πλέον χρησιμοποιούνται και ανιχνευτές σκέδασης φωτός (ELSD) και φασματογράφοι μάζας (MS) (89,90).

- Υδροδυναμικές και υδροστατικές στήλες



Εικόνα 5: Υδροδυναμικές στήλες



Εικόνα 6: Υδροστατικές στήλες

Υπάρχουν δύο είδη στήλης στη χρωματογραφία κατ'αντιρροή, οι υδροδυναμικές και οι υδροστατικές (91).

Στην τεχνική (HSCCC) High Speed Countercurrent Chromatograph χρησιμοποιείται υδροδυναμική στήλη, η οποία αποτελείται από έναν ελικοειδή σωλήνα που βρίσκεται γύρω από έναν κύλινδρο παίρνοντας μορφή πηνίου. Με βάση τον τρόπο περιστροφής του πηνίου, οι υδροδυναμικές στήλες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις τύπου "J" και τύπου "X". Όταν το πηνίο αυτό στρέφεται παράλληλα με τον κύριο άξονα περιστροφής η στήλη κατατάσσεται στην κατηγορία τύπου "J". Όταν το πηνίο περιστρέφεται σε μη παράλληλη κατεύθυνση σε σχέση με τον κύριο άξονα, κατατάσσεται στην κατηγορία τύπου "X" (86,92). Ουσιαστικά υδροδυναμικές στήλες ονομάστηκαν έτσι διότι η στατική φάση δεν παραμένει πλήρως ακινητοποιημένη, αλλά η θέση της μεταβάλλεται ανάλογα με το σημείο στο οποίο αναπτύσσεται η κεντρομόλος δύναμη (86).

Οι υδροστατικές στήλες χρησιμοποιούνται στην τεχνική FCPC. Αποτελούνται από μεταλλικούς δίσκους που διαθέτουν κυψελίδες (ή κελιά) διαχωρισμού και τους απαραίτητους σωλήνες σύνδεσης. Οι δίσκοι αυτοί τοποθετούνται κατάλληλα ο ένας πάνω στον άλλον, με μία διαχωριστική επιφάνεια τεφλόν αναμεσά τους, ώστε να συνδέεται η τελευταία κυψελίδα κάθε δίσκου με την πρώτη κυψελίδα του επόμενου. Οι κυψελίδες μπορούν να διαφέρουν από στήλη σε στήλη όσον αφορά το μέγεθος, τον αριθμό και το σχήμα τους, ανάλογα με την χρήση για την οποία προορίζεται η στήλη (αναλυτική, προ-παρασκευαστική, παρασκευαστική, χρωματογραφική,

εκχυλιστική κ.λ.π.). Οι στήλες αυτού του είδους ονομάζονται έτσι λόγω του ότι η στατική φάση παραμένει σταθερή μέσα τους χωρίς να μεταβάλλεται η θέση της (89,90).

Τόσο οι υδροδυναμικές, όσο και οι υδροστατικές στήλες εξελίσσονται με στόχο την καλύτερη ανάμιξη και διαχωρισμό των διφασικών συστημάτων, ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των θεωρητικών πλακών και κατ' επέκταση να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των ουσιών (86).

- *Κύριες μέθοδοι χρωματογραφίας κατ' αντιρροή*

Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί έως τώρα για την ανάλυση με χρωματογραφία κατ' αντιρροή είναι πέντε και μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Οι τρεις από αυτές ανήκουν στην κατηγορία που αναφέρεται στον τρόπο έκλουσης των διαλυτών (normal mode, dual mode, elution extraction) ενώ δύο έχουν να κάνουν με τα διφασικά συστήματα που χρησιμοποιούνται (gradient mode, pH zone refining).

i) Έκλουση Κανονικής φάσης (Normal Mode)

Σε αυτή τη μέθοδο η μία φάση χρησιμοποιείται ως κινητή και η άλλη ως στατική. Στη τεχνική CPC, όταν η κινητή φάση είναι η πάνω φάση, εισέρχεται στην στήλη από κάτω προς τα πάνω (ascending mode). Όταν η κινητή φάση είναι η κάτω φάση εισέρχεται στην στήλη από πάνω προς τα κάτω (descending mode) (93).

ii) Διαδικασία Έκλουσης Κανονικής και Αντιστρόφου Φάσης (Dual Mode)

Η μέθοδος αυτή διαφέρει με την παραπάνω μόνο στο γεγονός ότι και οι δύο φάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κινητές στο ίδιο πείραμα. Βασίζεται στην ευελιξία των μηχανημάτων να μεταβάλλεται το σημείο εισόδου της κινητής φάσης στην στήλη. Με την

περιστροφή της κατάλληλης βαλβίδας μπορεί να διοχετευθεί κινητή φάση , είτε από τη μία είσοδο της στήλης, είτε από την άλλη, χωρίς να απαιτείται άδειασμα της. Έτσι μειώνεται ο απαιτούμενος όγκος κινητής φάσης που χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί για να ολοκληρωθεί η ανάλυση ενός δείγματος, συνεπώς και ο χρόνος που απαιτείται για να εξέλθουν από την στήλη οι ουσίες που κατανέμονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην στατική φάση (93).

iii) Διαδοχική Διαδικασία Έκλουσης-Εξώθησης (Elution Extrusion)

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η περαιτέρω μείωση του χρόνου της ανάλυσης. Αρχικά εισάγεται συγκεκριμένος όγκος κινητής φάσης, που αναλογεί περίπου στο διπλάσιο της στατικής, ώστε οι ουσίες να διαχωριστούν εντός της στήλης με βάση τον συντελεστή κατανομής της κάθε μιας. Στην συνέχεια εισάγεται στατική φάση με την ανάλογη φορά, ώστε να αποβάλλει η στήλη όλο το περιεχόμενο της και μαζί με αυτό τις ουσίες του δείγματος. Οι ουσίες αυτές εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους εξαιτίας του διαχωρισμού που έχουν υποστεί εντός της στήλης. Με αυτή την μέθοδο εξοικονομείται μεγάλη ποσότητα διαλυτών και σημαντικός χρόνος, όμως συχνά ο διαχωρισμός των ουσιών δεν είναι ικανοποιητικός (94).

iv) Βαθμιδωτή Έκλουση (Gradient Mode)

Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην ανάλυση φυσικών ή άλλων εκχυλισμάτων που περιέχουν μεγάλο αριθμό ουσιών. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η χρήση πολλών συστημάτων με σκοπό τον διαχωρισμό ουσιών που διαφέρουν τόσο στην πολικότητα, όσο και στην δομή τους. Είναι σημαντικό να επιλεγθούν συστήματα ικανά να διαχωρίζουν μεγάλο αριθμό ουσιών και παράλληλα να διατηρούν την διφασικότητα τους εντός της στήλης, ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η ανάλυση. Έχει παρατηρηθεί ότι η μεταβολή των συστημάτων πολλές φορές έχει ως αποτέλεσμα την διατάραξη της ισορροπίας του διφασικού συστήματος. Για να αποφευχθεί αυτό συνήθως χρησιμοποιείται η ίδια στατική φάση, ενώ τα συστήματα της κινητής φάσης αποτελούνται από τους ίδιους διαλύτες μεταβάλλοντας τις αναλογίες τους (88).

ν) Έκλυση Μεταβαλλόμενου pH (pH Zone Refining)

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με βαθμιδωτή μεταβολή του pH κατά την εξέλιξη της αναλυτικής διαδικασίας. Είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό ουσιών που έχουν είτε όξινες είτε βασικές ιδιότητες. Τέτοιου είδους ουσίες θεωρούνται τα αλκαλοειδή, τα οξέα και πολλά άλλα μόρια. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την ανάλυση εκτός του συντελεστή κατανομής είναι η pK_a των ουσιών. Το σύστημα των δύο φάσεων αποτελείται συνήθως από μια οργανική και μία υδατική φάση, οι οποίες περιέχουν και τους ρυθμιστικούς παράγοντες του pH (88,95).

- *Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα χρωματογραφίας κατ' αντιρροή*

Η χρωματογραφία αυτή παρέχει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα, συγκριτικά με άλλες μεθόδους διαχωρισμού και απομόνωσης ουσιών, τα οποία αναφέρονται παρακάτω(91):

- Η απουσία στερεής στατικής φάσης αποκλείει την αμετάκλητη κατακράτηση ουσιών, εξασφαλίζοντας την ανάκτηση σχεδόν του 100% των ουσιών του μείγματος.
- Θεωρείται φιλική τεχνική προς το περιβάλλον, τόσο για τον προαναφερόμενο λόγο, όσο επειδή η ποσότητα των οργανικών διαλυτών που απαιτείται είναι περιορισμένη και μπορεί να ανακυκλωθεί.
- Είναι κατάλληλη ακόμη και για βιομηχανικής κλίμακας εφαρμογή.
- Μέσα σε λίγες ώρες, ορισμένες φορές και σε λεπτά, είναι δυνατόν να διαχωριστούν μεγάλες ποσότητες ουσιών.
- Λόγω του ότι χρησιμοποιούνται ήπιες συνθήκες αποφεύγεται η καταστροφή ευαίσθητων ουσιών.
- Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι επαναλήψιμα.
- Δεν υπάρχει περιορισμός, όσον αφορά την χρήση των διαλυτών.

Όπως κάθε τεχνική, παρουσιάζει και αυτή έναν αριθμό μειονεκτημάτων, που αν και μειωμένος είναι υπαρκτός. Τα αρνητικά χαρακτηριστικά της είναι τα εξής:

- Απαιτείται η χρήση ειδικής συσκευής, με αποτέλεσμα να αυξάνει το αρχικό κόστος.
- Η αναλυτική ικανότητα είναι συγκριτικά περιορισμένη
- Συνήθως η διαδικασία επιλογής του διφασικού συστήματος είναι χρονοβόρα.

- *Επιλογή και Έλεγχος Διφασικών Συστημάτων*

Το σημαντικότερο στάδιο και το πιο χρονοβόρο είναι η εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος για το κάθε δείγμα. Οι μεταβλητές που επηρεάζουν αυτή την διαδικασία είναι η πολικότητα των συστατικών του εκάστοτε δείγματος και η διαλυτότητα τους. Για να θεωρηθεί αποδεκτό ένα σύστημα θα πρέπει οι διαλύτες να πληρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- Να δημιουργείται διφασικό σύστημα
- Να απαιτείται μικρός χρόνος εξισορρόπησης (<60 sec)
- Να έχουν περίπου ίδιο όγκο οι δύο φάσεις μετά την εξισορρόπηση
- Να διαλύεται πλήρως το δείγμα, διότι η τεχνική αυτή είναι παρασκευαστική, επομένως είναι αναγκαίο να διαλύει μεγάλες ποσότητες δείγματος
- Οι συντελεστές κατανομής των ουσιών να κυμαίνονται μεταξύ 0,2 και 0,5, με ιδανικότερη περίπτωση να προσεγγίζουν το 1,0.

Για να διερευνηθεί εάν πληρούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις θα πρέπει αρχικά να μελετηθεί η βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα να ελεγχθεί εάν έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς κάποιο σύστημα, είτε για την ανάλυση του ίδιου δείγματος, είτε για τις κατηγορίες μορίων που περιέχονται σε αυτό. Σε περίπτωση που δεν εντοπιστεί κάποιο σύστημα μέσω του βιβλιογραφικού ελέγχου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν το σύστημα $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ για τα πολικά μόρια και το *n*-Hexane/EtOAc/MeOH/H₂O ή EtOAc/*n*-BuOH/MeOH/H₂O για τα λιγότερο πολικά (96) (Ito, 2005; Renault J.H. , 2002). Μεταβάλλοντας τις αναλογίες στα προαναφερόμενα συστήματα μπορεί να βρεθεί το κατάλληλο, στο οποίο θα κατανέμεται ικανοποιητικά το δείγμα και να παραμένει διφασικό. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη η κατασκευή τριγωνικών διαγραμμάτων που υποδεικνύουν τις κατάλληλες αναλογίες διαλυτών ώστε να είναι διφασικά τα συστήματα αυτά.

Στη συνέχεια τα συστήματα που επιλέχθηκαν ελέγχονται όσον αφορά την ικανότητα διάλυσης του μείγματος, την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των φάσεων. Για αυτόν τον λόγο, διαλύονται 10 mg μείγματος σε 3 ml κάθε συστήματος. Ανακινούνται έντονα και έπειτα, αφού ηρεμήσουν, παρατηρείται εάν διαλύθηκε πλήρως το δείγμα, ο χρόνος σχηματισμού των δύο φάσεων και η αναλογία όγκου της κάθε φάσης. Εάν πληρούνται και σε αυτό το στάδιο οι απαραίτητες προϋποθέσεις τότε γίνεται έλεγχος του συντελεστή κατανομής των ουσιών στις δύο φάσεις. Ο ταχύτερος τρόπος για να ελέγξουμε ποιοτικά την κατανομή των ουσιών είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Με αυτόν τον έλεγχο ρουτίνας μπορούν να εντοπιστούν τα συστήματα στα οποία οι ουσίες είναι κατανεμημένες μόνο στη μία φάση και έτσι να αποκλειστούν.

Στη συνέχεια χρησιμοποιείται συνήθως η τεχνική HPLC με ανιχνευτή UV-Vis για να βρεθεί με ακρίβεια ο συντελεστής κατανομής (K) κάθε ουσίας $K = C_\alpha/C_\beta = E_\alpha/E_\beta$. Ουσιαστικά υπολογίζεται το εμβαδόν των κορυφών (E) που αντιπροσωπεύει κάθε ουσία στις δύο φάσεις (α, β), σε όμοια ποσότητα δείγματος και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης (C). Βέβαια για να συμβεί αυτό θα πρέπει οι ουσίες να απορροφούν στο υπεριώδες. Διαφορετικά, για τις ουσίες που δεν απορροφούν σε αυτά τα μήκη κύματος, μπορούν να

χρησιμοποιηθούν τεχνικές όπως η Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζα (LC-MS) ή HPLC-ELSD. Για πτητικές ενώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί Αέρια Χρωματογραφία Μάζας (GC-MS).

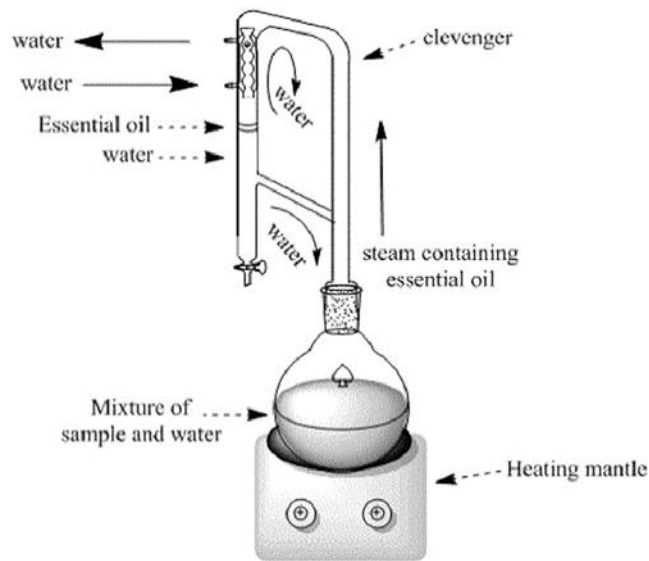
- *Φυγοκεντρική χρωματογραφία κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography)*

Η συσκευή Fast Centrifugal Partition Chromatography (FCPC) έχει στήλη με κυλινδρικό σχήμα και διαθέτει έναν κεντρικό άξονα στον οποίο εφαρμόζεται περιστροφική κίνηση. Η στήλη εσωτερικά περιέχει κυψελίδες οβάλ σχήματος, οι οποίες κατανέμονται μέσα σε αυτή σε επίπεδα και επικοινωνούν μεταξύ τους διαδοχικά με διαδρομές σαν σωληνάκια. Στην στήλη ασκείται φυγόκεντρος δύναμη καθώς περιστρέφεται γύρω από τον άξονά της και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της στατικής φάσης, επιτρέποντας στην κινητή φάση να διέρχεται μέσα από αυτή χωρίς να την παρασύρει (86). Υποκατηγορία αυτής της τεχνικής θεωρείται και Fast Centrifugal Partition Extraction (FCPE), η οποία δεν έχει ως σκοπό την χρωματογραφία αλλά την εκχύλιση των διαλυμάτων. Η διαφορά τους έγκειται στον αριθμό και το σχήμα των κυψελίδων που έχουν οι εκχυλιστικές στήλες (97).

2.1.2. Υδραπόσταξη

Η υδραπόσταξη είναι η ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε εργαστηριακή κλίμακα. Χαρακτηριστικό γνώρισμά της είναι ότι το φυτικό υλικό βρίσκεται σε νερό υπό βρασμό, οι ατμοί του οποίου τελικά παρασέρνουν τις πτητικές ενώσεις του φυτού. Η συσκευή αποτελείται από το κύριο μέρος που περιέχει ένα γυάλινο

κατακόρυφο σωλήνα και ψυκτήρα ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ένα βαθμονομημένο σωλήνα με στρόφιγγα. Ένας σωλήνας επιστροφής της υδατικής φάσης του αποστάγματος συνδέει το κάτω μέρος του βαθμονομημένου σωλήνα με τον κατακόρυφο σωλήνα. Το δείγμα τοποθετείται μέσα σε νερό σε σφαιρική φιάλη η οποία θερμαίνεται με τη χρήση θερμομανδύα. Οι υδρατμοί που σχηματίζονται μαζί με τα πτητικά συστατικά φτάνουν στον ψυκτήρα, ο οποίος ψύχεται με κυκλοφορία νερού βρύσης, με αποτέλεσμα να υγροποιούνται. Το νερό ανακυκλώνεται ενώ η φάση του αιθερίου ελαίου ως ελαφρότερη του νερού συγκεντρώνεται σταδιακά στο βαθμονομημένο (σε ml) σωλήνα του κυρίου μέρους της συσκευής. Πρακτικά η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί όταν η ποσότητα του αιθερίου ελαίου που έχει συλλεχθεί δεν αυξάνεται πλέον. Η ταχύτητα της απόσταξης ρυθμίζεται από την ένταση της θέρμανσης, η αύξηση της οποίας όμως μπορεί να επιφέρει τη διάσπαση των διάφορων συστατικών του αιθερίου ελαίου και την υποβάθμιση της ποιότητας του. Η μέθοδος πλεονεκτεί λόγω του μικρού της κόστους, της ευκολίας στη χρήση/μεταφορά και επειδή είναι κατάλληλη για ποικιλία φυτικών υλικών, όπως οι ρίζες, το ξύλο και οι καρποί. Ωστόσο υπάρχουν και αρκετά μειονεκτήματα, όπως η μεγάλη χρονική της διάρκεια, η σχετικά μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο, η χαμηλή ποιότητα του αιθερίου ελαίου λόγω της διάσπασης ορισμένων ευαίσθητων συστατικών καθώς και το ότι δεν είναι κατάλληλη για μεγάλες ποσότητες φυτικού υλικού (98).



Εικόνα 7: Συσκευή υδραπόσταξης κλειστού κύκλου τύπου Clevenger

2.1.3 Απόσταξη υποβοηθούμενη με Μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction)

Η απόσταξη με μικροκύματα αποτελεί μια από τις πράσινες τεχνικές που χρησιμοποιούνται εξοικονομώντας ενέργεια και είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιεί την ενέργεια των μικροκυμάτων για την θέρμανση των διαλυτών που βρίσκονται σε επαφή με το δείγμα με σκοπό τον διαχωρισμό των μεταβολιτών από το μητρικό δείγμα και το πέρασμά τους στο διαλύτη. Βασίζεται στις εξής αρχές:

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητικά κύματα με συχνότητα που κυμαίνεται μεταξύ 300 MHz και 30 GHz και μήκος κύματος μεταξύ 1 cm και 1m. Η πιο συνηθισμένη συχνότητα είναι 2450MHz που αντιστοιχεί σε μήκος κύματος 12.2 cm. Τα πλεονεκτήματα αυτής της

τεχνικής αποτελούν η υψηλή επαναληψιμότητα σε σύντομους χρόνους, η απλή διαχείριση της τεχνικής, η μειωμένη κατανάλωση διαλυτών, η μειωμένη κατανάλωση ενέργειας καθώς και η σημαντική μείωση του χρόνου εκύλισης(99).

2.1.4. Αέριος Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.λπ.

Το φέρον αέριο (συνήθως N₂, He, H₂, Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου. Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία.

Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο

χώρο, από ανοξειδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2 m για της πληρωμένες στήλες, μέχρις αρκετών εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των mm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες.

Το δείγμα, συνήθως όγκου 1μL εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Αν η στατική φάση είναι υγρό τότε πρόκειται για χρωματογραφία κατανομής, αν είναι στερεό για χρωματογραφία προσρόφησης.

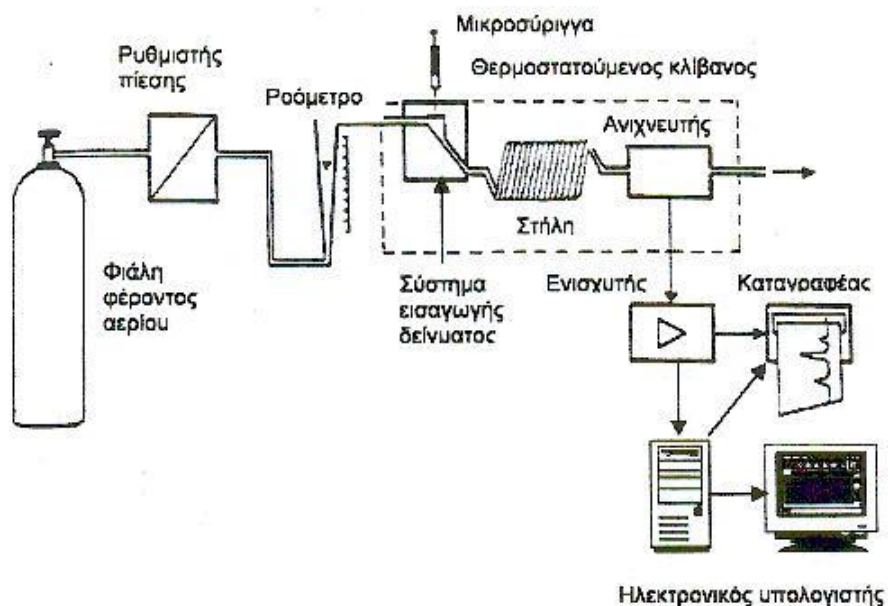
Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα.

Πλεονεκτήματα:

- Παρουσιάζει την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα από όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές.

Μειονεκτήματα:

- Ενώσεις με M.V. άνω του 300 είναι δύσκολο να αναλυθούν επειδή συνήθως δεν είναι πτητικές.
- Πιθανότητα διάσπασης ενώσεων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας
- Δεν αναλύονται ιονισμένες ενώσεις (Schauer et al., 2005).



Εικόνα 8: Διάγραμμα ροής Αέριας Χρωματογραφίας

Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αεριοχρωματογράφους, που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με **φασματομέτρα μαζών (MS)** ταχείας σάρωσης. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο συνδυασμός GC-MS είναι το όργανο αναφοράς για τον προσδιορισμό πολλών πτητικών-ημιπτητικών ενώσεων. Η εφαρμογή GC-MS λόγω της απλότητας και αμεσότητάς της, έχει πολύ μικρότερο κόστος, ευκολία και αντοχή σε σχέση με την σύζευξη LC-MS. Η τεχνική GC-MS βρίσκει εκτεταμένη εφαρμογή στην ανάλυση οργανικών ενώσεων: πετρελαιοειδών, αιθερίων ελαίων, ζιζανιοκτόνων, φαρμάκων και ναρκωτικών (100).

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της, ονομάζεται Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry, MS). Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά

ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Σε μία τυπική διαδικασία Φασματομετρίας Μαζών, ένα δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο, ιονίζεται. Τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z , mass-to-charge ratio). Τα ιόντα ανιχνεύονται από ένα μηχανισμό, ο οποίος είναι ικανός να ανιχνεύει φορτισμένα σωματίδια. Το διάγραμμα, που δίνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου m/z , ονομάζεται Φάσμα Μαζών (Mass Spectrum) της ένωσης. Τα άτομα ή μόρια μπορούν να ταυτοποιηθούν, με τη βοήθεια του χαρακτηριστικού φάσματός τους, με συσχέτισμό των γνωστών μαζών με ήδη υπάρχουσες μάζες ή μέσω του χαρακτηριστικού τρόπου θραυσματοποίησης. Σήμερα, η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρύτατα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής των διαφόρων οργανικών ενώσεων 22 κατά τη διαδικασία σύνθεσης (όπως π.χ. νέων φαρμάκων), για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων, για τη διερεύνηση της παρουσίας και του ποσοστού ισωτόπων, καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αγνώστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων.

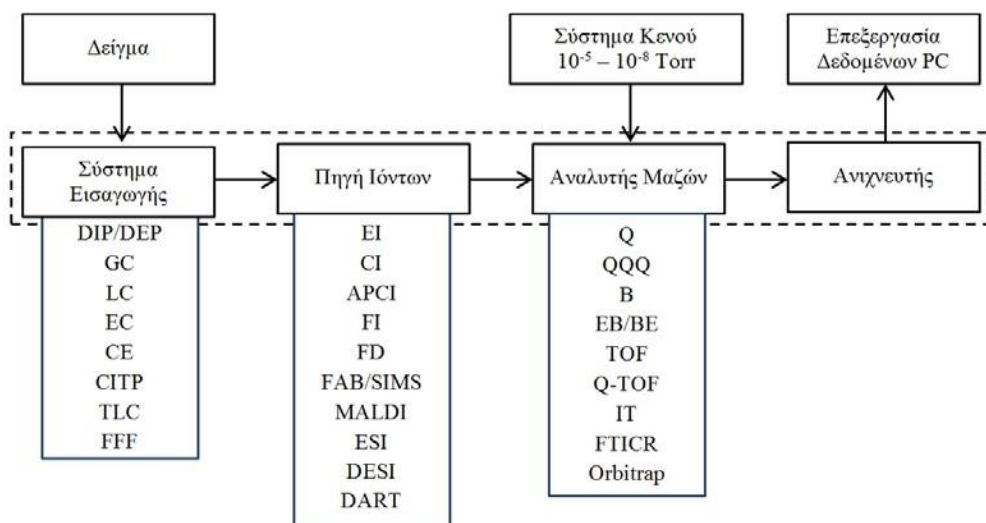
Ένα τυπικό φασματόμετρον μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος: Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος στο όργανο. Το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή στην υγρή του μορφή.
2. Πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization API): Εδώ τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων. Το προϊόν του ενιαίου αυτού τμήματος είναι ένα ρεύμα ιόντων (συνήθως θετικά φορτισμένων) τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.
3. Αναλυτής μαζών: Εδώ γίνεται διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z που φέρουν. Είναι η πραγματική καρδιά του συστήματος. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές.

4. Ανιχνευτής: Σκοπός της διάταξης αυτής είναι να συλλάβει τα διαχωριζόμενα ιόντα και να τα μετατρέψει σε ηλεκτρικό σήμα. Στη συνέχεια, γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

5. Σύστημα κενού: Ολόκληρο το φασματόμετρο (εκτός από το σύστημα επεξεργασίας δεδομένων) βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού.

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI). Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας (συνήθως 70 eV), δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρους της ένωσης μια κατιοντική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z . Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι : ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμό με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB). Οι συνηθέστεροι αναλυτές είναι: αναλυτής τομέα, τετραπολικός αναλυτής, παγίδα ιόντων, αναλυτής χρόνου πτήσης (101).



Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου

2.2. Παραλαβή και ανάλυση αιθερίων ελαίων

Η πιο ευρέως διαδεδομένη διαδικασία παραλαβής αιθερίων ελαίων είναι η υδραπόσταξη. Στο εργαστήριο για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της υδραπόσταξης με θερμομανδύα με εργαστηριακή συσκευή κλειστού τύπου Clengenger και η μέθοδος της υδραπόσταξης υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE). Παραλήφθηκαν τα αιθέρια έλαια και οι υδροσόλες τα οποία αναλύθηκαν με τη βοήθεια του GC-MS και ακολούθησε μελέτη των χρωματογραφημάτων και σύγκριση των δύο τεχνικών.

2.2.1. Παραλαβή αιθερίου ελαίου

Για τους σκοπούς του πειράματος πραγματοποιήθηκαν τρεις υδραποστάξεις και μία απόσταξη με την μέθοδο ΜΑΕ.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δάκρυα μαστίχας τα οποία δόθηκαν από την Ε.Μ.Χ

Η πρώτη υδραπόσταξη χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός-πρότυπο αναφοράς. Παραλήφθηκαν 200 gr δακρύων μαστίχας, τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 2 L και προστέθηκαν 400 ml H₂O. Αφού στήθηκε η συσκευή της απόσταξης και συνδέθηκαν όλα τα επιμέρους τμήματά της ξεκίνησε η διαδικασία της απόσταξης με εκκινήτρια θερμοκρασία στους 340°C. Αφού ξεκίνησε ο βρασμός στην φιάλη η θερμοκρασία μειώθηκε στους 200 °C και η απόσταξη συνεχίστηκε ώσπου και διακόπηκε για περίπου 3h . Στο τέλος της διαδικασίας παραλήφθηκε το αιθέριο έλαιο σε vial το οποίο υπολογίστηκε στα 4 ml αλλά και την υδροσόλη (μαστιχόνερο) τα οποία διαχωρίστηκαν πετώντας την επιφάνεια που εφάπτονταν μεταξύ τους στα απόβλητα. Η υδροσόλη ήταν περίπου 25 ml και η απόδοση της απόσταξης υπολογίστηκε στο 2 % w/v.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για να ελέγξουμε αν η διαδικασία είναι επαναλήψιμη και για να συγκριθούν τα αποτελέσματα και οι αναλύσεις των αιθερίων ελαίων. Στην 2^η και την 3^η υδραπόσταξη χρησιμοποιήθηκαν 100 gr δακρύων μαστίχας για λόγους ευκολίας καθώς και για να μην ξοδευτεί το υλικό. Και τις δύο φορές όλες οι παράμετροι διατηρήθηκαν σταθερές για να επιτευχθεί απόλυτη ακρίβεια ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα. Από τις δύο υδραποστάξεις παραλήφθηκε 1 ml αιθερίου ελαίου από τα 100 ml υλικού και η απόδοση υπολογίστηκε στο 2 %, οπότε αποδείχτηκε ότι η διαδικασία της υδραπόσταξης για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου από την ρητίνη της μαστίχας είναι επαναλήψιμη.



Εικόνα 10: Η συσκευή απόσταξης Clevenger κλειστού κύκλου

Στην συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MAE για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου από τα δάκρυα, η οποία είναι μια πολύ πιο γρήγορη και καινοτόμος μέθοδος για την διαδικασία της απόσταξης αλλά και αποτελεσματική καθώς δίνει τα ακριβώς ίδια αποτελέσματα σε σύγκριση με την υδραπόσταξη. Πρόκειται για ένα φούρνο μικροκυμάτων μέσα στον οποίο στηρίζεται η σφαιρική φιάλη η οποία περιέχει το υλικό προς απόσταξη με το νερό. Στο πάνω μέρος του ο φούρνος έχει μία οπή από την οποία περνάει γυάλινος κάθετος σωλήνας στον οποίο πάνω προσαρμόζεται το επίθεμα για την ανακύκλωση του αιθερίου ελαίου και σε αυτό ο ψυκτήρας. Η υπόλοιπη διάταξη είναι ίδια με την κλειστού κύκλου συσκευή Clevenger.

Για την παραλαβή όλων των αιθέριων ελαίων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή μικροκυμάτων Start E Microwave Extraction System (Εικόνα) και εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο (Πίνακας).



Εικόνα 11: Η συσκευή MAE

Πίνακας 3: Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων με μέθοδο της υδραπόσταξης με μικροκύματα

Time	Power
00:02:00	900W
00:20:00	700W
00:25:00	400 W
00:10:00	400 W

Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας αλληλουχίας υδραπόσταξεων και απόσταξης με την μέθοδο MAE.

Συγκριτικά αποτελέσματα παραλαβής αιθερίου ελαίου	
1 ^η Υδραπόσταξη (3h)	2% w/v
2 ^η Υδραπόσταξη (3h)	2% w/v
3 ^η Υδραπόσταξη (3h)	2% w/v
MAE (2h)	2% w/v

2.2.2. Ανάλυση με GC-MS αιθερίου ελαίου και υδροσόλης

Τα αιθέρια έλαια και οι υδροσόλες τους που παραλήφθηκαν με την μέθοδο της υδραπόσταξης αναλύθηκαν με την μέθοδο του GC-MS.

Για την παραλαβή των πτητικών συστατικών της υδροσόλης εφαρμόστηκε διαχωρισμός με υγρή-υγρή εκχύλιση με την προσθήκη 5 ml CH₂CL₂ την παραλαβή της κάτω οργανικής φάσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές με προσθήκη 5 ml CH₂CL₂ ώστε να παραληφθεί όλη η ποσότητα των πτητικών χωρίς παρουσία υγρασίας. Στο τέλος αφού συνενωθούν οι τρεις οργανικές φάσεις με το DCM προστίθεται Na₂SO₃ ώστε να απομακρυνθεί πλήρως όλη η υγρασία που υπάρχει. Έπειτα μεταφέρεται η φάση των πτητικών σε vial και το διάλυμα συμπυκνώνεται έως ότου απομακρυνθεί το DCM.

Η GC-MS ανάλυση έγινε σε συσκευή Hewlett-Packard 5973-6890 συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας HP 5973. Η μέθοδος παραγωγής των ιόντων έγινε μέσω του βομβαρδισμού με ηλεκτρόνια (EI-70 eV). Για το διαχωρισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε μία στήλη TP-5MS (30 m x 0.25 mm, πάχος φιλμ: 0.25 μm) της Thermo-SCIENTIFIC. 60 °C και 1 ml/min, αντίστοιχα. Για την Παρασκευή

του υπό εξέταση δειγματος 1 mg αιθερίου ελαίου διαλύθηκε σε 1 ml DCM εισήχθη χειροκίνητα στον αέριο χρωματογράφο και ο όγκος του δείγματος έγχυσης ήταν 1 μ L. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για την αραίωση των πτητικών της υδροσόλης.

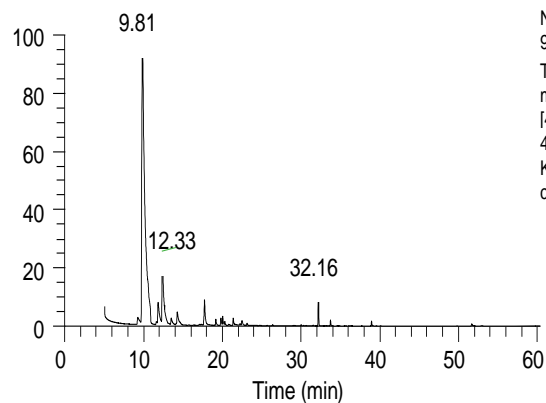
Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν:

-Θερμοκρασία εισαγωγέα: 60 °C

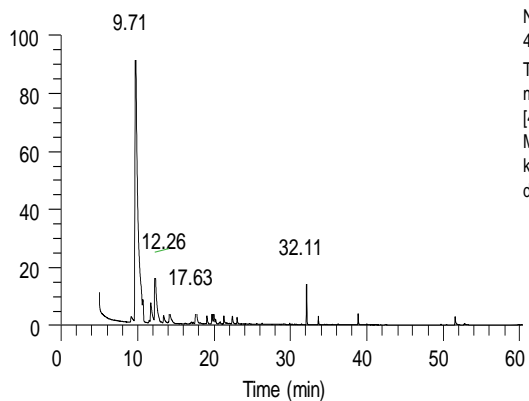
-Φέρον αέριο : Ήλιο(He), με ταχύτητα ροής 1 mL/min

Η ανάλυση των δειγμάτων είχε συνολική διάρκεια μίας ώρας (60 min) και το προφίλ της θερμοκρασίας του αέριου χρωματογράφου εξελίχθηκε ως ακολούθως:

η θερμοκρασία του φούρνου την στιγμή της ένεσης του δείγματος ήταν 50 °C διατηρήθηκε για τρία λεπτά και μετά το τρίτο λεπτό αυξανόταν 3 °C κάθε λεπτό που περνούσε μέχρι που έφτασε στους 210 °C και διατηρήθηκε για 0 λεπτά. Στο 56ο λεπτό άρχισε να αυξάνεται για 15 °C ανά λεπτό και τελικά έφτασε τους 240 °C όπου και διατηρήθηκε για δύο λεπτά.



NL:
9.63E8
TIC F: + c Full
ms
[40.00-
400.00] MS
KS_EO_masti
c



NL:
4.17E8
TIC F: + c Full
ms
[40.00-400.00]
MS
ks_eomastic_2n
dmae

Εικόνα 13: Χρωματογραφήματα αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο της υδραπόσταξης (αριστερά) και με τη μέθοδο της υδραπόσταξης υποβοηθούμενη με μικροκύματα (δεξιά)

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τα φάσματα μάζας των βιβλιοθηκών Wiley 7 και NIST 2011 και παίρνοντας υπόψη την σειρά έκλυσης των ουσιών.

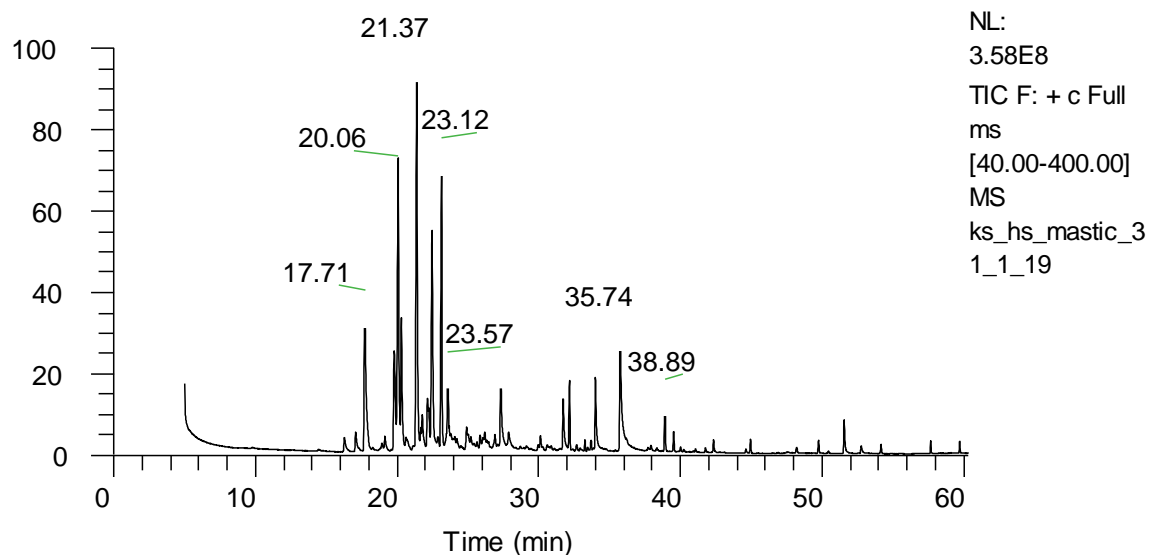
Πίνακας 5: Συγκριτικός πίνακας ποσοτικοποίησης πτητικών συστατικών των αιθεριων ελαίων από τις δύο μεθόδους απόσταξης

Πτητικά συστατικά ¹	Χρόνος κατακράτησης (t_R)	Εμβαδόν κορυφής (%) ²	
		Αιθέριο έλαιο (MAHD)	Αιθέριο έλαιο (HD)
Τρικυκλένιο	9.1	0.73	1.04
α -Πινένιο	9.7	67.19	72.95
Σαμπινένιο	11.5	0.26	0.19
β -Πινένιο	11.7	3.00	2.90
β -Μυρκένιο	12.2	10.24	8.45

ο-Μεθυλοανισόλη	13.4	0.86	0.76
Λιμονένιο	14.1	2.04	1.63
cis-Οξείδιο της λιναλοόλης	16.3	0.06	0.09
trans-Οξείδιο της λιναλοόλης	17.0	0.11	0.07
Λιναλοόλη	17.6	2.99	2.65
α-Καμφολενάλη	19.1	0.53	0.53
trans-Πινοκαρβεόλη	19.7	1.13	0.79
cis-Βερμπενόλη	19.9	1.55	0.87
trans-Βερμπενόλη	20.2	0.32	0.31
π-Μενθα-1,5-διεν-8-όλη	21.3	0.53	0.53
Μυρτενόλη	22.4	0.63	0.55
Βερμπενόνη	23.0	0.37	0.23
Οξικό βορνύλιο	26.3	0.06	0.07
α-Υλανγκένιο	29.9	0.06	0.06
α-Κοπαένιο	30.2	0.03	0.03
β-Μπουρπονένιο	30.6	0.02	0.02
ισο-Καρυοφυλλένιο	31.5	0.04	0.04
β-Καρυοφυλλένιο	32.1	2.94	2.73
α-Χουμουλένιο	33.6	0.38	0.36
γ-Μουουρολένιο	34.5	0.03	0.03
δ-Καδινένιο	36.0	0.01	-
Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	38.8	0.52	0.39
Εποξείδιο του χουμουλενίου II	39.9	0.05	0.05
Σεμπρένιο	51.5	0.66	0.50
Τερπενικοί υδρογονάνθρακες		87.63	89.30
Οξυγονούχα τερπένια		9.71	9.52
Σύνολο (%)		97.34	98.82

Μετά από την σύγκριση των δύο μεθόδων παραλαβής των αιθέριων ελαίων συμπεραίνεται ότι τα αιθέρια έλαια παραμένουν αναλοίωτα σε απόδοση και ποιοτική σύσταση. Ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 28 πτητικά συστατικά παρόντα και στα δύο αιθέρια έλαια με μόνη διαφορά το δ-καδινένιο που είναι παρόν στο αιθέριο έλαιο της υδραπόσταξης με μικροκύματα σε ίχνος και

εντελώς απόν στο αιθέριο έλαιο της κλασικής υδραπόσταξης. Ελάχιστες διαφορές παρατηρούνται στην ποσοτική σύσταση κάποιων κύριων συστατικών, ενώ σε γενική εικόνα είναι απειροελάχιστες οι διαφορές σε ποσοστιαία σύσταση των υπολοίπων συστατικών. Οι πέντε κύριες πτητικές ουσίες υπάρχουν στα αιθέρια έλαια και των δύο μεθόδων, το α -πινένιο, το β -μυρκένιο, το β -πινένιο, η λιναλοόλη και το β -καρυοφυλλένιο και εκτός από το α -πινένιο και το β -μυρκένιο που έχουν κάποια ίσως αξιοσημείωτη διαφορές στην σύστασή τους οι υπόλοιπες ουσίες δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων.



Εικόνα 14: Χρωματογράφημα του υδρολύματος που παρήχθη κατά την διαδικασία παραλής του αιθερίου ελαίου

Πίνακας 6: Συγκριτικός πίνακας ποσοτικοποίησης πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου και του υδρολύματος

Πτητικά συστατικά ¹	Χρόνος κατακράτησης (t_R)	Εμβαδόν κορυφής (%) ²	
		Αιθέριο έλαιο	Υδρόλυμα
Τρικυκλένιο	9.1	1.04	-
α -Πινένιο	9.7	72.95	-
Σαμπινένιο	11.5	0.19	-
β -Πινένιο	11.7	2.90	-
β -Μυρκένιο	12.2	8.45	-
<i>o</i> -Μεθυλοανισόλη	13.4	0.76	-
Λιμονένιο	14.1	1.63	-
<i>cis</i> -Οξειδίο της λιναλοόλης	16.3	0.09	0.74
<i>trans</i> -Οξειδίο της λιναλοόλης	17.0	0.07	0.84
Λιναλοόλη	17.6	2.65	8.35
α -Καμφολενάλη	19.1	0.53	0.51
<i>trans</i> -Πινοκαρβεόλη	19.7	0.79	4.78
<i>cis</i> -Βερμπενόλη	19.9	0.87	11.9
<i>trans</i> -Βερμπενόλη	20.2	0.31	4.47
π -Μενθα-1,5-διεν-8-όλη	21.3	0.53	15.44
π -Κυμεν-8-όλη	22.1	-	2.63
Μυρτενόλη	22.4	0.55	9.00
Βερμπενόνη	23	0.23	9.86
<i>trans</i> -Καρβεόλη	23.5	-	3.04
Οξικό βορνύλιο	26.3	0.07	-
Περιλλική αλκοόλη	27.3	-	3.32
α -Υλανγκένιο	29.9	0.06	-
α -Κοπαένιο	30.2	0.03	-
β -Μπουρπονένιο	30.6	0.02	-
<i>ισο</i> -Καρυοφυλλένιο	31.5	0.04	-
Μεθυλοευγενόλη	31.7	-	1.92
β -Καρυοφυλλένιο	32.1	2.73	1.67

α-Χουμουλένιο	33.6	0.36	0.25
(Z)-Μεθυλοισοευγενόλη	33.9	-	2.48
γ-Μουουρολένιο	34.5	0.03	-
(E)-Μεθυλοισοευγενόλη	35.7	-	7.24
δ-Καδινένιο	36.0	-	-
Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	38.8	0.39	1.76
Εποξειδίο του χουμουλενίου II	39.9	0.05	-
4-Υδροξυ-9-επί-(E)-καρυοφυλλένιο	42.4	-	0.34
Σεμπρένιο	51.5	0.50	1.18
Τερπενικοί υδρογονάνθρακες		90.93	3.10
Οξυγονούχα τερπένια		7.89	88.62
Σύνολο (%)		98.82	91.72

¹ Η ταυτοποίηση των συστατικών βασίστηκε στη σειρά έκλουσης και στη σύγκριση των φασμάτων μάζας με τα αντίστοιχα δεδομένα από τις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 2011, Wiley 2007 και Adams 07.

² Εκατοστιαία αναλογία κάθε συστατικού με βάση το λόγο του εμβαδού της κορυφής προς το συνολικό εμβαδόν των κορυφών στο χρωματογράφημα (TIC).

Έπειτα από τη σύγκριση των αναλύσεων του αιθερίου ελαίου και του υδrolύματος της μαστίχας ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται 28 πτητικά συστατικά στο αιθέριο έλαιο και 21 πτητικά συστατικά στο υδρόλυμα. Από τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου μόνο η λιναλοόλη και το β-καρυοφυλλένιο φαίνεται να υπάρχουν και στο υδρόλυμα, ενώ τα δύο πιο κύρια συστατικά του υδrolύματος είναι η π-Μενθα-1,5-διεν-8-όλη και η cis-Βερμπενόλη. Συμπεραίνεται ότι στο υδρόλυμα υπάρχουν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ή και εξ'ολοκλήρου μόνο στο υδρόλυμα οι ουσίες που είναι οξυγονούχα τερπένια ή είναι οξυγονωμένα παράγωγα των υπολοίπων ουσιών. Αυτές είναι κυρίως ενώσεις αυξημένης πολικότητας και διαλυτότητας στο νερό, ενώ στο αιθέριο έλαιο περιέχονται ουσίες άπολες υψηλής πτητικότητας, σχεδόν αδιάλυτες στο νερό που είναι κυρίως οι τερπενικοί υδρογονάνθρακες.

2.2.3. Κλασμάτωση αιθερίου ελαίου με CPC

Για τους σκοπούς της εις βάθος μελέτης του αιθερίου ελαίου χρησιμοποιήθηκε η κλασμάτωση με χρήση της Χρωματογραφίας Κατανομής με Φυγοκέντριση (FCPC). Επίσης η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον πιο λεπτομερή διαχωρισμό του αιθερίου ελαίου σε συμπυκνωμένα κλάσματα κι από εκεί στην όσο το δυνατόν πιο επιτυχημένη απομόνωση μεμονωμένων ουσιών. Το εγχείρημα αυτό στο αιθέριο έλαιο της μαστίχας δεν έχει αναφερθεί ξανά στην βιβλιογραφία, κάτι το οποίο το καθιστά καινοτόμο μιας και ενώ πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την μαστίχα και το έλαιό της με τις μεθόδους GC-MS, αλλά και HPLC, πουθενά όμως δεν έχει καταγραφεί η χρήση της μεθόδου του CPC. Η δυσκολία της χρήσης αυτής της μεθόδου αφορά κυρίως το γεγονός ότι δεν ενδείκνυται για πτητικά συστατικά μιας και είναι πολύ άπολα και έτσι θα υπήρχαν μεγάλες απώλειες κατά την διάρκεια του διαχωρισμού.

- Επιλογή κατάλληλου διφασικού συστήματος:

Για να γίνει καλύτερη επιλογή των διαλυτών για το διφασικό σύστημα που θα χρησιμοποιούταν για τους σκοπούς του διαχωρισμού, υπολογίστηκαν οι συντελεστές κατανομής των ουσιών του αιθερίου ελαίου στην πάνω και κάτω φάση διαφόρων συστημάτων. Δοκιμάστηκαν δύο διφασικά συστήματα, το σύστημα n-Hex/ACN/Butanol -> 1,6/1,6/0,2 ml και το σύστημα n-Hex/ACN/Iso-propanol -> 1,6/1,6/0,2 ml σε διαλύτη ανάπτυξης 100 % DCM και σε μίγμα διαλυτών DCM/c-Hex -> 50/50.

Σε όλες τις περιπτώσεις πριν αναπτυχθούν οι πλάκες TLC διαλύθηκε μια μικρή ποσότητα από το αιθέριο έλαιο στο διφασικό σύστημα σε δοκιμαστικό σωλήνα και αφού ανακινήθηκε, μετρήθηκε ο χρόνος διαχωρισμού των δύο φάσεων και καταγράφηκε η αναλογία

της πάνω και της κάτω φάσης. Και για τα δύο συστήματα ο χρόνος ήταν περίπου ο ίδιος γύρω στα 10 δευτερόλεπτα και η αναλογία της πάνω με την κάτω φάση ήταν 40:60.

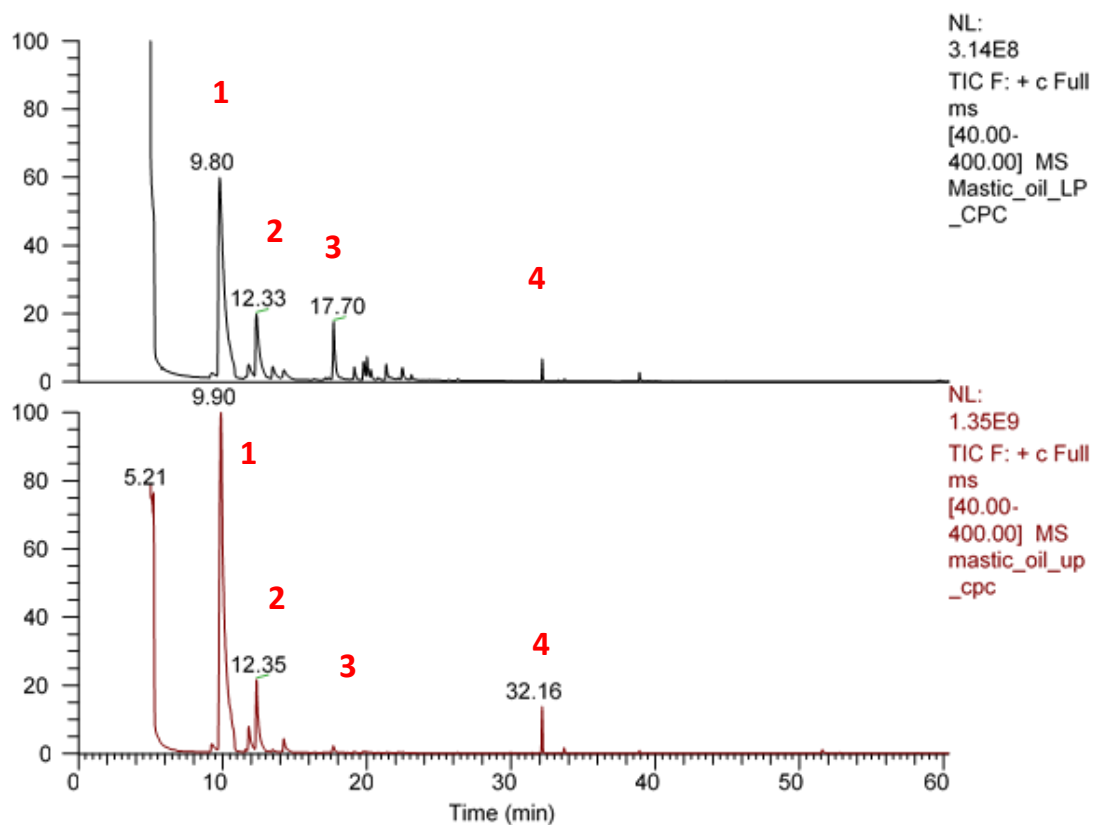


Εικόνα 15: Έλεγχος διφασικών συστημάτων με TLC. Αριστερά τα χρωματογραφήματα της πάνω και κάτω φάσης για το σύστημα *n*-Hex/ACN/Butanol -> 1,6/1,6/0,2 και δεξιά τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα για το σύστημα *n*-Hept/ACN/*iso*-propanol-> 1,6/1,6/0,2. Κινητή φάση: DCM/*c*-Hex-> 50/50. Παρατήρηση χρωματογραφήματων στα 254 nm και στο ορατό(Vis) μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση.

Η ανάπτυξη των πλακών TLC έδειξε ότι και για τα δύο συστήματα υπήρχε μια ικανοποιητική κατανομή των ουσιών στην πάνω και κάτω φάση σε σύγκριση με την κατανομή στο κυρίως αιθέριο έλαιο. Επιλέχθηκε παρόλα αυτά το σύστημα *n*-Hex/ACN/*iso*-propanol λόγω χαμηλότερου σημείου βρασμού της *iso*-προπανόλης, γεγονός που θα διευκόλυνε στην μετέπειτα διαδικασία της συμπύκνωσης την απομάκρυνση της *iso*-προπανόλης χωρίς την απώλεια πτητικών συστατικών.

Σε συνέχεια της επιβεβαίωσης διερεύνησης για την καταλληλότητα του συστήματος λαμβάνονται 16 mg από το αιθέριο έλαιο και διαλύονται σε 3,4 ml του διφασικού συστήματος. Έπειτα από τον διαχωρισμό των δύο φάσεων αραιώνονται 0,2 ml της κάθε μίας με

0,8 ml DCM σε vial πενικιλίνης και καταγράφονται τα προφίλ τους με τη μέθοδο του GC-MS, ώστε να υπολογιστούν οι συντελεστές κατανομής των συστατικών τους K_D .



Εικόνα 18: Χρωματογραφήματα στατικής(n-Hept/ACN) και κινητής φάσης(isopropanol) του διφασικού συστήματος διαχωρισμού του αιθερίου ελαίου με επισημασμένες τις κυριες κορυφές για τις οποίες πραγματοποιήθηκε η μελέτη

Πίνακας 7: Αποτελέσματα των συντελεστών κατανομής K_D συνάρτηση με το χρόνο κατακράτησης R_t

Κυριοι Μεταβολίτες Αιθερίου Ελαίου		Συντελεστής κατανομής	Συντελεστής Διαχωριστότητας
Κορυφή	R_t	K_D	α
1	9,81	6,19	$\alpha_{1,2}=1.8 / \alpha_{4,1}=1.5$
2	12,33	3,36	$\alpha_{1,2}=1.8 / \alpha_{2,3}=5.8$
3	17,62	0,58	$\alpha_{2,3}=5.8$
4	32,16	9,17	$\alpha_{4,1}=1.5$

Έπειτα από τον υπολογισμό των συντελεστών κατανομής επιβεβαιώθηκε ότι το σύστημα διαχωρισμού ήταν το κατάλληλο για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των κύριων συστατικών του αιθερίου ελαίου. Στην πλειοψηφία τους οι ουσίες παρουσιάζουν αρκετά διαφορετικό συντελεστή κατανομής ενώ ο συντελεστής διαχωριστότητας της εκάστου ουσίας βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος του 1.5 (πίνακας 7) γεγονός που υποδεικνύει την έκλουσή τους ξεχωριστά και κατ'επέκταση τον επιτυχή διαχωρισμό τους.

- Εκτέλεση διαχωρισμού:

Για την CPC κλασμάτωση του αιθέριου ελαίου της ρητίνης της μαστίχας Χίου χρησιμοποιήθηκε το όργανο FCPC KROMATON με ενσωματωμένη αναλυτική στήλη χωρητικότητας 200 ml.

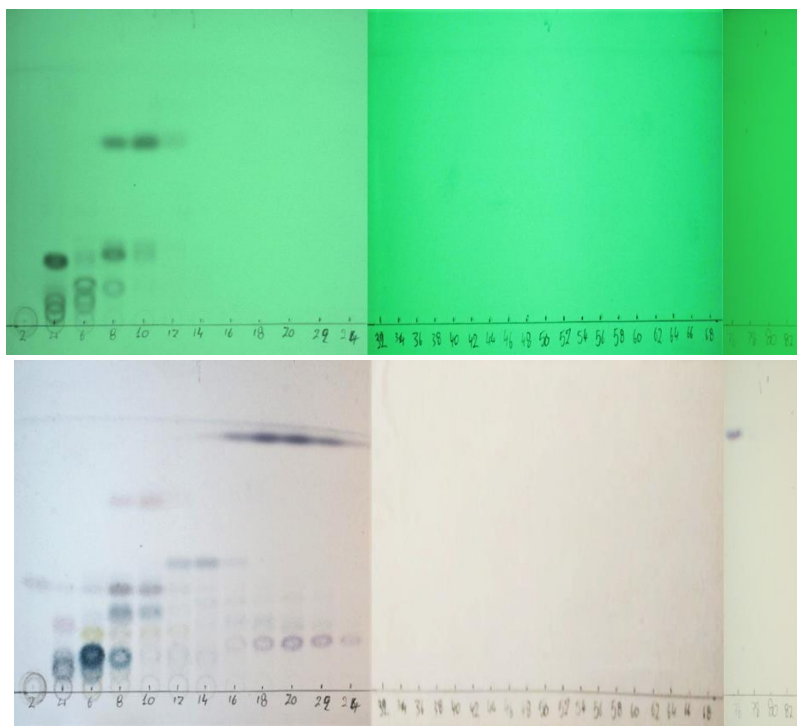
Το διφασικό σύστημα των διαλυτών προετοιμάζεται σε διαχωριστική χοάνη των 2 L. Μετά από ανακίνηση το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία ώστε οι δύο φάσεις να σχηματίσουν διαχωριστική επιφάνεια και έπειτα παραλαμβάνονται σε κωνικές φιάλες ξεχωριστά. Στη συνέχεια πληρώνεται η στήλη με την πάνω φάση (στατική) με ροή 15 ml/min και ταχύτητα περιστροφής στήλης στα 200 rpm. Η μέθοδος της κλασμάτωσης ακολούθησε την καθοδική λειτουργία αντίστροφης φάσης (descending/reverse mode) και ακολούθησε η εισαγωγή της κάτω κινητής φάσης με ροή 10 ml/min, και αφού έγινε εξισσορόπηση των δύο φάσεων υπολογίστηκε ο συντελεστής κατακράτησης της στατικής φάσης (S_F) και βρέθηκε να είναι 0,55. Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή του δείγματος (1ml αιθέριου ελαίου διαλυμένο σε 8ml μίγματος στατικής:κινητής σε αναλογία 5:2) και αφού παρήλθε ποσότητα διαλυτών 80 mL άρχισε η συλλογή των κλασμάτων . Με κινητή την κάτω φάση συλλέχθηκαν 58 κλάσματα των 10 ml και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση η άνω φάση με αποτέλεσμα την συλλογή 22 ακόμα κλασμάτων. Καθ'όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού η ροή παρέμεινε σταθερή στα 10 ml/min ενώ η περιστροφή της στήλης συντονίστηκε στα 750 rpm. Η διαδικασία του διαχωρισμού ακολούθησε την μέθοδο της έκλουσης-εξώθησης (elution-extrusion) και παρουσιάζεται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 8: Στοιχεία της μεθόδου της χρωματογραφίας κατ'αντιρροή στο αιθέριο έλαιο

Στατική φάση	Κινητή φάση	Κλάσματα (10 ml)
Στάδιο έκλουσης (descending mode)		
Άνω φάση	Κάτω φάση	58

(n-Hept/ACN)	Isopropanol	
Στάδιο εξώθησης (descending mode)		
Άνω φάση	Άνω φάση	22
(n-Hept/ACN)	(n-Hept/ACN)	
Ροή: 10ml/min		
Ταχύτητα Περιστροφής : 750 rpm		

Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν μελετήθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 19: TLC κλασμάτων από τη μέθοδο κλασμάτωσης CPC του αιθερίου ελαίου της ρητίνης της μαστίχας στα 254 nm και στο ορατό (vis)

Η ανάπτυξη σε πλάκες TLC των συνενωμένων κλασμάτων του αιθερίου ελαίου επιβεβαιώνει τον επιτυχή διαχωρισμό των πτητικών συστατικών. Επίσης συμπεραίνεται ότι σε αρκετά από τα κλάσματα δεν υπάρχουν καθόλου ουσίες, ενώ σε κάποια άλλα κάποιες παραλαμβάνονται σε μεγάλο ποσοστό μόνες τους. Αξιοσημείωτη είναι επίσης και η παρουσία πληθώρα ουσιών, που μετά από επιβεβαίωση με την ανάλυση GC-MS, επιβεβαιώνει την επιτυχία της επιλογής της μεθόδου της Χρωματογραφίας κατ'Αντιρροή για την λεπτομερή κλασμάτωση και την μελέτη του αιθερίου ελαίου.

2.2.4. Ανάλυση κλασμάτων με GC-MS

Τα συνενωμένα κλάσματα επεξεργάστηκαν εκ νέου με τη μέθοδο του GC-MS, αφού συμπυκνώθηκαν στο Rota χωρίς αύξηση θερμοκρασίας και με ελεγχόμενη πίεση κενού στα 70-110 mbar, ώστε να μη υπάρξουν απώλειες των πολύ πτητικών ουσιών. Για την Παρασκευή των υπό εξέταση δειγμάτων 1 mg κάθε κλάσματος διαλύθηκε σε 1 ml DCM εισήχθη χειροκίνητα στον αέριο χρωματογράφο και ο όγκος του δείγματος έγχυσης ήταν 1 μ L.

Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν:

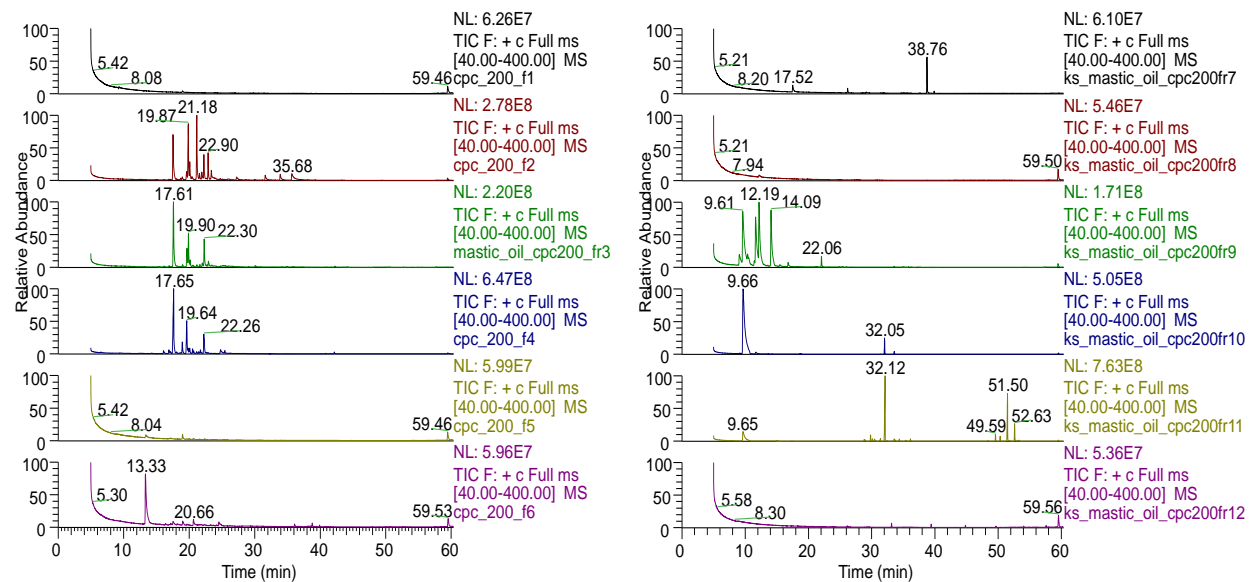
-Θερμοκρασία εισαγωγέα: 60 °C

-Φέρον αέριο : Ήλιο(He), με ταχύτητα ροής 1 mL/min

Η ανάλυση των δειγμάτων είχε συνολική διάρκεια μίας ώρας (60 min) και το προφίλ της θερμοκρασίας του αέριου χρωματογράφου εξελίχθηκε ως ακολούθως:

η θερμοκρασία του φούρνου την στιγμή της ένεσης του δείγματος ήταν 50 °C διατηρήθηκε για τρία λεπτά και μετά το τρίτο λεπτό αυξανόταν 3 °C κάθε λεπτό που περνούσε μέχρι που έφτασε στους 210 °C και διατηρήθηκε για 0 λεπτά. Στο 56ο λεπτό άρχισε να αυξάνεται για 15 °C ανά λεπτό και τελικά έφτασε τους 240 °C όπου και διατηρήθηκε για δύο λεπτά.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τα φάσματα μάζας των βιβλιοθηκών Wiley 7 και NIST 2011 και παίρνοντας υπόψη την σειρά έκλουσης των ουσιών.



Εικόνα 21: Χρωματογραφήματα των κλασμάτων 1-12 της κλασμάτωσης του αιθερίου ελαίου

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας ποσοτικοποίησης πτητικών συστατικών των κλασμάτων του αιθερίου ελαίου

No	Πτητικά Συστατικά ¹	Χρόνος Κατακράτησης(<i>t_R</i>)	Εμβαδόν Κορυφής (%) ²								
			Κλάσμα 2(4-5)	Κλάσμα 3(6)	Κλάσμα 4(7-8)	Κλάσμα 5(9-11)	Κλάσμα 6 (12-15)	Κλάσμα 7(16-25)	Κλάσμα 9(51-69)	Κλάσμα 10(70-73)	Κλάσμα 11(74-77)
1	Τρικυκλένιο	9.2							4.59	0.43	
2	α-Πινένιο	9.7							26.79	92.97	19.54
3	β-Πινένιο	11.7							18.51	1.44	
4	β-Μυρκένιο	12.2							21.97		
5	ο-Μεθυλοανισόλη	13.4				37.8					
6	Λιμονένιο	14.1							18.1	0.07	
7	<i>cis</i> -Οξείδιο της λιναλοόλης	16.1	0.07	0.45							
8	<i>trans</i> -Οξείδιο της λιναλοόλης	16.9	0.15	0.63							
9	Λιναλοόλη	17.6	16.95	39.4							

21	α-Κοπαένιο	30.1									0.95
22	ισο-Καρυοφυλλένιο	31.4									0.99
23	Μεθυλοευγενόλη	31.6	2.63								
24	β-Καρυοφυλλένιο	32.1						0.02	4.3	34.08	
25	α-Χουμουλένιο	33.6						0.14	0.73	0.84	
26	(Z)- Μεθυλοισοευγενόλη	33.9	3.54					0.01			
27	γ-Μουουρολένιο	34.4						0.03		0.82	
28	(E)- Μεθυλοισοευγενόλη	35.7	8.55								
29	Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	38.8					55.69				
30	Εποξείδιο του χουμουλενίου II	39.9					0.38				

31	Σεμπρένιο	51.5									21.9

¹ Η ταυτοποίηση των συστατικών βασίστηκε στη σειρά έκλουσης και στη σύγκριση των φασμάτων μάζας με τα αντίστοιχα δεδομένα από τις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 2011, Wiley 2007 και Adams 07.

² Εκατοστιαία αναλογία κάθε συστατικού με βάση το λόγο του εμβαδού της κορυφής προς το συνολικό εμβαδόν των κορυφών στο χρωματογράφημα (TIC).

Από την μελέτη του παραπάνω πίνακα συμπεραίνεται η επιτυχής επιλογή της μεθόδου της Χρωματογραφίας κατ'Αντιρροή για την κλασμάτωση του αιθερίου ελαίου σε συμπυκνωμένα κλάσματα και τον παραπέρα διαχωρισμό τους στα συστατικά του αιθερίου ελαίου. Από αυτή την προσπάθεια διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η επιλογή της μεθόδου του CPC σαν μια νέα καινοτόμος τεχνική για τον διαχωρισμό μέχρι και πτητικών συστατικών κάτι που μέχρι πρότινος αποφευγόταν και επίσης σαν μία αποτελεσματική τεχνική για την διερεύνηση συστατικών που στο κυρίως αιθέριο έλαιο δεν ανιχνεύονταν. Ταυτοποιήθηκαν περί τις 25 επιπλέον πτητικές ουσίες στα κλάσματα του αιθερίου ελαίου γεγονός που καθιστά την μέθοδο της Χρωματογραφία κατ'Αντιρροή πολύτιμη και σημαντική.

2.2.5. Συμπεράσματα

Έπειτα από το πέρας των πειραμάτων στο αιθέριο έλαιο της μαστίχας επιβεβαιώνεται η καταλληλότητα της μεθόδου της απόσταξης υποβοηθούμενης με μικροκύματα, αφού το αιθέριο έλαιο παραλαμβάνεται με την ίδια απόδοση καθώς και με την ίδια ποσοτική σύσταση με τη διαφορά ότι είναι πιο γρήγορη και πιο φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος. Η τεχνική της μεθόδου της Χρωματογραφίας κατ'Αντιρροή αποδεικνύεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλασμάτωση αιθερίων ελαίων και την λεπτομερή ανάλυση των κλασμάτων οπότε και την εις βάθος μελέτη των πτητικών συστατικών του. Παρέχει ένα ικανοποιητικό διαχωρισμό σε κλάσματα του αιθερίου ελαίου καθώς και την ανίχνευση συστατικών που στο κυρίως αιθέριο έλαιο υπάρχουν σε απειροελάχιστα ποσοστά.

2.3. Επεξεργασία κολοφωνίου - Απομόνωση και ταυτοποίηση πολυμερούς

2.3.1. Απομόνωση πολυμερούς

Από τις πρώτες προσπάθειες που έγιναν για την απομάκρυνση του πολυμερούς ήταν αυτή των Barton και Seoane (46). Σε αυτό το πείραμα η κονιοποιημένη μαστίχα διαλύθηκε σε διαιθυλαιθέρα, στη συνέχεια προστέθηκε μεθανόλη και παρέμεινε κατά τη διάρκεια της νύχτας. Μετά την απόχυσή του από το αδάλυτο πολυμερές το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το υπόλειμμα διαλύθηκε ξανά σε αιθέρα και αραιώθηκε με μεθανόλη. Η διαδικασία στο σύνολό της έγινε τρεις φορές έως ότου η μαστίχα ήταν διαλυτή στο μίγμα αιθέρα-μεθανόλης. Μία παρόμοια διαδικασία κατακρήμνισης αναφέρθηκε από τον Paraschos και τους συνεργάτες του (102). Η διαδικασία περιλάμβανε την διάλυση του πολυμερούς σε οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) ακολουθούμενη από προσθήκη μεθανόλης (MeOH), ώστε να αυξηθεί η πολικότητα του διαλύματος και έτσι να επιτευχθεί η κατακρήμνιση του πολυμερούς. Μετά από παραμονή δύο ημερών το αδιάλυτο πολυμερές αφαιρέθηκε, το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε και έτσι παραλήφθηκε το Ολικό Εκχύλισμα της Μαστίχας χωρίς πολυμερές (OEM) (102) Η ίδια διαδικασία έχει πραγματοποιηθεί και από άλλες ομάδες ερευνητών με ελάχιστες παραλλαγές (51,58,103–105). Σε μία άλλη μελέτη του Hamzaoui και των συνεργατών του για τους σκοπούς του διαχωρισμού του τριτερπενικού κλάσματος από το πολυμερές, έγινε κλασμάτωση του διαλύματος χρησιμοποιώντας το διφασικό σύστημα εξάνιο/ αιθανόλη/ νερό σε αναλογία: 15/13/2 (DOI: 10.1055/s-0035-1565686). Επίσης άλλη μια προσέγγιση που έγινε πρόσφατα αφορούσε την χρήση της Υπερκρίσιμης Εκχύλισης Υγρών (SFE) για τον διαχωρισμό του τριτερπενικού κλάσματος από το πολυμερές (32). Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν διάφοροι διαλύτες ως προς την διαλυτική τους ικανότητα στο πολυμερές, ούτως ώστε να συστηματοποιηθεί η διαδικασία όσο ήταν δυνατό και να βελτιωθεί η ταχύτητα και η αποτελεσματικότητα της παραλαβής του πολυμερούς.

Οι δοκιμές της διαλυτικής ικανότητας διαφόρων αντιδραστηρίων εκτελέστηκαν στο σύνολο της μαστίχας σε σχήμα δακρύων η οποία έχει συλλεχθεί και προσφθέρθηκε από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου (Ε.Μ.Χ.)



Εικόνα 23: Τα δάκρυα μαστίχας όπως παραλήφθησαν και επεξεργάστηκαν από την Ε.Μ.Χ.

Για τον σκοπό της εύρεσης κατάλληλου διαλύτη για τη παραλαβή του πολυμερούς και σύμφωνα με την βιβλιογραφία) δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες ώστε να βρεθεί με ποιο από αυτά θα μπορούσε να παραληφθεί επιτυχώς το πολυμερές. Οι δοκιμή με επτάνιο απέτυχε (n-Heptane) καθώς τα δάκρυα απέμειναν αδιάλυτα σε αυτό. Επίσης η διάλυση σε ακετονιτρίλιο (ACN) ήταν και αυτή ανεπιτυχής καθώς η μαστίχα παρέμεινε αδιάλυτη σε αυτό.

Για την ανάγκη της βελτιστοποίησης της διαδικασίας όσον αφορά το χρόνο και τις ανάγκες της σε διαλύτες, επιχειρήθηκε η διάλυση της μαστίχας σε DMSO, το οποίο είναι γνωστό για το ευρεία διαλυτική του ικανότητα.

Χρησιμοποιήθηκαν 50 g δακρύων μαστίχας στα οποία προστέθηκαν 500 ml DMSO. Αφού έγινε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων κρατήθηκε το αδιάλυτο μέρος της διαδικασίας και τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως όπου έγινε προσθήκη ξανά DMSO με συνεχή ανάδευση και τρίψιμο του κολλώδους αδιάλυτου υλικού με σπάτουλα



Εικόνα 24: Το πολυμερές μετά από τον διαχωρισμό του από το υπόλοιπο κομμάτι της μαστίχας

Η διαδικασία συνεχίστηκε άλλες δύο φορές έως ότου να σταματήσει το διάλυμα να είναι θολό (ένδειξη παρουσίας τερπενίων τα οποία παραλάμβανε το DMSO).

Αφού παραλήφθηκε πια το αδιάλυτο πολυμερές συνεχίστηκε η κατεργασία του με πλύσεις με την χρήση πρώτα νερού H₂O, ώστε να απομακρυνθεί το εναπομείναν DMSO. Αφού συνεχίζουμε την εξαντλητική πλύση του πολυμερούς με H₂O υποθέτουμε πως έχει απομακρυνθεί το DMSO τελείως όταν πια δεν υπάρχει καθόλου η χαρακτηριστική οσμή του. Έπειτα συνεχίζουμε την πλύση διαδοχικά και εξαντλητικά με ACN και EtOH, ώστε να επιτύχουμε πλήρη απομάκρυνση του H₂O. Στον πίνακα παρακάτω παρατίθενται οι αριθμοί μετά από τις ζυγίσεις για την παραλαβή του πολυμερούς

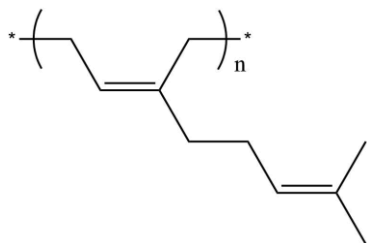
Πίνακας 9: Παρουσίαση αποτελεσμάτων της διαδικασίας παραλαβής του πολυμερούς

Αποτελέσματα διαδικασιών παραλαβής πολυμερούς	
Βάρος δακρύων μαστίχας	50 g
Βάρος πολυμερούς έπειτα από την υγρή-υγρή εκχύλιση	9,8 g
Ποσοστό πολυμερούς στα αρχικό βάρος των δακρύων	19,6 %
Διαφορά από θεωρητικό ποσοστό πολυμερούς	~5,4 %

2.3.2. Ταυτοποίηση πολυμερούς

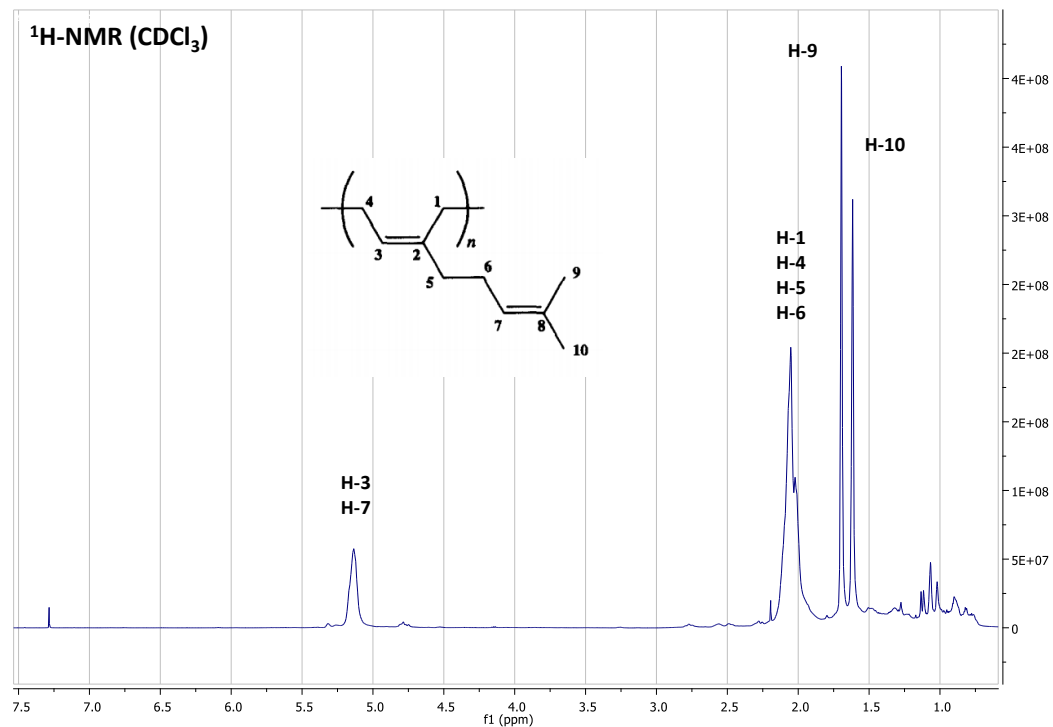
Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου ¹H-NMR, όπως και φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) έγινε σε φασματογράφο Bruker Avance III 600 (600 MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται

ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *multi* (πολλαπλή), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3).

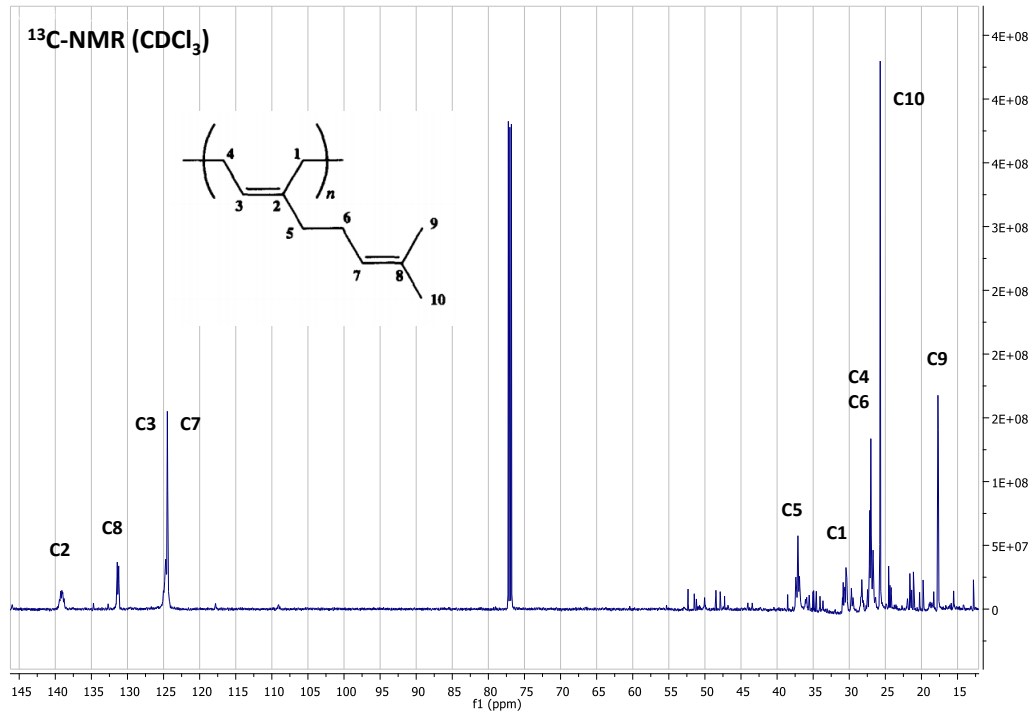


Εικόνα 25: Το πολυμερές *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκένιο

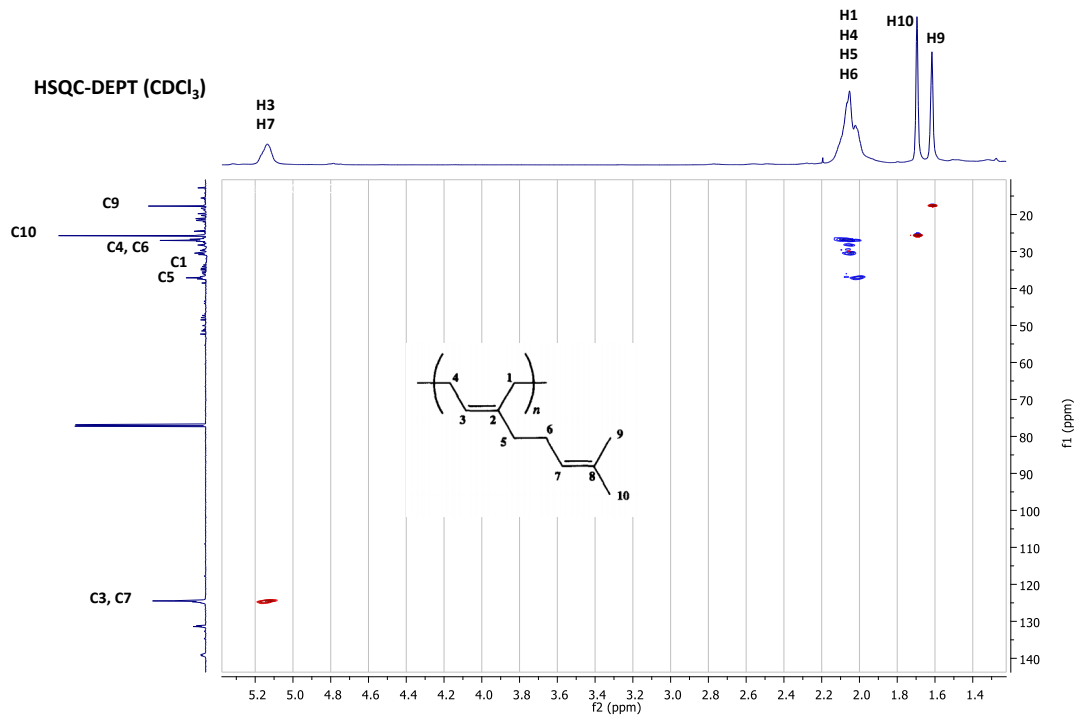
Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα μίας ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) και δύο διαστάσεων (COSY , HSQC-DEPT , HMBC) του πολυμερούς



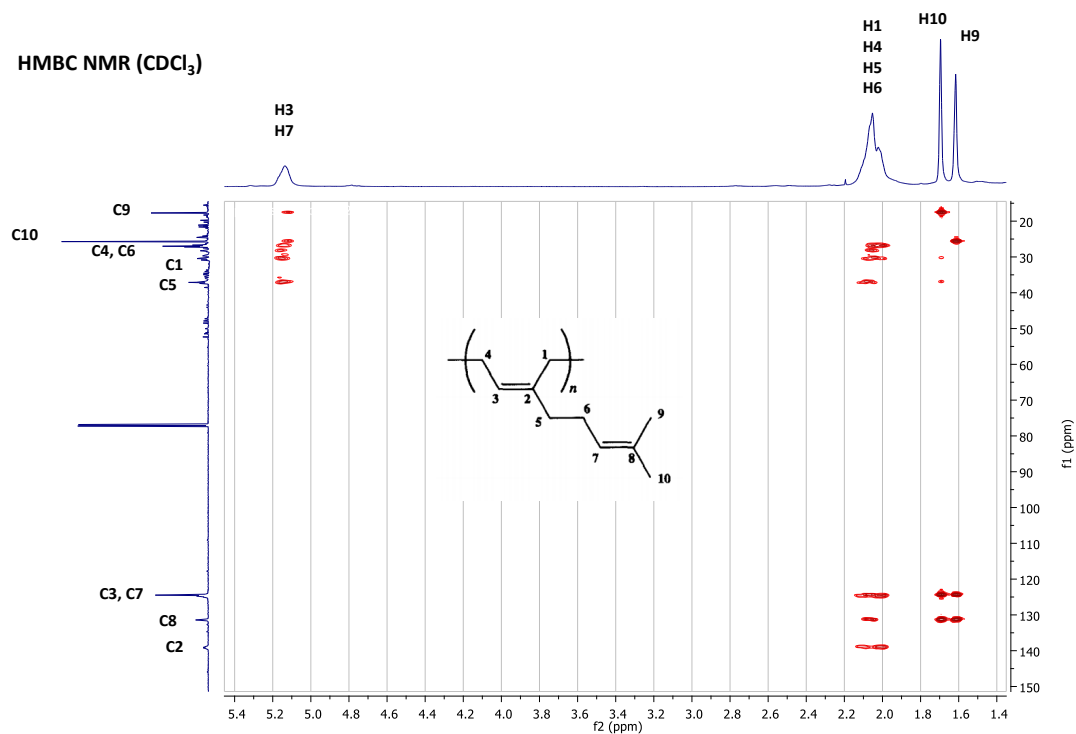
Εικόνα 26: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ του πολυμερούς *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκενίου



Εικόνα 27: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C-NMR}$ του πολυμερούς *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκενίου



Εικόνα 28: Φάσμα HSQC-DEPT του πολυμερούς *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκενίου



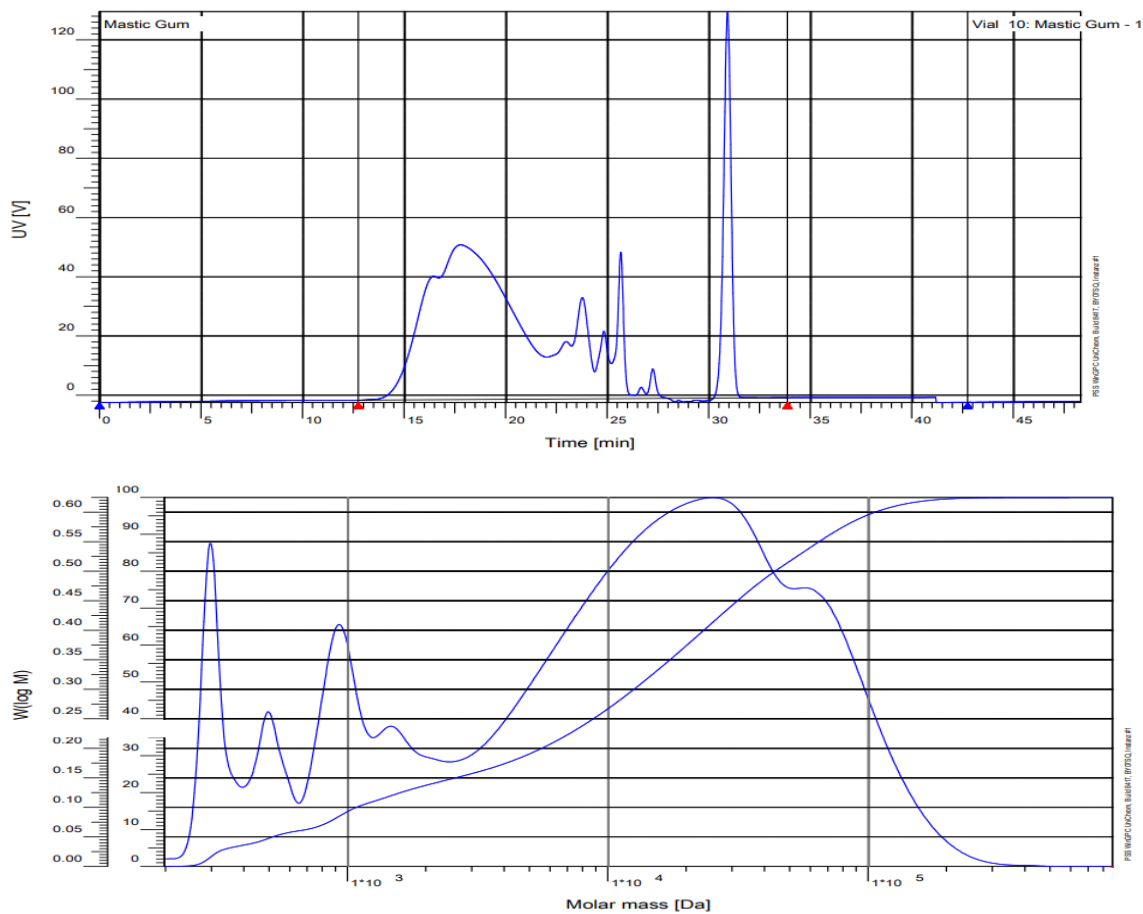
Εικόνα 9: Φάσμα HMBC NMR του πολυμερούς *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκενίου

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για του πολυμερούς

Πίνακας 10: Φασματοσκοπικά δεδομένα του πολυμερούς

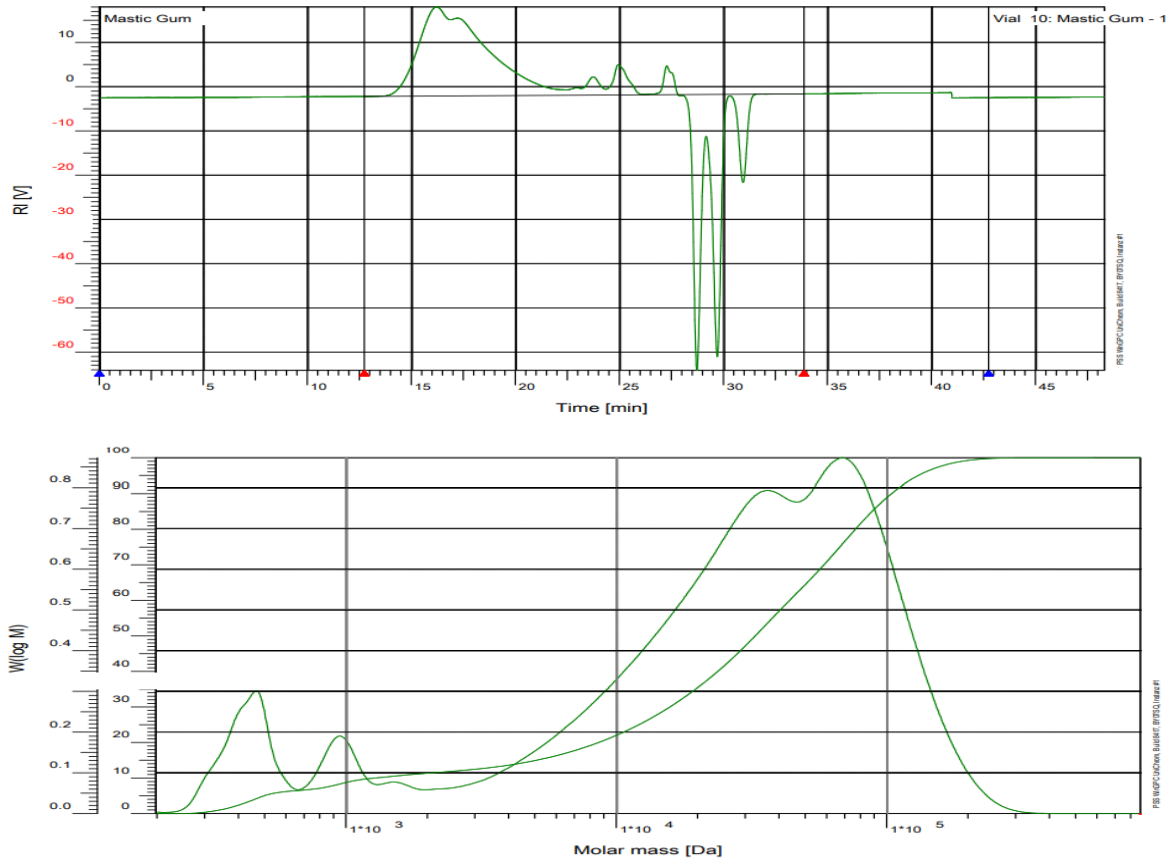
πολυμερές <i>cis</i> -1,4-πολύ-β-μυρκενίο			
	C		H
	ppm	ppm	
1	30.5	2.03	m
2	139.1	-	
3	124.7	5.11	brs
4	27.2	2.03	m
5	37.1	2.03	m
6	27.0	2.03	m
7	124.5	5.11	
8	131.4	-	
9	17.7	1.59	s
10	25.7	1.67	s

Προκειμένου να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος του πολυμερούς και κατ'επέκταση το βαθμό πολυμερισμού, το δείγμα αναλύθηκε με την τεχνική της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού συνδεδεμένης με ανιχνευτή υπερύθρων (SEC-IR) καθώς και ανιχνευτή υπεριόδους-ορατού (SEC-UV-Vis). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι το κλάσμα του πολυμερούς της μαστίχας Χίου αποτελείται από ένα μίγμα μακρομορίων διαφορετικού βαθμού πολυμερισμού και με μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 20.000 και 100.000 Da. Τα χρωματογραφήματα της παραπάνω ανάλυσης καθώς και ο υπολογισμός του MB παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



Detektor	Mn (Da)	Mw (Da)	Mp (Da)	Mz (Da)	Polydispersity
Agilent 1260II UV	2.224	26.618	26.855	73.492	11,9660

Εικόνα 30: Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV



Detektor	Mn (Da)	Mw (Da)	Mp (Da)	Mz (Da)	Polydispersity
Agilent 1260 RI	4.055	45.210	68.723	86.903	11,1502

Εικόνα 31: Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού συνδεδεμένη με ανιχνευτή IR

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη εύρεσης της δομής και του MB του πολυμερούς της PMX πραγματοποιείται για δεύτερη φορά και τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης συμφωνούν πλήρως με αυτά της προηγούμενης μελέτης (106).

2.3.3. Συμπεράσματα

Το σύνολο των εργασιών στις οποίες υποβλήθηκε το πολυμερές απέδειξαν ότι υπάρχει ένας απλός και γρήγορος τρόπος για την παραλαβή του από το σύνολο της PMX χωρίς την κατανάλωση υπέρογκων ποσοτήτων διαλυτών. Επίσης η ανάλυση του πολυμερούς με

φάσματοσκοπία NMR (φάσματα μίας και δύο διαστάσεων) επιβεβαίωσαν την ακριβή δομή του πολυμερούς ώστε μετέπειτα η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού συνδεδεμένη με ανιχνευτές UV και IR υπέδειξαν το μοριακό βάρος το οποίο κυμαίνεται από τα 20.000 μέχρι και τα 100.000 Da.

2.4. Επεξεργασία-Ανάλυση Τριτερπενικού κλάσματος μαστίχας και Απομόνωση ελάσσονων συστατικών

2.4.1. Παραλαβή τριτερπενικού κλάσματος

Για την παραλαβή του τριτερπενικού κλάσματος της μαστίχας οι δοκιμές έγιναν στο κολοφώνιο το οποίο είναι το υποπροϊόν της απόσταξης της μαστίχας για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου. Οπότε είναι απαλλαγμένο από τα πτητικά συστατικά της μαστίχας.

Σε 50 g κολοφωνίου ζυγισμένο σε κωνική φιάλη των 500 ml προστέθηκαν 500 ml DMSO και έγινε ανάδευση του κολοφωνίου στην φιάλη. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη απομάκρυνση των τερπενίων από την ποσότητα του κολοφωνίου. Αφού διαλύθηκε όσο το δυνατόν περισσότερο το κολοφώνιο στο DMSO και πάρθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα των τερπενίων, γίνεται διήθηση υπό κενό στο θολό διάλυμα με το DMSO και έπειτα το υπερκείμενο τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη 1L. Στη διαχωριστική χοάνη προστέθηκε 300 ml H₂O και 300 ml CH₂Cl₂ και σχηματίζεται διφασικό σύστημα. Η κάτω οργανική φάση με το DCM παραλαμβάνεται σε κωνική φιάλη. Στην πάνω υδατική φάση με το H₂O προστίθενται πάλι 300 ml DCM και επανασηματίζεται το διφασικό σύστημα με την κάτω φάση να είναι αυτή του DCM, όπου διαχωρίζεται και συνενώνεται με την προηγούμενη κάτω φάση του διαχωρισμού. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά και πάλι παραλαμβάνεται η κάτω οργανική φάση του DCM και προστίθεται στην κωνική φιάλη με τις προηγούμενες. Το διάλυμα που έχει παραληφθεί με τις συνενωμένες κάτω οργανικές φάσεις του DCM τοποθετείται μέσα σε σφαιρική φιάλη των 500 ml, η οποία έχει προζυγιστεί και οδηγείται στο Rotavapor για συμπύκνωση του διαλύτη. Μετά την ολοκλήρωση της συμπύκνωσης ξαναζυγίζεται η σφαιρική φιάλη. Τα τερπένια της μαστίχας παραλαμβάνονται μετά την συμπύκνωσή τους στο Rota, σε απόδοση 56% στην αρχική μάζα του κολοφωνίου, έχουν άσπρο χρώμα και τυρώδες σχήμα και η οσμή του υλικού πλησιάζει αρκετά αυτήν της μαστίχας.

Πίνακας 11: Παρουσίαση αποτελεσμάτων της διαδικασίας παραλαβής του τριτερπενικού κλάσματος

Αποτελέσματα διαδικασιών παραλαβής του τριτερπενικού κλάσματος	
Σφαιρική φιάλη 500 ml	149,92 g
Σφαιρική φιάλη 500 ml (μετά συμπύκνωσης και παραμονής στην “καμπάνα”)	169,33 g
Βάρος Τερπενίων	19,41 g
Ποσοστό τερπενίων στο αρχικό κολοφώνιο	38,82%
Σφαιρική φιάλη 500 ml (μετά διάλυση με H ₂ O, διήθηση υπό κενό, συμπύκνωση και παραμονή στην “καμπάνα”)	177,92 g
Βάρος Τερπενίων	28 g
Ποσοστό τερπενίων στο αρχικό κολοφώνιο	56%

2.4.2. Κλασμάτωση Τριτερπενικού κλάσματος με *ph-zone/step gradient* μέθοδο στο CPC

Στην ενότητα αυτή γίνεται περιγραφή της χρωματογραφικής ανάλυσης του τριτερπενικού κλάσματος της μαστίχας μέσω της μεθόδου FCPC, με απώτερο σκοπό την αρχική κλασμάτωση του δείγματός μας πριν την απομόνωση και ταυτοποίηση των σημαντικότερων δευτερογενών μεταβολιτών. Το υλικό κλασματώθηκε με συνδυασμό των μεθόδων μεταβαλλόμενου pH/βαθμιδωτής έκλουσης εξώθησης (*ph-zone refining/step-gradient elution extrusion*).

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Kromaton, Motor Power 0.75 kW, Electrical Input 110/220V, ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε παρασκευαστική στήλη (1000 ml). Η ροή των διαλυτών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια αντλίας LabAlliance ενώ η συλλογή των κλασμάτων έγινε με την βοήθεια του αυτόματου συλλέκτη Buchi B684.



Εικόνα 31: Χρωματογράφος FCPC Kromaton

- Επιλογή της κατάλληλης σειράς διφασικών συστημάτων:

Η επιλογή της κατάλληλης σειράς διφασικών συστημάτων αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην διαδικασία της ανάλυσης του εκχυλίσματος με την μέθοδο CPC. Για να επιτευχθεί αυτό μελετήθηκαν βάση βιβλιογραφίας και προγενέστερης εμπειρίας του εργαστηρίου στο συγκεκριμένο αντικείμενο, διαφορά συστήματα διαλυτών παρουσία του εκχυλίσματος ώστε να επιλεγεί το καταλληλότερο. Για το συγκεκριμένο πείραμα θεωρήθηκε ως κατάλληλη η σειρά συστημάτων που έχει αναφερθεί παλαιότερα σε ίδιο πείραμα και έτσι αφού ελέγχθηκε για την εγκυρότητά της χρησιμοποιήθηκε ως έχει:

	n-Hex	EtOAc	EtOH	H ₂ O
1^ο σύστημα	8	2	5	5
2^ο σύστημα	8	2	7	3
3^ο σύστημα	8	2	8	2
4^ο σύστημα	8	2	9	1

Οι διαλύτες υπολογίστηκαν σε αναλογία για όγκο 4 L:

	n-Hex	EtOAc	EtOH	H ₂ O
1° σύστημα	1600	400	1000	1000
2° σύστημα	1600	400	1400	600
3° σύστημα	1600	400	1600	400
4° σύστημα	1600	400	1800	200

- Εκτέλεση διαχωρισμού:

Η σειρά διφασικών συστημάτων εφαρμόστηκε σε καθοδική λειτουργία αντίστροφης φάσης (περιγραφή της αντίστροφης φάσης) χρησιμοποιώντας ως πρώτη μέθοδο κλασμάτωσης αυτήν του μεταβαλλόμενης ζώνης pH και έχοντας ως στατική την πάνω φάση (οργανική φάση) και ως κινητή την κάτω φάση (υδατική φάση) του συστήματος. Για την κλασμάτωση με την μέθοδο του μεταβαλλόμενου pH χρησιμοποιήθηκαν 100 mM τριφθοροξικό οξύ (TFA) στην στατική φάση και 80 mM τριαιθανολαμίνη (TEA) στην κινητή φάση. Η ένεση έγινε με την μέθοδο sandwich εισάγοντας 1200 ml πρώτα της στατικής φάσης μαζί με το TFA, οπότε στην ουσία εξωθώντας το διάλυμα αποθήκευσης από τη στήλη με στροφές στα 200 rpm. Αφού ογκομετρήθηκε το διάλυμα που βγήκε από τη στήλη στα 1200 ml περίπου, τότε αυξάνεται η ταχύτητα της στήλης σε 650 rpm και γίνεται ένεση στο loop της στήλης με 7 g του δείγματος διαλυμένο σε σύστημα 20 ml πάνω φάσης και 10 ml κάτω φάσης. Οι ποσότητες του TFA και TEA που χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα ήταν 52 και 74 ml TEA αντίστοιχα, ενώ η πίεση κατά τη διάρκεια του μεταβαλλόμενου pH καταγράφηκε στα 450 με 475 psi.

Αφού αφεθούν 110 ml διαλύματος να εξέρθουν από την στήλη του μηχανήματος, ώστε να περιθωριοποιηθούν οι πιθανότητες σφάλματος της διαδικασίας, τότε ξεκινάει η συλλογή των κλασμάτων της χρωματογραφίας. Συλλέγονται 50 κλάσματα σε σωληνάκια των 20 ml και επειδή έχει θεωρηθεί ότι έχει διαχωριστεί ένας όγκος στήλης, σε αυτό το σημείο η μέθοδος διαχωρισμού γίνεται με την τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης οπότε εισάγεται στη στήλη η κινητή φάση EtOH/H₂O σε αναλογία 7:3. Αφού συλλεχθούν τα επόμενα 50 σωληνάκια, τότε

αλλάζει η κινητή φάση που περνάει από τη στήλη σε αναλογία 8:2, ώστε να μειωθεί η πολικότητα του διαλύματος που διαπερνάει την στήλη. Έπειτα αφού συλλεχθούν πάλι τα επόμενα 50 σωληνάκια, αλλάζει η αναλογία της κινητής φάσης σε 9:1, και μειώνεται εκ νέου η πολικότητα της κινητής που παρασύρει τις ουσίες. Τελικά, εφαρμόζεται η μέθοδος της εξώθησης με την χρήση της στατικής φάσης (extrusion), εφού αφήνεται να εξέρθει μόνη της ώστε να συμπαρασύρει τα συστατικά που έχουν δεσμευθεί πάνω της και να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός. Μετά το πέρας το διαχωρισμού, αφού απενεργοποιηθούν όλα τα υπομέρη του συστήματος, ειέρχεται στην στήλη το διάλυμα αποθήκευσης EtOH/H₂O -> 50/50. Συνολικά συλλέχθηκαν 270 κλάσματα των 20 ml. Οι παράμετροι και οι συνθήκες του διαχωρισμού παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12: Παρουσίαση της μεθόδου της χρωματογραφίας κατ'αντιρροή για την κλασμάτωση του τριτερπενικού κλάσματος

Παράμετροι	Λεπτομέρειες
Όγκος στήλης	1000 mL
Μέθοδος λειτουργίας	Descending mode: Στατική φάση: πάνω φάση (n-Hexane/EtOAc) Κινητή φάση: κάτω φάση (EtOH/H ₂ O)
Μέθοδος κλασμάτωσης	pH zone/step-gradient/elution extrusion
Ροή (mL/min)	Κατά την πλήρωση της στήλης με στατική φάση η ροή ρυθμίστηκε στα 15 mL/min. Κατά την διάρκεια του πειράματος η ροή διατηρήθηκε στα 15 mL/min.
Ταχύτητα περιστροφής	Η ταχύτητα περιστροφής της στήλης ρυθμίστηκε στις 200 rpm (ελάχιστη περιστροφή) ώστε να πληρωθεί η στήλη με στατική φάση. Όταν έγινε η ένεση του δείγματος και έπειτα για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των ουσιών αυξήθηκε στα 650 rpm.
Κλάσματα	240 των 20 ml

Τα αρχικά κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με κανονικής φάσης TLC (Silica gel 60 F₂₅₄-Mer) σύστημα ανάπτυξης Toluene: EtOAc: Acetic Acid :Formic Acid (30:70:11:11). Με βάση το χρωματογράφημα TLC έγιναν οι απαραίτητες συνενώσεις απ' όπου καταλήξαμε σε 20 συνολικά κλάσματα τα οποία συμπυκνωθήκαν μέχρις ξηρού και υπολογιστικέ το ακριβές βάρος τους. Ο ακόλουθος πίνακας παρέχει τα δεδομένα.

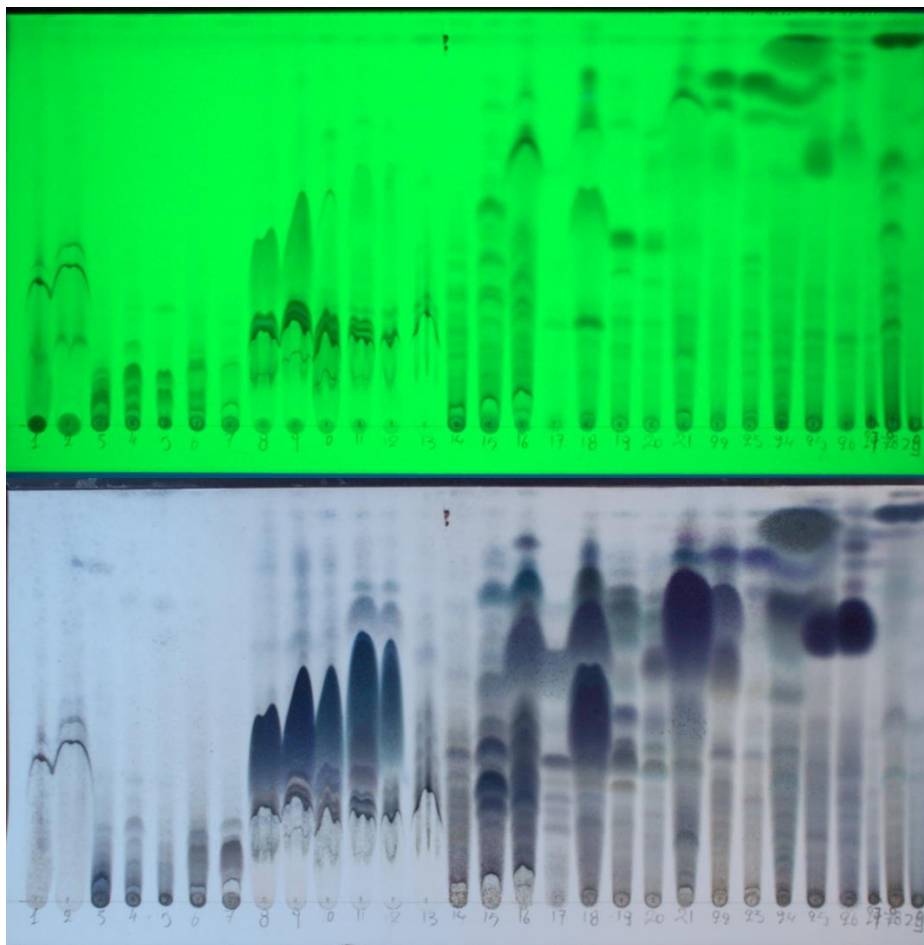
Πίνακας 13: Βάρη των συνενωμένων κλασμάτων μετά την διαδικασία της κλασμάτωσης του τριτερπενικού κλάσματος

Κλάσματα	Κωδικός	Βάρος
11-20	Fr. 1	0.428 g
21-32	Fr. 2	0.404 g
33-47	Fr. 3	0,21 g
48-62	Fr. 4	0,17 g
63-74	Fr. 5	0,019 g
75-88	Fr. 6	0,088 g
89-98	Fr. 7	0,15 g
99-101	Fr. 8	0,75 g
102-106	Fr. 9	1,14 g
107-109	Fr. 10	0,8 g
110-111	Fr. 11	0,6 g
112-113	Fr. 12	0,69 g
114-117	Fr. 13	0,53 g
118-124	Fr. 14	0,04
125-135	Fr. 15	0,08 g
136-146	Fr. 16	0,077 g
147-148	Fr. 17	0,014 g
149-159	Fr. 18	0,16 g
160-164	Fr. 19	0,001 g
165-170	Fr. 20	0,032 g

171-183	Fr. 21	0,09 g
184-198	Fr. 22	0,05 g
199-202	Fr. 23	0,019 g
203-210	Fr. 24	0,21 g
211-220	Fr. 25	0,11 g
221-229	Fr. 26	0,053 g
230-236	Fr. 27	0,013 g
237-250	Fr. 28	0,046 g
251-260	Fr. 29	0,026 g

2.4.3. Ανάλυση κλασμάτων CPC και ταυτοποίηση των κύριων μεταβολιτών του τριτερπενικού κλάσματος

Τα συνενωμένα κλάσματα επεξεργάστηκαν εκ νέου με TLC κανονικής φάσης και σύστημα διαλυτών ανάπτυξης DCM:MeOH ->98:2 όπου για 50 ml οι ποσότητες υπολογίστηκαν αναλογικά 49:1 ml. Επίσης μελετήθηκαν τόσο στο υπεριώδες (254 και 366 nm) όσο και στο ορατό με ψεκασμό διαλύματοςθειικής βανιλίνης και έπειτα θέρμανση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες



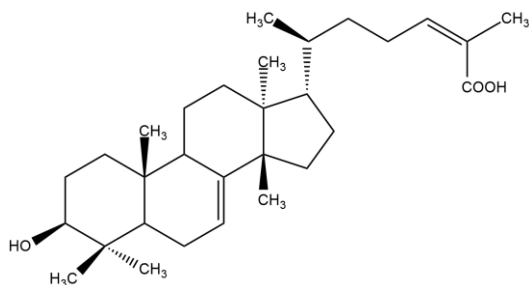
Εικόνα 33: TLC συνενωμένων κλασμάτων της μεθόδου του CPC στα 254 nm και στο ορατό (Vis)

Η ανάλυση με την τεχνική της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας (TLC) των συνενωμένων κλασμάτων του τριτερπενικού κλάσματος της PMX όπως φαίνεται παραπάνω απέδειξε ότι ο συνδυασμός των μεθόδων κλασμάτωσης μεταβαλλόμενης ζώνης pH και βαθμιδωτής έκλουσης κατάφερε να οδηγήσει σε επιτυχή διαχωρισμό των τριτερπενίων σε όξινα και ουδέτερα. Έτσι ήταν δυνατή η μελέτη και ανάλυση ξεχωριστά του όξινου και ουδέτερου μέρους των τριτερπενίων.

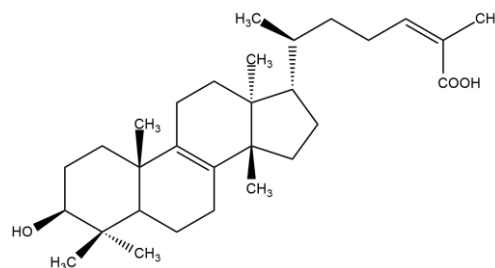
Έπειτα από την μελέτη της ανάλυσης της Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας (TLC) ακολούθησε η λήψη φασμάτων NMR (Μίας και δύο διαστάσεων) και μάζας (MS/MS) για την ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των δομών κυρίων και δευτερευόντων μεταβολιτών.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$, όπως και φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) έγινε σε φασματογράφο Bruker Avance III 600 (600 MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλή) και $multi$ (πολλαπλή), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3).

Το **κλάσμα 7 (CPC_Fr.7)** εμφάνισε μια κύρια κηλίδα στο χρωματογράφημα TLC. Η φασματοσκοπική ανάλυση που ακολούθησε (NMR) έδειξε ότι πρόκειται για μίγμα δύο ισομερών ενώσεων, του **μαστιχαδιενολικού** και **ισομαστιχαδιενολικού οξέος**.

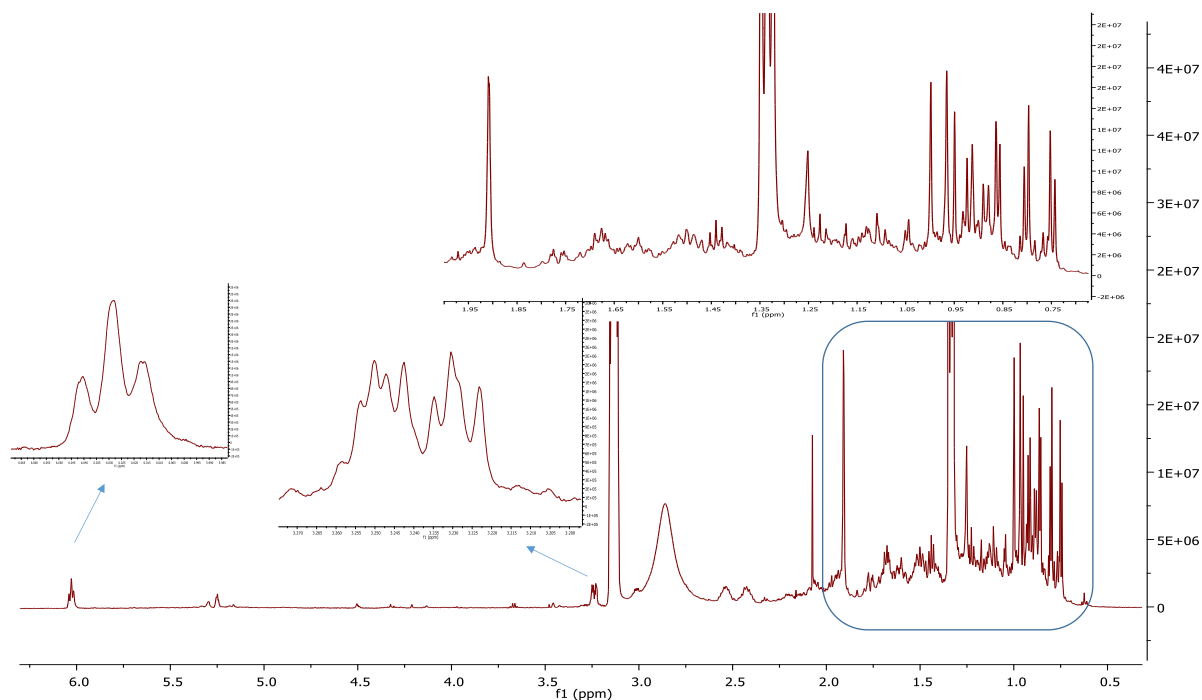


Μαστιχαδιενολικό οξύ



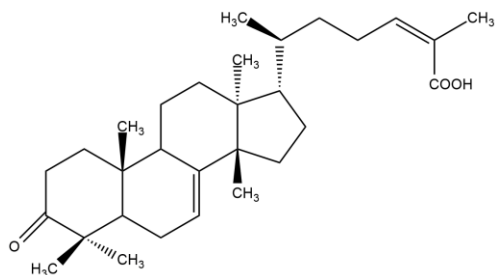
Ισομαστιχαδιενολικό οξύ

Το **μαστιχαδιενολικό** και **ισομαστιχαδιενολικό οξύ** είναι τετρακυκλικά τριτερπένια που ανήκουν στο όξινο κλάσμα της ρητίνης. Πρώτη φορά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τον *Barton* και τους συνεργάτες του (46) ενώ η ύπαρξή τους περιγράφεται και στις ρητίνες άλλων δέντρων του γένους *Pistacia* (*P. Vera*, *P. terebintha*, *P. atlantica*) (52,102). Έχουν δράση αντιφλεγμονώδη κυτταροτοξική και αντιμικροβιακή (102,107).

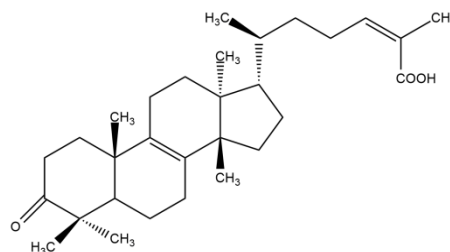


Εικόνα 34: Φάσμα πρωτονίου $1H-NMR$ του μίγματος μασιχαδιενονικού και ισομασιχαδιενονικού οξέος

Το κλάσμα 9 (CPC_Fr.9) εμφάνισε επίσης μια κύρια κηλίδα στο χρωματογράφημα TLC ενώ η φασματοσκοπική ανάλυση (NMR, MS/MS) έδειξε ότι πρόκειται για μίγμα των ισομερών μασιχαδιενονικό και ισομασιχαδιενονικό οξύ.



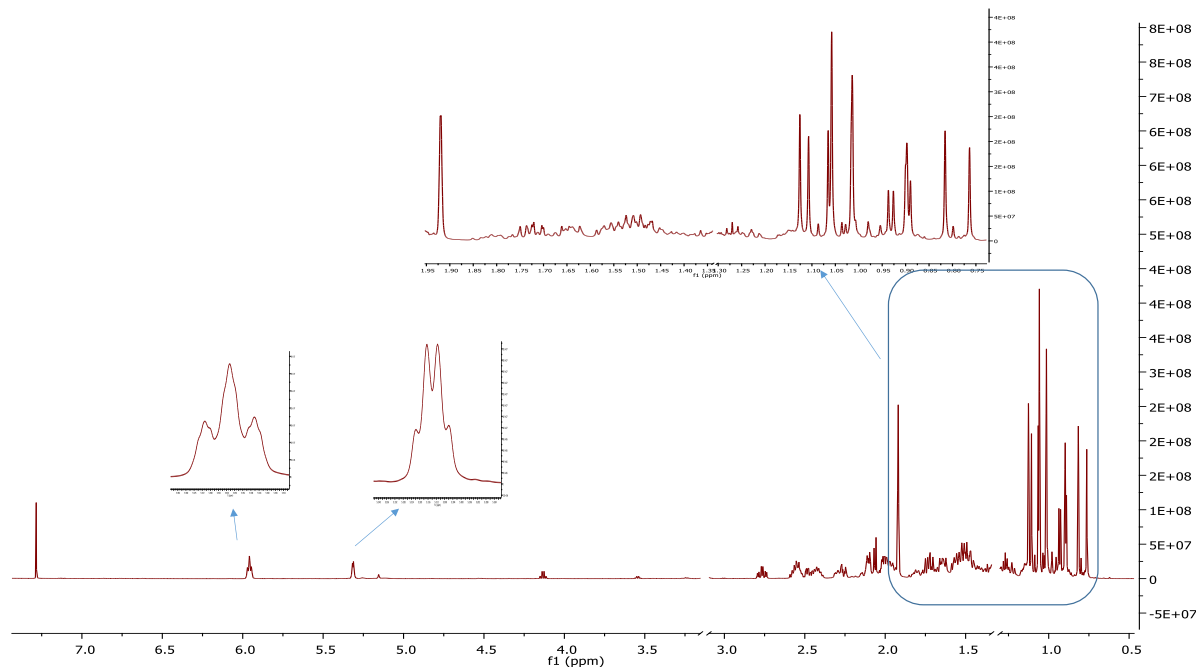
Μασιχαδιενονικό οξύ



Ισομασιχαδιενονικό οξύ

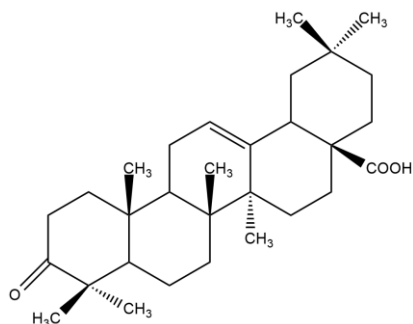
Το μασιχαδιενονικό οξύ και ισομασιχαδιενονικό οξύ είναι όξινα τετρακυκλικά τριτερπένια και είναι από τα κύρια συστατικά του όξινου κλάσματος της ρητίνης (βρίσκονται σε ποσοστά 12 % w/w) (45). Πρώτη φορά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τους *Barton* και *Seoane* (46) ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί και πιο πρόσφατα και από άλλους ερευνητές

(44). Είναι από τα πολυτιμότερα συστατικά της ρητίνης της μαστίχας καθώς έχουν αντιφλεγμονώδη, κυτταροτοξική και αντιμικροβιακή δράση (102,107).



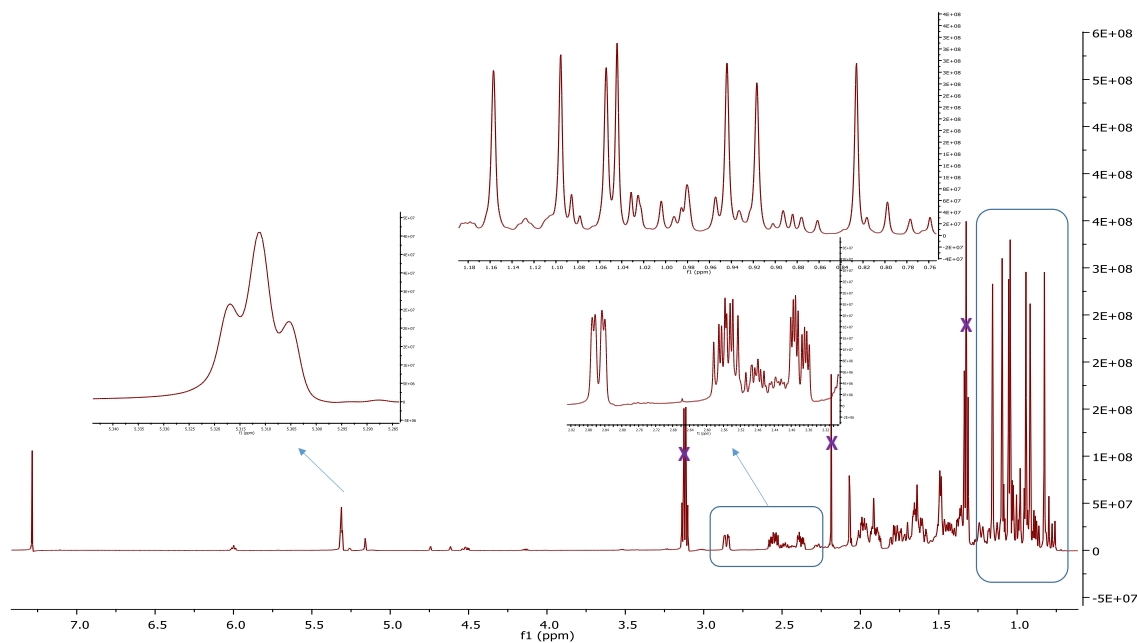
Εικόνα 35: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ του μίγματος μασιχαδιενονικού και ισομασιχαδιενονικού οξέος

Το **κλάσμα 11 (CPC_Fr.11)** εμφανίζει μία κύρια απορρόφηση στο χρωματογράφημα TLC και μετά από φασματοσκοπική ανάλυση(NMR,MS/MS) ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι είναι το **ολεανονικό οξύ**



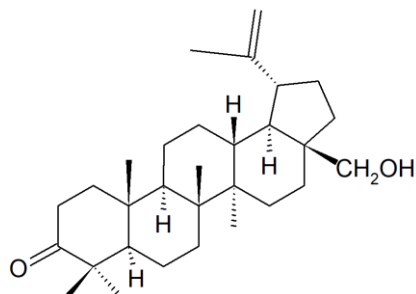
Το **ολεανονικό οξύ** είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο που απαντάται σε πολλά φυτά. Ανήκει στο όξινο κλάσμα της ρητίνης της μαστίχας και από τη ρητίνη της μαστίχας Χίου

απομονώθηκε πρώτη φορά από τον *Seoane et. al.*(108). Αποτελεί ένα από τα πιο κύρια συστατικά του τριτερπενικού κλάσματος (6 %) και έχει πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων και είναι ένα πολύτιμο φυσικό προϊόν το οποίο περιέχεται στη μαστίχα. Στο παρελθόν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη στην ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου με σκοπό τον ποιοτικό έλεγχο της μαστίχας της Χίου με τη μέθοδο της HPLC συζευγμένης με UV ανιχνευτή (51). Έχει δράση αντιφλεγμονώδη, αντιπαρασιτική, εντομοκτόνο, ανασταλτική επί της σύνθεσης των λευκοτριενίων, τονωτική των μυών της μήτρας, και κυτταροτοξική.



Εικόνα 36: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ του ολεανονικού οξέος

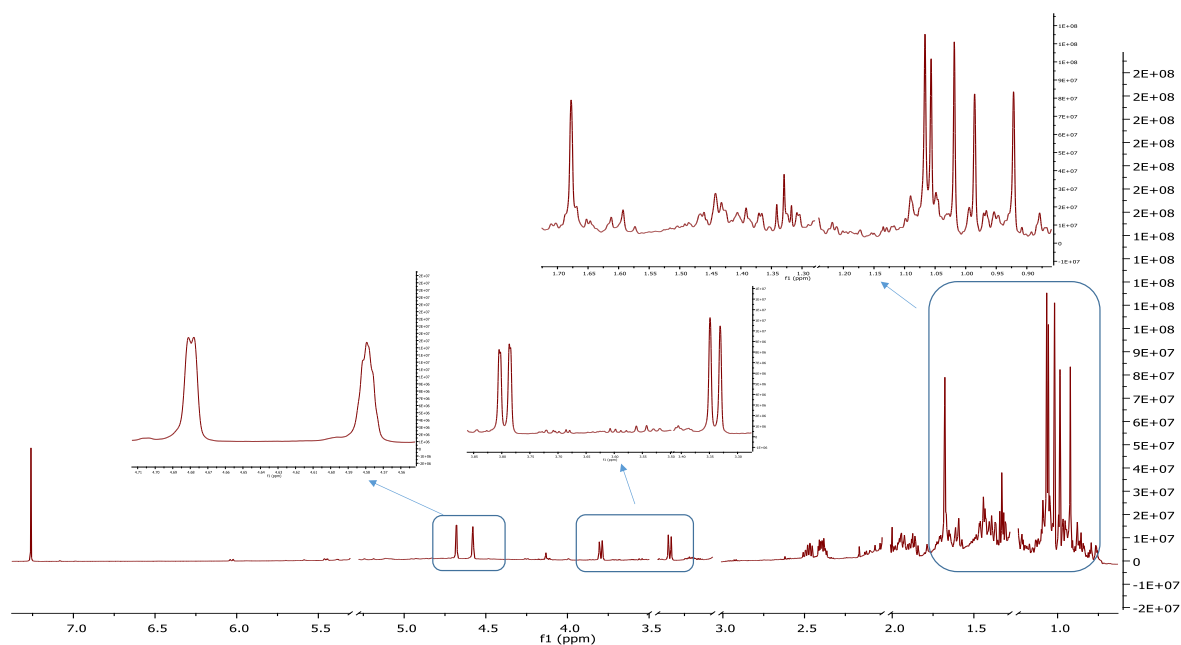
Το **κλάσμα 16 (CPC_Fr.16)** εμφανίζει μία κύρια κηλίδα στο χρωματογράφημα TLC και έπειτα από φασματοσκοπική ανάλυση(NMR,MS/MS) (μίας και δύο διαστάσεων)ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι είναι η **μπετουλόνη**.



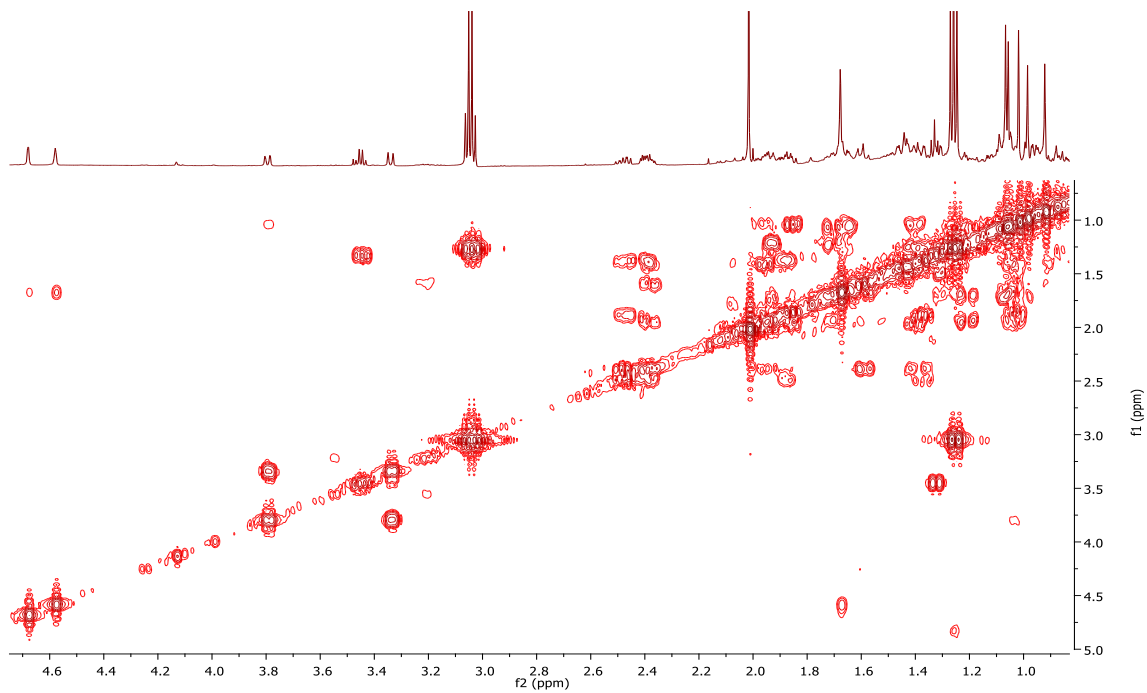
Η **μπετουλόνη** είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο το οποίο δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν σαν συστατικό της ρητίνης της μαστίχας, αλλά υπάρχουν αναφορές που την κατατάσσουν στα συστατικά του φλοιού του *Betula Alleghaniensis* (109) και της *Belamcanda chinensis*(110).

Λόγω της μη ύπαρξης αναφοράς στη βιβλιογραφία παλαιότερα σαν συστατικό της ρητίνης της μαστίχας θεωρείται ότι αποτελεί καινούριος μεταβολίτης της μαστίχας της Χίου.

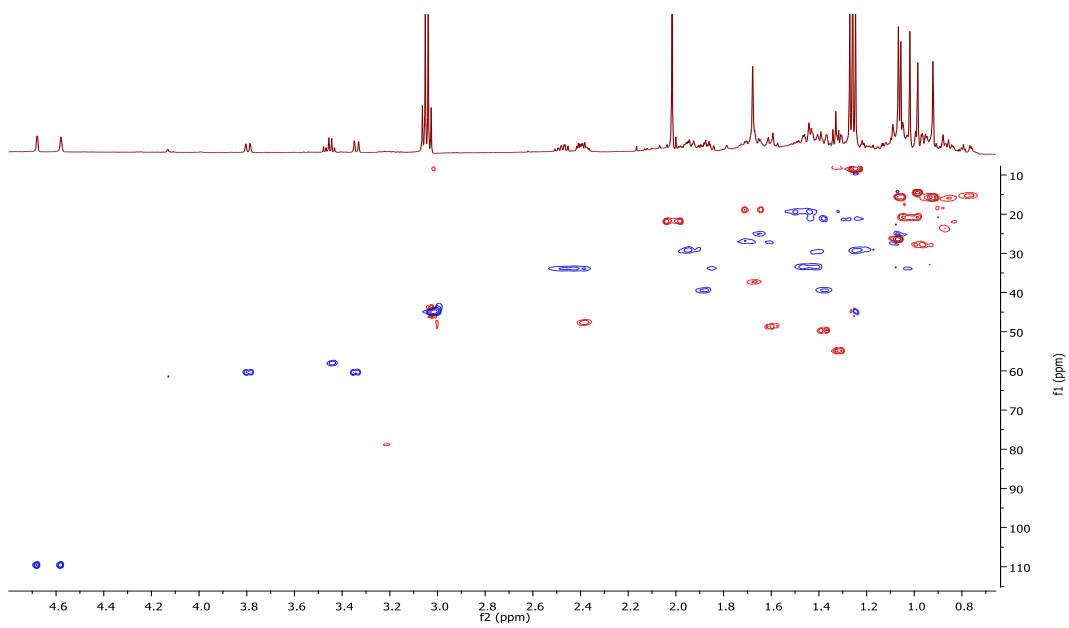
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων ($^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



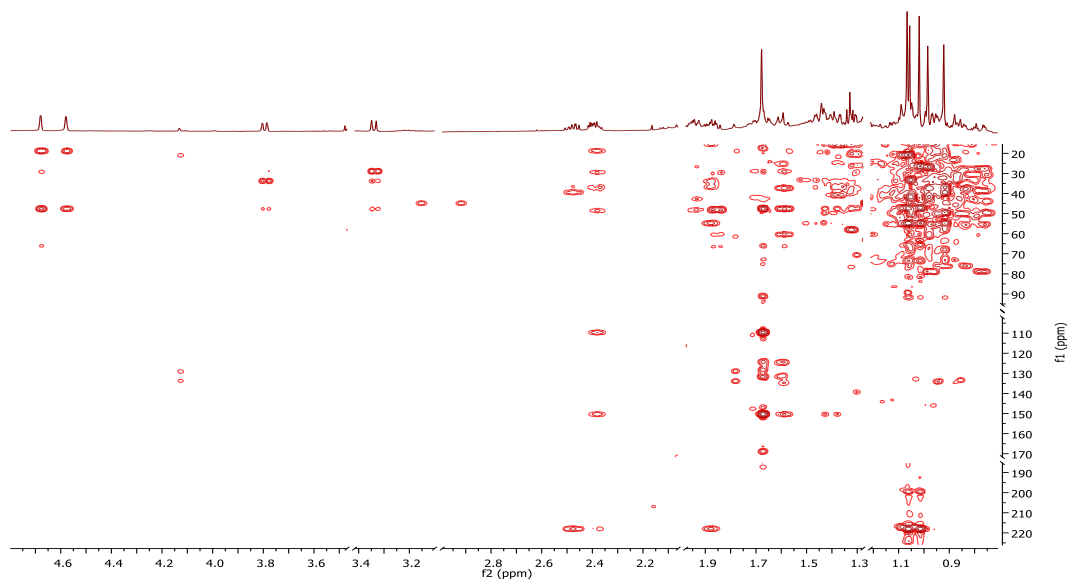
Εικόνα 37: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της μπετουλόνης



Εικόνα 38: Φάσμα COSY της μπετουλόνης



Εικόνα 39: Φάσμα HSQC-DEPT της μπετουλόνης



Εικόνα 40: Φάσμα HMBC NMR της μεπετουλόνης

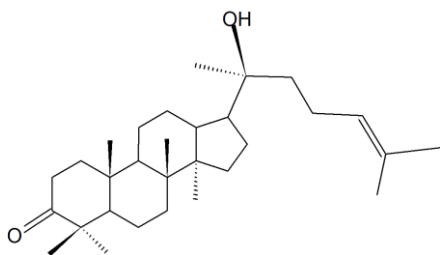
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για την μεπετουλόνη

Πίνακας 14: Φασματοσκοπικά δεδομένα της μεπετουλόνης

Μπετουλόνη			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	39.4	1.88	1H, m
1b		1.38	1H, m
2a	34.1	2.47	1H, m
2b		2.39	1H, m
3	218.5	-	
4	47.4	-	
5	54.9	1.32	1H, m
6a	19.5	1.49	1H, m
6b		1.43	1H, m
7	33.5	1.44	2H, m
8	40.9	-	
9	49.8	1.37	1H, m
10	36.9	-	
11a	21.2	1.41	1H, m
11b		1.27	1H, m
12a	25.1	1.65	1H, m

12b		1.07	1H, m
13	37.4	1.67	1H, m
14	42.8	-	
15	27.0	1.70	2H, m
16a	29.2	1.95	1H, m
16b		1.24	1H, m
17	47.8	-	
18	48.7	1.59	1H, m
19	47.8	2.38	1H, m
20	150.4	-	
21a	29.6	1.95	1H, m
21b		1.40	1H, m
22a	33.9	1.85	1H, m
22b		1.05	1H, m
23	26.5	1.07	3H, s
24	20.9	1.01	3H, s
25	15.8	0.91	3H, s
26	15.8	1.05	3H, s
27	14.6	0.99	3H, s
28 α	60.5	3.79	d, J = 11.1 Hz
28 β		3.34	d, J = 11.1 Hz
29 α	109.8	4.68	brs
29 β		4.58	brs
30	18.9	1.67	3H, s

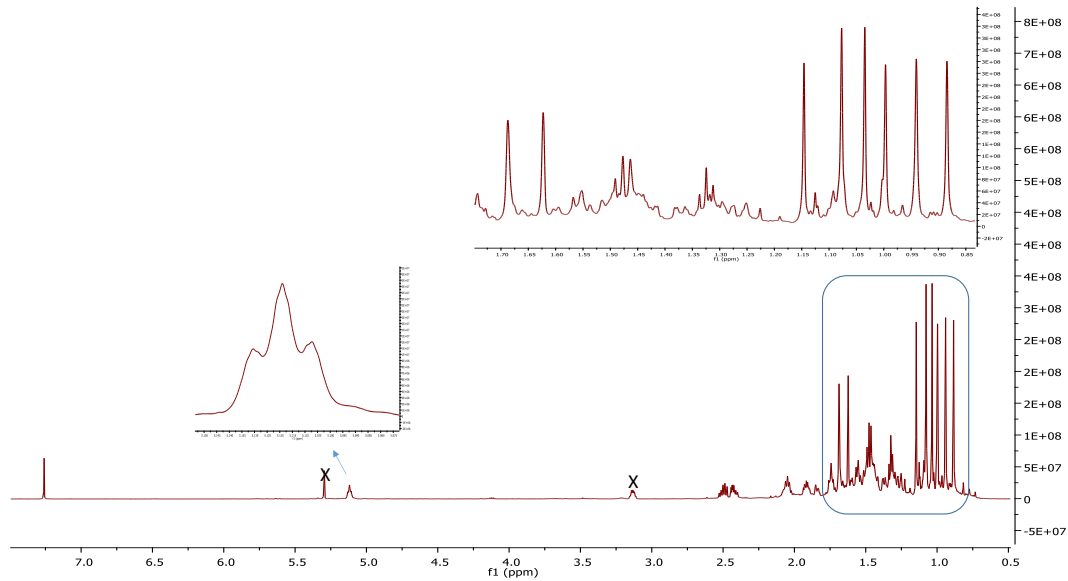
Το **κλάσμα 21 (CPC_Fr.21)** στο χρωματογράφημα TLC φαίνεται να εμφανίζει μία κύρια απορρόφηση που μετά από φασματοσκοπική ανάλυση(NMR,MS/MS)(μίας και δύο διαστάσεων) βρέθηκε ότι είναι η **διπτεροκαρπόλη**.



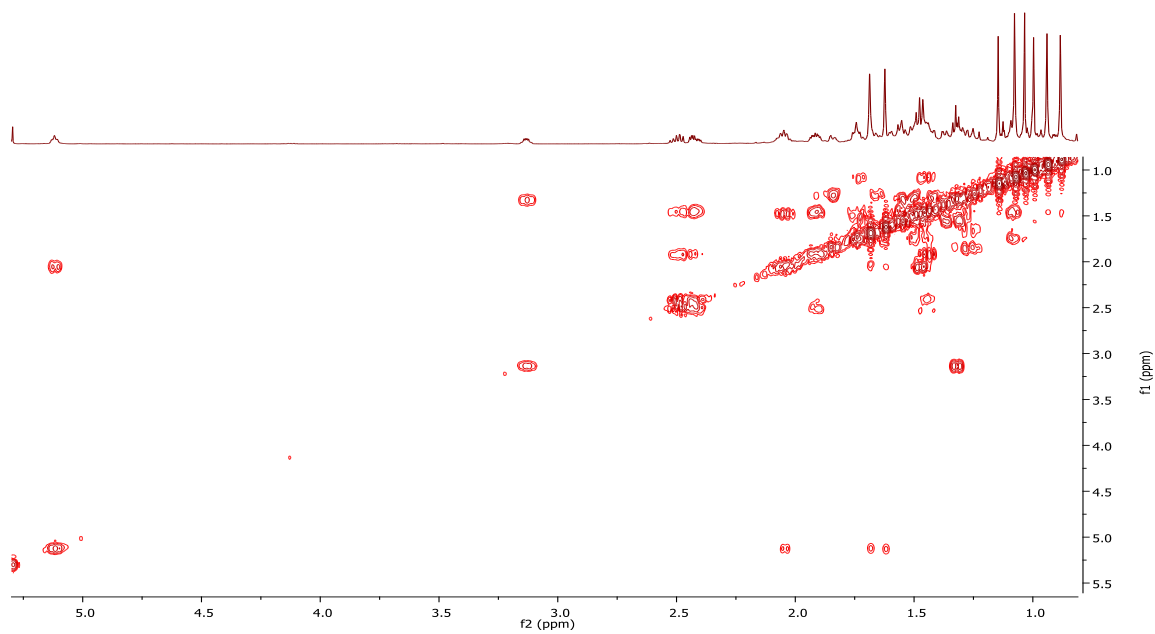
Η **διπτεροκαρπόλη** είναι ένα τετρακυκλικό τριτερπένιο που ανήκει στο μη όξινο κλάσμα της ρητίνης της μαστίχας. Έχει αναφερθεί πρώτη φορά από τον *Josef F.* και τους συνεργάτες του (111) από τους οποίους έχει ταυτοποιηθεί με την μέθοδο του GC-MS μαζί με άλλα ουδέτερα συστατικά του τριτερπενικού κλάσματος. Επίσης έχει ταυτοποιηθεί και πιο πρόσφατα και από άλλους ερευνητές με την ίδια μέθοδο (45,52).

Η ταυτοποίησή του πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (1D,2D) καθώς και σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με αυτά της βιβλιογραφίας (112).

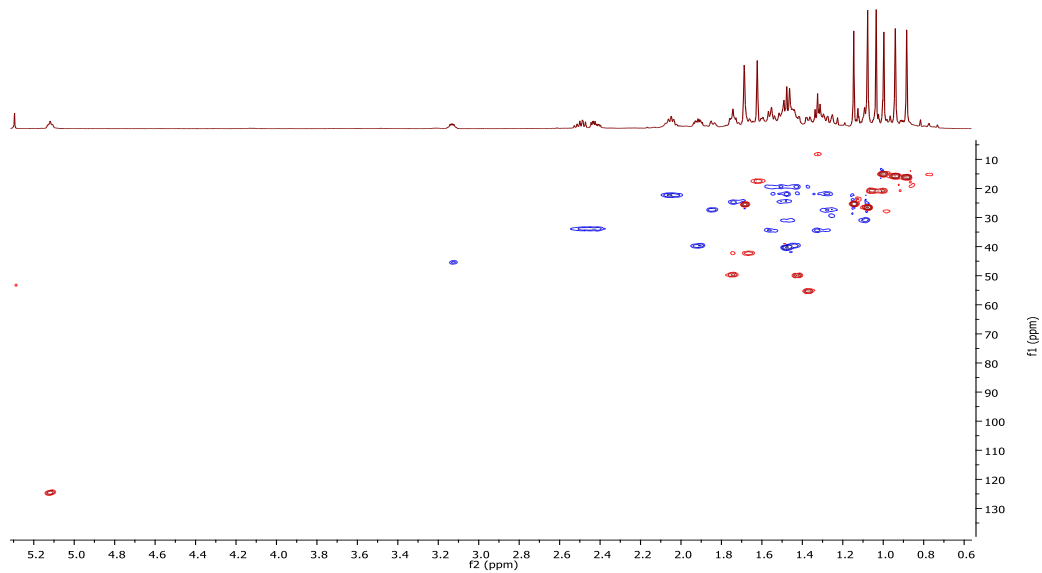
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων (1H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλεία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



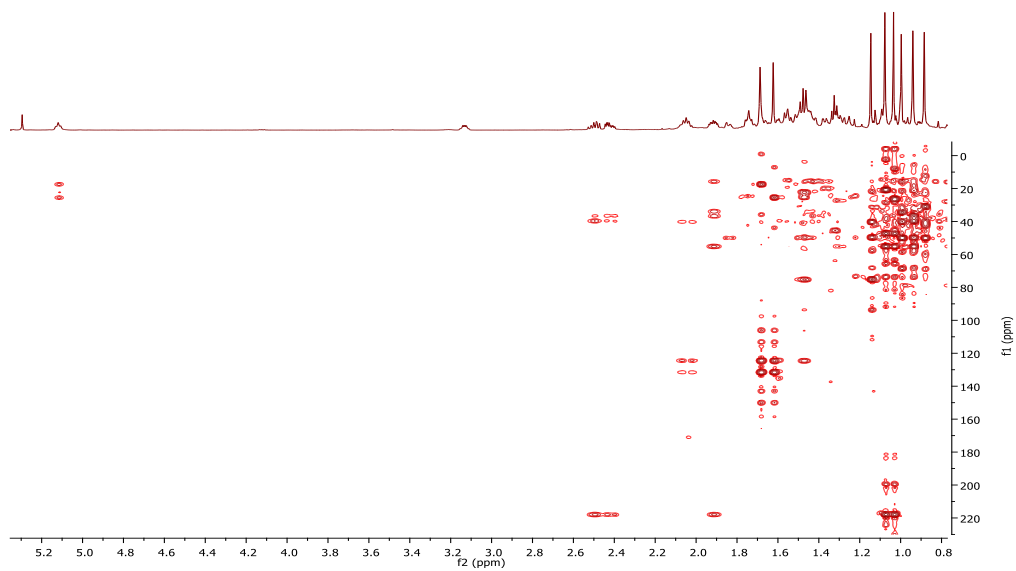
Εικόνα 41: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της διπτεροκαρπόλης



Εικόνα 42: Φάσμα COSY της διπτεροκαρπόλης



Εικόνα 43: Φάσμα HSQC-DEPT της διπτεροκαρπόλης



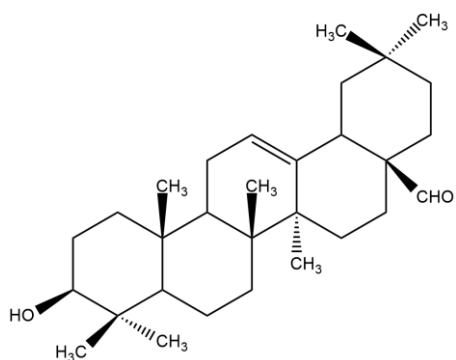
Εικόνα 44: Φάσμα HMBC NMR της διπτεροκαρπόλης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για την διπτεροκαρπύλη

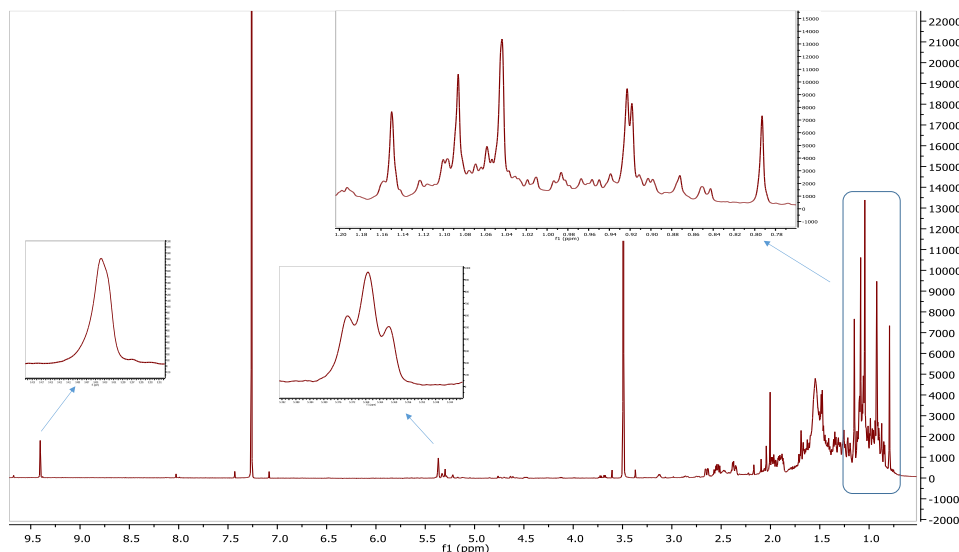
Πίνακας 15: Φασματοσκοπικά δεδομένα της διπτεροκαρπύλης

Διπτεροκαρπύλη			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	39.7	1.91	1H, m
1b		1.44	1H, m
2a	34.0	2.48	1H, m
2b		2.42	1H, m
3	219.1	-	
4	47.3	-	
5	55.3	1.37	
6a	34.4	1.56	1H, m
6b		1.32	1H, m
7a	34.5	1.54	1H, m
7b		1.30	1H, m
8	40.2	-	
9	49.9	1.43	1H, m
10	36.5	-	
11			
12			
13			
14	50.0	-	
15			
16			
17	49.7	1.74	1H, m
18	15.9	0.93	3H, s
19	15.2	1.00	3H, s
20	75.2	-	
21	25.4	1.14	3H, s
22	40.3	1.47	2H, m
23	22.4	2.05	2H, m
24	124.6	5.12	1H, t (7.3 Hz)
25	131.6	-	
26	25.6	1.68	3H, s
27	17.5	1.62	3H, s
28	26.6	1.07	3H, s
29	21.0	1.03	3H, s
30	16.2	0.88	3H, s

Το κλάσμα 24 (CPC_Fr.24) εμφανίζει μία κύρια κηλίδα στο χρωματογράφημα. Έπειτα από φασματοσκοπική ανάλυση (NMR) ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι είναι η **ολεανονική αλδεΰδη**

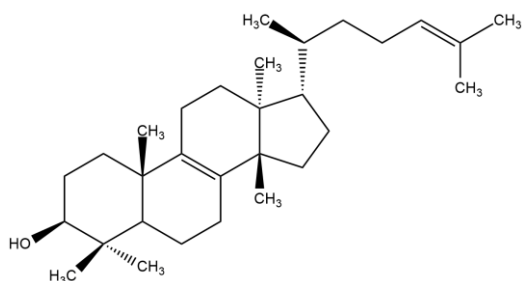


Η **ολεανονική αλδεΰδη** αποτελεί συστατικό του ουδέτερου μέρους του τριτερπενικού κλάσματος και είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο. Έχει ταυτοποιηθεί μαζί με άλλα έξι ουδέτερα συστατικά του τριτερπενικού κλάσματος της μαστίχας από τους *Marnier et. al.* (111) με τη μέθοδο του GC-MS. Η ύπαρξη της έχει αναφερθεί στην *Pistacia Vera* και στην *Pistacia Terebinthus* και δεν αναφέρονται στην βιβλιογραφία σαφείς βιολογικές δράσεις.

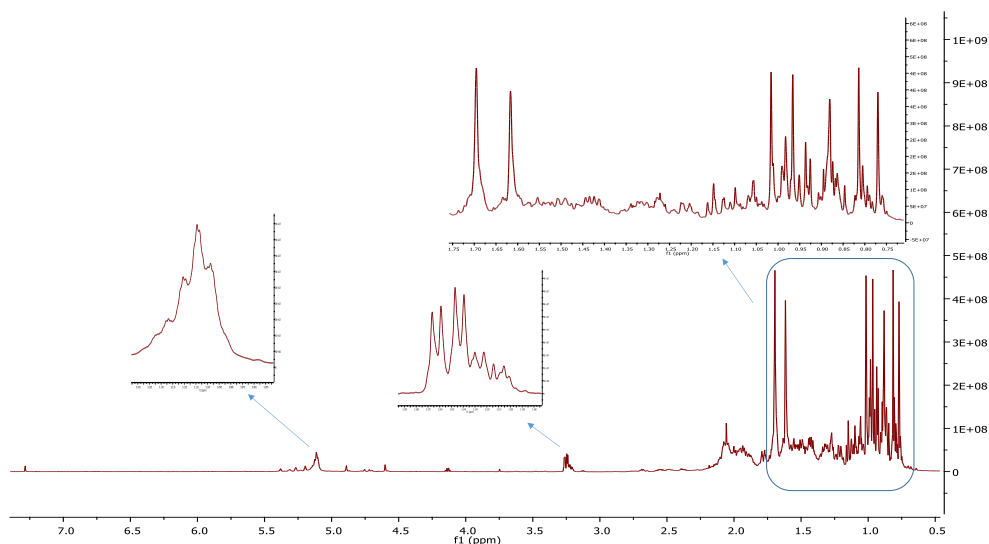


Εικόνα 45: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της ολεανονικής αλδεΐδης

Το κλάσμα **26 (CPC_Fr.26)** παρουσιάζει στη χρωματογραφία TLC μία κύρια μεγάλη απορρόφηση που έχει το σχήμα μίας μεγάλης κηλίδας. Ταυτοποιήθηκε μετά από φασματοσκοπική ανάλυση(NMR) και είναι η **τιρουκαλόλη**.



Η **τιρουκαλόλη** αποτελεί γνωστό συστατικό του ουδέτερου μέρους του τριτερπενικού κλάσματος της ρητίνης της μαστίχας και είναι ένα τετρακυκλικό τριτερπένιο. Έχει απομονωθεί πρώτη φορά από τους *Barton και Seoane* (34) με χρωματογραφία στήλης και σε μετέπειτα χρόνο έχει ταυτοποιηθεί και απομονωθεί και από άλλους ερευνητές (102,111). Αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του ουδέτερου τριτερπενικού κλάσματος και έχει ταυτοποιηθεί και στην ρητίνη των *Pistacia terebinthus* και *Pistacia Vera*. Έχει αντιφλεγμονώδη δράση και ειδικά επί των ανθρώπινων αρτηκών ενδοθηλιακών κυττάρων (113).



Εικόνα 46: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της τρουκαλόλης

2.4.4. Απομόνωση και ταυτοποίηση ελασσόνων συστατικών

- Παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (prepHPLC) στο κλάσμα 4

Για τους σκοπούς της απομόνωσης και της ταυτοποίησης πραγματοποιείται prep-HPLC στο κλάσμα 4. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το όργανο Thermo Finnigan, με αντλία SpectraSystem P4000, απαερωτή SpectraSystem 1000, αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000, στήλη Supelcosil LC-18 διαστάσεων 25cm x 21.2 mm i.d., 5.0 μm και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (PDA) SpectraSystem UV6000LP. Παρακάτω φαίνεται το χρωματογράφημα της μεθόδου της prep-HPLC όπου σημειώνονται οι κορυφές στις οποίες φαίνεται να έχουν απορρόφηση κάποιοι μεταβολίτες

Παρακάτω παρουσιάζονται οι συνθήκες της βαθμιδωτής έκλουσης της παρασκευαστικής-HPLC.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το όργανο Thermo Finnigan, με αντλία SpectraSystem P4000, απαερωτή SpectraSystem 1000, αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000, στήλη Fortis C-18 διαστάσεων 25cm x 10mm i.d., 5.0 μm και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (PDA) SpectraSystem UV6000LP.

Πραγματοποιήθηκαν οκτώ διαδοχικές ενέσεις των 200 μl στην prep-HPLC για το κλάσμα CPC_Fr4. Η αραιώση έγινε διαλύοντας 216 mg σε 2 ml MeOH και παίρνοντας από αυτό 1 ml σε Eppendorf. Η συγκέντρωση της ένεσης ήταν 21,6mg/0,2 ml. Η ανάλυση των κλασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης του παρακάτω πίνακα.

Time (min)	H ₂ O + 1% Acetic Acid(%)	ACN + 1% Acetic Acid+ 1 % MeOH(%)	Ροή (ml/min)
0.0	95.0	5.0	5
10.0	35.0	65.0	5
24.0	24.0	76.0	5
42.0	16.0	84.0	5
50	2.0	98.0	5
52	95.0	5.0	5
55	95.0	5.0	5

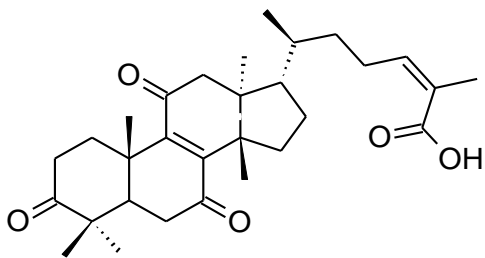
Οι κορυφές που συλλέγονται μετά την διαδικασία της prep-HPLC συμπυκνώνονται με τη χρήση του Rota.

Έπειτα από τη συμπύκνωσή τους μεταφέρονται σε vial όπου και αποθηκεύονται. Στο επόμενο χρονικό διάστημα λαμβάνονται τα φάσματα NMR τους και μελετούνται. Σε επιλεγμένα κλάσματα γίνεται η ταυτοποίησή τους με τη λήψη των φασμάτων δύο διαστάσεων και παρουσιάζονται παρακάτω.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου ¹H-NMR, όπως και φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) έγινε σε φασματογράφο Bruker Avance III 600 (600 MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *multi* (πολλαπλή), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃).

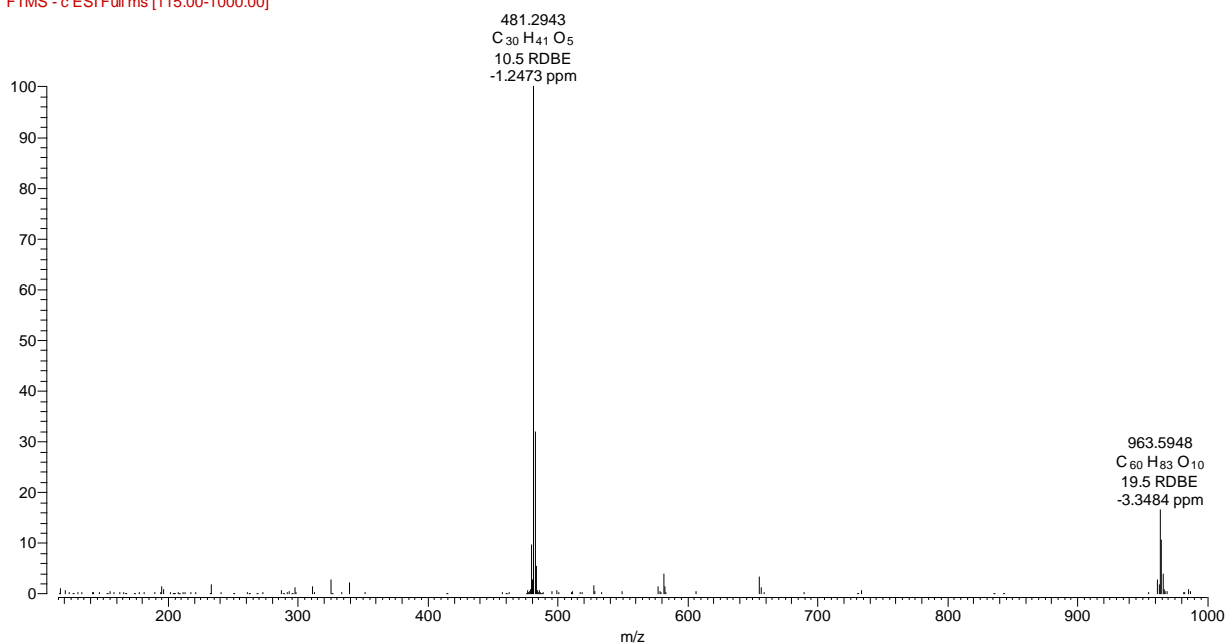
- Μελέτη της κορυφής 6 του χρωματογραφήματος του κλάσματος 4 (CPC Fr4 pHPLC fr6)

Για την κορυφή 6 του κλάσματος 4 ακολούθησε φασματοσκοπική ανάλυση (NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε η δομή της ένωσης **7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικό οξύ**. Στην βιβλιογραφία φαίνεται να υπάρχει και να έχει μελετηθεί το 3,7,11-τριοξο-5α-λανοστα-8,24(E)-διεν-26-οϊκό οξύ (114). Ο Συγκεκριμένος μεταβολίτης δεν διαθέτει βιβλιογραφικές αναφορές ούτε και αναφορές για τη φαρμακολογική του δράση και έτσι αποτελεί ένα καινούριο φυσικό προϊόν για τη ρητίνη της μαστίχας.

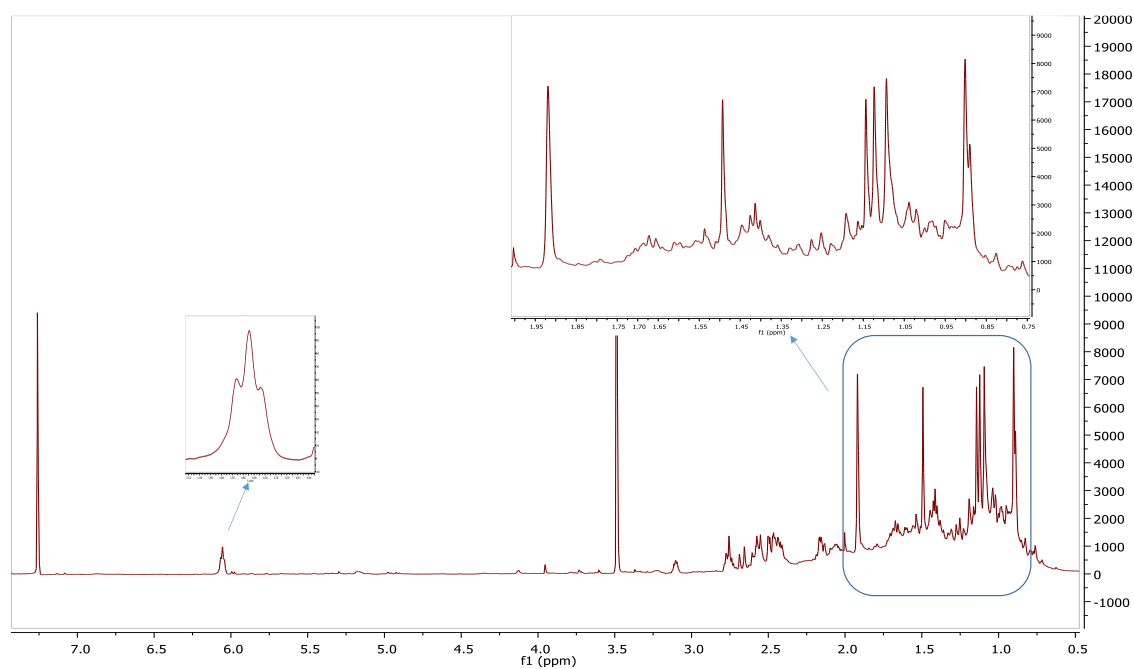


Η ταυτοποίηση της δομής πραγματοποιήθηκε μετά από μελέτη των φασμάτων NMR και HRMS. Στο φασμα μαζας υψηλής ακρίβειας του μεταβολίτη (εικονά 47) παρατηρούμε την κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος $[M-H]^-$ σε m/z 481.2943 με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{30}H_{41}O_5$ και 10 βαθμούς ακορεστότητας γεγονός που συμφώνει με τη χημική δομή του μορίου.

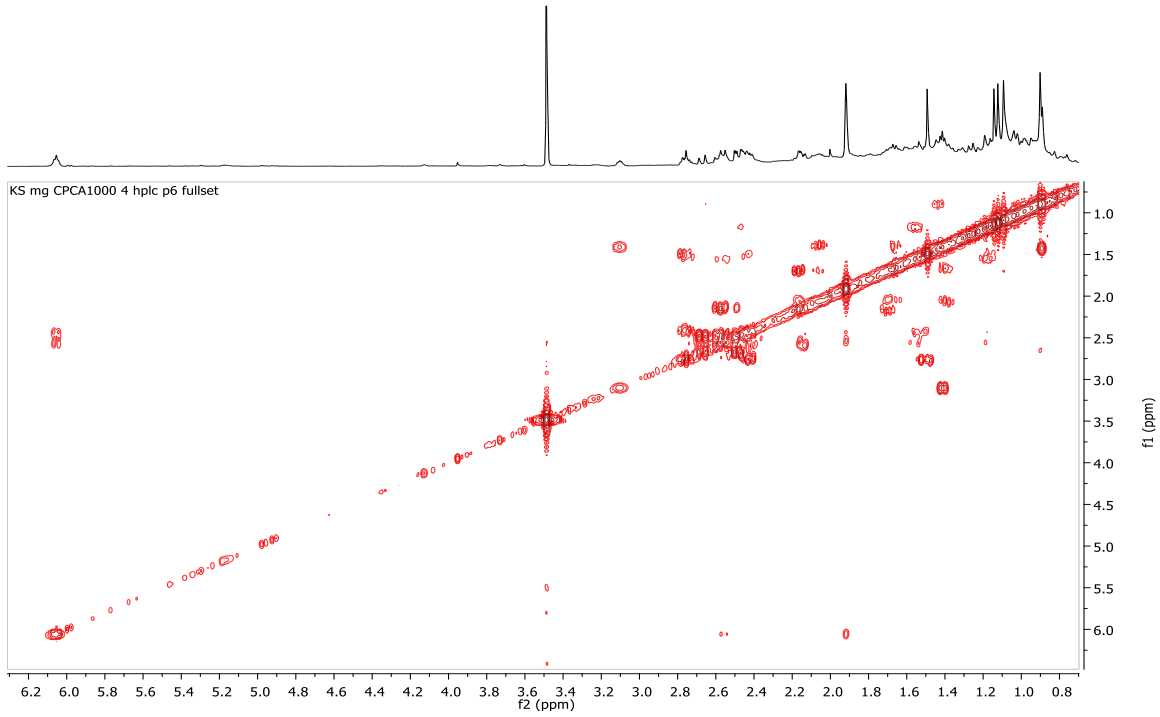
KS_fr4_peak6 #1544 RT: 15.08 AV: 1 NL: 8.33E6
F: FTMS - c ESI Full ms [115.00-1000.00]



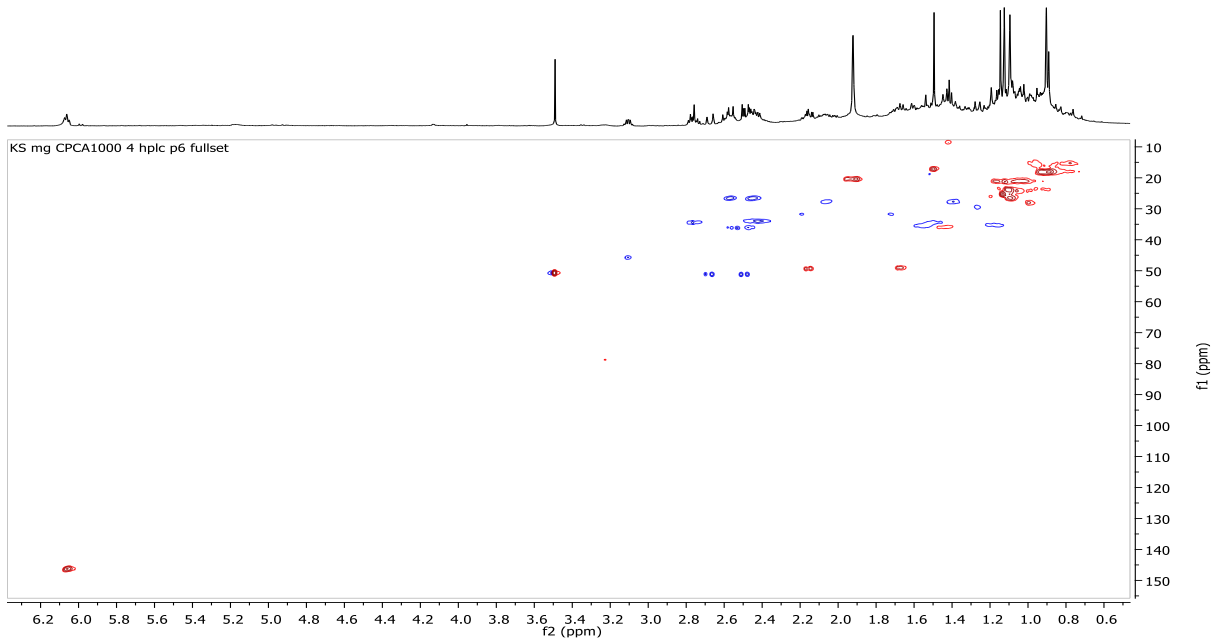
Εικόνα 47: Απεικόνιση φασματοσκοπίας μάζας HRMS για το μόριο του 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικού οξέος. Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων (1H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλεία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



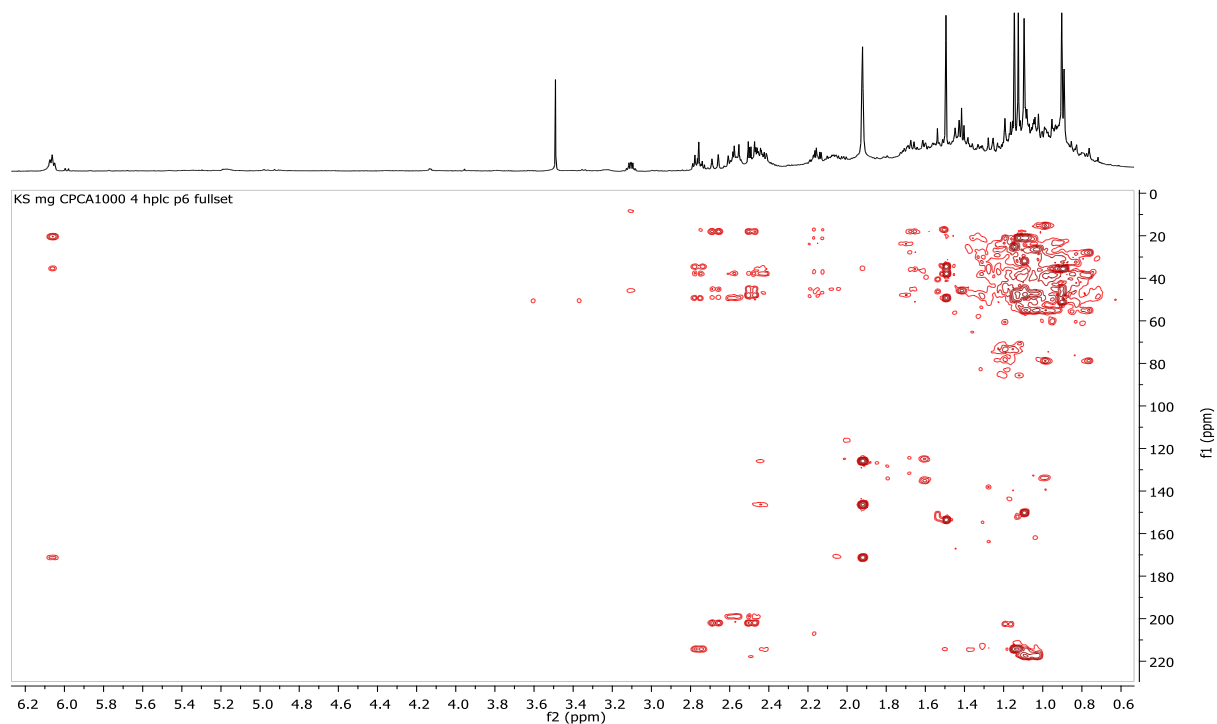
Εικόνα 48: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ του 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικού οξέος



Εικόνα 49: Φάσμα COSY του 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικού οξέος



Εικόνα 50: Φάσμα HSQC-DEPT του 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικού οξέος



Εικόνα 51: Φάσμα HMBC NMR του 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικού οξέος

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για το 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικό οξύ.

Πίνακας 16: Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικού οξέος

7,11-dioxo-24(Z)-masticadienonic acid			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	34.6	2.76	1H, m
1b		1.51	1H, m
2a	34.5	2.75	1H, m
2b		2.43	1H, m
3	214.3	-	
4	47.1	-	
5	49.2	2.15	1H, m
6a	36.2	2.55	1H, m
6b		2.47	1H, m
7	199.1	-	

8	150.2	-	
9	153.3	-	
10	37.7	-	
11	201.9	-	
12a	51.2	2.68	1H, d (19.2)
12b		2.49	1H, d (19.2)
13	45.2	-	
14	47.9	-	
15a	31.9	2.14	1H, m
15b		1.69	1H, m
16a	27.8	2.06	1H, m
16b		1.39	1H, m
17	49.0	1.67	1H, m
18	17.8	0.91	3H, s
19	17.1	1.49	3H, s
20	36.0	1.43	1H, m
21	18.2	0.90	3H, d (6.4 Hz)
22a	35.5	1.54	1H, m
22b		1.16	1H, m
23a	26.6	2.56	1H, m
23b		2.44	1H, m
24	146.1	6.06	1H, t (7.6 Hz)
25	125.9	-	
26	171.2	-	
27	20.4	1.92	3H, brs
28	21.0	1.15	3H, s
29	25.4	1.12	3H, s
30	26.4	1.09	3H, s

- Παρασκευαστική TLC (prepTLC) στα κλάσματα 15, 18 και 20

Για τις ανάγκες της απομόνωσης και ταυτοποίησης επιλέχθηκε η μέθοδος της παρασκευαστικής Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (prep-TLC). Σύμφωνα με παλαιότερες εργασίες κρίνεται ως κατάλληλη μέθοδος για την απομόνωση αρκετών μεταβολιτών της μαστίχας (8). Το πρωτόκολλο της εργασίας με την χρήση της παρασκευαστικής TLC είχε ως εξής : Χρησιμοποιήθηκε 40 mg από το κλάσμα που θέλουμε να αναπτύξουμε και αραιώθηκε σε vial με 0,5 ml EtOAc. Έπειτα ελέγχθηκαν οι πλάκες TLC για τυχόν βρωμιές και επιμολύνσεις στο CAMAG στα 254 και 366 nm και τέλος φέρεται παράλληλη γραμμή με μολύβι 1,5 cm από

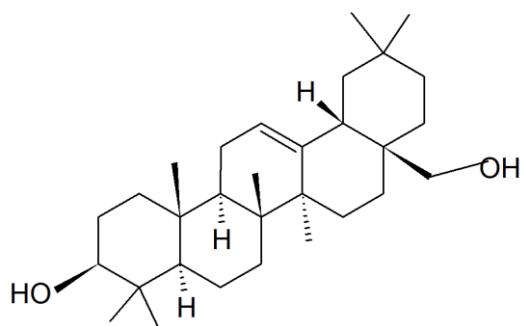
την βάση και δύο κάθετες γραμμές 1 cm από αριστερά και δεξιά. Η παράλληλη γραμμή με την βάση αποτελεί την γραμμή ανάπτυξης του δείγματος. Έπειτα αφού σημειωθούν με μολύβι δύο μικρά σημάδια 1 cm πιο μέσα από το σημείο που τέμνονται η παράλληλη γραμμή με τις δύο κάθετες τότε απλώνεται το διάλυμα χρησιμοποιώντας γυάλινη πιπέτα Pasteur με ελαφρύ άγγιγμα στη silica ώστε να μην χαρακτηί και να είναι όσο το δυνατόν πιο ευθεία η γραμμή ανάπτυξης του δείγματος και “μαρκάρονται” και δύο σημεία-οδηγοί ακόμα εκεί που τέμνονται η παράλληλη γραμμή με τις δύο κάθετες. Η ανάπτυξη συνεχίζεται έως ότου τελειώσει όλη η ποσότητα του δείγματος. Έπειτα η πλάκα αναπτύσσεται σε θάλαμο με σύστημα διαλυτών DCM:MeOH -> 99:1, αφήνεται να ανέβει το δείγμα και επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά, ώστε να είναι σίγουρο ότι έχει παρασυρθεί όλη η ποσότητα του δείγματος. Αυτό που ακολουθεί την διαδικασία αυτή είναι η απεικόνιση των πλακών στο υπεριώδες (254 και 366 nm) και θέρμανση για τη απεικόνιση στο ορατό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης. Από την εικόνα που λαμβάνεται μετά από την θέρμανση, την εικόνα στα 254 nm και τα σημεία-οδηγούς, κυκλώνονται οι “ζώνες” που έχουν δημιουργηθεί ώστε να αποξεστούν και να κατεργαστούν περαιτέρω. Αφού αποξεστούν οι ζώνες με τη βοήθεια ενός χαρτοκόπτη, τότε εκχυλίζονται με προσθήκη 10 ml DCM στους υπερήχους για 5 λεπτά και διηθούνται υπό κενό με τη χρήση χωνιού Buchner διαμέτρου πορώδους No 3. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές για όλες τις ζώνες ώστε να είναι σίγουρο ότι δεν έχει απομείνει καθόλου από την ουσία στην silica. Αφού συμπυκνωθούν τα δείγματα με τη βοήθεια του RotaVapor μεταφέρονται σε vials και ακολουθεί η φασματοσκοπική μελέτη τους με σκοπό την ταυτοποίηση δομών.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$, όπως και φασμάτων δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) έγινε σε φασματογράφο Bruker Avance III 600 (600 MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm (εσωτερικό πρότυπο TMS), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *multi*

(πολλαπλή), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φασμάτων ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃).

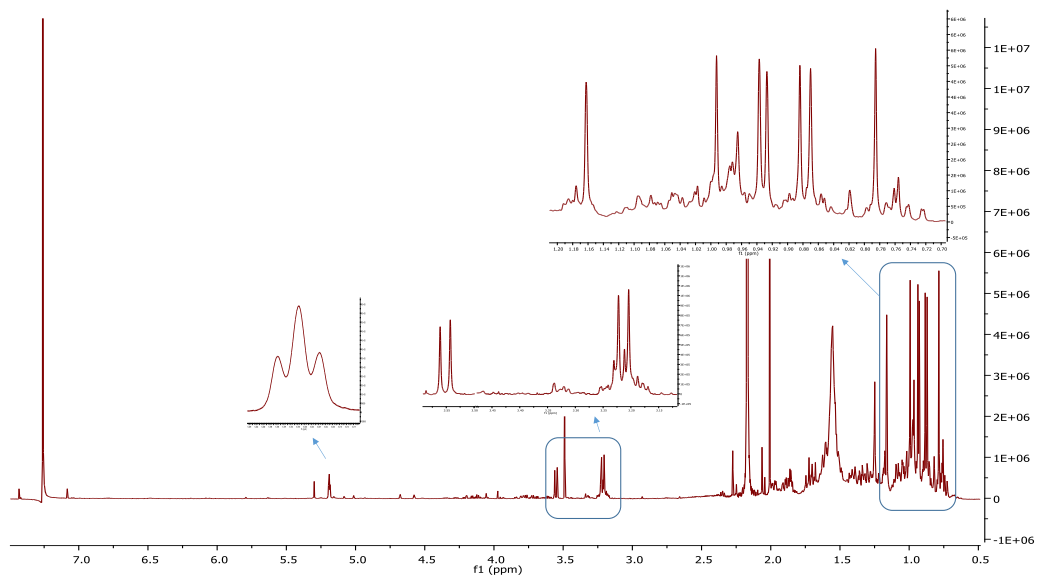
- Μελέτη της ζώνης 9 του κλάσματος 15 (CPC Fr15 pTLC fr9)

Για τη ζώνη 9 του κλάσματος 15 ακολούθησε φασματοσκοπική ανάλυση(NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) μελετήθηκε και ταυτοποιήθηκε η ένωση **ερυθροδιόλη**.

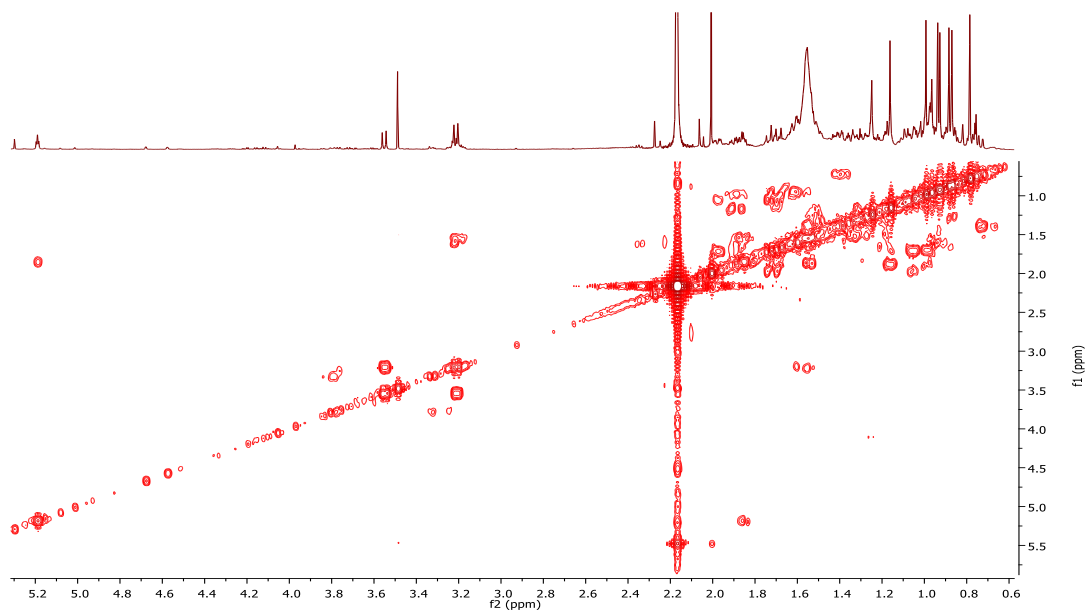


Η **ερυθροδιόλη** είναι ένα πεντακυκλικό μη όξινο τριτερπένιο. Φαίνεται να απαντάται πρώτη φορά στην ρητίνη της μαστίχας της Χίου καθώς δεν υπάρχουν αναφορές για την ύπαρξη της στη ρητίνη του *Pistacia lentiscus var. Chia*. Είναι ένα από τα πολύτιμα συστατικά που υπάρχουν στις ελιές, στα φύλλα του ελαιόδεντρου καθώς και στο παρθένο ελαιόλαδο (115). Έχει ταυτοποιηθεί στην ποικιλία *Pistacia terebinthus var. Chia* (52) καθώς και στο φυτό *Aster Yomena Makino* (116). Έχει ποικίλες και πολύτιμες ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδη, καρδιοπροστατευτική, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση(115). Η ταυτοποίησή του πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (1D,2D) και φασματομετρία HRMS καθώς και σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με αυτά της βιβλιογραφίας (116).

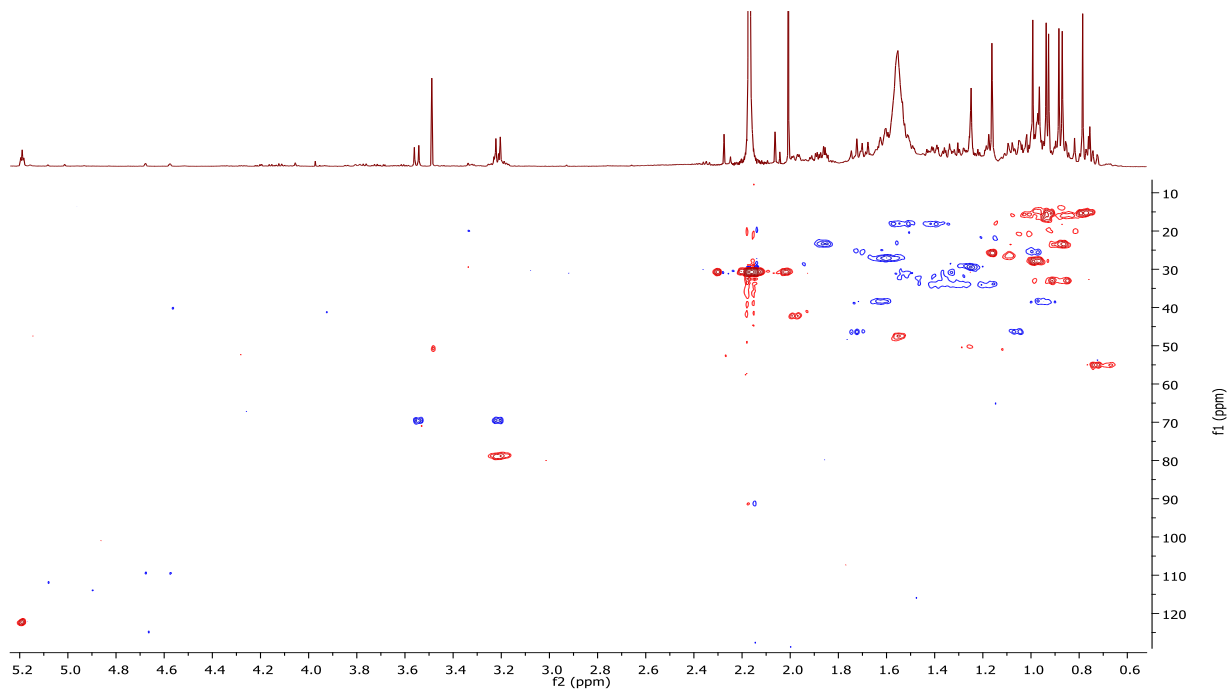
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων (1H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



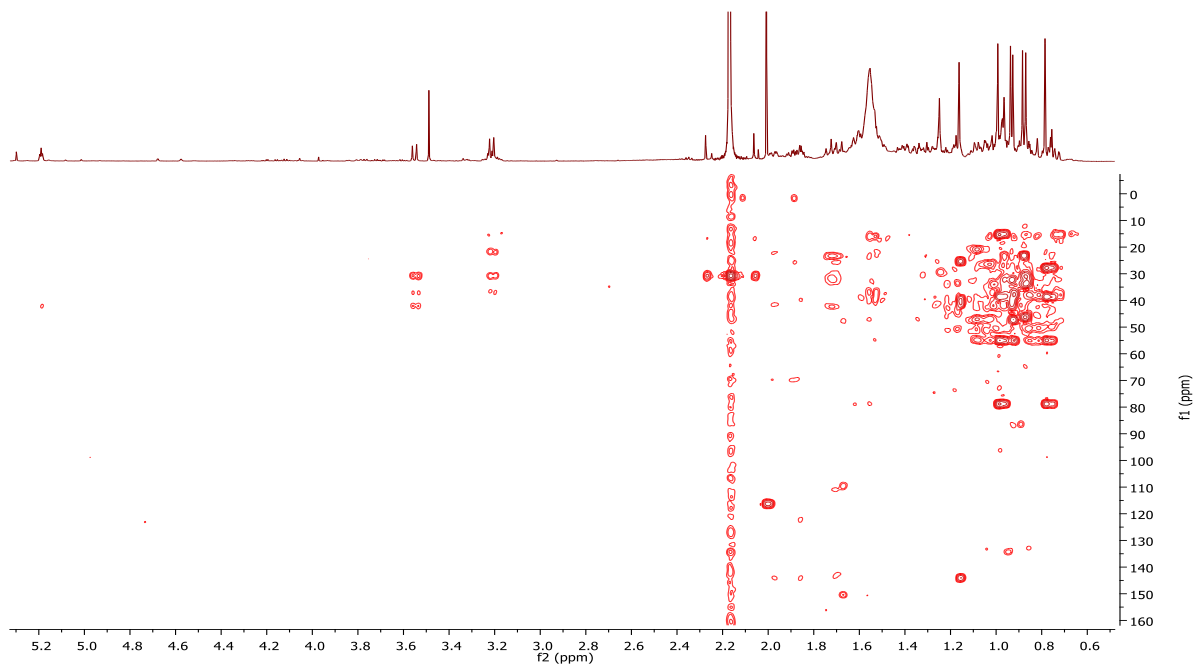
Εικόνα 52: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της ερυθροδιόλης



Εικόνα 53: Φάσμα COSY της ερυθροδιόλης



Εικόνα 54: Φάσμα HSQC-DEPT της ερυθροδιόλης



Εικόνα 55: Φάσμα HMBC NMR της ερυθροδιόλης

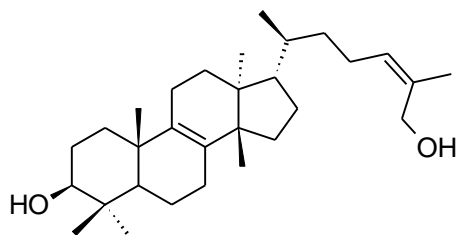
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για την ερυθροδιόλη

Πίνακας 17: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ερυθροδιόλης

Ερυθροδιόλη			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	38.6	1.62	1H, m
1b		0.95	1H, m
2	27.1	1.60	2H, m
3	79.0	3.21	1H, dd, (5/11 Hz)
4	38.7	-	
5	55.1	0.73	
6α	18.2	1.54	1H, m
6β		1.40	1H, m
7	32.4	1.36	2H, m
8	39.6	-	
9	47.6	1.55	1H, m
10	36.8	-	
11	23.5	1.85	2H, m
12	122.4	5.19	t, (3.5 Hz)
13	144.1	-	
14	41.7	-	
15a	25.4	1.71	1H, m
15b		0.98	1H, m
16	21.9	1.17	m
17	36.9	-	
18	42.3	1.98	1H, dd (13.9/4.3 Hz)
19a	46.4	1.73	1H, m
19b		1.05	1H, m
20	30.9	-	
21	34.1	1.28	1H, m
22a	30.8	1.51	1H, m
22b		1.34	1H, m
23	28.1	0.99	3H, s
24	15.4	0.79	S
25	15.2	0.93	3H, s
26	16.9	0.94	3H, s
27	25.8	1.16	3H, s
28a	69.7	3.54	1H, d (11 Hz)
28b		3.21	1H, d, (11 Hz)
29	33.0	0.88	S
30	23.5	0.87	3h, s

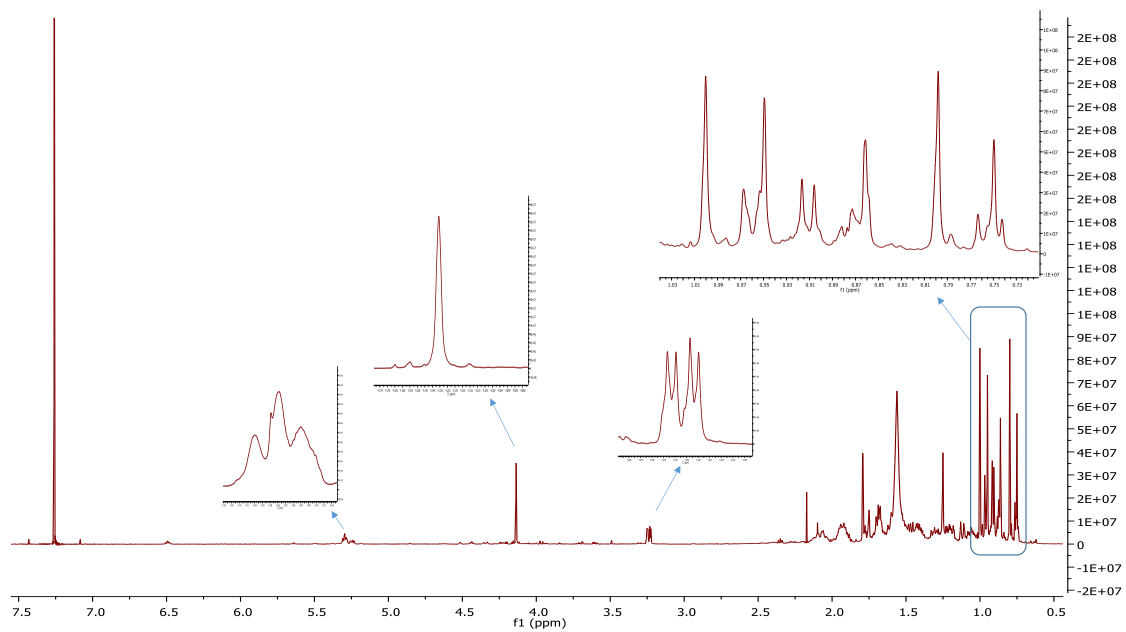
- Μελέτη της ζώνης 13 του κλάσματος 15(CPC Fr15 pTLC fr13)

Για τη ζώνη 13 του κλάσματος 15 ακολούθησε φασματοσκοπική ανάλυση (NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) και αφότου μελετήθηκε, βρέθηκε η ένωση **ισομαστιχαδιενεδιόλη**.

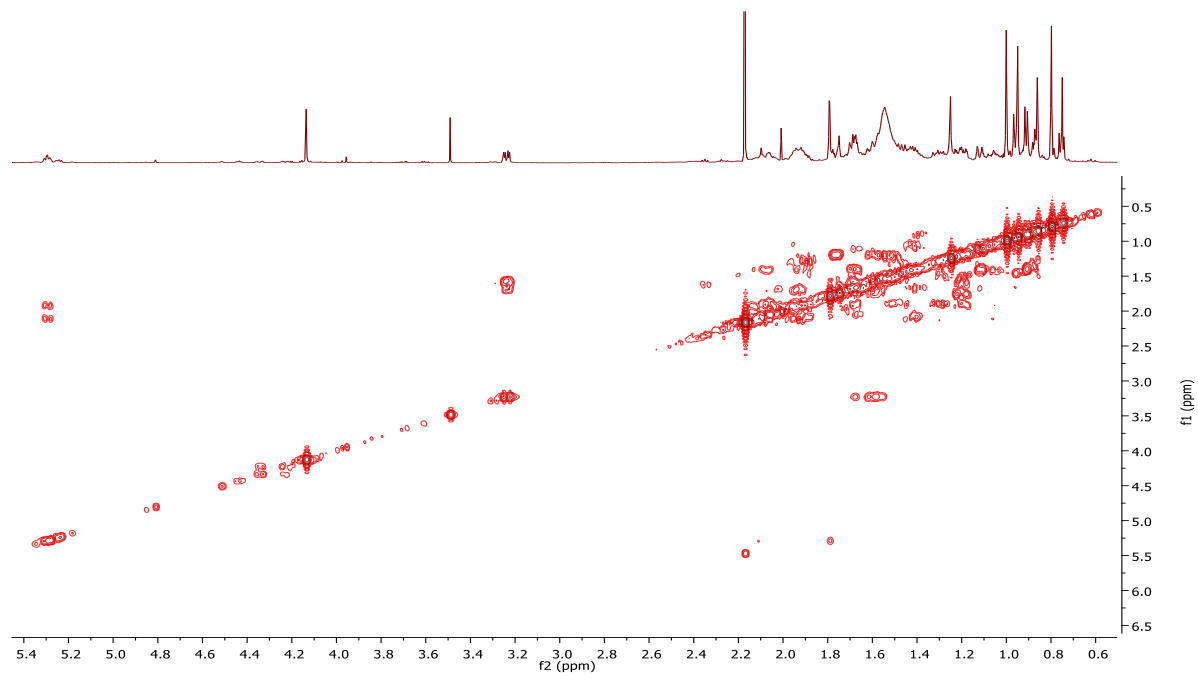


Η **ισομαστιχαδιενεδιόλη** είναι ένα ουδέτερο συστατικό του τριτερπενικού κλάσματος και είναι τετρακυκλικό τριτερπένιο. Έχει αναφερθεί η παρουσία του σε παλαιότερη εργασία ως μέρος πειράματος του *Seoane et. al.* (108) αλλά και σε πιο πρόσφατες εργασίες αποδείχτηκε ότι αποτελεί συστατικό των εξογκωμάτων του *Pistacia terebinthus* καθώς και του *Pistacia palestina* (117,118). Σε δημοσιευμένη εργασία της *Assimoroulou et al.* αναφέρεται η παρουσία της στη ρητίνη του *Pistacia terebinthus var. Chia* (52). Επίσης έχει επιτευχθεί η απομόνωσή του από τη ρίζα του *Micronychia tsiramiramy* (119). Δεν υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία για την ύπαρξή της στην ρητινη της μαστίχας της Χίου όπως και για πιθανές φαρμακολογικές δράσεις.

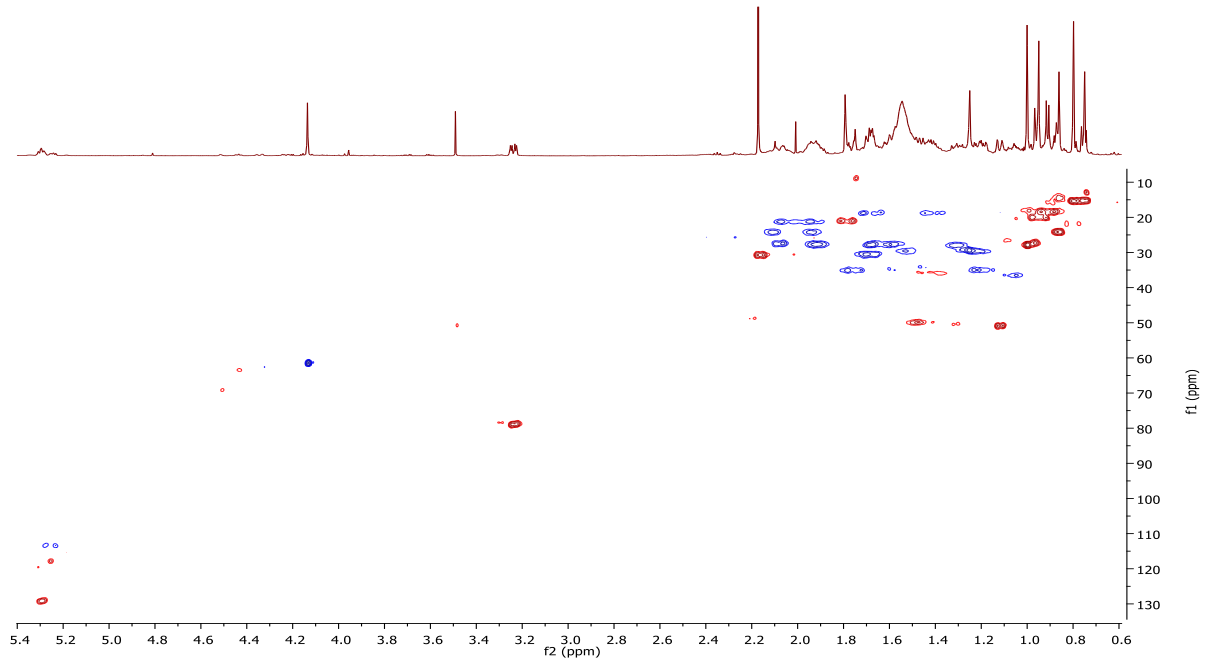
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων (1H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



Εικόνα 56: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της ισομαστιχαδιενεδιόλης



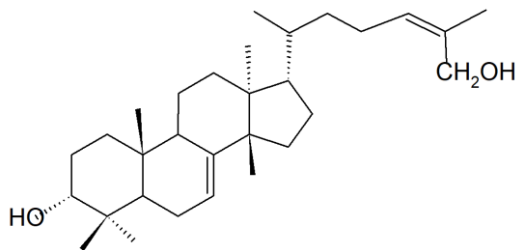
Εικόνα 57: Φάσμα COSY της ισομαστιχαδιενεδιόλης



Εικόνα 58: Φάσμα HMBC NMR της ισομαστιχαδιενεδιόλης

- Μελέτη της ζώνης 14 του κλάσματος 15(CPC Fr15 pTLC fr14)

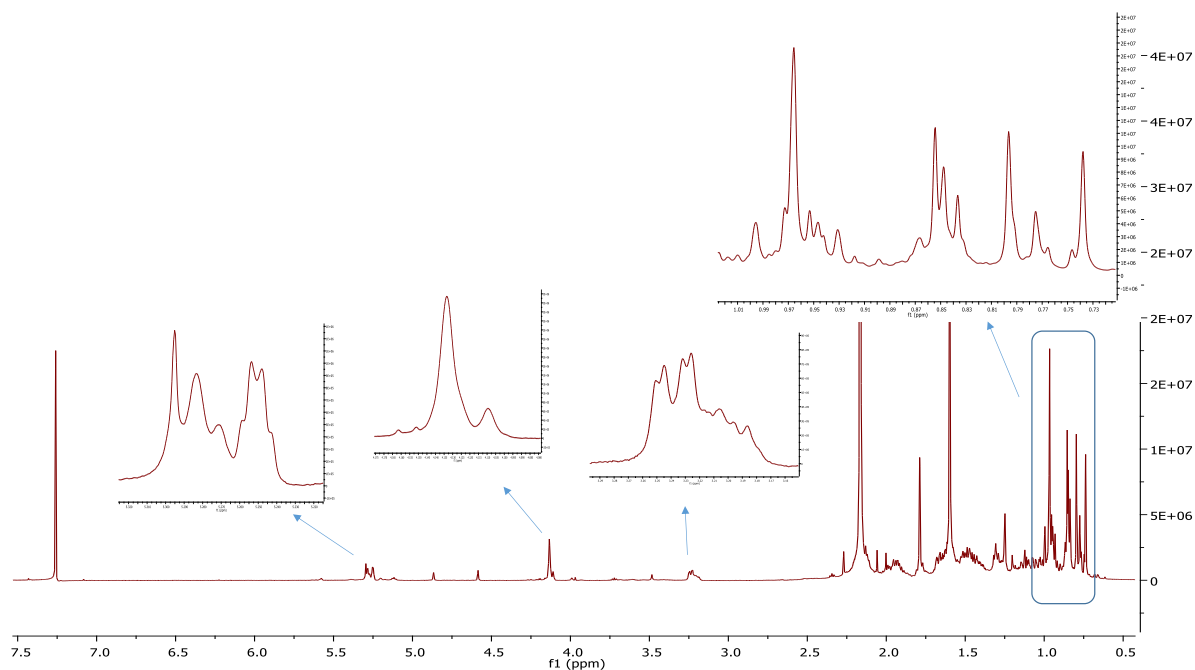
Για τη ζώνη 14 του κλάσματος 15 πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση(NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) έπειτα ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι είναι η ένωση **μαστιχαδιενεδιόλη**.



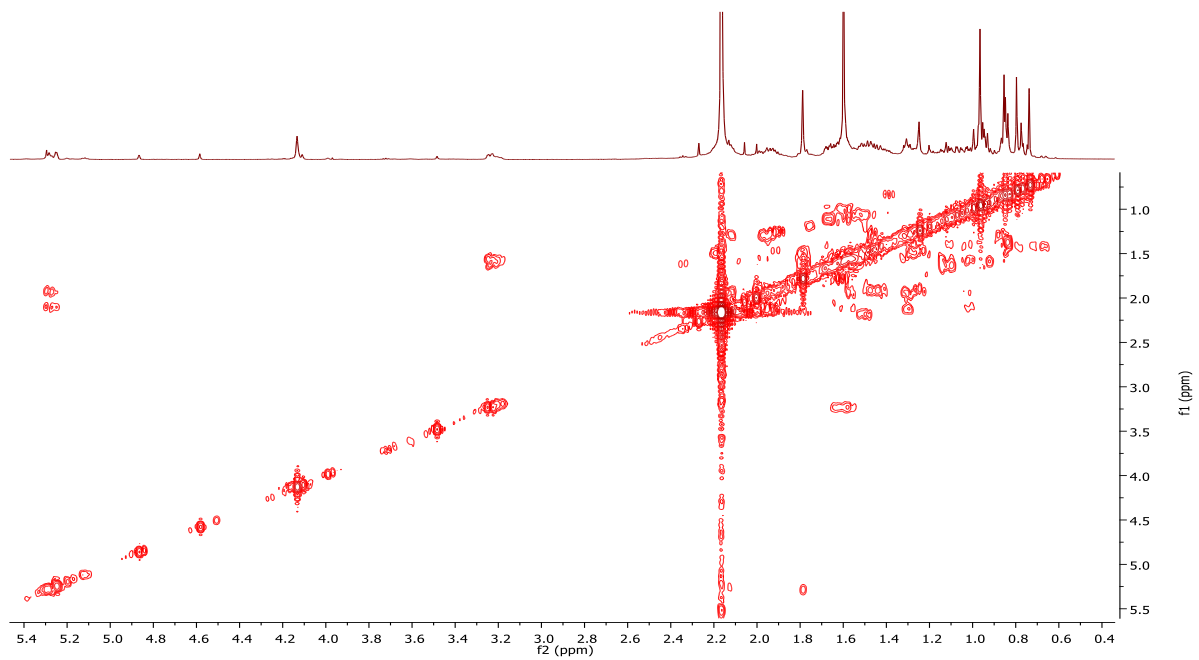
Η **μαστιχαδιενεδιόλη** είναι ένα ουδέτερο συστατικό του τριτερπενικού κλάσματος και είναι τετρακυκλικό τριτερπένιο. Είναι ισομερές της ισομαστιχαδιενεδιόλης στη θέση 3 του

υδροξυλίου. Έχει αναφερθεί η παρουσία του σε παλαιότερο πείραμα των Barton και Seoane et al (46). Όπως και το ισομερές της έχει ανιχνευθεί στα εξογκώματα του *Pistacia terebinthus* και του *Pistacia palestina* αλλά και στη ρητίνη του *Pistacia terebinthus var. Chia*. (52,117,118). Επίσης έχει αναφερθεί η παρουσία της στα εξογκώματα του *Pistacia Lentiscus* καθώς και στην αποφλοιωμένη ρητίνη του *Pistacia Vera* (120,121) αλλά και στα φύλλα του *Trichilia Maynasiana* (122). Δεν υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία για την ύπαρξή της στην ρητίνη της μαστίχας της Χίου όπως και για πιθανές φαρμακολογικές δράσεις.

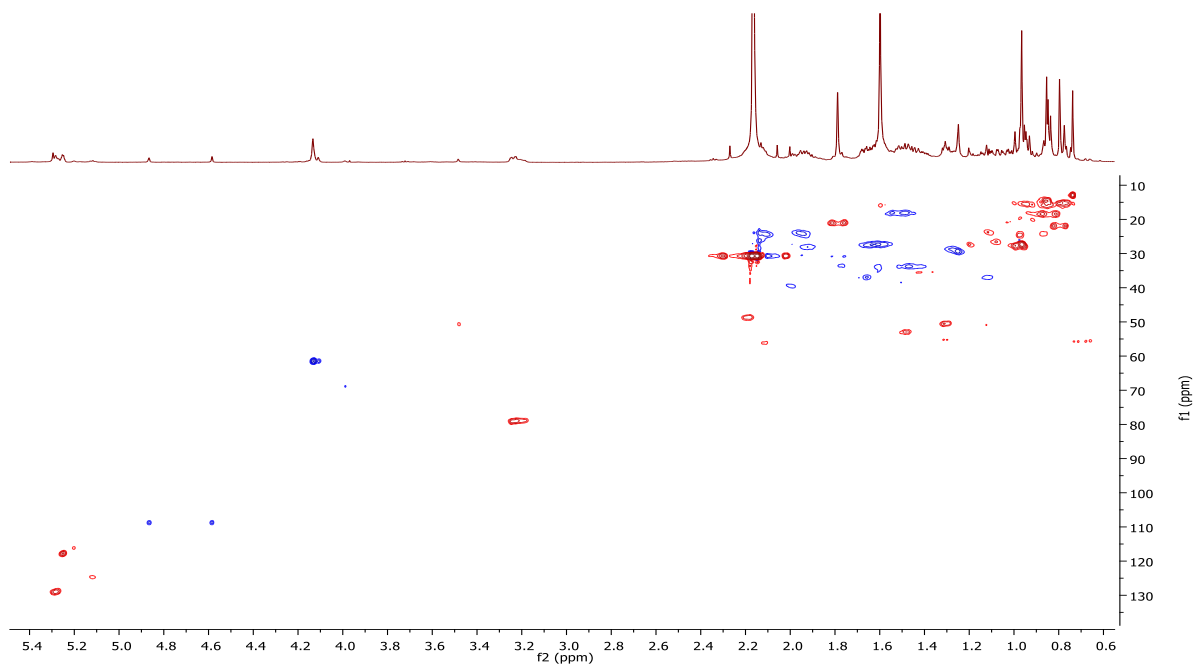
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων ($^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλεία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



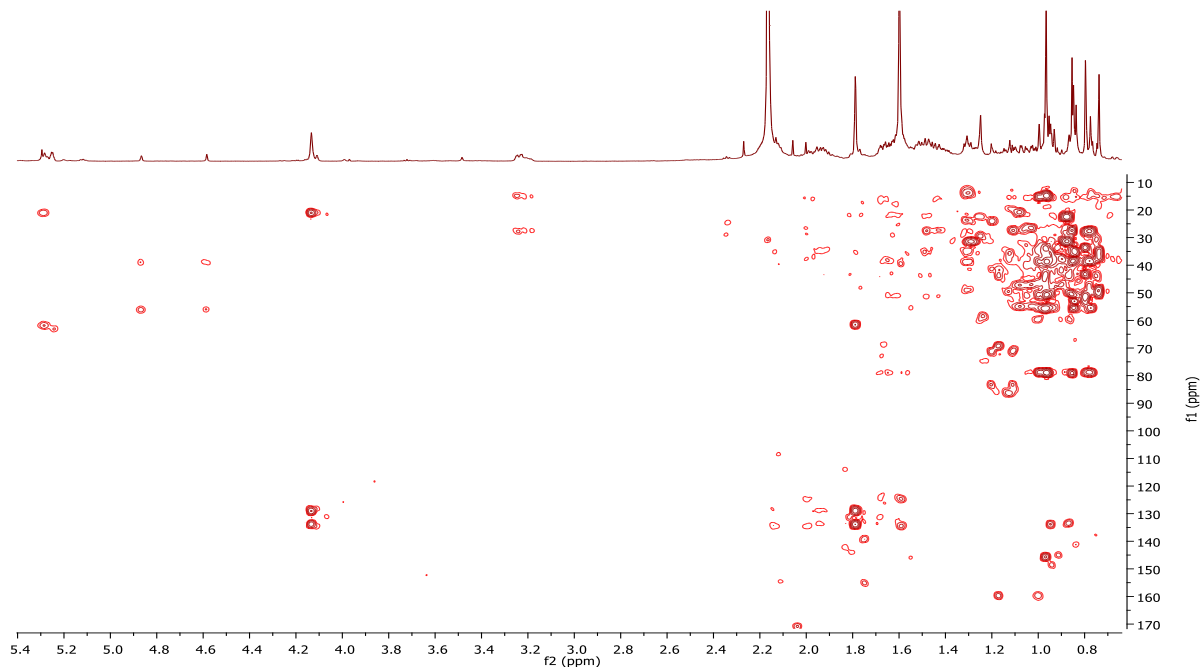
Εικόνα 59: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της μαστιχαδιενεδιόλης



Εικόνα 60: Φάσμα COSY της μαστιχαδιενεδιόλης



Εικόνα 61: Φάσμα HSQC-DEPT της μαστιχαδιενεδιόλης



Εικόνα 62: Φάσμα HMBC NMR της μαστιχαδιενεδιόλης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνολικά οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για τις μαστιχαδιενεδιόλη και ισομαστιχαδιενεδιόλη

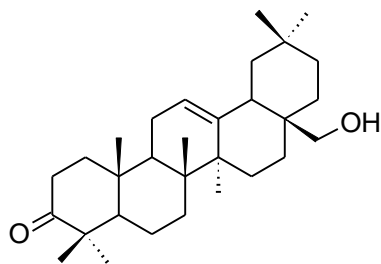
Πίνακας 18: Φασματοσκοπικά δεδομένα της μαστιχαδιενεδιόλης και ισομαστιχαδιενεδιόλης

	ISOMASTICADIENEDIOL			MASTICADIENEDIOL		
	C	H		C	H	
	ppm	ppm		ppm	ppm	
1a	35.2	1.75	1H, m	33.9		
1b		1.20	1H, m			
2a	27.8	1.69	1H, m			
2b		1.57	1H, m			
3	79.0	3.23	1H, dd (11.8/4.4 Hz)	79.2	3.23	1H, dd (11.5/4.1 Hz)
4	39.0	-		38.9	-	
5	50.9	1.11	1H, m	50.5	1.30	
6a	18.5	1.67	1H, m		2.12	
6b		1.42	1H, m		1.94	
7a	27.3	2.08	1H, m	118.2	5.25	1H, dd (6.5/3.2 Hz)
7b		1.91	1H, m			
8	133.5	-		145.7	-	
9	134.1	-		48.7	2.19	
10	37.0	-		43.4	-	
11a	21.2	2.06	1H, m			

11b		1.94	1H, m			
12a	30.6	1.70	1H, m			
12b		1.66	1H, m			
13	44.2	-		38.6	-	
14	50.0	-		49.8	-	
15a	29.8	1.52	1H, m			
15b		1.21	1H, m			
16a	27.3	1.59	1H, m			
16b		1.31	1H, m			
17	50.6	1.47	1H, m	52.9	1.48	
18	15.3	0.75	3H, s	13.0	0.74	3H, s
19	18.5	0.95	3H, s	22.1	0.80	3H, s
20	36.1	1.39	1H, m	35.6	1.38	
21	18.5	0.91	3H, d (6.7 Hz)	18.6	0.84	3H, d (6.5 Hz)
22	36.5	1.07	2H, m			
23a	24.3	2.12	1H, m	24.6	2.10	
23b		1.94	1H, m		1.93	
24	129.3	5.29	1H, brt (7.6 Hz)	129.3	5.28	1H, brt (7.4 Hz)
25	133.8	-		134.2	-	
26	61.6	4.13	2H, s	61.8	4.12	2H, s
27	21.2	1.78	3H, s	21.3	1.79	3H, s
28	27.9	0.99	3H, s	27.4	0.96	3H, s
29	15.3	0.79	3H, s	14.6	0.85	3H, s
30	24.2	0.86	1H, m	24.5	0.97	

- Μελέτη της ζώνης 5 του κλάσματος 18 (CPC Fr18 pTLC fr5)

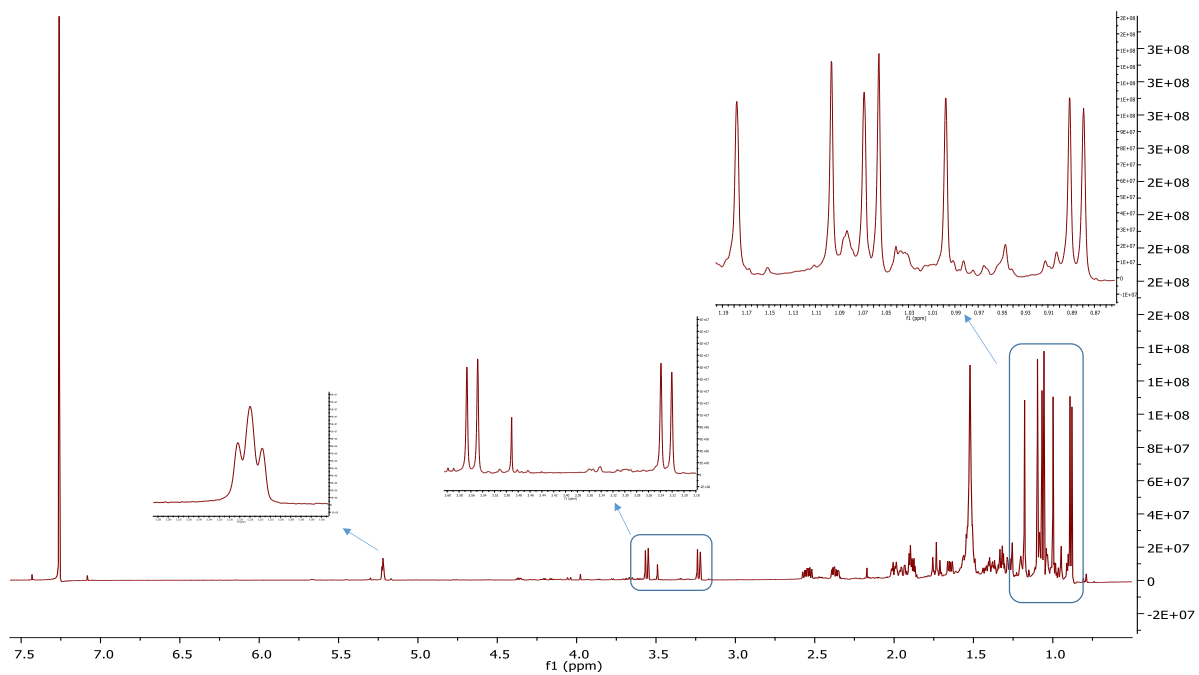
Για τη ζώνη 5 του κλάσματος 18 έγινε φασματοσκοπική ανάλυση (NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) μελετήθηκε και τουτοποιήθηκε η ένωση **ολεανονική αλκοόλη**.



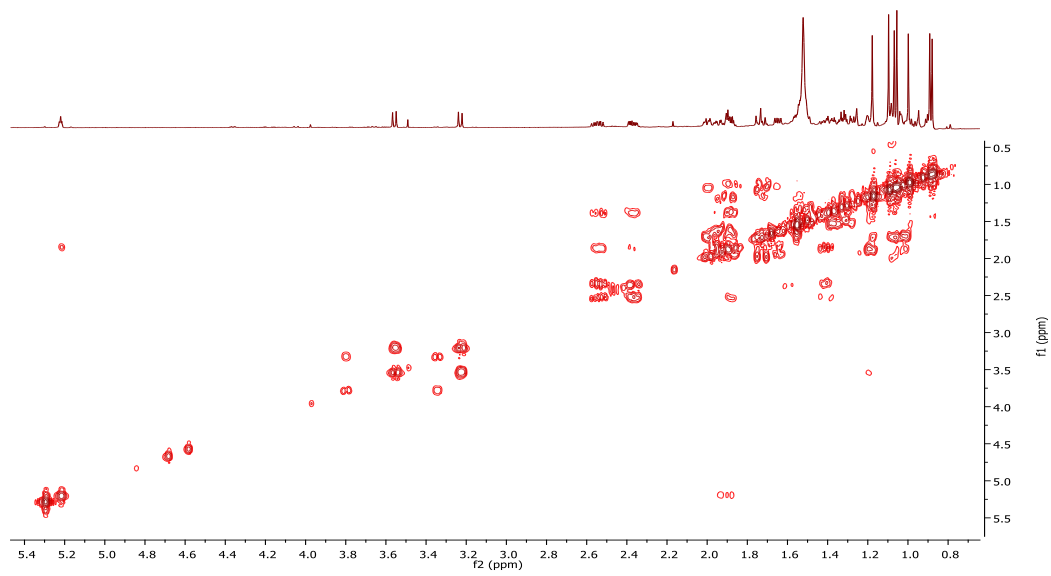
Η **ολεανονική αλκοόλη** είναι πεντακυκλικό τριτερπένιο. Στη ρητίνη της μαστίχας υπάρχει το ολεανονικό οξύ, το οποίο είναι κύριο συστατικό του όξινου κλάσματος των τριτερπενίων της

μαστίχας, ενώ για την αλκοόλη δεν υπάρχουν αναφορές στην βιβλιογραφία ξανά. Θεωρείται ότι απαντάται για πρώτη φορά στη ρητίνη της μαστίχας και ότι ανήκει στο ουδέτερο κλάσμα των τριτερπενίων της.

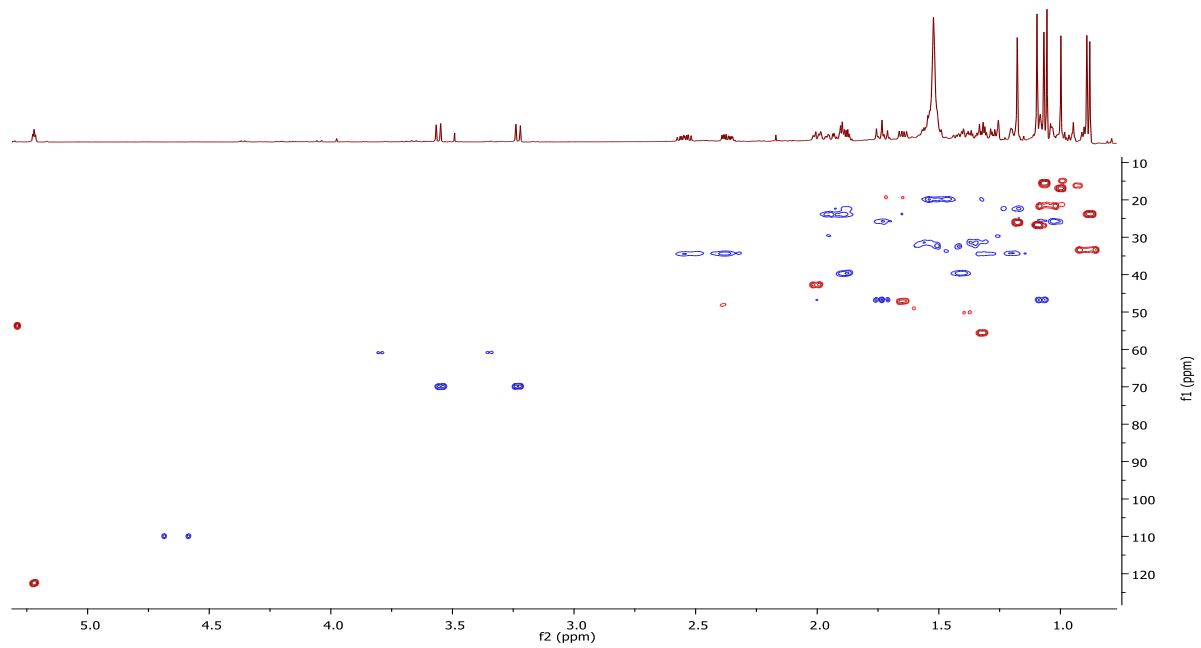
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων (1H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλεία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



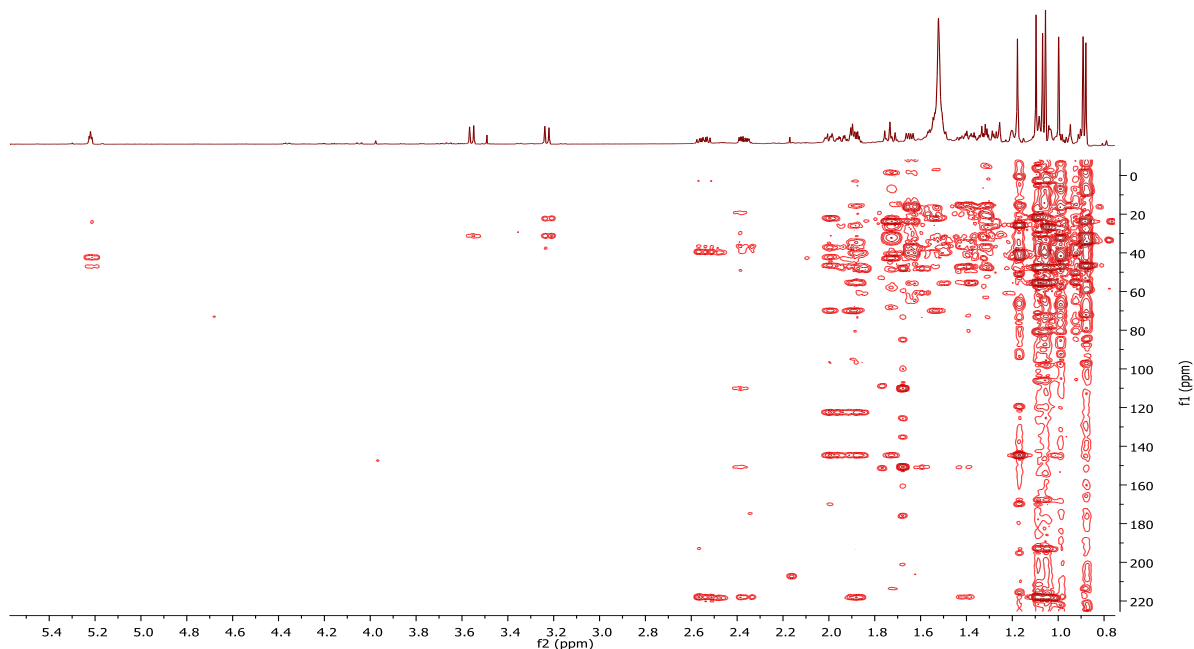
Εικόνα 63: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της ολεανονικής αλκοόλης



Εικόνα 64: Φάσμα COSY της ολεανονικής αλκοόλης



Εικόνα 65: Φάσμα HSQC-DEPT της ολεανονικής αλκοόλης



Εικόνα 66: Φάσμα HMBC NMR της ολεανονικής αλκοόλης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για την ολεανονική αλκοόλη.

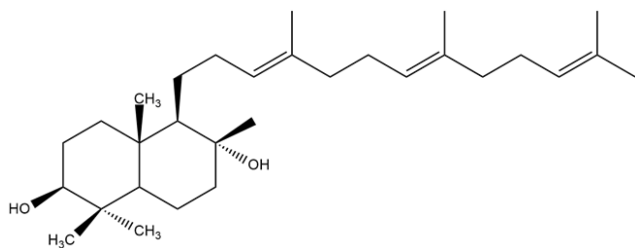
Πίνακας 19: Φασματοσκοπικά δεδομένα της ολεανονικής αλκοόλης

Ολεανονική αλκοόλη			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	39.6	1.88	1H, m
1b		1.40	1H, m
2a	34.4	2.53	1H, m
2b		2.38	1H, m
3	218.0	-	
4	46.7	-	
5	55.6	1.32	1H, m
6a	19.9	1.53	1H, m
6b		1.47	1H, m
7a	32.4	1.50	1H, m
7b		1.42	1H, m
8	41.9	-	
9	47.1	1.65	1H, m
10	35.9	-	

11a	23.8	1.94	1H, m
11b		1.89	1H, m
12	122.6	5.22	1H, brt (5.20 Hz)
13	143.8	-	
14	40.0	-	
15a	25.7	1.73	1H, m
15b		1.02	1H, m
16a	31.2	1.53	1H, m
16b		1.33	1H, m
17	37.6	-	
18	42.7	2.00	1H, m
19a	46.8	1.73	1H, m
19b		1.03	1H, m
20	46.2	-	
21a	31.5	1.54	1H, m
21b		1.36	1H, m
22a	22.5	1.88	1H, m
22b		1.19	1H, m
23	26.8	1.09	3H, s
24	21.8	1.04	3H, s
25	15.5	1.06	3H, s
26	16.9	0.99	3H, s
27	26.2	1.17	3H, s
28a	69.9	3.55	1H, d (11.0 Hz)
28b		3.23	1H, d (11.0 Hz)
29	33.4	0.89	3H, s
30	23.8	0.87	3H, s

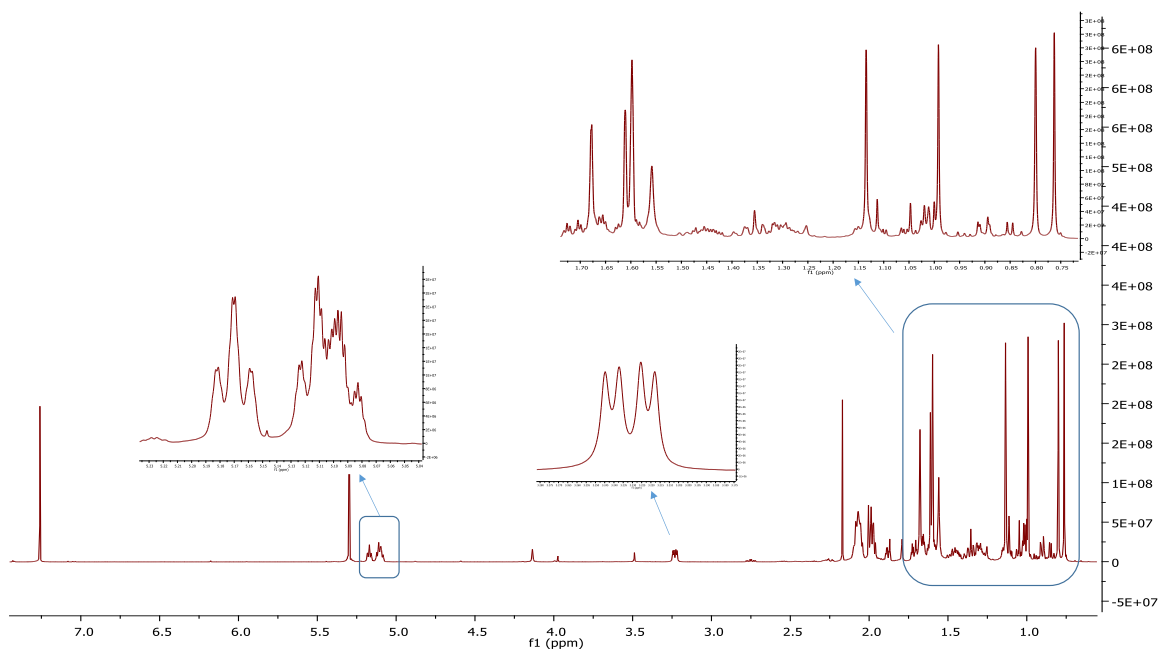
- Μελέτη της ζώνης 8 του κλάσματος 18 (CPC Fr18 pTLC fr8)

Για τη ζώνη 8 του κλάσματος 18 ακολούθησε φασματοσκοπική ανάλυση(NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) μελετήθηκαν τα φάσματα και ταυτοποιήθηκε η ένωση **μυρρανόλη C**.

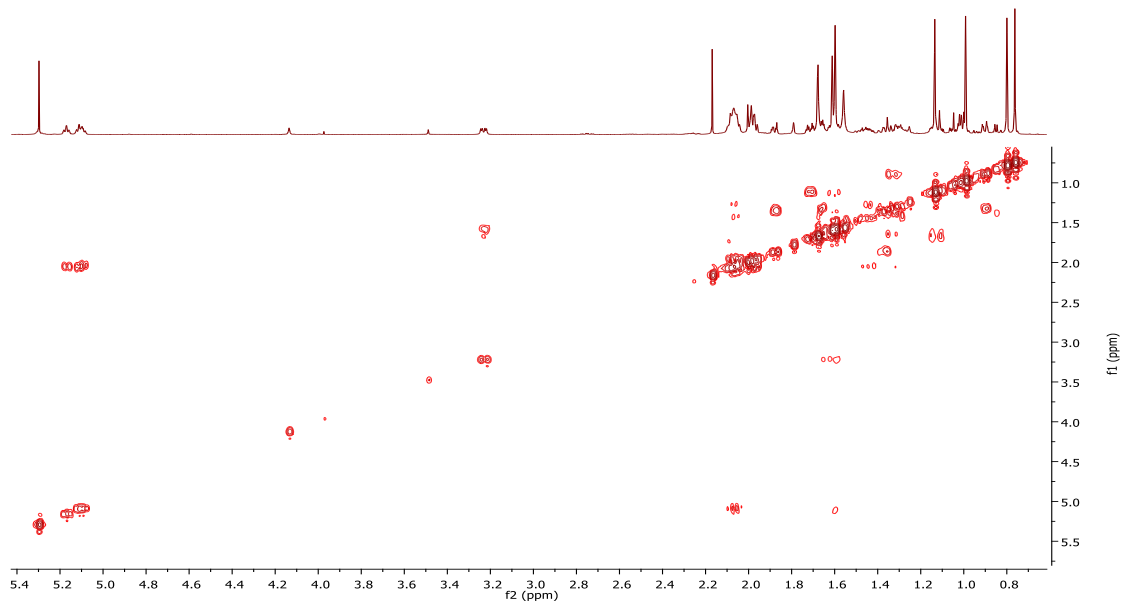


Η **μυρρανόλη C** ανήκει στα δικυκλικά τριτερπένια και είναι συστατικό του ουδέτερου κλάσματος της ρητίνης της μαστίχας. Έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί στο παρελθόν από τον *Paraschos et al.* για τους σκοπούς διδακτορικής διατριβής με τη χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων (8). Δεν υπάρχουν σαφείς αναφορές στην βιβλιογραφία για πιθανές βιολογικές της δράσεις.

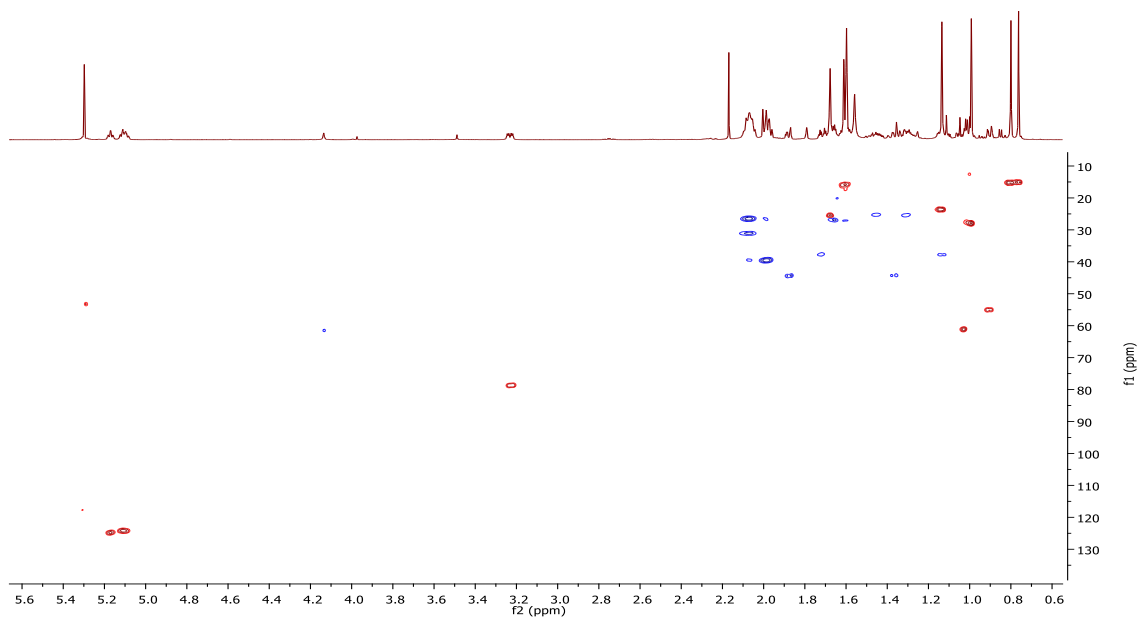
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων (¹H-NMR, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλεία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου



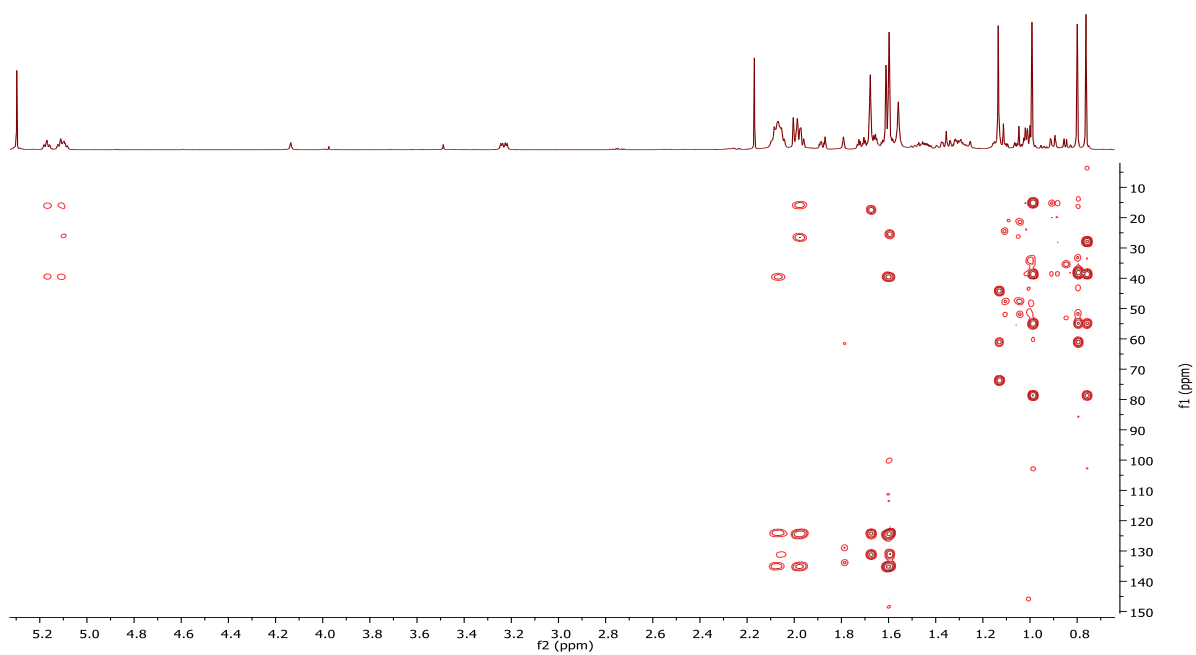
Εικόνα 67: Φάσμα πρωτονίου ¹H-NMR της μυρρανόλης C



Εικόνα 68: Φάσμα COSY της μυρρανόλης C



Εικόνα 69: Φάσμα HSQC-DEPT της μυρρανόλης C



Εικόνα 70: Φάσμα HMBC NMR της μυρρανόλης C

- Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται 4 απλές κορυφές από 0.78 έως 1.14 ppm, Οι οποίες αντιστοιχούν στα 4 μεθύλια του σκελετού του μορίου (C23, 24, 25 & 26). Το τελευταίο εμφανίζεται αποθωρακισμένο λόγω της γειτνίασης με το υδροξύλιο του άνθρακα 8 με τον οποίο συνδέεται άμεσα.
 - Άλλες 4 απλές κορυφές παρατηρούνται στο ίδιο φάσμα από τα 1.60 έως τα 1.68 ppm. Αυτές αντιστοιχούν στα 4 μεθύλια της αλυσίδας (27, 28, 29 & 30) και εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμένες, λόγω της γειτνίασης του κάθε μεθυλίου με διπλό δεσμό.
 - Η διπλή διπλών κορυφή που εμφανίζεται στα 3.22 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδροξυλιωμένου άνθρακα 3
 - Στην ολεφινική περιοχή παρατηρούνται τρεις τριπλές κορυφές (5.17, 5.11 & 5.10 ppm), οι οποίες αντιστοιχούν στα τρία πρωτόνια των διπλών δεσμών της πλάγιας αλυσίδας (13, 17, 21).
-
- Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ παρατηρούνται 30 κορυφές, που αντιστοιχούν στους 30 άνθρακες του τριτερπενικού προϊόντος. Από αυτούς, και σύμφωνα με το φάσμα DEPT, 10 είναι μεθυλενικοί και 6 τεταρτοταγείς.
 - Στο φάσμα άνθρακα, παρατηρούνται δύο οξυγονωμένοι άνθρακες, και οι δύο υδροξυλιωμένοι ο ένας στα 73.6 που αντιστοιχεί στον άνθρακα 8, και ο άλλος στα 78.6 που αντιστοιχεί στον άνθρακα 3.
 - Στην ολεφινική περιοχή, διακρίνονται τρεις κορυφές από τα 124.2 έως τα 124.8 ppm, που αντιστοιχούν στους τρεις ακόρεστους άνθρακες των διπλών δεσμών της πλάγιας αλυσίδας (13, 17, 21), καθώς και τρεις κορυφές από 131.1 έως 135.0 ppm, που αντιστοιχούν στους τρεις κορεσμένους άνθρακες των διπλών δεσμών της πλάγιας αλυσίδας (14, 18, 22)
 - Στο φάσμα HMQC είναι ορατές οι συζεύξεις μεταξύ των τριών ακόρεστων ολεφινικών ανθράκων (124.2-124.8 ppm) και των πρωτονίων τους (5.10-5.17 ppm)
 - Στο ίδιο φάσμα, παρατηρούνται οι συζεύξεις μεταξύ των ανθράκων και των πρωτονίων κάθε μεθυλίου

- Στο ίδιο φάσμα, διακρίνεται πως ο ένας υδροξυλιωμένος άνθρακας (C-3, 78.6 ppm) φέρει πρωτόνιο (3.22), ενώ ο άλλος δεν παρουσιάζει αντίστοιχη σύζευξη
- Στο φάσμα HMBC ο υδροξυλιωμένος άνθρακας που δε φέρει πρωτόνιο (C-8, 73.6 ppm) παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου 26 (1.14 ppm), ενώ ο υδροξυλιωμένος άνθρακας 3 (78.6 ppm) παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια των μεθυλίων 23 & 24 (0.99 & 0.78 ppm)
- Στο ίδιο φάσμα, διακρίνονται οι συζεύξεις μεταξύ των κορεσμένων ολεφινικών ανθράκων της πλάγιας αλυσίδας και των πρωτονίων των μεθυλίων που φέρουν: ο C-14 (135.0) με τα 3 H-27 (1.61), ο C-18 με τα τρία H-28, και χαρακτηριστικά ο C-22 (131.1), που βρίσκεται στο άκρο της αλυσίδας με τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων 29 (1.60) & 30 (1.68).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για την μυρρανόλη C.

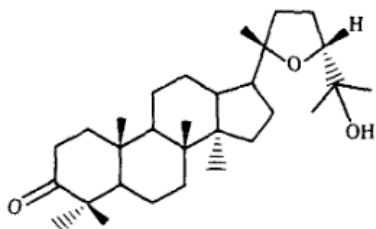
Πίνακας 20: Φασματοσκοπικά δεδομένα της μυρρανόλης C

Μυρρανόλη C			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	37.7	1.72	1H, m
1b		1.14	1H, m
2a	27.0	1.58	1H, m
2b		1.69	1H, m
3	78.6	3.22	1H, dd (11.7/4.7 Hz)
4	38.7	-	
5	54.9	0.90	1H, m
6a	20.1	1.64	1H, m
6b		1.37	1H, m
7a	44.4	1.87	1H, m
7b		1.37	1H, m
8	73.6	-	
9	61.2	1.03	1H, m
10	38.3	-	
11a	25.2	1.46	1H, m
11b		1.30	1H, m
12	31.1	2.07	2H, m
13	124.8	5.17	1H, brt (5.18 Hz)

14	135.0	-	
15	39.6	1.99	2H, m
16	26.4	2.07	2H, m
17	124.2	5.11	1H, brt (5.18 Hz)
18	134.6	-	
19	39.6	1.99	2H, m
20	26.4	2.08	2H, m
21	124.2	5.10	1H, brt (5.18 Hz)
22	131.1	-	
23	28.0	0.99	3H, s
24	15.1	0.78	3H, s
25	15.2	0.88	3H, s
26	23.5	1.14	3H, s
27	15.8	1.61	3H, s
28	15.8	1.60	3H, s
29	15.8	1.60	3H, s
30	25.5	1.68	3H, s

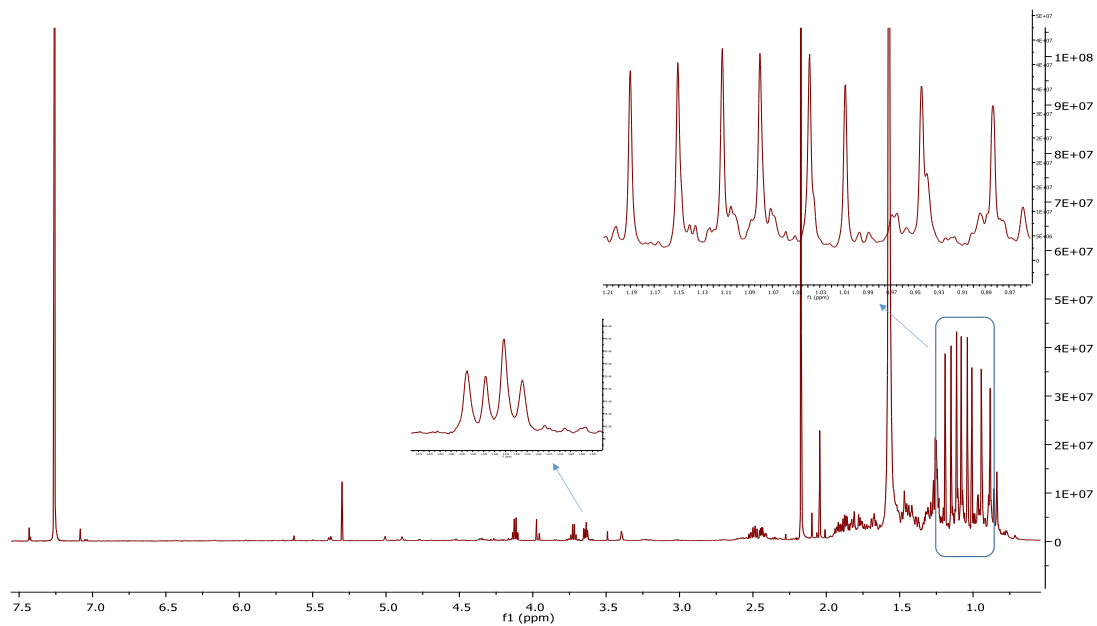
- Μελέτη της ζώνης 12 του κλάσματος 20 (CPC Fr20_pTLC_fr12)

Για τη ζώνη 12 του κλάσματος 20 πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση (NMR-μίας και δύο διαστάσεων, MS/MS) και αφού μελετήθηκαν τα φάσματά ταυτοποιήθηκε η δομή της ένωσης **οκοτιλλόνη**.

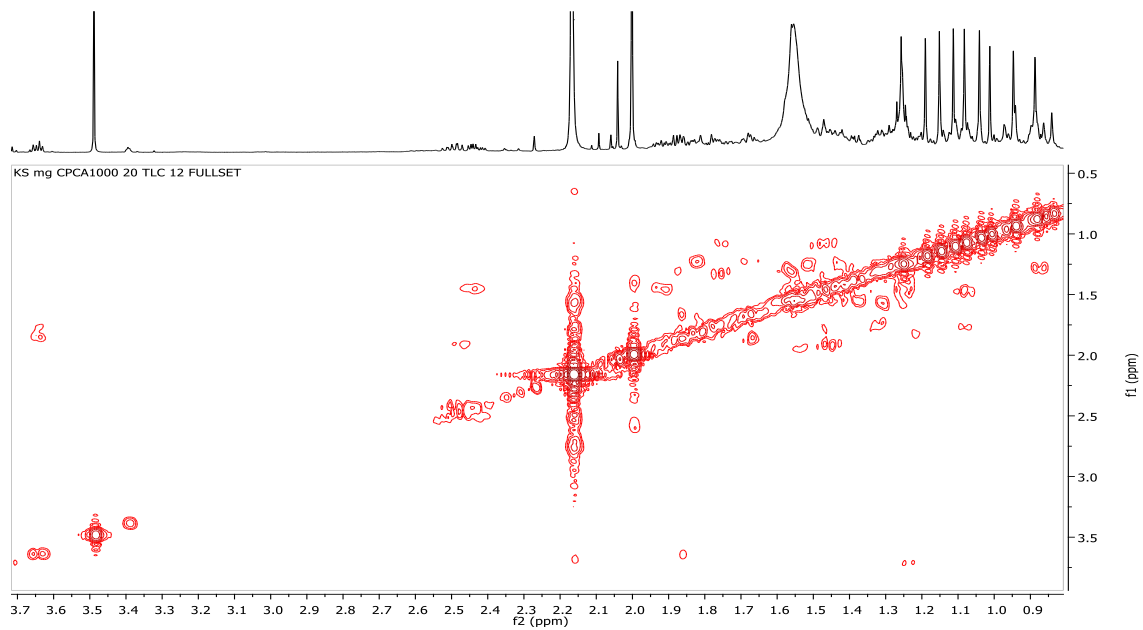


Η **οκοτιλλόνη** είναι ένα τριτερπένιο που δεν έχει αναφερθεί η παρουσία του στο παρελθόν στη ρητίνη της μαστίχας. Η ύπαρξή του έχει αναφερθεί σε παλαιότερες εργασίες σε διάφορα φυτά, ενώ έχει πραγματοποιηθεί η απομόνωση και ταυτοποίησή του από το *Cabralea Eichleriana* (123). Σε μία άλλη δημοσιευμένη εργασία αναφέρεται η πιθανή κυτταροτοξική του δράση σε σειρές καρκινικών κυττάρων (124).

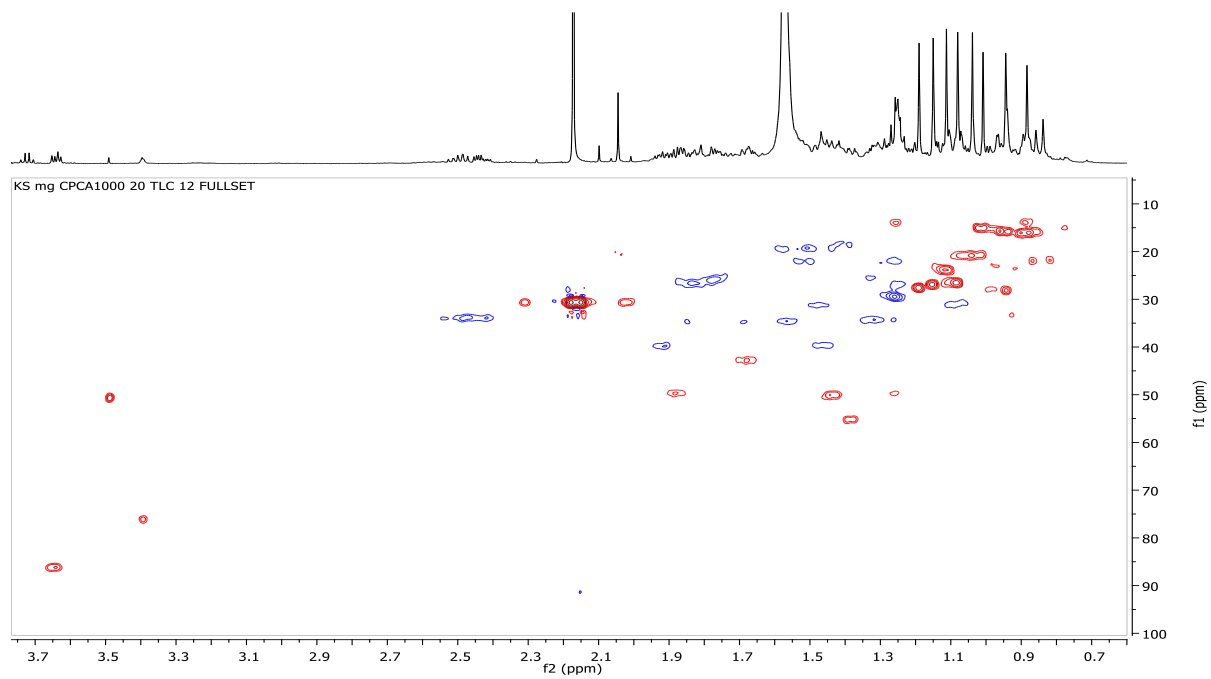
Τα φασματα NMR μίας και δύο διαστάσεων ($^1\text{H-NMR}$, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες και αποτέλεσαν κρίσιμα εργαλεία στην ταυτοποίηση της δομής του μορίου.



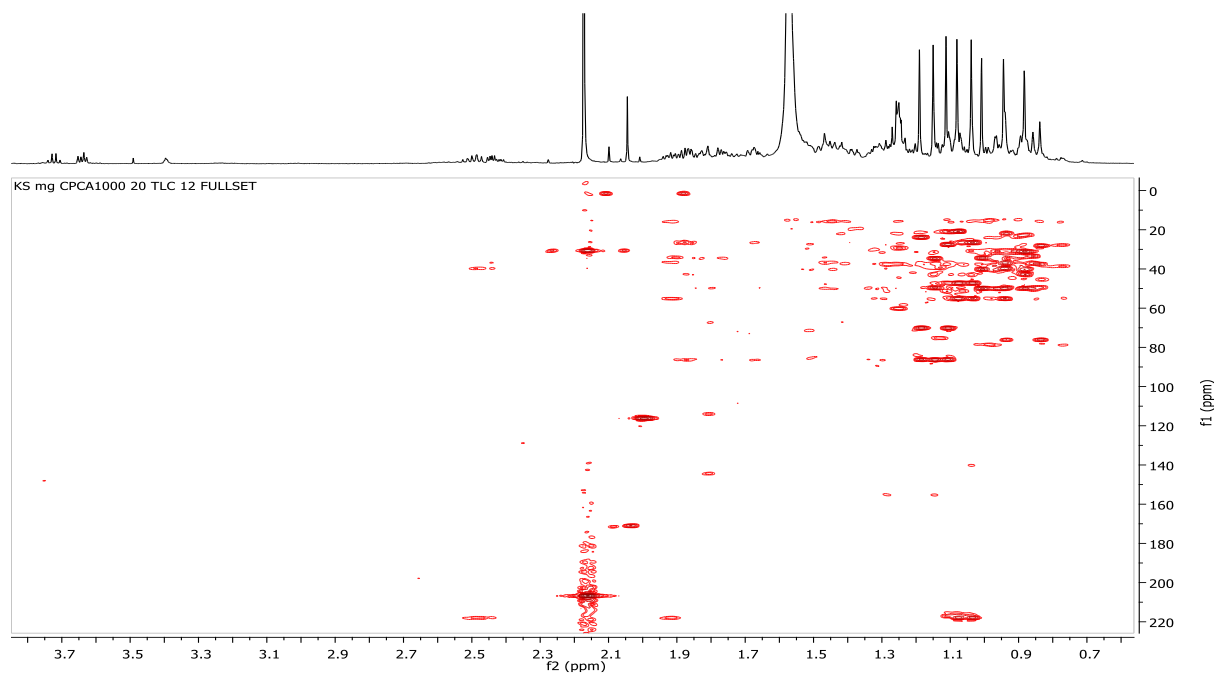
Εικόνα 71: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ της οκτοιλλόνης



Εικόνα 72: Φάσμα COSY της οκτιλλόνης



Εικόνα 73: Φάσμα HSQC-DEPT της οκτιλλόνης



Εικόνα 74: Φάσμα HMBC NMR της οκοτιλλόνης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις για τα φάσματα άνθρακα και πρωτονίου για την οκοτιλλόνη.

Πίνακας 21: Φασματοσκοπικά δεδομένα της οκοτιλλόνης

Οκοτιλλόνη			
	C	H	
	ppm	ppm	
1a	39.8	1.91	1H, m
1b		1.46	1H, m
2a	33.9	2.48	1H, m
2b		2.43	1H, m
3	218.0	-	
4	47.2	-	
5	55.1	1.38	1H, m
6a	19.5	1.56	
6b		1.32	
7	34.7	1.2-1.8	m
8	40.2	-	

9	49.9	1.43	1H, m
10	36.9	-	
11	22.2	1.2-1.8	m
12	25.6	1.2-1.8	m
13	42.9	1.2-1.8	m
14	50.1	-	
15	31.3	1.2-1.8	m
16	26.8	1.2-1.8	m
17	50.1	1.88	1H, m
18	16.5	0.89	3H, s
19	15.4	1.01	3H, s
20	86.4	-	
21	24.2	1.11	3H, s
22	34.4	1.66	2H, m
23a	26.3	1.85	1H, m
23b		1.75	1H, m
24	86.5	3.64	1H, m
25	70.1	-	
26	27.2	1.15	3H, s
27	28.0	1.19	3H, s
28	26.6	1.07	3H, s
29	20.8	1.03	3H, s
30	16.1	0.95	3H, s

2.4.5. Συμπεράσματα

Η μελέτη των τριτερπενίων της ρητίνης έδειξε την παρουσία πληθώρας ουσιών στο τριτερπενικό κλάσμα τα πιο πολλά από τα οποία είναι γνωστά μόρια και έχουν μελετηθεί και απομονωθεί ξανά στο παρελθόν. Μερικά από αυτά παραλήφθησαν σε καθαρή μορφή με τις μεθόδους απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων. Σε συνέχεια των μελετών σε μερικά από τα κλάσματα βρέθηκαν μόρια, τα οποία έπειτα από την απομόνωση τους από το σύνολο των κλασμάτων και την περαιτέρω μελέτη τους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας και δύο διαστάσεων, που δεν έχουν ξανααναφερθεί ή απομονωθεί από το

τριτερπενικό κλάσμα της ρητίνης της μαστίχας και κάποια από αυτά από κανένα άλλο φυτικό είδος.

2.5. Συμπεράσματα-Προοπτικές Μαστίχας

Το σύνολο των πειραμάτων και εργασιών της μεταπτυχιακής ειδίκευσης είχε να κάνει με την φυτοχημική μελέτη στη ρητίνη της μαστίχας Χίου (*Pistacia Lentiscus var. Chia*). Πραγματοποιήθηκαν μελέτες στα τρία μεγάλα μέρη της ρητίνης της μαστίχας το τριτερπενικό κλάσμα, το πολυμερές και το αιθέριο έλαιο.

Οι ερευνητικές διαδικασίες πάνω στο αιθέριο έλαιο είχαν να κάνουν με την παραλαβή του με δύο μεθόδους, την κλασική μέθοδο της υδραπόσταξης και της υδραπόσταξης υποβοηθούμενης με μικροκύματα αλλά και την περαιτέρω μελέτη στο αιθέριο έλαιο και το υδρόλυμα της ρητίνης και των πτητικών συστατικών τους. Στο πρώτο στάδιο της παραλαβής αποδείχτηκε ότι οι δύο μέθοδοι παραλαβής παρείχαν τα ίδια αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση του αιθερίου ελαίου αλλά και την ποσοτική και ποιοτική σύστασή του σε πτητικές ουσίες. Στη συνέχεια οι συγκρίσεις των αναλύσεων του αιθερίου και του υδρολύματος κατέληξαν σε κάποια σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά την ύπαρξη πτητικών συστατικών κάποια στο αιθέριο έλαιο και κάποια στο υδρόλυμα μόνο. Έπειτα οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην εφαρμογή της Χρωματογραφίας κατ'Αντιρροή (CPC) για την κλασμάτωση του αιθερίου ελαίου σε συμπυκνωμένα κλάσματα κι από κει για την περαιτέρω ανάλυση των κλασμάτων αυτών με την μέθοδο της Αέριας Χρωματογραφίας συνδεδεμένη με Φασματοσκοπία Μάζας GC-MS για την λήψη του αναλυτικού προφίλ των κλασμάτων. Οι συγκεκριμένες αναλύσεις απέδειξαν όχι μόνο την επιτυχή επιλογή της μεθόδου του CPC σαν μια καινοτόμο μέθοδο κλασμάτωσης του αιθερίου ελαίου της μαστίχας αλλά και την επακόλουθη λεπτομερή διερεύνηση των πτητικών συστατικών του αιθερίου που ανέδειξε ουσίες οι οποίες στην ανάλυση του κυρίου αιθερίου ελαίου βρίσκονται σε ίχνη. Έτσι επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση 25 επιπλέον πτητικών ουσιών οι οποίες για πρώτη φορά ανιχνεύονται στο αιθέριο έλαιο.

Εν συνεχεία των πειραμάτων για πρώτη φορά αναπτύχθηκε μία εύκολη, γρήγορη και με χαμηλή κατανάλωση διαλυτών μέθοδος για την παραλαβή του πολυμερούς από τη ρητίνη της μαστίχας με σκοπό την περαιτέρω μελέτη στο καθε αυτό πολυμερές αλλά και την διευκόλυνση της συνέχισης των μελετών στο υπόλοιπο τριτερπενικό κλάσμα. Το πολυμερές παραλήφθηκε

καθαρό με την διάλυση της ρητίνης μαστίχας σε διαλύτη DMSO και έπειτα με διαδικασίες καθαρισμού του από το υπολείμμα DMSO. Έτσι αναλύθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας διάστασης $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ και αφού ταυτοποιήθηκε και με φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων COSY, HSQC-DEPT και HMBC-NMR, επιβεβαιώθηκε η δομή του καθώς και η επιτυχία της απλής παραλαβής του από τη ρητίνη. Για την ολοκλήρωση της μελέτης του πολυμερούς πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού συνδεδεμένη με ανιχνευτές UV και IR ώστε να υπολογιστεί το μοριακό βάρος της ένωσης το οποίο κυμαίνεται στα 20.000 έως 50.000 Da.

Το τρίτο και τελευταίο μέρος των πειραματικών διαδικασιών αφορούσε την κλασμάτωση, ανάλυση και απομόνωση των τριτερπενίων της ρητίνης της μαστίχας. Με την μέθοδο της Χρωματογραφίας κατ' Αντιρροή (CPC) και την εφαρμογή των συνδυαστικών μεθόδων διαχωρισμού μεταβαλλόμενης ζώνης pH και βαθμιδωτής έκλυσης (step gradient) επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός και η παραλαβή των τριτερπενίων σε όξινα και ουδέτερα κλάσματα. Συνεχίζοντας τις πειραματικές εργασίες αναλύθηκαν τα κλάσματα με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC) και περαιτέρω με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ και επιλέχθηκαν κάποια από τα κλάσματα για την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών. Ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο **16** δευτερογενείς μεταβολίτες της μαστίχας εκ των οποίων **9** από αυτούς είναι κύριοι και **7** είναι δευτερεύοντες. Τα κύρια τριτερπένια που ταυτοποιήθηκαν είναι το **μαστιχαδιενολικό**, **μαστιχαδιενονικό** και τα ισομερή τους **ισομαστιχαδιενολικό** και **ισομαστιχαδιενονικό οξύ** αντίστοιχα, το **ολεανολικό οξύ**, η **διπτεροκαρπόλη**, η **ολεανονική αλδεΰδη** και η **τιρουκαλόλη** για τα οποία υπάρχουν δεδομένα και αναφορές σε άλλες μελέτες και η **μπετουλόνη** που δεν έχει αναφερθεί ξανά σαν συστατικό της ρητίνης. Οι δευτερεύοντες μεταβολίτες απομονώθηκαν από τα κλάσματά τους με την μέθοδο της Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Παρασκευαστικής κλίμακας (prep-TLC) και με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (prep-HPLC) και έπειτα μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τις μεθόδους πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας διάστασης $^1\text{H-NMR}$ και δύο διαστάσεων COSY, HSQC-DEPT και HMBC-NMR. Οι ουσίες που απομονώθηκαν είναι το **7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικό οξύ**, η **ερυθροδιόλη**, η **μαστιχαδιενεδιόλη**, η **ισομαστιχαδιενεδιόλη**, η **ολεανονική αλκοόλη**, η **μυρρανόλη C** και η **οκοτιλλόνη** για τις οποίες υπάρχουν αναφορές για

την ύπαρξή τους στην ρητίνη της μαστίχας μόνο για την μυρρανόλη C, ενώ για όλες τις άλλες δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την ρητίνη της μαστίχας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι για το μόριο **7,11-διοξο-24(Z)-μαστιχαδιενονικό οξύ** δεν υπάρχουν αναφορές ξανά για την ύπαρξή του σε κάποιο άλλο φυσικό προϊόν.

Κάποιες από τις προοπτικές στην επεξεργασία της ρητίνης της μαστίχας Χίου είναι οι ακόλουθες:

- Στις όλο και αυξανόμενες ανάγκες σε δραστικά προϊόντα ανοίγει ο δρόμος για μελέτη όλο και περισσότερων συστατικών της μαστίχας με πιθανή φαρμακευτική δράση.
- Διευκολύνεται η περαιτέρω μελέτη του πολυμερούς της μαστίχας για εύρεση πιθανών βιολογικών δράσεων αλλά και η εφαρμογή της παραλαβής του σε βιομηχανικά επίπεδα.
- Η ευρεία χρήση της μεθόδου της χρωματογραφίας κατ'αντιρροή (CPC) για την επιτυχή κλασμάτωση και την παραπέρα λεπτομερή μελέτη πολύπλοκων αιθερίων ελαίων.
- Η διεύρυνση και συστηματοποίηση της χρήσης της απόσταξης υποβοηθούμενης με μικροκύματα (MAHD) για την άμεση και οικολογική παραλαβή των αιθερίων ελαίων.

Βιβλιογραφία

1. Browicz K. *Pistacia lentiscus* cv. Chia (Anacardiaceae) on Chios island. *Plant Syst Evol* [Internet]. 1987 [cited 2019 Apr 7];155(1–4):189–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00936298>
2. Dimitrios G. Ierapetritis. The Geography of the Chios Mastic Trade from the 17th through to the 19th Century. [cited 2019 Jun 17]; Available from: <https://sci-hub.tw/http://journals.sfu.ca/era/index.php/era/article/view/372>
3. Paraschos S, Magiatis P, Gousia P, Economou V, Sakkas H, Papadopoulou C, et al. Chemical investigation and antimicrobial properties of mastic water and its major constituents. *Food Chem* [Internet]. 2011;129(3):907–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.043>
4. Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. A DOUBLE-BLIND CONTROLLED CLINICAL TRIAL OF MASTIC AND PLACEBO IN THE TREATMENT OF DUODENAL ULCER. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 1984 Oct 1 [cited 2019 Jun 18];11(5):541–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.1984.tb00864.x>
5. Kozhoridze G, Orlovsky N, Orlovsky L, Blumberg DG, Golan-Goldhirsh A. Geographic distribution and migration pathways of *Pistacia* - present, past and future. *Ecography (Cop)* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2019 Jun 18];38(11):1141–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ecog.01496>
6. Bozorgi M, Memariani Z, Mobli M, Salehi Surmaghi MH, Shams-Ardekani MR, Rahimi R. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology.

- ScientificWorldJournal [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2019 Jun 18];2013:219815. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453812>
7. Thomson Healthcare (Firm). PDR for herbal medicines. Thomson; 2007.
 8. Paraschos, Sotirios. Φυτοχημική & Φαρμακολογική μελέτη της μαστίχας της Χίου. 2010.
 9. No Title. p. www.gummastic.gr.
 10. No Title. p. <http://ayla.culture.gr/en/%CE%B7-%CE%BA%CE%B1%CE%B>.
 11. Ηρόδοτος. No Title.
 12. Modugno F, Ribechini E, Colombini MP. Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2019 Jul 3];20(11):1787–800. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.2507>
 13. Vieillescazes C, Coen S. Characterisation de quelques resines utilisees en Egypte ancienne. Stud Conserv [Internet]. 1993 Nov 19 [cited 2019 Jun 18];38(4):255–64. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/sic.1993.38.4.255>
 14. Πλήνιος. No Title.
 15. Mizzoni F, Cesaro SN. Study of the organic residue from a 2600-year old Etruscan plumpekanne. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2019 Jun 18];68(2):377–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142506007189>
 16. Dioscorides P. De materia medica - Pedanius Dioscorides - Βιβλία Google [Internet]. 1829 [cited 2019 Sep 17]. Available from: https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=dGw-AAAACAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=de+materia+medica&ots=q2QpoAiWe_&sig=6Jpq0nCb21E8FrB7DJg8sEpcKJc&redir_esc=y#v=onepage&q=de+materia+medica&f=false

17. Γαληνός. No Title.
18. Valiakos E, Marselos M, Sakellaridis N, Constantinidis T, Skaltsa H. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the “Antidotes” in Nikolaos Myrepsos’ Dynameron. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015 Apr 2 [cited 2019 Jun 18];163:68–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115000136>
19. Valiakos E, Marselos M, Sakellaridis N, Constantinidis T, Skaltsa H. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the “Elements Alpha to Delta” in Nikolaos Myrepsos’ Dynameron. Part II. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2017 Jun 9 [cited 2019 Jun 18];205:246–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874117303185>
20. Lev E, Amar Z. Reconstruction of the inventory of materia medica used by members of the Jewish community of medieval Cairo according to prescriptions found in the Taylor–Schechter Genizah collection, Cambridge. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2006 Dec 6 [cited 2019 Jun 18];108(3):428–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106002960>
21. Lev E, Amar Z. “Fossils” of practical medical knowledge from medieval Cairo. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2008 Sep 2 [cited 2019 Jun 18];119(1):24–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874108002900>
22. Lardos A. The botanical materia medica of the Iatrosophikon—A collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2006 Apr 6 [cited 2019 Jun 18];104(3):387–406. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106000043>
23. Lardos A, Prieto-Garcia J, Heinrich M. Resins and Gums in Historical Iatrosophia Texts from Cyprus – A Botanical and Medico-pharmacological Approach. *Front Pharmacol* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2019 Jun 18];2:32. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2011.00032/abstract>

24. Jarić S, Mitrović M, Djurdjević L, Kostić O, Gajić G, Pavlović D, et al. Phytotherapy in medieval Serbian medicine according to the pharmacological manuscripts of the Chilandar Medical Codex (15–16th centuries). *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2019 Jun 18];137(1):601–19. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111004338>
25. Freedman P. Mastic: a Mediterranean luxury product. *Mediterr Hist Rev* [Internet]. 2011 Jun 19 [cited 2019 Jun 18];26(1):99–113. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09518967.2010.536673>
26. Moussaieff A, Fride E, Amar Z, Lev E, Steinberg D, Gallily R, et al. The Jerusalem Balsam: From the Franciscan Monastery in the old city of Jerusalem to Martindale 33. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2005 Oct 3 [cited 2019 Jun 18];101(1–3):16–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105002667>
27. No Title. p. <https://www.gummastic.gr/el/company/istoria>.
28. Della A, Paraskeva-Hadjichambi D, Hadjichambis AC. An ethnobotanical survey of wild edible plants of Paphos and Larnaca countryside of Cyprus. *J Ethnobiol Ethnomed* [Internet]. 2006 Sep 4 [cited 2019 Jun 18];2(1):34. Available from: <http://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4269-2-34>
29. Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* [Internet]. 1999 Dec 1 [cited 2019 Jun 18];42(11–12):665–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0507.1999.00499.x>
30. Hanlidou E, Karousou R, Kleftoyanni V, Kokkini S. The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2019 Jun 18];91(2–3):281–99. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104000364>
31. Medicines Agency E. Assessment report on *Pistacia lentiscus* L., resin (mastic) [Internet]. [cited 2019 Sep 17]. Available from: www.ema.europa.eu/contact

32. Xynos N, Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis LA, Aligiannis N. Supercritical CO₂ extraction of mastic gum and chemical characterization of bioactive fractions using LC-HRMS/MS and GC-MS. *J Supercrit Fluids*. 2018;133(October 2017):349–56.
33. Kaliora AC, Mylona A, Chiou A, Petsios DG, Andrikopoulos NK. Detection and Identification of Simple Phenolics in *Pistacia lentiscus* Resin. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2004;27(2):289–300.
34. Barton DHR, Seoane E. 801. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticdienonic acid. *J Chem Soc [Internet]*. 1956 [cited 2018 Dec 1];4150. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=jr9560004150>
35. Van Den Berg KJ, Van Der Horst J, Boon JJ, Sudmeijer OO. Cis-1,4-poly- β -myrcene; The structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. *Tetrahedron Lett*. 1998;39(17):2645–8.
36. Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia. *J Agric Food Chem [Internet]*. 2005;53:7681–5. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-960856>
37. Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis A-L, Chinou BI, Mitaku S. Chemical composition and antimicrobial activity of the Essential oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Planta Med*. 1999;65:752–4.
38. Papageorgiou VP, Mellidis AS, Argyriadou N. The chemical composition of the essential oil of mastic gum. *J Essent Oil Res*. 1991;3(2):107–10.
39. Papanicolaou D, Melanitou M, Katsaboxakis K. Changes in chemical composition of the essential oil of Chios “mastic resin” from *Pistacia lentiscus* var. Chia tree during solidification and storage. *Dev Food Sci*. 1995;37(C):303–10.
40. Kokolakis AK, Kouvarakis AN, Katerinopoulos HE. Effect of hydrodistillation with phosphoric acid on the yield of Chios mastic gum essential oil. *Flavour Fragr J [Internet]*.

2010 Jan [cited 2018 Dec 2];25(1):48–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1958>

41. Petersen RK, Christensen KB, Assimopoulou AN, Fretté X, Papageorgiou VP, Kristiansen K, et al. Pharmacophore-driven identification of PPAR γ agonists from natural sources. *J Comput Aided Mol Des*. 2011;25(2):107–16.
42. Xynos N, Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis LA, Aligiannis N. Supercritical CO₂ extraction of mastic gum and chemical characterization of bioactive fractions using LC-HRMS/MS and GC-MS. *J Supercrit Fluids* [Internet]. 2018;133(October 2017):349–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.011>
43. Daferera D, Pappas C, Tarantilis PA, Polissiou M. Quantitative analysis of α -pinene and β -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chem*. 2002;77(4):511–5.
44. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomed Chromatogr*. 2004;19(8):285–311.
45. Dabos KJ, Sfika E, Vlatka LJ, Giannikopoulos G. The effect of mastic gum on *Helicobacter pylori*: A randomized pilot study. *Phytomedicine* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2019 Jun 18];17(3–4):296–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711309002396>
46. Barton, D. H. R. SE. Triterpenoids. Part XXII. The Constitution and Stereochemistry of Masticadienonic Acid. *J Chem Soc*. 1956;189(4150):4150–7.
47. Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P. Chios Mastic Gum Extract and Isolated Phytosterol Tirucallol Exhibit Anti-Inflammatory Activity in Human Aortic Endothelial Cells. *Exp Biol Med* [Internet]. 2009;234(5):553–61. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3181/0811-RM-338>
48. Kivçak B, Akay S. Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry.

- Fitoterapia. 2005;76(1):62–6.
49. Papageorgiou VP, Bakola-Christianopoulou MN, Apazidou KK, Psarros EE. Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J Chromatogr A*. 1997;769(2):263–73.
 50. Paraschos S, Magiatis P, Gikas E, Smyrnioudis I, Skaltsounis A-L. Quality profile determination of Chios mastic gum essential oil and detection of adulteration in mastic oil products with the application of chiral and non-chiral GC–MS analysis. *Fitoterapia* [Internet]. 2016 Oct;114:12–7. Available from: <file://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X16301824>
 51. Jin Y, Zhao J, Jeong KM, Yoo DE, Han SY, Choi SY, et al. A simple and reliable analytical method based on HPLC–UV to determine oleanonic acid content in Chios gum mastic for quality control. *Arch Pharm Res*. 2017;40(1):49–56.
 52. Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. *Chia*. *Biomed Chromatogr*. 2005;19(8):586–605.
 53. Daifas DP, Smith JP, Blanchfield B, Sanders G, Austin JW, Koukoutsis J. Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2019 Jun 18];94(3):313–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504000790>
 54. Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phyther Res* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2019 Jun 18];17(5):501–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1185>
 55. Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S, Dikalov S. Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF- α induced oxidative stress. *Nutr J* [Internet]. 2011 Dec 6 [cited 2019 Jun 18];10(1):64.

Available from: <http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-10-64>

56. Dedoussis GV., Kaliora AC, Psarras S, Chiou A, Mylona A, Papadopoulos NG, et al. Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2019 Jun 18];174(2):293–303. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915004001364>
57. Georgiadis I, Karatzas T, Korou L-M, Katsilambros N, Perrea D. Beneficial Health Effects of Chios Gum Mastic and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Indications of Common Mechanisms. *J Med Food* [Internet]. 2015 Jan 6 [cited 2019 Jun 18];18(1):1–10. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2014.0021>
58. Vasilios Athanasiadis OG. Study of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chios Mastic Gum Fractions(Neutral, Acidic) Before and After Encapsulation in Liposomes. *J Food Process Technol* [Internet]. 2014;05(08). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/study-of-antioxidant-and-antimicrobial-activity-of-chios-mastic-gum-fractions-neutral-acidic-before-and-after-encapsulation-in-liposomes-2157-7110.1000355.php?aid=30864>
59. Papada E, Torović L, Amerikanou C, Kalogeropoulos N, Smyrnioudis I, Kaliora A, et al. Modulation of Free Amino Acid Profile in Healthy Humans Administered with Mastiha Terpenes. An Open-Label Trial. *Nutrients* [Internet]. 2018 Jun 3 [cited 2019 Jun 18];10(6):715. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/6/715>
60. Huwez FU, Thirlwell D, Cockayne A, Ala'aldein AA, Path MRC. Mastic Gum Kills *Helicobacter pylori* [Internet]. Vol. 339, *New England Journal of Medicine*. 1998 [cited 2019 Jun 18]. Available from: <http://estianippon.jp/design/estia/pdf/Mastic004.pdf>
61. Marone P, Bono L, Leone E, Bona S, Carretto E, Perversi L. Bactericidal Activity of *Pistacia lentiscus* Mastic Gum Against *Helicobacter pylori*. *J Chemother* [Internet]. 2001 Jan 18 [cited 2019 Jun 18];13(6):611–4. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/joc.2001.13.6.611>

62. Kottakis F, Lamari F, Matragkou C, Zachariadis G, Karamanos N, Choli-Papadopoulou T. Arabino-Galactan Proteins from *Pistacia lentiscus* var. *chia*: isolation, characterization and biological function. *Amino Acids* [Internet]. 2008 Apr 21 [cited 2019 Jun 18];34(3):413–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-007-0554-8>
63. Loughlin MF, Ala'Aldeen DA, Jenks PJ. Monotherapy with mastic does not eradicate *Helicobacter pylori* infection from mice. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2019 Jun 18];51(2):367–71. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkg057>
64. Bebb JR, Bailey-Flitter N, Ala'Aldeen D, Atherton JC. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2003 Aug 13 [cited 2019 Jun 18];52(3):522–3. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkg366>
65. Karygianni L, Cecere M, Skaltsounis AL, Argyropoulou A, Hellwig E, Aligiannis N, et al. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Jun 26 [cited 2019 Jun 18];2014:839019. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054150>
66. Aksoy A, Duran N, Koksall F. In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and *mutans streptococci*. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2019 Jun 18];51(6):476–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996905002669>
67. Koychev S, Dommisch H, Chen H, Pischon N. Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens. *J Periodontol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Jun 18];88(5):511–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2017.150691>
68. Topitsoglou-Themeli V, Dagalis P, Lambrou D. [A Chios mastiche chewing gum and oral hygiene. I. The possibility of reducing or preventing microbial plaque formation]. *Hell Stomatol Chron* [Internet]. 1984 [cited 2019 Jun 18];28(3):166–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6599089>

69. Mason JC, Libby P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: Mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. *Eur Heart J*. 2015;36(8):482–9.
70. Zhou L, Satoh K, Takahashi K, Watanabe S, Nakamura W, Maki J, et al. Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *In Vivo (Brooklyn)*. 2009;23(4):583–90.
71. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 18]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/47728297>
72. Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedoussis GVZ, Andrikopoulous NK. Chios mastic treatment of patients with active Crohn’s disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Feb 7;13(5):748–53.
73. Balan K V, Demetzos C, Prince J, Dimas K, Cladaras M, Han Z, et al. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum. *In Vivo [Internet]*. 2005 Jan 1 [cited 2019 Jun 18];19(1):93–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15796160>
74. Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Lampri E, Fitsiou E, Vasileiadis S, Vamvakias M, et al. Dietary mastic oil extracted from *Pistacia lentiscus* var. chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Sci Rep [Internet]*. 2017 Dec 19 [cited 2019 Jun 18];7(1):3782. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-03971-8>
75. Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A, Koika V, Kolisis FN, Papapetropoulos A, et al. Mastic Oil from *Pistacia lentiscus* var. chia Inhibits Growth and Survival of Human K562 Leukemia Cells and Attenuates Angiogenesis. *Nutr Cancer [Internet]*. 2006 Jul [cited 2019 Jun 18];55(1):86–93. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1207/s15327914nc5501_11
76. Magkouta S, Stathopoulos GT, Psallidas I, Papapetropoulos A, Kolisis FN, Roussos C, et al.

- Protective Effects of Mastic Oil From *Pistacia Lentiscus* Variation *Chia* Against Experimental Growth of Lewis Lung Carcinoma. *Nutr Cancer* [Internet]. 2009 Sep 23 [cited 2019 Jun 18];61(5):640–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580902825647>
77. Loutrari H, Magkouta S, Papapetropoulos A, Roussos C, Loutrari H, Magkouta S, et al. Mastic Oil Inhibits the Metastatic Phenotype of Mouse Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2011 Feb 23 [cited 2019 Jun 18];3(1):789–801. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/1/789>
78. Vallianou I, Peroulis N, Pantazis P, Hadzopoulou-Cladaras M. Camphene, a Plant-Derived Monoterpene, Reduces Plasma Cholesterol and Triglycerides in Hyperlipidemic Rats Independently of HMG-CoA Reductase Activity. Hofmann A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 3 [cited 2019 Jun 18];6(11):e20516. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020516>
79. Andreadou I, Mitakou S, Paraschos S, Efentakis P, Magiatis P, Kaklamanis L, et al. “*Pistacia lentiscus* L.” reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. *Phytomedicine* [Internet]. 2016 Oct 15 [cited 2019 Jun 18];23(11):1220–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711316300769>
80. Triantafyllou A, Chaviaras N, Sergentanis TN, Protopapa E, Tsaknis J. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2007 Apr 20 [cited 2019 Jun 18];111(1):43–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874106005733>
81. Katsanou ES, Kyriakopoulou K, Emmanouil C, Fokialakis N, Skaltsounis A-L, Machera K. Modulation of CYP1A1 and CYP1A2 Hepatic Enzymes after Oral Administration of Chios Mastic Gum to Male Wistar Rats. Vontas J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 20 [cited 2019 Jun 18];9(6):e100190. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0100190>

82. Ur Rehman MS, Kamran SH, Ahmad M, Akhtar U. Anti-diabetic activity of crude *Pistacia lentiscus* in alloxan-induced diabetes in rats. *Bangladesh J Pharmacol*. 2015;10(3):543–7.
83. MIKHAIL GR, SELAK L, SALO S. Reinforcement of Surgical Adhesive Strips. *J Dermatol Surg Oncol*. 1986;12(9):904–8.
84. Mikhail GR, Selak L, Salo S, Balle MR. The efficacy of adhesives in the application of wound dressings. *J Burn Care Rehabil*. 1989;10(3):216–9.
85. Sawidis T, Yurukova L, Askitis T. Chios mastic, a natural supplement for zinc to enhance male sexuality and prostate function. *Pharm Biol* [Internet]. 2010 Jan 2 [cited 2019 Jun 18];48(1):48–54. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903029399>
86. Berthod A, Maryutina T, Spivakov B, Shpigun O, Sutherland IA. Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Jun 18];81(2):355–87. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2009.81.issue-2/pac-rep-08-06-05/pac-rep-08-06-05.xml>
87. Berthelot C.H. JE. On the laws that operate for the partition of a substance between two solvents. *Ann Chim Phys*. 1872;4(26):82–6.
88. Margraff R, Intes O, Renault J, Garret P. Partitron 25, a Multi-Purpose Industrial Centrifugal Partition Chromatograph: Rotor Design and Preliminary Results on Efficiency and Stationary Phase Retention. *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2005 Jul 6 [cited 2019 Jun 18];28(12–13):1893–902. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/JLC-200063539>
89. Duret P, Fakhfakh MA, Herrenknecht C, Fournet A, Franck X, Figadère B, et al. Preparative separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution. *J Chromatogr A* [Internet]. 2003 Sep 5 [cited 2019 Jun 18];1011(1–2):55–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303010203>

90. Ha YW, Kim YS. Preparative isolation of six major saponins from *Platycodi Radix* by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem Anal* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2019 Jun 18];20(3):207–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.1116>
91. Berthod A, Carda-Broch S. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. *J Chromatogr A* [Internet]. 2004 May 28 [cited 2019 Jun 18];1037(1–2):3–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304000445>
92. Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2005 Feb 18 [cited 2019 Jun 18];1065(2):145–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304023374>
93. Roullier C, Chollet-Krugler M, Bernard A, Boustie J. Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea*. *J Chromatogr B* [Internet]. 2009 Jul 15 [cited 2019 Jun 18];877(22):2067–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023209003766>
94. Foucault A. Centrifugal partition chromatography edited by Alain P. Foucault.pdf.
95. Foucault EP. Theory of centrifugal partition chromatography. New York; 1995. 25–50 p.
96. Foucault A., Chevolut L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J Chromatogr A* [Internet]. 1998 May 29 [cited 2019 Jun 18];808(1–2):3–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398001216>
97. Ungureanu C, Marchal L, Chirvase AA, Foucault A. Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2019 Jun 18];132:406–9. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412018019>

98. Berka-Zougali B, Ferhat M-A, Hassani A, Chemat F, Allaf KS, Berka-Zougali B, et al. Comparative Study of Essential Oils Extracted from Algerian *Myrtus communis* L. Leaves Using Microwaves and Hydrodistillation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Apr 12 [cited 2019 Jun 18];13(4):4673–95. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/4/4673>
99. Asbahani A El, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EHA, Casabianca H, et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharm* [Internet]. 2015 Apr 10 [cited 2019 Jun 18];483(1–2):220–43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517314009661>
100. Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, et al. GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2005 Feb 28;579(6):1332–7.
101. Roberts C. Book review. *J Archaeol Sci*. 2001;28(5):566–567.
102. Paraschos S, Magiatis P, Mitakou S, Petraki K, Kalliaropoulos A, Maragkoudakis P, et al. In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2018 Dec 7];51(2):551–9. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.00642-06>
103. Gao JB, Li GY, Huang J, Wang HY, Zhang K, Wang JH. A new tetracyclic triterpenoid compound from Mastic. *J Asian Nat Prod Res*. 2013;15(4):400–3.
104. Sharifi MS, Hazell SL. Isolation, Analysis and Antimicrobial Activity of the Acidic Fractions of Mastic, Kurdica, Mutica and Cabolica Gums from Genus *Pistacia*. *Glob J Health Sci* [Internet]. 2011;4(1):217–28. Available from: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/gjhs/article/view/13017>
105. Sharifi MS, Hazell SL. Fractionation of mastic gum in relation to antimicrobial activity. *Pharmaceuticals*. 2009;2(1):2–10.

106. Van Den Berg KJ, Van Der Horst J, Boon JJ, Sudmeijer OO. Cis-1,4-poly- β -myrcene: the Structure of the polymeric fraction of Mastic Resin (*Pistacia Lentiscus* L.) Elucidated. *Tetrahedron Lett.* 1998;39:2645–8.
107. Giner-Larza EM, Máñez S, Giner RM, Recio MC, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, et al. Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebinthus* galls. *Planta Med.* 2002;68(4):311–5.
108. Seoane E. Further Crystalline Constituents of Gum Mastic. *J Am Chem Soc.* 1956;189(4158):4158–60.
109. Cole BJW, Bentley MD, Hua Y, Bu L. Triterpenoid Constituents in The Outer Bark of *Betula Alleghaniensis* (Yellow Birch). *J Wood Chem Technol.* 1991;11(2):209–23.
110. Liu M, Yeng S, Jin L, Hu D, Wu Z, Yang S. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *belamcanda chinensis* (L.) DC roots and their antitumor activities. *Molecules.* 2012 May;17(5):6156–69.
111. Marner FJ, Freyer A, Lex J. Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. *Phytochemistry.* 1991;30(11):3709–12.
112. Smirnova IE, Thu HDT, Kazakova OB, Tolstikov GA, Kukovinets OS, Lobov AN, et al. Ozonolysis of dipterocarpol and its derivatives. *Russ J Org Chem.* 2012;48(10):1370–6.
113. Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, Chrousos GP, Lekakis I, Moutsatsou P. Chios Mastic Gum Extract and Isolated Phytosterol Tirucalol Exhibit Anti-Inflammatory Activity in Human Aortic Endothelial Cells. *Exp Biol Med [Internet].* 2009 May [cited 2018 Dec 2];234(5):553–61. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3181/0811-RM-338>
114. Huang H-C, Liaw C-C, Yang H-L, Hseu Y-C, Kuo H-T, Tsai Y-C, et al. Lanostane triterpenoids and sterols from *Antrodia camphorata*. *Phytochemistry [Internet].* 2012 Dec 1 [cited 2019 Jul 2];84:177–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942212003780>
115. Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M, Beltrán G, Gaforio JJ.

- Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2013 Dec 18 [cited 2019 Jul 3];61(50):12173–82. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf403154e>
116. Jin Q, Jin H-G, Kim AR, Woo E-R. A New Megastigmane Palmitate and a New Oleanane Triterpenoid from *Aster yomena* Makino. *Helv Chim Acta* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2019 Jul 2];95(8):1455–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hlca.201200035>
117. Caputo R, Mangoni L, Monaco P, Palumbo G. Triterpenes of galls of *Pistacia terebinthus*: Galls produced by *Pemphigus utricularius*. *Phytochemistry* [Internet]. 1975 Mar [cited 2019 Jul 4];14(3):809–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942275830433>
118. Caputo R, Mangoni L, Monaco P, Palumbo G. Triterpenes from the galls of *Pistacia palestina*. *Phytochemistry* [Internet]. 1979 Jan [cited 2019 Jul 4];18(5):896–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942279800461>
119. Razakarivony AA, Lenta BN, Andriamihaja B, Michalek C, Razanamahefa B, Razafimahefa DR, et al. Long-chain alkyl-substituted gentisic acid and benzoquinone derivatives from the root of *Micronychia tsiramiramy* (Anacardiaceae). *Zeitschrift für Naturforsch B* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2019 Jul 4];71(4):297–303. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/znb.2016.71.issue-4/znb-2015-0188/znb-2015-0188.xml>
120. Monaco P, Caputo R, Palumbo G, Mangoni L. Triterpenes from the galls of *pistacia lentiscus*. *Phytochemistry* [Internet]. 1973 Oct [cited 2019 Jul 4];12(10):2534–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942273804728>
121. Caputo R, Mangoni L, Monaco P, Palumbo G, Aynehchi Y, Bagheri M. Triterpenes from the bled resin of *Pistacia vera*. *Phytochemistry* [Internet]. 1978 Jan [cited 2019 Jul 4];17(4):815–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200942456>

122. D'Ambola M, Malafronte N, Gualtieri M, Hernández V, Vassallo A, Severino L. A Novel Tirucallane-type Triterpene and Sesquiterpene from *Trichilia maynasia*. *Nat Prod Commun* [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 Sep 23];11(4):1934578X1601100. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1601100406>
123. Rao MM, Meshulam H, Zelnik R, Lavie D. *Cabralea eichleriana* dc. (meliaceae)—I structure and stereochemistry of wood extractives. *Tetrahedron* [Internet]. 1975 Jan [cited 2019 Jul 5];31(4):333–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0040402075800421>
124. Choosang K, Gisele V, Severino P, Fernandes JB, Casal CM, Choosang K, et al. Evaluation of Effect of Triterpenes and Limonoids on Cell Growth, Cell Cycle and Apoptosis in Human Tumor Cell Lines SBVEPS-Emergência do vírus Schmallenberg em Portugal e na Sérvia (FCT/Proc.º 441.00 SERVIA) View project HEPeCONTROL-Hepatitis E virus epidemiology, safety and control in Portugal View project Evaluation of Effect of Triterpenes and Limonoids on Cell Growth, Cell Cycle and Apoptosis in Human Tumor Cell Lines. *Cancer Agents Med Chem* [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 5];10:769–76. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/233660756>