



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΟΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**« Αξιοποίηση των υποπροϊόντων του είδους *Pistacia
lentiscus var. chia* για την ανάπτυξη προϊόντων
υψηλής προστιθέμενης αξίας»**



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
Χριστίνα-Ζωή Μπακάλη, Χημικός
Αθήνα, Φεβρουάριος 2018

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος
Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

« Αξιοποίηση των υποπροϊόντων του είδους Pistacia
lentiscus var. chia για την ανάπτυξη προϊόντων υψηλής
προστιθέμενης αξίας»

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

Χριστίνα-Ζωή Μπακάλη, χημικός, Τμήμα Χημείας, Εθνικό
και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Νεκτάριος Αληγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Καθηγητής, Τομέας
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Νεκτάριος Αληγιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Νικόλαος Φωκιαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας
Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Αφιερώνεται στον κοινωνικό ρόλο της επιστήμης

Η επιστημονική έρευνα και οι ανακαλύψεις είναι δεμένα με την κοινωνική πρακτική, με την πρακτική της παραγωγής και με την πρακτική της ταξικής πάλης. Η επιστήμη γίνεται η επαναστατική δύναμη της κοινωνίας.

Maurice Cornforth

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών και στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου ParisDescartes στο Παρίσι.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων και Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για την ανάθεση του θέματος της εργασίας, την εξαιρετική συνεργασία μας, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τετράμηνη μετακίνηση μέσω του προγράμματος EXANDAS στο πανεπιστήμιο Paris Descartes στη Γαλλία.

Τους Αναπληρωτές Καθηγητές, Μαρίνα Κριτσανίδα και Raphaël Grougnet για την εξαιρετική συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της μετακίνησης μου στη Γαλλία και συνολικά για τη βοήθεια που μου προσέφεραν τόσο σε επαγγελματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Το Δρ. Διονύση Αμπάτη για τη βοήθειά του, την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, και την καλή συνεργασία που είχαμε.

Τον Ηλία Σμυρνιούδη και την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου για την προσφορά του υλικού και για τη στήριξη που μου προσέφερε κυρίως για τη μετακίνησή μου στη Γαλλία.

Την Marylin Lecsö-Bornet για την πολύτιμη συνεισφορά της στη διεξαγωγή των αντιβακτηριακών πειραμάτων.

Την εταιρεία Pellas Nature για τη διεξαγωγή των πειραμάτων σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ελαιόλαδου.

Το Δρ. Γιώργο Παπαευσταθίου για τη συνεργασία μας και την αμέριστη βοήθεια του κατά τη διεξαγωγή του SFE.

Το Δρ. Νίκο Ξυνό, για τη βοήθειά του και τις συμβουλές του στη διεξαγωγή του CPC

Τον Υποψήφιο διδάκτωρα, Sergio Enrique Ortiz, για τη βοήθειά του στις βιολογικές δοκιμές και την υποστήριξή του.

Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Βάιο Αμούντζια και Γρηγόρη Ζανιά, για την άψογη συνεργασία και την στήριξη που μου παρείχαν σε καθημερινή βάση.

Τον Πάνο Πολυχρονόπουλο, το Μιχάλη Μακρυγιαννάκη, τη Ροζαλία Μιχαλέα, τη Βασούλα Μπόζνου, την Πηνελόπη Βλάχου, την Εύα Ντίνα, τη Δήμητρα Χρίστου, το Νίκο Κατσίνα, τη Γεωργία Ντάση, τη Julia Morais Fernandes και τη Nabiha Benalia για τη βοήθειά τους και τη φιλία τους.

Όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές που απαρτίζουν το εργαστήριο για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, στο Γιάννη και στους φίλους μου για την υπομονή τους και την στήριξή τους σε όλα μου τα βήματα.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
SUMMARY	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	12
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	15
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
A.1. Περιγραφή του είδους <i>Pistacia lentiscus var. chia</i> και της παραγόμενης ρητίνης	16
A.1.1. Συστηματική κατάταξη	16
A.1.2. Βοτανική περιγραφή	16
A.1.3. Μοναδικότητα της ποικιλίας της Χίου	17
A.1.4. Εθνοφαρμακολογικές αναφορές για τη μαστίχα Χίου	18
A.1.5. Ιστορική αναδρομή για την παραγωγή μαστίχας - Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου	19
A.1.6. Η «παραδοσιακή» θεραπευτική χρήση της μαστίχας Χίου	21
A.2. Προϊόντα και υποπροϊόντα του μαστιχόδεντρου – Χημική σύσταση, Βιολογικές ιδιότητες	22
A.2.1. Ρητίνη/Μαστίχα	22
A.2.2. Ακάθαρτη μαστίχα	27
A.2.3. Αιθέριο έλαιο ρητίνης	28
A.2.4. Κολοφώνιο	30
A.2.5. Μαστιχόνερο	31
A.2.6. Καρποί	31
A.2.7. Φύλλα και κλαδιά	32
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
B.1. Περιγραφή μεθόδων/τεχνικών	34
B.1.1. Εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών (SFE)	34
B.1.2. Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής	37
B.1.3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	40
B.1.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-απόδοσης (HPLC) / μέσης πίεσης (MPLC)	42
B.1.5. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με Μικροκύματα (MAE)	43
B.1.6. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με Υπέρηχους (UAE)	44

B.1.8. Αντιβακτηριακός έλεγχος.....	44
B.1.9. Έλεγχος φαινολικού φορτίου και αντιοξειδωτικής δράσης.....	45
B.1.10. Έλεγχος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του ελαιόλαδου.	49
ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ: Κολοφώνιο	51
B.2. Απομάκρυνση του πολυμερούς από κολοφώνιο/μαστίχα με τη συμβατική μέθοδο	52
B.3. Εκχύλιση του κολοφωνίου με τη χρήση της τεχνικής των υπερκρίσιμων ρευστών	57
B.4. Ανάπτυξη πρωτοκόλλου απομάκρυνσης του πολυμερούς με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής	60
B.5. Παρασκευή ελαιόλαδου εμπλουτισμένου σε τερπένια.	68
ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: Ακάθαρτη μαστίχα	75
B.6. Εκχύλιση της ακάθαρτης μαστίχας με τη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών	76
B.7. Αξιολόγηση του εκχυλίσματος της ακάθαρτης μαστίχας με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής	79
ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ: Καρποί.....	83
B.8. Κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των καρπών με υγρή-υγρή εκχύλιση.	84
B.9. Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του EtOAc με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής	84
B.10. Απομόνωση μεταβολιτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	88
B.11. Απομόνωση μεταβολιτών με υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης	99
B.12. Αντιβακτηριακός έλεγχος εκχυλισμάτων/κλασμάτων	103
B.13. Αντιοξειδωτικός έλεγχος εκχυλισμάτων	124
B.14 Ταυτοποίηση μεταβολιτών με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.....	126
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	156
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	158

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρόγραμμα EXANDAS

Το πρόγραμμα EXANDAS είναι ένα ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα που στοχεύει στην εφαρμογή αναδυόμενων τεχνολογιών και τεχνολογιών αιχμής στον τομέα των Φυσικών Προϊόντων για την πλήρη και αποτελεσματική εκμετάλλευση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων που παράγονται κατά την επεξεργασία οικονομικά σημαντικών αρωματικών/φαρμακευτικών φυτών, με απώτερο στόχο την ανάπτυξη νέων καλλυντικών και συμπληρωμάτων διατροφής.

Σύγχρονες τεχνικές όπως ASE, CPC, MAE, SFC κλπ. χρησιμοποιούνται για την απομόνωση, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό των δραστικών συστατικών που θα διερευνηθούν περαιτέρω με σκοπό την εμπορική εκμετάλλευσή τους. Ένα ευρύ φάσμα βιοπροσδιορισμών λαμβάνει χώρα με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντιμικροβιακής και αντιγηραντικής ιδιότητας όλων των παραγόμενων φυσικών προϊόντων.

Εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία και αξιολόγηση των υποπροϊόντων (κολοφώνιο, ακάθαρτη μαστίχα, καρποί) της καλλιέργειας του φυτού *Pistacia lentiscus* var. *chia* και της μεταποίησης της παραγόμενης ρητίνης. Σκοπός ήταν τόσο η δημιουργία εκχυλισμάτων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όσο και η βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση ενώσεων με σημαντική βιολογική δράση.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, διερευνήθηκε ο βέλτιστος τρόπος επεξεργασίας-εκχύλισης του κολοφωνίου προκειμένου να επιτευχθεί η απομάκρυνση του περιεχόμενου πολυμερούς, το οποίο δημιουργεί σημαντικά προβλήματα στη διαδικασία αξιοποίησής του για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακοκαλλυντικών προϊόντων. Στη συνέχεια, επιλέγοντας την πράσινη τεχνική της εκχύλισης με υπερκρίσιμο CO₂, καθώς και τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής, ερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για την παραλαβή ενός εκχυλίσματος πλούσιου σε τερπενικό φορτίο και όσο το δυνατό πιο φτωχού σε πολυμερές. Τελικά, διερευνήθηκε η ενσωμάτωση του παραγόμενου εκχυλίσματος στο ελαιόλαδο με τη χρήση της τεχνικής εκχύλισης με μικροκύματα, ώστε να δημιουργηθεί ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Στο δεύτερο μέρος, πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία της ακάθαρτης μαστίχας με σκοπό την παραλαβή ενός εκχυλίσματος εμπλουτισμένου σε βιοδραστικά τριτερπένια σε ήμι-πυλωτική κλίμακα. Διεξήχθη εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμου

διοξειδίου του άνθρακα σε επιλεγμένες συνθήκες, με βάση προγενέστερα πειράματα τα οποία είχαν λάβει χώρα σε μαστίχα α'-ποιότητας στα πλαίσια προγενέστερων μελετών της ερευνητικής μας ομάδας, ενώ στη συνέχεια αξιολογήθηκε το παραληφθέν εκχύλισμα ως προς την περιεκτικότητά του σε πολυμερές και τερπένια με τη χρήση της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής και της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.

Στο τρίτο μέρος υλοποιήθηκε φυτοχημική ανάλυση στους καρπούς, οι οποίοι συλλέχθηκαν από το θάμνο *Pistacia lentiscus* var. *chia* στο στάδιο ωρίμανσής τους, προκειμένου να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν βιοδραστικές ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση. Μέσω μιας σειράς χρωματογραφικών τεχνικών (φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε αναλυτική και παρασκευαστική κλίμακα, υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης) απομονώθηκαν ενώσεις από κλάσματα με σημαντική αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση. Οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν ήταν το 24-Z-μαστιχαδιενονικό οξύ, το 24-Z-ισομαστιχαδιενονικό οξύ, το 6β-υδροξυ-ολεανολικό οξύ, η β-σιτοστερόλη και το 3-O-ακετυλο-μαστιχαδιενολικό οξύ.

SUMMARY

The EXANDAS project

The EXANDAS program is a European research program aiming at the application of emerging technologies and cutting-edge technologies in the field of Natural Products for the full and efficient exploitation of waste and by-products produced during the processing of economically important aromatic / medicinal plants, with the ultimate goal of developing new cosmetics and supplements.

Modern techniques such as ASE, CPC, MAE, SFC etc. are used to isolate, purify and characterize the active ingredients that will be further investigated for commercial exploitation. A wide range of bioassays takes place in order to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-aging properties of all natural products produced.

Work performed during the current master thesis

In the context of this study, the by-products (colophony, crude mastic, and fruit) of the cultivation of the plant *Pistacia lentiscus* var. *chia* and of the resin produced were processed. The aim was both the generation of extracts of high added value, as well as the bio-directed isolation and identification of compounds with significant biological activity.

In the first part, the optimal way of the extraction of colophony was investigated in order to remove the polymer, which poses significant problems in its use for the development of innovative pharmaceutical and cosmetic products. Then, choosing the green extraction technique with supercritical CO₂ as well as the centrifugal partition chromatography, the optimum extraction conditions were investigated to obtain an extract rich in terpenic charge and polymer as low as possible. Finally, the incorporation of the prementioned extract into olive oil was investigated using the microwave extraction technique to create a product of high added value.

In the second part, the crude mastic was processed in order to obtain an extract of bioactive triterpenes enriched in semi-pilot scale. Extraction was carried out using supercritical CO₂ under selected conditions, based on previous experiments that had taken place in mastic of top quality in previous research studies of our research team, and then the extract obtained was evaluated for its content in polymer and terpenes using centrifugal partition chromatography and thin layer chromatography.

In the third part, a phytochemical analysis was carried out on the fruit, collected from the *Pistacia lentiscus* var. *chia* at their maturation stage in order to isolate and identify bioactive compounds with antimicrobial activity. Through a series of chromatographic techniques (centrifugal partition chromatography, high performance liquid chromatography on analytical and preparative scale, medium pressure liquid

chromatography) compounds were isolated from fractions with significant antibacterial and antioxidant activity. The metabolites isolated were 24-Z-masticadienonic acid, 24-Z-isomasticadienonic acid, 6 β -hydroxy-oleanolic acid, β -sitosterol and 3-O-acetyl-masticadienolic acid.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

13C-NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός ¹³ C
1H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός πρωτονίου
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)	2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ
ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
ASE	Accelerated solvent extraction	Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτες
BuOH	Butanol	Βουτανόλη
c-Hex	Cyclohexane	Κυκλοεξάνιο
CO₂	Carbon dioxide	Διοξείδιο του άνθρακα
COSY	Correlation Spectroscopy	Φασματοσκοπία συσχέτισης
CPC	Centrifugal partition chromatography	Χρωματογραφία κατανομής με φυγόκεντρο
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο

DPPH	di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium	Δι(φαινυλ)-(2,4,6-τρινιτροφαινυλ)ιμινοαζάνιο
Ether	diethyl ether	Διαιθυλαιθέρας
EtOAc	Ethyl acetate	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Ethanol	Αιθανόλη
FT-IR	Fourrier Transform infrared spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
GC	Gas chromatography	Αέρια χρωματογραφία
H₂O	Water	Νερό
HCl	Hydrogen chloride	Υδροχλώριο
Hept	Heptane	Επτάνιο
Hex	Hexane	Εξάνιο
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Συσχέτιση ετεροπυρηνικών πολλαπλών δεσμών
HPLC	High performance liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Ετεροπυρηνική απλή κβαντική συσχέτιση
K_D	Distribution coefficient	Συντελεστής Κατανομής

MAE	Microwave assisted extraction	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MIC	Minimum inhibitory concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MPLC	Medium pressure liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης
MS	Mass spectrometry	Φασματομετρία μάζας
Na₂CO₃	Sodium carbonate	Ανθρακικό νάτριο
NaOH	Sodium hydroxide	Καυστικό νάτριο
NMR	Nuclear magnetic resonance	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
SFE	Supercritical fluid extraction	Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό
TLC	Thin layer chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
USAE	Ultrasound assisted extraction	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους
UV-VIS	Ultraviolet-visible	Υπεριώδες-Ορατό

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μεταξύ των στόχων της παρούσας εργασίας περιλαμβάνονται:

- Η απομάκρυνση του πολυμερούς από το κολοφώνιο και την ακάθαρτη μαστίχα με στόχο την παραλαβή εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοδραστικά τριτερπένια.
- Η ενσωμάτωση των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων σε ελαιόλαδο με τη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών και την αποφυγή αλλοίωσης των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ελαίου.
- Η βιοκατευθυνόμενη φυτοχημική μελέτη των καρπών του είδους *Pistacia lentiscus* var. *chia*, προκειμένου να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν ενώσεις με αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Περιγραφή του είδους *Pistacia lentiscus* var. *chia* και της παραγόμενης ρητίνης

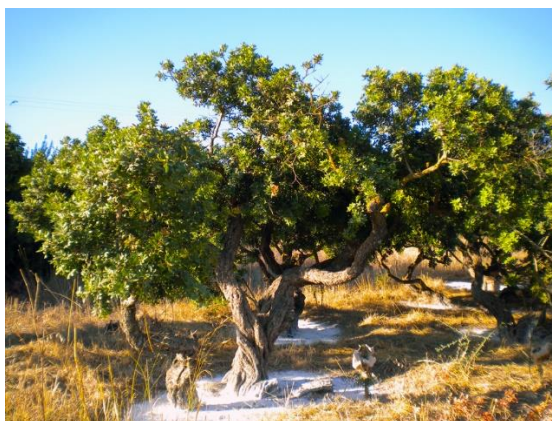
A.1.1. Συστηματική κατάταξη

Το γένος *Pistacia* ανήκει στην οικογένεια *Anacardiaceae*, μία «κοσμογυρισμένη» οικογένεια, η οποία εμπεριέχει γύρω στα 70 γένη και πάνω από 600 είδη. Τα είδη του γένους *Pistacia* είναι είτε αειθαλείς, είτε φυλλοβόλοι θάμνοι ή δέντρα που φέρουν ρητίνη. Είναι φυτά που μεγαλώνουν σε ξηρό έδαφος και έχουν μέχρι 8-10 μέτρα ύψος. Τα *Pistacia lentiscus* L., *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. vera.*, και *P. khinjuk* αποτελούν τα πιο γνωστά είδη και ευδοκιμούν από την περιοχή της Μεσογείου μέχρι την κεντρική Ασία¹.

Το είδος *Pistacia lentiscus* φύεται στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου. Η ποικιλία *chia*, κοινώς γνωστή ως μαστίχα, καλλιεργείται μοναδικά στη νότια Χίο. Η μαστίχα είναι το φυσικό κόμμι που λαμβάνεται ως έκκριμα μετά από τραυματισμό του κορμού και τα κλαδιών του *P. lentiscus* (L.) var. *chia*².

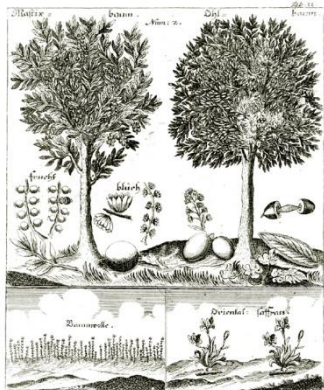
A.1.2. Βοτανική περιγραφή

Το είδος *Pistacia lentiscus* var. *chia* είναι ένας αειθαλής δίοικος θάμνος ή σπανίως μικρό δέντρο, με ύψος 1-3 μέτρα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, κυρίως στα ηλικιωμένα φυτά μπορεί να φτάσει τα 5 μέτρα. Οι ρίζες του φυτού απλώνονται στην επιφάνεια του εδάφους, φτάνοντας σε μήκος μέχρι και τα 20 μέτρα. Παρόλα αυτά, απλώνονται σε σχετικά μικρό βάθος, γεγονός που συντελεί στην ξηροφυτική προσαρμογή του σε ένα ξηρό περιβάλλον, με λιγιστές και σύντομες βροχοπτώσεις, όπως είναι αυτό της Νότιας Χίου. Αντιθέτως, είναι ευάλωτο στο ψύχος και συνεπώς, σε περιπτώσεις παγετών (φαινόμενο σπάνιο στη νότια Χίο) τα μαστιχόδενδρα καίγονται^{3,4}.



Εικόνα Α. 1. Το μαστιχόδεντρο της Χίου

Το μαστιχόδεντρο πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα και η διαδικασία αυτή λέγεται ξεσκιλίδισμα. Πιο συγκεκριμένα, κόβεται το αποδεδειγμένα πιο αποδοτικό μόσχευμα από το φυτό και τοποθετείται στο χώμα, αφήνοντας έξω μόνο μερικά φύλλα στην κορυφή. Το ποσοστό επιτυχίας είναι ιδιαίτερα χαμηλό.



Εικόνα Α. 2. *Pistacia lentiscus* var. *chia*

Γενικά, αναπτύσσεται με αργό ρυθμό. Η πλήρης ανάπτυξη επέρχεται σε 40-50 χρόνια, ενώ εμφανίζει προσδόκιμο επιβίωσης περισσότερο από 100 χρόνια. Αρχίζει να παράγει μαστίχα από τον πέμπτο ή έκτο χρόνο και αποδίδει τα μέγιστα μετά το δέκατο πέμπτο χρόνο. Από τα εβδομήντα χρόνια και μετά η απόδοσή του πέφτει σημαντικά. Η μέση ετήσια απόδοση ανά δένδρο είναι 150-180 γραμμάρια μαστίχας. Στην αποδοτικότητα παίζει ρόλο η απόσταση μεταξύ των δένδρων, το κλάδεμα, το σκάλισμα και η ποικιλία⁵.

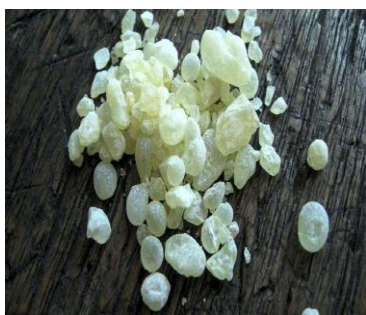
A.1.3. Μοναδικότητα της ποικιλίας της Χίου

Η ποικιλία της Χίου, ευρέως γνωστή ως μαστιχόδεντρο, καλλιεργείται μόνο στο νότιο μέρος του νησιού της Χίου. Η μαστίχα της Χίου είναι μία φυσική, αρωματική ρητίνη σε σχήμα δακρύου η οποία παράγεται από το μαστιχόδεντρο, ως έκκριμα αφού πληγωθούν ο κορμός και τα κλαδιά του.



Εικόνα Α. 3. Η έκκριση ρητίνης από το «τραυματισμένο» μαστιχόδεντρο

Η μοναδικότητα αυτή οφείλεται σε τρία «μυστικά». Το πρώτο είναι το ιδιαίτερο μικροκλίμα της Χίου το οποίο χαρακτηρίζεται από ήπιο χειμώνα και πολύ ξηρό καλοκαίρι, γεγονός που ευνοεί το στέγνωμα της μαστίχας, καθώς, αν η μαστίχα βραχεί πριν ωριμάσει, η ποιότητά της αλλοιώνεται. Το δεύτερο είναι ο ευγονισμός, ο οποίος έπειτα από τους κατάλληλους πολλαπλασιασμούς σχίνων στους οποίους προέβησαν



Εικόνα Α. 4. Η ρητίνη σε σχήμα δακρύου

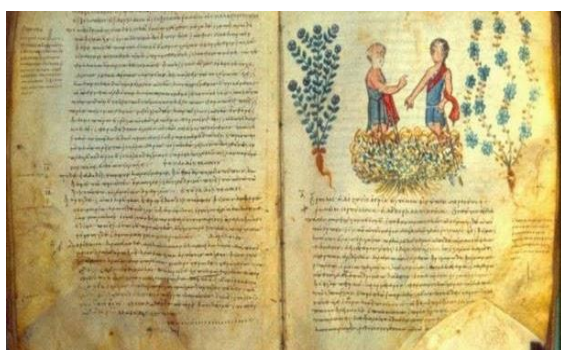
οι καλλιεργητές από τα αρχαία χρόνια, δημιούργησε ένα νέο είδος σχίνου, υπερπαραγωγικού σε μαστίχα, την ξεχωριστή ποικιλία της Χίου. Το τρίτο μυστικό είναι η καλή διαχείριση των αρχαίων Χιωτών, οι οποίοι συστηματοποίησαν την καλλιέργεια και προώθησαν το προϊόν στην αγορά^{5,6}.

A.1.4. Εθνοφαρμακολογικές αναφορές για τη μαστίχα Χίου

Η παλαιότερη ιστορική αναφορά σχετικά με τη χρήση μαστίχας είναι αυτή του Ηρόδοτου (5^{ος} αι. π.Χ.), ο οποίος αναφέρεται στο μάσημα (ξήρανση) του ξηρού ρητινώδους υγρού που εκκρίνεται από το φλοιό του μαστιχόδεντρου. Ο Ηρόδοτος αναφέρει ένα κόμμα, το οποίο οι αρχαίοι Αιγύπτιοι άπλωναν πάνω στα φύλλα με τα οποία κάλυπταν τα βυσαλωμένα πτώματα και το οποίο ήταν ενδεχομένως η μαστίχα. Τα σύγχρονα αρχαιολογικά ευρήματα με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας επιβεβαίωσαν τη χρήση μαστίχας για τη συσκευασία των μούμιων των Αιγυπτίων του 7^{ου} αι. π.Χ. προσδιορίζοντάς την ως το κύριο συστατικό του χρησιμοποιούμενου μείγματος².

Ο Θεόφραστος (372-287 π.Χ.) είναι ο πρώτος που χρησιμοποιεί τη λέξη μαστίχα. Τόσο ο ίδιος, όσο και ο Ηρόδοτος, δεν αναφέρουν κάτι περί οργανωμένης παραγωγής μαστίχας στη Χίο. Δεν υπάρχουν αναφορές για το εμπόριο της χιώτικης μαστίχας στην αρχαία εποχή. Η πρώτη δυναμική της παρουσία στην αγορά έγινε στους ελληνιστικούς χρόνους (336-146 π.Χ.).

Ο πρώτος υμνητής της μαστίχας είναι ο Διοσκουρίδης (1^{ος} αιώνας μ.Χ.), ο οποίος γράφει ότι στη Χίο παράγεται η καλύτερη και η περισσότερη μαστίχα⁶. Αναφέρει τις θεραπευτικές ιδιότητες της μαστίχας στο βιβλίο του *De Materia Medica*. Πιο



Εικόνα Α. 5. *De Materia Medica*

συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι βοηθά στις περιπτώσεις δυσπεψίας, στα προβλήματα αίματος, στο χρόνια βήχα, ενώ ταυτόχρονα ενεργεί κι ως ηρεμιστικό. Προτείνει τις θεραπευτικές ιδιότητες της μάσησης της ρητίνης της μαστίχας για τη συμβολή της στη στοματική υγιεινή καθώς και για την καθαρή και φρέσκια αναπνοή.

Αναφέρεται στη χρήση του αιθέριου ελαίου της μαστίχας, που εφαρμόζεται με πολλαπλούς τρόπους για ταλαιπωρίες της μήτρας καθώς και για τις στυπτικές της δραστηριότητες.

Επιπλέον, στο διάσημο έργο του «*De Materia Medica*»⁷, ο Διοσκουρίδης αναφέρει το «*mastichinon elaiion (oleum)*», πιθανότατα ένα παρασκεύασμα το οποίο δημιουργείται με την ανάμιξη μαστίχας με ελαιόλαδο και το οποίο εμφανίζει θερμαντικές, στυπτικές και μαλακτικές ιδιότητες, ενώ επίσης επιδρά στις φλεγμονές του στομάχου, στις κοιλιακές και εντερικές διαταραχές.

Ο Ιπποκράτης γράφει ότι η μαστίχα είναι ευεργετική στην πρόληψη πεπτικών προβλημάτων και κρυολογημάτων.

Ο Γαληνός, ο σημαντικότερος Έλληνας γιατρός μετά τον Ιπποκράτη, τονίζει ότι το καλύτερο μαστιχέλαιο παρασκευάζεται στη Χίο, εκθειάζοντας τις στυπτικές και μαλακτικές ιδιότητες της μαστίχας, την οποία και συνιστά για τις φλεγμονές του στομάχου, των εντέρων και του ήπατος. Επίσης, προτείνει τη μαστίχα για τη βρογχίτιδα και τη βελτίωση της κατάστασης του αίματος⁵.

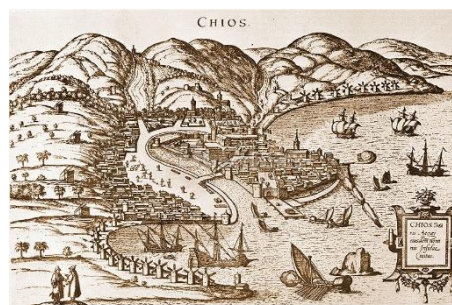
Ο Πλίνιος είναι ίσως ο πρώτος συγγραφέας που αναφέρει τη μοναδική καλλιέργεια του μαστιχόδεντρου στο νότιο τμήμα της Χίου. Η αναφορά του στη χρήση μαστίχας ως πρόσθετου γλεύκους σταφυλιών επιβεβαιώθηκε από τα αρχαιολογικά ευρήματα του 6^{ου} αι. π.Χ. Στην περιοχή de Osteris στην Ιταλία, ανάλυση FT-IR του υπολείμματος σε δοχεία κρασιού αποκάλυψε την παρουσία μαστίχας².

Ο Σωρανός από τη Έφεσο, ο οποίος άσκησε το επάγγελμα του γιατρού στη Ρώμη στα τέλη του 1^{ου} αιώνα μ.Χ., συνιστά τη μαστίχα, σε συνδυασμό με άλλα βότανα, έναντι στομαχικών διαταραχών. Αναφέρει το καλλυντικό μαστιχίνον, μια κρέμα φτιαγμένη από μαστίχα και λάδι που χρησιμοποιούσαν οι φιλάρεσκοι της εποχής⁶.

A.1.5. Ιστορική αναδρομή για την παραγωγή μαστίχας - Ένωση Μαστιχοπαργαγωγών Χίου

Την περίοδο της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, η μαστίχα αποτελούσε είδος πολυτέλειας και συνιστούσε καθημερινή συνήθεια για την καλή κοινωνία της εποχής. Από τις αρχές του 11^{ου} αιώνα και με την εμφάνιση των Λατίνων στο νησί η οικονομία του νησιού άρχισε να δυναμώνει. Ως απόρροια αυτής της εξέλιξης χτίστηκαν τα Μαστιχοχώρια.

Έπειτα, το νησί πέρασε στα χέρια των Οθωμανών και ο σουλτάνος Σελίμ ο Β΄ αναδιοργάνωσε την «επιχείρηση μαστίχα». Άφησε στους καλλιεργητές την πλήρη ευθύνη για τη διαχείριση των σχίνων με αντάλλαγμα να του παραδίδουν κάθε χρόνο 25.000 κιλά. Επίσης τους απάλλαξε από τους περισσότερους φόρους και τους παραχώρησε ειδικά προνόμια.

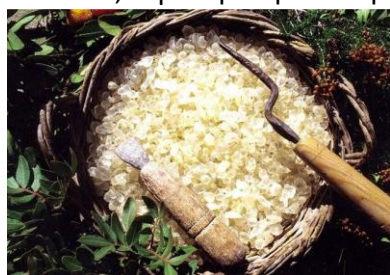


Εικόνα Α. 6. Το νησί της Χίου στην περίοδο της Τουρκοκρατίας

Η βιοτεχνία και το εμπόριο άνθησαν, με αποτέλεσμα στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, τα 21 τότε Μαστιχοχώρια να είναι τα πιο πυκνοκατοικημένα και πλούσια χωριά της Χίου. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, η Χίος ζούσε το αποκορύφωμα της ευημερίας της. Η φορολογία ήταν χαμηλή, η κοινωνία αυτοδιαχειριζόμενη, οι άνθρωποι μορφωμένοι. Οι Χιώτες ζούσαν καλύτερα από τους περισσότερους Έλληνες της εποχής τους.

Η εμφάνιση του αντιφεουδαρχικού κινήματος Μπουρνιά-Λογοθέτη πυροδότησε μια σειρά γεγονότων που οδήγησαν στη σφαγή της Χίου από το σουλτάνο Μαχμούτ (25.000 σφάχτηκαν και 65.000 αιχμαλωτίστηκαν), από την οποία ωστόσο εξαιρέθηκαν τα Μαστιχοχώρια. Την περίοδο του Μεσοπολέμου, η κρίση στη μαστίχα κορυφώθηκε. Το ελληνικό κράτος αποφάσισε να επιβάλλει τη μείωση της παραγωγής της με νόμο το 1929.

Το 1938, ιδρύθηκε η Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου, η οποία είναι αναγκαστικός

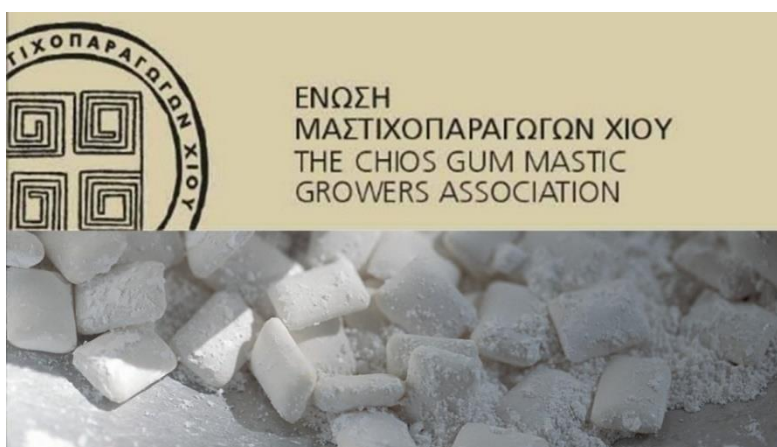


συνεταιρισμός «Προς σκοπόν της προστασίας της μαστίχης Χίου, δια συστηματοποιήσεως της παραγωγής, της συγκεντρώσεως, της συσκευασίας και της από κοινού διαθέσεως αυτής επιβάλλεται δια του παρόντος η αναγκαστική συνεταιριστική οργάνωσις πάντων των μαστιχοπαραγωγών Χίου».

Εικόνα Α. 7. Συλλογή μαστίχας

Ιδρύθηκαν 20 Αναγκαστικοί Συνεταιρισμοί Μαστιχοπαραγωγών ως πρωτοβάθμιες συνεταιριστικές οργανώσεις και μέλη τους ήταν υποχρεωτικά όλοι οι μαστιχοπαραγωγοί. Αυτούς θα εκπροσωπούσε η δευτεροβάθμια οργάνωσή τους, που έφερε την επωνυμία «Ένωσις Μαστιχοπαραγωγών Χίου». Η λειτουργία της ΕΜΧ ξεκίνησε το 1939, με πρόεδρο τον ιατρό Γεώργιο Σταγκούλη.

Οι μαστιχοπαραγωγοί κάθε χωριού ήταν υποχρεωμένοι να εγγράφονται στον αντίστοιχο συνεταιρισμό, και όφειλαν να παραδίδουν σε αυτόν το σύνολο της παραγωγής τους, με εξαίρεση μια ποσότητα (δύο οκάδες) που μπορούσαν να κρατήσουν αυστηρά για οικιακή χρήση. Για τους παραβάτες προβλέπονταν ποινές^{5,7}.



Εικόνα Α. 8. Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου

A.1.6. Η «παραδοσιακή» θεραπευτική χρήση της μαστίχας Χίου

Βάσει της μονογραφίας που καταρτίστηκε το 2015 από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) ⁸, η μαστίχα της Χίου αναγνωρίζεται ως φαρμακευτικό προϊόν εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, καθώς και σε χώρες εκτός αυτής που ακολουθούν τις ευρωπαϊκές φαρμακευτικές «μονογραφίες».

Η σκόνη της ρητίνης *Pistacia Lentiscus*, κυρίως της μαστίχας της Χίου, έχει χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο (Ιράκ, Τουρκία, Ιαπωνία, Νότια Κορέα, ΗΠΑ κ.λπ.) καθώς και στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ελλάδα) για περισσότερα από 30 χρόνια. Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία από διάφορες πηγές της βιβλιογραφίας, οι νόμιμες απαιτήσεις πληρούνται για την παραδοσιακή φαρμακευτική χρήση κονιοποιημένης μαστίχας ρητίνης.

Αποτελέσματα μη κλινικών *in vitro* και *in vivo* μελετών ανέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας έναντι μιας σειράς Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, την ιδιαίτερη ισχυρή δράση της έναντι του *H. pylori* (MBC 60μg/ml) και τις *in vitro* αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της. Τα προαναφερόμενα, συνοδευόμενα από τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών, παρέχουν επαρκή αξιοπιστία για τη μακρόχρονη παραδοσιακή φαρμακευτική χρήση της μαστίχας σε μορφή σκόνης στις ακόλουθες ενδείξεις, παρόλο που δεν μπορεί να τεκμηριωθεί η καθιερωμένη χρήση:

Ένδειξη 1): Παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν που χρησιμοποιείται σε ήπιες δυσπεπτικές διαταραχές.

Ένδειξη 2): Παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν που χρησιμοποιείται για τη συμπτωματική θεραπεία μικρών φλεγμονών του δέρματος και ως βοήθημα στην επούλωση μικρών τραυμάτων.



7 July 2015
EMA/HMP/46726/2015
Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)

Assessment report on *Pistacia lentiscus* L., resin (mastix)
Draft

Based on Article 16(1), Article 16f and Article 16h of Directive 2001/83/EC as amended (traditional use)

Herbal substance(s) (botanical scientific name of the plant, including plant part)	<i>Pistacia lentiscus</i> L., resin (mastix)
Herbal preparation(s)	Powdered herbal substance
Pharmaceutical form(s)	Powdered herbal substance in solid dosage form for oral use Powdered herbal substance in semi-solid dosage form for cutaneous use
Manufacturer(s)	Isaiah Chiu
Peer-reviewer	Nanna Diebb

Εικόνα Α. 9. Η μονογραφία του EMA για την παραδοσιακή χρήση της ρητίνης του *P. lentiscus*

A.2. Προϊόντα και υποπροϊόντα του μαστιχόδεντρου – Χημική σύσταση, Βιολογικές ιδιότητες

Κύρια προϊόντα του μαστιχόδεντρου είναι η ρητίνη «μαστίχα» και το αιθέριο έλαιο το οποίο παραλαμβάνεται μετά τη διαδικασία της υδραπόσταξης. Είναι γεγονός ότι τόσο τόσο η ρητίνη όσο και το αιθέριο έλαιο της μαστίχας αποτελούν καλά μελετημένα προϊόντα⁹ και έχουν πολλές εφαρμογές, γεγονός που δικαιολογεί τη μεγάλη εμπορικότητά τους.

Ωστόσο, κατά τη διαδικασία καλλιέργειας του μαστιχόδενδρου και της μεταποίησης της ρητίνης παράγονται διάφορα υποπροϊόντα ή δευτερεύοντα προϊόντα, τα οποία περιέχουν μεταβολίτες με αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες και φαρμακολογικές δράσεις, ενώ στην πλειονότητά τους είναι αναξιοποίητα. Κύρια υποπροϊόντα της διαδικασίας διαλογής και μεταποίησης της μαστίχας είναι η ακάθαρτη ρητίνη που απορρίπτεται κατά τη διαλογή της μαστίχας, όπως επίσης το μαστιχόνερο και το κολοφώνιο που παράγονται κατά τη διαδικασία της υδραπόσταξης της ρητίνης για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου της. Επίσης, σημαντικά υποπροϊόντα της καλλιέργειας του μαστιχόδενδρου αποτελούν οι καρποί, τα φύλλα και τα κλαδιά, τα οποία συλλέγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες κατά την περίοδο κλαδέματος των θάμνων.

A.2.1. Ρητίνη/Μαστίχα

Εκτός από τις εθνοφαρμακολογικές αναφορές για τις ιδιότητες και τη θεραπευτική χρήση της μαστίχας, υπάρχουν πλέον στη διεθνή βιβλιογραφία αξιόλογες επιστημονικές μελέτες οι οποίες τεκμηριώνουν τις αξιοπρόσεκτες φαρμακολογικές



Εικόνα Α. 10. Η ρητίνη του μαστιχόδεντρου

δράσεις της. Όσον αφορά στην ποικιλία της Χίου, δεδομένου ότι η πιο κοινή θεραπευτική χρήση της μαστίχας ιστορικά ήταν αυτή έναντι των γαστρεντερικών διαταραχών, η συσχέτισή της με τη δράση έναντι του *H. pylori* υπήρξε μια από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις¹⁰. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει υπολιπιδαιμική¹¹, αντιφλεγμονώδη¹² και αντικαρκινική¹³ δράση.

Επίσης, η μαστίχα διαφόρων ποικιλιών εμφανίζει επιπρόσθετες δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή δράση¹ κ.ά.

Από φυτοχημικής πλευράς, η σύσταση της μαστίχας περιλαμβάνει την ύπαρξη ενός πολυμερούς (1,4-πολυ-[β-μυρκένιο]) και τερπενίων, τα οποία διακρίνονται σε μονοτερπένια, διτερπένια και κυρίως τέτρα- και πέντα κυκλικά τριτερπένια¹⁴ σε όξινη ή ουδέτερη μορφή^{15,16,17} (Πίνακας Α. 1).

Όσον αφορά στο πολυμερές,¹⁵ προσδιορίστηκε από τους Van Den Berg et al ως 1,4-πολυ-[β-μυρκένιο] (**Πίνακας Α. 1.**) και διαπιστώθηκε ότι φέρει την *cis* διαμόρφωση στο 75% της δομής του. Το πολυμερές βρέθηκε να έχει κατανομή μοριακού βάρους έως περίπου 100.000 Da. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε μεγάλο αριθμό προϊόντων, τα περισσότερα από τα οποία είναι υδρογονάνθρακες. Το μυρκένιο ήταν αυτό που εντοπίστηκε στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα, αλλά βρέθηκαν επίσης και πολλές διμερείς δομές (C₂₀H₃₂). Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκαν και χαμηλές ποσότητες λιμονενίου, καμφενίου και πινενίου. Από αυτές τις ενώσεις, το β-μυρκένιο είναι η μόνη ένωση με συζευγμένους διπλούς δεσμούς οι οποίοι είναι σχετικά επιρρεπείς στον πολυμερισμό. Το μονοτερπένιο του μυρκενίου πολυμερίζεται κατά τον τραυματισμό του δέντρου και την έκκριση της ρητίνης.

Τα μη πτητικά τερπένια διακρίνονται σε ουδέτερα τριτερπένια και τριτερπενικά οξέα αποτελώντας το ουδέτερο και όξινο κλάσμα, αντίστοιχα.

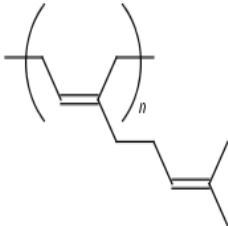
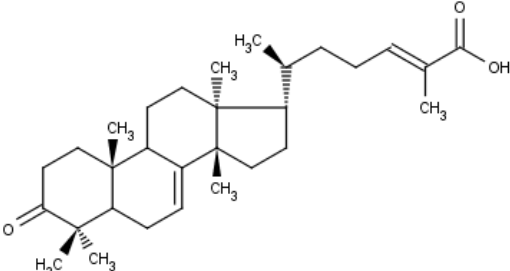
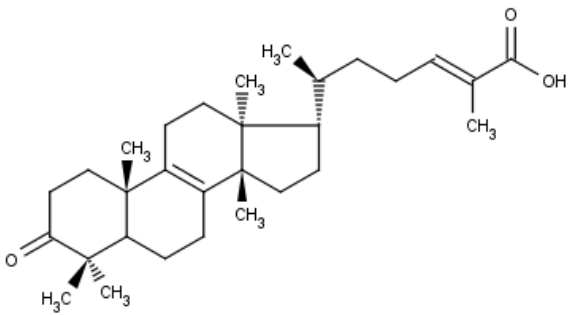
Πιο συγκεκριμένα για την ποικιλία της Χίου, από το όξινο κλάσμα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 10 τριτερπενικά οξέα (**Πίνακας Α. 1.**). Αρχικά, η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS) εφαρμόστηκε για τη φυτοχημική ανάλυση του όξινου κλάσματος¹⁷. Έτσι, ταυτοποιήθηκαν απευθείας τρία τερπενικά οξέα (μαστιχαδιενονικό οξύ, ισομαστιχαδιενονικό οξύ και ολεανονικό οξύ), τα οποία είχαν εντοπισθεί και σε άλλες ποικιλίες του είδους, καθώς κι άλλα επτά τριτερπενικά οξέα με τη μορφή των μεθυλεστέρων τους (μορονικό οξύ, ολεανολικό οξύ, 18αΗ-ολεανονικό οξύ, 3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ, μαστιχαδιενολικό οξύ, 3-ακετοξυ-3-επι-ισομαστιχαδιενολικό οξύ, και 3-ακετοξυ-3-επι-μαστιχαδιενολικό οξύ). Το 2006, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν επίσης¹⁸ το μορονικό οξύ, το 24-Z-ισομαστιχαδιενονικό οξύ και το 24-Z-ισομαστιχαδιενολικό οξύ, το ολεανονικό οξύ, το 24-Z-μαστιχαδιενονικό οξύ και το 24-Z-μαστιχαδιενολικό οξύ. Το 2010 απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε και το ολεανολικό οξύ⁴.

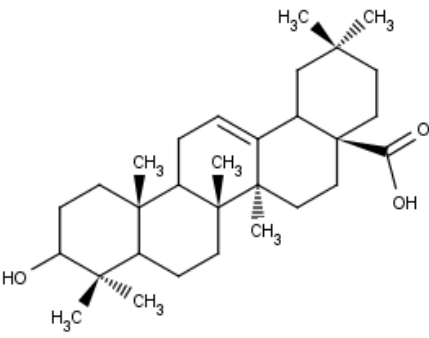
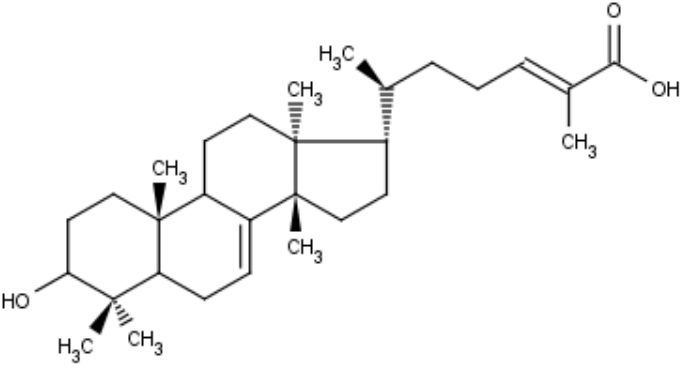
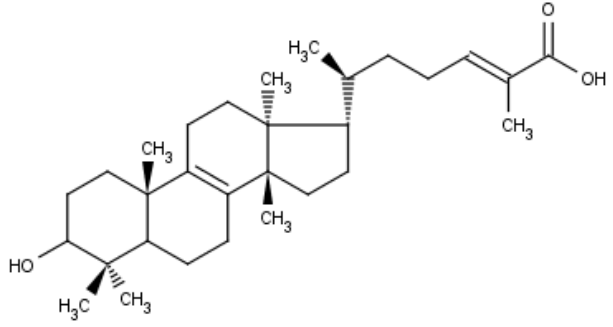
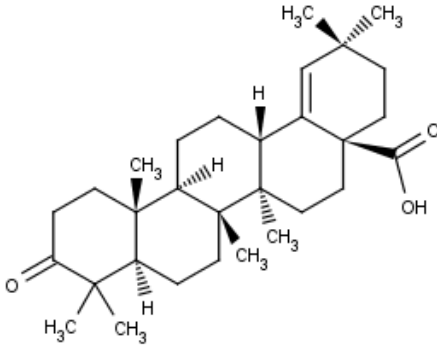
Όσον αφορά γενικά στο είδος *P. lentiscus*, το 1956, από τους Barton et Seoane, στο όξινο κλάσμα της ρητίνης απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το κύριο συστατικό, το μαστιχαδιενονικό οξύ¹⁹, ενώ αργότερα απομονώθηκαν από το Seoane το ισομερές ισομαστιχαδιενονικό οξύ και το ολεανονικό οξύ¹⁶. Τα όξινα συστατικά της μαστίχας συμπληρώνει το μαστιχινοϊκό οξύ, ένα συστατικό που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε πρόσφατα²⁰.

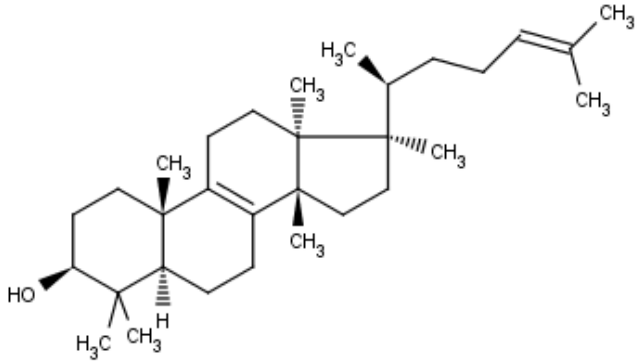
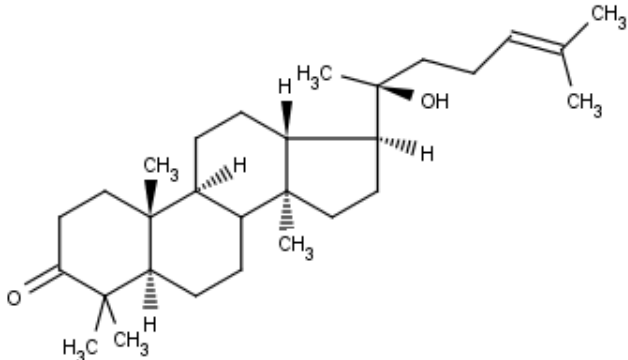
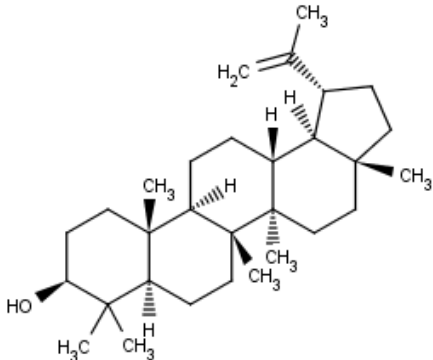
Επιπρόσθετα, όσον αφορά στο ουδέτερο κλάσμα της ποικιλίας της Χίου, το 2007¹⁸ απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν η ολεανική αλδεΐδη, η ολεανολική αλδεΐδη, η τιρουκαλλόλη, η δαμαραδιενόνη και η 28-νορ-ολεαν-12-εν-3-όνη. Το 2010, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ταυτοποίηση έξι επιπλέον συστατικών, της μαστιχαδιενονάλης, της ισομαστιχαδιενονάλης, της ολεανολικής αλδεΐδης, της λουπ-20(29)-εν-3-όνης, της μπετουλονάλης, και της 28-νορ-ολεανόνης⁴ (**Πίνακας Α. 1.**).

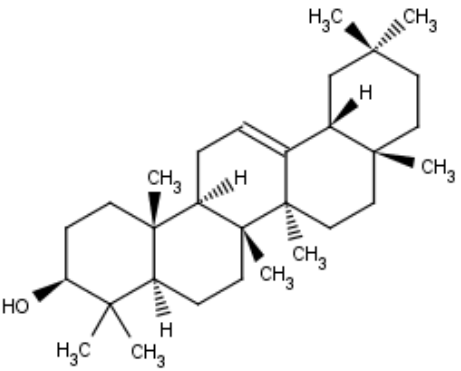
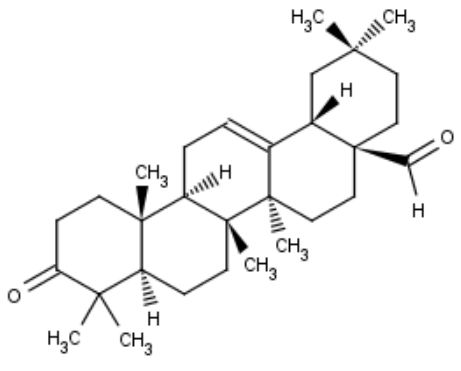
Γενικά όμως, από το ουδέτερο κλάσμα της μαστίχας άλλων ποικιλιών είχε ήδη απομονωθεί μία τριτερπενική αλκοόλη, η τிருκαλλόλη¹⁹. Μετά από 30 χρόνια, απομονώθηκε μία δικυκλική τριτερπενική διόλη, το (8R)-3-οξο-8-υδροξυ-πολυποδα-13E,17E,21-τριένιο, που θεωρήθηκε ενδιάμεσο προϊόν της κυκλοποίησης του (3S)-2,3-εποξειδίου του σκουαλενίου²¹. Το 1991²², με τη χρήση της τεχνικής GC-MS, ταυτοποιήθηκαν από το ουδέτερο κλάσμα επτά τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τριτερπένια, η τிருκαλλόλη, η διπτεροκαρπόλη, η λουπεόλη, η β-αμυρίνη, η β-αμυρόνη, η ολεανική αλδεΐδη και η γερμαϊκόλη.

Πίνακας Α. 1. Δομές του πολυμερούς και χαρακτηριστικών όξινων και ουδέτερων τερπενίων της μαστίχας

<p>1,4-πολυ-(β-μυρκένιο)</p>	
<p>24Z-μαστιχαδιενονικό οξύ</p>	
<p>24Z-ισομαστιχαδιενονικό οξύ</p>	

<p>Ολεανολικό οξύ</p>	 <p>The structure shows a pentacyclic oleanane skeleton. It features a hydroxyl group at C-3, a methyl group at C-10, and a methyl group at C-13. The side chain at C-17 consists of a methyl group at C-18, a double bond between C-19 and C-20, and a carboxylic acid group at C-21. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
<p>24Z-μαστιχαδιενολικό οξύ</p>	 <p>The structure shows a pentacyclic skeleton with a hydroxyl group at C-3, methyl groups at C-10 and C-13, and a methyl group at C-14. The side chain at C-17 is a 24Z-alkenyl group, consisting of a methyl group at C-18, a double bond between C-19 and C-20 in the Z configuration, and a carboxylic acid group at C-21.</p>
<p>24Z-ισομαστιχαδιενολικό οξύ</p>	 <p>The structure is identical to 24Z-masticadienolic acid, showing a pentacyclic skeleton with a hydroxyl group at C-3, methyl groups at C-10, C-13, and C-14, and a 24Z-alkenyl side chain at C-17.</p>
<p>Μορονικό οξύ</p>	 <p>The structure shows a pentacyclic skeleton with a ketone group at C-3, methyl groups at C-10, C-13, and C-14, and a methyl group at C-17. The side chain at C-18 consists of a methyl group at C-19, a double bond between C-20 and C-21, and a carboxylic acid group at C-22. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>

<p>Τιρουκαλόλη</p>	 <p>The structure of Tirucalol is a complex polycyclic molecule. It features a pentacyclic core with a hydroxyl group (HO) at C-14, a methyl group (CH₃) at C-13, and a methyl group (CH₃) at C-10. A side chain at C-13 consists of a propyl group with a methyl group (H₃C) at the end, which is further substituted with a methyl group (CH₃) and a methyl group (CH₃) on a double bond.</p>
<p>Διπεροκαρπόλη</p>	 <p>The structure of Dipercarpol is a complex polycyclic molecule. It features a pentacyclic core with a ketone group (O) at C-14, a methyl group (CH₃) at C-13, and a methyl group (CH₃) at C-10. A side chain at C-13 consists of a propyl group with a methyl group (H₃C) at the end, which is further substituted with a hydroxyl group (OH) and a methyl group (CH₃) on a double bond.</p>
<p>Λουπεόλη</p>	 <p>The structure of Lupéol is a complex polycyclic molecule. It features a pentacyclic core with a hydroxyl group (HO) at C-14, a methyl group (CH₃) at C-13, and a methyl group (CH₃) at C-10. A side chain at C-13 consists of a propyl group with a methyl group (CH₃) at the end, which is further substituted with a methyl group (CH₃) and a methyl group (CH₃) on a double bond.</p>

<p>β-Αμυρίνη</p>	
<p>Ολεανονική αλδεΐδη</p>	

A.2.2. Ακάθαρτη μαστίχα

Η ακάθαρτη μαστίχα είναι η συλλεγμένη ρητίνη που απορρίπτεται κατά τη διαλογή της μαστίχας επειδή φέρει σκούρες κηλίδες στην επιφάνειά της ή έχει εγκλωβίσει ξένες πρώτες υλές κατά τη διάρκεια της έκκρισής της. Ενδεχομένως προέρχεται από τα δάκρυα που δεν έχουν πέσει στα ειδικά τραπέζια συλλογής αλλά παραμένουν κολλημένα στον κορμό και στα κλαδιά του μαστιχόδεντρου.



Εικόνα Α. 11. Διαλογή της μαστίχας

Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής, οι καλλιεργητές επιδίδονται στο πρώτο κοσκίνισμα



Εικόνα Α. 12. Καθαρή και «ακάθαρτη» μαστίχα

της μαστίχας. Το «ταχτάρισμα» της μαστίχας, όπως συνηθίζεται να λέγεται, αποσκοπεί στην απομάκρυνση της σκόνης και των ξερών φύλλων που συλλέχθηκαν μαζί με τα δάκρυα. Ακολουθεί πλύσιμο της μαστίχας σε νερό, μέσα στο οποίο έχει διαλυθεί σαπούνι, και κατόπιν ξέπλυμα με άφθονο κρύο νερό. Τέλος, τοποθετείται σε ξηρό μέρος μέσα στο σπίτι, προκειμένου να

στεγνώσει. Τελευταία ενέργεια είναι το «τσιμπημα», δηλαδή η απομάκρυνση από τη στεγνή πλέον μαστίχα, τυχόν ξένων υλών, με τη βοήθεια ενός μικρού μαχαιριού⁴.

Αν και η προαναφερόμενη διαδικασία που ακολουθείται για τον κύριο όγκο της μαστίχας είναι η παραπάνω, εντούτοις υπάρχει και μια ποσότητα αυτής που παραμένει ακάθαρτη.

A.2.3. Αιθέριο έλαιο ρητίνης

Το αιθέριο έλαιο της ρητίνης είναι πολύτιμο καθώς εμφανίζει μια ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιμικροβιακή^{9,23}, αντιλευχαιμική²⁴ δράση και δράση έναντι του καρκίνου των πνευμόνων²⁵.

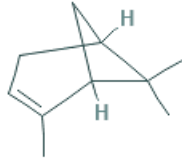
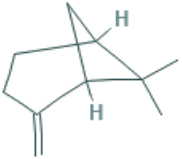
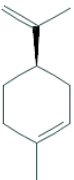
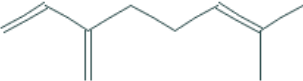
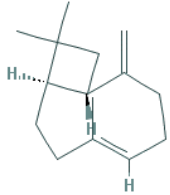
Πιο αναλυτικά όσον αφορά στην ποικιλία της Χίου, το αιθέριο έλαιο της μαστίχας έχει αντιβακτηριακή δράση η οποία μπορεί να αποδοθεί στον συνδυασμό πολλών συστατικών μάλλον παρά σε μία συγκεκριμένη ένωση, καθώς διάφορα βακτήρια είναι ευαίσθητα ή όχι σε διαφορετικές ενώσεις του αιθέριου ελαίου²². Επιπλέον, αναφέρεται ότι η αντιβακτηριακή δράση έναντι των στελεχών *Lactobacillus plantarum* και *Staphylococcus aureus*, των οποίων η ανάπτυξη παρεμποδίστηκε πλήρως από το αιθέριο έλαιο μαστίχας²³. Το μαστιχέλαιο εμφανίζει αντικαρκινική δράση, καθότι συντελεί στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκου μέσω μιας σειράς σημαντικών μηχανισμών (επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, αναστολή της φλεγμονώδους απόκρισης που σχετίζεται με τον όγκο και αγγειογένεση)²⁰.

Γενικά, τα πτητικά συστατικά του είδους *P. lentiscus* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μέσω των μελετών του αιθέριου ελαίου της ρητίνης. Η πρώτη ολοκληρωμένη μελέτη²⁶ σε δείγμα από την επαρχία της Σεβίλλης στην Ισπανία, ανέδειξε, μέσω της χρήσης GC-MS, 90 συστατικά τα οποία αποτελούνταν από μονοτερπένια (90%). Στο αιθέριο έλαιο της μαστίχας κυριότερα συστατικά είναι το α -πινένιο (79%) και το μυρκένιο (3%).

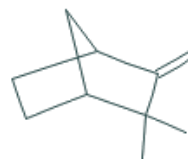
Συγκεκριμένα στην ποικιλία της Χίου, όπως έδειξε η ανάλυση ποσοτικοποίησης με GC-MS και FT-Raman φασματοσκοπία²⁷, το αιθέριο έλαιο της μαστίχας χαρακτηρίζεται από την παρουσία α -πινενίου (38.1– 69.5%) και β -μυρκενίου (4.5– 57.9%) (**Πίνακας Α. 2**). Η μεγάλη διακύμανση στα ποσοστά των παραπάνω μονοτερπενίων οφείλονται στον χρόνο συλλογής της ρητίνης και στη διάρκεια μεταξύ της εκκρίσεώς της από τον κορμό και τη συλλογή της. Σε μία επόμενη μελέτη²⁸, ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση GC-MS ως κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου, εκτός από το α -πινένιο και το β -μυρκενίο, μια σειρά μονοτερπενίων και συγκεκριμένα το β -πινένιο, το λιμονένιο, το *trans*-καρβοφυλλένιο και το καμφένιο (**Πίνακας Α. 2**). Σε επόμενη μελέτη²⁹, το α -πινένιο (63.22–71.17)%, το μυρκενίο (16.60–18.09%) και το

β-πινένιο (2.08–2.78%) αποδείχθηκαν και πάλι τα συστατικά που κατέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μαστιχέλαιο. Επίσης, αποδείχτηκε ότι η απόσταση παρουσία H_3PO_4 10% v/v διπλασίασε την απόδοση του αιθέριου ελαίου. Λίγα χρόνια αργότερα, μέσω GC-MS επαληθεύτηκε και πάλι πως κύρια συστατικά του είναι το α-πινένιο, το β-μυρκένιο, το β-πινένιο και το λιμονένιο³⁰.

Πίνακας Α. 2. Δομές χαρακτηριστικών μονοτερπενίων του αιθερίου ελαίου της μαστίχας

α-Πινένιο	
β-Πινένιο	
Λιμονένιο	
β-Μυρκένιο	
trans-Καρυοφυλλένιο	

Καμφένιο



Μερικές από τις πιο σημαντικές εφαρμογές του μαστιχέλαιου είναι η ευρεία χρήση του ως πρόσθετο τροφίμων σε πολλά προϊόντα, σε είδη ζαχαροπλαστικής, στη βιομηχανία αρωμάτων και επίσης ως συστατικό σε καλλυντικά και προϊόντα υγείας. Αποτελεί ένα από τα πιο ακριβά αιθέρια έλαια στην αγορά.

A.2.4. Κολοφώνιο

Το κολοφώνιο είναι το υπόλειμμα της ρητίνης αφού αυτή υποστεί υδραπόσταξη για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου της (πτητικά συστατικά). Επομένως, από φυτοχημική άποψη αναμένεται να αποτελείται από τα υπόλοιπα συστατικά της ρητίνης, δηλαδή τα μη πτητικά συστατικά και το πολυμερές.

Αποτελεί υποπροϊόν και παραμένει σε σημαντικό βαθμό ανεκμετάλλευτο. Μία από τις ελάχιστες εφαρμογές του σήμερα είναι για την παρασκευή χειρουργικών ραμμάτων.

Δεν έχει μελετηθεί συστηματικά μέχρι σήμερα, καθώς η επεξεργασία του λόγω της ύπαρξης του πολυμερούς είναι δύσκολη. Μία μόνο μελέτη αναφέρεται στο κολοφώνιο της μαστίχας της ποικιλίας της Χίου³⁰, το οποίο υπέστη φυτοχημική ανάλυση εφόσον χωρίστηκε πρώτα σε όξινο και ουδέτερο κλάσμα. Μέσω της χρήσης GC-MS και MS/MS ταυτοποιήθηκαν όξινα και ουδέτερα τερπένια τα οποία είχαν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι αποτελούν συστατικά της μαστίχας. Εντοπίστηκαν διάφορα ουδέτερα τριτερπένια που ανήκουν στις κατηγορίες 12- και 18-ολεανενίων, 28-νορ-17-ολεανενίων, 7- και 8-τιρουκαλλενίων, δαμαμαρανίων και λουπανίων. Επίσης τα κύρια τριτερπενικά οξέα ήταν το ολεανονικό οξύ, το μουρονικό οξύ, το ισομαστιχαδιενονικό οξύ και μίγμα του μαστιχαδιενολικού και του ισομαστιχαδιενολικού οξέος. Τέλος, το κολοφώνιο υποβλήθηκε σε εκχύλιση σε CO₂ με πίεση 290bar και 7% EtOH. Η απόδοση της εκχύλισης ήταν υψηλή (48,1%), αλλά το εκχύλισμα ήταν σκληρό, κολλώδες και είχε μικρότερη περιεκτικότητα σε οξέα, γεγονός που δηλώνει την παρουσία του πολυμερούς.



Εικόνα Α. 13. Κολοφώνιο μαστίχας

A.2.5. Μαστιχόνερο

Το μαστιχόνερο είναι το προϊόν της συμπύκνωσης των υδρατμών, το οποίο λαμβάνεται σε μεγάλες ποσότητες μαζί με αιθέριο έλαιο κατά την απόσταξη της ρητίνης. Διαχωρίζεται από το αιθέριο έλαιο λόγω της διαφορετικής πυκνότητάς του.

Το μαστιχόνερο περιέχει κυρίως πτητικά συστατικά αυξημένης πολικότητας και διαλυτότητας στο νερό. Οι περισσότερες ενώσεις είναι οξυγονωμένα μονοτερπένια, με τα περισσότερα να φέρουν 1 υδροξυλομάδα, τέσσερα φέρουν 2 υδροξύλια, τρία φέρουν ομάδα κετόνης/αλδεΐδης, δύο είναι οξείδια και τέλος τρεις ενώσεις είναι μη μονοτερπενικά φυσικά προϊόντα. Οι κύριες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν η βερβενόνη, η α -τερπινεόλη, η λιναλοόλη και η *trans*-πινोκαρβεόλη³¹.

Σήμερα χρησιμοποιείται ως αρωματικό νερό στη ζαχαροπλαστική ή ως χαμηλότερου κόστους υποκατάστατο του μαστιχέλαιου σε διάφορα προϊόντα. Αν και το μαστιχόνερο είναι ένα εμπορικά διαθέσιμο προϊόν με συνεχώς αυξανόμενες πωλήσεις, το χημικό του προφίλ και οι βιολογικές του δραστηριότητες παραμένουν άγνωστες καθώς και η σταθερότητά του υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης.

A.2.6. Καρποί

Οι καρποί *P. lentiscus var. chia* είναι ένα από τα υποπροϊόντα που δεν έχουν μελετηθεί καθόλου ως σήμερα.



Εικόνα Α. 14. Καρποί *P. lentiscus var. chia*

Σήμερα, οι καρποί δεν χρησιμοποιούνται στον Ελλαδικό χώρο, αλλά απαντώνται σε παραδοσιακές συνταγές άλλων μεσογειακών χωρών, όπως η Αλγερία ή η Τυνησία, για τη θεραπεία της φλεγμονής, των εγκαυμάτων και του έλκους. Το έλαιό τους έχει φαρμακευτικές χρήσεις είτε εσωτερικά στη θεραπεία των ελκών είτε εξωτερικά για να θεραπεύσει την ψωρίαση.

Στην Αλγερία, τα εκχυλίσματα καρπών μελετήθηκαν κι έδειξαν αντιφλεγμονώδη και ισχυρή κυτταροπροστατευτική δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις³², όπως επίσης ηπατοπροστατευτική και αντιδιαβητική δράση³³.

Στην Τυνησία διαπιστώθηκαν οι αντιοξειδωτική και αποπρωτική δράση του διγαλλικού οξέος, που απομονώθηκε από τους καρπούς του *Pistacia lentiscus*^{34,35}.

Το αιθέριο έλαιο των καρπών, που προέρχονται από συλλογές του θάμνου στη Σεβίλλη της Ισπανίας, μελετήθηκε²⁶ και διαπιστώθηκε ότι αποτελείται από μονοτερπένια (90-96%) και σεσκιτερπένια (2-3%). Τα κύρια συστατικά του ανώριμου

καρπού ήταν 22% α -πινένιο και 54% β -μυρκένιο, ενώ στο έλαιο του ώριμου καρπού προσδιορίστηκε α -πινένιο (11%) και β -μυρκένιο (72%).

Στην Αλγερία το έλαιο των καρπών του *P. lentiscus*, είναι πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το ελαϊκό και το λινολεϊκό³⁶. Στην Αλγερία το λάδι των φρούτων χρησιμοποιείται από τον πληθυσμό στην παραδοσιακή ιατρική με πολλούς τρόπους, κυρίως όμως ως αντιδιαρροϊκό και ως συστατικό των ζωοτροφών.

Τέλος, μελέτη στο έλαιο των καρπών της Τυνησίας, έδειξε ότι αποτελεί ένα πολύπλοκο φυσικό μίγμα λιπαρών οξέων, μονοτερπενίων, σεσκιτερπενίων, πολυφαινολών, φλαβονοειδών, τοκοφερόλων και στερολών, με σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση όπως αποδείχτηκε με *in vivo* πειράματα³⁷.

A.2.7. Φύλλα και κλαδιά

Τα φύλλα και τα κλαδιά του μαστιχόδεντρου θεωρούνται ένα από τα κύρια υποπροϊόντα, του οποίου η κύρια μάζα παράγεται κατά τη διάρκεια της κλαδέματος των δέντρων και της συγκομιδής μαστίχας. Ωστόσο ως σήμερα δεν έχουν ακόμη αξιοποιηθεί.

Όσον αφορά στην ποικιλία της Χίου, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη για την αποτελεσματική εκχύλιση αντιοξειδωτικών και φαινολικών ενώσεων από φύλλα³⁸. Η χημική σύσταση του εκχυλίσματος με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (υδατικό εκχύλισμα φρέσκων φύλλων με τη χρήση υπερήχων) αποκάλυψε ότι τα φύλλα του μαστιχόδεντρου περιέχουν αντιοξειδωτικές φαινόλες και φλαβονοειδή, όπως το γαλλοϋλο-κινικό οξύ, η D-γαλοκατεχίνη, η μυρικετίνη, η κερκετίνη και η καμπφερόλη.



Εικόνα Α. 15. Φύλλα και άνθη *P. lentiscus* var. *chia*

Σε μελέτη του *P. Lentiscus* που πραγματοποιήθηκε στην Αλγερία^{32,39} διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα φύλλων είναι πλούσια σε απλές φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή και ταννίνες, και δικαιολογημένα παρουσίασαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση, καθώς ήταν δυνατή η ανάκτηση έως και 18,6% των συνολικών φαινολικών ενώσεων της ξηρής μάζας των φύλλων. Επίσης, τα εκχυλίσματα αυτά επέδειξαν αντιφλεγμονώδη, ηπατοπροστατευτική και αντιδιαβητική δράση³³.

Όσον αφορά στην ποικιλία της Χίου, τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου των φύλλων είναι το μυρκένιο (20,58%), το D-γερμακρένιο (13,30%), το E-καρνοφυλλένιο (8,33%), η α -καδινόλη (7,33%) και το δ -καδινένιο (7,00%). Επιπλέον κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου των κλαδιών είναι το μυρκένιο (47,92%), το D-γερμακρένιο (15,46%) και το E-καρνοφυλλένιο (4,75%)⁵. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το α -

πινένιο, το οποίο είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου της μαστίχας (66,48%), προσδιορίστηκε μόνο σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στα έλαια των φύλλων και των κλαδιών⁵.

Στο είδος *P. lentiscus* από τη Σεβίλλη, διαπιστώθηκε ότι το αιθέριο έλαιο των φύλλων περιέχει 50% μονοτερπένια, 20% μονοτερπένια που περιέχουν οξυγόνο και 25% σεσκιτερπένια. Τα κύρια συστατικά του είναι α -πινένιο (11%) και β -μυρκένιο (19%). Οι κυρίαρχες μονοτερπενικές αλκοόλες είναι η α -τερπινεόλη και η τερπινεν-4-όλη (συνολικά 15%)²⁶.

Το αιθέριο έλαιο των φύλλων *Pistacia lentiscus* από την Τουρκία αναλύθηκε με GC-MS και ως κύρια συστατικά του προσδιορίστηκαν το α -πινένιο, το β -πινένιο, το λιμονένιο, η τερπινεν-4-όλη και η α -τερπινεόλη⁴⁰.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Περιγραφή μεθόδων/τεχνικών

B.1.1. Εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών (SFE)

B.1.1.1. Η εφαρμογή της τεχνικής και τα πλεονεκτήματά της

Ανάμεσα στις διάφορες τεχνικές εκχύλισης που χρησιμοποιούνται σε αναλυτική και παρασκευαστική κλίμακα, η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Τα τελευταία χρόνια, καταβάλλεται μία συστηματική προσπάθεια για την καλύτερη κατανόηση των διάφορων ιδιοτήτων των υπερκρίσιμων ρευστών.

Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα πεδία όπως στη βιομηχανία τροφίμων, στα φυσικά προϊόντα, στις φαρμακευτικές εταιρείες και στις περιβαλλοντικές επιστήμες. Πολύ σημαντική είναι η αποτελεσματικότητά της στην εκχύλιση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας από τρόφιμα και φυσικά προϊόντα⁴¹.

Τα πλεονεκτήματα που διαθέτει η τεχνική αυτή έναντι της κλασικής υγρής - υγρής εκχύλισης είναι ποικίλα. Μερικά από τα πιο σημαντικά είναι τα παρακάτω⁴²:

- ❖ Αποτελεί μία «πράσινη» τεχνική εκχύλισης, καθώς χαρακτηρίζεται από τη μη κατανάλωση διαλυτών τοξικών για το περιβάλλον, οι οποίοι ανακυκλώνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.
- ❖ Διαθέτει χαμηλά λειτουργικά κόστη παρά τον ακριβό πάγιο εξοπλισμό της.
- ❖ Δεν αφήνει σχεδόν καθόλου υπολείμματα διαλύτη μετά το πέρας της διαδικασίας.
- ❖ Είναι μία ασφαλής τεχνική, η οποία δεν περιορίζεται σε χρήση εντός εργαστηρίου, αλλά χρησιμοποιείται και σε βιομηχανική κλίμακα.
- ❖ Επειδή εφαρμόζονται ήπιες συνθήκες εκχύλισης, θεωρείται κατάλληλη για την παραλαβή θερμοευαίσθητων ουσιών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η θερμοκρασία του CO₂ στο κρίσιμο σημείο είναι μόλις 30.9 °C.
- ❖ Φημίζεται για την παραλαβή παρασκευασμάτων τα οποία θυμίζουν το υλικό της προέλευσής τους.
- ❖ Παραλαμβάνονται τελικά προϊόντα χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.
- ❖ Είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης καθώς χαρακτηρίζεται από μεγάλες αποδόσεις.
- ❖ Συνήθως, απαιτούνται μικρότεροι χρόνοι εκχύλισης.

Το CO₂ είναι το πιο χρησιμοποιούμενο υπερκρίσιμο ρευστό διότι⁴³:

- ❖ Είναι φθηνό, άοσμο και φιλικό προς τον άνθρωπο και το περιβάλλον (όχι τοξικό, εύφλεκτο, διαβρωτικό, εκρηκτικό).
- ❖ Είναι άμεσα διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες υψηλής καθαρότητας.
- ❖ Γενικά αναγνωρίζεται σαν ασφαλές από τον FDA και τον EFSA.
- ❖ Έχει χαμηλό κρίσιμο σημείο. Η κρίσιμη θερμοκρασία είναι μόλις 30.9°C και η κρίσιμη πίεση 73.8bar.
- ❖ Έχει παρόμοια διαλυτική ικανότητα με αυτή του υγρού CO₂.
- ❖ Έχει παρόμοια διεισδυτική ικανότητα με αυτή του αερίου CO₂.
- ❖ Απομακρύνεται εύκολα από το εκχύλισμα με τη μορφή αερίου.
- ❖ Προσφέρει προϊόντα με την πιο φυσική γεύση και οσμή, η οποία πλησιάζει αυτές της πηγής προέλευσης.
- ❖ Κυκλοφορεί στο εμπόριο, χωρίς να επιβαρύνει επιπλέον το περιβάλλον, καθώς ανακτάται σαν υπόπροϊόν από διαδικασίες ζύμωσης ή από τη βιομηχανία των λιπασμάτων. Κατά συνέπεια, η χρήση του ως υπερκρίσιμος διαλύτης, δεν αυξάνει το ποσοστό του στην ατμόσφαιρα κι επομένως δε συμβάλλει επιπρόσθετα στο φαινόμενο του θερμοκηπίου.

B.1.1.2. Η θερμοδυναμική της υπερκρίσιμης κατάστασης

Ως εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά ορίζεται η παραλαβή χημικών ουσιών, οι οποίες αναμειγνύονται με το υπερκρίσιμο ρευστό για να σχηματίσουν την κινητή φάση. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, η κινητή φάση υποβάλλεται σε πιέσεις και θερμοκρασίες κοντά ή πάνω από το κρίσιμο σημείο, με σκοπό να ενισχυθεί η διαλυτική της ικανότητα⁴¹.

Υπερκρίσιμο σημείο: Από τη μία πλευρά, όταν ένα αέριο συμπιέζεται σε αρκετά υψηλή πίεση, γίνεται υγρό. Από την άλλη πλευρά, όταν ένα αέριο θερμαίνεται πάνω από μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, χωρίς να συμπιέζεται, γίνεται πάλι υγρό. Αυτή η τιμή στη θερμοκρασία καλείται κρίσιμη θερμοκρασία και η αντίστοιχη τιμή στην τάση ατμών καλείται κρίσιμη πίεση. Αυτές οι τιμές θερμοκρασίας και πίεσης καθορίζουν το κρίσιμο σημείο, το οποίο είναι μοναδικό για κάθε ουσία. Όταν οι τιμές στη θερμοκρασία και την πίεση υπερβαίνουν αυτές του κρίσιμου σημείου, τότε η κατάσταση στην οποία βρίσκεται η ουσία καλείται υπερκρίσιμη.

Κατ' επέκταση, το ρευστό αποκτά πολλές από τις ιδιότητες τόσο των αερίων, όσο και των υγρών.

Η διαδικασία ξεκινάει με το CO₂ σε αέρια μορφή. Έπειτα συμπιέζεται σε υγρή κατάσταση πριν γίνει υπερκρίσιμο. Όταν γίνει υπερκρίσιμο (θερμοκρασία 30.9 °C, πίεση 73.8 bar και πυκνότητα 0.467 gm / mL) τότε η διαδικασία της εκχύλισης

ξεκινάει. Συγκεκριμένα το υπερκρίσιμο CO₂ έχει παρόμοια πολικότητα με αυτή του εξανίου, οπότε αποτελεί κατάλληλο διαλυτικό μέσο για την εκχύλιση άπολων ενώσεων. Με τη χρήση συνδιαλύτη π.χ. EtOH (πράσινος διαλύτης) αυξάνεται η πολικότητα του διαλυτικού μέσου. Οι ιδιότητες του υπερκρίσιμου CO₂ κοντά στο κρίσιμο σημείο αλλάζουν σημαντικά με την παραμικρή διαφοροποίηση στις τιμές της θερμοκρασίας και της πίεσης.

B.1.1.3. Η συμπεριφορά της διαλυτότητας και τα φαινόμενα μεταφοράς στην υπερκρίσιμη κατάσταση.

Ο επιτυχής σχεδιασμός και η ανάπτυξη της διαδικασίας της εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά σε βιομηχανική κλίμακα προϋποθέτει όχι μόνο τη γνώση των ιδιοτήτων της θερμοδυναμικής ισορροπίας αλλά και την κατανόηση των ιδιοτήτων μεταφοράς του υπερκρίσιμου CO₂. Από τη μία, τα χαρακτηριστικά της εκχύλισης από θερμοδυναμικής άποψης είναι αυτά που συμβάλλουν στην υλοποίηση της διαδικασίας, καθώς και στην εύρεση των καλύτερων όσο το δυνατόν συνθηκών για το διαχωρισμό του δείγματος. Από την άλλη, η γνώση των ιδιοτήτων μεταφοράς του υπερκρίσιμου διαλύτη και της αντίστασης που προβάλλεται στα διάφορα φαινόμενα μεταφοράς είναι απαραίτητη για να καθοριστεί τόσο ο χρόνος της εκχύλισης, όσο και το μέγεθος των συστατικών του δείγματος που πρόκειται να εκχυλιστεί⁴¹.

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει καμία επιφανειακή τάση σε ένα υπερκρίσιμο ρευστό, καθώς επίσης δεν υπάρχει και όριο μεταξύ των φάσεων υγρού/αερίου, με την αλλαγή της πίεσης και της θερμοκρασίας του ρευστού, οι ιδιότητές του μπορούν να προσομοιάζουν περισσότερο εκείνες των υγρών ή περισσότερο εκείνες των αερίων.

Η διαλυτότητα σε ένα υπερκρίσιμο ρευστό με σταθερή θερμοκρασία, τείνει να αυξάνει με την αύξηση της πυκνότητας και της διηλεκτρικής σταθεράς του ρευστού. Επομένως, δεδομένου ότι η πυκνότητα αυξάνει, με την αύξηση της πίεσης αυξάνεται και η διαλυτότητα.

Η σχέση της διαλυτότητας με τη θερμοκρασία είναι λίγο πιο περίπλοκη. Σε σταθερή πυκνότητα, η διαλυτότητα αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ωστόσο, κοντά στο κρίσιμο σημείο, η πυκνότητα μπορεί να πέσει απότομα με μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας. Ως εκ τούτου, κοντά στην κρίσιμη θερμοκρασία, η διαλυτότητα μειώνεται συχνά με την αύξηση της θερμοκρασίας, κι έπειτα αυξάνεται ξανά.

Η προσθήκη συνδιαλύτη σε πολύ μικρή συγκέντρωση πραγματοποιείται προκειμένου να τροποποιηθούν κάποια χαρακτηριστικά του διαλύτη όπως η πολικότητα και οι αλληλεπιδράσεις, χωρίς όμως να αλλάξει σημαντικά η πυκνότητα και η συμπίεστικότητα του αρχικού υπερκρίσιμου διαλύτη. Ο συνδιαλύτης αναμειγνυόμενος με τον υπερκρίσιμο διαλύτη είναι κι αυτός υπερκρίσιμος, όταν η

πίεση και η θερμοκρασία του είναι πάνω από τις αντίστοιχες τιμές του κρίσιμου σημείου του μείγματος των δύο (οι οποίες τελικά δε διαφέρουν και πολύ από τις τιμές που έχει μόνος του ο υπερκρίσιμος διαλύτης). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι με τη χρήση ενός πιο πολικού συνδιαλύτη, η κινητή φάση ενδέχεται να μην είναι πραγματικά υπερκρίσιμη. Οι συνθήκες είναι πλέον υποκρίσιμες και επιφέρουν μικρότερες αλλαγές στην πυκνότητα του ρευστού με μια μικρή διαφοροποίηση στις τιμές θερμοκρασίας και πίεσης.

Γενικά, το ιξώδες εξαρτάται από τις τιμές θερμοδυναμικών μεταβλητών, όπως είναι η θερμοκρασία και η πίεση. Πιο συγκεκριμένα η τιμή του αυξάνεται με την αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία, ενώ αντίθετα η τιμή του μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας υπό σταθερή πίεση.

Γενικά, η τιμή της διάχυσης στο υπερκρίσιμο CO₂ αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και μειώνεται με την αύξηση της πίεσης. Παρότι η διάχυση επηρεάζεται από αλλαγές στη συγκέντρωση, την πίεση και τη θερμοκρασία, η επίδραση της σε ένα σύστημα είναι πολύ μικρή.

Γενικά, η τιμή της θερμικής αγωγιμότητας εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την πίεση του ρευστού. Η τιμή της μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στην υπερκρίσιμη κατάσταση, αποκτά την ελάχιστη τιμή της σε οποιαδήποτε τιμή της πίεσης, και μετά αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και την αύξηση της πυκνότητας στα περισσότερα υπερκρίσιμα ρευστά.

B.1.2. Φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής

B.1.2.1. Η εφαρμογή της τεχνικής και τα πλεονεκτήματά της

Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography - CPC) αποτελεί μία από τις παραλλαγές της υγρής –υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται σήμερα. Βασίζεται στην κατανομή των ουσιών του μίγματος στις δύο φάσεις του διφασικού συστήματος των διαλυτών και ο διαχωρισμός των ουσιών σχετίζεται με τους συντελεστές κατανομής τους⁴⁴.

Η στήλη της συσκευής CPC αποτελείται από μια σειρά καναλιών που συνδέονται σε σειρά με λεπτούς αγωγούς και είναι τοποθετημένα σε δίσκους κυκλικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα. Η περιστροφική κίνηση του στροφέα υποβάλλει την παρούσα διάταξη σ' ένα σταθερό πεδίο φυγόκεντρου.

Δύο μη αναμίξιμα υγρά, που έχουν παρασκευαστεί με ανάμιξη δύο ή περισσότερων διαλυτών, χρησιμοποιούνται ως κινητή και στατική φάση. Λόγω της υγρής τους φύσης και οι δυο φάσεις μπορούν να επιλεγούν ως κινητή ή στατική. Πιο συγκεκριμένα, η στατική φάση διατηρείται στο εσωτερικό της στήλης με την

εφαρμογή της φυγόκεντρου δύναμης που παράγεται από τη περιστροφή γύρω από τον κεντρικό άξονα. Η δεύτερη φάση του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως κινητή φάση και τροφοδοτείται υπό πίεση μέσα στη στήλη και κινείται διαμέσου της στατικής φάσης. Επιπλέον, ανάλογα με την ροή των φάσεων διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις: αν η βαριά φάση είναι η στατική και η ελαφριά η κινητή, τότε η ροή της κινητής είναι ανιούσα, ενώ αν η βαριά φάση είναι η κινητή και η ελαφριά η στατική, τότε η ροή της κινητής είναι κατιούσα.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι τα παρακάτω:

- Πρόκειται για ένα χρωματογραφικό σύστημα που έχει σχεδιαστεί για τον παρασκευαστικό διαχωρισμό ουσιών και χαρακτηρίζεται από χαμηλές πιέσεις, υψηλούς ρυθμούς ροής και τη δυνατότητα χρήσης ενός μεγάλου εύρους διαλυτών.
- Σε αντίθεση με άλλες χρωματογραφικές μεθόδους, η στατική φάση δεν είναι στερεή κι έτσι περιορίζεται σημαντικά ο κίνδυνος της μη αντιστρεπτής προσρόφησης των προς διαχωρισμό ουσιών.
- Η στατική φάση είναι πολύ λιγότερο ακριβή από τις περισσότερες στερεές φάσεις.
- Μπορεί να επιτευχθεί η στόχευση στην απομόνωση μιας ουσίας. Επίσης, περισσότερες ουσίες, αντιπροσωπεύοντας ένα μεγάλο εύρος από πολικότητες, μπορούν πιθανά να διαχωριστούν με μια κατάλληλα αναπτυγμένη μέθοδο. Για αυτόν το σκοπό είναι διαθέσιμοι τρόποι που περιλαμβάνουν έκλυση είτε κανονικής είτε αντίστροφης φάσης, αλλά με αλλαγή κινητής και στατικής φάσης. Τέλος, τα αποτελέσματα του διαχωρισμού χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα σε αντίθεση με τις τεχνικές στις οποίες γίνεται χρήση στερεών μέσων.
- Η επιλογή συστήματος διαλυτών έχει γίνει ακόμα πιο εκλεπτυσμένη και σαφής, επιτρέποντας μία πιο γρήγορη και πιο στοχευόμενη ανάπτυξη των συνθηκών για το διαχωρισμό. Επιπρόσθετα, ένα μεγάλο εύρος οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον διαλυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί.
- Οι τιμές των συντελεστών κατανομής είναι πειραματικά αναπαραγώγιμοι, ακόμα και σε μεγαλύτερης κλίμακας διαχωρισμούς.
- Ο διαχωρισμός φυγόκεντρης κατανομής μπορεί να συνδυαστεί με σχεδόν κάθε ανιχνευτή συμβατό με την υγρή χρωματογραφία.
- Η μαθηματική μοντελοποίηση βασισμένη στις τιμές των συντελεστών κατανομής και στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη του χρόνου κατακράτησης, της ταυτοποίησης των αναλυτών και το διαχωρισμό μεγαλύτερης κλίμακας.
- Λαμβάνει χώρα ολοκληρωτική ανάκτηση του δείγματος.

- Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται δημιουργούν ένα ήπιο χημικό περιβάλλον το οποίο ελαχιστοποιεί την αποδόμηση και τη χημική μετουσίωση των δειγμάτων.
- Είναι σύντομη χρονικά τεχνική, καθώς απαιτείται μία μέρα για να ολοκληρωθεί, ενώ άλλες χρειάζονται πολύ περισσότερο χρόνο (ακόμη και μία εβδομάδα στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας στήλης).
- Καταναλώνονται μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών κατά τη διαδικασία.

B.1.2.2. Η επιλογή διφασικού συστήματος

Η επιλογή διφασικού συστήματος διαλυτών για τη χρωματογραφία αυτή είναι τόσο σημαντική όσο και η επιλογή στήλης και συστήματος έκλουσης για την HPLC. Βασικά κριτήρια αποτελούν⁴⁴:

- η πολικότητα του δείγματος
- η διαλυτότητα
- το φορτίο των ενώσεων
- η ευαισθησία των ουσιών
- η ικανότητά του δείγματος να δημιουργεί σύμπλοκα

Ικανοποιητικός συνδυασμός διαλυτών επιτυγχάνεται όταν:

- ✓ Το δείγμα διαλύεται εύκολα και παραμένει σταθερό σε αυτό.
- ✓ Προκύπτει διφασικό σύστημα σε αναλογία των δύο φάσεων περίπου 1:1, με μικρό χρόνο εξισορρόπησης αυτών ($t < 60$ s)
- ✓ Οι συντελεστές κατανομής K των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις κυμαίνονται μεταξύ των τιμών $0.2 < K < 5.0$ (ιδανικά 1.0).
- ✓ Το σύστημα των διαλυτών μπορεί να συντελέσει στην ικανοποιητική συγκράτηση της στατικής φάσης στη στήλη.

Η επιλογή συστήματος διαλυτών πραγματοποιείται με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας και της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Η δεύτερη είναι χρήσιμη για τον έλεγχο του καταμερισμού στις δύο φάσεις. Η βελτιστοποίηση της τεχνικής επιτυγχάνεται αρχικά με την εύρεση εκείνου του συνδυασμού των διαλυτών στους οποίους το δείγμα θα διαλύεται εύκολα κι έπειτα με την εξασφάλιση ενός συντελεστή κατανομής στις δύο φάσεις που θα προσεγγίζει τη μονάδα.

Όταν ένα δείγμα κατανέμεται και στις δύο φάσεις του συστήματος των διαλυτών, τότε το σύστημα των διαλυτών μπορεί εν δυνάμει να κριθεί κατάλληλο για τη χρωματογραφία, ενώ όταν κατανέμεται αποκλειστικά στη μία φάση, κρίνεται ακατάλληλο. Συνήθως τα περισσότερα συστήματα διαλυτών είναι μίγματα τριών, τεσσάρων ή ακόμα και περισσότερων διαλυτών Σε γενικές γραμμές όταν

χρησιμοποιούνται πάνω από δύο διαλύτες αυξάνεται η διαχωριστική ικανότητα των διφασικών συστημάτων.

B.1.2.3. Οι παράμετροι που καθορίζουν τη συμπεριφορά του δείγματος εντός της στήλης

Είναι σημαντικό το διάλυμα του δείγματος να μην ανατρέπει το σχηματισμό των δύο φάσεων όταν αναμειγνύεται με το σύστημα των διαλυτών. Όταν αυτό δεν επιτυγχάνεται, η κινητή φάση είναι πιθανό να εξωθήσει τη στατική φάση σχεδόν εξ ολοκλήρου από τη στήλη. Προκειμένου να διασφαλιστεί η ικανοποιητική διατήρηση της στατικής φάσης μέσα στη στήλη, πρέπει να γίνει διάλυση του δείγματος σε περίπου ίσους όγκους των δύο φάσεων και να μετρηθεί ο χρόνος αποκατάστασης του διφασικού διαλύματος μαζί με το δείγμα στο εσωτερικό του. Όσο υψηλότερη είναι η διατήρηση της στατικής φάσης, τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση των κορυφών στο χρωματογράφημα και αποτελεσματικότερος ο διαχωρισμός των αναλυτών.

Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης προσδιορίζει το χρόνο διαχωρισμού, ενώ το ποσό της στατικής φάσης που διατηρείται εντός της στήλης καθορίζει το εύρος της κορυφής. Ένας μικρότερος ρυθμός ροής της κινητής φάσης συνήθως δίνει υψηλότερο επίπεδο διατήρησης της στατικής φάσης στο εσωτερικό της στήλης, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την ανάλυση των κορυφών των ουσιών, αν και απαιτείται περισσότερος χρόνος για το διαχωρισμό τους.

Από την άλλη, η χρήση μικρότερης ταχύτητας περιστροφής συντελεί στη μείωση του όγκου της στατικής φάσης που παραμένει στη στήλη οδηγώντας σε χαμηλότερη ανάλυση των κορυφών. Αντίθετα, οι υψηλότερες ταχύτητες μπορεί να προκαλέσουν υπερβολική διεύρυνση της ζώνης του δείγματος λόγω των βίαιων παλμών της στήλης, από την αυξημένη πίεση.

B.1.3. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

➤ Αρχή της μεθόδου

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) καθιερώθηκε στη δεκαετία του 1950 και είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για τον γρήγορο έλεγχο μιγμάτων και καθαρών ουσιών. Βασικά πλεονεκτήματά της είναι ότι είναι μια γρήγορη, φθηνή και φορητή μέθοδος ποιοτικής ανάλυσης^{45,46}.

Χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με γέλη πυριτίου. Το δείγμα εφαρμόζεται στη βάση της πλάκας ως σημείο ή ζώνη. Οι διαχωρισμοί εκτελούνται καθώς η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό θάλαμο ανάπτυξης με

κατάλληλο διαλύτη. Η πλάκα τοποθετείται με αυτόν τον τρόπο ώστε να διαβραχεί μόνο το κατώτερο άκρο της, αλλά να μη βραχεί το τμήμα της πλάκας όπου τοποθετήθηκαν οι κηλίδες. Το μέτωπο του διαλύτη κινείται στην πλάκα μέσω του προσροφητικού μέσου λόγω τριχοειδικών φαινομένων και αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως ανάπτυξη.

Σε όλες τις περιπτώσεις, ο διαχωρισμός προκύπτει από τους διαφορετικούς ρυθμούς μετακίνησης των συστατικών του δείγματος στην κατεύθυνση που διανύθηκε από την κινητή φάση. Η απόσταση που διανύει η κάθε ουσία καθορίζεται από τη σχετική της συγγένεια για τη στατική φάση ως προς την κινητή φάση. Ο παράγοντας ποσοτικοποίησης της μετανάστευσης μιας ένωσης σε ένα συγκεκριμένο σύστημα προσροφητή και διαλύτη είναι η τιμή R_f .

Μετά την ανάπτυξη και την εξάτμιση της κινητής φάσης, τα συστατικά του δείγματος ανιχνεύονται με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας σε δύο κυρίως μήκη κύματος 254nm και 366nm ή/και την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με ψεκασμό της πλάκας με αντιδραστήρια εμφάνισης ανάλογα τις κατηγορίες χημικών ενώσεων που περιλαμβάνει το δείγμα.

➤ Πειραματική πορεία

Για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών ουσιών με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (αναλυτική TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου 20 x 20 cm κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου και με πάχος στιβάδας 0.1 mm (Silica gel 60 F254-Merck). Η παρατήρηση των χρωματογραφήματων έγινε σε λάμπα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis, CAMAG TLC Visualizer) σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm. Τέλος, οι πλάκες ψεκάστηκαν με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης (αντιδραστήριο εμφάνισης), θερμάνθηκαν και παρατηρήθηκαν στο ορατό. Για την παρασκευή του μεθανολικού διαλύματος θειϊκής βανιλίνης αναμείχθηκαν δύο διαλύματα: το διάλυμα (Α) που περιείχε βανιλίνη 5 % (w/v) σε μεθανόλη και το διάλυμα (Β) που περιείχε πυκνό H_2SO_4 5 % (v/v) σε μεθανόλη. Ίσοι όγκοι αναμιγνύονταν λίγο πριν τον ψεκασμό και τα χρωματογραφήματα θερμαίνονταν για 2 min στους 105 °C.

B.1.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-απόδοσης (HPLC) / μέσης πίεσης (MPLC)

➤ Αρχή της μεθόδου

Οι βασικές αρχές που διέπουν την υγρή χρωματογραφία για το διαχωρισμό των ουσιών του αναλυόμενου δείγματος είναι (α) η διαφορετική ικανότητα προσρόφησης τους στη στατική φάση (χρωματογραφία προσρόφησης) και (β) η διαφορετική κατανομή των μορίων μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, δηλαδή μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης (χρωματογραφία κατανομής). Ο διαχωρισμός των μορίων στην προσρόφηση εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και της στατικής φάσης, οι οποίες είναι δυνάμεις διασποράς, διπόλου-διπόλου και δεσμοί υδρογόνου, ενώ στην κατανομή στηρίζεται στον διαφορετικό συντελεστή κατανομής των συστατικών ενός μίγματος σε ορισμένο σύστημα διαλυτών^{46,47}.

Τόσο στη χρωματογραφία MPLC, όσο και στη χρωματογραφία HPLC η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας διαμέσου της στατικής. Η Βασική διαφορά μεταξύ των δύο χρωματογραφιών είναι η τιμή της πίεσης που εφαρμόζεται και κατά επέκταση και η διαφορετική διαχωριστική ικανότητα των αναλυόμενων ουσιών. Η τιμή της πίεσης στην MPLC είναι μέχρι 20bar, ενώ στην HPLC αναλυτική ή παρασκευαστική είναι πάνω από 20bar.

Η στατική φάση αποτελείται είτε από στερεό πορώδες υλικό με ενεργή επιφάνεια και μικροσωματιδιακή μορφή (χρωματογραφία προσροφήσεως), ή από ένα λεπτό υμένιο υγρού καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου (χρωματογραφία κατανομής), που βρίσκεται μέσα στη στήλη. Η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών.

Κάθε συστατικό μετακινείται μέσα στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα και αυτό αποτελεί τη βάση κάθε χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική πραγματοποιείται μέσω χρήσης αντλιών μέσης/υψηλής πίεσης με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά.

Ανάλογα με τη πολικότητα της στατικής φάσης, η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) και αντίστροφης φάσης (reversed phase).

Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης αντλίας υψηλής πίεσης είναι ότι επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής

φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό.

➤ Πειραματική πορεία

Αρχικά, όσον αφορά στην αναλυτική HPLC, η διάταξη περιελάμβανε ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) κι επομένως ανιχνεύονταν όλες οι κορυφές που αντιστοιχούσαν σε ουσίες που απορροφούν σε οποιοδήποτε μήκος κύματος στο UV.

Έπειτα, όσον αφορά στην παρασκευαστική HPLC, επιλέχθηκε μόνο ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος στον ανιχνευτή UV (220 nm) για τις ουσίες που απορροφούν σε αυτό και παραλήφθηκε το χρωματογράφημα με τις αντίστοιχες κορυφές. Επιπλέον, για την αξιολόγηση των παραληφθέντων κλασμάτων πραγματοποιήθηκε TLC προκειμένου να αναγνωριστούν οι ενώσεις που απορροφούν και να ελεγχθεί η καθαρότητά τους.

Τέλος, όσον αφορά στη MPLC, δεν υπήρξε κάποιος συνδεδεμένος ανιχνευτής. Η αξιολόγηση των παραληφθέντων κλασμάτων πραγματοποιήθηκε με TLC προκειμένου να αναγνωρισθούν οι περιεχόμενες ουσίες σε κάθε κλάσμα.

B.1.5. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με Μικροκύματα (MAE)

Μικροκύματα: Τα μικροκύματα καλύπτουν περιοχή συχνοτήτων από 300 MHz -300 GHz και η λειτουργία τους βασίζεται στη θέρμανση που επιτυγχάνεται μέσω απορρόφησης ενέργειας, σε πολικά-διηλεκτρικά υλικά και διαλύτες που φέρουν μόνιμα δίπολα (π.χ. νερό). Η παραπάνω διαδικασία εξαρτάται από την ιοντική αγωγιμότητα, δηλαδή τη μετανάστευση των ιόντων υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Η ευθυγράμμιση των διπόλων αυτών με το ολοένα και μεταβαλλόμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, έχει ως αποτέλεσμα τη δόνηση των μορίων αυτών και την παραγωγή θερμότητας. Η τεχνική αυτή θεωρείται «πράσινη», δηλαδή φιλική προς το περιβάλλον και το χρήστη, διότι έχει τα παρακάτω πλεονεκτήματα ^{48,49}.

- Χαρακτηρίζεται από μειωμένη κατανάλωση των διαλυτών
- Επιτυγχάνεται μικρότερος χρόνος εκχύλισης
- Υπάρχει υψηλή ανάκτηση
- Υπάρχει επαναληψιμότητα
- Είναι κατάλληλη για θερμοευαίσθητες ουσίες
- Υπάρχει δυνατότητα ανάδευσης
- Είναι απλή στην εφαρμογή
- Υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης εκχύλισης μεγάλου αριθμού δειγμάτων
- Είναι μικρότερη η επεξεργασία των τελικών προϊόντων
- Έχει χαμηλό λειτουργικό κόστος

Βασικές παράμετροι που καθορίζουν την απόδοση μιας εκχύλισης είναι ο χρόνος της εκχύλισης, η αναλογία στερών συστατικών προς το διαλύτη, η ισχύς, η θερμοκρασία, και η σύσταση του διαλυτικού μέσου³⁹.

B.1.6. Εκχύλιση υποβοηθούμενη με Υπέρηχους (UAE)

Οι υπέρηχοι χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες εκχύλισης σε εύρος συχνοτήτων 20–100kHz. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο φαινόμενο της σπηλαίωσης, που συμβαίνει στη μάζα του διαλύτη κατά την εφαρμογή των διαφόρων συχνοτήτων. Κατά το φαινόμενο αυτό, ο διαλύτης σε μικροκυτταρικό επίπεδο απορροφάει την ακτινοβολία δημιουργώντας μικρές φυσαλίδες στη μάζα του, οι οποίες μέσω συνεχόμενων κύκλων συμπύκνωσης–αραίωσης οδηγούν στο σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων, την απελευθέρωση των δραστικών συστατικών και εν τέλει στην αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Ωστόσο μετά το πέρας της εκχύλισης είναι απαραίτητη η συμπύκνωση του δείγματος για την απομάκρυνση του διαλύτη⁵⁰.

Οι κύριες παράμετροι που καθορίζουν την εκχύλιση με χρήση υπερήχων είναι η αναλογία στερεού υλικού προς το υγρό, η θερμοκρασία, η φύση του διαλυτικού μέσου, η ισχύς των υπερήχων και ο χρόνος της εκχύλισης⁵⁰.

Κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι:

- η μεγάλη μείωση του χρόνου εκχύλισης
- η υψηλότερη απόδοση των εκχυλίσεων
- η υψηλή αναπαραγωγικότητα σε συντομότερο χρόνο
- ο απλοποιημένος χειρισμός
- η μειωμένη κατανάλωση διαλυτών

B.1.8. Αντιβακτηριακός έλεγχος

Ο αντιβακτηριακός έλεγχος που διεξήχθη βασίζεται στη μέθοδο αραίωσης με άγαρ⁵¹. Τα εκχυλίσματα και τα κλάσματα διαλύθηκαν σε DMSO και αξιολογήθηκαν αρχικά σε συγκέντρωση 8 mg / mL.

Όσον αφορά στις αερόβιες καλλιέργειες, 250 μL των διαλυμάτων ενσωματώθηκαν σε άγαρ Mueller Hinton (BioMerieux) σε τελικό όγκο 20 mL. Ειδικότερα, μέσα σε κάθε τρυβλίο υπήρχαν 1.75 mL νερού, 0.25 mL διαλύματος και 18 mL άγαρ. Κατά συνέπεια, η τελική συγκέντρωση του υπό δοκιμασία εκχυλίσματος-κλάσματος ήταν 0.1 mg / mL.

Επιπρόσθετα, η οφλοξακίνη χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε όλες τις σειρές πειραμάτων. Η οφλοξακίνη είναι ένα αντιβιοτικό ευρέως φάσματος δραστικό

κατά Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων. Είναι βακτηριοκτόνο, καθώς μετά τη δέσμευσή του στην DNA γυράση, αναστέλλει την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA του και συνεπώς την αναπαραγωγή του.

Διεξήχθη η μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC/Minimum Inhibitory Concentration) για το εκχύλισμα EtOAc. Είναι η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη βακτηρίων. Έτσι, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του προαναφερόμενου εκχυλίσματος στην οποία αναστέλλεται πλήρως η δραστηριότητα κάθε στελέχους που περιλαμβάνονταν στον κατάλογο βακτηρίων. Για τον προσδιορισμό του MIC, παρασκευάστηκαν γεωμετρικές αραιώσεις σε DMSO για να δώσουν τελικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος 100 - 0.5 mg / mL.

Τα μέσα δοκιμής επωάστηκαν για 18 ώρες στους 37 °C. Οι τυφλοί έλεγχοι των μικροβιακών καλλιιεργειών επωάστηκαν με 250 µL DMSO υπό τις ίδιες συνθήκες. Το DMSO προσδιορίστηκε ότι είναι μη τοξικό υπό αυτές τις συνθήκες.

Όσον αφορά στις αναερόβιες καλλιέργειες (στελέχη *Streptococci* και *Propionibacterium*) χρησιμοποιήθηκε ως μέσο άγαρ Wilkins-Chalgren και το τρυβλίο επωάστηκε σε δοχείο Gas Pak για 24 ώρες. Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

Τέλος, όσον αφορά στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων, σε κάθε τρυβλίο εγχύθηκαν μια σειρά από βακτήρια, το καθένα μέσα σε μια μικρή υποδοχή (ένα τετραγωνάκι). Γνωρίζοντας από την αρχή σε ποια υποδοχή τοποθετήθηκε το κάθε στέλεχος, παρατηρήθηκε αν ανεστάλη η όχι η ανάπτυξή του. Λαμβάνεται ως δεδομένο πως αν και μόνο αν δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη μέσα στην υποδοχή μπορούμε να ισχυριστούμε αναστολή, ενώ αντίστοιχα αν υπάρχουν από ελάχιστες αποικίες ως σημαντικός πολλαπλασιασμός, δεν υπάρχει αναστολή στη συγκεκριμένη συγκέντρωση που δοκιμάζεται το δείγμα.

B.1.9. Έλεγχος φαινολικού φορτίου και αντιοξειδωτικής δράσης

➤ Ολικό Φαινολικό Φορτίο

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu εισήχθη για πρώτη φορά από τους O. Folin και D. Ciocalteu το 1927. Χημικά, πρόκειται για ένα ετερο-πολυοξύ, το φωσφομολυβδοβουτυλικό οξύ, το οποίο όταν αντιδρά με φαινολική ομάδα παράγεται μπλε χρώση.

Μια πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος σε DMSO έγινε σε συγκεντρώσεις μεταξύ 100 µg / mL έως 2.5 µg / mL τελικής συγκέντρωσης (1 mg / mL έως 0.025 mg / mL αρχικής συγκέντρωσης).

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 υποδοχών, τοποθετήθηκαν 25 μL δείγματος (εκχύλισμα, DMSO ή γαλλικό οξύ), 125 μL αντιδραστήριου Folin Ciocalteu (10 % v/v σε H_2O) και 100 μL /διττανθρακικού νατρίου 7.5 %v/v (250 μL τελικού όγκου ανά υποδοχή) σε κάθε υποδοχή.

Αντίστοιχα τυφλά δείγματα ετοιμάστηκαν, στο πρώτο το δείγμα αντικαταστάθηκε από 25 μL DMSO και στο δεύτερο το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu αντικαταστάθηκε από 125 μL H_2O .

Οι πλάκες επώαστηκαν για 30 λεπτά προστατευμένες από το φως και σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στη συνέχεια η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765 nm. Οποιοδήποτε δείγμα παρουσίασε απορρόφηση πάνω και εκτός της πρότυπης καμπύλης, επαναλήφθηκε η αξιολόγηση του σε χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση (2 mg / mL ή χαμηλότερη).

Το ολικό φαινολικό φορτίο εκφράστηκε σε ισοδύναμο γαλλικού οξέος σε mg ανά γραμμάριο εκχυλίσματος.

➤ Ολικό Φορτίο Φλαβονοειδών

Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή του εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο χλωριούχου αλουμινίου (AlCl_3), το οποίο σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με την C-4 καρβονυλομάδα και είτε την C-3 ή την C-5 υδροξυλομάδα φλαβονών και φλαβονολών. Επιπροσθέτως, σχηματίζει όξινα ασταθή σύμπλοκα με ομάδες κατεχόλης των δακτυλίων A ή/και B του φλαβονοειδούς.

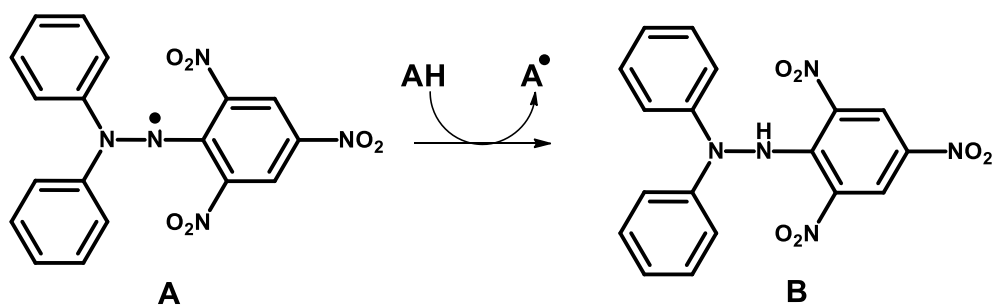
Μια πρότυπη καμπύλη της κερκετίνης έγινε σε DMSO και οι τελικές συγκεντρώσεις στην υποδοχή ήταν από 200 μg / mL έως 1.25 μg / mL (αρχική συγκέντρωση από 1 mg / mL ως 0.00625 mg / mL). Σε κάθε υποδοχή τοποθετήθηκαν 50 μL δείγματος (εκχύλισμα ή κερκετίνη), 160 μL EtOH, 20 μL AlCl_3 (1.8% w/v $\text{AlX}3.6\text{H}_2\text{O}$) και 20 μL οξικού νατρίου 820.3 mg σε 100 mL H_2O).

Αντίστοιχα τυφλά δείγματα ετοιμάστηκαν, προσθέτοντας είτε αντί για εκχύλισμα 50 μL DMSO, είτε αντί για τα αντιδραστήρια AlCl_3 και οξικό νάτριο 40 μL H_2O .

Οι πλάκες επώαστηκαν για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και διαβάστηκαν στα 415 nm. Οποιοδήποτε δείγμα παρουσίασε απορρόφηση πάνω από το υψηλότερο σημείο της πρότυπης καμπύλης επαναλήφθηκε σε χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση (2 mg / mL ή χαμηλότερη).

Το ολικό φορτίο φλαβονοειδών εκφράστηκε σε ισοδύναμο κερκετίνης σε mg ανά γραμμάριο εκχυλίσματος.

➤ Αντιοξειδωτικός έλεγχος DPPH



Εικόνα Β. 1. Αντίδραση DPPH (A, λ_{max} 517) παρουσία αντιοξειδωτικού αντιδραστηρίου

Το διάλυμα του αντιδραστηρίου 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) παρασκευάστηκε λίγο πριν το πείραμα με διάλυση 12.4 mg DPPH σε 100 mL αιθανόλης.

Σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκαν 10 mL διαλύματος του δείγματος (εκχύλισμα αρχικής συγκέντρωσης 4 mg / mL, τελική συγκέντρωση 200 μg / mL στην υποδοχή) και 190 μL διαλύματος DPPH.

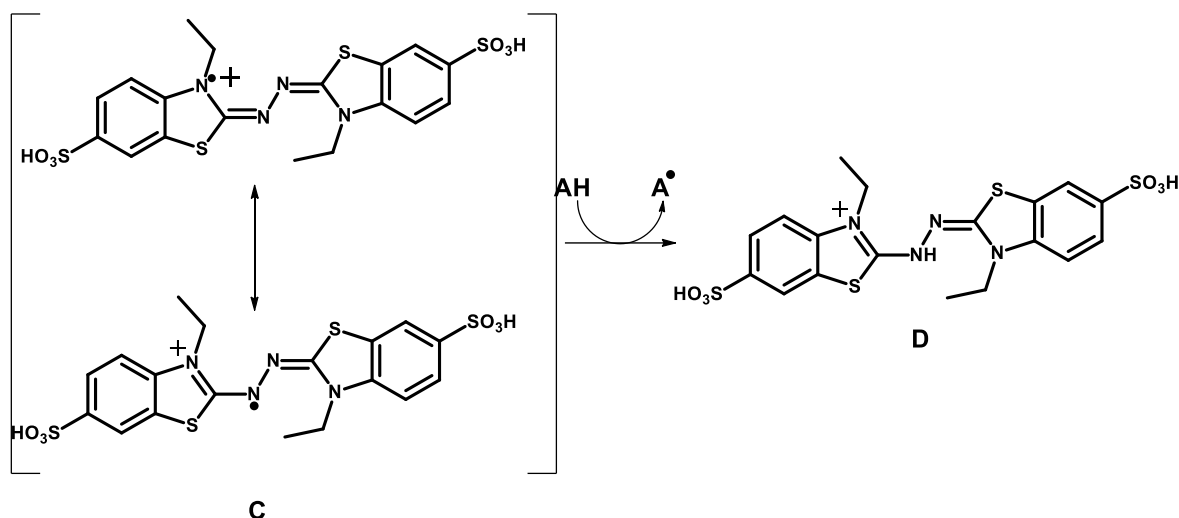
Για αρνητικό έλεγχο το δείγμα αντικαταστάθηκε με 10 mL DMSO και για το θετικό έλεγχο το δείγμα αντικαταστάθηκε με 10 mL γαλλικού οξέος (100 μL/mg αρχικής συγκέντρωσης, τελική συγκέντρωση 5 μg / mL) στην υποδοχή. Τυφλά δείγματα ετοιμάστηκαν επίσης.

Οι πλάκες επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένες από το φως. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm. Το αποτέλεσμα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\% \text{ DPPH Scavenging} = \frac{(OD_{\text{control}} - OD_{\text{blankcontrol}}) - (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blankofsample}})}{(OD_{\text{control}} - OD_{\text{blankofcontrol}})}$$

Εικόνα Β. 2. Εξίσωση υπολογισμού της αντιοξειδωτικής δράσης DPPH

➤ Αντιοξειδωτικός έλεγχος ABTS



Εικόνα Β. 3. Αντίδραση του $ABTS \bullet +$ (C, λ_{max} 734) παρουσία αντιοξειδωτικού αντιδραστήριου

Το αντιδραστήριο 2,2'-αζινο-δις (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS) παρασκευάστηκε μία ημέρα πριν από το πείραμα ως ακολούθως: 10 mL 7mM διαλύματος ABTS (36.02 mg σε 10 mLH₂O) αναμείχθηκαν με 164 μL διαλύματος 140 mM υπερθειικού καλίου (37.84 mg σε 1 mL H₂O) και αποθηκεύτηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας (16 ώρες). Το τελικό διάλυμα μετά την αποθήκευση αραιώθηκε σε απεσταγμένο H₂O (1: 20) μέχρις ότου η απορρόφηση του διαλύματος (100 μL διαλύματος ABTS και 50 μL DMSO) να ρυθμιστεί σε $0.70 \pm 0,02$.

Σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκαν 100 μL τελικού διαλύματος ABTS και 50 μL δείγματος (εκχύλισμα στα 600 μg / mL ως αρχική συγκέντρωση, τελική συγκέντρωση 200 μg / mL). Μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν για αρνητικό έλεγχο όπου 50 μL διαλύματος του δείγματος αντικαταστάθηκαν με 50 mL DMSO και για το θετικό έλεγχο όπου χρησιμοποιήθηκαν 50 μL διαλύματος trolox 25 μg / mL (τελική συγκέντρωση στη υποδοχή 8 μg / mL.Τυφλά δείγματα επίσης ετοιμάστηκαν.

Οι πλάκες επώαστηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 734 nm και το ποσοστό εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας προσδιορίστηκε με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ ABTS Scavenging} = \frac{(OD_{control} - OD_{blank\ control}) - (OD_{sample} - OD_{blank\ of\ sample})}{(OD_{control} - OD_{blank\ of\ control})} \times 100$$

Εικόνα Β. 4. Εξίσωση υπολογισμού της αντιοξειδωτικής δράσης του $ABTS \bullet +$

B.1.10. Έλεγχος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του ελαιόλαδου.

Μεταξύ των βασικών κριτηρίων αξιολόγησης της ποιότητας του ελαιόλαδου είναι η οξύτητα (υδρολυτικό τάγγισμα), η οξείδωση (οξειδωτικό τάγγισμα), το χρώμα, το άρωμα και η γεύση. Με βάση τον κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και τις τροποποιήσεις του, μερικές από τις πιο σημαντικές παραμέτρους προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα του ελαιόλαδου είναι οι παρακάτω:

Οξύτητα: Ο βαθμός ελεύθερης οξύτητας ορίζεται ως το ποσό των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο και εκφράζεται ως ποσοστό (%) του ελαϊκού οξέος. Τα λιπαρά αυτά οξέα βρίσκονται σε αυτή τη μορφή λόγω των υδρολυτικών φαινομένων (υδρόλυση εστέρων λιπαρών οξέων προς λιπαρά οξέα και γλυκερίνη) που λαμβάνουν χώρα.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας των οξέων στο δείγμα του ελαιόλαδου χρησιμοποιείται η μέθοδος της ογκομέτρησης, η οποία βασίζεται στην εξουδετέρωση της ποσότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων από το πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH). Το δείγμα διαλύεται αρχικά σε μίγμα αιθανόλης – αιθέρα και στη συνέχεια ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα NaOH παρουσία του δείκτη φαινολοφθαλεΐνη.

Υψηλή οξύτητα σημαίνει ότι το ελαιόλαδο έχει ταλαιπωρηθεί από ασθένειες του καρπού της ελιάς, υδρολύσεις και οξειδώσεις.

K(232): Συντελεστής υπολογισμού της απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 232 nm. Οφείλεται σε υδροϋπεροξειδία και σε συζυγή διένια. Αποτελεί δείκτη αρχικού σταδίου οξείδωσης (υδροϋπεροξειδία) ή ενδιάμεσου σταδίου οξείδωσης (διένια).

K(270): Συντελεστής υπολογισμού της απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 270 nm. Οφείλεται σε καρβονυλικές ενώσεις και συζυγή τριένια. Αποτελεί δείκτη προχωρημένου σταδίου οξείδωσης (τάγγισης) ή δείκτη ραφινάρισματος.

ΔΚ: Υπολογίζεται από τους προαναφερόμενους συντελεστές απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας και αποτελεί κριτήριο αναγνώρισης ενός κακής ποιότητας ελαιόλαδου.

Υπεροξειδία: Τα υπεροξειδία δημιουργούνται κυρίως από την αντίδραση του οξυγόνου με το ελαιόλαδο. Μπορεί να λαμβάνει χώρα είτε ενζυματικά, είτε χημικά και αποτελεί δείκτη αρχικού σταδίου οξείδωσης (τάγγισης). Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα αυτών των συστατικών του δείγματος (εκφρασμένη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg) που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο

προς μοριακό ιώδιο. Έπειτα, το αποδεσμευμένο ιώδιο ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

Ολικές Φαινόλες: Αυξάνουν την οξειδωτική σταθερότητα και σε αυτές οφείλονται σε μεγάλο βαθμό τα γευστικά χαρακτηριστικά του «πικρού» και του «φρουτώδους». Υψηλή τιμή ολικών φαινολών σημαίνει ότι το ελαιόλαδο έχει υψηλή προστασία έναντι του ταγγίσματος και ότι θα έχει μεγαλύτερη αντοχή στο χρόνο.

Ένας από τους πιο κοινούς τρόπους μέτρησης του ολικού φαινολικού φορτίου είναι με τη μέθοδο Folin Ciocalteu (B.1.9.). Επίσης υπάρχουν και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση είτε υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, είτε φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και οι οποίες συντελούν στον προσδιορισμό της δομής και της ποσότητας κάθε φαινολικής ένωσης.

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ: Κολοφώνιο



B.2. Απομάκρυνση του πολυμερούς από κολοφώνιο/μαστίχα με τη συμβατική μέθοδο

B.2.1. Πειραματική πορεία

Δεδομένης της ύπαρξης του πολυμερούς, η επεξεργασία του υλικού αποκτά μια ιδιαίτερη δυσκολία, γεγονός που αποτυπώνεται και στη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, για την εκχύλιση του υλικού οι *Barton et Seoane*¹⁹ δημιούργησαν το πρώτο πρωτόκολλο το 1956 με απώτερο στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση του μαστιχαδιενονικού οξέος. Στηριζόμενοι σε αυτό, οι *Paraschos et al.*¹⁸ πραγματοποίησαν τροποποιήσεις του προαναφερόμενου πρωτοκόλλου και κατάφεραν τη βελτιστοποίησή του, με σκοπό να απομακρύνουν το πολυμερές και να παραλάβουν το σύνολο των τερπενίων που τους ενδιέφερε.

Ένας συσδυασμός των δύο πρωτοκόλλων εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, με σκοπό την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους στην απομάκρυνση του πολυμερούς. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο στη μαστίχα όσο και σε δύο είδη κολοφωνίου. Τα δύο είδη κολοφωνίων διέφεραν στην υφή τους, καθώς το πρώτο ήταν με τη μορφή σκληρών και κιτρινωπών τεμαχίων, ενώ το δεύτερο έμοιαζε με υποκίτρινη άμορφη μάζα. Για να υλοποιηθεί η επεξεργασία των κολοφωνίων επετεύχθη θρυματοποίησή τους σε σκόνη με τη χρήση γουδιού, ενώ η μαστίχα ήταν ήδη σε μορφή σκόνης. Η ποσότητα του κάθε δείγματος κολοφωνίου σε σκόνη ήταν περίπου 2 kg.

➤ Καταβύθιση και διήθηση πολυμερούς

Συγκεκριμένα, μία ποσότητα 100 g και από τα 3 υλικά (ξεχωριστά) διαλύθηκε σε 400ml μίγματος διαλυτών MeOH/AcOEt 3/1, με χρήση υπερήχων. Αφέθηκαν 2 μέρες σε ηρεμία, προκειμένου να επιτευχθεί η



Εικόνα Β. 5. Διήθηση μαστίχας/ κολοφωνίου για την παραλαβή πολυμερούς

καταβύθιση του πολυμερούς, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση χωρίς κενό λαμβάνοντας στον ηθμό το ίζημα. Καθότι απαιτείτο μία εξαντλητική διήθηση των παραπάνω διαλυμάτων προκειμένου να παραληφθεί στον ηθμό το σύνολο του πολυμερούς, τα παραγόμενα διαλύματα διηθήθηκαν άλλες 2 φορές, αφού προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί πρώτα σε πάγο για να διευκολυνθεί η

περαιτέρω καταβύθιση του πολυμερούς. Στη συνέχεια, αφού τα διαλύματα αφέθηκαν πάλι σε ηρεμία για μία εβδομάδα, προκειμένου να καταβυθιστεί το σύνολο του πολυμερούς, διηθήθηκαν για τελευταία φορά και παραλήφθηκε προσθετικά με τις άλλες δύο η συνολική μάζα του πολυμερούς και από τα 3 υλικά.



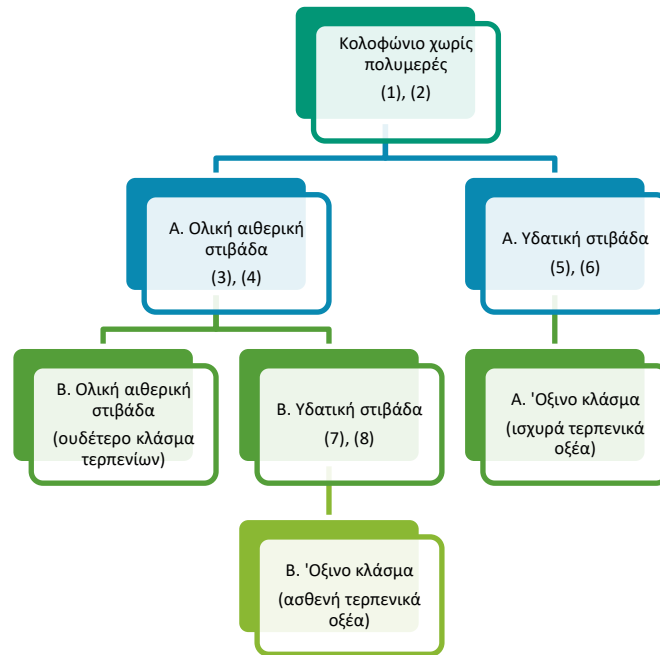
Εικόνα Β. 6. Συμπύκνωση κολοφωνίου χωρίς πολυμερές

➤ Πορεία επεξεργασίας του κολοφωνίου (1) μετά από την απομάκρυνση του πολυμερούς

Μετά την απομάκρυνση του πολυμερούς πραγματοποιήθηκε μία διαδικασία κλασμάτωσης των τερπενίων σε ουδέτερα και όξινα, της οποίας τα στάδια φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί ενώ συνοπτικά απεικονίζονται στο διάγραμμα της Εικόνας Β. 7.

Πίνακας Β. 1. Πορεία επεξεργασίας του κολοφωνίου μετά την απομάκρυνση του πολυμερούς

ΒΗΜΑΤΑ	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	ΣΚΟΠΟΣ
1	Προσθήκη Na_2CO_3 5 % w/v, υπέρηχοι	
2	Προσθήκη αιθέρα, υπέρηχοι (3 φορές)	A. Ολική αιθερική στιβάδα
3	Προσθήκη NaOH 0.5 N στην A. Ολική αιθερική στιβάδα, υπέρηχοι	
4	Προσθήκη αιθέρα, υπέρηχοι (3 φορές)	B. Ολική αιθερική στιβάδα (ουδέτερο κλάσμα τερπενίων)
5	Προσθήκη HCl 1 N στην A. υδατική, ώστε $\text{pH} = 7$	
6	Προσθήκη αιθέρα, υπέρηχοι (3 φορές)	A. Όξινο κλάσμα
7	Προσθήκη HCl 1 N στην B. υδατική στιβάδα, ώστε $\text{pH} = 7$	
8	Προσθήκη αιθέρα, υπέρηχοι (3 φορές)	B. Όξινο κλάσμα



Εικόνα Β. 7. Σχηματική αναπαράσταση της πορείας επεξεργασίας του κολοφωνίου μετά την απομάκρυνση του πολυμερούς

B.2.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

➤ Καταβύθιση και διήθηση πολυμερούς

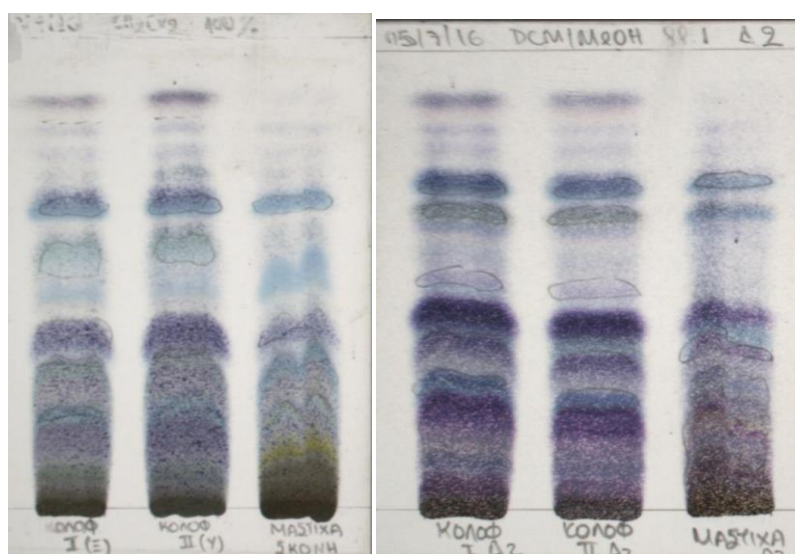
Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της καταβύθισης του πολυμερούς στα 3 υπο μελέτη υλικά.

Πίνακας Β. 2. Αποτελέσματα από την καταβύθιση και τη διήθηση του πολυμερούς

ΜΑΖΑ:100g		ΚΟΛΟΦΩΝΙΟ 1	ΚΟΛΟΦΩΝΙΟ 2	ΜΑΣΤΙΧΑ
ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ		Θολό πορτοκαλί υπερκείμενο δ/μα - Άσπρο ίζημα	Κιτρινοπορτοκαλί υπερκείμενο δ/μα - Ίζημα	Έντονο πορτοκαλί υπερκείμενο δ/μα - Όχι εμφανές ίζημα
ΔΙΗΘΗΣΗ	Ηθμός	Καφέ παχύρρευστο/ κίτρινο κρυσταλλικό ίζημα	Εκρέμ-μαστιχέ παχύρρευστο ίζημα	Κίτρινο κρυσταλλικό ίζημα
	Διήθημα	Θολό πορτοκαλί διήθημα	Θολό κιτρινοπορτοκαλί διήθημα	Θολό πορτοκαλί διήθημα

ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΜΑΖΑ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ	Περίπου 23.83 g Απόδοση: 23.83 %	Περίπου 15 g Απόδοση: 15 %	Περίπου 9.80 g Απόδοση: 9.80 %
-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------	-----------------------------------

Όπως φαίνεται, η απόδοση της προαναφερθείσας διαδικασίας, δηλαδή το ποσοστό της μάζας του πολυμερούς προς τη συνολική μάζα της πρώτης ύλης, είναι περίπου 24 %, 15 % και 10 % για το κολοφώνιο (1), το κολοφώνιο (2) και τη μαστίχα, αντίστοιχα.



Εικόνα Β. 8. TLC των υπερκείμενων διαλυμάτων μαστίχας και κολοφωνίων μετά την πρώτη (αριστερά) και δεύτερη (δεξιά) διήθηση σε συστήματα διαλυτών DCM/100 % και DCM/MeOH: 99/1 αντίστοιχα.

Τα προβλήματα που ανακύπτουν από τη διαδικασία αυτή είναι τα εξής:

Μικρή τροποποίηση της αναλογίας MeOH/EtOAc, προκειμένου να εξεταστεί η συμπεριφορά του υλικού και η καταβύθιση ή όχι του πολυμερούς, ανέδειξε μεγάλη διαφοροποίηση στα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας EtOAc επετεύχθη διαλυτοποίηση του ιζήματος, ενώ αντίθετα με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας MeOH καθίζανε μεγαλύτερη ποσότητα του υλικού.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για την καταβύθιση του πολυμερούς απαιτείται το διάλυμα είτε να αφεθεί 2 μέρες σε ηρεμία και μετά να διηθηθεί, είτε να αφεθεί 1 μέρα και μετά να διηθηθεί με επανάληψη αυτού του βήματος 3 φορές. Εδώ πραγματοποιήθηκε μια παραλλαγή, καθότι

ξεκινώντας με το πρώτο η μάζα που παραλήφθηκε στον ηθμό ήταν πολύ μικρότερη της προβλεπόμενης και συνεχίζοντας με επαναλήψεις όπως περιγράφηκε προηγουμένως πάλι δεν επετεύχθη τελικά η απόδοση που έχει περιγραφεί, καθώς το ποσοστό του πολυμερούς επί του συνόλου της μάζας ήταν μικρότερο από αυτό που προβλέπεται από τη βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τους *Paraschos et al*¹⁸, η απόδοση του πολυμερούς είναι περίπου 30 %.

➤ Πορεία επεξεργασίας του υπολείμματος του κολοφωνίου (1) μετά από την απομάκρυνση του πολυμερούς

Τα προβλήματα που ανέκυψαν από τη διαδικασία αυτή ήταν τα εξής:

Βήμα 1^ο: Στην προσθήκη Na_2CO_3 5 % w/v δεν υπήρξε πλήρης διάλυση του κολοφωνίου ακόμα και με τη χρήση υπερήχων για διάρκεια 6 ωρών. Δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική βελτίωση ακόμη και όταν το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία όλο το βράδυ. Επομένως υπήρξε πρόβλημα με τη διαδικασία αλκαλοποίησης.

Βήμα 2^ο: Στην προσθήκη αιθέρα με τη χρήση υπερήχων υπήρξε διάλυση και δημιουργήθηκε διφασικό σύστημα λόγω της ύπαρξης του Na_2CO_3 5 % w/v, καθώς επίσης και γαλάκτωμα.

Βήμα 3^ο: Στην προσθήκη NaOH 0.5 N, παρά τη χρήση των υπερήχων πάλι δεν υπήρξε διάλυση.

Βήμα 4^ο: Στην προσθήκη αιθέρα σχηματίστηκε διφασικό σύστημα λόγω της ύπαρξης του NaOH 0.5 N και μια ενδιάμεση επιφάνεια με αδιάλυτα τεμαχίδια. Με προσθήκη EtOAc , υπήρξε διαφοροποίηση στη διαλυτοποίηση των τερπενίων.

Βήμα 7^ο: Στην προσθήκη HCl 1 N στη Β. υδατική στιβάδα, προκειμένου το pH να γίνει 7, ελέγχθηκε το pH με πεχαμετρικό χαρτί πριν την προσθήκη και ήταν ήδη 7 παρά την προσθήκη NaOH στο 4^ο βήμα. Επομένως υπήρξε πάλι πρόβλημα στην αλκαλοποίηση.

Συμπερασματικά, όλη η παραπάνω διαδικασία ήταν χρονοβόρα, δαπανηρή λόγω της ποσότητας των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν και δύσκολη στην εκτέλεσή της λόγω και της ιδιαιτερότητας του υλικού. Συνεπώς, τα βήματα δεν υλοποιήθηκαν έτσι ακριβώς όπως σχεδιάστηκε στην πειραματική πορεία βάσει της βιβλιογραφίας. Τέλος, τα αποτελέσματα ήταν πολλές φορές αναξιόπιστα. Επομένως, κρίθηκε αναγκαία η εύρεση ενός

εναλλακτικού τρόπου απομάκρυνσης του πολυμερούς από το κολοφώνιο και τη μαστίχα για την παραλαβή ενός εκχυλίσματος πλούσιου σε τερπένια.

B.3. Εκχύλιση του κολοφωνίου με τη χρήση της τεχνικής των υπερκρίσιμων ρευστών

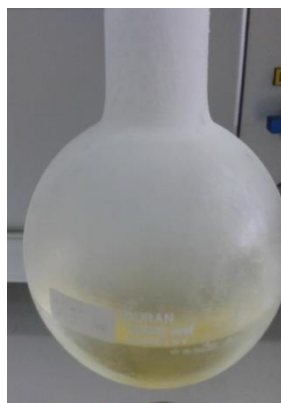
B.3.1. Πειραματική πορεία

Στόχος της παραπάνω διαδικασίας ήταν να παραληφθεί ένα εκχύλισμα με τη μέγιστη ποσότητα τερπενίων και ταυτόχρονα την ελάχιστη ως μηδαμινή ποσότητα πολυμερούς. Συνεπώς, διερευνήθηκε η επίδραση των συνθηκών εκχύλισης (θερμοκρασία, πίεση, χρόνος εκχύλισης, ποσοστό συνδιαλύτη) προκειμένου να επιτευχθεί ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την επίτευξη του προαναφερόμενου στόχου.

Η εκχύλιση της ρητίνης έλαβε χώρα στη συσκευή αναλυτικής κλίμακας (SeraTex). Ως υπερκρίσιμο ρευστό χρησιμοποιήθηκε το CO₂, του οποίου το κρίσιμο σημείο είναι σε θερμοκρασία 30.9 °C και πίεση 73.8 bar, ενώ η πυκνότητά του στις συνθήκες αυτές είναι 0.467 g / mL.

Όσον αφορά στην προετοιμασία του δείγματος, σε κάθε πείραμα από τα παρακάτω που έλαβαν χώρα, ποσότητα 10 g κολοφωνίου αναμείχθηκε με 10 g κελουλόζης και τοποθετήθηκαν εντός του δοχείου εκχύλισης. Η ανάμειξη με την κελουλόζη έγινε με σκοπό την ευκολότερη διέλευση του CO₂ μέσα από όλη τη μάζα του υλικού, καθώς και για να αποτραπεί ο κίνδυνος απόφραξης των φίλτρων λόγω της κολλώδους υφής του κολοφωνίου, διασφαλίζοντας έτσι την ομαλότερη λειτουργία της συσκευής και την ομοιόμορφη εκχύλιση της πρώτης ύλης³⁰.

Τα πειράματα που διεξήχθησαν, έγιναν στα πλαίσια ενός πειραματικού σχεδιασμού (Design Of Experiments_DOE)^{43,52,53} προκειμένου να μελετηθεί η επιρροή διαφόρων παραμέτρων διεργασίας σε μία ή περισσότερες αποκρίσεις του σχεδιασμού. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων (DoE) είναι σε θέση να προσδιορίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων και να προβλέψει τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης χρησιμοποιώντας ένα ελάχιστο αριθμό πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο σχεδιασμός 'Central Composite', προκειμένου να αξιολογηθεί αν οι παράμετροι της θερμοκρασίας, της



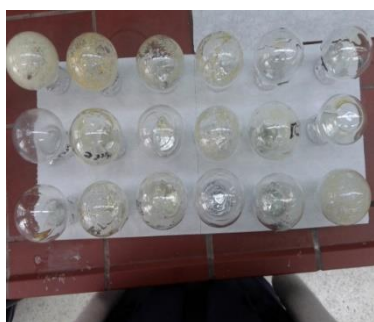
Εικόνα Β. 9. Εκχύλισμα κολοφωνίου από SFE

πίεσης, της ροής του διαλύτη και του ποσοστού του συνδιαλύτη επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη εκχυλιστική διαδικασία⁵⁴.

Συνολικά, μελετήθηκαν 4 αριθμητικές παράμετροι (numerical factors)²⁷, τα όρια των οποίων ορίστηκαν ως εξής:

- Θερμοκρασία: 40 – 70 °C
- Πίεση: 100 – 300 bar
- Ποσοστό συνδιαλύτη: 0 – 20 %
- Ποσότητα CO₂ ανά γραμμάριο υλικού (ratio): 20-200 mL / g

Δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκε σταθερή ροή CO₂ (10 mL / min) και σταθερή ποσότητα υλικού (10 g) ανά πείραμα, η μεταβαλλόμενη τιμή της ποσότητας CO₂ που περνάει ανά γραμμάριο υλικού (ratio), υπολογίστηκε



Εικόνα Β. 10. Εκχυλίσματα κολοφωνίου από SFE

τελικά από το χρόνο της εκχύλισης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η τιμή του ratio συμπίπτει με την τιμή του χρόνου εκχύλισης.

Από τα προβλεπόμενα πειράματα (32), 14 μόνο έλαβαν χώρα με τυχαία σειρά και παρουσιάζονται παρακάτω. Μέσα από την απόδοση του εκχυλίσματος που παραλήφθηκε, ως απόκριση του προαναφερθέντος σχεδιασμού, πραγματοποιήθηκε μια αρχική διερεύνηση ως προς την επίδραση που έχουν οι προαναφερόμενες παράμετροι στην εκχυλιστική διαδικασία.

B.3.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Πίνακας Β. 3. Συνθήκες και απόδοση στα πειράματα SFE που έλαβαν χώρα

ΠΕΙΡΑΜΑ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΠΙΕΣΗ (bar)	ΕtOH %	ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΑΠΟΔΟΣΗ %
4	62.5	250	5	65	16.99
17	40.0	200	10	110	28.50
16	62.5	250	15	155	47.38

3	47.5	250	5	65	10.72
21	55.0	200	0	110	0.44
1	47.5	150	5	65	8.19
8	62.5	250	15	65	49.71
29	55.0	200	10	110	38.07
30	55.0	200	10	110	41.83
10	62.5	150	5	155	8.93
2	62.5	150	5	65	8.21
5	47.5	150	15	65	15.24
12	62.5	250	5	155	22.38
25	55.0	200	10	110	31.98

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Σε σταθερές τιμές θερμοκρασίας, πίεσης και χρόνου, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση του ποσοστού του συνδιαλύτη (% περιεκτικότητα της αιθανόλης), **αυξάνεται σημαντικά** η απόδοση % της εκχύλισης (βλέπε χαρακτηριστικά τα αποτελέσματα των παρακάτω συνδυασμών πειραμάτων: **4-16** και **21-29** ή **30** ή **25**).
- ✓ Σε σταθερές τιμές θερμοκρασίας, % περιεκτικότητας αιθανόλης και χρόνου, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της τιμής της πίεσης, **αυξάνεται αρκετά** η απόδοση % της εκχύλισης (βλέπε χαρακτηριστικά τα αποτελέσματα των παρακάτω συνδυασμών πειραμάτων: **4-2** και **1-3**).
- ✓ Σε σταθερές τιμές πίεσης, % περιεκτικότητας αιθανόλης και χρόνου, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, **αυξάνεται** η απόδοση % της εκχυλιστικής διαδικασίας (βλέπε χαρακτηριστικά τα αποτελέσματα των παρακάτω συνδυασμών πειραμάτων: **4-3** και **17-29** ή **30** ή **25**).
- ✓ Σε σταθερές τιμές θερμοκρασίας, πίεσης και % περιεκτικότητας αιθανόλης, ισχύει ότι με την αύξηση του χρόνου της εκχύλισης

αυξάνεται % η απόδοση της εκχύλισης, αλλά μέχρι ενός ορίου (βλέπε χαρακτηριστικά τα αποτελέσματα των παρακάτω συνδυασμών πειραμάτων: **4-12** και **8-16**).

Η τάση αυτή που παρατηρήθηκε στα παραπάνω αποτελέσματα, είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας και αναμένεται να επιβεβαιωθεί με το πέρας της υλοποίησης του συνόλου του πειραματικού σχεδιασμού.

Β.4. Ανάπτυξη πρωτοκόλλου απομάκρυνσης του πολυμερούς με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής

Β.4.1. Πειραματική πορεία

Σκοπός της χρήσης της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (CPC) στην απομάκρυνση του πολυμερούς, ήταν η ανάπτυξη μιας διαδικασίας ποιοτικής και ποσοτικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων, τα οποία προήλθαν από την εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE), ως προς την περιεκτικότητά τους σε πολυμερές και τερπένια. Η ποιοτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) στα κλάσματα που παρελήφθησαν από τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής. Η ποσοτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε βασιζόμενη στην ποιοτική, καθότι περιλάμβανε τη συνένωση κλασμάτων με παρόμοιο προφίλ, την εξάτμισή τους και τον υπολογισμό της μάζας τους.

Με βάση αυτήν τη διαδικασία είναι εφικτό να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, λαμβάνοντας υπόψη όχι μόνο την απόδοση της εκχύλισης αλλά και την περιεκτικότητα του παραληφθέντος εκχυλίσματος σε πολυμερές και τερπένια, βάσει των μαζών των συνενωμένων κλασμάτων.

➤ Έρεση διφασικού συστήματος και συνθηκών

Με βάση τη βιβλιογραφία⁴⁴ εξετάστηκαν 18 συστήματα διαλυτών προκειμένου να βρεθεί το κατάλληλο διφασικό σύστημα για την επίτευξη του προαναφερόμενου στόχου, δηλαδή το διαχωρισμό του πολυμερούς από τα τερπένια.

Πίνακας Β. 4. Αποτελέσματα των συστημάτων διαλυτών που δοκιμάστηκαν

Σύστημα διαλυτών	Αναλογία	Διαλυτότητα υλικού	Διαχωρισμός φάσεων
Hex/EtOAc/MeOH/H ₂ O	4/1/2.5/2.5	κακή	γαλάκτωμα
Hex/EtOAc/EtOH/H ₂ O	4/1/2.5/2.5	κακή	γαλάκτωμα
Hex/EtOH/ACN	6/0.4/3.6	μέτρια, κομμάτια	θολό
Hex/MeOH/ACN	6/0.7/3.3	μέτρια, κομμάτια	θολό
Hept/EtOH/ACN	6/0.2/3.8	δύσκολη	θολό
Hept/BuOH/ACN	6/0.6/3.4	δύσκολη	θολό
Hex/BuOH/ACN	6/0.6/3.4	δύσκολη	θολό
EtOAc/acetone/Ethylene glycole	5.3/0.7/4	καλή	θολό
EtOAc/acetone/Ethylene glycole	5.6/0.4/4	καλή	Θολό μόνιμα
C-Hex/acetone/ethylene glycole	5.4/0.6/4	Μέτρια, υλικό στη μεσεπιφάνεια	θολό
C-Hex/ether/MeOH	5.9/0.1/4	κακή	Πολύ θολό
Hept/EtOAc/MeOH/H ₂ O	4.3/0.7/4.3/0.7	μέτρια	Πολύ γαλάκτωμα
Hept/EtOH/ACN	4/0.2/5.8	μέτρια	αρκετά θολό
Hept/EtOH/ACN	4/1.5/4.5	πιο καλή	γαλάκτωμα (κάτω)
Hept/EtOH/ACN	4/3.6/3.4	καλή	γαλάκτωμα (κάτω)
Hept/BuOH/ACN	4/0.84/5.16	μέτρια	θολό
Hept/BuOH/ACN	4/1.4/4.6	καλή	θολό
Hept/BuOH/ACN	4.62/1.79/3.59	Καλή	λιγότερο θολό

Η χρωματογραφική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή αναλυτικής κλίμακας (Kromaton), δηλαδή με τη χρήση στήλης των 50 mL και βρόχου των 5 mL. Σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν η μάζα του κολοφωνίου ήταν 250 mg και διαλυόταν σε 2 mL διαλύματος. Το σύστημα διαλυτών που επιλέχθηκε και τελικά χρησιμοποιήθηκε ήταν Hept/BuOH/ACN 4.62/1.79/3.59 ή αλλιώς 1.8/0.7/1.4.

Η εισαγωγή του προς διαχωρισμό δείγματος είναι δυνατό να γίνει με δύο τρόπους. Στην πρώτη περίπτωση το δείγμα διαλύθηκε σε 2 mL στατικής φάσης και εισήχθη στη στήλη μετά την πλήρωσή της με τη στατική φάση και πριν τη διοχέτευση της κινητής φάσης.

Στη δεύτερη περίπτωση, το δείγμα διαλύθηκε σε 1 mL στατικής φάσης και σε 1 mL κινητής φάσης, ενώ εισήχθη μετά την εξισορρόπηση των δύο φάσεων στο εσωτερικό της στήλης.

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές στις οποίες ελέγχθηκαν ο καθορισμός των ρόλων των δύο φάσεων (ανιούσα ή κατιούσα χρωματογραφία), ο τρόπος εισαγωγής του δείγματος (μετά την είσοδο της στατικής και πριν την είσοδο της κινητής φάσης ή μετά την εξισορρόπηση των φάσεων), η ταχύτητα περιστροφής και η ροή της κινητής φάσης.

Πίνακας Β. 5. Πειράματα CPC που έλαβαν χώρα για την εύρεση των καταλληλότερων συνθηκών διεξαγωγής τους

ΜΑΖΑ ΚΟΛΟΦΩΝΙΟΥ (mg)	ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΤΡΟΠΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΡΟΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ	ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ (rpm)	ΡΟΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ (mL/min)
<u>250</u>	βαριά	ελαφριά	Μεταξύ των φάσεων	ανιούσα	1000	2
<u>250</u>	βαριά	ελαφριά	Μεταξύ των φάσεων	ανιούσα	1000	2
<u>250</u>	βαριά	ελαφριά	Μετά την ισορροπία των φάσεων	ανιούσα	1000	2
<u>250</u>	ελαφριά	βαριά	Μετά την ισορροπία των φάσεων	κατιούσα	1000	2
<u>250</u>	ελαφριά	βαριά	Μετά την ισορροπία των φάσεων	κατιούσα	1500	2

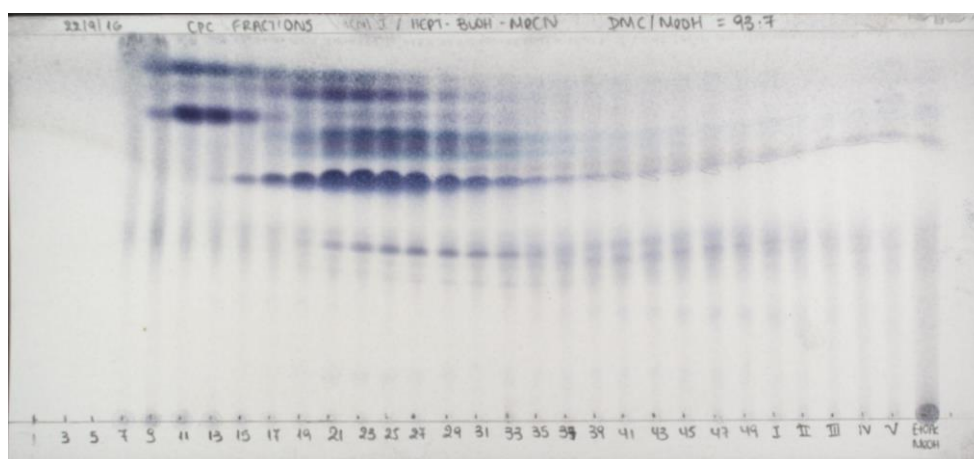
<u>250</u>	ελαφριά	βαριά	Μετά την ισορροπία των φάσεων	κατιούσα	1000	1
------------	---------	-------	--	----------	------	---

➤ Αξιολόγηση εκχυλίσματος προερχόμενο από SFE

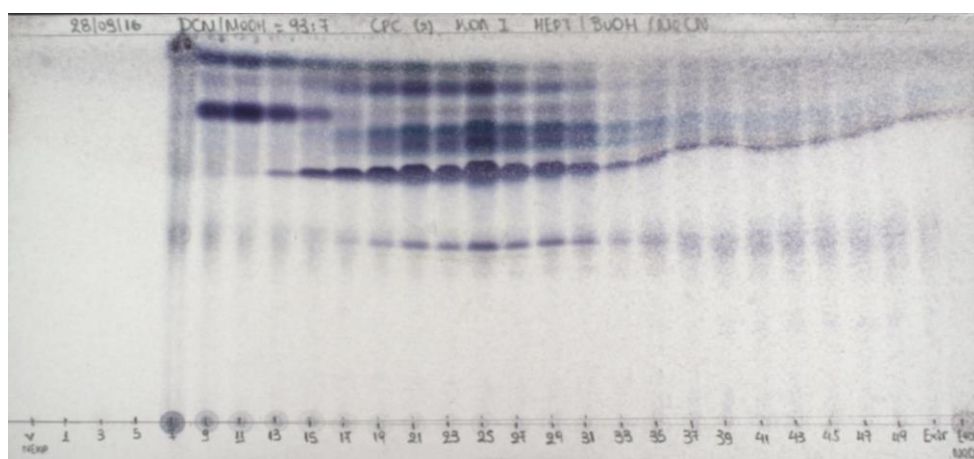
Το εκχύλισμα, το οποίο παρασκευάστηκε με την τεχνική SFE με απόδοση 47.38 % (θερμοκρασία 62.5 °C, πίεση 250 bar, ποσοστό συνδιαλύτη EtOH 15 % και χρόνος εκχύλισης 155 min), υποβλήθηκε σε χρωματογραφία CPC, βάσει των βέλτιστων συνθηκών που ευρέθησαν παραπάνω. Η ποσότητα του δείγματος που εγχύθηκε στο βρόχο του μηχανήματος ήταν 200 mg.

B.4.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

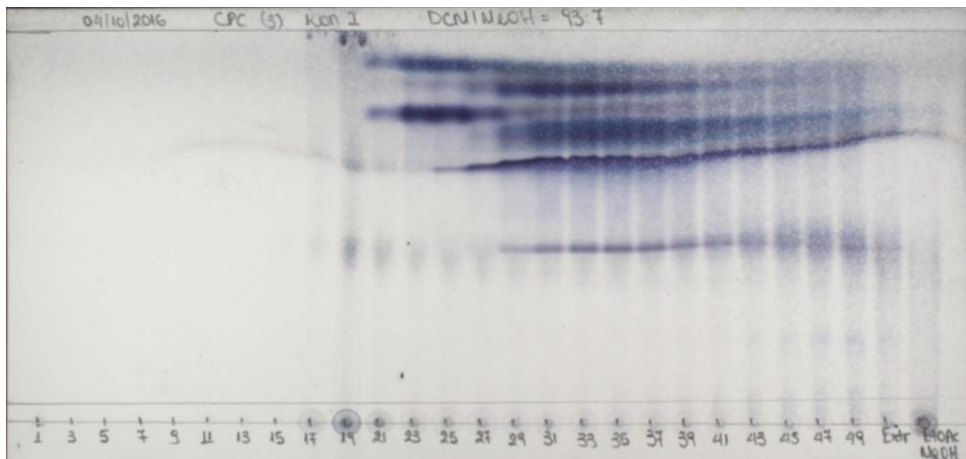
➤ Εύρεση διφασικού συστήματος και συνθηκών



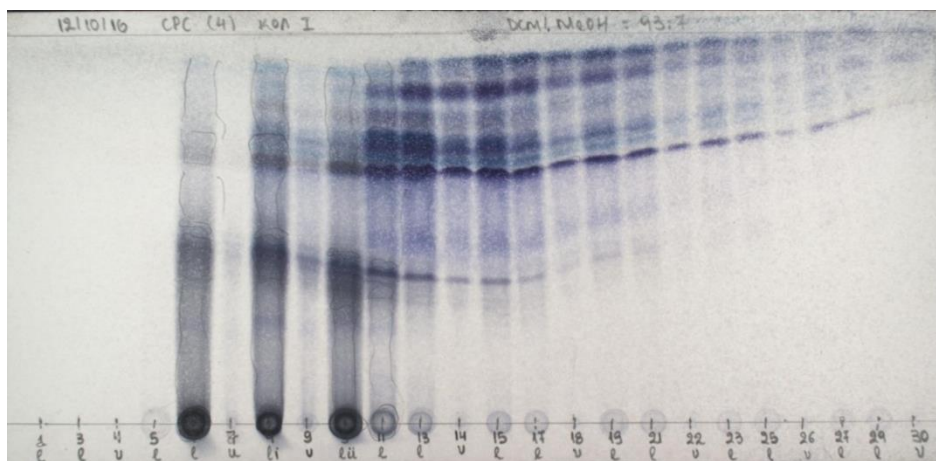
Εικόνα Β. 11. TLC από την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC (1)



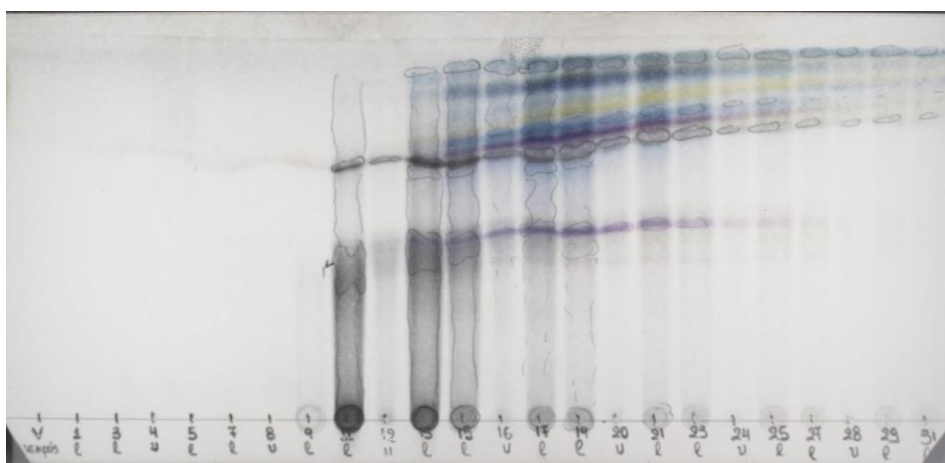
Εικόνα Β. 12. TLC από την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC (2)



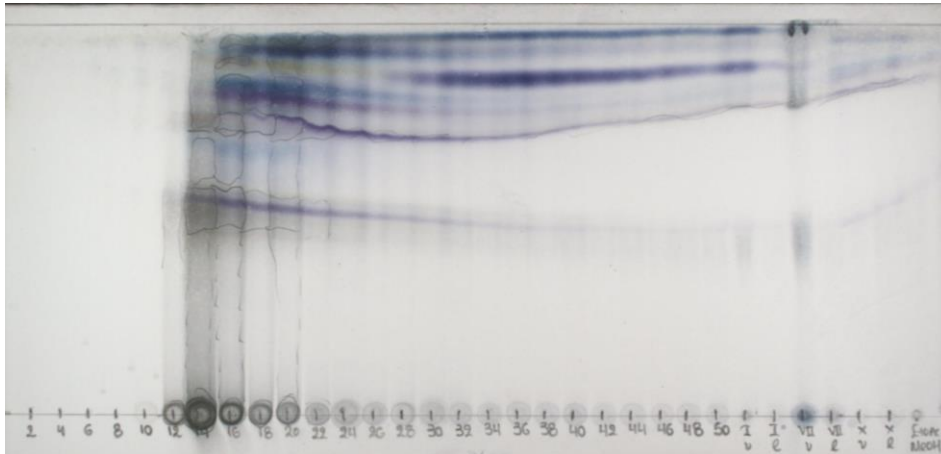
Εικόνα Β. 13. TLC από την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC (3)



Εικόνα Β. 14. TLC από την πάνω και την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC (4)



Εικόνα Β. 15. TLC από την πάνω και την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC (5)



Εικόνα Β. 16. TLC από την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC (6)

Στα 3 πρώτα πειράματα, κατά τα οποία επιλέχθηκε ανιούσα έκλυση (**ascending mode**) παρατηρήθηκε ότι ένα μέρος του πολυμερούς εκλούσθηκε τόσο στην αρχή (μέχρι να επιτευχθεί η εξισορρόπηση των δύο φάσεων με το δείγμα), όσο και στο τέλος, όταν έγινε εξώθηση της κινητής φάσης (extrusion) με τη στατική φάση. Ωστόσο, η μεγαλύτερη ποσότητά του παρελήφθη όταν διοχετεύτηκε σύστημα διαλυτών EtOAc/MeOH 1/1, στο οποίο είναι διαλυτό το πολυμερές. Βέβαια, υπήρχαν μικρότερες αλλά αμελητέες ποσότητες πολυμερούς και στα υπόλοιπα κλάσματα. Το γεγονός ότι ένα μέρος του πολυμερούς παρέμεινε στη στήλη είναι λογικό καθώς το πολυμερές δε διαλύεται στην κινητή φάση (ελαφριά), αλλά στη στατική φάση (βαριά).

Στα επόμενα 3 πειράματα, κατά τα οποία επιλέχθηκε κατιούσα έκλυση (**descending mode**) παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος του πολυμερούς βγήκε στην αρχή διαλυμένο και συμπαρασυρόμενο από την κινητή φάση. Κι εδώ υπήρχαν αμελητέες ποσότητες του πολυμερούς και στα υπόλοιπα κλάσματα. Τέλος, στο στάδιο εξώθησης της κινητής φάσης (extrusion) και στο στάδιο έκπλυσης με το σύστημα διαλυτών EtOAc/MeOH δεν υπήρχε καθόλου πολυμερές. Η εξέλιξη αυτή κρίνεται ως φυσιολογική γιατί το πολυμερές διαλύεται καλύτερα στη στατική (βαριά) φάση.

Στα πειράματα που εφαρμόστηκε **ascending mode** παρατηρήθηκε μεγάλη απώλεια στατικής φάσης (βαριά) από τη στήλη, κατά την εξισορρόπηση των φάσεων και με τους δύο διαφορετικούς τρόπους εισαγωγής του δείγματος, καθώς η στατική φάση υπολογίσθηκε σε 10 mL περίπου και η κινητή ήταν περίπου 40 mL. Ενώ στα πειράματα που εφαρμόστηκε **descending mode**, η αναλογία στατικής/κινητής μετά την εξισορρόπηση ήταν καλύτερη, περίπου 20 mL στατικής και 30 mL κινητής φάσης.

Αν και η μεγαλύτερη μάζα του πολυμερούς απομακρύνθηκε στην αρχή κατά την εφαρμογή της descending mode, εντούτοις συμπαρέσυρε μαζί της και τερπένια.

Η αύξηση της ταχύτητας περιστροφής από 1000 rpm σε 1500 rpm δεν επέφερε κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή στο διαχωρισμό των δύο φάσεων.

Η μείωση της ροής διοχέτευσης της κινητής φάσης από 2 mL / min σε 1 mL / min, δεν επέφερε ούτε αυτή κάποια ιδιαίτερη αλλαγή, πάρα μόνο αύξηση το χρόνο διαχωρισμού κι έτσι παρατηρήθηκε το πολυμερές σε περισσότερα κλάσματα.

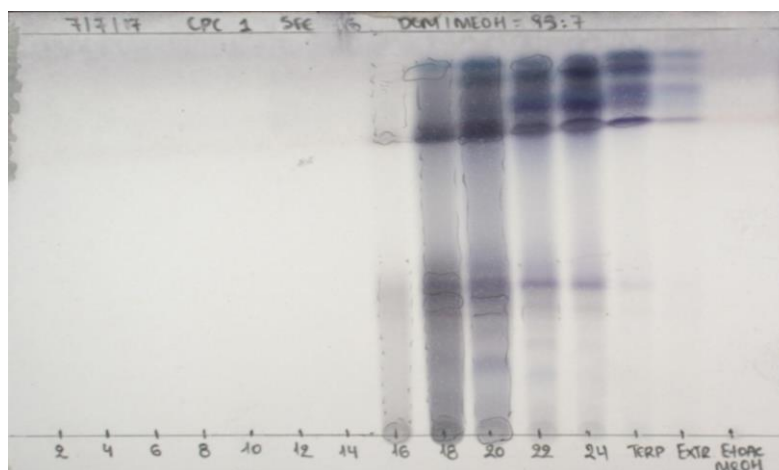
Άρα, δεδομένου όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων, οι καλύτερες συνθήκες για την απομάκρυνση του πολυμερούς με την τεχνική CPC ήταν αυτές που εφαρμόστηκαν στο 5^ο πείραμα:

Πίνακας Β. 6. Οι βέλτιστες συνθήκες του πειράματος CPC

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΡΟΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ	Κατιούσα	Μαζική απομάκρυνση πολυμερούς στην αρχή Μεγαλύτερη κατακράτηση στατικής φάσης
ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ	1000 rpm	Καλύτερος διαχωρισμός πολυμερούς και τερπενίων
ΡΟΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ	2 mL / min	Πιο σύντομος διαχωρισμός πολυμερούς και τερπενίων

➤ Αξιολόγηση SFE εκχυλίσματος με CPC χρωματογραφία

Οι προαναφερόμενες επιλεγμένες συνθήκες εφαρμόστηκαν κατά την επεξεργασία εκχυλίσματος που παρασκευάστηκε με την υπερκρίσιμη εκχύλιση, ώστε να προσδιοριστεί το περιεχόμενό του σε πολυμερές και τερπένια.



Εικόνα Β. 17. TLC από την κάτω φάση των κλασμάτων του πειράματος CPC το οποίο αντιστοιχεί στο εκχύλισμα SFE 16.

Πίνακας Β. 7. Μάζες τερπενίων και πολυμερούς του πειράματος CPC

ΚΛΑΣΜΑΤΑ 15-21 (mg)	ΚΛΑΣΜΑΤΑ 22-24, TERP. & EXTRUSION (mg)	EtOAc/ MeOH (mg)	ΑΠΟΔΟΣΗ %	ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ %	ΤΕΡΠΕΝΙΑ %
61.7	130.1	4.2	98 (196/200)	31.48	66.38

Τα κλάσματα 15-21 αντιστοιχούν στο μεγαλύτερο ποσοστό του πολυμερούς, μαζί πάντα με μία μικρή ποσότητα τερπενίων που συμπαρασύρονται. Τα υπόλοιπα κλάσματα (22-24, κλάσμα τερπενίων, κλάσμα εξώθησης και κλάσμα έκπλυσης) περιέχουν κυρίως τερπένια και σχεδόν καθόλου πολυμερές, όπως διαπιστώθηκε από τη χρωματογραφία TLC που πραγματοποιήθηκε.

Όσον αφορά στο ποσοστό του πολυμερούς (κλάσματα 15-21), από τη μία πλευρά μπορεί να θεωρηθεί μεγάλο, δεδομένου ότι αρχικά ένα σημαντικό ποσοστό θα έπρεπε να έχει απομακρυνθεί από το εκχύλισμα κατά την εκχυλιστική διαδικασία με SFE και δεδομένου ότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το ποσοστό του κυμαίνεται στο 30 %. Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό αυτό δεν αντιστοιχεί μόνο σε πολυμερές βάσει της παραπάνω TLC.

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην αντίστοιχη εκχύλιση με την τεχνική SFE, από τη μία πλευρά είχαν ως αποτέλεσμα μία μεγάλη τιμή στην απόδοση της εκχύλισης (47.38 %). Από την άλλη πλευρά όμως, δεδομένου

ότι η μάζα των 200 mg είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής μάζας του εκχυλίσματος, φαίνεται ότι στις συνθήκες της εκχύλισης παρελήφθη σημαντικό ποσοστό του πολυμερούς κυρίως λόγω του μεγάλου ποσοστού της αιθανόλης (15 %) στο διαλυτικό μέσο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα προγενέστερων πειραμάτων, τα οποία είχαν πραγματοποιηθεί στη μαστίχα για την παραλαβή του τερπενικού κλάσματος απουσία πολυμερούς με την εφαρμογή της εκχύλισης υπερκρίσιμων ρευστών.

Έτσι, με την προαναφερόμενη διαδικασία θα ελεγχθεί το περιεχόμενο των εκχυλισμάτων που έχουν ή/και θα παραχθούν στα πλαίσια του σχεδιασμού πειραμάτων DoE.

B.5. Παρασκευή ελαιόλαδου εμπλουτισμένου σε τερπένια.

B.5.1. Πειραματική πορεία

Επιλογή καλύτερης μεθόδου για ενσωμάτωση του κολοφωνίου στο ελαιόλαδο

Στόχος της διαδικασίας ήταν η αξιοποίηση του κολοφωνίου μέσω της ενσωμάτωσής του στο ελαιόλαδο για την παρασκευή (α) ενός βρώσιμου ελαιόλαδου υψηλής προστιθέμενης αξίας, το οποίο θα μπορεί να αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής και (β) ενός ελαιώδους παρασκευάσματος με θεραπευτικές ιδιότητες.

Η παραπάνω συνταγή έχει αναφερθεί αιώνες πριν, στο διάσημο έργο του Διοσκουρίδη «De Materia Medica»⁷, όπου αναφέρεται το «mastichion elaiion (oleum)». Πρόκειται πιθανότατα για ένα παρασκεύασμα το οποίο παραγόταν με την ανάμιξη μαστίχας με ελαιόλαδο, Το προαναφερόμενο παρασκεύασμα είχε αναφερθεί ότι φέρει θερμαντικές, στυπτικές και μαλακτικές ιδιότητες, καθώς και ευεργετική επίδρασή στις φλεγμονές του στομάχου, στις κοιλιακές και εντερικές διαταραχές.

Για να επιτευχθεί η παραγωγή του προαναφερόμενου προϊόντος, εξετάστηκαν διαφορετικοί τρόποι ενσωμάτωσης του κολοφωνίου στο ελαιόλαδο και εφαρμόστηκαν διάφορες συνθήκες, προκειμένου να βρεθεί η καλύτερη μεθολογία η οποία θα πρέπει να:

- Είναι πράσινη, οικονομική και χρονικά σύντομη.
- Εξασφαλίζει την ομοιογένεια του τελικού προϊόντος.
- Επιτυγχάνει την ενσωμάτωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας κολοφωνίου στο τελικό προϊόν.

- Μην επιδρά αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου.

Με βάση τη βιβλιογραφία⁵⁵ έχει επιχειρηθεί η ενσωμάτωση φυσικών ρητινών σε διάφορους τύπους λαδιού, εκτός του ελαιόλαδου, με τη χρήση DCM ως διαλυτικού μέσου και την τοποθέτηση των δειγμάτων μετά την ενσωμάτωση στο φούρνο για την εξάτμιση αυτού. Οι τελικές συγκεντρώσεις μαστίχας στο λάδι, οι οποίες επιτεύχθηκαν με την προαναφερόμενη μεθοδολογία, ήταν 0.05 %, 0.1 % και 0.15 % w/w.

Με σκοπό τη βελτίωση των προαναφερόμενων επιτευγμάτων, εξετάστηκε η εφαρμογή των ακόλουθων μεθοδολογιών: 1) χρήση του αναδευτήρα, 2) εφαρμογή υπερήχων και 3) εφαρμογή μικροκυμάτων. Σε όλους τους τρόπους διάλυσης-ενσωμάτωσης διερευνήθηκαν οι παράμετροι που καθορίζουν την απόδοση της διαδικασίας και αξιολογήθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και η όψη των τελικών προϊόντων.

Πειράματα με ελαιόλαδο σε μικροκύματα και έλεγχος των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του

Εφόσον η χρήση μικροκυμάτων επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη τεχνική για



Εικόνα Β. 18. Ελαιόλαδο με κολοφώνιο στα μικροκύματα

την ενσωμάτωση του κολοφωνίου στο ελαιόλαδο, εξετάστηκε αν με την εφαρμογή της προαναφερόμενης μεθοδολογίας επηρεάζονται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου. Το εύρος των θερμοκρασιών που δοκιμάστηκε κατά την προσπάθεια ενσωμάτωσης του κολοφωνίου ακόμα και παρουσία πολυμερούς, ήταν 50 - 90°C. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές

πειραμάτων. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε στην ενδιάμεση θερμοκρασία δηλαδή στους 70°C με μοναδική μεταβλητή το χρόνο, προκειμένου να εξεταστεί αν σε σταθερή θερμοκρασία το χρονικό διάστημα παραμονής στα μικροκύματα επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου. Η δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για σταθερό χρόνο των 60 min σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών.

B.5.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

- Πειράματα διάλυσης του υλικού σε ελαιόλαδο με τη χρήση του αναδευτήρα

Πίνακας Β. 8. Συνθήκες και αποτελέσματα των πειραμάτων διάλυσης του υλικού σε ελαιόλαδο με τη χρήση αναδευτήρα

Όγκος Ελαιολάδου (mL)	Μάζα κολοφωνίου (g)	Περιστροφή (rpm)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Αποτελέσματα
50	0.5090	500	18	20	Όχι διάλυση
		600	18	20	Όχι διάλυση
		700	18	30	Όχι διάλυση
		50-60		30	Μέτρια διάλυση
		60-70		30	Μέτρια διάλυση
		70-80		30	Καλή διάλυση
		80-90		30	Καλή διάλυση
		90-100		30	Καλή διάλυση

➤ Πειράματα διάλυσης του υλικού σε ελαιόλαδο με τη χρήση υπερήχων

Πίνακας Β. 9. Συνθήκες και αποτελέσματα των πειραμάτων διάλυσης του υλικού σε ελαιόλαδο με τη χρήση υπερήχων

Όγκος Ελαιολάδου (mL)	Μάζα κολοφωνίου (g)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Αποτελέσματα
50	0.5134	30	30	Συσσωματώματα
		40	30	Μερική διάλυση
		50	30	Διάλυση-σωματίδια
		60	30	Καλή διάλυση
50	1.0076 + 0.5129 + 0.5345 + 0.4968	40-45	30	Κομμάτια
		45-50	30	Καλή διάλυση
		50	30	Αρκετά καλή διάλυση
		50-60	30	Εναιώρημα-θολό
		60	30	Εναιώρημα-θολό
		65	30	Εναιώρημα-πυκνό-αλλαγή χρώματος

➤ Πειράματα διάλυσης του υλικού σε ελαιόλαδο με τη χρήση μικροκυμάτων

Πίνακας Β. 10. Συνθήκες και αποτελέσματα των πειραμάτων διάλυσης του κολοφωνίου σε ελαιόλαδο με τη χρήση μικροκυμάτων

Όγκος Ελαιολάδου (mL)	Μάζα (g)	Θερμοκρασία (°C)	Ανάδευση (%)	Χρόνος (min)	Ενέργεια (Watt)	Αποτελέσματα
50	0.025 Κολοφώνιο 0.05 % w/v	22-40	50	5	200	Όχι διάλυση-ίζημα
		40	50	30	200	
		40-50	50	5	250	
		50	50	30	200	Καλή διάλυση-ίζημα
		50-60	50	5	250	
		60	50	30	200	
		60-70	5050	5	300	
		70	50	30	200	Καλύτερη διάλυση-σωματίδια
		70-80	50	5	300	
		80	50	30	200	

Πίνακας Β. 11. Συνθήκες και αποτελέσματα των πειραμάτων διάλυσης του κολοφωνίου χωρίς πολυμερές & του πολυμερούς σε ελαιόλαδο με τη χρήση μικροκυμάτων

Όγκος Ελαιολάδου (mL)	Μάζα (g)	Θερμοκρασία (°C)	Ανάδευση (%)	Χρόνος (min)	Ενέργεια (Watt)	Αποτελέσματα
50	0.025 Κολοφώνιο χωρίς πολυμερές 0.05 % w/v	22-40	50	5	200	ΠΛΗΡΗΣ ΔΙΑΛΥΣΗ σε 35 min
		40	50	30	200	
50	0.220 Κολοφώνιο χωρίς πολυμερές 0.4 % w/v	22 - 40	50	5	200	ΠΛΗΡΗΣ ΔΙΑΛΥΣΗ σε 60 min
		30	50	30	200	
		30 – 40	50	5	200	
		40	50	30	200	
30	0.018 πολυμερές	22 - 40	50	5	200	ΟΧΙ ΔΙΑΛΥΣΗ
		40	50	30	200	
		40 – 50	50	5	200	
		50	50	30	200	
		50-60	50	5	250	
		60	50	30	200	
		60-70	50	5	300	
		70	50	30	200	
		70-80	50	5	300	
80	50	30	200			

Μελετώντας τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων πινάκων καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

✓ **Κατά τη χρήση αναδευτήρα**, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν κυρίως η θερμοκρασία και η ταχύτητα ανάδευσης. Μεταξύ των προαναφερόμενων παραγόντων, ο πρώτος φαίνεται να είναι ο πλέον καθοριστικός. Ωστόσο, για να διαλυθεί το υλικό απαιτείται σχετικά υψηλή θερμοκρασία (≥ 80 °C), κάτι το οποίο όχι μόνο δεν επιτυγχάνεται εύκολα, αλλά επιφέρει αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, γεγονός που χαρακτηριστικά αποτυπώθηκε στην οσμή του.

✓ **Κατά τη χρήση υπερήχων**, η θερμοκρασία επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Σε σχέση με την προηγούμενη τεχνική επιτυγχάνονται

καλύτερα αποτελέσματα, καθώς διαλύονται πιο αποτελεσματικά τόσο η μαστίχα όσο και το κολοφώνιο. Ωστόσο, ο προσδιορισμός του σημείου κορεσμού του ελαιόλαδου έδειξε ότι υπάρχει μεγάλη δυσκολία στην ενσωμάτωση ποσότητας πρώτης ύλης μεγαλύτερης του 1 g. Ειδικά, στα 2.5 g τα παραγόμενα δείγματα ελαιόλαδων ήταν τόσο πυκνά εναιωρήματα στα οποία είχε μεταβληθεί το χρώμα τους και η όψη τους (αυξημένη θολερότητα) εξαιτίας του μεγάλου πλήθους σωματιδίων. Οι συνθήκες οι οποίες επέτρεψαν μια σχετικά καλή διάλυση του κολοφωνίου στο ελαιόλαδο, επέφεραν αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου, γεγονός το οποίο αποτυπώθηκε με αλλαγή στο χρώμα και στην οσμή του.

✓ **Κατά τη χρήση μικροκυμάτων**, κυρίαρχο ρόλο παίζουν αρχικά η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής σε συγκεκριμένες συνθήκες, ενώ σε δεύτερη φάση η ανάδευση. Επίσης, γενικά σαν τεχνική είναι καλύτερη καθώς επιφέρει πιο ομοιόμορφη κατανομή της ενέργειας και έτσι επιτυγχάνει καλύτερη ενσωμάτωση.

✓ Από τις 3 δοκιμαζόμενες τεχνικές, η μέθοδος με τη χρήση μικροκυμάτων αποδείχτηκε η αποτελεσματικότερη, διότι επιτεύχθηκε η ενσωμάτωση του κολοφωνίου χωρίς πολυμερές εύκολα και σε χαμηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια εξετάστηκε η πιθανή επδρασή της στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Πειράματα επίδρασης των μικροκυμάτων στις φυσικοχημικές παραμέτρους και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου

Πίνακας Β. 12. Αποτελέσματα για θερμοκρασία 70°C, με μεταβλητή το χρόνο

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Οξύτητα	K(232)	K(270)	ΔΚ	Υπεροξειδία	Ολικές Φαινόλες (mg / kg)
20	-	0.48	2.93	0.33	0.0026	21.0	83
70	15	0.51	3.50	1.19	0.0410	20.5	80
70	30	0.51	3.04	0.42	0.0027	20.6	nd
70	45	0.48	3.00	0.43	0.0050	18.4	nd
70	60	0.54	3.18	0.42	0.0029	19.7	74

Πίνακας Β. 13. Αποτελέσματα για χρόνο 60 min, με μεταβλητή τη θερμοκρασία

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Οξύτητα	K(232)	K(270)	ΔΚ	Υπεροξειδία	Ολικές Φαινόλες (mg / kg)
20	-	0.48	2.93	0.33	0.0026	21.00	83
50	60	0.54	3.03	0.39	0.0026	20.81	77
60	60	0.54	3.09	0.35	0.0018	17.20	nd
70	60	0.51	2.97	0.33	0.0032	18.40	nd
80	60	0.54	3.04	0.31	0.0010	21.04	nd
90	60	0.56	3.09	0.41	0.0024	21.04	67

Από τη μελέτη των προαναφερόμενων αποτελεσμάτων καταλήξαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Σε όσα δείγματα μετρήθηκε, το περιεχόμενο σε φαινόλες ήταν περίπου σταθερό ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες και μάλιστα οι τιμές του ολικού φαινολικού φορτίου ήταν παρόμοιες με αυτή του μη επεξεργασμένου ελαιόλαδου.
- Στην πρώτη σειρά πειραμάτων, όπου σε σταθερή θερμοκρασία (70 °C) αυξάνεται ο χρόνος επίδρασης των μικροκυμμάτων ανά 15 min μέχρι συνολικής διάρκειας 1 ώρας στο ίδιο δείγμα, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στις τιμές των φυσικοχημικών παραμέτρων των επεξεργασμένων ελαιόλαδων (και σε σύγκριση με την πρώτη ύλη).
- Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, όπου σε σταθερό χρόνο (60 min) αυξάνεται η θερμοκρασία ανά 10 °C σε διαφορετικό δείγμα την κάθε φορά, παρατηρείται επίσης ότι δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στις ελεγχόμενες παραμέτρους ποιότητας του ελαιόλαδου.
- Επομένως, συμπερασματικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η θερμοκρασία 90 °C σε χρόνο 60 min, προκειμένου να ενσωματωθεί κολοφώνιο με ή χωρίς πολυμερές στη μέγιστη ποσότητα.
- Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι με την επίδραση των μικροκυμάτων δεν παρατηρείται μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του και κυρίως αλλοίωση στη γεύση και την οσμή του.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: Ακάθαρτη μαστίχα



B.6. Εκχύλιση της ακάθαρτης μαστίχας με τη χρήση υπερκρίσιμων ρευστών

B.6.1. Πειραματική πορεία

Στόχος είναι η αξιοποίηση της ακάθαρτης μαστίχας (μαστίχα β'-ποιότητας) μέσω της παρασκευής ενός εκχυλίσματος με τη μέγιστη ποσότητα τερπενίων και ταυτόχρονα την ελάχιστη ως μηδαμινή ποσότητα πολυμερούς. Επιπρόσθετα, η διαδικασία που διεξήχθη για το κολοφώνιο (B.3.) έλαβε χώρα, με κάποιες τροποποιήσεις, σε ημι-πιλοτική κλίμακα. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν, βασίστηκαν στην υπάρχουσα βιβλιογραφία³⁰.

Αρχικά, για την προετοιμασία του δείγματος, η ακάθαρτη μαστίχα



Εικόνα Β. 19. Θρυμματισμός ακάθαρτης μαστίχας

κονιοποιήθηκε με τη χρήση γουδιού. Η ποσότητα σκόνης που λήφθηκε ήταν περίπου 320 g, εκ των οποίων 150.2 g πρώτης ύλης αναμείχθηκε με 150.2 g κελουλόζης και τοποθετήθηκαν εντός του δοχείου εκχύλισης.

Η εκχύλιση έλαβε χώρα στη συσκευή ημι-πιλοτικής κλίμακας (Separex). Ως υπερκρίσιμο ρευστό χρησιμοποιήθηκε το CO₂, του οποίου η πυκνότητα στις κρίσιμες τιμές θερμοκρασίας (30.9 °C), και πίεσης (73.8 bar) είναι 0.467 g / mL.

Η εκχυλιστική διαδικασία περιλάμβανε διάφορα στάδια με διαφορετικές παραμέτρους εκχύλισης ώστε να επιτευχθεί η κλασμάτωση των περιεχόμενων στην πρώτη ύλη συστατικών. Η κλασμάτωση αυτή δεν επετεύχθη με την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών εντός των διαχωριστήρων, αλλά με την αλλαγή της πολικότητας της κινητής φάσης. Στόχος αποτέλεσε να παραληφθούν το σύνολο των συστατικών, δηλαδή τόσο το αιθέριο έλαιο και όσο και η κύρια μάζα μη πτητικών τερπενίων, αλλά και να επιτευχθεί ταυτόχρονα διαχωρισμό τους από το πολυμερές μέσω της παραμονής του τελευταίου εντός του δοχείου εκχύλισης.

Οι παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν τη διαδικασία εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστά είναι η πίεση και η θερμοκρασία (τόσο στον εκχυλιστήρα όσο και στους διαχωριστήρες), ο χρόνος εκχύλισης, η ροή του CO₂ και το ποσοστό του συνδιαλύτη (EtOH). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε υπερκρίσιμο CO₂ σε χαμηλή πίεση για την παραλαβή των πτητικών

συστατικών της ρητίνης, ενώ στη συνέχεια αυξήθηκε η πίεση για την παραλαβή των άπολων μη πτητικών συστατικών και τέλος με προσθήκη συνδιαλύτη (σε διάφορες συγκεντρώσεις) επιτεύχθηκε η παραλαβή των πιο πολικών μεταβολιτών. Με αυτόν τον τρόπο έγινε δυνατή η παραλαβή κλασμάτων με διαφορετικό φυτοχημικό φορτίο.

Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές στις οποίες κυμάνθηκαν οι προαναφερόμενες παράμετροι είναι οι παρακάτω:

- Θερμοκρασία εκχύλισης: 50 °C
- Πίεση εκχύλισης: 100 – 300 bar
- Ποσοστό συνδιαλύτη: 0 – 10 %
- Χρόνος εκχύλισης ανά στάδιο: 70 – 100 min
- Θερμοκρασία διαχωριστήρα: 35 -45 °C
- Πίεση διαχωριστήρα: 50 bar
- Ροή CO₂: 3.5 kg / h

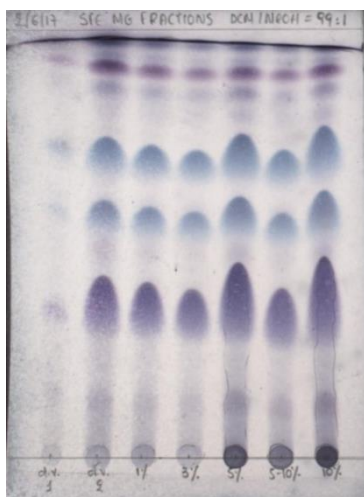


Εικόνα Β. 20. Ημι-πυλοτικό SFE

B.6.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Πίνακας Β. 14. Συνθήκες και απόδοση του καθε σταδίου της εκχύλισης της ακάθαρτης μαστίχας σε ημι-πυλοτική κλίμακα

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΡΟΗ (Kg / h)	ΠΙΕΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (bar)	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (°C)	ΠΙΕΣΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑ (bar)	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑ (°C)	EtOH %	ΑΠΟΔΟΣΗ %
70	3.5	100	50.0	50	35.0	0	0.16
75	3.5	300	50.0	50	35.0	0	1.49
75	3.5	300	50.0	50	35.0	1	2.53
90	3.5	300	50.0	50	35.0	3	10.88
100	3.5	300	50.0	50	35.0	5	
90	3.5	300	50.0	50	35.0 & 45.0	10	33.85
500							48.91



Εικόνα Β. 21. TLC των κλασμάτων από το κάθε στάδιο της εκχυλιστικής διαδικασίας

Η εκχυλιστική διαδικασία διήρκεσε στο σύνολο περίπου 8.5 ώρες και η συνολική απόδοσή της ήταν περίπου 50 %.

Μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή της πίεσης, η ροή του CO₂ ήταν 4.5 kg / h.

Στο (6)^ο στάδιο αυξήθηκε η θερμοκρασία στο διαχωριστήρα στους 45 °C. Αυτή η θερμοκρασία επιλέχθηκε για να διευκολυνθεί η παραλαβή των εκχυλιζόμενων συστατικών³⁰.

Στα στάδια(4) και (5) μετρήθηκε μαζί η απόδοση διότι συλλέχτηκαν μαζί κατά πολύ μεγάλο ποσοστό.

Κατά τη διάρκεια του καθαρισμού του μηχανήματος πήραμε 1.60 g υλικού από τους διαχωριστήρες.

B.7. Αξιολόγηση του εκχυλίσματος της ακάθαρτης μαστίχας με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής

B.7.1. Πειραματική πορεία

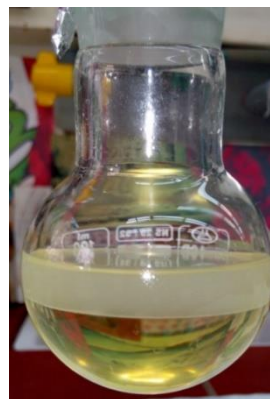
Σκοπός της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (CPC) ήταν η ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση του εκχυλίσματος, το οποίο προήλθε από την ακάθαρτη μαστίχα με εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE), ως προς την ποσότητα του πολυμερούς και των τερπενίων που διαθέτει (B.4.)

Συνενώθηκαν επομένως τα κλάσματα από τα στάδια (4), (5) και (6), τα οποία ελήφθησαν με 3-10 % αιθανόλη, προκειμένου να πραγματοποιηθεί CPC και να υπολογιστεί η συνολική ποσότητα του περιεχόμενου πολυμερούς.



Εικόνα B. 23. Ημι-πυλοτικό CPC

Η διαδικασία έλαβε χώρα στο μηχάνημα πιλοτικής κλίμακας (Kromaton) με τη στήλη του 1 L και το βρόχο των 30 mL. Το διφασικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hept/BuOH/ACN 1.8/0.7/1.4 (B.4.). Εισήχθησαν 2.97 g υλικού διαλυμένα σε περίπου 30 mL διαλύτη (15 mL στατικής και 15 mL κινητής φάσης). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

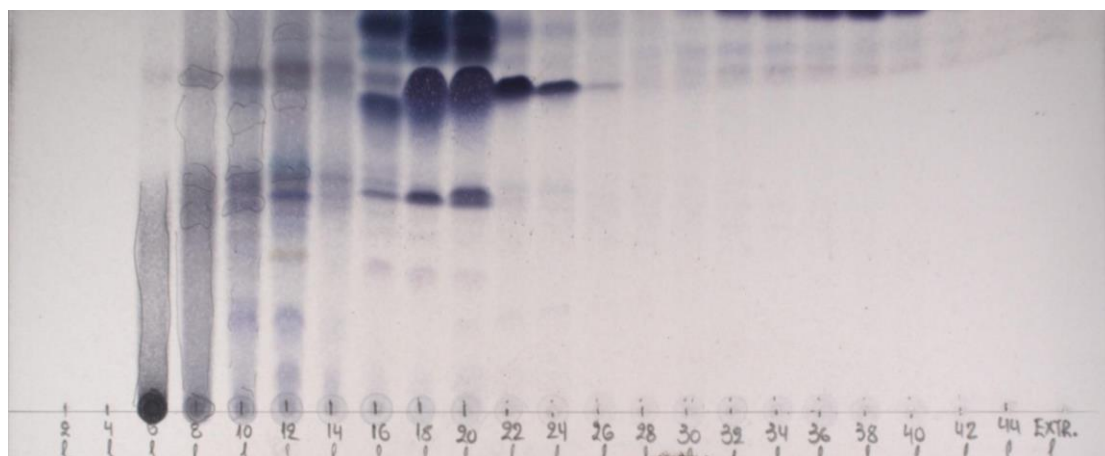


Εικόνα B. 22. Εκχύλισμα ακάθαρτης μαστίχας έτοιμο για CPC

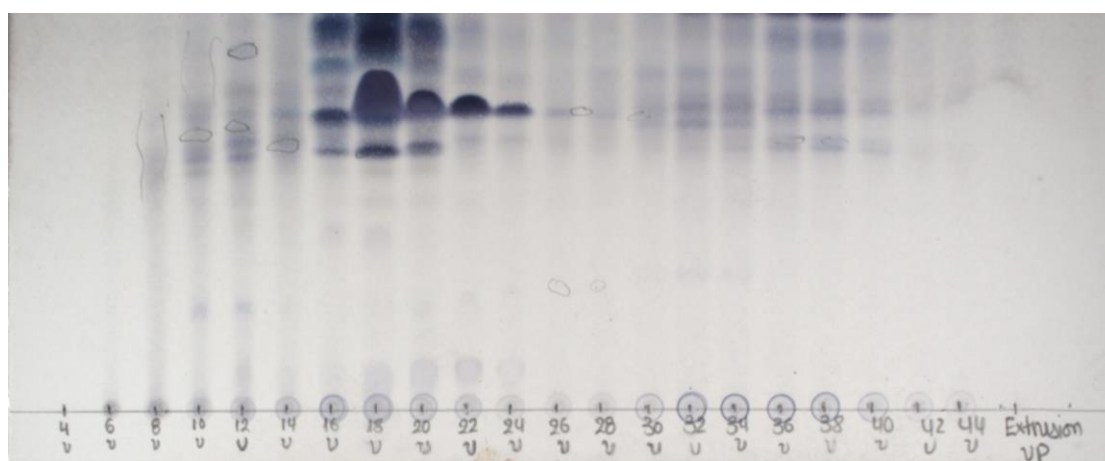
Πίνακας B. 15. Οι συνθήκες της υλοποίησης του ημι-πυλοτικού πειράματος CPC

ΡΟΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ	Κατιούσα	Μαζική απομάκρυνση πολυμερούς στην αρχή Μεγαλύτερη κατακράτηση στατικής φάσης
ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗΣ	600-800 rpm	Αποτελεσματικότερος διαχωρισμός πολυμερούς και τερπενίων
ΡΟΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ	6-10 mL / min	Πιο σύντομος διαχωρισμός πολυμερούς και τερπενίων

B.7.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση



Εικόνα Β. 24. TLC από την κάτω φάση των κλασμάτων του ημι-πιλοτικού CPC



Εικόνα Β. 25. TLC από την πάνω φάση των κλασμάτων του ημι-πιλοτικού CPC

Πίνακας Β. 16. Μάζες τερπενίων και πολυμερούς της ακάθαρτης μαστίχας από το πείραμα CPC

ΚΛΑΣΜΑΤΑ 5-9 (mg)	ΚΛΑΣΜΑΤΑ 10-13 (mg)	ΚΛΑΣΜΑΤΑ 14-21 (mg)	ΚΛΑΣΜΑΤΑ 22-26 (mg)	ΚΛΑΣΜΑΤΑ 27-45 (mg)	EXTRUSION (mg)
173.4	232.1	2275.5	70.7	185.1	23.5

ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ	ΤΕΡΠΕΝΙΑ	ΑΠΟΔΟΣΗ
%	%	%
13.70	85.51	99.67

Από τη μελέτη των προαναφερόμενων αποτελεσμάτων καταλήξαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Δεδομένου του γεγονότος ότι τα κλάσματα που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας ήταν ως ένα βαθμό διφασικά, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) τόσο στην πάνω όσο και στην κάτω φάση του κάθε κλάσματος. Από τις χρωματογραφίες αυτές επαληθεύεται ότι το πολυμερές βγαίνει μόνο στην κάτω φάση, λόγω της διαλυτότητάς του στη βαριά φάση. Όσον αφορά στα τερπένια παρατηρείται η κατανομή τους εξίσου και στις δύο φάσεις, κάτι που βεβαιώνει πως το σύστημα διαλυτών που επιλέχτηκε για τη χρωματογραφία ήταν κατάλληλο.

- Από τα παραπάνω κλάσματα το πολυμερές βρίσκεται κυρίως στα κλάσματα 5-9 και 10-13, με το πρώτο κλάσμα να μην έχει σχεδόν καθόλου και το δεύτερο κλάσμα να έχει πάρα πολύ μικρή ποσότητα τερπενίων, των οποίων η μεγαλύτερη ποσότητα απαντάται στο τρίτο κλάσμα (14-21). Επομένως, για τον υπολογισμό του ποσοστού πολυμερούς λήφθηκαν υπόψη τα κλάσματα 5-13, ενώ για το ποσοστό των τερπενίων τα κλάσματα 14-45.

- Η αναλογία στατικής και κινητής φάσης εντός της στήλης ήταν περίπου 75-80 % και 20-25 %, αντίστοιχα.

- Μετά την εισαγωγή του δείγματος η ροή ρυθμίστηκε σε 3 mL / min για τα πρώτα 75 ml, προκειμένου το δείγμα να μπει ομαλά στη στήλη και να μην ανέβει πολύ υψηλά η πίεση.

- Στα 16 πρώτα κλάσματα επιχειρήθηκε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες προκειμένου να 1) μην βγαίνει μεγάλο μέρος της στατικής και 2) μην υπάρχει γαλάκτωμα. Έπειτα από ένα συνδυασμό τιμών της ταχύτητας περιστροφής και της ροής της κινητής φάσης, διαπιστώθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες ήταν ταχύτητα περιστροφής 750 rpm και ροή 6.0 mL / min.

- Η εξώθηση της κινητής φάσης από τη στήλη (extrusion) έλαβε χώρα με ροή 20 mL / min και ταχύτητα περιστροφής 200 rpm.

Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι στη διαδικασία εκχύλισης της ακάθαρτης μαστίχας δεν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση σε σχέση με το κολοφώνιο και τη μαστίχα α'-ποιότητας, καθότι όποιες βρωμιές υπήρχαν μαζί με την πρώτη ύλη δεν εκχυλίστηκαν αλλά παρέμειναν στο δοχείο εκχύλισης. Επομένως είναι δυνατόν η ακάθαρτη μαστίχα να αξιοποιηθεί εξίσου όπως και το κολοφώνιο και να μην απορρίπτεται κατά τη διαδικασία της διαλογής της μαστίχας.

Επιπλέον, οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην εκχύλιση επέφεραν τόσο μια υψηλή απόδοση στη διαδικασία (50 %), όσο και ένα εκχύλισμα πολύ πλούσιο σε τερπενικό φορτίο (85.51 %) και σχετικά φτωχό σε πολυμερές (13.70 %). Αυτό αναδεικνύει ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες το μεγαλύτερο ποσοστό του πολυμερούς δεν παρελήφθη αλλά παρέμεινε στο δοχείο εκχύλισης.

ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ: Καρποί



B.8. Κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος των καρπών με υγρή-υγρή εκχύλιση.

B.8.1. Πειραματική πορεία

Μεθανολικό εκχύλισμα καρπών του είδους *Pistacia lentiscus* var. *chia*, οι οποίοι συλλέχθηκαν στη Χίο τον Οκτώβριο του 2016, μελετήθηκε ως προς το φυτοχημικό του περιεχόμενο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Ένα μέρος του μεθανολικού εκχυλίσματος μάζας 4 g εκχυλίστηκε με υγρή-υγρή εκχύλιση, προκειμένου να διαχωριστούν οι πολικές από τις άπολες ενώσεις.



Εικόνα B. 26.
Θρυμματισμένοι καρποί

Το δείγμα διαλύθηκε σε μείγμα διαλυτών H₂O/EtOAc



Εικόνα B. 27. Υγρή-υγρή εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος καρπών

50/50 συνολικού όγκου 13 mL, με τη συμβολή υπέρηχων. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναμίχθηκε σε διαχωριστική χοάνη με 20 mL H₂O και 20 mL EtOAc. Από το διφασικό σύστημα που προέκυψε, η κάτω (υδατική) φάση συλλέχθηκε σε κωνική φιάλη, ενώ η άνω (EtOAc) φάση συλλέχθηκε σε μια σφαιρική φιάλη, προκειμένου να εξατμιστεί.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές. Στις επόμενες δύο εκχυλίσεις 20 mL EtOAc προστέθηκαν στη διαχωριστική χοάνη και αναμίχθηκαν με την ίδια υδατική φάση, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί εξαντλητική εκχύλιση της υδατικής φάσης.

B.8.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Μετά την εξάτμιση των διαλυτών της οργανικής και της υδατικής φάσης, προσδιορίστηκε η ποσότητα του υδατικού εκχυλίσματος σε 2.515 g, ενώ η μάζα του εκχυλίσματος του EtOAc ήταν 1.485 g.

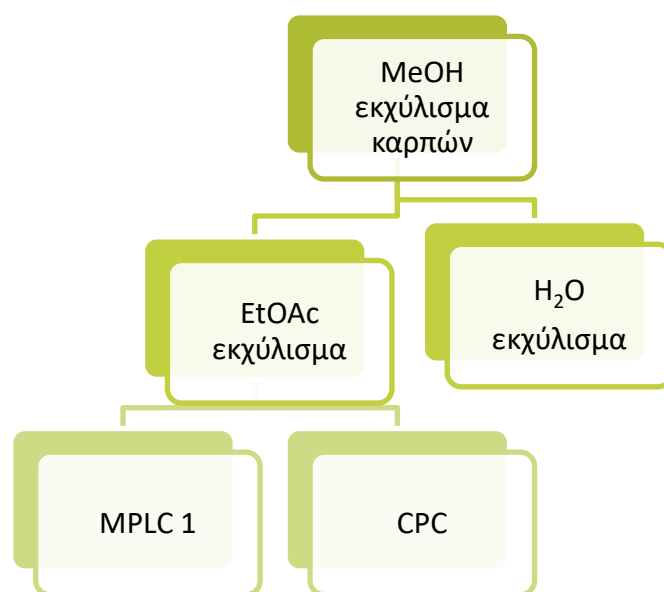
B.9. Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του EtOAc με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής

B.9.1. Πειραματική πορεία

Πριν πραγματοποιηθεί περαιτέρω κλασμάτωση των δύο εκχυλισμάτων, και τα τρία εκχυλίσματα, το μεθανολικό (αρχικό), το υδατικό και του οξικού

αιθυλεστέρα, υποβλήθηκαν σε αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική αξιολόγηση (B.12.), (B.13.). Βάσει των αποτελεσμάτων, το εκχύλισμα του EtOAc υπέστη περαιτέρω κλασμάτωση με τη χρήση φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής (CPC).

Μία άλλη ποσότητα του EtOAc εκχυλίσματος, που προέκυψε πάλι από υγρή υγρή εκχύλιση του μεθανολικού εκχυλίσματος, είχε ήδη υποβληθεί σε κλασμάτωση με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης (MPLC).



Εικόνα Β. 28. Σχηματική αναπαράσταση της κλασμάτωσης του αρχικού εκχυλίσματος των καρπών

Η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής πραγματοποιήθηκε σε συσκευή CPC (ARMEN), με στήλη των 250 mL και τη χρήση βρόχου των 50mL. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν c-Hex/MeOH/H₂O 4/5/1.



Εικόνα Β. 29. Διαδικασία CPC

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 2 L διαλυτών και αναλύθηκαν 1.485 g του εκχυλίσματος του EtOAc. Εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση και κατιούσα ροή της κινητής φάσης (descending mode)

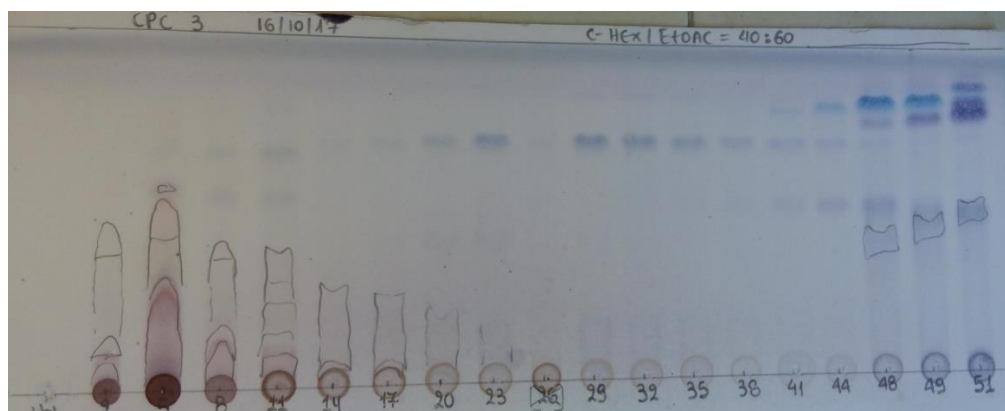
Αρχικά, η ελαφριά φάση, ως στατική φάση, γέμισε τη στήλη με ταχύτητα περιστροφής 500 rpm και ροή 25 mL / min. Στη συνέχεια διοχετεύθηκε η κινητή φάση, αποτελούμενη από H₂O/MeOH 50/50, με ταχύτητα περιστροφής 1600 rpm και ροή 25 mL / min, μέχρις ότου επιτευχθεί η

ισορροπία. Στην εξισορρόπηση του συστήματος διαλυτών εντός της στήλης υπήρχαν τελικά 105 mL της στατικής φάσης και 145 mL της κινητής φάσης. Μετά την εξισορρόπηση, έλαβε χώρα η εισαγωγή του δείγματος. Το δείγμα διαλύθηκε πλήρως σε 10 mL διαλυτών, 5 mL της στατικής φάσης και 5 mL H₂O/MeOH, με τη συμβολή υπερήχων.

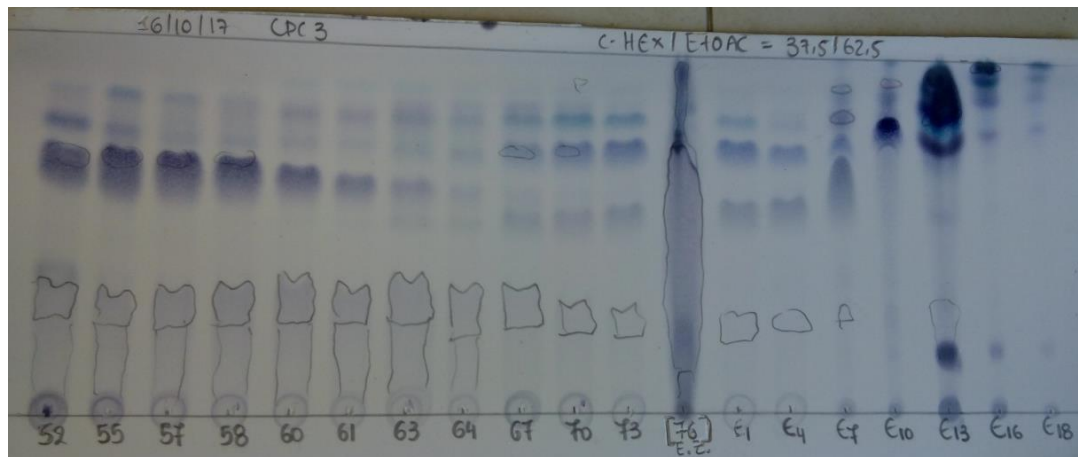
Πραγματοποιήθηκε η συλλογή 92 κλασμάτων. Στα πρώτα κλάσματα η κινητή φάση ήταν μόνο νερό, στα επόμενα κλάσματα υπήρχε μια διαβάθμιση πολικότητας που περνούσε από 100 % νερό σε 100 % κάτω φάση του διφασικού συστήματος, σε χρονικό διάστημα 20 min και στα τελικά κλάσματα η κινητή φάση ήταν μόνο η βαριά φάση του διφασικού συστήματος.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε εξώθηση της κινητής φάσης (extrusion) με τη διέλευση της στατικής φάσης, με ταχύτητα 1600 rpm και ροή 10-15 mL / min. Έτσι συλλέχθηκαν άλλα 18 κλάσματα, ενώ στο τέλος ο καθαρισμός της στήλης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αιθανόλης και στους δύο τρόπους έκλουσης, αρχικά κατιούσα κι έπειτα ανιούσα.

B.9.2. Αποτελέσματα



Εικόνα B. 30. TLC από τα κλάσματα 1-51 του CPC του EtOAc εκχυλίσματος των καρπών



Εικόνα Β. 31. TLC από τα κλάσματα 52-extrusion 18 του CPC του EtOAc εκχυλίσματος των καρπών

Πίνακας Β. 17. Μάζες των κλασμάτων του CPC

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)
1	21.2
2-4	151.0
5-11	360.6
12-16	42.4
17-28	52.8
29-37	57.9
38-42	30.3
43-46	15.3
47-50	29.9
51-61	268.5

62-66	59.9
67-74+Extrusion 1-6	108.9
Extrusion 8	10.7
Extrusion 13-18	223.5
EtOH 1-5	16.2

- Όλα τα κλάσματα συλλέχθηκαν με ταχύτητα περιστροφής 1600 rpm και ροή 10-15 mL / min, ανάλογα με τη δημιουργία ή μη γαλακτώματος σε μερικά από αυτά.
- Στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) παρατηρείται ότι στα πρώτα κλάσματα υπάρχουν τανίνες στη βάση της πλάκας, γεγονός που αναδεικνύει ότι δεν απομακρύνθηκε το σύνολό τους κατά την υγρή-υγρή εκχύλιση στην υδατική φάση.
- Το κλάσμα 29-37 υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

B.10. Απομόνωση μεταβολιτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

B.10.1. Πειραματική πορεία

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε τόσο σε αναλυτική, όσο και παρασκευαστική κλίμακα για τέσσερα κλάσματα συνολικά. Τα κλάσματα αυτά είχαν ήδη δείξει αντιβακτηριακή δράση σε μια σειρά βακτηριακών στελεχών (B.12.), επομένως η απομόνωση των σημαντικότερων ενώσεων τους κρίθηκε αναγκαία.

➤ Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αναλυτικής κλίμακας

Σκοπός της χρήσης αυτής της χρωματογραφίας ήταν να βρεθούν οι συνθήκες διαχωρισμού των κυριότερων ενώσεων των δραστικών δειγμάτων και βάσει των χρωματογραφημάτων να πραγματοποιηθεί αντίστοιχα χρωματογραφία σε παρασκευαστική κλίμακα, προκειμένου να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν οι επιλεγμένες ενώσεις.

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε ήταν LaChrom_Merck_Hitachi και ο ανιχνευτής ήταν ανιχνευτής συστοιχίας διοδίων (DAD). Η στήλη ήταν αντίστροφης φάσης EZ Chrom Elite (C-18, 5 μm, 250*4.6 mm).

Πίνακας Β. 18. Συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων της HPLC σε αναλυτική κλίμακα

ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ (mg / mL)	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΡΟΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ (mL / min)
Cpc_67-74	10	ACN/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	1
mp1c1_157-163	10	ACN/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	1
mp1c1_87-96	10	MeOH/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	1
mp1c1_106-108	10	MeOH/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	1

- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης παρασκευαστικής κλίμακας

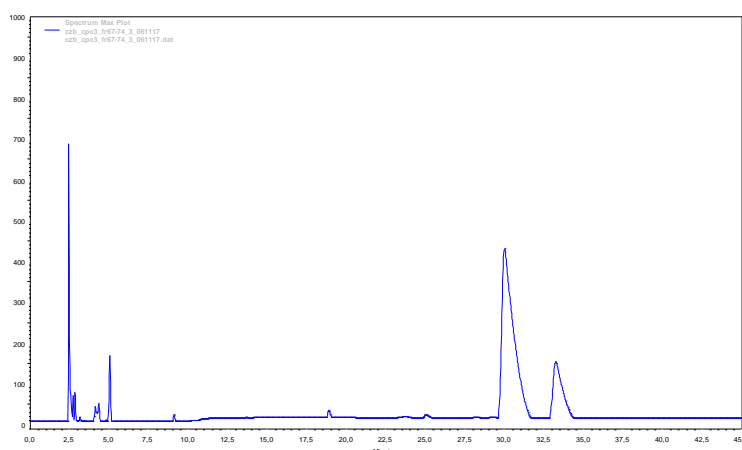
Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τη χρωματογραφία ήταν ένας τύπος Macherey-Nagel, αντίστροφης φάσης (C-18, 5 μm, 250*32 mm).

Πίνακας Β. 19. Συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων της HPLC σε παρασκευαστική κλίμακα

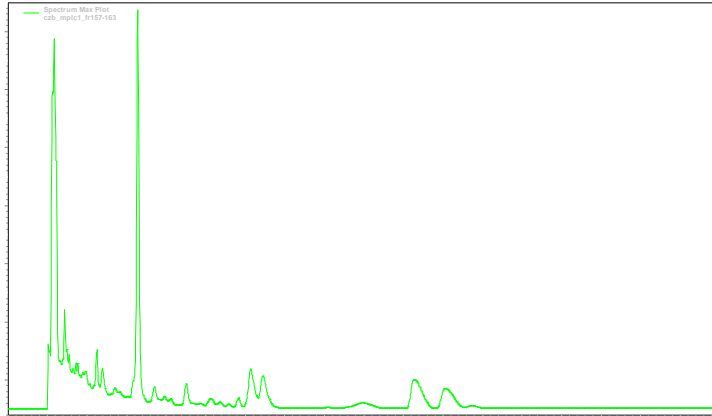
ΚΛΑΣΜΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΠΟΡΩΝ ΦΙΛΤΡΟΥ (μm)	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΡΟΗ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ (mL / min)	ΡΥΘΜΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ (s) / σωληνάκι	λ (nm)
Crc_67-74	104 mg / 4mL MeOH	0.45	ACN/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	45	20	220
mp1c1_15 7-163	30mg / 2mL MeOH	0.2	ACN/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	45	20	220
mp1c1_87- 96	48mg / 2.2mL MeOH	0.45	MeOH/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	35	30	220
mp1c1_10 6-108	40mg / 4 mL MeOH	0.45	MeOH/HCOOH (aq) 0.1N 85/15	35	30	220

B.10.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

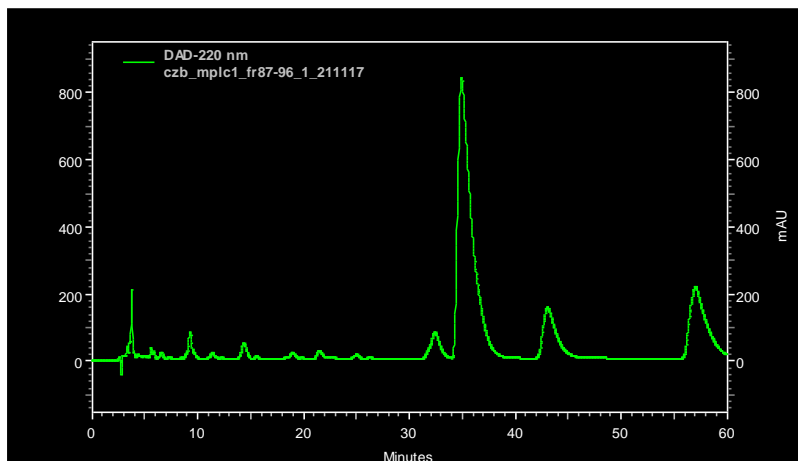
➤ Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αναλυτικής κλίμακας



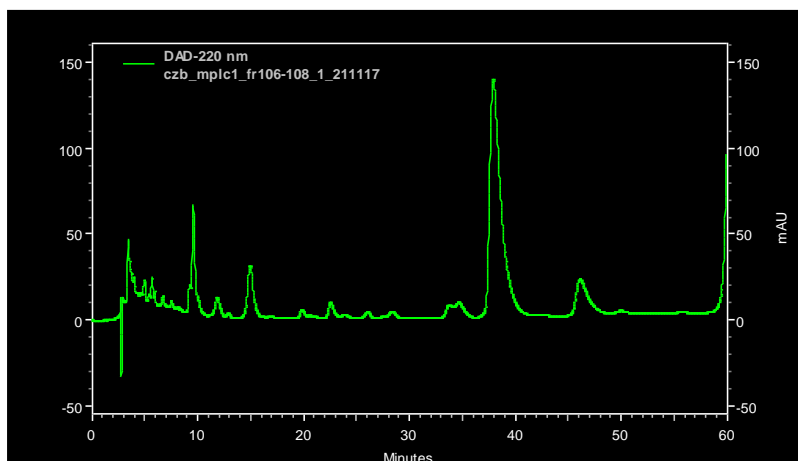
Εικόνα Β. 32. Χρωματογράφημα του Crc_67-74 στην αναλυτική HPLC



Εικόνα Β. 33. Χρωματογράφημα του *mp1c1_157-163* στην αναλυτική HPLC



Εικόνα Β. 34. Χρωματογράφημα του *mp1c1_87-96* στην αναλυτική HPLC



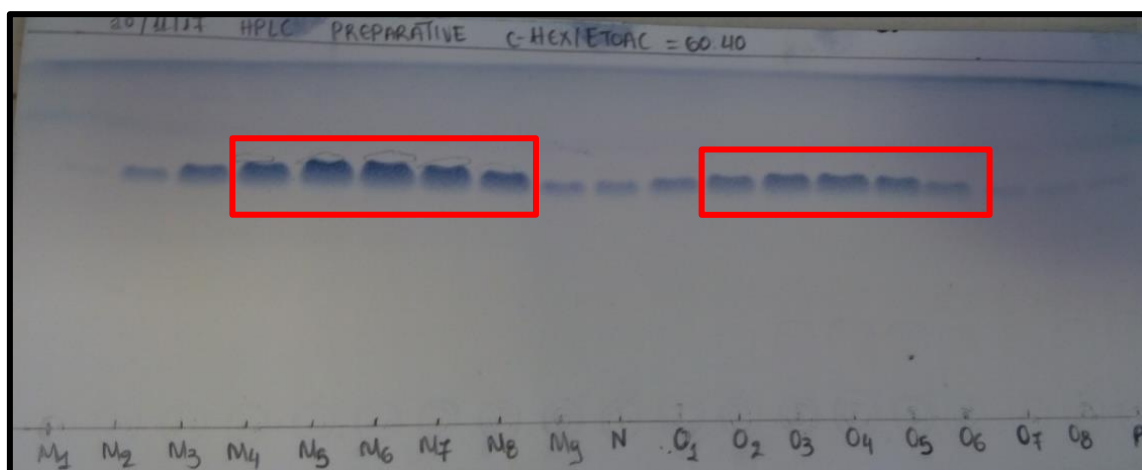
Εικόνα Β. 35. Χρωματογράφημα του *mp1c1_106-108* στην αναλυτική HPLC

- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης παρασκευαστικής κλίμακας

➤ Κλάσμα Crc 67-74



Εικόνα B. 36. Χρωματογράφημα του Crc_67-74 στην παρασκευαστική HPLC



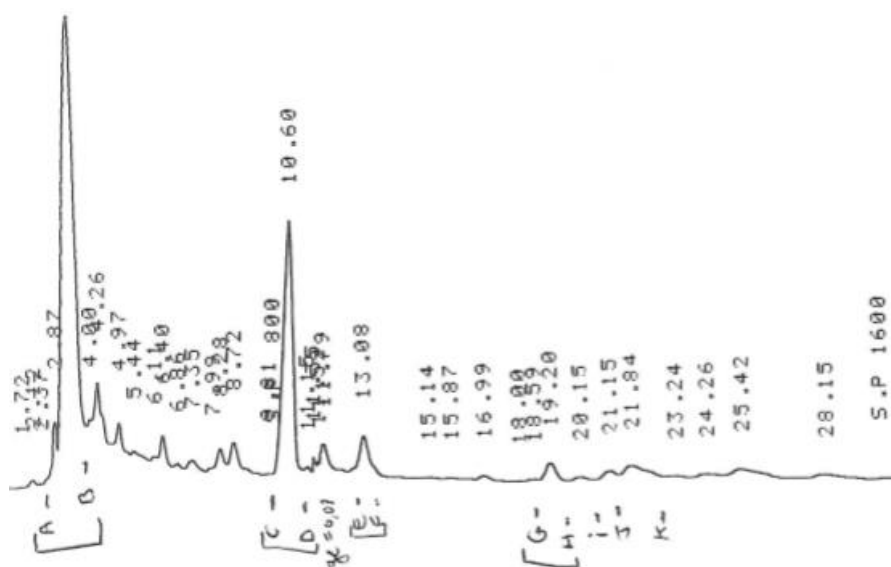
Εικόνα B. 37. TLC των κλασμάτων M1-N και O1-P της παρασκευαστικής HPLC του Crc_67-74

Πίνακας Β. 20. Μάζες των κλασμάτων της παρασκευαστικής HPLC του Crs_67-74

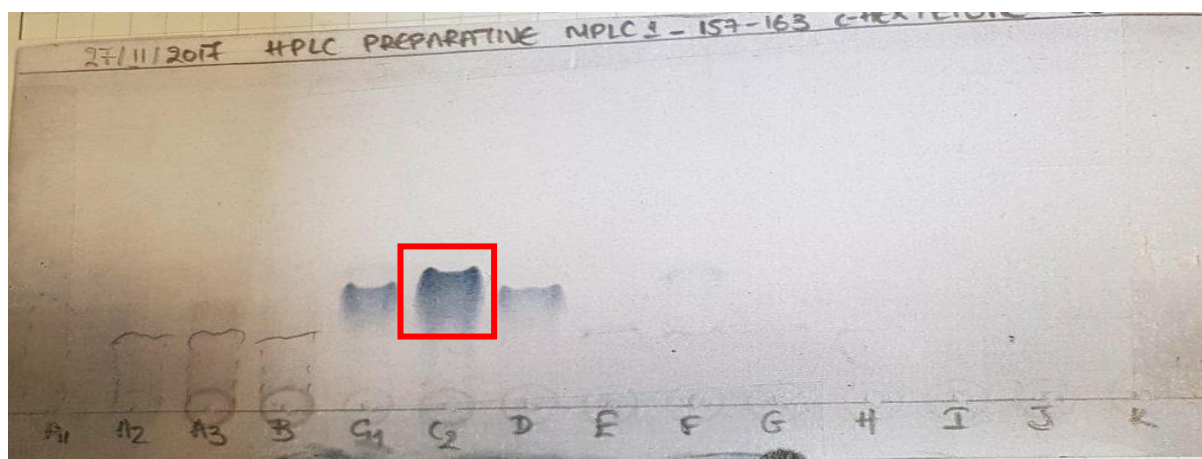
ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)	NMR
3-7	3.4	MeOD
B1-4	0.2	CDCl ₃
H1-4	0.3	CDC
M1-2	0.7	CDCl ₃
M3	1.0	CDCl ₃
M4-8	13.6	CDCl ₃
M9	0.8	CDCl ₃
M10/N	0.2	CDCl ₃
O1	0.7	CDCl ₃
O2-6	2.3	CDCl ₃
O7-9	1.0	CDCl ₃
καθάρισμα	8.7	MeOD

- Όλα τα παραπάνω κλάσματα που συλλέχθηκαν καθώς και οι συνενώσεις αυτών υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

➤ mplc1 157-163



Εικόνα Β. 38. Χρωματογράφημα του *mplc1_157-163* στην παρασκευαστική HPLC



Εικόνα Β. 39. TLC των κλασμάτων της παρασκευαστικής HPLC του *mplc1_157-163*

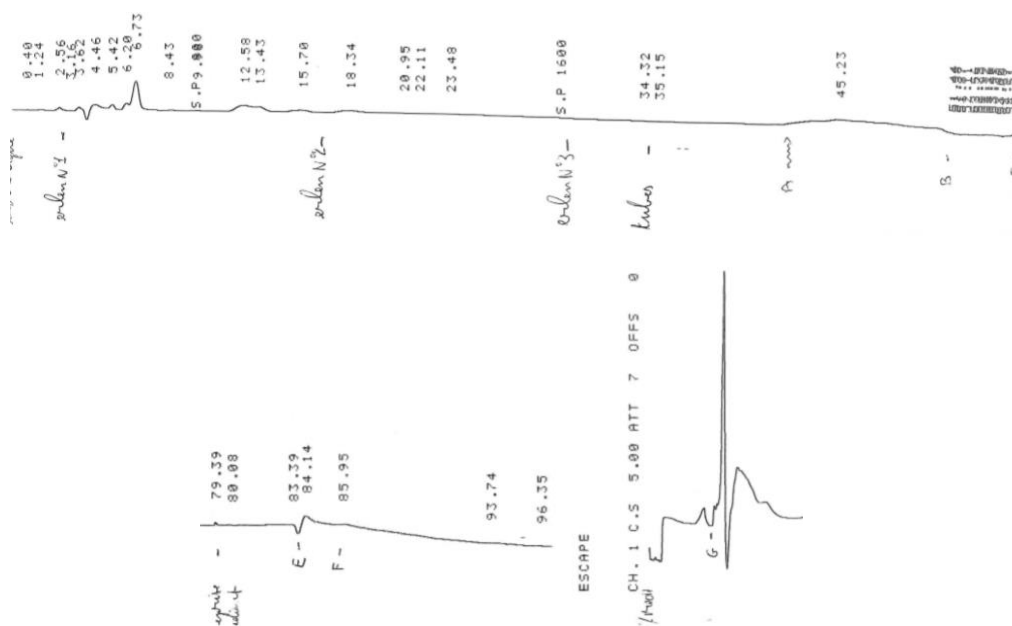
Πίνακας Β. 21. Μάζες των κλασμάτων της παρασκευαστικής HPLC του *mplc1_157-163*

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)	NMR
A1	0.1	CDCl ₃
A2	0.7	CDCl ₃

A3	1.2	CDCl ₃
A4/B	0.5	CDCl ₃
C1	1.7	CDCl ₃
C2	8.4	CDCl ₃
C3/D	13.5	CDCl ₃
E-F	0.3	
G-H	0.3	CDCl ₃

- Όλα τα παραπάνω κλάσματα που συλλέχθηκαν καθώς και οι συνενώσεις αυτών εκτός από το (E-F) υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

➤ mp1c1 87-96



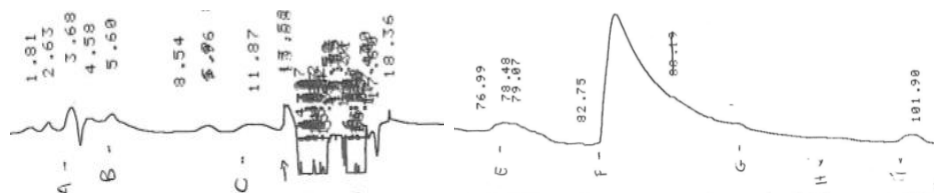
Εικόνα Β. 40. Χρωματογράφημα του mp1c1_87-96 στην παρασκευαστική HPLC

Πίνακας Β. 22. Μάζες των κλασμάτων της παρασκευαστικής HPLC του *mp1c1_87-96*

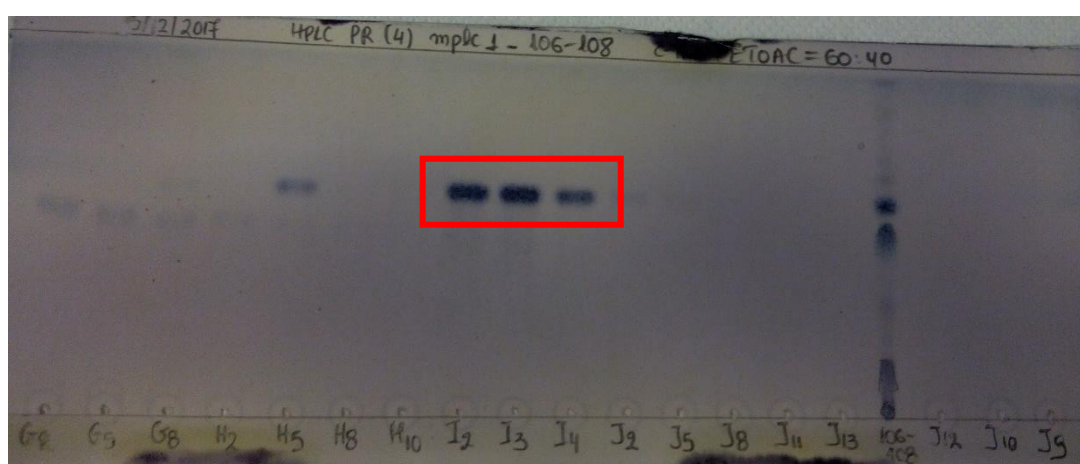
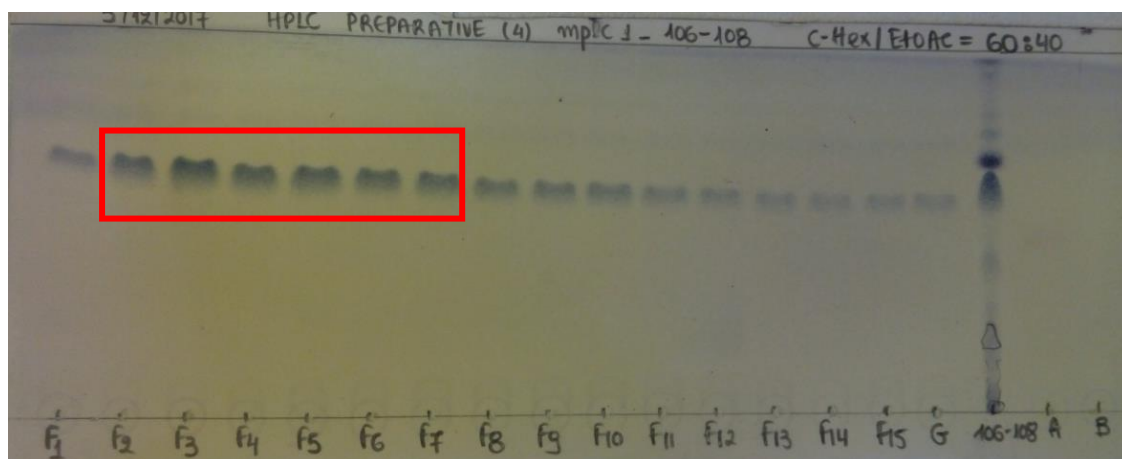
ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)	NMR
Κωνική φιάλη 1	1.9	
Κωνική φιάλη 2	1.5	CDCl ₃
Κωνική φιάλη 3	0.5	
1-20	1.8	
21-29	6.6	CDCl ₃
30-63	16.0	
64-75	7.8	CDCl ₃
76-τέλος	6.7	

- Κάποια από τα παραπάνω κλάσματα που συλλέχτηκαν καθώς και κάποιες συνενώσεις αυτών υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

➤ *mp1c1_106-108*



Εικόνα Β. 41. Χρωματογράφημα του *mp1c1_106-108* στην παρασκευαστική HPLC



Εικόνα Β. 42. TLC των κλασμάτων της παρασκευαστικής HPLC του mp1c1_106-108

Πίνακας Β. 23. Μάζες των κλασμάτων της παρασκευαστικής HPLC του mp1c1_106-108

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)	NMR
A-58	3.7	
59-60	0.1	CDCl ₃
61-64	3.7	
65-69	0.4	CDCl ₃

70-80	4.4	CDCl ₃
81-89	1.2	
90-105	5.1	CDCl ₃
106-137	2.1	
138-145	2.8	CDCl ₃
146-158	2.5	
F2-F7	2.6	CDCl ₃
F8-G	1.6	CDCl ₃
G2-H3	1.4	CDCl ₃
H4-H6	1,4	CDCl ₃
H7-H10	0.3	
I1	0.6	
I2-I4	4.9	CDCl ₃
J1-J13	0.8	

- Κάποια από τα παραπάνω κλάσματα που συλλέχτηκαν καθώς και κάποιες συνενώσεις αυτών υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Συμπερασματικά, από τις τέσσερις υγρές χρωματογραφίες υψηλής απόδοσης οι οποίες έλαβαν χώρα, απομονώθηκαν **πέντε** μεταβολίτες σε ποσότητα ικανή και αναγκαία για την ταυτοποίησή τους. Οι μεταβολίτες αυτοί είναι το M4-8 (13.6 mg), το O2-6 (2.3 mg), το C2 (8.4 mg), το F2-7 (2.6 mg) και το I2-4 (4.9 mg).

B.11. Απομόνωση μεταβολιτών με υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης

B.11.1. Πειραματική πορεία

Η υγρή χρωματογραφία μεσης πίεσης εφαρμόστηκε για την κλασμάτωση του κλάσματος crc_51-61 που είχε ήδη δείξει αντιβακτηριακή δράση (B.12.).

➤ Προετοιμασία δείγματος

Πραγματοποιήθηκε η διάλυση του δείγματος, του οποίου η μάζα ήταν 330 mg, με απεσταγμένο CH₂Cl₂ σε σφαιρική φιάλη κι έπειτα προστέθηκαν περίπου 400 mg Silica gel τύπου 60A 70-200N για την παρασκευή ξηρού 'desot'. Το μίγμα εξατμίστηκε και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στην αντλία αζώτου υψηλού κενού μέχρις ότου γίνει λεπτή ξηρή σκόνη.

➤ Προετοιμασία στήλης

Η στήλη MPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου FS-12-VID 20 mm (AIT France) και πακεταρίστηκε με Silica gel τύπου LC60A 20-45 micron. Έπειτα, αφού τοποθετήθηκε ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού, το δείγμα χύθηκε στη στήλη. Στο τέλος, πάνω από το δείγμα, τοποθετήθηκε ένα επιπλέον κομμάτι διηθητικού χαρτιού.

➤ Πειραματική διαδικασία

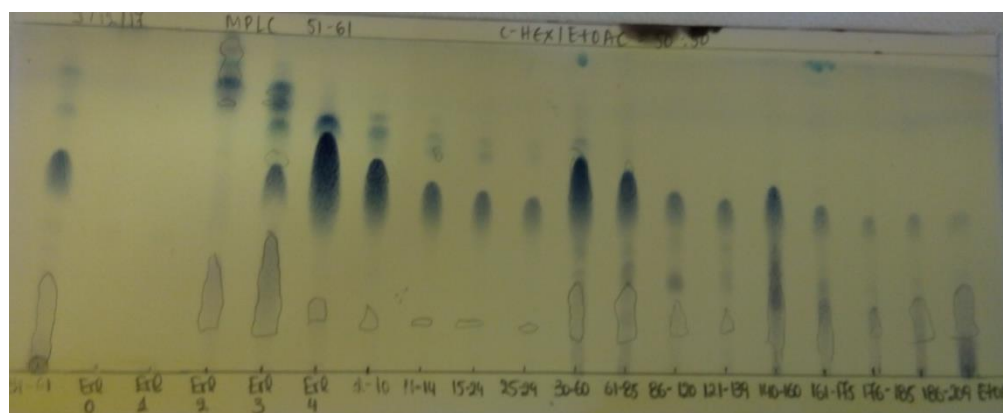
Η αντλία MPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν μοντέλο C-615 αντλίας Buchi.

Οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφία αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας Β. 24. Συνθήκες διεξαγωγής της MPLC του *crc_51-61*

ΕΙΔΟΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (%)	ΟΓΚΟΣ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (mL)	ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΤLC ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (%)
100 c-Hex	200	Κωνικές φιάλες:0,1	80/20 c-Hex/EtOAc
90/10 c-Hex/EtOAc	400	Κωνικές φιάλες2,3,4 1-10	80/20 c-Hex/EtOAc
85/15 c-Hex/EtOAc	800	11-105	80/20 c-Hex/EtOAc 60/40 c-Hex/EtOAc
80/20 c-Hex/EtOAc	300	106-139	50/50 c-Hex/EtOAc
70/30 c-Hex/EtOAc	200	140-162	50/50 c-Hex/EtOAc
60/40 c-Hex/EtOAc	200	163-185	50/50 c-Hex/EtOAc
50/50 c-Hex/EtOAc	200	186-209	50/50 c-Hex/EtOAc

B.11.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση



Εικόνα B. 43. TLC από τα κλάσματα της MPLC του *crs_51-61*

Πίνακας B. 25. Μάζες από τα κλάσματα της MPLC του *crs_51-61*

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)	NMR
Κωνική φιάλη 0	0.4	
Κωνική φιάλη1	0.1	
Κωνική φιάλη2	7.0	
Κωνική φιάλη3	11.3	
Κωνική φιάλη4	20.1	CDCl ₃
1	1.6	CDCl ₃
2-10	7.9	
11-14	1.8	

15-24	1.9	
25-29	2.0	CDCl ₃
30-60-{45}	13.6	30-35:CDCl ₃
45	0.5	CDCl ₃
61-85-{70}	7.1	
70	0.3	CDCl ₃
86-120	6.5	
121-139	1.7	
140-160	4.1	
161-175	11.8	
176-185	1.5	
186-209	3.4	
Κωνική φιάλη EtOAc	7.8	

- Κάποια από τα παραπάνω κλάσματα που συλλέχτηκαν καθώς και κάποιες συνενώσεις αυτών υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

B.12. Αντιβακτηριακός έλεγχος εκχυλισμάτων/κλασμάτων

B.12.1. Πειραματική πορεία

➤ Πρώτη λίστα στελεχών

Το μεθανολικό εκχύλισμα, το υδατικό εκχύλισμα και το εκχύλισμα EtOAc υποβλήθηκαν σε αντιβακτηριακές δοκιμές. Τα στελέχη βακτηρίων που δοκιμάστηκαν ήταν τα εξής:

Πίνακας Β. 26. Πρώτη λίστα αερόβιων βακτηρίων

ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CIP 6086T
<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 5855
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 103.467
<i>Brevundimonas diminuta</i>	CIP103020
<i>Aeromonas hydrophila</i> (<i>bestiarum</i>)	CIP 74.30T
<i>Pseudomonas putida</i>	CIP 55.191
<i>Klebsiella oxytoca</i>	coll perso
<i>Staphylococcus</i> <i>lugdunensis</i>	ATCC 43.809
<i>Providencia stuartii</i>	CIP 107.808
<i>Morganella morganii</i>	coll perso
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25.923

<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124
<i>Salmonella enterica</i>	CIP 58.58
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CIP 52.145
<i>Enterobacter cloacae</i>	CIP 60.85
<i>Citrobacter freundii</i>	CIP 57.32
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CIP 54.90
<i>Alcaligenes faecalis</i>	CIP 67.23
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 81.56
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 103.014
<i>Citrobacter koseri</i>	CIP 82.87
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CIP 70.34
<i>Burkholderia cepacia</i>	CIP 80.24
<i>Achromobacter xylosoxidans xylosoxidans</i>	CIP 77.15
<i>Achromobacter xylosoxidans denitrificans</i>	CIP 71.32
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	coll perso

<i>Comamonas testosteroni</i>	coll perso
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 103.214
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CIP 76.14
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CIP 103.227
<i>Comamonas acidovorans</i>	coll perso
<i>Serratia marcescens</i>	CIP 60.93
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIP 80.27
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CIP 76125
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 6624
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CIP 103.018
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 103.575
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CIP 75.2
<i>Aeromonas caviae</i>	CIP 76.16
<i>Enterococcus gallinarum</i>	CIP 105 985
<i>Enterococcus durans</i>	CIP 104 999
<i>Enterococcus avium</i>	CIP 104 053
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	CIP 100652T

➤ Δεύτερη λίστα στελεχών

Το εκχύλισμα EtOAc υποβλήθηκε σε αντιβακτηριακές δοκιμές σε μια σειρά θετικών κατά Gram βακτηρίων που περιελάμβανε επίσης κλινικά στελέχη.

Πίνακας Β. 27. Δεύτερη λίστα αερόβιων βακτηρίων

ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 57.10
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC 43.809
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25.923
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 81.56
<i>Staphylococcus caprae</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Corynebacterium striatum</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus hominis</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus capitis</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	CIP 100652T
<i>Staphylococcus warneri</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Κλινικό στέλεχος

<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CIP 76125
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 6624
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 103.575
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Comamonas testosteroni</i>	coll perso

➤ Τρίτη λίστα στελεχών

Στην τρίτη σειρά αντιβακτηριακών πειραμάτων εξετάστηκε η δράση του εκχυλίσματος EtOAc σε αναερόβια στελέχη.

Πίνακας Β. 28. Τρίτη λίστα αναερόβιων βακτηρίων

ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CIP 103.227
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA 1108 4768
<i>Streptococcus agalactiae</i>	UR 1201 2651
<i>Streptococcus agalactiae</i>	N858
<i>Streptococcus agalactiae</i>	N983
<i>Streptococcus agalactiae</i>	N1036
<i>Streptococcus agalactiae</i>	N1311
<i>Streptococcus bovis</i>	CIP 102302
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1052
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	CIP 107086
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1328
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1330
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1331
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1332
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1335

<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1336
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1337
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	N1338
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619/CIP 104340
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1001
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1005
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1006
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1318
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1339
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1364
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N1367
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IP56.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SA06115001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N1357
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N1259
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N1347
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N1356
<i>Streptococcus pyogenes</i>	N1357

<i>Propionibacterium acnes</i>	CIP 53 117
<i>Propionibacterium acnes</i>	N878
<i>Propionibacterium acnes</i>	N880
<i>Propionibacterium acnes</i>	N881
<i>Propionibacterium acnes</i>	N882
<i>Propionibacterium acnes</i>	N895
<i>Propionibacterium acnes</i>	N896
<i>Propionibacterium granulosum</i>	N883

➤ Τέταρτη λίστα στελεχών

Στην τέταρτη σειρά αντιβακτηριακών πειραμάτων δοκιμάστηκαν κλάσματα που προέρχονται από το εκχύλισμα EtOAc (μέσω διαφορετικών χρωματογραφικών τεχνικών).

Πίνακας Β. 29. Τέταρτη λίστα αερόβιων βακτηρίων

ΑΡΙΘΜΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 57.10
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
4	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC 43.809

5	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25.923
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Κλινικό στέλεχος
11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124
12	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 81.56
13	<i>Comamonas testosteroni</i>	coll perso
14	<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
15	<i>Enterococcus avium</i>	Κλινικό στέλεχος
16	<i>Enterococcus avium</i>	Κλινικό στέλεχος
17	<i>Corynebacterium striatum</i>	Κλινικό στέλεχος
18	<i>Enterococcus durans</i>	Κλινικό στέλεχος
19	<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
20	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	CIP 100652T
21	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213

22	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP103.214
23	<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 103.014
24	<i>Enterococcus faecium</i>	Κλινικό στέλεχος
25	<i>Enterococcus faecalis</i>	Κλινικό στέλεχος
26	<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
27	<i>Enterococcus durans</i>	Κλινικό στέλεχος
28	<i>Enterococcus faecalis</i>	Κλινικό στέλεχος
29	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CIP 76125
30	<i>Enterococcus faecalis</i>	Κλινικό στέλεχος
31	<i>Comamonas testosteroni</i>	coll perso
32	<i>Bacillus cereus</i>	CIP 6624
33	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CIP 103.018T
34	<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 103.575
35	<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 107.387
36	<i>Enterococcus faecium</i>	Κλινικό στέλεχος
37	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Κλινικό στέλεχος
38	<i>Enterococcus faecalis</i>	Κλινικό στέλεχος
39	<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος

40	<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
41	<i>Enterococcus faecium</i>	Κλινικό στέλεχος
42	<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
43	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Κλινικό στέλεχος
44	<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
45	<i>Enterococcus faecium</i>	Κλινικό στέλεχος
46	<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
47	<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 104 676
48	<i>Enterococcus gallinarum</i>	CIP 105 985
49	<i>Enterococcus durans</i>	CIP 104 999
50	<i>Enterococcus avium</i>	CIP 104 053
51	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Κλινικό στέλεχος
52	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144

➤ Προσδιορισμός MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) για το εκχύλισμα EtOAc

Πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για το εκχύλισμα EtOAc ώστε να βρεθεί σε ποια συγκέντρωση αυτού του εκχυλίσματος εμφανίζεται η ανασταλτική δραστηριότητα σε κάθε στέλεχος του προαναφερθέντος καταλόγου βακτηρίων (Τέταρτη λίστα αερόβιων βακτηρίων). Οι τελικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (εντός της πλάκας) που εξετάστηκαν ήταν 100, 80, 60, 40,

20, 10, 5, 2, 1, 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, δεδομένου ότι η πρώτη είχε ήδη δοκιμαστεί στην πρώτη λίστα στελεχών και έδειξε ανασταλτική δράση.

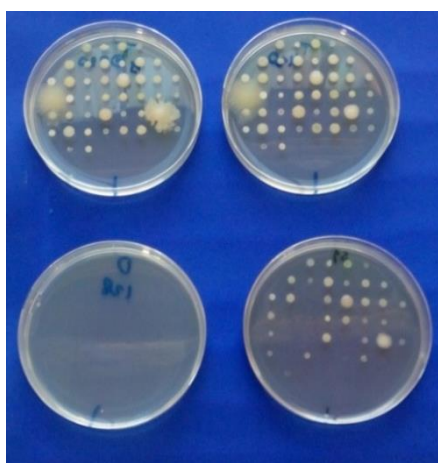
B.12.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

➤ Πρώτη λίστα στελεχών

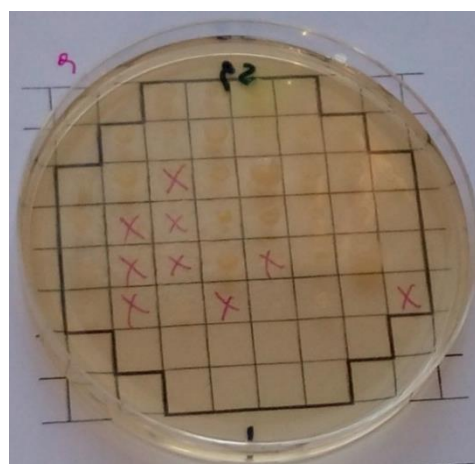
Από τα ελεγχόμενα αρχικά εκχυλίσματα, μόνο το εκχύλισμα EtOAc ήταν δραστικό έναντι της ανάπτυξης των στελεχών. Τα άλλα δύο εκχυλίσματα ήταν αδρανή. Το εκχύλισμα EtOAc ανέστειλε την ανάπτυξη των παρακάτω βακτηρίων.

Πίνακας Β. 30. Βακτήρια στα οποία έδειξε δράση το εκχύλισμα EtOAc

ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 103.014
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 81.56
<i>Streptococcusagalactiae</i>	CIP 103.227
<i>Enterococcusfaecalis,</i>	CIP 103.214
<i>Comamonastestosterone</i>	coll perso
<i>Listeriamonocytogenes</i>	CIP 103.575
<i>Enterococcus durans</i>	CIP 104 999



Εικόνα Β. 45. Τρυβλία των (Πάνω αριστερά) εκχυλίσματος MeOH, (πάνω δεξιά) εκχυλίσματος H₂O, (κάτω δεξιά) εκχυλίσματος EtOAc και (κάτω αριστερά) οφλοξακίνης



Εικόνα Β. 44. Αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων τρυβλίου-σχήματος για την εύρεση των βακτηρίων στα οποία ανεστάλη η ανάπτυξη

➤ Δεύτερη λίστα στελεχών

Τα θετικά αποτελέσματα του εκχυλίσματος EtOAc, όταν αξιολογήθηκε στη δεύτερη λίστα βακτηρίων, ήταν έναντι των παρακάτω βακτηρίων.

Πίνακας Β. 31. Βακτήρια στα οποία έδειξε δράση το εκχύλισμα EtOAc

ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΤΥΠΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 57.10
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC 43.809
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 81.56
<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Corynebacterium striatum</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus hominis</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	CIP 100652T

<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 6624
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 103.575
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Bacillus cereus</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Listeria monocytogenes</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Κλινικό στέλεχος
<i>Comamonas testosteroni</i>	coll perso



Εικόνα Β. 46. Τρυβλίο όπου φαίνονται τα Βακτήρια στα οποία δεν έδειξε δράση το εκχύλισμα EtOAc

Το στέλεχος *Comamonas testosteroni* είναι το μόνο Gram-αρνητικό βακτήριο που περιλαμβάνεται στον κατάλογο.

Το *Staphylococcus hominis* είναι ένα στέλεχος που κατάφερε να αναπτυχθεί σε μερικές πλάκες παρά την παρουσία αντιβιοτικών. Εν τούτοις, το εκχύλισμα EtOAc έδειξε δραστικότητα έναντι αυτού του στελέχους.

➤ Τρίτη λίστα στελεχών

Το εκχύλισμα του EtOAc ανέστειλε την ανάπτυξη **ΟΛΩΝ** των αναερόβιων βακτηρίων.

➤ Τέταρτη λίστα στελεχών

Στον παρακάτω πίνακα αναπαριστάται με πράσινο χρώμα η δράση που έδειξε το καθένα από τα εξεταζόμενα δείγματα σε κάθε στέλεχος βακτηρίου. Τα κλάσματα που δοκιμάστηκαν προέρχονται από διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές. Επίσης εξετάστηκε και μια απομονωμένη ένωση C2 από το κλάσμα mrlc1_157-163.

Πίνακας Β. 32. Βακτήρια στα οποία έδειξαν δράση τα κλάσματα που εξετάστηκαν

N° spot	MPLC1_100-105	MPLC1_106-108	MPLC2_35-60	MPLC1_128-130	MPLC1_157-163	MPLC2 κωνική φιάλη 3	MPLC1_87-96	MPLC1_131-133	CPC_51-61
1						■			
2						■	■		
3		■				■			
4						■			
5									
6						■			
7						■			■

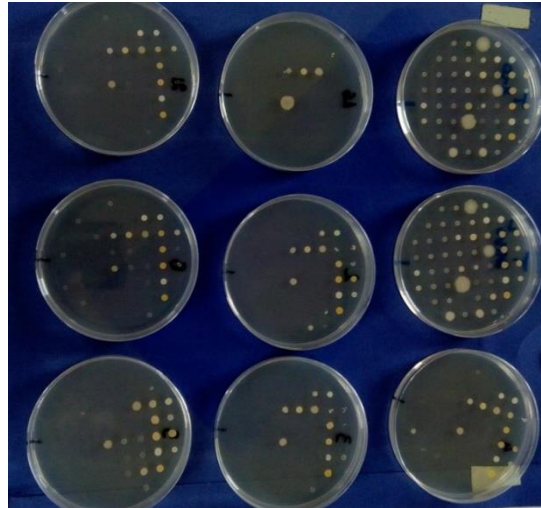
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									

28	■	■	□	□	■	■	■	□	□
29	□	□	□	□	■	□	□	□	□
30	■	■	□	□	■	■	■	□	□
31	□	□	□	□	□	□	□	□	□
32	■	■	■	■	■	■	■	□	□
34	■	■	■	□	■	■	□	□	□
35	■	■	□	□	■	■	□	■	■
36	■	■	□	□	■	■	■	□	□
37	■	■	■	□	■	■	■	□	□
38	■	■	□	□	■	■	■	□	□
39	■	■	■	■	■	■	■	□	□
40	■	■	■	■	■	■	■	□	□
41	■	■	■	□	■	■	□	□	□
42	■	■	■	■	■	■	■	□	□
43	■	■	■	□	■	■	■	□	□
44	■	■	□	■	■	■	■	□	■
45	■	■	□	□	■	■	□	□	□
46	■	■	■	■	■	■	■	□	□
47	■	■	□	□	■	■	■	□	□
48	■	■	□	□	■	■	□	□	□

49									
50									
51									
52									

- Μερικά κλάσματα που δοκιμάστηκαν δεν έδειξαν καθόλου δραστικότητα, όπως είναι τα κλάσματα mprc1_210-214, mprc1_251-263, crc_29-37, crc_E13-18, mprc1_135-137.
- Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι υπάρχουν τρία στελέχη (5, 13, 31), τα οποία κανένα από τα κλάσματα δεν κατόρθωσαν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξή τους.
- Από τα στελέχη που περιλαμβάνονται στον κατάλογο, το *Enterococcus faecium* CIP 107.387 (35) είναι ένα από τα πιο ανθεκτικά βακτήρια στη λίστα.
- Αν και το εκχύλισμα EtOAc έδειξε ανασταλτική δραστικότητα στο *Comamonas testosteroni* (13, 31), (το μόνο Gram αρνητικό βακτήριο που δοκιμάστηκε σε όλες τις σειρές) τα δοκιμασμένα κλάσματα εμφανίστηκαν αδρανή.
- Από τα στελέχη που περιλαμβάνονται στη λίστα, μπορούμε να διακρίνουμε τα εξής:
 1. Το στέλεχος *Listeria monocytogenes* προκαλεί μηνιγγίτιδα, κυρίως στους ηλικιωμένους, στους ανθρώπους με άνοση κατάθλιψη και στις εγκύους. Έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως 4°C. Κατά συνέπεια, μπορεί να υπάρχει και μέσα στα τρόφιμα που είναι αποθηκευμένα στο ψυγείο.
 2. Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα ανθρωποπαθογόνο στέλεχος υπεύθυνο για το απόστημα.
 3. Το *Corynebacterium minutissimum* είναι ένα στέλεχος που προκαλεί λοίμωξη του δέρματος.

Κατά συνέπεια, η ανακάλυψη δραστικών φυσικών προϊόντων που αναστέλλουν τα προαναφερόμενα στελέχη παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον.



Εικόνα Β. 47. Ενδεικτικά τρυβλία όπου παρουσιάζεται η αναστολή και μη σε διάφορα στελέχη.

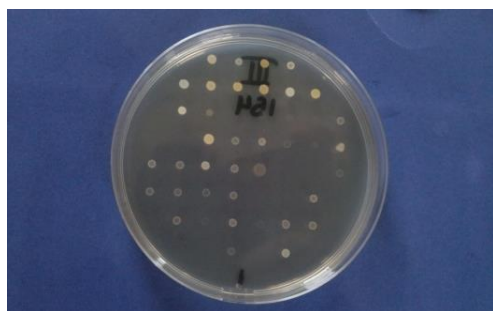
MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) για το εκχύλισμα EtOAc

Εκχύλισμα EtOAc 80mg/mL	
ΕΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
Staphylococcus epidermidis	CIP 53.124
Corynebacterium striatum	Κλινικό στέλεχος
Corynebacterium minutissimum	CIP 100652T
Enterococcus faecium	Κλινικό στέλεχος

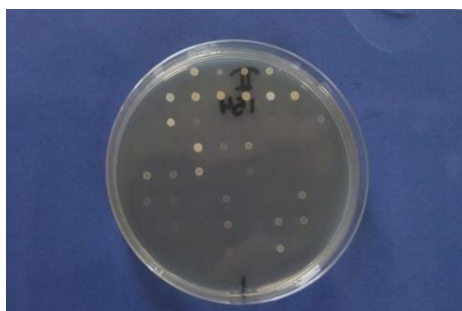
Εκχύλισμα EtOAc 60μg/mL	
ΕΙΔΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
Bacillus cereus	Κλινικό στέλεχος (*2)
Bacillus cereus	CIP 6624
Enterococcus durans	CIP 104 999
Staphylococcus intermedius	Κλινικό στέλεχος

Enterococcus faecalis	Κλινικό στέλεχος (*2)
Bacillus cereus	Κλινικό στέλεχος
Listeria monocytogenes	Κλινικό στέλεχος (*4)

Από τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος EtOAc που ελέχθηκαν, μόνο η δεύτερη (80 µg / mL) και η τρίτη (60 µg / mL) έδειξαν ανασταλτική δράση σε μερικά στελέχη.



Εικόνα Β. 49. Τρυβλίο συγκέντρωσης (60µg/ml) εκχυλίσματος EtOAc

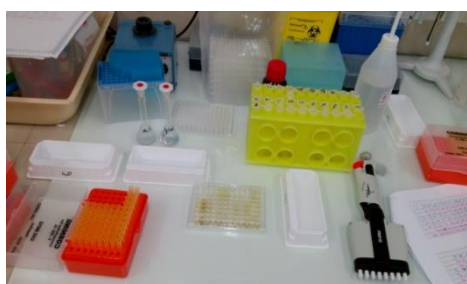


Εικόνα Β. 48. Τρυβλίο συγκέντρωσης (80µg/ml) εκχυλίσματος EtOAc

B.13. Αντιοξειδωτικός έλεγχος εκχυλισμάτων

B.13.1. Πειραματική πορεία

Αντιοξειδωτικές δοκιμές διεξήχθησαν για το ολικό μεθανολικό εκχύλισμα των καρπών, το εκχύλισμα H₂O και το εκχύλισμα EtOAc. Η συγκέντρωση όλων των εκχυλισμάτων ήταν 4 mg / mL και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν DMSO. Αρχικά, προσδιορίστηκαν



Εικόνα Β. 50. Αντιοξειδωτικός έλεγχος καρπών

το ολικό φαινολικό φορτίο (δοκιμή Folin-Ciocalteu) και το ολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή (χρωματομετρική μέθοδος χλωριούχου αλουμινίου), ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντιοξειδωτικός έλεγχος για την ικανότητα

εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών DPPH και ABTS.

B.13.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα αποτελέσματα που έδειξαν τα τρία εκχυλίσματα στους τέσσερις διαφορετικούς ελέγχους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας Β. 33. Αποτελέσματα του ελέγχου του χημικού φορτίου και της αντιοξειδωτικής δράσης στα εκχυλίσματα MeOH, H₂O και EtOAc

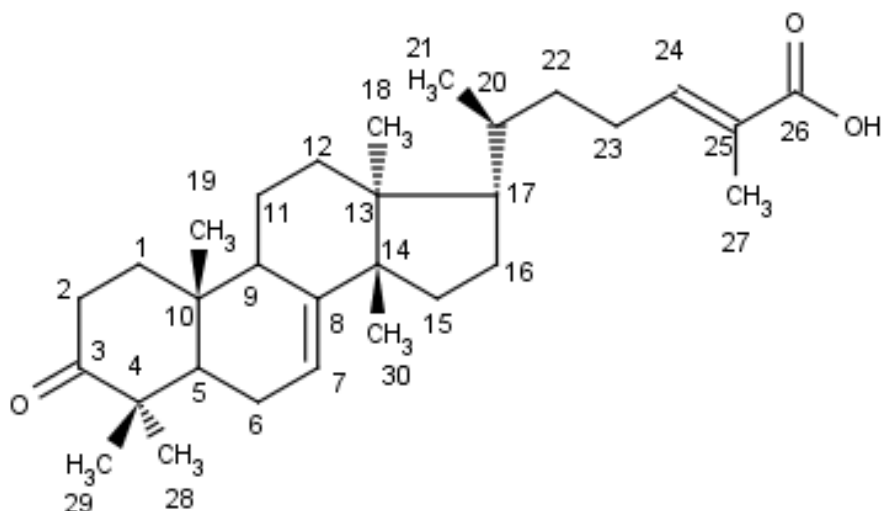
	TPC (mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος)	TFE (mg ισοδύναμου κερκετίνης ανά g εκχυλίσματος)	DPPH (% αποτελεσματικότητα σε 200 μg / mL εκχυλίσματος)	ABTS (% αποτελεσματικότητα σε 20 μg / mL εκχυλίσματος)
MeOH	69.5 ± 0.3	7.3 ± 1.5	94.1 ± 0.2	99.6 ± 0.0
H₂O	142.8 ± 0.0	0.0 ± 0.3	41.2 ± 8.8	9.2 ± 0.1
EtOAc	45.3 ± 0.3	13.2 ± 2.2	95.3 ± 0.2	7.0 ± 0.7

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Αν και το υδατικό εκχύλισμα είχε την πιο μεγάλη τιμή ολικού φαινολικού φορτίου, εντούτοις δεν περιείχε σχεδόν καθόλου флаβονοειδή.
- Ωστόσο, ούτε τα άλλα δύο εκχυλίσματα περιείχαν αξιόλογη ποσότητα флаβονοειδών.
- Επιπρόσθετα, αρκετά σημαντική αντιοξειδωτική δράση (ανασταλτική έναντι των ριζών DPPH και ABTS) εμφάνισε το αρχικό μεθανολικό εκχύλισμα, ενώ το εκχύλισμα του EtOAc εμφάνισε σημαντική ανασταλτική δράση μόνο έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH.

B.14 Ταυτοποίηση μεταβολιτών με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Μεταβολίτης M4-8



Εικόνα Β. 51. Δομή 24-Z-μαστιχαδιενονικού οξέος (Μεταβολίτης M4-8)

Ο μεταβολίτης M4-8, ο οποίος απομονώθηκε από το κλάσμα *crc_67-74* με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Preparative HPLC) όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.10.1., ταυτοποιήθηκε ως το 24-Z-μαστιχαδιενονικό οξύ. Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D και σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία⁵⁶.

- Πιο συγκεκριμένα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. Β. 52) παρατηρούμε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά σήματα: Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται τα πρωτόνια H-24 και H-7 ως μία τριπλή-τετραπλή κορυφή (1H, tq, $J = 7.5 / 1.5$ Hz) και μία σχεδόν τριπλή κορυφή (1H, ~t, $J = 3.5$ Hz) σε δ 6.07 και 5.28, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται (HSQC, Εικ. Β. 55) στα 147.6 ppm και 118.4 ppm, αντίστοιχα.

- Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος συντονίζονται τα πρωτόνια των 7 μεθυλικών ομάδων της ένωσης, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζει η διπλή κορυφή ($J = 1.5$ Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-27 και εμφανίζεται σε δ 1.90 λόγω της γειννίας με το διπλό δεσμό στις θέσεις 24, 25. Επίσης, τα μεθυλικά πρωτόνια H-18, H-19, H-28, H-29 και H-30 εμφανίζονται ως απλές κορυφές σε δ 0.79, 0.98, 1.10, 1.03 και 0.99, αντίστοιχα. Τέλος, στα 0.88 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή ($J = 6.4$ Hz), η οποία ολοκληρώνει για τρία

πρωτόνια και αντιστοιχεί στα H-21, τα οποία παρουσιάζουν ομοπυρηνική σύζευξη (COSY, **Εικ. Β. 53**) με το H-20 (δ 1.38).

- Τα πρωτόνια της θέσης 2 συντονίζονται σε δ 2.72 (1H, td, $J = 14.3 / 5.3$ Hz) και 2.22 (1H, dt, $J = 14.3 / 3.6$ Hz) και είναι αποθωρακισμένα λόγω της γειτνίασης με το καρβονύλιο της θέσης 3.

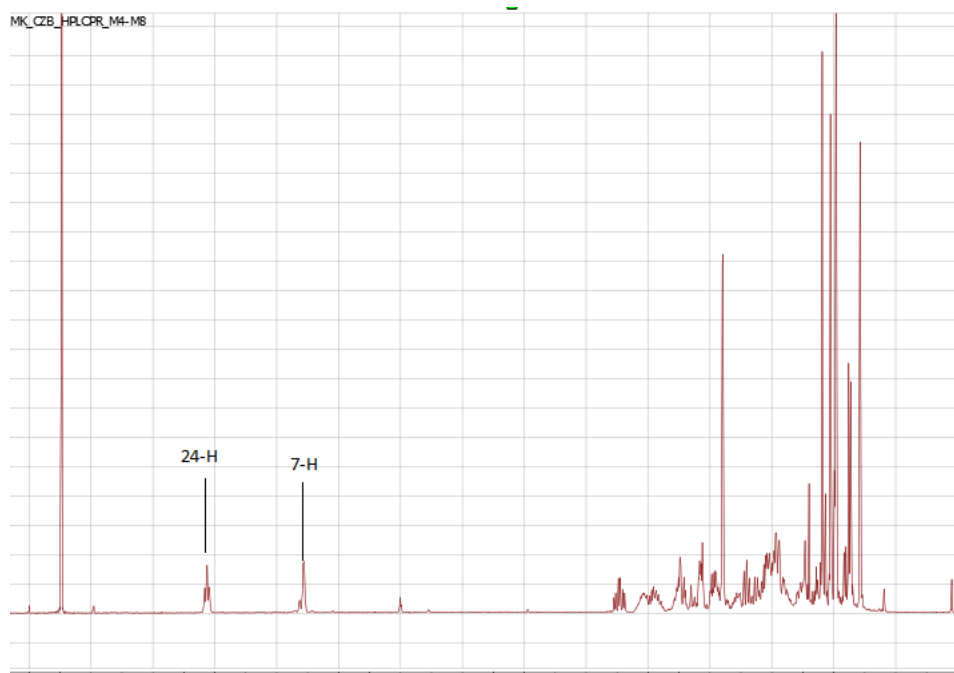
- Τα πρωτόνια της θέσης H-6 συντονίζονται σε δ 2.06 (2H, m) και εμφανίζονται αποθωρακισμένα λόγω της γειτνίασης με το διπλό δεσμό των θέσεων 7, 8.

- Σε δ 2.56 (1H, m) και 2.46 (1H, m) συντονίζονται τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 23, τα οποία παρουσιάζουν ομοπυρηνικές συζεύξεις (COSY, **Εικ. Β. 53**) τόσο με τα πρωτόνια H-22 όσο και με το ολεφινικό πρωτόνιο H-24.

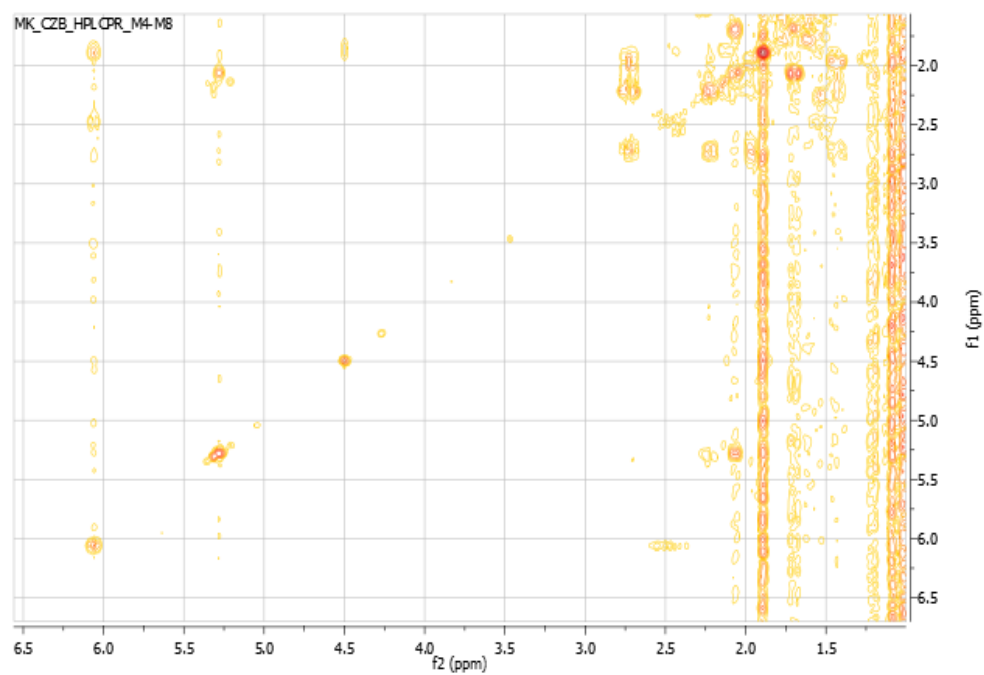
Στο φάσμα HSQC-DEPT (**Εικ. Β. 54**) ξεχωρίζουν τα εξής σήματα:

- Οι καρβονυλικοί άνθρακες των θέσεων 3 και 26 συντονίζονται σε δ 217.0 και 173.6, αντίστοιχα.

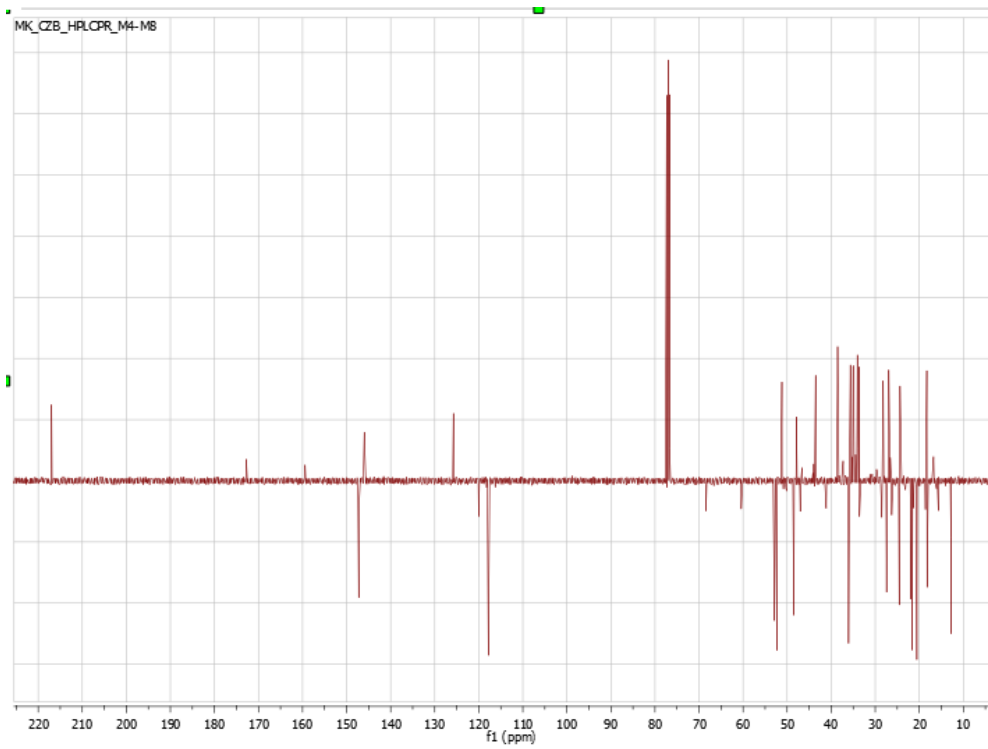
- Εκτός από τους άνθρακες C-24 και C-7 (βλέπε παραπάνω), στην ολεφινική περιοχή του φάσματος, συντονίζονται σε δ 146.2 και 125.7 οι άνθρακες των θέσεων 8 και 25, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψιν τα σήματα των ετεροπυρηνικών φασμάτων HSQC-DEPT (**Εικ. Β. 55**) και HMBC (**Εικ. Β. 56**) επιτεύχθηκε η απόδοση όλων των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης (βλέπε τον ακόλουθο πίνακα).



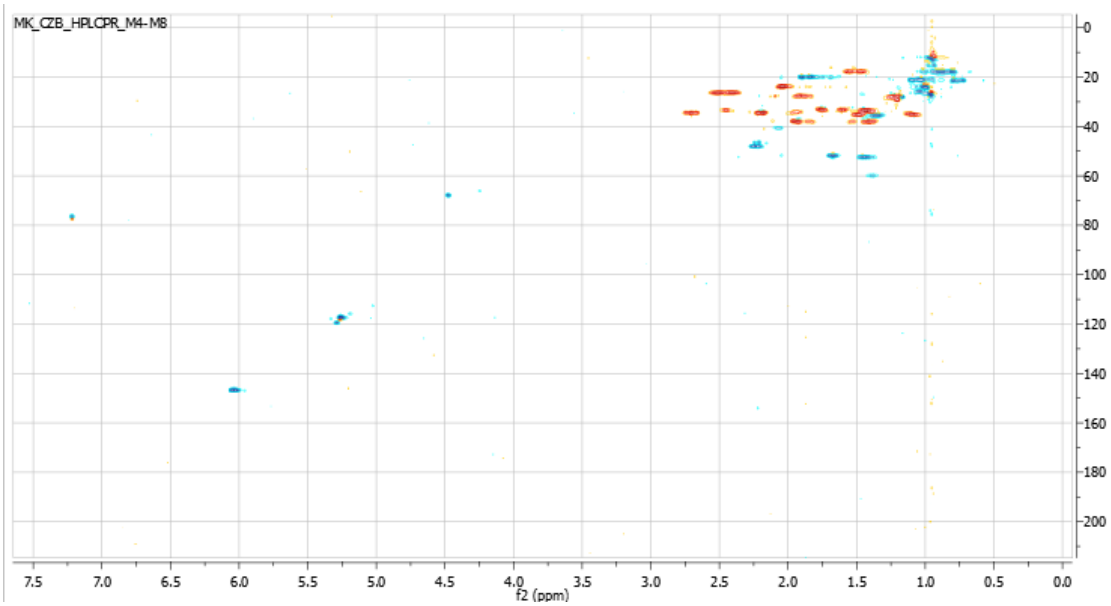
Εικόνα Β. 52. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη Μ4-8



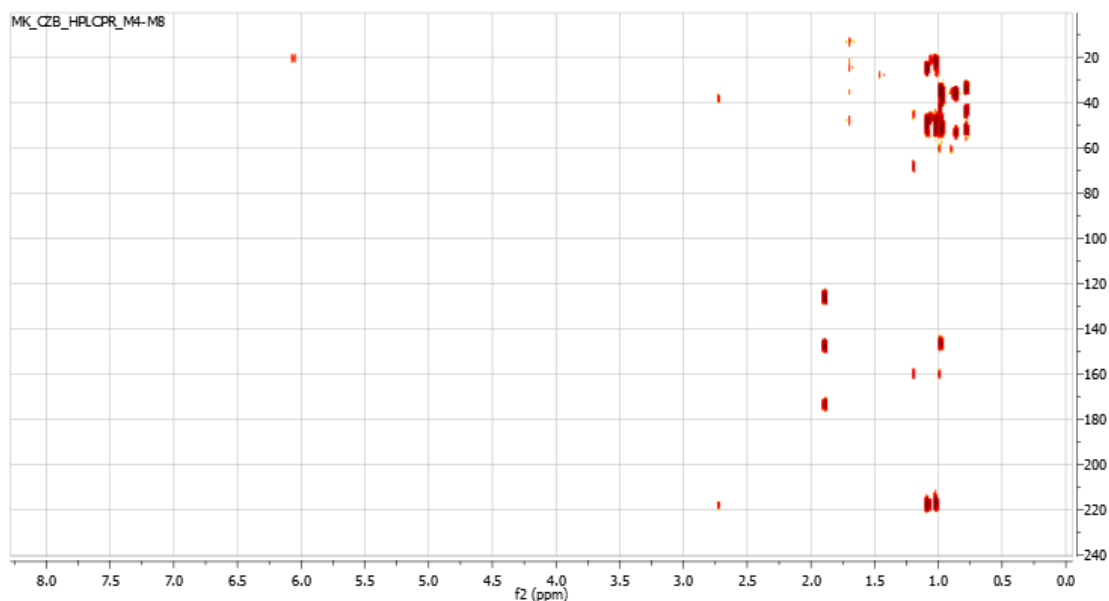
Εικόνα Β. 53. Φάσμα COSY του μεταβολίτη Μ4-8



Εικόνα Β. 54. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του μεταβολίτη M4-8



Εικόνα Β. 55. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη M4-8



Εικόνα Β. 56. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη M4-8

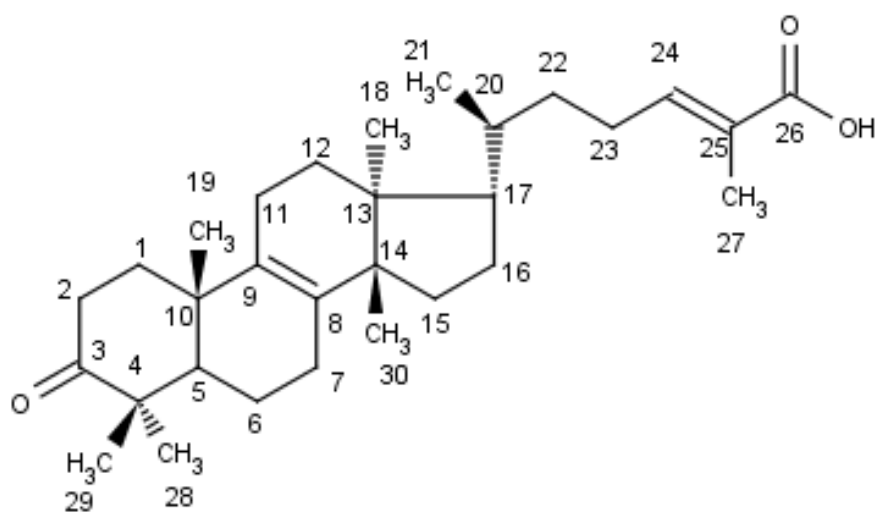
Πίνακας Β. 34. Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz) του μεταβολίτη M4-8 σε CDCl_3

<u>ΘΕΣΗ</u>	<u>$^1\text{H-NMR}$</u> δ (ppm), J (Hz)	<u>$^{13}\text{C-NMR}$</u> δ (ppm)
1	1.96 (1H, m) / 1.43 (*)	38.5
2	2.72 (1H, td, $J = 14.3 / 5.3$) / 2.22 (1H, dt, $J = 14.3 / 3.6$)	34.8
3	-	217.0
4	-	48.4
5	1.69 (1H, ~t, $J = 7.6$)	52.5
6	2.06 (2H, m)	24.6
7	5.28 (1H, ~t, $J = 3.5$)	118.4
8	-	146.2

9	2.27 (1H, m)	48.9
10	-	35.0
11	1.58 (*) / 1.50 (*)	18.2
12	1.78 (1H, m) / 1.63 (*)	33.1
13	-	43.5
14	-	51.2
15	1.45 (2H, *)	34.0
16	1.93 (2H, m)	28.2
17	1.47 (1H, *)	52.9
18	0.79 (3H, s)	22.0
19	0.98 (3H, s)	12.9
20	1.38 (1H, *)	36.2
21	0.88 (3H, d, $J = 6.2$)	18.4
22	1.52 (1H, *) / 1.12 (1H, m)	35.5
23	2.56 (1H, m) / 2.46 (1H, m)	26.7
24	6.07 (1H, tq, $J = 7.5/1.5\text{Hz}$)	147.6
25	-	125.7
26	-	173.6
27	1.90 (3H, d, $J = 1.5\text{Hz}$)	20.6

28	1.10 (3H, s)	21.7
29	1.03 (3H, s)	24.7
30	0.99 (3H, s)	27.4

Μεταβολίτης O2-6



Εικόνα Β. 57. Δομή 24-Z-ισομαστιχαδιενονικού οξέος (Μεταβολίτης O2-6)

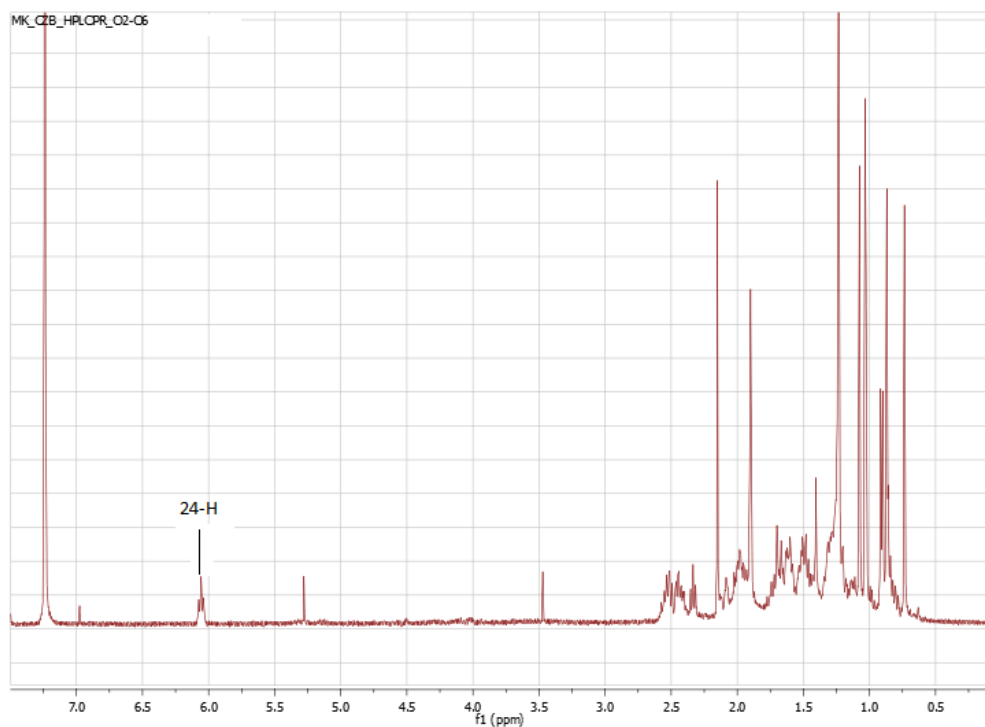
Ο μεταβολίτης O2-6, ο οποίος απομονώθηκε από το κλάσμα *crc_67-74* με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Preparative HPLC), όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.10.1., ταυτοποιήθηκε ως το 24-Z-ισομαστιχαδιενονικό οξύ. Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D και με σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία¹⁸.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη O2-6 παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του μεταβολίτη M4-8 (24-Z-μαστιχαδιενονικό οξύ). Οι κύριες διαφορές, οι οποίες απορρέουν από τη μετάθεση του διπλού δεσμού από τις θέσεις 7, 8 στην περίπτωση του M4-8 στις θέσεις 8, 9 στον μεταβολίτη O2-6, συνοψίζονται στις ακόλουθες:

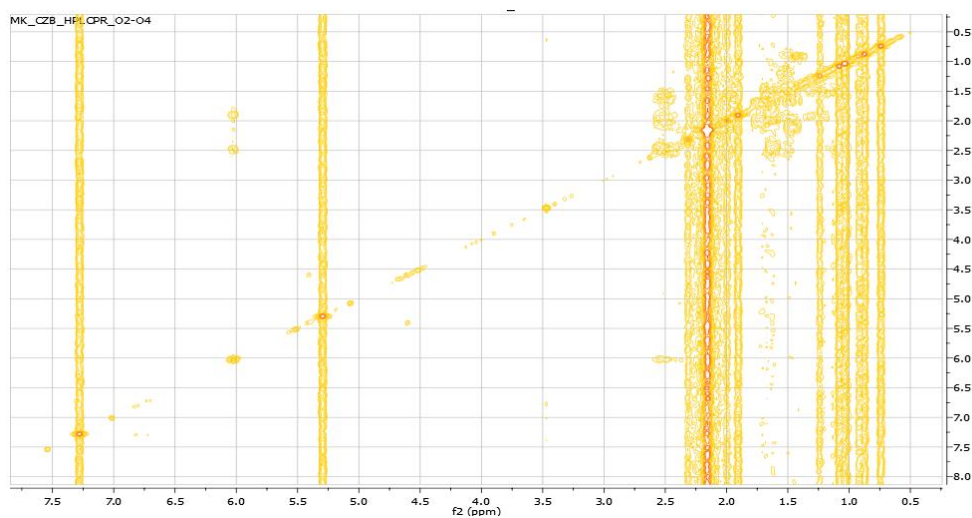
- Απουσιάζει από το φάσμα ¹H-NMR (Εικ.Β. 58) και συγκεκριμένα από την ολεφινική περιοχή το πρωτόνιο της θέσεως 7 καθώς δεν είναι πλέον ολεφινικό και στη συγκεκριμένη θέση υπάρχουν δύο μεθυλενικά πρωτόνια.
- Οι άνθρακες των διπλών δεσμών είναι 4, αλλά στην περίπτωση του μεταβολίτη O2-6 απαντώνται 3 τεταρτοταγείς ολεφινικοί άνθρακες (C-8, C-9 και C-25) και ένας μεθινικός (C-24).
- Απουσιάζει το σήμα που αντιστοιχεί στο H-9 καθώς στη συγκεκριμένη θέση ο άνθρακας είναι πλέον τεταρτοταγής.

- Τα μεθυλениκά πρωτόνια H-6 εμφανίζονται πιο θωρακισμένα ενώ τα H-11 πιο αποθωρακισμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σήματα του μαστιχαδιενονικού οξέος.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα σήματα των ετεροπυρηνικών φασμάτων HSQC και HMBC επιτεύχθηκε η απόδοση όλων των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης (βλέπε τον ακόλουθο πίνακα).



Εικόνα B. 58. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη O2-6



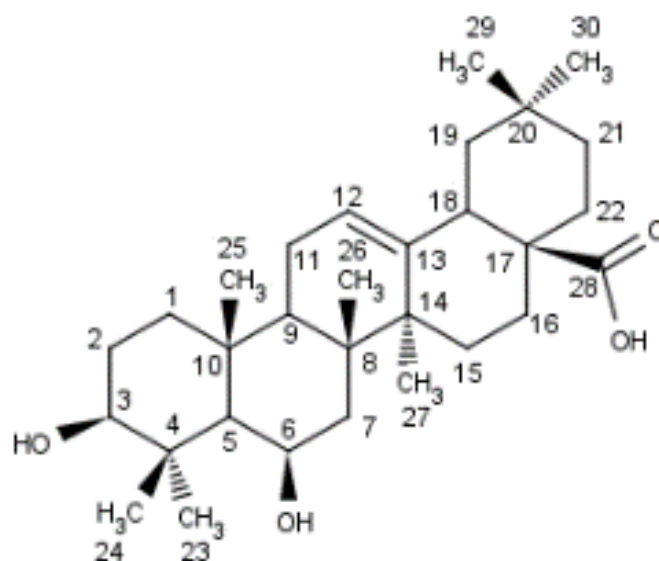
Εικόνα B. 59. Φάσμα COSY του μεταβολίτη O2-6

Πίνακας Β. 35. Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz) του μεταβολίτη O2-6 σε CDCl_3

ΘΕΣΗ	$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm)
1	1.93 (1H, m) / 1.57 (*)	35.5
2	2.49 (1H, m) / 2.42 (1H, m)	34.6
3	-	218.3
4	-	47.2
5	1.64 (1H, ~t, $J = 7.6$)	51.4
6	1.80 (2H, m)	20.2
7	2.06 (2H, m)	27.4
8	-	134.6
9	-	132.6
10	-	37.1
11	1.90 (2H, m)	28.0
12	1.67 (2H, *)	30.6
13	-	50.0
14	-	50.0
15	1.48 (1H, *) / 1.19 (1H, *)	29.7
16	1.99 (1H, m) / 1.88 (1H, m)	21.3
17	1.45 (1H, *)	50.0

18	0.74 (3H, s)	15.5
19	1.04 (3H, s)	20.5
20	1.38 (1H, *)	36.4
21	0.91 (3H, d, $J = 6.2$)	18.5
22	1.46 (1H, *) / 1.08 (1H, m)	35.8
23	2.51 (1H, m) / 2.39 (1H, m)	26.8
24	6.06 (1H, tq, $J = 7.5 / 1.5\text{Hz}$)	147.4
25	-	125.7
26	-	173.4
27	1.90 (3H, d, $J = 1.5\text{Hz}$)	19.7
28	1.03 (3H, s)	21.1
29	1.08 (3H, s)	2.7
30	0.87 (3H, s)	24.2

Μεταβολίτης C2



Εικόνα Β. 58 Δομή 6β-υδροξυ-ολεανολικού οξέος (μεταβολίτης C2)

Ο μεταβολίτης C2, ο οποίος απομονώθηκε από το κλάσμα mp1c1_157-163 με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Preparative HPLC) όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.10.1., ταυτοποιήθηκε ως το 6α-υδροξυ-ολεανολικό οξύ. Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και με σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία⁵⁷.

Στο φάσμα ¹H-NMR (βλέπε **Εικ. Β. 61**) φαίνονται τα χαρακτηριστικά σήματα των τριτερπενίων τύπου ολεανολικού οξέος, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται:

- Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος εμφανίζεται μία ευρεία τριπλή κορυφή ($J = 3.5$ Hz) σε δ 5.30, η οποία αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο της θέσης 12.
- Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 9.4 / 5.4$ Hz) σε δ 3.14 και μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.52, οι οποίες αντιστοιχούν στα μεθινικά πρωτόνια H-3 και H-6, των οποίων οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 78.4 και 69.0 (βλέπε **Εικ. Β. 64**). Η μορφή των πρωτονίων και οι αντίστοιχες τιμές των αλληλεπιδράσεων

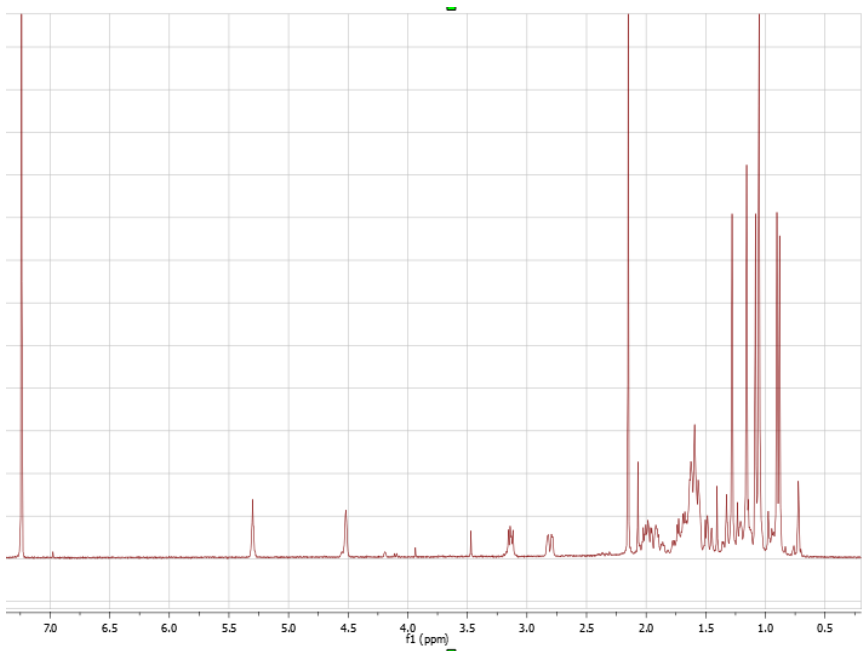
τους με τα γειτονικά πρωτόνια φανερώνουν ότι τα H-3 και H-6 έχουν α-προσανατολισμό και στις δύο περιπτώσεις.

- Στα 2.81 ppm εμφανίζεται μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 13.8 / 3.3$ Hz) η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-18, του οποίου η χημική μετατόπιση φανερώνει την παρουσία καρβοξυλίου στη θέση 17 και συμφωνεί με το γεγονός ότι ο βασικός σκελετός του τριτερπενίου είναι τύπου ολεανίου και όχι ουρσανίου.

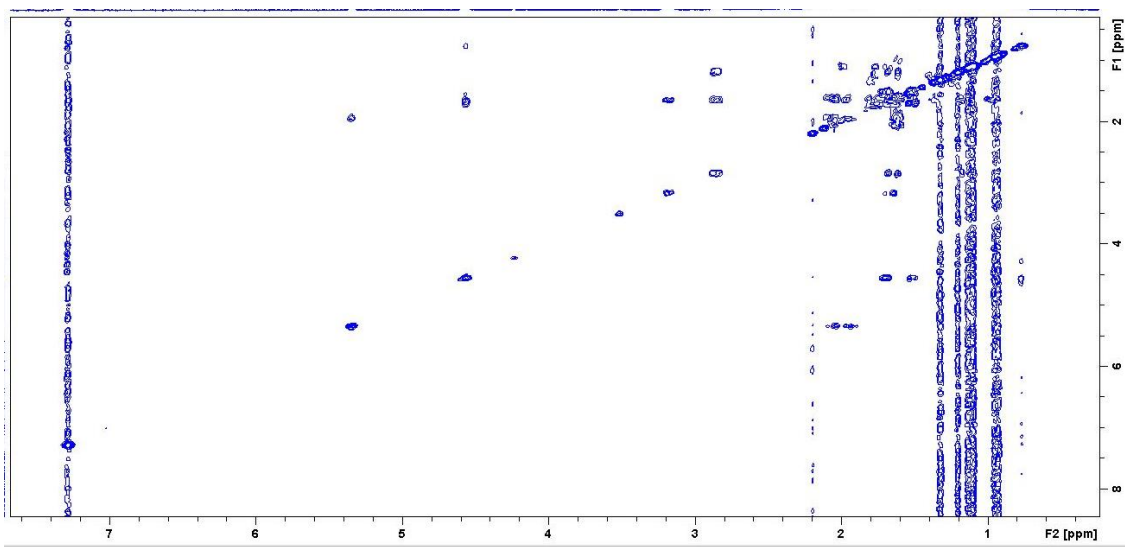
- Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται 5 απλές κορυφές (δ 1.28, 1.16, 1.09, 0.90 και 0.88) που η καθεμία πλοκληρώνει για τρία πρωτόνια, αλλά και μία απλή κορυφή (δ 1.06) που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια. Τα προαναφερόμενα σήματα αντιστοιχούν στις επτά μεθυλομάδες της ένωσης.

- Η παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 6 δικαιολογεί το γεγονός ότι το H-5 (δ 0.72) εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή, επειδή έχει σύζευξη (βλέπε **Εικ. Β. 62**) μόνο με ένα πρωτόνιο της θέσεως 6.

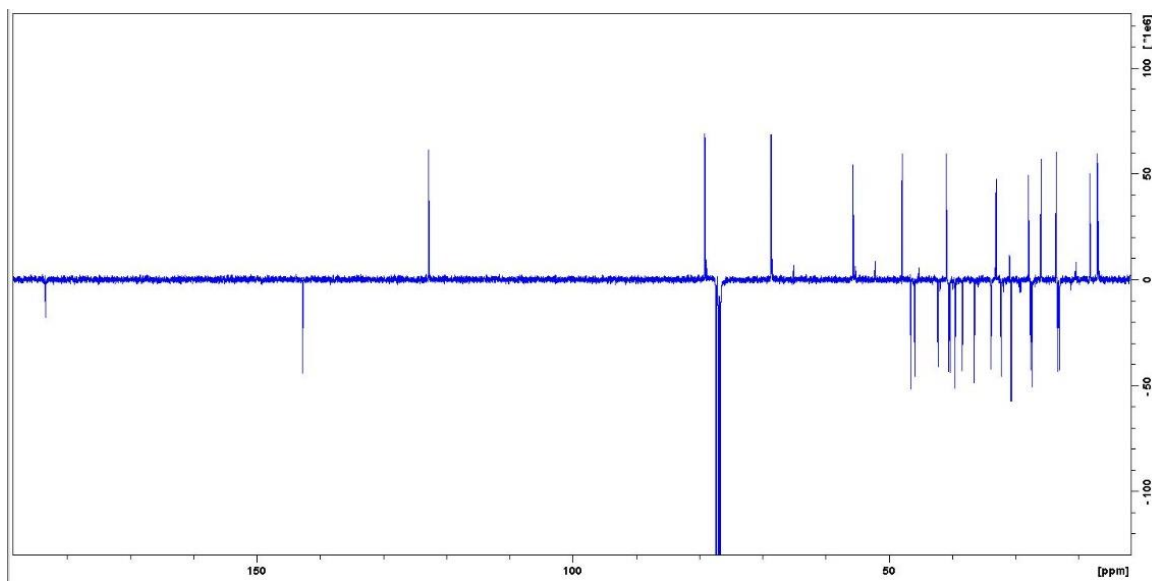
Λαμβάνοντας υπόψιν τα σήματα των ετεροπυρηνικών φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC επιτεύχθηκε η απόδοση όλων των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης (βλέπε τον ακόλουθο πίνακα).



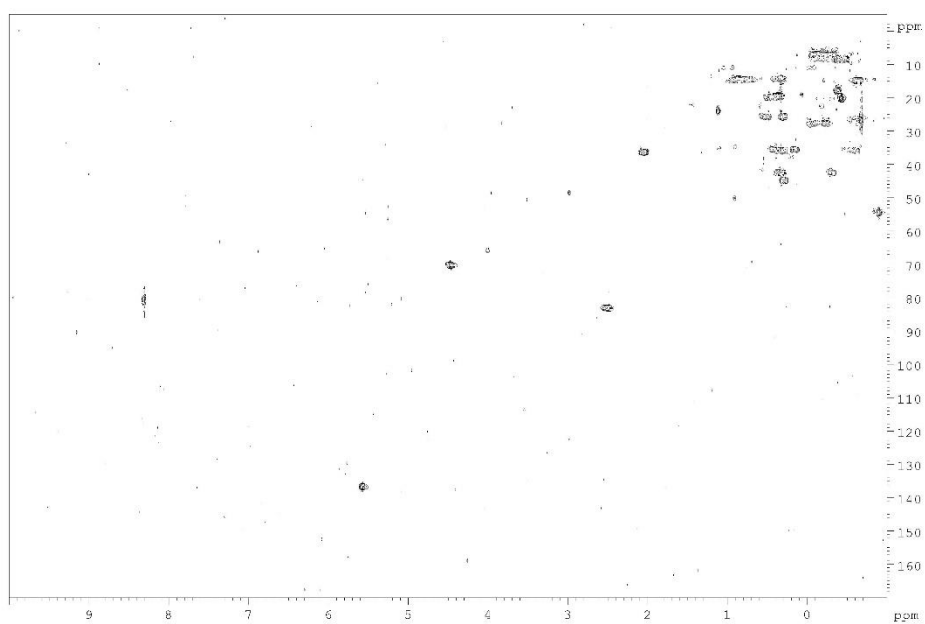
Εικόνα Β. 59. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη C2



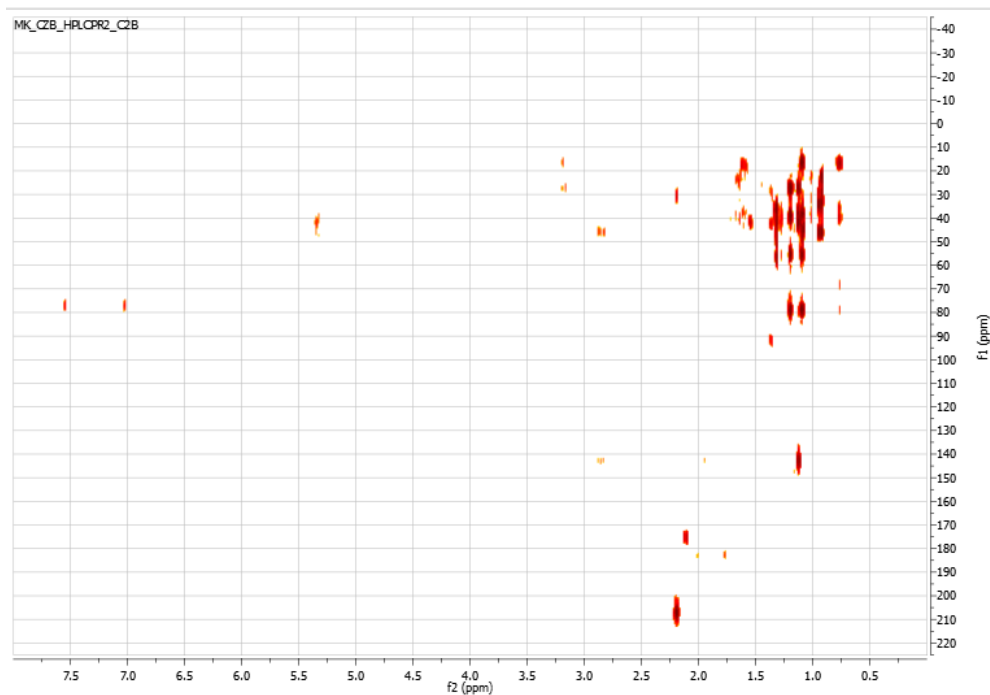
Εικόνα Β. 60. Φάσμα COSY του μεταβολίτη C2



Εικόνα Β. 61. Φάσμα ^{13}C - NMR του μεταβολίτη C2



Εικόνα Β. 62. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη C2



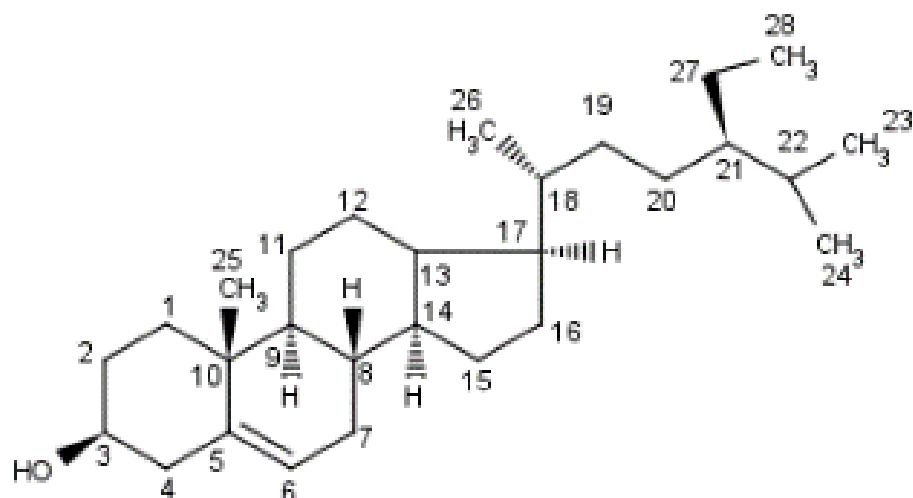
Εικόνα Β. 63. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη C2

Πίνακας Β. 36. Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz) του μεταβολίτη C2 σε CDCl_3

<u>ΘΕΣΗ</u>	<u>$^1\text{H-NMR}$</u> δ (ppm), J (Hz)	<u>$^{13}\text{C-NMR}$</u> δ (ppm)
3	3.14 (1H, dd, $J = 9.4 / 5.4$)	78.4
4	-	39.4
5	0.72 (1H, brs)	55.7
6	4.52 (1H, brs)	69.0
8	-	40.0
10	-	36.9
11	2.00 (2H, m)	23.8
12	5.30 (1H, $\sim t$, $J = 3.5$)	122.4

13	-	142.9
14	-	40.8
17	-	46.1
18	2.81 (1H, dd, J = 13.8 / 3.3)	41.6
23	1.16 (3H, s)	27.2
24	1.06 (3H, s)	16.8
25	1.28 (3H, s)	16.7
26	1.06 (3H, s)	17.2
27	1.09 (3H, s)	26.3
28	-	175.6
29	0.92 (3H, s)	33.7
30	0.95 (3H, s)	22.4

Μεταβολίτης I2-4



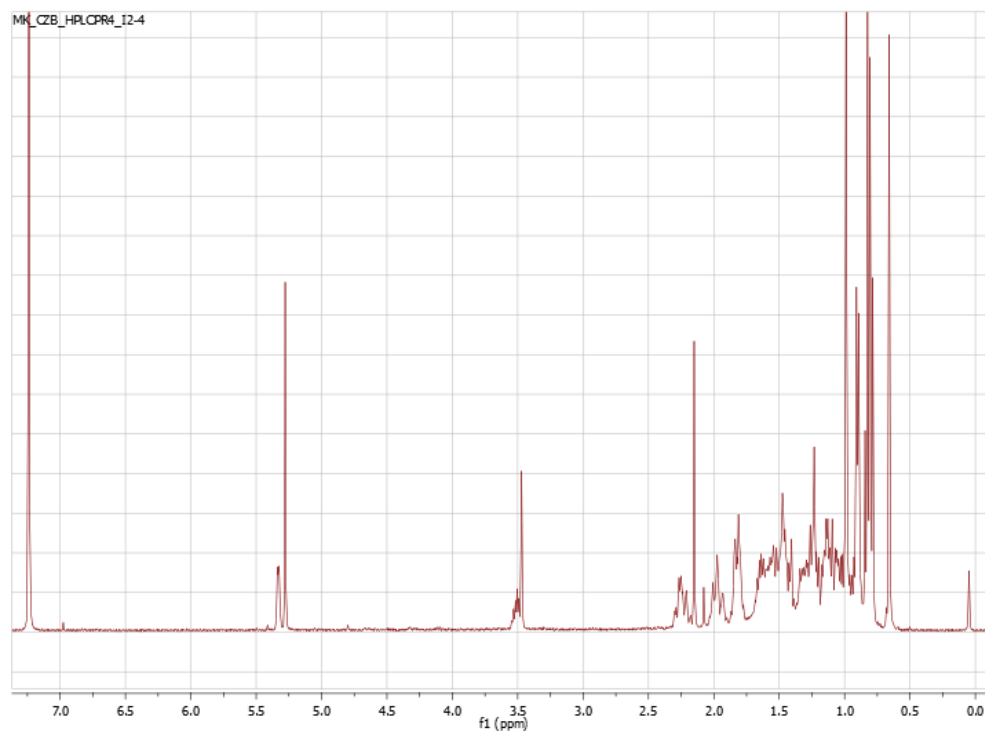
Εικόνα Β. 64. Δομή της β-σιτοστερόλης (μεταβολίτης I2-4)

Ο μεταβολίτης I2-4 ο οποίος απομονώθηκε από το κλάσμα mp1c1_106-108 με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Preparative HPLC), όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.10.1. και ταυτοποιήθηκε ως β-σιτοστερόλη. Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και με σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία.

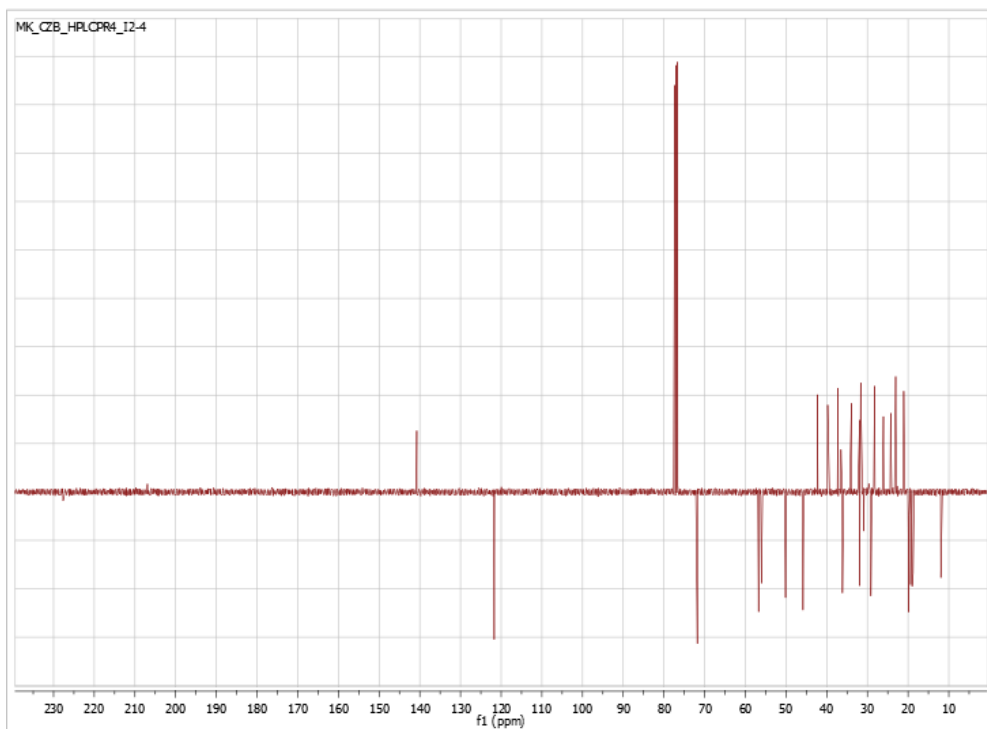
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (βλέπε **Εικ. Β. 67**) παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα της β-σιτοστερόλης, στα οποία περιλαμβάνονται:

- Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζεται μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.50, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο μεθίνιο της θέσης 3.
- Στην ολεφινική περιοχή και συγκεκριμένα στα 5.35 ppm συντονίζεται το μεθινικό πρωτόνιο H-6, του οποίου ο αντίστοιχος άνθρακας (βλέπε **Εικ. Β. 69**, HSQC-DEPT) συντονίζεται σε δ 121.6.
- Στην αλειφατική περιοχή συντονίζονται τα πρωτόνια των μεθυλομάδων και συγκεκριμένα: (i) τα H-18 και H-19 ως απλές κορυφές σε δ 0.66 και 0.99 αντίστοιχα, (ii) τα H-21, H-26 και H-27 ως διπλές σε δ 0.90, 0.83 και 0.79 αντίστοιχα, (iii) τα H-29 ως τριπλή σε δ 0.83.

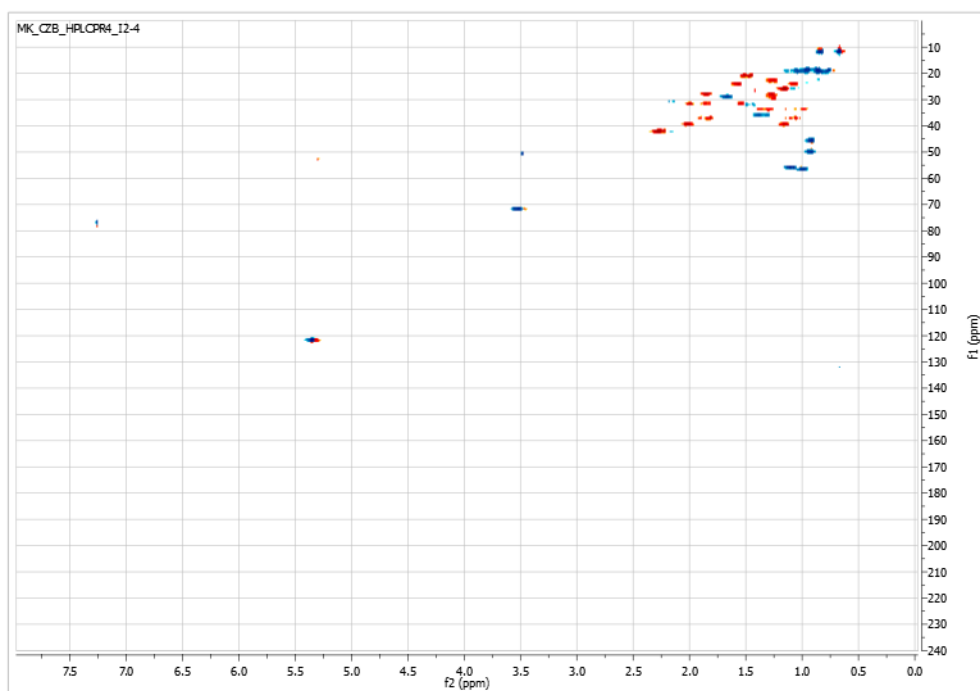
Λαμβάνοντας υπόψιν τα δεδομένα των υπόλοιπων φασμάτων και κυρίως των ετεροπυρηνικών φασμάτων HSQC-DEPT (βλέπε **Εικ. Β. 69**) και HMBC (βλέπε **Εικ. Β. 70**) καταλήξαμε στην ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων και ανθράκων του μορίου όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.



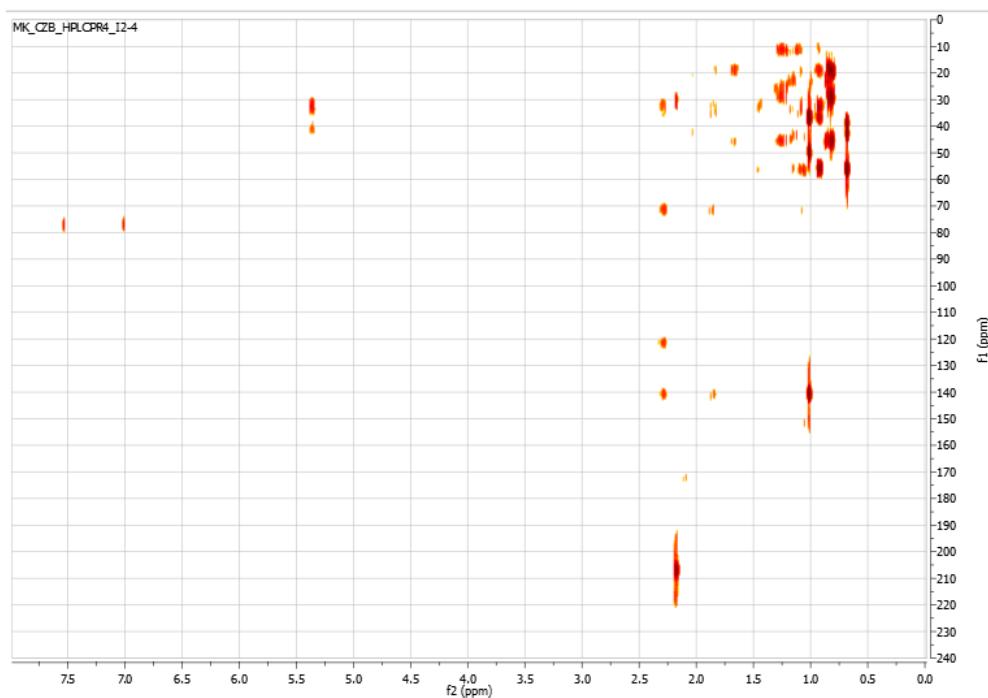
Εικόνα Β. 65. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη 12-4



Εικόνα Β. 67. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του μεταβολίτη 12-4



Εικόνα Β. 66. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 12-4



Εικόνα Β. 68. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 12-4

Πίνακας Β. 37. Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz) του μεταβολίτη 12-4 σε CDCl_3

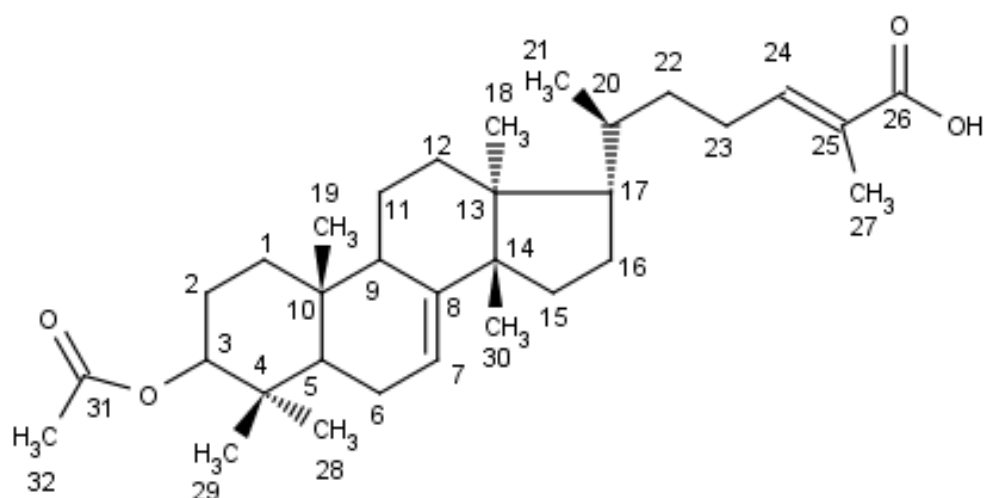
ΘΕΣΗ	$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ ppm, J σε Hz)	$^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , δ ppm)
1	1.08 (1H, m) / 1.81 (1H, *)	36.9
2	1.80 (1H, *) / 1.48 (1H, *)	31.7
3	3.50 (1H, m)	71.6
4	2.31-2.20 (2H, m)	42.2
5	-	140.3
6	5.35 (1H, m)	121.6

8	1.46 (1H, *)	31.7
9	0.90 (1H, m)	50.0
10	-	36.2
11	1.52-1.39 (2H, *)	21.0
12	1.98 (1H, m) / 1.15 (1H, *)	39.6
13	-	42.3
14	0.99 (1H, m)	56.5
15	1.53 (1H, *) / 1.04 (1H, m)	24.2
16	1.79 (1H, m) / 1.24 (1H, *)	28.2
17	1.09 (1H, m)	55.9
18	0.66 (3H, s)	11.9
19	0.99 (3H, s)	19.3
20	1.33 (1H, *)	36.0
21	0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)	18.7
22	1.32 (1H, m) / 1.28 (1H, m)	33.9
23	1.20-1.09 (2H, m)	26.0
24	0.89 (1H, m)	45.6
25	1.63 (1H, *)	29.0

26	0.83 (3H, d, $J = 6.9$)	19.6
27	0.79 (3H, d, $J = 6.9$)	19.1
28	1.32-1.18 (2H, *)	22.8
29	0.83 (3H, t, $J = 7.0$)	12.0

* Αλληλεπικαλυπτόμενα πρωτόνια

Μεταβολίτης F2-7



Εικόνα Β. 69. Δομή του 3-Ο-ακετυλο-μαστιχαδιενολικού οξέος (μεταβολίτης F2-7)

Ο μεταβολίτης F2-7, ο οποίος απομονώθηκε από το κλάσμα mp1c1_106-108 με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Preparative HPLC) όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.10.1., ταυτοποιήθηκε ως 3-Ο-ακετυλομαστιχαδιενολικό οξύ. Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D, ενώ τα φασματοσκοπικά δεδομένα παρουσίασαν μεγάλη ομοιότητα με αυτά του μαστιχαδιενονικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. Β. 72) παρατηρούμε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά σήματα:

- Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται τα πρωτόνια H-24 και H-7 ως μία τριπλή-τετραπλή κορυφή (1H, tq, $J = 7,5 / 1,5$ Hz) και μία σχεδόν τριπλή κορυφή (1H, \sim t, $J = 3,5$ Hz) σε δ 6.06 και 5.23, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται (HSQC, Εικ. Β. 75) στα 147.1 ppm και 117.6 ppm, αντίστοιχα.

- Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος συντονίζονται τα πρωτόνια των 7 μεθυλικών ομάδων της ένωσης, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζει η διπλή κορυφή ($J = 1,5$ Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-27 και εμφανίζεται σε δ 1.91 λόγω της γειννίας με το διπλό δεσμό στις θέσεις 24,25. Επίσης, τα μεθυλικά πρωτόνια H-18, H-19, H-28, H-29 και H-30 εμφανίζονται ως απλές κορυφές σε δ 0.78, 0.74, 0.90, 0.82 και 0.94, αντίστοιχα. Ωστόσο, τα πρωτόνια H-19, H-28 και H-29 εμφανίζονται πιο θωρακισμένα σε σύγκριση με το μαστιχαδιενονικό οξύ, εξαιτίας της απουσίας της καρβονυλομάδας

στη θέση 3. Τέλος, στα 0.87 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή ($J = 6,6$ Hz), η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα H-21, τα οποία παρουσιάζουν ομοπυρηνική σύζευξη (COSY, **Εικ. Β. 73**) με το H-20 (δ 1.38).

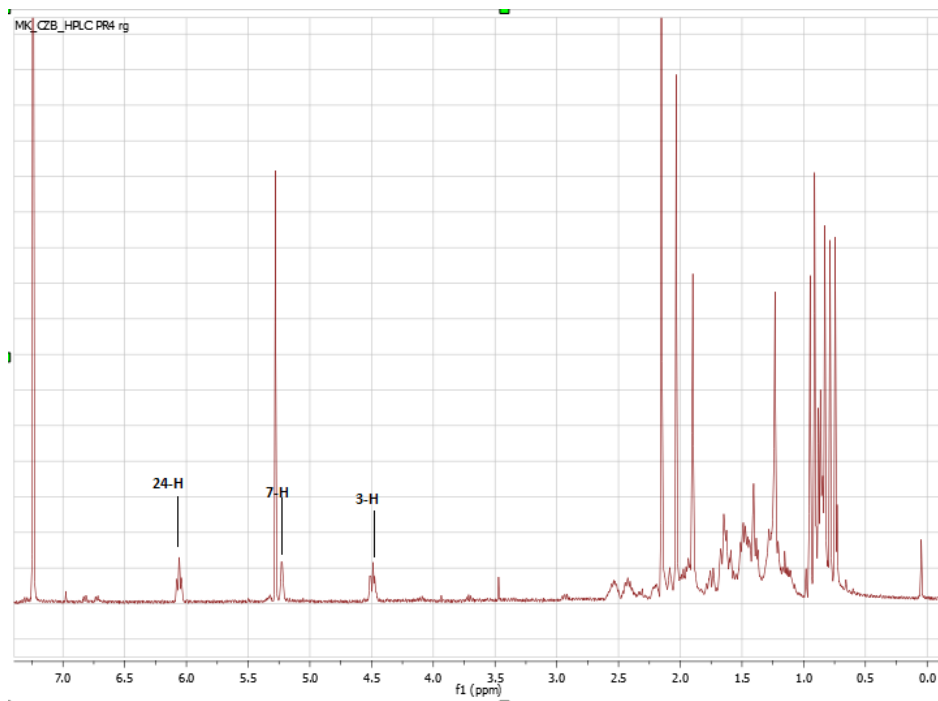
- Τα πρωτόνια της θέσης 2 (δ 1.65 (1H) και 1.20 (1H)) εμφανίζονται σαφέστατα πιο θωρακισμένα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια του μαστιχαδιενονικού οξέος, λόγω της απουσίας του καρβονυλίου της γειτονικής θέσης.

- Τα πρωτόνια της θέσης H-6 συντονίζονται σε δ 2.10 (1H, m) και 1.95 (1H, m), ενώ η αποθωράκισή τους οφείλεται στη γεινίαση με το διπλό δεσμό των θέσεων 7,8.

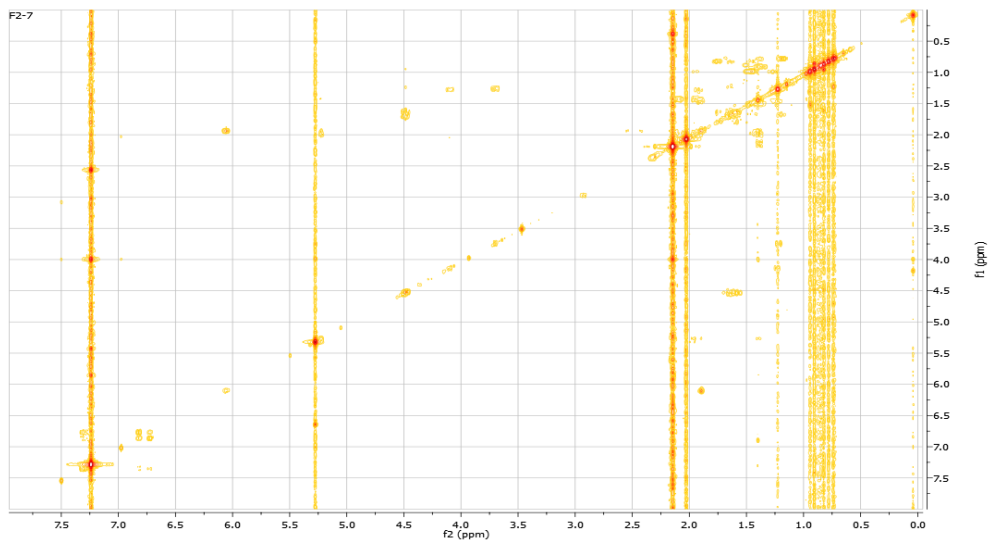
- Σε δ 2.54 (1H, m) και 2.42 (1H, m) συντονίζονται τα πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 23, τα οποία παρουσιάζουν ομοπυρηνικές συζεύξεις (COSY, **Εικ. Β. 73**) τόσο με τα πρωτόνια H-22 όσο και με το ολεφινικό πρωτόνιο H-24.

- Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (**Εικ. Β. 69**) εμφανίζεται μία διπλή διπλής κορυφή ($J = 11.5 / 3.9$), η οποία συντονίζεται σε δ 4.49 και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3. Μάλιστα, η μεγάλη αποθωράκιση του προαναφερόμενου πρωτονίου οφείλεται στην παρουσία ακετόξυ- ομάδας στη συγκεκριμένη θέση, της οποίας τα μεθυλικά πρωτόνια εμφανίζονται ως απλή κορυφή σε δ 2.03.

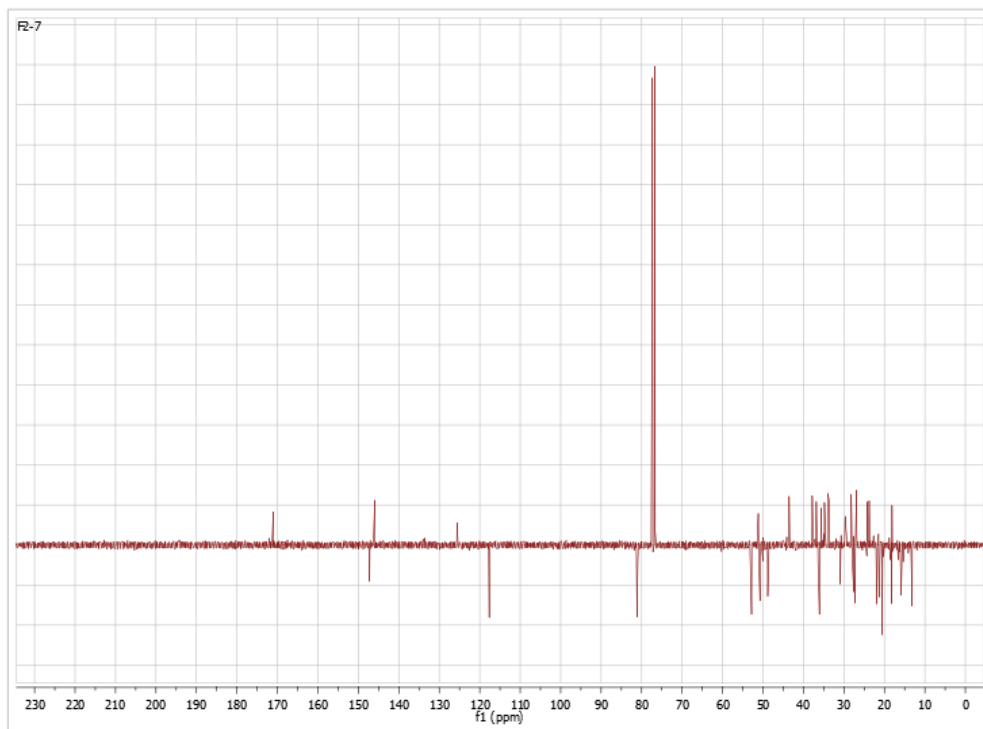
Λαμβάνοντας υπόψιν τα σήματα των ετεροπυρηνικών φασμάτων HSQC-DEPT (**Εικ. Β. 75**) και HMBC (**Εικ. Β. 76**) επιτεύχθηκε η απόδοση όλων των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης (βλέπε τον ακόλουθο πίνακα).



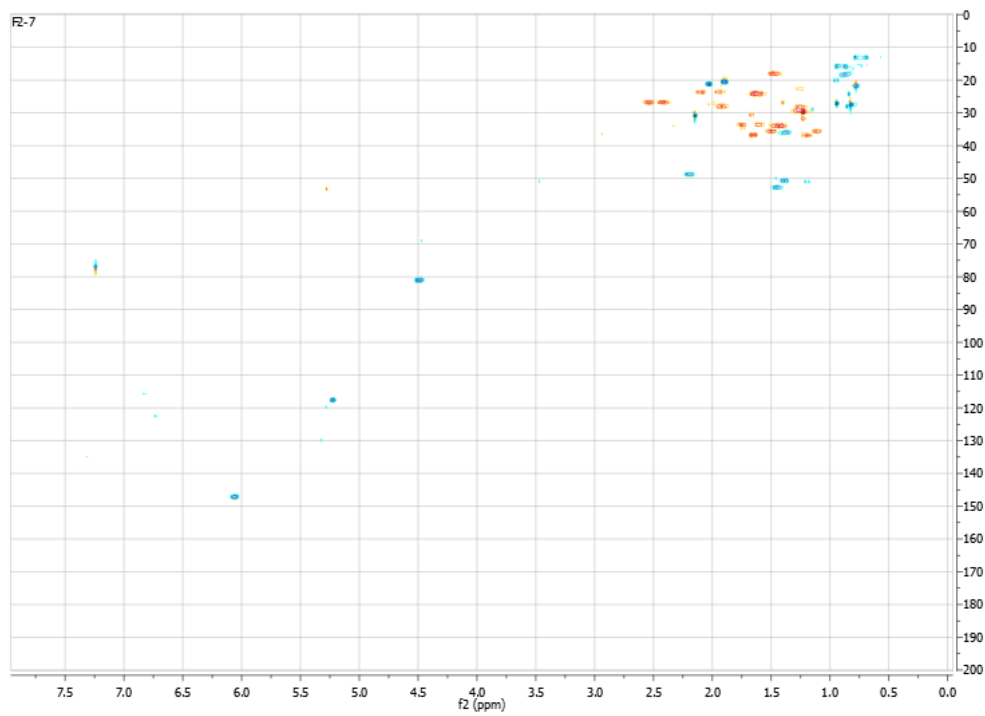
Εικόνα Β. 70. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεταβολίτη F2-7



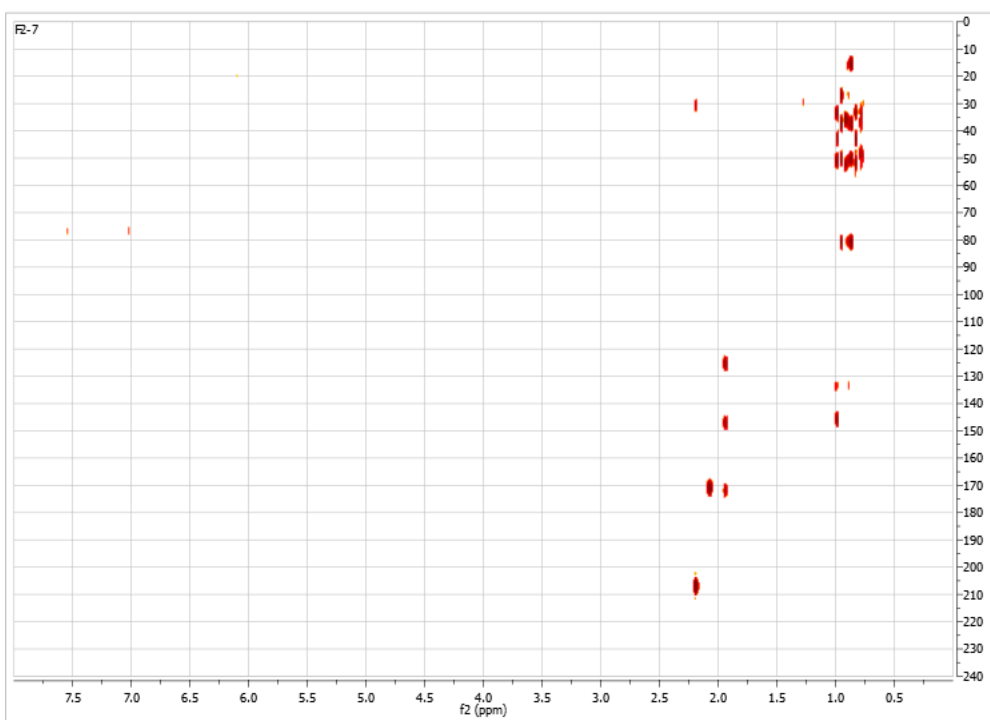
Εικόνα Β. 71. Φάσμα COSY του μεταβολίτη F2-7



Εικόνα Β. 72. Φάσμα ^{13}C -NMR του μεταβολίτη F2-7



Εικόνα Β. 73. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη F2-7



Εικόνα Β. 74. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη F2-7

Πίνακας Β.38. Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz) του μεταβολίτη F2-7 σε CDCl_3

<u>ΘΕΣΗ</u>	<u>$^1\text{H-NMR}$</u> δ (ppm), J (Hz)	<u>$^{13}\text{C-NMR}$</u> δ (ppm)
1	1.50 (*) / 1.11 (1H, m)	35.5
2	1.65 (*) / 1.20 (1H, m)	36.8
3	4.49 (1H, dd, J = 11.5 / 3.9)	81.1
4	-	37.8
5	1.39 (1H, *)	50.8
6	2.10 (1H, *) / 1.95 (1H, *)	23.6
7	5.23 (1H, ~t, J = 3.5)	117.6
8	-	146.2
9	2.19 (1H, m)	48.8
10	-	35.6
11	1.48 (2H, m)	18.0
12	1.78 (1H, m) / 1.60 (1H, *)	32.3
13	-	43.2
14	-	50.9
15	1.46 (1H, *) / 1.42 (1H, *)	33.7
16	1.91 (2H, m)	28.1
17	1.45 (1H, *)	52.6
18	0.78 (3H, s)	21.8

19	0.74 (3H, s)	12.9
20	1.38 (1H, *)	36.0
21	0.87 (3H, d, $J = 6.6$)	18.3
22	1.50 (1H, *) / 1.11 (1H, m)	35.6
23	2.54 (1H, m) / 2.42 (1H, m)	26.7
24	6.06 (1H, tq, $J = 7.5 / 1,5\text{Hz}$)	147.1
25	-	125.4
26	-	172.5
27	1.90 (3H, d, $J = 1.5$)	20.4
28	0.90 (3H, s)	15.6
29	0.82 (3H, s)	27.5
30	0.94 (3H, s)	27.1
31	-	171.3
32	2.03 (3H, s)	21.1

* Αλληλεπικαλυπτόμενα πρωτόνια

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, καταβλήθηκε μία συστηματική προσπάθεια αξιοποίησης των υποπροϊόντων καλλιέργειας (καρποί) του φυτού *Pistacia lentiscus* var. *chia*. και μεταποίησης της ρητίνης για την παραγωγή μαστίχας α'-ποιότητας και αιθέριου ελαίου (κολοφώνιο, ακάθαρτη μαστίχα ή μαστίχα β'-ποιότητας) για την παραγωγή εκχυλισμάτων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία του κολοφωνίου. Αρχικά διερευνήθηκε ο βέλτιστος τρόπος εκχύλισης του κολοφωνίου προκειμένου να επιτευχθεί η απομάκρυνση του πολυμερούς. Έπειτα, επιλέγοντας την πράσινη τεχνική της εκχύλισης με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, καθώς και τη φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής, ερευνήθηκαν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για την παραλαβή ενός εκχυλίσματος πλούσιου σε τερπενικό φορτίο και με το όσο δυνατό λιγότερο πολυμερές. Στη συνέχεια, επιτεύχθη η ενσωμάτωση του παραγόμενου εκχυλίσματος (κολοφώνιο χωρίς πολυμερές) σε ελαιόλαδο με τη χρήση μικροκυμάτων, ώστε να δημιουργηθεί ένα προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας. Συμπερασματικά, εκτός από το αιθέριο έλαιο της μαστίχας, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί εμπορικά και το κολοφώνιο καθώς παρέχει εκχυλίσματα πλούσια σε τερπένια και άλλα βιοδραστικά συστατικά στα οποία οφείλονται οι θεραπευτικές δράσεις της μαστίχας.

Στο δεύτερο μέρος, πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία της ακάθαρτης μαστίχας. Προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα αξιοποίησής της ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία με αυτή του πρώτου μέρους σε ήμι-παρασκευαστική κλίμακα. Διεξήχθη εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα σε συγκεκριμένες συνθήκες (αντίστοιχες αυτών της εκχύλισης της μαστίχας) κι έπειτα αξιολογήθηκε το παραληφθέν εκχύλισμα ως προς την περιεκτικότητά του σε πολυμερές και τερπένια με τη χρήση φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής. Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ακάθαρτη μαστίχα όχι μόνο δεν πρέπει να απορρίπτεται κατά τη διαδικασία της διαλογής της μαστίχας αλλά είναι δυνατό να αξιοποιηθεί (όπως και το κολοφώνιο) για την ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων, όπως είναι τα εμπλουτισμένα ελαιόλαδα και τα ελαιώδη παρασκευάσματα με επουλωτικές ιδιότητες

Στο τρίτο μέρος υλοποιήθηκε η φυτοχημική ανάλυση στους καρπούς, προκειμένου να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν ενώσεις με βιολογική δράση. Μέσω μιας σειράς χρωματογραφικών τεχνικών (φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε αναλυτική και παρασκευαστική κλίμακα, υγρή χρωματογραφία μέσης

πίεσης) απομονώθηκαν ενώσεις από κλάσματα με σημαντική αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση. Οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν ήταν το 24-Z μαστιχαδιενονικό οξύ, το 24-Z ισομαστιχαδιενονικό οξύ, το 6β-υδροξυ-ολεανολικό οξύ, η β-σιτοστερόλη και το 3-O-ακετυλο-μαστιχαδιενολικό οξύ.

Συμπερασματικά, η επεξεργασία των καρπών του μαστιχόδεντρου προμηνύεται πολλά υποσχόμενη λόγω τόσο των ενώσεων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, όσο και των βιολογικών δράσεων που έδειξαν τα κλάσματα από τα οποία απομονώθηκαν.

Στη συνέχεια, αναμένεται να ολοκληρωθεί ο πειραματικός σχεδιασμός στην εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό και να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες ώστε να παραληφθεί ένα εκχύλισμα με το μεγαλύτερο ποσοστό τερπενίων στη μέγιστη απόδοση. Στη συνέχεια, οι επιλεγμένες βέλτιστες συνθήκες θα εφαρμοσθούν σε πιλοτική κλίμακα προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσο είναι εφικτή η ουσιαστική αξιοποίηση τόσο του κολοφωνίου, όσο και της ακάθαρτης μαστίχας σε μεγάλη κλίμακα. Επίσης, όσον αφορά στην παρασκευή του ελαιόλαδου πλούσιου σε τερπένια, αναμένεται η εύρεση της μέγιστης ποσότητας κολοφωνίου με και χωρίς πολυμερές η οποία μπορεί να ενσωματωθεί στο ελαιόλαδο χωρίς να επηρεαστούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Τέλος, τα παραγόμενα ελαιώδη παρασκευάσματα θα αξιολογηθούν με *in vivo* πειράματα ως προς τη φαρμακολογική τους αξία.

Επιπρόσθετα, σχετικά με τους καρπούς, περαιτέρω βιοκατευθυνόμενη φυτοχημική ανάλυση είναι αναγκαία προκειμένου να απομονωθούν και να αξιοποιηθούν μεταβολίτες με σημαντική βιολογική δράση. Παράλληλα, θα επιδιωχθεί η επανάληψη της διαδικασίας σε μεγάλη κλίμακα προκειμένου να προκύψουν εκχυλίσματα/κλάσματα/μεταβολίτες σε μεγαλύτερες ποσότητες. Τέλος, στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος EXANDAS, θα επιδιωχθεί η αξιολόγηση της αντιγηραντικής δράση των κλασμάτων/ενώσεων, καθώς και η αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση των απομονωμένων μεταβολιτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bozorgi, M. *et al.* Five pistacia species (P. vera, P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk, and P. lentiscus): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *Sci. World J.* **2013**, (2013).
2. Paraschos, S., Mitakou, S. & Skaltsounis, A. L. Chios Gum Mastic: A Review of its Biological Activities. *Curr. Med. Chem.* **19**, 2292–2302 (2012).
3. Σαββίδης Θ. *Το μαστιχόδεντρο της Χίου.* (2000).
4. Παράσχος Σ. Φυτοχημική και Φαρμακολογική Μελέτη της Μαστίχας Χίου. **66**, (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010).
5. Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου. www.gummastic.gr/el/.
6. Ζαχαρόπουλος Κ., Μ. Η. *Το βιβλίο της μαστίχας.* **1**, (2007).
7. Dioscurides. *THE GREEK HERBAL OF Dioscorides. The American Journal of the Medical Sciences* **188**, (1934).
8. European Medicines Agency. Assessment report on Pistacia lentiscus L., resin (mastix). **44**, (2015).
9. Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.-L., Chinou, I. B. & Mitaku, S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. *Planta Med.* **65**, 749–752 (1999).
10. Aksoy, A., Duran, N. & Koksali, F. In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against Streptococcus mutans and mutans streptococci. *Arch. Oral Biol.* **51**, 476–481 (2006).
11. Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergentanis, T. N., Protopapa, E. & Tsaknis, J. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 43–49 (2007).

12. Loizou, S. *et al.* Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **234**, 553–561 (2009).
13. Giaginis, C. & Theocharis, S. Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios Mastic Gum. *Nutr. Cancer* **63**, 1174–1184 (2011).
14. Assimopoulou, A. N. & Papageorgiou, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part II. Pistacia terebinthus var. Chia. *Biomed. Chromatogr.* **19**, 586–605 (2005).
15. Van Den Berg, K. J., Van Der Horst, J., Boon, J. J. & Sudmeijer, O. O. Cis-1,4-poly-??-myrcene; The structure of the polymeric fraction of mastic resin (Pistacia lentiscus L.) elucidated. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2645–2648 (1998).
16. Mayo, D. Seoane : 802. Further Crystalline Constituents. 4158–4160 (1954).
17. Papageorgiou, V. P., Bakola-Christianopoulou, M. N., Apazidou, K. K. & Psarros, E. E. Gas chromatographic mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum (vol 769, pg 263, 1997). *J. Chromatogr. a* **831**, 333 (1999).
18. Paraschos, S. *et al.* In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against Helicobacter pylori In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against Helicobacter pylori \square . (2007). doi:10.1128/AAC.00642-06
19. Barton, D. H. R. & Seoane, E. Triterpenoids. Part XXII The Constitution and Stereochemistry of Masticadienonic Acid. *J. Chem. Soc.* 4150–4157 (1956).
20. Gao, J. B. *et al.* A new tetracyclic triterpenoid compound from Mastich. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **15**, 400–403 (2013).
21. Boar, R. B., Couchman, L. A., Jaques, A. J. & Perkins, M. J. Isolation from Pistacia resins of a bicyclic triterpenoid representing an apparent trapped intermediate of squalene 2,3-epoxide

- cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2476–2477 (1984).
22. Marner, F. J., Freyer, A. & Lex, J. Triterpenoids from gum mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. *Phytochemistry* **30**, 3709–3712 (1991).
 23. Tassou, C. C. & Nychas, G. J. E. Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chia) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in Model Food System. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **36**, 411–420 (1995).
 24. Magkouta, S. *et al.* Protective Effects of Mastic Oil From *Pistacia Lentiscus* Variation Chia Against Experimental Growth of Lewis Lung Carcinoma. *Nutr. Cancer* **61**, 640–648 (2009).
 25. Moulos, P. *et al.* A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med. Genomics* **2**, 1–15 (2009).
 26. Boelens, M. H. & Jimenez, R. Chemical composition of the essential oils from the gum and from various parts of *Pistacia lentiscus* l. (mastic gum tree). *Flavour Fragr. J.* **6**, 271–275 (1991).
 27. Daferera, D., Pappas, C., Tarantilis, P. a & Polissiou, M. Quantitative analysis of α -pinene and β -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. **77**, 511–515 (2002).
 28. Koutsoudaki, C., Krsek, M. & Rodger, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7681–7685 (2005).
 29. Figueiredo, C., Barroso, J., Pedro, L. & Scheeffer, J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* **22**, 206–213 (2007).
 30. Xynos, N., Termentzi, A., Fokialakis, N., Skaltsounis, L. A. & Aligiannis, N. Supercritical CO₂ extraction of mastic gum and chemical characterization of bioactive fractions using LC-HRMS/MS and GC-MS. *J. Supercrit. Fluids* **133**, 349–356 (2018).

31. Paraschos, S. *et al.* Chemical investigation and antimicrobial properties of mastic water and its major constituents. *Food Chem.* **129**, 907–911 (2011).
32. Remila, S. *et al.* Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur. J. Integr. Med.* **7**, 274–286 (2015).
33. Mehenni, C. *et al.* Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *J. Food Drug Anal.* **24**, 653–669 (2016).
34. Bhourri, W. *et al.* Digallic acid from *Pistascia lentiscus* fruits induces apoptosis and enhances antioxidant activities. *Phyther. Res.* **26**, 387–391 (2012).
35. Bhourri, W. *et al.* Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol. Vitr.* **24**, 509–515 (2010).
36. Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M. & Stocker, P. Determination of the fatty acid composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in algeria. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 921–924 (2008).
37. Ben Khedir, S. *et al.* In Vivo Evaluation of the Anti-Inflammatory Effect of *Pistacia lentiscus* Fruit Oil and Its Effects on Oxidative Stress. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2016**, 6108203 (2016).
38. Bampouli, A. *et al.* Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC-HRMS. *J. Food Eng.* **167**, 25–31 (2015).
39. Dahmoune, F. *et al.* *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* **61**, 31–40 (2014).
40. Duru, M. E. *et al.* Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* **74**, 170–176 (2003).

41. Mamata Mukhopadhyay. *Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide*. (2000).
42. Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A. & Porcedda, S. Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour Fragr. J.* **17**, 239–244 (2002).
43. Sodeifian, G., Ghorbandoost, S., Sajadian, S. A. & Saadati Ardestani, N. Extraction of oil from *Pistacia khinjuk* using supercritical carbon dioxide: Experimental and modeling. *J. Supercrit. Fluids* **110**, 265–274 (2016).
44. Alain P. Foucault. *Centrifugal partition chromatography*. (1995). doi:10.2174/1570193X14666170518151027
45. Poole, C. F. C F Poole , Wayne State University, Detroit, MI, USA & 2005,. 66–77 (2005).
46. Sarker Satyajit D., Latif Zahid, G. A. I. *Natural Products Isolation*.
47. Χατζηιωάννου Θ.Π. *Ενόργανη Ανάλυση*. **176**, (2010).
48. Baghdikian, B. *et al.* Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and comparison with conventional solvent extraction methods. *Comptes Rendus Chim.* **19**, 692–698 (2016).
49. Bampouli, A. *et al.* Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **1**, 81–91 (2014).
50. Kuo, C. H. *et al.* Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Polygonum cuspidatum*. *Molecules* **19**, 67–77 (2013).
51. Corlay, N. *et al.* Antibacterial Labdane Diterpenoids from *Vitex vestita*. *J. Nat. Prod.* **78**, 1348–1356 (2015).
52. Salea, R., Veriansyah, B. & Tjandrawinata, R. R. Optimization and

- scale-up process for supercritical fluids extraction of ginger oil from *Zingiber officinale* var. *Amarum*. *J. Supercrit. Fluids* **120**, 285–294 (2016).
53. Senyay-Oncel, D., Ertas, H. & Yesil-Celiktas, O. Effects of supercritical fluid extraction parameters on unsaturated fatty acid yields of pistacia terebinthus berries. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **88**, 1061–1069 (2011).
54. Xynos, N. *et al.* Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.* **122**, 323–330 (2014).
55. Assimopoulou, A. N., Zlatanov, S. N. & Papageorgiou, V. P. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chem.* **92**, 721–727 (2005).
56. Camacho, M. D. R. *et al.* Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med.* **66**, 463–468 (2000).
57. Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R. & Kunert, O. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **41**, 636–638 (2003).