

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ.
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Κατεύθυνση: Μελέτη & Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΑΛΚΟΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΗΤΙΝΗΣ
ΧΑΛΕΠΙΑΣ ΠΕΥΚΗΣ (*PINUS HALEPENSIS*)»**



ΝΑΤΣΗ Θ.ΙΡΕΝΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ.
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Κατεύθυνση: Μελέτη & Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΑΛΚΟΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΗΤΙΝΗΣ
ΧΑΛΕΠΙΑΣ ΠΕΥΚΗΣ (*PINUS HALEPENSIS*)»**

ΝΑΤΣΗ Θ.ΙΡΕΝΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ.
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Κατεύθυνση: Μελέτη & Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟΑΛΚΟΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΗΤΙΝΗΣ
ΧΑΛΕΠΙΑΣ ΠΕΥΚΗΣ (*PINUS HALEPENSIS*)»**

ΝΑΤΣΗ Θ.ΙΡΕΝΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων: Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη: Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2018

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Ανθρώπου και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Γενικής Χημείας, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου με κατεύθυνση Μελέτη & Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον επιβλέποντα καθηγητή, της παρούσας διπλωματικής, τον κ. Χ. Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή, τόσο για το αξιόλογο και πολύ ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε, όσο και για την αμέριστη υποστήριξη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ευγενική και οικεία στάση του. Ειδικότερα, με την εμπιστοσύνη και την επιστημονική του καθοδήγηση συνέβαλε σε μεγάλο βαθμό στην αποπεράτωση της ερευνητικής μου εργασίας. Παρά το πλήθος των επιστημονικών του ανειλημμένων υποχρεώσεων, ήταν πρόθυμος να αφιερώσει χρόνο, παρέχοντας χρήσιμες συμβουλές για την επιτυχή έκβαση και ρύθμιση διαφόρων θεμάτων. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Πέτρο Ταραντίλη, για την προσφορά οποιασδήποτε βοήθειας κι αν χρειάστηκα, και την κ. Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Δήμητρα Δαφερέρα, μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού για τη διαρκή και υπομονετική της επίβλεψη καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια της στο σύνολο της προσπάθειας μου.

Την ευχαριστώ για το ενδιαφέρον που επέδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές της και το χρόνο που αφιέρωσε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω σε όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος που μας μετέδωσαν τις γνώσεις τους και μας βοήθησαν να εμβαθύνουμε σε θέματα που αφορούν την επιστήμη που επιλέξαμε, όπως και στο προσωπικό του Εργαστηρίου Χημείας.

Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους, για τις στιγμές γέλιου που περάσαμε και ιδιαίτερα την συνάδελφο Καπαράκου Ελευθερία που ξεκινήσαμε μαζί αυτή την πορεία και μοιραστήκαμε προβληματισμούς προσφέροντας η μία στην άλλη ότι μπορούσε από τις γνώσεις της, καθώς και τις υποψήφιες διδάκτορες Ελένη Κακούρη, Λυδία Βαλάση και Νεφέλη-Σοφία Σωτηροπούλου, για την πολύτιμη βοήθεια τους σε ότι και αν χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου που όλα αυτά τα χρόνια ήταν δίπλα μου στηρίζοντάς με, με κάθε τρόπο, με το να με εμπυχώνουν και να μου δίνουν κουράγιο, την αδερφή μου που χάρη στην προτροπή της έδωσα εξετάσεις στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και τον Μάνο Γαλανό για την πολύτιμη βοήθεια του καθώς και την ψυχολογική του στήριξη.

IPENA Θ. ΝΑΤΣΗ

Αθήνα, Οκτώβριος 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρητίνη αποτελεί ένα δευτερογενές δασικό προϊόν με ιδιαίτερη οικονομική σημασία. Η έρευνα των συστατικών της ρητίνης αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών λόγω της ευρείας χρήσης σε σημαντικό αριθμό βιομηχανιών(αρωματοποιίας, φαρμακοποιίας, βιομηχανίας χρωμάτων, κ.λπ.) Η παραγωγή της προέρχεται από διάφορα είδη κωνοφόρων δέντρων. Στην Ελλάδα τα είδη που ρητινεύονται είναι αυτά της χαλέπιας, της τραχείας και της μαύρης πεύκης, με τη χαλέπιο να αποτελεί το κύριο ρητινοπαραγωγό είδος.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν α) ο προσδιορισμός της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης του αιθέριου ελαίου της ρητίνης *Pinus halepensis* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας(Χαλκιδική, Βορεια και Κεντρική Εύβοια και Μέγαρα) με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών ενόργανων αναλύσεων όπως η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομέτρο μάζας (GC-MS) και η φασματοσκοπία υπερύθρου με μεταχρισμό Fourier καθώς και Raman, τέλος εξετάστηκε και ως προς το περιεχόμενο του σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folin Ciocalteu β) μελέτη των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης(Πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου) ως προς τη χημική τους σύσταση, ως συνέπεια της προσθήκης σε αυτά ποσότητας ρητίνης *Pinus halepensis*. Τα υδροαλκοολικά αυτά εκχυλίσματα ρητίνης εξετάστηκαν ως προς το περιεχόμενο σε πτητικά συστατικά τα οποία μεταφέρθηκαν από το αιθέριο έλαιο της ρητίνης και λήφθηκαν με τη μέθοδο της απλής εκχύλισης και τη χρήση οργανικού διαλύτη και συγκεκριμένα του εξανίου(εκχύλισμα εξανίου). Η ανάλυση του πτητικού κλάσματος των πρότυπων διαλυμάτων προσομοίωσης οίνου έγινε με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS).

Ακόμη, τα πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου μετά την απομάκρυνση του πτητικού κλάσματος εξετάστηκαν ως προς το περιεχόμενο τους σε ρητινικά οξέα (διτερπενικά οξέα) τα οποία πιθανόν να μεταφέρθηκαν από το στερεό τμήμα της ρητίνης το κολοφώνιο. Η ανάλυση έγινε αρχικά με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού για τον προσδιορισμό των μεγίστων απορροφήσεων των συγκεκριμένων ενώσεων και στη συνέχεια με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD).

Αρχικά γίνεται εκτενής βιβλιογραφική αναφορά στο είδος *Pinus halepensis* και στους δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύονται στο είδος αυτό. Επίσης, περιγράφονται οι τρόποι παραλαβής των δευτερογενών αυτών μεταβολιτών και αναφέρονται οι μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφεται το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και η προέλευση του, καθώς και η τεχνική παραλαβής του αιθέριου ελαίου από αυτό με απόσταξη σε συσκευή Clevenger. Η ανάλυση του έγινε με αέρια χρωματογραφία GC-MS, υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier και φασματοσκοπία Raman, ενώ μελετήθηκε ακόμα και ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου στα οποία προστέθηκε ποσότητα ρητίνης και εκχύλιστηκαν με οργανικό διαλύτη εξανίου. Τα πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου καθώς και τα εκχυλίσματα εξανίου εξετάστηκαν ως προς τη χημική τους σύσταση με αναλύσεις GC-MS και HPLC-DAD.

Τα αιθέρια έλαια ρητίνης *Pinus halepensis* αποτελούνται κυρίως από μονοτερπένια και οξυγονούχα μονοτερπένια ανεξάρτητα από την περιοχή συλλογής της ρητίνης.

Τα αιθέρια έλαια είχαν χαμηλή περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά και επομένως δεν παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης τους με GC-MS καθώς σύμφωνα με τη χημική τους σύσταση δεν εντοπίστηκαν φαινολικές ενώσεις. Τα εκχυλίσματα εξανίου εμφάνισαν υψηλή περιεκτικότητα σε συστατικά τα οποία αποτελούνταν κυρίως από μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, παράγωγα ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλες αλειφατικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Τέλος, τα πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου τα οποία μετά την απομάκρυνση του πτητικού κλασματος εξετάστηκαν για την παρουσία ρητινικών οξέων, τα αποτελέσματα της ανάλυσης τους με HPLC-DAD δεν έδειξαν την παρουσία αυτών των ενώσεων στα πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου, λόγω όμως έλλειψης προτύπων ενώσεων ρητινικών οξέων απαιτείται περαιτέρω ανάλυση για επιβεβαίωση.

Εργαστήριο Χημείας του Γ.Π.Α.
Οκτώβριος, 2018

Λέξεις κλειδιά

Ρητίνη, πεύκο, υδροαπόσταξη, αιθέριο έλαιο, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, FT-IR, Raman, α-πινένιο, μέθοδος Folin Ciocalteu

**«Study of chemical composition and antioxidant activity of hydroalcoholic
extracts of pine resin of *Pinus halepensis*»**

ABSTRACT

Resin is a secondary forest product of particular economic importance. The research of resin components has been studied by many researchers due to the wide use in a broad range of industries (perfumery, pharmacy, paint industry, etc.). Its production comes from various types of coniferous trees. In Greece, the varieties that are being exploited for resin production are those of Aleppo, Trachea and Black Pine, with the Aleppo being the main resin producer species.

The purpose of the present research was a) to determine the qualitative and quantitative composition of the essential oil of *Pinus halepensis* resin from various regions of Greece (Halkidiki, North and Central Evia and Megara) using modern instrumental techniques such as gas chromatography with mass spectrometer (GC-MS) and infrared spectroscopy with Fourier and Raman transitions and was also examined for its content of total phenolic components by the Folin Ciocalteu method. b) the study of hydroalcoholic extracts (Standard Wine Sample Solutions) in terms of their chemical composition, as a consequence of adding to them quantities of *Pinus halepensis* resin. These hydroalcoholic resin extracts were tested for the content of volatile components which were transferred from the resin's essential oil and obtained by the simple extraction method with the use of an organic solvent and in particular hexane (hexane extract). Volatile fraction analysis of standard wine simulating solutions was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Furthermore, standard wine simulation solutions after removal of the volatile fraction were tested for their content in resin acids (diterpenic acids) which were likely to be transferred from the solid part of the resin, which is the rosin. Initial analysis was

performed using an ultraviolet-visible spectrophotometer to determine the maximum absorbances of the particular compounds followed by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD).

Initially, an extensive bibliographic reference is made to *Pinus halepensis* species and to the secondary metabolites detected in this species. Also the various ways in which these secondary metabolites are received and the methods of instrumental analysis used for the separation and identification of these metabolites are described.

The experimental part describes the plant material used and its origin, as well as the technique of obtaining the essential oil from it, by distillation on a Clevenger device. Its analysis was done by GC-MS gas chromatography, Fourier transformation infrared spectroscopy and Raman spectroscopy, while it was studied in terms of total phenolic content by the Folin Ciocalteu method. Standard wine simulation solutions were prepared in which a quantity of resin was added and extracted with hexane, an organic solvent. Standard wine simulation solutions as well as hexane extracts were tested for their chemical composition by GC-MS and HPLC-DAD analysis.

Pinus halepensis resin essential oils consist mainly of monoterpene and oxygenated monoterpenes, regardless of the resin collection area. The essential oils had a low content of total phenolic components and therefore did not show significant antioxidant activity. These results were also confirmed by the results of their GC-MS analysis as no phenolic compounds were found according to their chemical composition. The hexane extracts showed a high content of ingredients which consisted mainly of monoterpenes, sesquiterpenes, naphthalene and benzene derivatives as well as other low molecular weight aliphatic compounds. Finally, the results of the analysis of the standard wine solutions, tested by HPLC-DAD for the

presence of resin acids, after the removal of the volatile fraction did not show the presence of these compounds, but due to the lack of standard resin acid compounds, further analysis is needed.

Chemistry Lab of A.U.A.
October, 2018

Keywords

Resin, pinus, hydrodistillation, essential oil, Extraction with organic solvent, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, , High performance Liquid Chromatography, FT-IR, Raman, α -pinene, Folin Ciocalteu method

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	ix
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Χαλέπιος Πεύκη (<i>Pinus halepensis</i> Mill.).....	1
1.1.1 Οικονομική σημασία του είδους	8
1.2 Ρητίνη της χαλέπιας πεύκης.....	9
1.2.1 Γενικά.....	9
1.2.2 Συλλογή της ρητίνης.....	10
1.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της ρητίνης.....	12
1.2.4 Χρήσεις της ρητίνης	14
1.3 Αιθέρια ελαια.....	16
1.3.1 Προέλευση και φυσικές ιδιότητες αιθερίων ελαίων	16
1.3.2 Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων	18
1.3.3 Παράγοντες διαφοροποίησης της σύστασης των αιθερίων ελαίων	22
1.3.4 Αιθέριο έλαιο (τερεβινθέλαιο) ρητίνης Χαλέπιας πεύκης.....	24
1.3.5 Βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου της ρητίνης του <i>Pinus Halepensis</i> και οι χρήσεις του	26
1.3.6 Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου (τερεβινθελαίου) ρητίνης της χαλέπιας πεύκης. .	29
1.3.7 Κολοφώνιο	34
1.4 Αναλυση αιθεριου ελαιου.....	39
1.4.1 Τρόποι παραλαβής.....	39
1.4.2 Απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation, SD), με χρήση συσκευής Clevenger	41

2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	
ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΗΣ ΧΑΛΕΠΙΟΥ ΠΕΥΚΗΣ.....	43
2.1 Αρχές Αέριας Χρωματογραφίας (Gas Chromatography)	45
2.1.1 Ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων	48
2.1.2 Δείκτης συγκράτησης (RI)	52
2.1.3 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου	54
2.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου	55
2.2.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier, (Fourier Transform Infrared, FTIR)	59
2.2.2 Φάσματα IR Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR).....	61
2.3 Φασματοσκοπία Raman	63
2.4 Αιθέρια Έλαια και Αντιοξειδωτική Ικανότητα	66
2.4.1 Μέθοδος μέτρησης φαινολικών συστατικών- Folin-Ciocalteu (FC).....	68
2.5 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού Φωτός (UV-Vis)	70
2.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	71
Σκοπός μελέτης	76
3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
Υλικά-Συσκευές-Μέθοδοι.....	80
3.1 Φυτικό υλικό	80
3.2 Απομόνωση, παραλαβή και μελέτη της χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i>	81
3.2.1 Παραλαβή αιθερίου ελαίου με συσκευή Clevenger	82
3.2.2 Παραλαβή των αιθερίων ελαίων	84
3.2.3 Συμπεράσματα	86

3.2.4 Προετοιμασία αιθέριων ελαίων για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS).....	87
3.2.5 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος δωδεκανίου	87
3.2.6 Προετοιμασία αιθέριων ελαίων	87
3.2.7 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αιθέριων ελαίων ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS).....	88
3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	91
3.3.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρητίνης του είδους <i>Pinus halepensis</i>	91
3.3.2 Συζήτηση.....	101
3.3.3 Συμπεράσματα	103
3.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu του αιθερίου ελαίου ρητίνης	105
3.4.1 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών	105
3.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση	108
3.5.1 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης καφεϊκού οξέος (Folin Ciocalteu)	108
3.5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης αιθέριων ελαίων ρητίνης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	109
3.5.3 Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	111
3.6 Ανάλυση των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> με φασματοσκοπία FT-IR	113
3.6.1 Αποτελέσματα-Συζήτηση	115
3.7 Ανάλυση των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> με φασματοσκοπία RAMAN	120
3.7.1 Αποτελέσματα-Συζήτηση	121
3.8 Συμπεράσματα	125

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΡΟΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ (ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΟΙΝΟΥ-ΠΑΠΟ) ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΗΣ ΧΑΛΕΠΙΑΣ ΠΕΥΚΗΣ.....	126
Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Πρότυπες ενώσεις	126
4.1 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος προσομοίωσης οίνου-ΠΑΠΟ (Model Wine).....	126
4.1.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων ΠΑΠΟ	127
4.1.2 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη.....	127
4.1.3 Μελέτη των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΑΠΟ	129
4.1.4 Προετοιμασία εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΑΠΟ για ανάλυση με.....	130
GC-MS	130
4.1.5 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΑΠΟ με GC-MS.....	130
4.2.1 Ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΑΠΟ με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS).....	131
4.2.2 Πτητικά συστατικά των εκχυλισμάτων κανονικού εξανίου των ΠΑΠΟ	132
4.2.3 Πτητικά συστατικά των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΑΠΟ μετά από παραμονή σε ΠΑΠΟ ποσότητας ρητίνης για 12 ημέρες.....	147
4.3 Συμπεράσματα.....	155
4.4 Ανάλυση υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (ΠΑΠΟ) με υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανεστραμμένης Φάσης (HPLC-RP)	156
Ανάλυση HPLC-DAD	156
4.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση	159
4.5.1 Αποτελέσματα της ανάλυσης των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (ΠΑΠΟ) με (HPLC-DAD).....	159
4.6 Συμπεράσματα	176
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	178

I.	Κατάλογος Συντημήσεων.....	178
II.	Αερια Χρωματογραφήματα	179
III.	Φάσματα FT-IR αιθερίων ελαίων ρητίνης <i>Pinus halepensis</i>	185
IV.	Φάσματα RAMAN αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i>	187
V.	Πίνακας Δομών Κυριοτέρων Συστατικών.....	190
VI.	Χρωματογραφήματα HPLC/DAD	191
VII.	Φάσματα UV-Vis.....	201
VIII.	Κατάλογος Εικόνων	203
IX.	Κατάλογος Πινάκων.....	209
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	210

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χαλέπιος Πεύκη (*Pinus halepensis* Mill.)

Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis*) είναι ένα αιθαλές κωνοφόρο δέντρο, που ανήκει στην οικογένεια *Pinaceae* και στο γένος *Pinus*. Το είδος *Pinus halepensis* περιγράφηκε το **1755 (Duhamel)** και ονομάστηκε *P. Hierosolimitana*. Ο Miller περιγράφοντας το ίδιο είδος (1788) το ονόμασε *Pinus halepensis*. Η ονομασία χαλέπιος πεύκη επικράτησε, παρόλο που το Χαλέπιο (Συρία) δεν βρίσκεται στα φυσικά όρια εξάπλωσης του είδους (**Nahal, 1962**). Το γένος *Pinus* (*Pinaceae*) περιλαμβάνει 250 είδη και είναι ευρέως διαδεδομένο σε όλο το βόρειο ημισφαίριο, ιδίως στην Ασία, την βόρεια και κεντρική Αμερική (κυρίως στην περιοχή της Καραϊβικής) και την Ευρώπη (κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου). Τα πεύκα απαντούν σχεδόν σε όλες τις κλιματικές ζώνες και οικοσυστήματα ενώ υψομετρικά απαντούν από την παραλιακή ζώνη μέχρι τα δασσόρια. Ορισμένα είδη εξαπλώνονται ευρύτατα (*Pinus silvestris*), ενώ άλλα έχουν πολύ περιορισμένη φυσική κατανομή (όπως το *Pinus torreyana*). Τα είδη που αυτοφύονται στην Ευρωπαϊκή ήπειρο είναι τα εξής 11: *P.brutia*, *P. Cembra*, *P.halepensis*, *P.heldreichii*, *P.mugo*, *P.uncinata*, *P.nigra*, *P.peuce*, *P. Pinaster*, *P.pinea* και *P.sylvestris*. Από αυτά, μόνο τέσσερα είδη (*P. Cembra* *P.mugo*, *P.uncinata*, *P. Pinaster*) δεν απαντώνται στη χώρα μας (**Gausses et al., 1993, Greuter et al., 1984**).

Εκτός από το γενικότερο χλωριδικό της πλούτο, η Ελλάδα συμπεριλαμβάνεται στις περιοχές που χαρακτηρίζονται από μεγάλες συγκεντρώσεις ειδών πεύκου. Στη χώρα μας φύονται τα είδη *Pinus halepensis*, *Pinus brutia*, *Pinus pinea*, *Pinus nigra*, *Pinus silvestris*, *Pinus leucodermis* (*P. Heldreichii*) και *Pinus peuce*.

Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι η μοναδική στην οποία συναντώνται οι φυσικές κατανομές των δύο Μεσογειακών πεύκων (*P.halepensis* και *P.brutia*). Στην Ελλάδα η χαλέπιος πεύκη απαντά στην Ήπειρο, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησο, Χαλκιδική, Πήλιο, Εύβοια, Σκύρο και μερικά άλλα νησιά του Αιγαίου και Ιονίου Πελάγους, ενώ η τραχεία πεύκη στη Θράκη, τα νησιά του Αν. Αιγαίου και την Κρήτη (**Σκορδίλας, 1992**)

Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis*) αποτελεί ένα σημαντικό δασοπονικό είδος για τη χώρα μας με μεγάλη προσαρμοστική ικανότητα αφού αναπτύσσεται σε πολύ διαφορετικά εδάφη. Είναι ένα είδος προσαρμοσμένο στις ακραίες κλιματικές και εδαφικές συνθήκες του Μεσογειακού κλίματος. Φύεται κυρίως στις χαμηλές παραθαλάσσιες περιοχές της χώρας μας, στην παραλιακή και λοφώδη ζώνη βλάστησης, την *Quercetalia ilicis* (**Αθανασιάδης, 1986**). Δίνει σημαντικά δασικά προϊόντα, αλλά ταυτόχρονα προσφέρει και πολύτιμες υπηρεσίες στο κοινωνικό σύνολο.

Είναι ένα μεγάλο δέντρο με ύψος 5-20 μέτρα. Ο κορμός του είναι συνήθως στρεβλός και η διακλάδωση του δε γίνεται σε σπονδύλους. Η κόμη του είναι σε νεαρή ηλικία κωνική και σε μεγαλύτερη πλατιά και ακανόνιστη. Ο φλοιός του στην αρχή λείος, γυαλιστερός και σταχτόλευκος ενώ αργότερα σχηματίζει ξηρό φλοιό κοκκινοκάστανο, με επιμήκεις σχισμές (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Pinus halepensis

Οι βελόνες της βρίσκονται ανά δυο σε βραχυκλάδια, με σπειροειδή διάταξη, έχουν χρώμα ανοιχτοπράσινο και είναι λεπτές, στιλπνές, ευθείες με μήκος 8-13 εκατοστά και πλάτος 1 χιλιοστό. Οι παρυφές τους είναι ελαφρά οδοντωτές, με οδόντωση που δεν είναι αισθητή στην αφή. Ρητινοφόροι αγωγοί εντοπίζονται στην πάνω επίπεδη επιφάνεια (1-2), ενώ στην κάτω είναι περισσότεροι. Η διάρκεια ζωής των βελονών είναι 2 χρόνια.

Είναι φυτό μόνικο και τα άνθη του είναι μονογενή. Τα αρσενικά είναι κίτρινοι ίουλοι, ενώ τα θηλυκά έχουν μορφή μικρών κωνίσκων, πορφυροκόκκινου χρώματος, με ποδίσκο 1 εκατοστού. Στην αρχή είναι όρθια και μετά την επικονίαση στρέφονται προς τα κάτω. Η άνθηση τους γίνεται από τον Μάρτιο έως τον Απρίλιο. Οι κώνοι της είναι ωσειδείς, οξυκόρυφοι με μήκος 5-10 εκατοστά και πλάτος 6 εκατοστά, ευθείς ή λίγο κυρτοί.

Είναι μονοί ή ανά δύο σε σπονδύλους και κρέμονται από τα κλαδιά με κυρτό ποδίσκο που έχει μήκος 1,5-3 εκατοστά. Το χρώμα των ώριμων κώνων είναι κοκκινοκάστανο, όταν όμως μένουν πολλά χρόνια πάνω στα δέντρα παίρνουν χρώμα σκούρο σταχτί. Η ωρίμανση τους γίνεται τον Απρίλιο- Μάιο του τρίτου χρόνου από την άνθηση, δηλαδή μετά από μια διετία. Οι περισσότεροι από τους κώνους ανοίγουν ως το φθινόπωρο, άλλοι τον επόμενο ή τον μεθεπόμενο χρόνο και μερικοί μένουν κλειστοί πολλά χρόνια. Ανοιχτοί κώνοι επίσης μένουν πάνω στα δέντρα για πολύ καιρό. Τα σπέρματα είναι αχλαδόμορφα, αμβλέα στο πάνω άκρο και οξέα στο κάτω, με μήκος 5-7 χιλιοστά και χρώμα καστανοσταχτί με μαύρα στίγματα. Το περύγιο τους είναι ανοιχτοκαστανό, κρατά το σπέρμα σαν τσιμπίδα και συνήθως είναι πλατύτερο στο πάνω μισό (Εικ. 2).



Εικόνα 2. Ωριμοί κώνοι P. Halepensis

Είναι ένα είδος με μεγάλη προσαρμοστική ικανότητα και λιτοδίαιτο. Αναπτύσσεται σε πολύ διαφορετικά εδάφη, ακόμα και σε άγονα, ξηρά και αβαθή. Είναι πολύ φωτόφιλο και έχει απαιτήσεις σε φως μεγαλύτερες από όλα τα πεύκα εκτός από την κουκουναριά (*Pinus pinea*). Είναι είδος ανθεκτικό στην ξηρασία, αντέχοντας σε ξηρές περιόδους μέχρι και 6 μήνες, ενώ παρουσιάζει δυσκολία προσαρμογής σε ψυχρά κλίματα και χαμηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τον **Quezel (1985)**, εμφανίζεται σε κλίματα στα οποία η μέση ελάχιστη θερμοκρασία δεν πέφτει κάτω από τους $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Παράλληλα, είναι ένα αρκετά πυρόφιλο είδος προσαρμοσμένο στις δασικές πυρκαγιές, γεγονός που οφείλεται στη μικρή ανταγωνιστική ικανότητα των νεαρών ατόμων του είδους απέναντι στα υπόλοιπα είδη του υπορόφου, καθώς και στο ότι μέρος των κώνων που παράγονται κάθε χρόνο παραμένει κλειστό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έτσι μετά από μια πυρκαγιά και διάστημα μιας έως δυο ημερών, ώστε να έχει κρυώσει το έδαφος και να έχει ξεπεραστεί ο κίνδυνος καταστροφής των σπερμάτων, οι κώνοι ανοίγουν και απελευθερώνουν τα σπέρματα αφού πλέον έχει εξαλειφτεί ο υπόροφος και το πυκνό στρώμα βελονών.

Η γεωγραφική της εξάπλωση περιλαμβάνει τη Β.Αφρική, Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία, Αλβανία, Κροατία, Τουρκία (Αδανα), Συρία, Λίβανο, και Παλαιστίνη. Στην Ελλάδα απαντάται στην Ήπειρο, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησο, Χαλκιδική, Πήλιο, Εύβοια, Σκύρο και μερικά άλλα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους (**Αθανασιάδης, 1986**) (Εικ.3). Στον ελλαδικό χώρο φύεται από παραθαλάσσιες περιοχές μέχρι και υψόμετρο 1000μ. (**Παπαϊωάννου, 1935**).

Τα δάση της χαλέπιας πεύκης ανήκουν στα μεσογειακά δασικά οικοσυστήματα με ευρύ υψομετρικό φάσμα και οι φυτοκοινωνιολογικές ζώνες όπου αυτά συναντώνται είναι η *Oleo ceratonion*, η *Oleo lentiscetum*, η *Quercion ilicis* και ιδιαίτερα η *Adrachno quercetum* όπου βρίσκεται και το άριστο της ανάπτυξης του

είδους. Η συνολική έκταση των δασών της χαλέπιας πεύκης ανέρχεται σε 3,5 εκ. εκτάρια (Ντάφης, 1987).



Εικόνα 3 . Γεωγραφική εξάπλωση *Pinus halepensis*

Η γενετική ποικιλότητα του είδους είναι μεγάλη, γεγονός που διακρίνεται αμέσως από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως είναι η ευθύτητα του κορμού, το πάχος των κλαδιών και το σχήμα των κώνων καθώς και η ανατομία των βελονών. Ακόμη, ποικιλότητα έχει εντοπιστεί και ως προς τον χρόνο ανοίγματος των κώνων και της διασποράς των σπόρων (Vidakovic, 1991).

Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis*) είναι ένα πολύ σημαντικό δασοπονικό είδος, τόσο από οικολογική όσο οικονομική και αισθητική σκοπιά. Αποτελεί το κυριότερο ρητινοπαραγωγό είδος στη χώρα μας αφού παράγει ρητίνη σε σημαντικές ποσότητες (Φιλίππου, 1986). Το ξύλο της είναι κατάλληλο για διάφορα προϊόντα όπως πριστή ξυλεία, στύλοι, χαρτοπολτός, μοριοπλάκες κ.α.

Τέλος, μια πλουτοπαραγωγική πηγή που είναι συνυφασμένη με τα δάση χαλέπιας πεύκης είναι η άσκηση της μελισσοτροφίας και το προϊόν αυτής το μέλι (Οικονόμου, 1987).

1.1.1 Οικονομική σημασία του είδους

Η χαλέπιος αποτελεί το κύριο είδος ρητινοσυλλογής στη Μεσόγειο και την Ελλάδα με μέσο όρο παραγωγής 3 Kg ρητίνης ανά δέντρο το έτος, η οποία μπορεί να φτάσει και σε περισσότερα από 10 Kg σε μερικά άτομα. Παρόλο που η ζήτηση της φυσικής ρητίνης έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, λόγω της εμφάνισης φθηνότερων τεχνητών ρητινών, επανακάμπει το ενδιαφέρον γι' αυτήν, ως φυσικό υλικό πλήρως βιοδιασπώμενο, με φαρμακευτικές και καλλυντικές ιδιότητες (Χριστοδούλου, 2012) και ως βελτιωτικό καυσίμων (Tsanaktsidis *et al.*, 2014, 2013).

Στην Ελλάδα, η παραγωγή μελιού από πευκοδάση (από το έντομο *Marchalina hellenica*) αποτελεί σημαντική πρόσοδο σε πολλές περιοχές (Bacadoros *et al.* 2004).

Για την αναδάσωση των περιοχών που πλήττονται από πυρκαγιές, όπως η Ελλάδα (η χώρα με τις περισσότερες πυρκαγιές), ταυτόχρονα με την ανάγκη ενός είδους που μπορεί να αντιμετωπίσει την αύξηση της θερμοκρασίας στο πλαίσιο της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής, η ενδεχόμενη παγκόσμια ζήτηση εκτιμάται ότι θα είναι εκατομμύρια φυτά ετησίως (Chambel *et al.*, 2013).

1.2 Ρητίνη της χαλέπιας πεύκης

1.2.1 Γενικά

Η ρητίνη είναι ένα παχύρρευστο, άχρωμο υγρό που εκκρίνεται από ορισμένα είδη κωνοφόρων δέντρων (κυρίως πεύκων) όταν πληγωθούν από διάφορες αιτίες (άνεμο, φωτιά, κεραυνό ή κ.ά.) , θέτοντας στο σημείο τραυματισμού ένα εμπόδιο, απέναντι στις προσβολές υγρασίας, σήψης, αποξήρανση του ιστού και στην επίθεση των εντόμων και των παθογόνων (Smith, 1966 ; Shain, 1967 ; Shrimpton, 1973 ; Reid *et al.* 1987). Από χημική άποψη, η ρητίνη είναι μίγμα ρητινικών οξέων (κολοφωνίου) και πτητικού ελαίου (τερεβινθελαίου). Η ροή της ρητίνης γίνεται από ρητινοφόρους αγωγούς. Σε μια τομή ξύλου, οι αγωγοί αυτοί φαίνονται με γυμνό μάτι ή με φακό, αλλά η δομή τους διακρίνεται μόνο με μικροσκόπιο. Έτσι διαπιστώνεται, ότι είναι σωληνώδεις κατασκευές, που είναι τοποθετημένες αξονικά και ακτινικά και ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα «δίκτυο συγκοινωνούντων αγγείων». Οι ρητινοφόροι αγωγοί δεν είναι κύτταρα, αλλά κενοί χώροι ανάμεσα στα κύτταρα του ξύλου και έχουν εσωτερική επένδυση από ειδικευμένα κύτταρα (παρεγχυματικά, επιθηλιακά). Τα κύτταρα αυτά είναι πηγή της ρητίνης. Είναι αξιοσημείωτο, ότι ρητίνη εκκρίνεται μόνο από ρητινοφόρους αγωγούς που βρίσκονται στο σομφό ξύλο.

Στο εγκάρδιο ξύλο, οι αγωγοί είναι κλειστοί (αποφραγμένοι). Γενικά τα κωνοφόρα κατατάσσονται σε δυο ομάδες σε σχέση με την παραγωγή ρητίνης ως αμυντικό μηχανισμό κατά των τραυματισμών. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει είδη όπως τα *Pinus*, τα οποία παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα πρωτογενούς (συστατικής) ρητίνης και ένα πολύ καλά ανεπτυγμένο εκκριτικό σύστημα. Τα είδη αυτά αντιδρούν στους τραυματισμούς, με τη μεταφορά προσχηματισμένης ρητίνης στο σημείο, διαμέσου του πολύ καλά ανεπτυγμένου συστήματος των ρητινοφόρων αγωγών.

Τα είδη της δεύτερης ομάδας, όπως είναι τα *Abies*, τα οποία παράγουν μικρές ποσότητες συστατικής ρητίνης και εμφανίζουν απομονωμένα κύτταρα με ρητίνη ή κύστες, βασίζονται κυρίως στην άμεση βιοσύνθεση της στην περιοχή τραυματισμού, ενώ σχηματίζουν τραυματικούς ρητινοφόρους αγωγούς, οι οποίοι είναι απόντες στους μη πληγωμένους ιστούς (Bamman 1936 ; Shimaji and Nagatsuka 1971 ; Kuroda and Shimaji 1983). Πολλά είδη κωνοφόρων πάντως βασίζονται και στα δυο συστήματα (Lewinsohn *et al.*, 1991).

1.2.2 Συλλογή της ρητίνης

Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis*) αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα κωνοφόρα στη λεκάνη της Μεσογείου. Παράλληλα αποτελεί και ένα από τα πλέον παραγωγικά είδη, μαζί με την *P. pinaster*, σε ρητίνη. Στην Ελλάδα ρητινεύεται κυρίως η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis*) και σε μικρό ποσοστό η τραχεία πεύκη (*Pinus brutia*). Οι περιοχές της Ελλάδας όπου και εξακολουθεί να ασκείται η εργασία της ρητινοσυλλογής είναι οι νομοί Χαλκιδικής και Εύβοιας, κατά κύριο λόγο, και έπειτα οι νομοί Κορινθίας και Ηλείας. Σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες ρητινεύονται τα είδη *Pinus pinaster*, *Pinus laricio*, *Pinus pinea*, *Pinus silvestris*, στις Η.Π.Α. οι *Pinus palustris*, *Pinus elliotii*, στην Ινδία η *Pinus longifolia*, στην Κίνα η *Pinus koraiensis* κ.α.

Η συλλογή της ρητίνης γίνεται κατά τη χρονική περίοδο μεταξύ Απριλίου (ή τέλος Μαρτίου) και Νοεμβρίου. Ξεκινά δηλαδή και τελειώνει σύμφωνα με την αυξητική περίοδο του δέντρου γιατί τότε παρατηρείται η μεγαλύτερη παραγωγή.

Η ρητίνευση γίνεται με δυο βασικές μεθόδους:

1. με πελέκηση και
2. με αποφλοιώση και επίπαση με διάλυμα ή πάστα θειικού οξέος.

Στην πρώτη μέθοδο γίνεται πελέκηση και τομή των ρητινοφόρων αγωγών μέσα στο ξύλο. Στη δεύτερη δημιουργείται στον κορμό του δέντρου μια εντομή πλάτους περίπου 16cm και ύψους περίπου 8cm που καλείται 'μέτωπο'. Η περιοχή αυτή αποφλοιώνεται και πάνω στη επιφάνεια συνήθως γίνεται επάλειψη πάστας θειικού οξέος. Το θειικό οξύ λειτουργεί ως ερεθιστικό, καίγοντας την επιφάνεια του αποφλοιωμένου ξύλου, με συνέπεια να ανοίγουν οι ρητινοφόροι αγωγοί και έτσι η εκροή την ρητίνης να διαρκεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Τσουμής, 1969). Στη συνέχεια στη βάση του μετώπου τοποθετείται πλαστική σακούλα όπου συλλέγεται η ρητίνη που ρέει (Εικ.4). Παλαιότερα, αντί της πλαστικής σακούλας χρησιμοποιούνταν τενεκεδάκια αλλά αυτά έχουν εγκαταλειφθεί πλέον γιατί είναι πιο δύσχρηστα. Η διαδικασία της αποφλοιώσης γίνεται κατά την διεύθυνση του κορμού και προς τα πάνω (προς την κόμη). Επαναλαμβάνεται συνήθως κάθε 21 μέρες αν και αυτό εξαρτάται από την ένταση και το ρυθμό εργασίας του εκάστοτε ρητινοσυλλέκτη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνήθως κάθε 21 ημέρες. Αν μια σακούλα γεμίσει αντικαθίσταται από καινούρια. Όλες οι σακούλες είτε επειδή γέμισαν ή επειδή έφτασε το τέλος της ρητίνευσης αφήνονται στη βάση του κορμού και συλλέγονται όλες μαζί. Κατόπιν μεταφέρονται στην αποθήκη του συνεταιρισμού των ρητινοσυλλεκτών όπου ζυγίζονται και πωλούνται στις βιομηχανίες. Η παραγωγή της στον ελλαδικό χώρο κυμαίνεται κατά μέσο όρο στα 1,7- 3,3 Kg/έτος.άτομο με βάση τον Τσουμή (1978), ενώ ο Παπαϊωάννου (1971), αναφέρει μέσο όρο 3-5 Kg/έτος.άτομο, αν και έχουν εντοπιστεί άτομα στην περιοχή της Χαλκιδικής με παραγωγή άνω των 10 Kg/έτος (Μουλαλής, 1981).



Εικόνα 4. Συλλογή ρητίνης

1.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή της ρητίνης

Οι παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν την παραγωγή ρητίνης είναι πολλοί και διάφοροι. Σε πολλές περιπτώσεις πάντως οι διάφορες έρευνες-εργασίες παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα ως προς την επιρροή στην παραγωγή ρητίνης από κάποιο παράγοντα. Οι Παπαιωάννου και Μεγαλόφονος (1966) παρατήρησαν πως η παραγωγή ρητίνης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την απομάκρυνση της υποβλάστησης. Τα διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά έχουν μελετηθεί ώστε να βρεθεί αν υπάρχει συσχέτιση με την παραγωγή ρητίνης.

Η ετήσια παραγωγή ρητίνης ανά δένδρο ποικίλει σε ευρύτατα όρια (1-15 kg) και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το είδος της πεύκης, την ηλικία, τη μέθοδο ρητίνευσης κ.ά. Ο Schormeyer (1953) αναφέρει ότι οι παράγοντες που ελέγχουν ή επηρεάζουν την παραγωγή της ρητίνης είναι:

- (1) Το μέγεθος των αξονικών ρητινοφόρων αγωγών.
- (2) Ο αριθμός των ρητινοφόρων αγωγών ανά τετραγωνική ίντσα.
- (3) Από το πόσο παχύρρευστη είναι η ρητίνη και
- (4) πιθανώς, από την πίεση εκκρίσεως μέσα σε ένα δέντρο, η οποία ωθεί την ρητίνη προς τα έξω.

Ο Μουλαλής (1981) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η διάμετρος του κορμού είναι θετικά συσχετισμένη με την ρητινοπαραγωγή, ενώ το ύψος του δέντρου, η επιφάνεια της κόμης, ο αριθμός των ρητινοφόρων αγωγών στις βελόνες και ο αριθμός των σειρών των στομάτων στις βελόνες, δεν την επηρεάζουν. Σε ότι αφορά τους ρητινοφόρους αγωγούς σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Schorpmeyer (1957) και Hodges *et al.*, (1981). Ακόμη η ρητινοπαραγωγή δεν επηρεάζεται από τη διαμόρφωση του εδάφους (επίπεδο-κλίση) και από το ύψος της ρητίνευσης (βάση του κορμού-ύψος στηθιαίας διαμέτρου), σύμφωνα με τους Τσουμή και Βουλγαρίδη (1980). Παράλληλα η παραγωγή της ρητίνης επηρεάζεται θετικά από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και την απομάκρυνση της βλάστησης (Papaioannou και Megalophonos 1966) ενώ δεν συσχετίζεται σημαντικά με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως επίσης και με την πυκνότητα του δάσους (Tadesse *et al.*, 2001). Οι έρευνες μιας πληθώρας επιστημόνων κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή της ρητίνης διαφόρων πεύκων είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα, κληρονομήσιμο σε μεγάλο βαθμό (Dorman 1947; Mergen *et al.*, 1955 ; Chundnoff 1962 ; Squillace and Fisher 1966 ; Wright 1976).

1.2.4 Χρήσεις της ρητίνης

Η ρητίνη ως χημική πρώτη ύλη, συνίσταται από μείγμα τερπενοειδών και λιπαρών οξέων, εκ των οποίων άλλα είναι πτητικά (τερεβινθέλαιο) και άλλα μη πτητικά (κολοφώνιο). Η πρώτη βιομηχανική επεξεργασία της ρητίνης συνίσταται στην παραγωγή του κολοφωνίου και του τερεβινθελαίου. Η τεχνική παραγωγής των προϊόντων αυτών διακρίνεται σε δύο βασικά στάδια (Φιλίππου, 1986):

- Στον καθαρισμό της ρητίνης και
- Στην απόσταξη στους 100-160 °C

Το τερεβινθέλαιο αποτελείται από δύο κλάσεις-τάξεις τερπενίων, τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια που συνιστούν το 15% του βάρους της ρητίνης και αποτελούν την τουρπεντίνη. Το κολοφώνιο αποτελείται από τα διτερπένια και τα οξυγονούχα προϊόντα αυτών, τα ρητινικά οξέα, συστατικά που αποτελούν το 70% του βάρους της ρητίνης.

Η χρήση της ρητίνης από τον άνθρωπο είναι γνωστή περίπου από το 500 π.Χ (περιγράφει την παραγωγή της στην Ελλάδα ο κλασικός Έλληνας βοτανολόγος Θεόφραστος στην Περί Φυτών ιστορία του). Παραδοσιακά, είναι γνωστή η χρησιμοποίηση της για φωτισμό, σε θρησκευτικές τελετές, ως φάρμακο, συντηρητικό σε ξύλινες κατασκευές (κολοφώνια πίσσα), για την ταρίχευση των νεκρών και στη σταγανοποίηση των ξύλινων ενώσεων των πλοίων (από όπου προέρχεται και ο διεθνής όρος 'naval stores' για τη ρητίνη και τα προϊόντα της) (Δαμιανός, 1933; Παπαδημητρακόπουλος, 1991; Τσουμής, 1978 ; Zinkel, 1975).

Κατά τους Βυζαντινούς χρόνους και την επανάσταση του 1821 αποτέλεσε πολύτιμο υλικό για την Παρασκευή του ‘υγρού πυρός’ και την πυρπόληση των εχθρικών πλοίων.

Ακόμη χρησιμοποιείται και στην παρασκευή του κρασιού ρετσίνα στην Ελλάδα από αμνημονεύτων ετών.

Σήμερα, η εικόνα των χρήσεων έχει αλλάξει τελείως. Η ρητίνη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη παραγωγής μεγάλης ποικιλίας μοντέρνων βιομηχανικών προϊόντων. Το νέφτι, δηλαδή το υγρό κλάσμα απόσταξης της ρητίνης αποτελεί χρήσιμη ύλη στις βιομηχανίες υφασμάτων, χρωμάτων, αρωμάτων, καλλυντικών, φαρμάκων, λιπαντικών ουσιών, συνθετικών ρητίνων, κ.α. Το κολοφώνιο, δηλαδή το στερεό κλάσμα απόσταξης της ρητίνης, αποτελεί χρήσιμη ύλη στην τυπογραφία, υφαντουργία, μεταλλουργία και στην παρασκευή ποικιλίας προϊόντων, όπως λιπαντικά, πλαστικά, αντιδιαβρωτικά, αρωματικά κεριά, αδιάβροχα υλικά, σφραγίσματα δοντιών, τεχνητά δόντια, έμπλαστρα, συντηρητικά, προσθετικά γεύσης σε τρόφιμα, ποτά και είδη ζαχαροπλαστικής, καταλύτες, επιβραδυντικά της φωτιάς, μουσαμάδες για δάπεδα, ταπετσαρίες, τεχνητά δέρματα, καλλύντικά, συνθετικό καουτσούκ, εντομοκτόνα, παρκετίνη, μονωτικά, τυπογραφική μελάνη, χρώματα, φάρμακα, κόλλες, προσθετικές ύλες στο χαρτί, τσίχλες για μάσηση, κ.α. (Τσουμής, 1978; Καραολάνογλου και Κούκιος, 2002; Zimkel, 1980).

1.3 Αιθερία ελαια

1.3.1 Προέλευση και φυσικές ιδιοτητες αιθεριων ελαιων

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά αρωματικά συστατικά που λαμβάνονται από τα φυτά συνήθως με απόσταξη με υδρατμούς. Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και δεν έχουν καμία σχέση με τα « λίπη και έλαια». Η προέλευση του ονόματός τους αιτιολογείται από το γεγονός της ταχείας εξάτμισής τους στον αέρα. Δεδομένου ότι είναι πτητικές, τα μόριά τους εξατμίζονται εύκολα και διασκορπίζόμενα στον ατμοσφαιρικό αέρα, έρχονται σ' επαφή με τα όργανα όσφρησης, τα οποία και διεγείρουν. Προκαλούν, έτσι, μία συνήθως ευχάριστη αίσθηση, χαρακτηριστική για κάθε είδος φυτού, που αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό για το κάθε είδος άρωμα (Σαρλής, 1994).

Συνίστανται από πολλές χημικές ουσίες που μπορούν να φτάσουν τις 150, ενώ τα υπερισχύοντα συστατικά τους καθορίζουν το χαρακτήρα τους. Το χαρακτηριστικό άρωμα κάθε αιθερίου ελαίου είναι συνισταμένη όλων των συστατικών του, αλλά πολλές φορές η παρουσία ενός μόνο συστατικού σε αναλογία 1% ή και μικρότερη, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αρώματος. Παρόλα αυτά, η χαρακτηριστική οσμή των αιθερίων ελαίων οφείλεται στα κύρια συστατικά τους

Τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται από φυτά που αναπτύσσονται σε θερμές περιοχές του πλανήτη, όπως είναι η περιοχή της Μεσογείου και οι τροπικές χώρες και σε συνθήκες περιβάλλοντος (20 - 30 °C και 0,1 MPa), είναι υγρά και πτητικά. Είναι άχρωμα έως υποκίτρινα με ελάχιστες εξαιρέσεις όπως το γαρυφαλλέλαιο που είναι κιτρινοκαστανόχρωμο και όσα περιέχουν αζουλένιο είναι μπλε. Κατά την παραμονή τους επί πολύ χρόνο σκουραίνουν, ρητινοποιούνται και αλλοιώνεται η οσμή τους.

Αιτία γι' αυτό είναι οι αυτοοξειδώσεις, ο πολυμερισμός και οι υδρολύσεις των εστέρων. Η υγρασία, η θερμοκρασία και το φως επηρεάζουν τα αιθέρια έλαια γι' αυτό πρέπει να φυλάσσονται σε μικρά, γεμάτα και καλά κλεισμένα και προστατευμένα από το φως και τη θερμοκρασία δοχεία. Διακρίνονται για το δυνατό άρωμά τους και σχηματίζονται από τα αρωματικά φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Η σύνθεση τους μπορεί να γίνει σε όλα τα τμήματα του φυτού, όπως τα άνθη, τα φύλλα, τους σπόρους, τα φρούτα, τις ρίζες, το φλοιό, το μίσχο και τα κλαδιά. Αποθηκεύονται σε κοιλότητες, πόρους και κύτταρα της επιδερμίδας και το τρίχωμα, όπου απαντώνται με τη μορφή σταγονιδίων (Bakkali, Averbek, Averbek & Idaomaer, 2008 - Wilson, 2003). Αυτά αποτελούν δευτερογενή παράγωγα του μεταβολισμού και οι λόγοι που τα φυτά παράγουν αιθέρια έλαια είναι α) για την προσέλκυση των εντόμων (επικονίαση) (Pichersky and Gershenzon, 2002), β) για την προστασία τους από τα φυτοφάγα ζώα (τα αιθέρια έλαια είναι συνήθως πικρά και μερικές φορές δηλητηριώδη) (Keeling and Bohlmann, 2006), γ) για τη μείωση της διαπνοής του νερού από τα φύλλα (ιδιαίτερα τους θερμούς μήνες), δ) για την προστασία από διάφορες ασθένειες (Benderoth *et al.*, 2006), ε) για την επίδρασή τους σε άλλα φυτά που αναπτύσσονται στην ίδια περιοχή (αλληλοπάθεια) (Pichersky and Gershenzon, 2002) και στ) για τη χρησιμοποίησή τους ως αποθήκες ενέργειας.

Η πυκνότητα τους είναι γενικά χαμηλότερη από του νερού. Χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη διάθλασης. Τα περισσότερα είναι οπτικώς ενεργά με στροφική ικανότητα που είναι συνήθως πολύτιμη διαγνωστική ιδιότητα. Δεν διαλύονται παρά ελάχιστα στο νερό, ενώ είναι διαλυτά στον αιθέρα, πετρελαϊκό αιθέρα, αλκοόλη και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και στα λιπαρά λάδια.

1.3.2 Χημική συσταση αιθεριων ελαιων

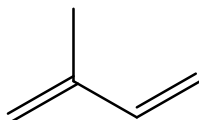
Τα αιθήρια έλαια κατά κανόνα βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και αποτελούν μόνο ένα μικρό κλάσμα του συνολικού βάρους του φυτικού υλικού (0,01-20%). Από χημική άποψη, τα φυτικά αιθήρια έλαια αποτελούνται κυρίως από μίγματα τερπενίων. Τα τερπένια είναι οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, τα οποία παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα δομικών διαφορών. Μερικά είναι υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου, άλλα είναι μόρια ανοικτής αλυσίδας και άλλα περιλαμβάνουν δακτυλίους

Πιο συγκεκριμένα, τα κυριότερα συστατικά που απαντούν στα αιθήρια έλαια των φυτών είναι τα μονοτερπένια και τα σесκιτερπένια, ενώ επίσης μπορούν να περιλαμβάνονται και άλλες ουσίες, όπως φαινυλοπροπανοειδή, θειούχες ή αζωτούχες ενώσεις, αλεικυκλικοί υδρογονάνθρακες κ.ά. Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: σε οξυγονούχα και μη οξυγονούχα. Στα οξυγονούχα κατατάσσονται οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες, οι κετόνες, οι φαινόλες, τα οξέα και οι εστέρες. Από αυτά, οι εστέρες έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στο άρωμα των αιθερίων ελαίων. Αντίθετα, στα μη οξυγονούχα ανήκουν οι υδρογονάνθρακες, που έχουν μικρή συμβολή στο άρωμα των αιθερίων ελαίων. Τα κυριότερα μη οξυγονούχα συστατικά είναι τα μονοκυκλικά και δικυκλικά τερπένια, όπως είναι το λεμονένιο, το πινένιο και το καμφένιο (Brooker and Kleinig, 2006).

Όλα τα τερπένια σχετίζονται μεταξύ τους, ανεξάρτητα με τις δομικές διαφορές τους. Ο μεγάλος ερευνητής Leopold Ruzicka (1887-1976), ο οποίος τιμήθηκε το 1939 με το βραβείο Nobel για τις εργασίες του στον τομέα των τερπενίων, διατύπωσε το 1953 τον «κανόνα του ισοπρενίου», κατά τον οποίο όλα τα τερπένια είναι μόρια με δομή πολλαπλάσια της μονάδας του ισοπρενίου (2-μεθυλο-

1,3-βουταδιένιο) (Εικ. 5). Ο άνθρακας 1, ονομάζεται κεφαλή της ισοπρενικής μονάδας, ενώ ο άνθρακας 4 θεωρείται η ουρά της.

Οι μονάδες του ισοπρενίου στα μόρια των τερπενίων συνδέονται «κεφαλή - ουρά» και η αρχικά σχηματιζόμενη δομή μπορεί στη συνέχεια, με διάφορες ενζυματικές πορείες, να αναδιαταχθεί με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ποικιλίας σκελετών με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα.



Εικόνα 5. Απεικόνιση του ισοπρενίου

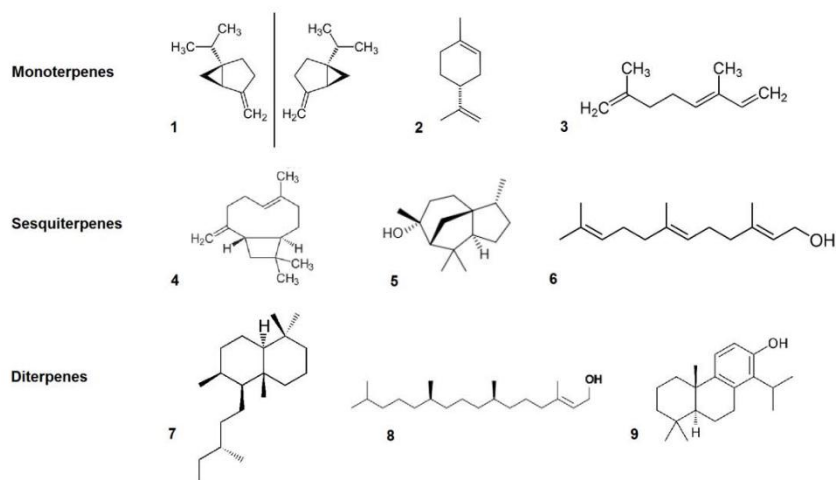
Τα τερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Έτσι, ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν ταξινομούνται ως εξής:

ΤΕΡΠΕΝΙΑ		
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ C	ΜΟΝΑΔΕΣ ΙΣΟΠΡΕΝΙΟΥ
ΗΜΙΤΕΡΠΕΝΙΟ	5	1
ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΟ	10	2
ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΟ	15	3
ΔΙΤΕΡΠΕΝΙΟ	20	4
ΣΕΣΤΕΤΕΡΠΕΝΙΟ	25	5
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΟ	30	6
ΤΕΤΡΑΤΕΡΠΕΝΙΟ	40	8
ΠΟΛΥΤΕΡΠΕΝΙΑ	>40	

Τα μονο- και τα σεσκιτερπένια απαντούν κυρίως στα φυτά, ενώ τα υψηλότερης τάξης τερπένια απαντούν τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα και πολλά παρουσιάζουν αξιόλογη βιολογική δραστηριότητα.

Τα τερπένια είναι οργανωμένα σε άκυκλες και κυκλικές κατανομές, με *cis*- και *trans*-διαμορφώσεις και χειρόμορφους άνθρακες που επιτρέπουν την ύπαρξη αρκετών εναντιομερών (Εικ.6). Τα μονοτερπένια διακρίνονται ανάλογα με το χημικό τους τύπο σε άκυκλα, μονοκυκλικά και δικυκλικά. Σύμφωνα με τον κανόνα του ισοπρενίου, όλες οι οικογένειες των μονοτερπενίων προέρχονται από τη γερανιόλη είτε με απευθείας χημικές μετατροπές είτε με κυκλοποιήσεις ενδιάμεσων καρβοκατιόντων.

Τα σεσκιτερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των δακτυλίων που έχει ο συντακτικός τους τύπος σε άκυκλα, μονοκυκλικά, δικυκλικά και τρικυκλικά και έχουν μητρική ένωση τον πυροφωσφορικό εστέρα της φαρνεσόλης.



Εικόνα 6. Παραδείγματα τερπενίων:

1 Δύο εναντιομερή του σαβινενίου: (-) - σαμπινένιο και (+) - σαμπινένιο (δικυκλική δομή). 2 λιμονένιο (μονοκυκλικό). 3 α -οκιμένιο (ακυκλό). 4 β -καρυοφυλένιο (τρικυκλικό). 5 cedrol (τρικυκλική, οξυγονωμένη). 6 φαρνεσόλη (ακυκλή, οξυγονωμένη). 7 labdane (δικυκλική). 8 φυτόλη (ακυκλή, οξυγονωμένη). 9 τοταρόλη (τρικυκλική, οξυγονωμένη).

1.3.3 Παράγοντες διαφοροποίησης της σύστασης των αιθερίων ελαίων

Οι μεταβολές στη χημική σύσταση και στην απόδοση του αιθερίου ελαίου στα φυτά είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο που θα πρέπει να εξετάζεται και να προσδιορίζεται η επίδρασή του στην παραλαβή ελαίου υψηλής ποιότητας (Drake *et al.*, 2009).

Στις περισσότερες περιπτώσεις η σύσταση του αιθερίου ελαίου μπορεί να διαφοροποιείται στα διάφορα μέρη του φυτού όπου περιέχεται (άνθη, φύλλα, βλαστοί, ρίζες κ.λπ.), γεγονός που αποδίδεται ως ένα βαθμό στα εκκριτικά όργανα που παράγουν τα αιθέρια έλαια (τριχίδια, πόροι). Αυτά, μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικό μηχανισμό έκκρισης, να μην εκκρίνουν τα ίδια συστατικά, ή να μην αναπτύσσονται ταυτόχρονα σε όλα τα μέρη του φυτού (Figueiredo *et al.*, 2008).

Επίσης, ένας άλλος βασικός παράγοντας επίδρασης στη σύσταση των αιθερίων ελαίων είναι οι γενετικές διαφορές μεταξύ φυτών διαφορετικού είδους, υποείδους, ποικιλίας ή ακόμη και μεταξύ του ίδιου είδους με την ύπαρξη διαφορετικών χημειοτύπων (Wildy *et al.*, 2000).

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

Ακόμη, η ηλικία των φύλλων που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή αιθερίου ελαίου συνδέεται με την περιεκτικότητα και τη συνολική του απόδοση, με συνέπεια να προκύπτουν συχνά διαφορές μεταξύ νεαρών και ώριμων φύλλων ενός είδους. Αντίστοιχα, η μέθοδος ξήρανσης του φυτικού υλικού μαζί με τη μέθοδο απόσταξης ή εκχύλισης που επιλέγεται, επιδρούν καταλυτικά στη βιοδραστικότητα του αιθερίου ελαίου (Brooker and Kleinig, 2006).

Ένας επιπλέον υπολογίσιμος παράγοντας, που ασκεί θετική ή αρνητική επίδραση στην ποιότητα και στην απόδοση του αιθερίου ελαίου, είναι η ύπαρξη ζιζανίων ή εχθρικών παρασίτων και εντόμων στο κοντινό περιβάλλον ανάπτυξης του φυτού. Αντίστοιχα, η χρήση ζιζανιοκτόνων και άλλων φυτοφαρμάκων για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο της εξάπλωσής τους, οδηγεί σε υποβάθμιση της ποιότητας και ελάττωση της ποσοστιαίας απόδοσης του αιθερίου ελαίου (Agrow, 2007; Oerke, 1999).

1.3.4 Αιθέριο έλαιο (τερεβινθέλαιο) ρητίνης Χαλέπιας πεύκης

Η ρητίνη (oleoresin) αποτελείται από το τερεβινθέλαιο (turpentine) και το κολοφώνιο (rosin). Το τερεβινθέλαιο (turpentine, spirit of turpentine, oil of turpentine, wood turpentine), είναι ένα παχύρευστο υγρό που παραλαμβάνεται με απόσταξη από τη ρητίνη του πεύκου (Βάρβογλης & Αλεξάνδρου 1970). Αυτό έχει χαρακτηριστική οσμή και γεύση, είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό στην αιθανόλη και άλλους οργανικούς διαλύτες και είναι ιδιαίτερα εύφλεκτο με αποτέλεσμα να απαιτείται ιδιαίτερα μεγάλη προσοχή κατά την κατεργασία του. Το τερεβινθέλαιο αποτελείται από δύο κλάσεις-τάξεις τερπενίων, τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπενια.

Η ρητίνη που είχε παραληφθεί κατά τα έτη 1966 και 1967 από τη χαλέπιο πεύκη στη χώρα μας αποτελούνταν, σύμφωνα με μια μελέτη του Υπουργείου Εμπορίου, από ρητινικά οξέα (60-65%), τερεβινθέλαιο (20-25%), νερό (8-12%), μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά (4-8%) και ξένες ύλες (0,5-2%). Σε νεότερη μελέτη αναφέρεται ότι η εγχωρίως παραγόμενη ρητίνη αποτελείται κατά 78,6% από κολοφώνιο και κατά 17% από τερεβινθέλαιο (Στεφανόπουλος, 1976). Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της είναι, σύμφωνα με τη μελέτη αυτή:

- Απώλειες στους 100⁰C: 14(%)
- Περιεκτικότητα σε τέφρα 0,14(%)
- Αριθμός οξύτητας 149
- Αριθμός εστέρων 6
- Αριθμός σαπωνοποίησης 155

Ο Μητσόπουλος (1987) σε πείραμα κοινού περιβάλλοντος 16 προελεύσεων χαλέπιας πεύκης βρήκε πως η ποικιλότητα της περιεκτικότητας της ρητίνης σε τερεβινθέλαιο μεταξύ των προελεύσεων κυμαινόταν από 24,8 έως 29,8%. Όπως σημειώνουν και οι Πετειναράκης κ.α. (2002), οι διαφορές σε περιεκτικότητα τερεβινθελαιίου οφείλονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην 'πητικότητα αυτού και στην ευκολία απωλειών του σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας'. Το τερεβινθέλαιο λαμβάνεται με απόσταξη από τη ρητίνη και είναι το γνωστό σε όλους νέφτι το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως ως διαλύτης χρωμάτων ή ως καθαριστικό υγρό.

Η ειδική στροφική ικανότητα (ad)20 του τερεβινθελαιίου Β. Εύβοιας βρέθηκε κατά μέσο όρο +53,80, χαρακτηριζόμενο ως έντονα δεξιόστροφο (Πετειναράκης κ.α., 2002). Η αυξημένη τιμή της δεξιόστροφης στροφικής ικανότητας οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητα του τερεβινθελαιίου σε α-πινένιο.

Το τερεβινθέλαιο, που είναι γνωστό και ως νέφτι, χρησιμοποιείται στη ζωγραφική ως διαλυτικό. Ορισμένα από τα συστατικά του (μονο- και σεσκιτερπένια) βρίσκουν εφαρμογή ως αρωματικές ύλες (πρόσθετες ύλες) στην παραγωγή τροφίμων και αναψυκτικών, ως συστατικά αρωμάτων, και ως μέσα για τον αρωματισμό οδοντόκρεμας, σάπωνος, καπνού και άλλων προϊόντων (Verlet, 1993; Καρανίκας κ.α., 2010).

1.3.5 Βιολογική δράση του αιθερίου ελαίου της ρητίνης του *Pinus Halepensis* και οι χρήσεις του

Η πιο σημαντική ομάδα οργανικών ενώσεων που βρίσκονται στα αιθέρια έλαια είναι τα τερπενοειδή. Αναλυτικότερα, σε ένα αιθέριο έλαιο μπορεί να εντοπιστούν μέχρι και διακόσιες διαφορετικές χημικές ενώσεις, όπως επίσης είναι δυνατόν να διαφέρει η σύσταση του αιθερίου ελαίου ενός φυτού στο ίδιο ή σε άλλο μέρος του. Αυτό εξηγεί και την ποικιλία των ιδιοτήτων τους, καθώς δρουν ως καλλυντικά, αντισηπτικά, αντιμικροβιακά, αντιφλεγμονώδη, αντικά, αντιμυκητιακά, αναλγητικά, τονωτικά, στυπτικά, εντομοαπωθητικά, εντομοκτόνα κ.λπ.

Τα τερπενοειδή εξυπηρετούν πολλούς και διακριτούς ρόλους. Όσον αφορά στα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και διτερπένια, ο κύριος ρόλος που υπηρετούν είναι οικολογικός και όχι δομικής φύσεως καθώς, παρέχουν προστασία από τα φυτοφάγα και παθογόνα, ελκύουν ζώα τα οποία διασκορπίζουν τη γύρη ή τους σπόρους και εμποδίζουν τη βλάστηση και ανάπτυξη γειτονικών φυτών (Harborne and Tomas-Barberan, 1991; Langenheim, 1994). Ένας ακόμη μηχανισμός στον οποίο συμμετέχουν είναι αμυντικός. Ορισμένα φυτά ανταποκρινόμενα στις επιθέσεις φυτοφάγων, εκλύουν πτητικά τερπένια τα οποία έλκουν εχθρούς των φυτοφάγων.

Ειδικότερα για τη ρητίνη των κωνοφόρων θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρόλος της είναι κατεξοχήν αμυντικός. Όταν πληγωθεί ένα δέντρο αυτό αντιδρά διοχετεύοντας στο σημείο προσβολής μεγάλες ποσότητες ρητίνης. Η ρητίνη αυτή είτε προϋπάρχει της προσβολής και βρίσκεται αποθηκευμένη στους ρητινοφόρους αγωγούς είτε σχηματίζεται επί τούτου (de novo σύνθεση).

Το πτητικό μέρος της ρητίνης, δηλαδή τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια, δημιουργεί ένα τοξικό περιβάλλον ώστε να απωθήσει τα έντομα που προσπαθούν να

διεισδύσουν στον ιστό και ταυτόχρονα να καταπολεμήσει τα διάφορα παθογόνα που ακολουθούν (μύκητες). Επίσης, χρησιμεύει και σαν μεταφορέας του μη-πτητικού μέρους, δηλαδή των ρητινικών οξέων, το οποίο σφραγίζει την πληγή και πολλές φορές εγκλωβίζει τα έντομα (Croteau and Johnson, 1985; Raffa *et al.*, 1985)

Επειδή δεν επηρεάζουν άμεσα την ανάπτυξη των φυτών, τα παραπάνω τερπενοειδή χαμηλού μοριακού βάρους χαρακτηρίζονται και ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Όμως, στην τάξη των τερπενοειδών ανήκουν και κάποια πολυπλοκότερα μόρια όπως είναι οι γνωστοί ρυθμιστές αύξησης γιββεριλίνη και ABA οι οποίοι βέβαια παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και συμμετέχουν ενεργά στον πρωτογενή μεταβολισμό. Ακόμη, πολλές πρωτεΐνες είναι τροποποιημένες με την προσθήκη πλευρικών αλυσίδων C15 και C20 τερπενοειδών στο μόριό τους. Η λειτουργία των κατώτερων τερπενίων δεν περιορίζεται μόνο στο φυσικό κόσμο. Στην ανθρώπινη κοινωνία, η συμμετοχή χιλιάδων μονοτερπενίων και σесκιτερπενίων ως γευστικοί και αρωματικοί παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντική σε πολλά προϊόντα όπως σε φαγητά, αρώματα, σαπούνια, οδοντόπαστες, καπνό και πολλά άλλα (Verlet, 1993). Επίσης, τα τελευταία χρόνια όλο και πιο σημαντική είναι η προσφορά τους στη φαρμακοβιομηχανία. Εκτός από την καμφορά που ανακουφίζει από πόνους εγκαυμάτων και διάφορες φλεγμονές, η αρτεμισίνη, ένα σесκιτερπένιο που παράγεται από το παραδοσιακό κινέζικο φαρμακευτικό φυτό *Artemisia annua*, χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση της ελονοσίας (Butler and Wu, 1992), όπως και η ταξόλη, ένα διτερπένιο που παράγεται από τον τάξο (*Taxus spp.*) χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Hezari and Croteau, 1997). Επίσης, τα διτερπενικά οξέα ισοκυπρεσικό και σανταρακοπιμαρικό οξύ των βλαστών μιας τούγιας (*Thuja standishii*) (Iwamoto *et al.*, 2003) και των κουκουναριών ενός πεύκου (*Pinus luchuensis*) (Minami *et al.*, 2002) εμφανίζουν πιθανή αντικαρκινική δράση.

Αξιοσημείωτη είναι η αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση του αιθερίου ελαίου ρητίνης προερχόμενο από τα εναέρια τμήματα (βελόνες, κλαδιά, κώνοι, μπουμπούκια) του είδους *Pinus halepensis* καθώς και άλλων ειδών *Pinus* (Ulukanli *et al.*, 2014; Hamrouni *et al.*, 2014; Graïkou *et al.*, 2012; Ghalem Bachir Raho., 2014; Fekih *et al.*, 2014; Sadou *et al.*, 2015; Abi-Ayad M.*et al.*, 2011; Amri *et al.*, 2013). Εκτός όμως από την αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση το αιθέριο έλαιο των εναέριων τμημάτων του είδους *Pinus halepensis* καθώς κ άλλων ειδών *Pinus* παρουσιάζει και αντιοξειδωτική δράση (Guri *et al.*, 2006; Šarac *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2010; Djerrad *et al.*, 2015; Yesil-Celiktas *et al.*, 2009; Meullemiestre *et al.*, 2013; Yener *et al.*, 2014). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι, το αιθέριο έλαιο του είδους *Pinus eldarica* εμφάνισε κυτταροτοξική επίδραση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών γραμμών HeLa (ανθρώπινο επιθηλιακό καρκίνωμα του τραχήλου) και MCF-7 (ανθρώπινο καρκίνωμα μαστού) (Sarvmeili *et al.*, 2017) ενώ το αιθέριο έλαιο βελόνων του είδους *Pinus halepensis* εμφάνισε κυτταροπροστατευτική επίδραση έναντι της προκαλούμενης από ασπιρίνη βλάβης στα κύτταρα *in vitro* (Bouzena *et al.*, 2017).

1.3.6 Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου (τερεβινθελαίου) ρητίνης της χαλέπιας πεύκης.

Η σύσταση της ρητίνης μεγάλου αριθμού κωνοφόρων δέντρων είναι σε γενικές γραμμές γνωστή από μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν, ωστόσο αυτή των διαφόρων ειδών πεύκου που φύονται στην περιοχή της Μεσογείου δεν είναι γνωστή καθώς η έρευνα που έχει γίνει είναι σχετικά περιορισμένη (Dob *et al.*, 2005). Έχει γίνει έρευνα για την εξακρίβωση της σύστασής της σε τερπένια με σκοπό να διερευνηθεί η ανθεκτικότητα και η προδιάθεση των δέντρων στις ασθένειες και στην προσβολή από έντομα και ζώα (Schiller & Grundwald, 1987; Puresvaran *et al.*, 2004), να γίνουν χημειοταξινομικές μελέτες (Chang & Hanover 1991; Lang, 1994) και να ταυτοποιηθούν οι κλώνοι που χαρακτηρίζονται ως φυτοχημικοί δείκτες (Kossuth *et al.*, 1988).

Η έρευνα που έχει γίνει με σκοπό τη διερεύνηση της σύστασης του πτητικού κλάσματος της ρητίνης της χαλέπιας πεύκης είναι σε γενικές γραμμές περιορισμένη (Ikonomou *et al.*, 1964; Miron & Ploff, 1965; Στεφανόπουλος, 1976; Μπέτζιος, 1978; Schiller & Grundwald, 1987; Papagiannopoulos *et al.*, 2001; Karanikas *et al.*, 2010).

Το τερεβινθέλαιο έχει βρεθεί ότι αποτελείται κυρίως από α-πινένιο (90-96%), ενώ περιέχει και αρκετούς άλλους τερπενικούς υδρογονάνθρακες, κυρίως δ-3-καρένιο, καμφένιο, λεμονένιο, μυρκένιο, β-πινένιο, π-κυμένιο, τερπινολένιο και φελλανδρένιο (Ikonomou *et al.*, 1964; Miron & Ploff, 1965; Μπέτζιος 1978).

Από τους πρώτους που μελέτησαν τη σύνθεση του τερεβινθελαίου δύο ειδών που φύονται και στην Ελλάδα ήταν οι Ikonomou *et al.*, (1964). Τα είδη που μελετήθηκαν ήταν η χαλέπιας και η τραχεία πεύκη. Δείγματα χαλέπιας συλλέχθηκαν από την Κόρινθο, την Αττική και τη Χαλκιδική ενώ τραχείας από την Εύβοια.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν.1). (Καρανίκας, 2008).

Πίνακας 1. Συστατικά τερεβινθελαίου ελληνικών δέντρων χαλέπιας και τραχείας πεύκης (Οικονόμου κ.α.,1964)

Συστατικά %	<i>Pinus halepensis</i>			<i>Pinus brutia</i>
	Αττική	Κόρινθος	Χαλκιδική	Εύβοια
α-πινένιο	96,3	96,2	96,1	67,1
Καμφένιο	0,65	0,7	0,7	0,9
β-πινένιο	0,9	0,8	0,6	16,9
μυρκένιο	0,75	0,8	0,5	0,9
δ-3-καρένιο	0,25	0,3	0,2	11,6
Λεμονένιο	1,0	1,0	1,5	0,7
β-φελανδρένιο	0,05	0,05	0,1	0,5
τερπινολένιο	0,1	0,15	0,25	0,7

Η μονοτερπενική σύνθεση της ρητίνης χαλέπιας πεύκης από όλη σχεδόν την εξάπλωση του είδους μελετήθηκε από τους Schiller και Grunwald (1987a). Η ρητίνη προερχόταν από το ξύλωμα ατόμων σε φυτεία προελεύσεων στο Ισραήλ. Οι μέσες τιμές των μονοτερπενίων των 22 προελεύσεων, των παραμεσογείων περιοχών όπου φύεται η χαλέπιος πεύκη, δίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 2). Επίσης, δίνονται και οι μέσες τιμές των 2 ελληνικών προελεύσεων της Ελιάς (Πελοπόννησος) και Β. Εύβοιας. (Karaniikas, 2008)

Πίνακας. 2. Συστατικά τερεβινθελαίου ελληνικών και παραμεσογειακών πληθυσμών (Schiller and Grunwald, 1987a)

Συστατικά %	<i>Pinus halepensis</i>		
	Ελιά	Β.Εύβοια	22 Προελεύσεις
α-πινένιο	86,41	87,67	82,34
β-πινένιο	1,8	1,8	1,9
μυρκένιο	2,8	2,9	7,2
φελλανδρένιο	3,4	1,7	3,4
δ-3-καρένιο	3,2	3,2	2,5
λεμονένιο	0,03	0,05	0,4
γ-τερπινένιο	0,03	0,04	0,4
τερπινολένιο	1,37	1,33	1,4
γ-τερπινεόλη	0,16	0,33	0,33
Άγνωστο 1	0,04	0,1	0,21
Άγνωστο 2	0,22	0,09	0,14
Άγνωστο 3	0,54	0,79	0,43

Τα αποτελέσματα των Schiller και Grunwald διαφέρουν σημαντικά από αυτά των Alette και Banister (1962), Οικονόμου κ.α., (1964) και Miron *et al.* (1966) οι οποίοι βρήκαν πολύ μικρές ποσότητες μυρκενίου, τερπινολενίου και φελλανδρενίου.

Σε σχέση με τις βόρειο-αφρικανικές προελεύσεις, οι ελληνικές εμφανίζουν σχετικά υψηλά ποσοστά σε α-πινένιο και 3-καρένιο και χαμηλά σε μυρκένιο και γ-τερπινένιο. Αυτή η σημαντική διαφορά πιθανόν να οφείλεται σε εισαγωγή γονιδίων (introgression) από πληθυσμούς *P. brutia*, καθώς τα δύο αυτά είδη υβριδίζουν μεταξύ τους, και το τελευταίο περιέχει υψηλά ποσοστά 3-δ-καρενίου στη ρητίνη του (Οικονόμου κ.α., 1964).

Οι ίδιοι ερευνητές (Schiller και Grunwald (1987) μελέτησαν και τη σύσταση της ρητίνης του φλοιού σε κάποιες προελεύσεις, μεταξύ των οποίων και τις ελληνικές. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της ρητίνης του ξυλώματος και του φλοιού στις ίδιες προελεύσεις. Ακόμη βρήκαν πως αυξημένες ποσότητες μυρκενίου, τερπινολενίου και γ-τερπινεόλης και μειωμένες ποσότητες λεμονένιο και φελλανδρένιο, σχετίζονται με αύξηση στις πληγώσεις των δέντρων από διάφορα έντομα, μύκητες κλπ.

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για τη διερεύνηση της σύστασης του αιθερίου ελαίου που παραλαμβάνεται από ορισμένα μέρη της χαλέπιας πεύκης. Οι Roussis *et al.*, (1995) μελέτησαν τα πτητικά συστατικά βελόνων πέντε ειδών πεύκης που φύονται στον ελληνικό χώρο, μεταξύ αυτών και τη χαλέπιο πεύκη. Τα κυριότερα συστατικά που βρήκαν είναι: α-πινένιο(13,40%), μυρκενίο (6,62%), 3-δ-καρένιο(6,87%), τερπινολένιο(3,07%), καρυοφυλλένιο(19,05%), βουτανικό οξύ (6,57%) και σεμπρένιο(7,62%).

Οι Gallis και Panetsos (1997), ανέλυσαν τα μονο- και σεσκιτερπένια της ρητίνης του φλοιού κλαδιών σε άτομα χαλέπιας, τραχείας και υβρίδια αυτών. Η χαλέπιος πεύκη, σε σύνολο 14 αναγνωρισθέντων συστατικών, παρουσίασε τα εξής κύρια συστατικά: α-πινένιο (26,65%), β-πινένιο (2,12%), 3-δ-καρένιο (10,04%), μυρκενίο (18,11%), α-τερπινολένιο (4,367%) και καρυοδυλλένιο (28,08%).

Οι Karanikas *et al.*, (2010), οι οποίοι μελέτησαν τη χημική σύσταση της ελαιορητίνης στις περιοχές Εύβοιας και Χαλκιδικής με σκοπό την αξιοποίηση της ως ένα διαγνωστικό εργαλείο για τη διάκριση της χαλεπίου πεύκης ανάλογα με την περιοχή ή την απόδοση της σε ρητίνη, διαπίστωσαν ότι το 97,4% της ρητίνης αποτελείται από 40 συνολικά ενώσεις, 11 μονοτερπενικές, 12 σεσκιτερπενικές και 17 διτερπενικές.

Τα κυριότερα μονοτερπενικά συστατικά που βρήκαν ήταν το α-πινένιο με ποσοστό 90,10%, το μυρκένιο (1,48%), 3-δ-καρένιο (1,31%), λεμονένιο (1,21%) και β-πινένιο (0,68%). Από τα σεσκιτερπένια, τα κυριότερα συστατικά ήταν το β-κοπαένιο και το α-μουρολένιο.

Τα πτητικά συστατικά της ρητίνης των βελονών, των κλαδιών και των κουκουναριών μελέτησαν οι Macchioni *et al.* (2003) σε δέντρα χαλέπιας της κεντρικής Ιταλίας. Μεταξύ των διαφορετικών ιστών παρατηρούνται κάποιες μικρές ποιοτικές διαφορές αλλά όσον αφορά στην ποσοτική σύσταση οι διαφορές είναι αρκετά μεγάλες. Για παράδειγμα, η ποσότητα του α-πινένιο στις βελόνες ήταν 18,1%, στα κλαδιά 27,9% και στα κουκουναρία 53,6%, ενώ για το μυρκένιο ήταν 27,9%, 42,1% και 13,7% αντιστοίχως. Τα κυριότερα συστατικά πάντως ανεξαρτήτως του ιστού ήταν τα α-πινένιο, μυρκένιο, β-καρυοφυλλένιο, α-χουμουλένιο και α-μουουρολένιο.

Τα αιθέρια έλαια των βελονών της χαλέπιας που φύεται στην Αλγερία μελέτησαν και οι Dob *et al.* (2005). Τα κυριότερα συστατικά που εντοπίστηκαν ήταν: β-καρυοφυλλένιο (40,31%), α-χουμουλένιο (7,92%), αρομανδρενιο (7,10%), μυρκένιο (3,07%), α-πινένιο (1,23%) και σαμπινένιο (1,23%).

Τέλος, οι Nadia Fekih *et al.*, (2014) εξέτασαν τα πτητικά συστατικά των αιθέριων ελαίων που απομονώθηκαν από τα εναέρια τμήματα των δέντρων χαλέπιας πεύκης (βελόνες, κλαδιά, μπουμπούκια) στην Αλγερία. Τα κυριότερα συστατικά που εντοπίστηκαν ήταν το μυρκένιο (15,2%-32,0%), α-πινένιο (12,2%-24,5%), Ε-β-καρυοφυλλένιο (7,0%-17,1%), τερπινολένιο (1,8%-13,3%), 2-phenyl ethyl isovalerate (4,8%-10,9%), τερπινέν-4-όλη (1,0%-8,2%) και σαμπινένιο (1,5%-6,3%).

1.3.7 Κολοφώνιο

Το κολοφώνιο είναι το δεύτερο βασικό συστατικό της ρητίνης το οποίο αποτελεί το στερεό υπόλειμμα που απομένει μετά το διαχωρισμό με το τερεβινθέλαιο. Υπάρχουν διάφοροι τύποι κολοφωνίου, ανάλογα με το τμήμα του δέντρου από το οποίο προέρχεται. Το κολοφώνιο κόμμεος το οποίο απορροφάται από ζωντανά πεύκα, το κολοφώνιο ταλλελαίου το οποίο είναι ένα παραπροϊόν από χαρτοπολτό και το κολοφώνιο ξύλου το οποίο εξάγεται από δέντρα (Botham *et al.* 2008; Sadhra *et al.* 1997). Τα κολοφώνια έχουν ποικίλες χρήσεις στη βιομηχανία, συμπεριλαμβανομένων των χρωμάτων, των βερνικιών, των κολλών, των καλλυντικών και της επικάλυψης φαρμάκων (Mandaogade *et al.* 2002). Εξάγονται από πεύκα σε πολλές γεωγραφικές τοποθεσίες, συμπεριλαμβανομένης της Κίνας, της Γαλλίας, της Αμερικής, της Ινδονησίας, της Ρωσίας, της Σκανδιναβίας και της Πορτογαλίας (Botham *et al.* 2008). Είναι αδιάλυτα στο νερό, ενώ μερικά από τα συστατικά τους είναι υδατοδιαλυτά σε υψηλότερες τιμές pH. Είναι διαλυτά σε αλκοόλη, βενζόλιο, αιθέρα, παγόμορφο οξικό οξύ, έλαια, υδροξειδία αλκαλίων και τερεβινθίνη (Olivares-Pérez *et al.* 2005). Η αυξημένη τάση για κρυστάλλωση, που αποτελεί αρνητικό στοιχείο για την ποιότητα του κολοφωνίου, το κατατάσσει σε μέτριας ποιότητας κολοφώνιο.

Το κολοφώνιο αποτελείται κυρίως από ρητινικά οξέα (90%) τα οποία είναι διτερπενικά μονοκαρβοξυλικά οξέα. Το υπόλοιπο 10% αποτελείται από ουδέτερες ενώσεις οι οποίες είναι κυρίως τερπενικές και μπορούν να περιλαμβάνουν αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες και υδρογονάνθρακες (Zinkel *et al.*, 1989; Olivares-Pérez *et al.*, 2005; Souto *et al.*, 2011). Οι δομές τους συνθέτουν ένα υδρόφοβο σκελετό με προσδεδεδεμένες υδροφιλικές καρβοξυλικές ομάδες (Atta *et al.*, 2006).

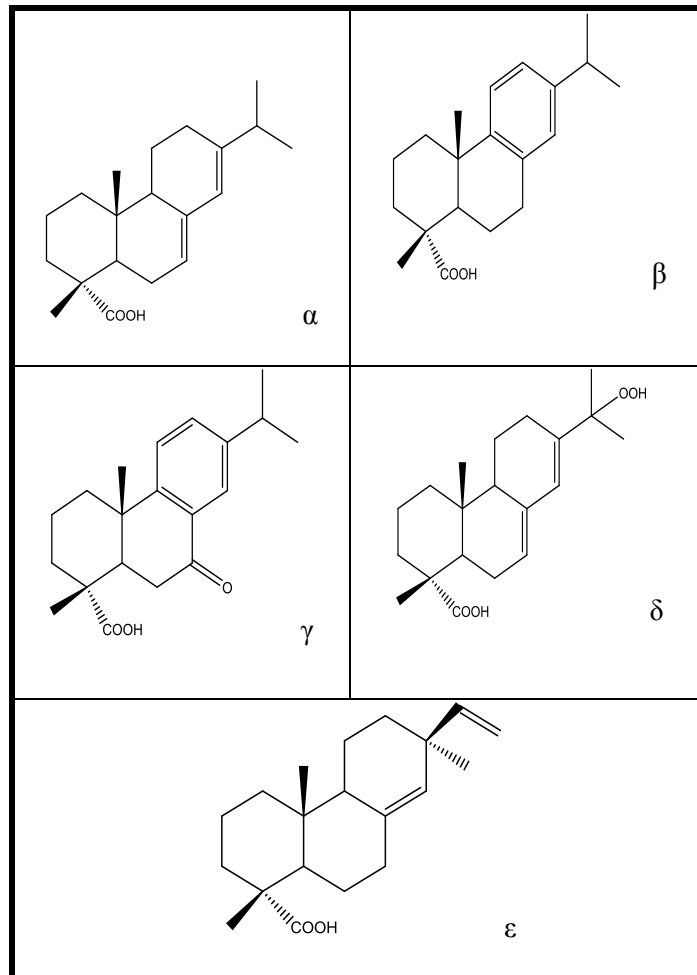
Από τις όξινες ενώσεις, το 90% είναι ισομερή αβιετικού οξέος και το 10% είναι διυδροαβιετικό οξύ και δευδροαβιετικό οξύ (Olivares-Pérez *et al.*, 2005). Τα ισομερή αβιετικού οξέος σχηματίζουν δύο ομάδες, τα αβιετικά οξέα με συζευγμένους διπλούς δεσμούς (40-60%) και τα πιμαρικά οξέα με μη συζευγμένους διπλούς δεσμούς (9-27%) (Sadhra *et al.*, 1997; Liu, 2010), (βλ. Πίνακα. 3). Τα αβιετικά οξέα περιέχουν μία ομάδα ισοπροπυλίου ενώ τα πιμαρικά οξέα έχουν ομάδα μεθυλίου και βινυλίου. Οι τιμές pKa τους κυμαίνονται από 5.7-7.25 (Zinkel *et al.*, 1989; Thanos 1978; Yamada *et al.*, 1995). Ενώ τα οξέα του πιμαρικού οξέος δεν οξειδώνονται εύκολα, τα αβιετικά οξέα οξειδώνονται εύκολα στον αέρα λόγω του συζευγμένου διπλού δεσμού (Fiebach *et al.*, 2002). Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με δυσαναλογία, πολυμερισμό, υδρογόνωση του δεσμού για να τον κορεστεί, ή αφυδρογόνωσης αυτού για να αυξηθεί η αποσταθεροποίηση που καθιστά ένα σταθερό αρωματικό δακτύλιο.

Πίνακας 3. Μερικά από τα συστατικά που αναφέρθηκαν ότι υπάρχουν στα κολοφόνια (Joye *et al.* 1967, Luong *et al.* 1999, Illing *et al.* 2009)

ΑΒΙΕΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΟΞΕΑ	ΠΙΜΑΡΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΟΞΕΑ	ΟΥΔΕΤΕΡΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ
Αβιετικό οξύ (ABA)	$\Delta^{(8,9)}$ Ισοπιμαρικό οξύ	Ισολονγκιφολένιο
Δευδροαβιετικό οξύ (DHA)	Πιμαρικό οξύ (PIM)	3-καρένιο
Διυδροαβιετικό οξύ	Ελιοτινικό οξύ	Αρομαδενδρένιο
Παλουστρικό οξύ (PAL)	Σανταρακοπιμαρικό οξύ (SAN)	α -τερπινεόλη
Νεοαβιετικό οξύ (NEO)	Ισοπιμαρικό οξύ (ISO)	Καμφένιο
Λεβοπιμαρικό οξύ (LVO)	Διυδροπιμαρικό οξύ	Λονγκιφολένιο
Διυδροπαλουστρικό οξύ	Τετραυδροπιμαρικό οξύ	α -πινένιο
Τετραυδροαβιετικό οξύ		β -πινένιο
7-οξο-δευδροαβιετικό οξύ(7- OXO)		4-Αλλυλανισόλη

Τα κυριότερα οξέα είναι το αβιετικό οξύ και το δευδροαβιετικό οξύ

(Εικ.7)



Εικόνα 7. Χημικές δομές των συστατικών κολοφώνιου.

(α)Αβιετικό οξύ, (β) Δευδροαβιετικό οξύ, (γ) 7-ο-δευδροαβιετικό οξύ. Επίσης οι δομές του κύριου αλλεργιογόνου (δ) 15-υδροπεροξυαβιετικό οξύ και (ε)πιμαρικό οξύ

Υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν θέματα υγείας που σχετίζονται με την εργασία με και γύρω από κολοφώνια καθώς είναι γνωστοί ευαισθητοποιητές του δέρματος όταν οξειδωθούν (Botham *et al.*, 2008; Burge *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1996; Karlberg *et al.*, 1995; Illing *et al.*, 2009) και σχετίζονται με καταστάσεις όπως

το άσθμα (Botham *et al.*, 2008; Burge *et al.*, 1981; Burge *et al.*, 1984) και η δερματίτιδα εξ επαφής (Sadhra *et al.*, 1997).

Η έκθεση σε ρητινικά οξέα έχει συσχετιστεί με ερεθισμούς του δέρματος, των ματιών και της αναπνευστικής οδού και μερικές οξειδωμένες μορφές είναι γνωστό ότι προκαλούν δερματίτιδα εξ επαφής. (Estlander *et al.*, 2001; Keira *et al.*, 1997; Burge *et al.*, 1980; Hausen *et al.*, 1993; Karlberg *et al.*, 1988). Οξέα ρητίνης, όπως το αβιετικό οξύ, είναι επιρρεπή στην οξείδωση (Prinz *et al.*, 2002) και οξειδωμένες μορφές, εκ των οποίων κυρίως το 15-υδροϋπεροξυαβιετικό οξύ (15-HPA), υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι οι κύριοι ευαισθητοποιητές του κολοφωνίου (Ehrin *et al.*, 1990, Karlberg *et al.*, 1991, Botham *et al.*, 2008)

Εκτενείς μελέτες έχουν εντοπισει ότι οι οξειδωμένες ενώσεις που σχηματίζονται με έκθεση στον αέρα προέρχονται κυρίως από το AbA (Karlberg 1988; Karlberg *et al.*, 1988; Karlberg, 1991; Hausen *et al.*, 1993; Gäfvert *et al.*, 1994). Ενώ το ίδιο το AbA είναι ένα ασθενές αλλεργιογόνο ή μη αλλεργιογόνο, κάποια από τα προϊόντα οξείδωσης που σχηματίζονται είναι αλλεργιογόνα. Ένα από τα πιο σημαντικά προϊόντα οξείδωσης είναι το 15-υδροϋπεροξυαβιετικό οξύ (Εικόνα 7), που είναι ένα ισχυρό αλλεργιογόνο (Karlberg *et al.*, 1988; Bråred-Christensson *et al.*, 2006; Karlberg *et al.*, 1996).

Έχουν υπάρξει λίγες κυτταροτοξικολογικές μελέτες των ενώσεων αυτών, αν και αναφέρθηκε ότι το δεϋδροαβιετικό οξύ αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο στα ανθρώπινα επιθήλια και στα κύτταρα ινοβλάστες (Söderberg *et al.*, 1996), και ασκούν τοξικές επιδράσεις στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Toivola *et al.*, 1991) και στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (Sunzel *et al.*, 1991). Το αβιετικό οξύ έχει αναφερθεί ότι προκαλεί λύση των ανθρώπινων κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων (Ayars *et al.*, 1989).

Πρόσφατα, αυτές οι ενώσεις έχουν επίσης αναφερθεί ότι παρουσιάζουν δραστηριότητα που προκαλεί βλάβη στην ανασύνδεση του DNA (Ozaki *et al.*, 2005).

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία των μελετών για την ανάλυση κολοφωνίου χρησιμοποιεί GC. Ενώ ο καλός διαχωρισμός, η ευαισθησία και η επιλεκτικότητα επιτυγχάνονται χρησιμοποιώντας GC, απαιτείται ένα στάδιο παραγωγοποίησης για τα μη πτητικά οξέα ρητίνης το οποίο είναι χρονοβόρο και καθιστά τα δείγματα μη χρησιμοποιήσιμα για περαιτέρω χρήση. Μπορεί επίσης να οδηγήσει στον σχηματισμό άλλων ανεπιθύμητων προϊόντων παραγωγοποίησης τα οποία παρεμποδίζουν την ανάλυση. Το LC έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει στο δείγμα να εγχέεται απευθείας πάνω στη στήλη χωρίς την ανάγκη παραγωγοποίησης. Οι χρόνοι ανάλυσης HPLC έχουν δειχθεί ότι είναι μικρότεροι από τους χρόνους GC (30-55 λεπτά σε σύγκριση με 35-120 λεπτά) και η ευαισθησία είναι συγκρίσιμη. Επίσης, έχει παρατηρηθεί καλύτερη ανάλυση χρησιμοποιώντας GC, αλλά η δυνατότητα βελτιστοποίησης της μεθόδου HPLC δεν έχει εξερευνηθεί πλήρως, καθώς δεν έχει γίνει ακόμη μεγάλη ανάλυση των δειγμάτων κολοφωνίου με HPLC. Στην παρούσα εργασία τα ρητινικά οξέα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

1.4 Αναλυση αιθεριου ελαιου

1.4.1 Τρόποι παραλαβής

Οι κλασικές μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων είναι η απόσταξη, η εκχύλιση (κυρίως για άνθη ή άλλα φυτικά υλικά ευπαθή στην απόσταξη) και η μηχανική έκθλιψη (Σουλελής, 2000; Bicchi, 2000). Διεθνώς ως «αιθέριο έλαιο» ορίζεται το προϊόν παραλαβής με απόσταξη με ατμό (steam distillation, SD), υδροαπόσταξη (hydrodistillation, HD), ή έκθλιψη (expression) του φυτού ή μέρους αυτού (Bicchi, 2000).

Η απόσταξη είναι η πιο διαδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων. Πάραυτα υπάρχουν διάφορα είδη εξαγωγής προκειμένου να απομονωθούν τα αιθέρια έλαια από το λουλούδι, το φλοιό, τους σπόρους, τα φύλλα, τις ρίζες ή της ρητίνες εν προκειμένω, των φυτών:

- υδροαπόσταξη (hydrodistillation, HD)
- απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation, SD), με χρήση συσκευής Clevenger
- μικροαπόσταξη με υδρατμούς, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (microsteam distillation extraction, MSDE), με χρήση συσκευής Lickens- Nickerson
- απόσταξη με κενό (vacuum head space distillation, VHSD)
- παραλαβή στο χώρο πάνω από το φυτό (head space, HS).

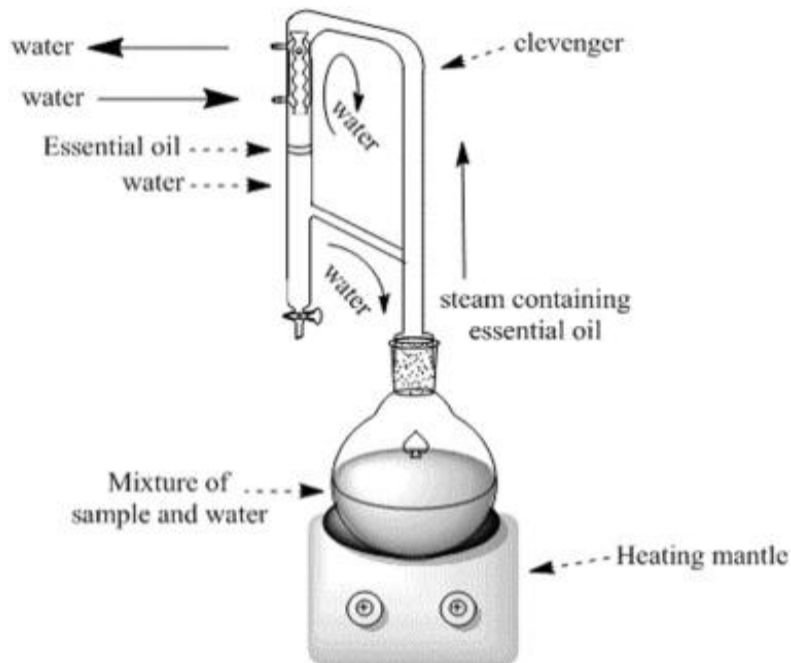
Σε πιο πρόσφατες μελέτες για την παραλαβή πτητικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί κάποιες τεχνικές εκχύλισης, όπως:

- μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase microextraction, SPME)
- εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (super critical fluids, SCF).

Όλες οι παραπάνω τεχνικές παρουσιάζουν κατά την αξιολόγησή τους πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Ωστόσο, οι κλασικές μέθοδοι απομόνωσης των πτητικών συστατικών στα οποία οφείλεται το άρωμα των φυτών είναι η απόσταξη με υδρατμούς και η εκχύλιση με διαλύτη.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η παραλαβή των αιθερίων ελαίων από τις ρητίνες του είδους *Pinus halepensis*, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation, SD), με χρήση συσκευής Clevenger.

1.4.2 Απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation, SD), με χρήση συσκευής Clevenger.



Εικόνα 8. Απεικόνιση της αποστακτικής συσκευής Clevenger

Η συσκευή της υδροαπόσταξης που χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα ονομάζεται Clevenger (Εικ.8). Η συσκευή αυτή χρησιμοποιείται για τον εργαστηριακό έλεγχο της συνολικής περιεκτικότητας αιθερίων ελαίων σε μικρές ποσότητες αρωματικών φυτών. Στην υδροαπόσταξη, το προς απόσταξη φυτικό υλικό, τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Το χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή. Το υλικό, ανάλογα με το ειδικό του βάρος, επιπλέει ή βρίσκεται βυθισμένο στο νερό. Σημαντικό ακόμη είναι να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, ώστε να μη συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθερίου ελαίου.

Οι υδρατμοί που σχηματίζονται μαζί με τα πτητικά συστατικά, ρέουν προς τον ψυκτήρα, ο οποίος ψύχεται με κυκλοφορία νερού βρύσης, με αποτέλεσμα τη συμπύκνωση των ατμών. Το αποσταζόμενο νερό ανακυκλώνεται επιστρέφοντας στη φιάλη, ενώ η φάση του αιθερίου ελαίου, που είναι υπερκείμενη της υδατικής φάσης, συλλέγεται σταδιακά στο βαθμονομημένο (σε mL) κυλινδρικό σωλήνα της συσκευής. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν η ποσότητα του αιθερίου ελαίου που έχει συλλεχθεί δεν αυξάνεται επιπλέον. Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων με απόσταξη διαρκεί 1-3 ώρες, ανάλογα με το είδος και την ποσότητα του αιθερίου ελαίου. Με τη μέθοδο αυτή απομονώνονται πολλά πτητικά αιθέρια έλαια χωρίς τον κίνδυνο αποσύνθεσής τους, αφού αποστάζουν σε θερμοκρασίες κάτω των 100 °C (Σ.Ζ νερού). Η απόσταξη γίνεται συνήθως σε ατμοσφαιρική πίεση και σε ειδικές περιπτώσεις σε ελαττωμένη ή σε υψηλή πίεση.

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο απλή, εύχρηστη και οικονομική μέθοδος για την απόσταξη αιθερίων ελαίων, αλλά έχει και κάποια μειονεκτήματα, όπως ότι απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος απόσταξης, η απόδοση σε αιθέριο έλαιο είναι σχετικά μικρή και το αιθέριο έλαιο είναι κατώτερης ποιότητας, λόγω αποσύνθεσης διαφόρων συστατικών (υδρόλυση εστέρων, πολυμερισμός μονοτερπενίων).

2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΗΣ ΧΑΛΕΠΙΟΥ ΠΕΥΚΗΣ

Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται συνήθως με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) με ανιχνευτή φασματόμετρου μαζών (Mass Spectrometer, MS). Η φασματομετρία μάζας είναι ο ιδανικός ανιχνευτής στην αεριοχρωματογραφία, καθώς παρέχει τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές πληροφορίες, έχει μεγάλη ευαισθησία και μπορεί να διαχωρίσει με μεγάλη ακρίβεια τα συστατικά ενός μείγματος. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 άρχισε η εμφάνιση στην αγορά φασματογράφων μαζών ειδικά κατασκευασμένων για να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές αεριοχρωματογραφίας. Η άμεση σύζευξη αεριοχρωματογράφου με φασματογράφο μαζών ταχείας σάρωσης, παρέχει τη συζευγμένη τεχνική (hyphenated technique) Αεριοχρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (GC-MS), με την οποία εξάγονται αναλυτικά αποτελέσματα μεγαλύτερης ακρίβειας και αξιοπιστίας από αυτά που παράγει η κάθε μία τεχνική χωριστά. Τα όργανα GC-MS έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση εκατοντάδων συστατικών που βρίσκονται σε φυσικά και βιολογικά δείγματα, όπως για την ταυτοποίηση των συστατικών με χαρακτηριστική οσμή σε διάφορα τρόφιμα, την ταυτοποίηση ρυπαντών υδάτων, την ιατρική διάγνωση με βάση τα συστατικά εκπνοής και τις μελέτες μεταβολιτών φαρμάκων.

Η *Αεριοχρωματογραφία* είναι μία τεχνική διαχωρισμού των συστατικών πολύπλοκων μειγμάτων, η οποία απευθύνεται κυρίως σε μείγματα που αποτελούνται από πτητικές ουσίες ή ουσίες που μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Επίσης, τα αεριοχρωματογραφήματα που παρέχονται από την τεχνική αυτή, χρησιμοποιούνται ευρύτατα και ως κριτήρια καθαρότητας οργανικών ενώσεων.

Η εφαρμογή όμως της Αεριοχρωματογραφίας, περιορίζεται στην ποιοτική ανάλυση, καθώς η αξιοποίηση των δεδομένων δεν επαρκεί για πλήρη ποσοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των συστατικών του αναλυόμενου δείγματος. Η ποσοτική ανάλυση επιτυγχάνεται σε συνδυασμό με την *Φασματομετρία Μάζας*, η οποία αποτελεί αξιόπιστη τεχνική ταυτοποίησης των συστατικών του μείγματος. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός ότι, τα φασματόμετρα μαζών διακρίνουν τις μάζες ισοτόπων, σε αντίθεση με τα άλλα αναλυτικά όργανα (Skoog *et al.*, 2007).

Η φασματοσκοπία Raman και η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) είναι επίσης κάποιες αξιόπιστες τεχνικές, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως συμπληρωματικές του MS για την ταυτοποίηση πολύπλοκων μιγμάτων καθώς μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή χημικών μορίων λόγω της ικανότητας τους να διαχωρίζουν τα ισομερή και να εντοπίζουν τις χαρακτηριστικές ομάδες των μορίων. Η σύγκριση φασμάτων IR και Raman μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη συμμετρία ή μη ενός μορίου.

2.1 Αρχές Αέριας Χρωματογραφίας (Gas Chromatography)

Αρχικά, υπάρχουν δύο τύποι αεριοχρωματογραφίας: α) η χρωματογραφία αερίου-στερεού (gas-solid chromatography, GSC) και β) η χρωματογραφία αερίου-υγρού (gas-liquid chromatography, GLC). Η χρωματογραφία αερίου-υγρού χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών, γι' αυτό τον λόγο αναφέρεται πιο απλά ως αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC).

Ανάλογα με τη φύση των στατικών και των κινητών φάσεων στις χρωματογραφικές μεθόδους, καθώς και το είδος των ισορροπιών που εμπλέκονται στην ανταλλάγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των δύο φάσεων, διακρίνονται τρεις γενικές κατηγορίες: η υγροχρωματογραφία, η αεριοχρωματογραφία και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical-fluid chromatography). Από τις ονομασίες αυτές γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι, η αεριοχρωματογραφία είναι μία τεχνική, κατά την οποία ο αναλύτης κατανέμεται σε διαφορετικό βαθμό μεταξύ μιας κινητής φάσης (mobile phase) που είναι ένα αέριο και μιας στατικής φάσης (stationary phase) που είναι διαφορετική στην χρωματογραφία αερίου-στερεού και αερίου-υγρού. Ειδικότερα, σε κάθε μία μέθοδο ισχύουν τα εξής:

α) Χρωματογραφία αερίου-στερεού (gas-solid chromatography, GSC):

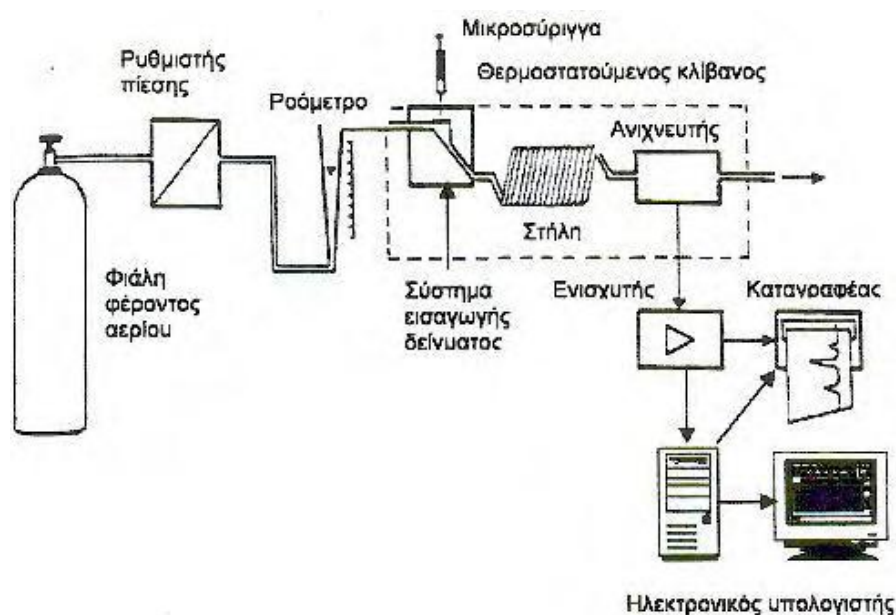
βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι περιορισμένη, λόγω της σχεδόν μόνιμης κατακράτησης δραστικών ή πολικών μορίων και της έντονης εμφάνισης ουράς στις κορυφές έκλυσης που οφείλεται στην μη γραμμικότητα του μηχανισμού προσρόφησης.

β) Χρωματογραφία αερίου-υγρού (gas-liquid chromatography, GLC):

βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής φάσης και μιας υγρής στατικής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. Μερικές κοινές στατικές φάσεις για χρωματογραφία αερίου-υγρού είναι το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, το πολυ (φαινυλομεθυλοδιμεθυλο) σιλοξάνιο, το πολυ (φαινυλομεθυλο) σιλοξάνιο, το πολυ (τριφθοροπροπυλοδιμεθυλο) σιλοξάνιο, η πολυ (αιθυλενογλυκόλη) και το πολυ (διακυανοαλλυλοδιμεθυλο) σιλοξάνιο (Skoog *et al.*, 2007).

Γενικά, τα βασικά τμήματα ενός αεριοχρωματογράφου είναι τα εξής:

- 1) Τροφοδοσία φέροντος αερίου (carrier gas)
- 2) Ρυθμιστής πίεσης και ροόμετρο
- 3) Σύστημα έγχυσης δείγματος
- 4) Στήλη τοποθετημένη σε θερμοστατούμενο φούρνο
- 5) Ανιχνευτής
- 6) Ενισχυτής σήματος
- 7) Καταγραφικό – Η/Υ



Εικόνα 9. Απεικόνιση των βασικών τμημάτων ενός αεριοχρωματογράφου

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος γίνεται μέσω εκλεκτικών προσροφήσεων ή κατανομών τους μεταξύ μιας υγρής ή στερεάς στατικής φάσης και μιας αέριας κινούμενης φάσης μέσα στη στήλη της χρωματογραφίας. Συνήθως, ως *φέροντα αέρια*, τα οποία αποτελούν την κινητή φάση, χρησιμοποιούνται το ήλιο (He), το άζωτο (N) ή το υδρογόνο (H), τα οποία πρέπει να είναι χημικώς αδρανή, έτσι ώστε να μην αλληλεπιδρούν με τα μόρια του αναλύτη, διότι ο μόνος τους ρόλος είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Επιπλέον, η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου ρυθμίζεται με ρυθμιστή πίεσης και μπορεί να μετρηθεί με ροόμετρο στην κεφαλή της στήλης. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Η παροχή του αερίου ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα.

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία διακρίνονται σε δύο είδη: τις πληρωμένες (ή ‘πακεταρισμένες’, packed) και β) τις στήλες ανοικτού σωλήνα (open tubular) ή τριχοειδείς (capillary). Οι πληρωμένες στήλες μπορεί να είναι κατασκευασμένες από γυάλινους σωλήνες, μεταλλικούς (από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αλουμίνιο) ή πλαστικούς (από Teflon) και έχουν μορφή σπειράματος με διάμετρο περίπου 15 cm για να είναι εύκολη η τοποθέτησή τους στον θερμοστατούμενο κλίβανο. Όσον αφορά τις ανοικτούσωλήνα ή τριχοειδείς στήλες, οι οποίες είναι αποτελεσματικότερες και μεγαλύτερης απόδοσης από τις πληρωμένες, οι δύο βασικοί τύποι στους οποίους διακρίνονται είναι οι στήλες ανοικτού σωλήνα με επικάλυψη τοιχωμάτων (wall-coated open tubular, WCOT), όπου το εσωτερικό τους τοίχωμα είναι επικαλυμμένο με λεπτό στρώμα στατικής φάσης και οι στήλες ανοικτού σωλήνα με επικάλυψη υλικού στήριξης (support-coated, open tubular column, SCOT), όπου το εσωτερικό τους τοίχωμα καλύπτεται με λεπτό υμένιο ($\approx 30 \mu\text{m}$) υλικού στήριξης, όπως είναι η γη διατόμων.

Συνθήκες ανάλυσης, όπως η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, δηλαδή του φέροντος αερίου, η ταχύτητα έγχυσης του δείγματος, η θερμοκρασία της στήλης, το είδος της στήλης και το μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού, ο τύπος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται είναι πολύ σημαντικές για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των επιμέρους συστατικών.

2.1.1 Ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων

Η ποιοτική ανάλυση και ταυτοποίηση των συστατικών ενός δείγματος με τη συζευγμένη τεχνική Αεριοχρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (GC-MS), είναι εφικτή με τον προσδιορισμό των παρακάτω σημαντικών παραμέτρων:

- με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης του άγνωστου συστατικού με αυτόν του πρότυπου,
- με τη μέθοδο του εμβολιασμού (spiking), δηλαδή με προσθήκη στο δείγμα μετά τη λήψη του πρώτου χρωματογραφήματος, μικρής ποσότητας από την ουσία που θέλουμε να ανιχνεύσουμε,
- με προσδιορισμό του δείκτη συγκράτησης Kovats (Kovats retention index)

Στην περίπτωση ισόθερμης έκλουσης, με τον οποίο γίνεται σύγκριση του χρόνου κατακράτησης της άγνωστης ουσίας ($t_{Rχ}$) με τον χρόνο συγκράτησης δύο προτύπων αλκανίων (t_{RA}), των οποίων οι κορυφές πρέπει να περιβάλλουν την κορυφή της ουσίας. Για θερμοπρογραμματιζόμενη έκλουση, χρησιμοποιείται ο ορισμός των van der Dool και Kratz για την εύρεση του δείκτη συγκράτησης. Ο δείκτης συγκράτησης ενός κανονικού αλκανίου είναι ανεξάρτητος της θερμοκρασίας, του υλικού και τρόπου πλήρωσης της στήλης ή άλλες χρωματογραφικές παραμέτρους. Αντίθετα, ο δείκτης συγκράτησης μιας ένωσης δεν είναι σταθερός και μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις παραμέτρους της στήλης (Skoog et al., 2007).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών γίνεται με:

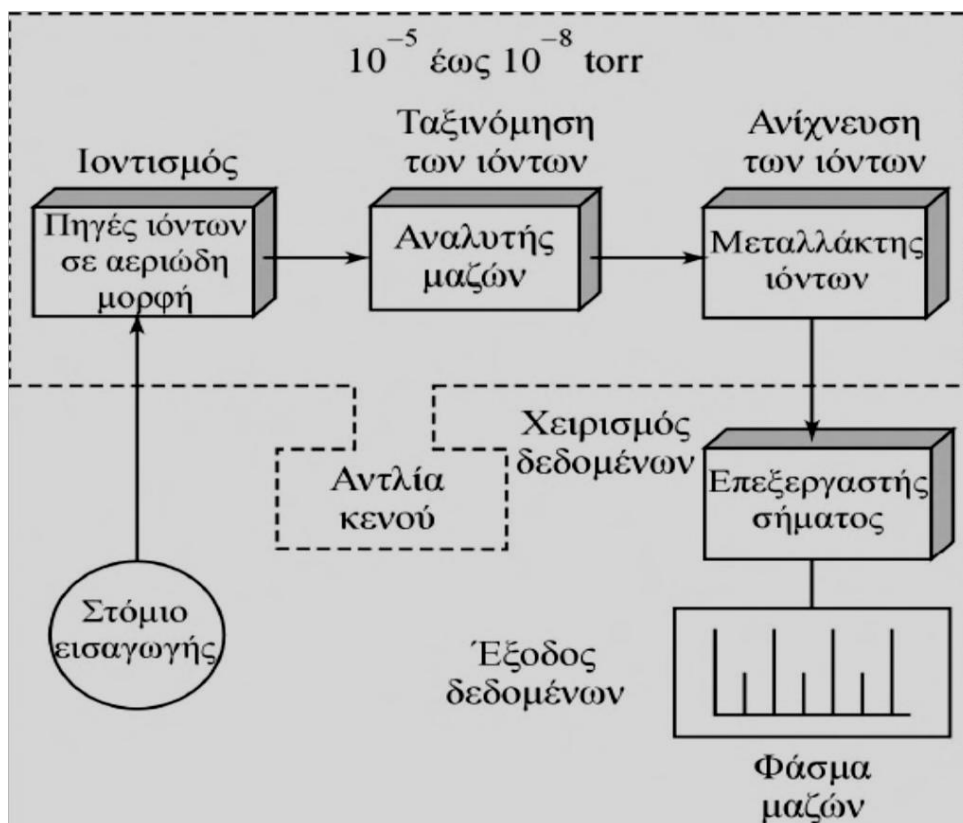
- βάση το % εμβαδού (percentage of total)
- μέθοδο εξωτερικού προτύπου (external standard)
- μέθοδο εσωτερικού προτύπου (internal standard).

Επιπρόσθετα, για την ταυτοποίηση μιας ουσίας λαμβάνονται υπόψη τα φάσματα μαζών των καθαρών δειγμάτων των πιθανών ενώσεων, όπως και αξιόπιστες βιβλιοθήκες φασματικών δεδομένων.

Το φασματόμετρο μαζών (mass spectrometer) είναι ένα όργανο, το οποίο διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση τον λόγο μάζας-προς-φορτίο, m/z . Τα περισσότερα ιόντα που σχηματίζονται κατά την ανάλυση είναι μονοφορτισμένα, επομένως ο λόγος m/z είναι απλά η μάζα του ιόντος. Έχουν κατασκευαστεί διάφοροι τύποι φασματομέτρων, όπως φασματόμετρο μαγνητικού τομέα, φασματόμετρο διπλής εστίασης, τετραπολικό φασματόμετρο μαζών, φασματόμετρο ‘χρόνου πτήσης’, φασματόμετρο παγίδευσης ιόντων, φασματόμετρο κινητικότητας ιόντος, φασματόμετρο μαζών με μετασχηματισμό Fourier (Harris, 2009).

Συνοπτικά, τα βασικά τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών είναι:

- Το σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Η πηγή ιόντων σε αεριώδη μορφή
- Ο αναλυτής μαζών
- Ο ανιχνευτής
- Ο ενισχυτής-επεξεργαστής σήματος
- Καταγραφικό-H/Y

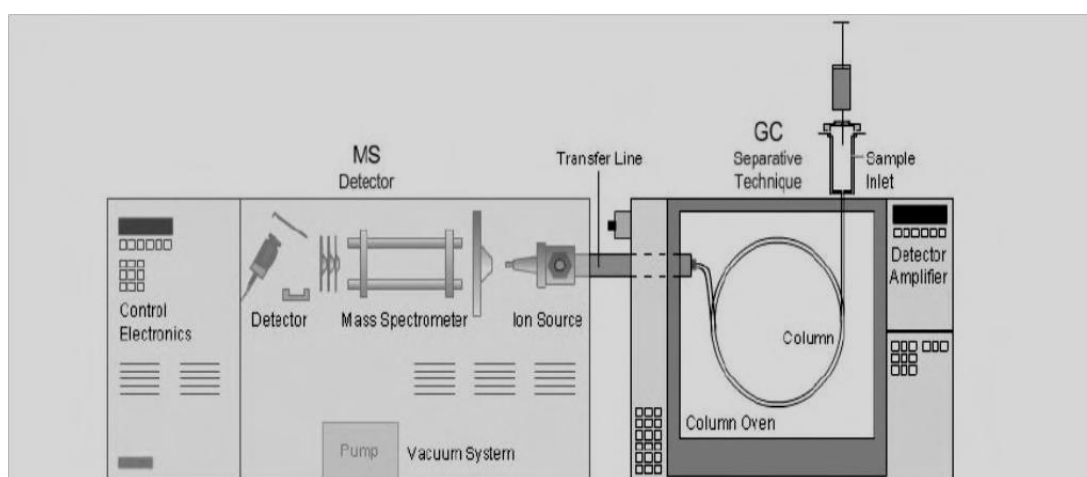


Εικόνα 10: Διάγραμμα ενός φασματομέτρου μαζών

(Πηγή: Skoog et al., 2007)

Η ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία άμεσα συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS) επιτρέπει την είσοδο των εκλουόμενων ουσιών του δείγματος από τη χρωματογραφική στήλη στο φασματόμετρο μαζών. Τα βασικά στάδια ανάλυσης με φασματόμετρο μαζών είναι τα ακόλουθα: 1) μετατροπή των ενώσεων του δείγματος από την χρωματογραφική στήλη σε ιόντα (συνήθως μονοφορτισμένα θετικά ιόντα) στην αέρια φάση μετά από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, φωτόνια, ιόντα, ή μόρια, καθώς επίσης με θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια, 2) επιταχύνση των ιόντων με εφαρμογή υψηλού ηλεκτρικού δυναμικού και με παραγωγή κενού προς τον αναλυτή μαζών και διαχωρισμός αυτών με βάση τον λόγο m/z , 3) κατεύθυνση των

ιόντων με συγκεκριμένο λόγο m/z προς τον ανιχνευτή, 4) μετατροπή της ιοντικής δέσμης σε ηλεκτρικό σήμα, 5) περαιτέρω επεξεργασία και αποθήκευση στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, 6) καταγραφή και παρουσίαση της απόκρισης του ανιχνευτή ως προς το m/z στο φάσμα μάζας (Hussain, Maqbool, 2014) (Εικ. 10).



Εικόνα 11. Σχηματικό διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου συζευγμένου με φασματογράφο μαζών (GC/MS) (Hussain S.Z., Maqbool K., 2014)

Σε ένα φάσμα μάζας το ιόν με το μεγαλύτερο m/z , που έχει το ίδιο μοριακό βάρος με το μόριο του αναλύτη ονομάζεται μοριακό ιόν, ενώ η κορυφή με τη μεγαλύτερη ένταση απορρόφησης ονομάζεται κύρια ή βασική κορυφή (Harris, 2009).

2.1.2 Δείκτης συγκράτησης (RI)

Για την ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών που συνιστούν το προς ανάλυση δείγμα, μία σημαντική παράμετρος που μελετάμε είναι ο χρόνος παραμονής (retention time) της κάθε ουσίας στη χρωματογραφική στήλη. Είναι γεγονός, βέβαια, πως οι εργαστηριακές συνθήκες από ένα ερευνητικό εργαστήριο σε κάποιο άλλο ή ακόμη και στο ίδιο, δεν είναι πανομοιότυπες και απόλυτα ελεγχόμενες κάθε φορά. Έτσι, συχνά συναντάμε αποκλίσεις και σφάλματα κατά την χρήση των απλών χρόνων παραμονής των ουσιών στη χρωματογραφική στήλη. Ενδεικτικά, στην αέριο χρωματογραφία οι συνθήκες που μπορεί να διαφέρουν είναι η θερμοκρασία, ο τύπος της στατικής φάσης, το μήκος της χρωματογραφικής στήλης, η ροή του φέροντος αερίου και άλλοι

παράγοντες. Έτσι γίνεται χρήση μιας άλλης παραμέτρου, η οποία σχετίζεται με το χρόνο παραμονής (retention time) της ουσίας στη στήλη σε σχέση με τον χρόνο παραμονής n-αλκανίων, αλλά είναι ανεξάρτητη των εργαστηριακών συνθηκών, εξαλείφοντας τις αποκλίσεις και παρέχοντας σταθερά κι επαναλήψιμα αποτελέσματα.

Πρώτος ο Kovats πρότεινε το Σύστημα Δεικτών Κατακράτησης (Kovats'Retention Index System) και η τροποποίηση του σε συνθήκες θερμοκρασίας που δεν είναι σταθερή, επιτρέπει τα αποτελέσματα που έχουν μετρηθεί σε κάποιο εργαστήριο να χρησιμοποιηθούν από κάποιο άλλο. Το σύστημα αυτό συνδυάζει δύο θεμελιώδεις ιδιότητες της αέριου χρωματογραφίας: το σχετικό χρόνο κατακράτησης και τον ειδικό όγκο κατακράτησης. Μεταφορικά θα λέγαμε, ότι ο Kovats πρότεινε ένα χημικό κανόνα για να χαρακτηρίσει διαφορετικές χημικές ενώσεις με βάση μια κλίμακα ειδικού χρόνου με στόχο την ταυτοποίηση των ενώσεων.

Σύμφωνα με τον Kovats ο δείκτης ενός αναλυτή, μιας ουσίας, είναι ο σχετικός χρόνος ανάμεσα στα πλησιέστερα n- αλκάνια τα οποία εκλύονται αμέσως πριν και αμέσως μετά από τον άγνωστο αναλυτή. Οι δείκτες κατακράτησης του Kovats ή Kovats Retention Index για ισοθερμικές αναλύσεις δίνονται από τη μαθηματική σχέση:

$$IX=100n+100[\log(t'x)-\log(t'n)]/[\log(t'n+1)-\log(t'n)]$$

όπου

□ $t'n$: ο χρόνος συγκράτησης του n-αλκανίου που εκλύεται αμέσως πριν από την άγνωστη ένωση.

□ $t'n+1$: ο χρόνος συγκράτησης του n-αλκανίου που εκλύεται αμέσως μετά από την άγνωστη ένωση.

□ $t'x$: ο χρόνος συγκράτησης της άγνωστης ένωσης. Στην περίπτωση μη ισοθερμικών αναλύσεων η μαθηματική αυτή σχέση, σύμφωνα με τον ορισμό των Van den Dool και Kratz για μετρήσεις επί προγραμματισμένων θερμοκρασιών διαμορφώνεται ως εξής:

$$IX=100n+100(tx -tn)/(tn+1 -tn)$$

όπου t_n , t_{n+1} και t_x οι χρόνοι συγκράτησης του n-αλκανίου που εκλύεται αμέσως πριν την έκλυση της άγνωστης ένωσης, του n- αλκανίου που εκλύεται αμέσως μετά την άγνωστη ένωση και της άγνωστης ένωσης αντίστοιχα (Babushok *et al.*, 2011).

2.1.3 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

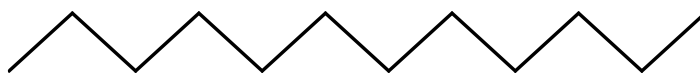
Για την ποσοτικοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του εσωτερικού προτύπου. Εσωτερικό πρότυπο είναι ένα συστατικό ή μίγμα συστατικών γνωστής συγκέντρωσης το οποίο προστίθεται στο προς ανάλυση δείγμα ακριβώς πριν την εισαγωγή του για ανάλυση. Το σήμα από τον αναλυτή για κάθε συστατικό συγκρίνεται με αυτό του εσωτερικού προτύπου για να προσδιορισθεί η συγκέντρωσή του.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα μιας ουσίας, που αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο, προστίθεται σε κάθε πρότυπο διάλυμα και σε κάθε δείγμα. Ως αναλυτική παράμετρος χρησιμοποιείται ο λόγος της επιφάνειας ή ύψους της κορυφής του αναλύτη προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου.

Για να είναι επιτυχής η μέθοδος, είναι απαραίτητο:

- (α) η κορυφή του εσωτερικού προτύπου να διαχωρίζεται καλά από τις κορυφές των άλλων συστατικών του δείγματος ($R_s > 1,25$)
- (β) Η κορυφή του προτύπου να μην απέχει πολύ από την κορυφή του αναλύτη.

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε ως εσωτερικό πρότυπο ο υδρογονανθρακας δωδεκάνιο (Εικ. 12) που πληροί τα παραπάνω κριτήρια ως εσωτερικό πρότυπο, ως προς την δομή με τα μετρούμενα τερπένια και επίσης δεν συνεκλύεται με κάποιο άλλο συστατικό των δειγμάτων.



Εικόνα 12 . Δομή δωδεκανίου

2.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infra Red spectroscopy, IR) είναι μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές και μαζί και με την φασματοσκοπία υπεριώδους έχουν βρει τις περισσότερες εφαρμογές. Η διαδικασία λήψης του φάσματος είναι σχετικά εύκολη έναντι χρωματογραφικών εφαρμογών ενώ και η μετέπειτα σύγκριση και ανάλυση του φάσματος είναι εύκολη. Η τεχνική της σύγκρισης ολόκληρων ή περιοχών φασμάτων με φάσματα γνωστών ουσιών είναι η πιο συνήθης. Με την απλή αυτή τεχνική λαμβάνονται πολύ γρήγορα πληροφορίες για την δομή μορίων και ειδικά επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ή μη χαρακτηριστικών ομάδων. Πολλές τέτοιου είδους εφαρμογές έχουν βρεθεί και χρησιμοποιούνται στην οργανική σύνθεση, την ανάλυση φυσικών προϊόντων αλλά και σε τρόφιμα, πολυμερή και παράγωγα πετρελαίου. Το όνομα της μεθόδου προέρχεται από την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που ονομάζεται υπέρυθρη και βρίσκεται μεταξύ του ορατού και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm). Η περιοχή του υπερύθρου χωρίζεται περαιτέρω σε τρεις υπο-περιοχές και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: Άπω υπέρυθρη (Far IR, FIR) (50- 1000 μm) , μέσο υπέρυθρη (Mid IR, MIR) (2,5-50 μm) και εγγύς υπέρυθρη (Near IR, NIR) (0,75-2,5 μm). Έχει επικρατήσει στην ορολογία της φασματοσκοπίας αντί να αναφερόμαστε στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα, να χρησιμοποιούμε τους κυματαριθμούς ($\tilde{\nu}$). Οι κυματαριθμοί είναι ένα πιο εύχρηστο μέγεθος για κύματα που κινούνται με την ταχύτητα του φωτός όπως η ακτινοβολία υπερύθρου. Οι κυματαριθμοί εκφράζουν με απλό τρόπο συγκεκριμένες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος προσδιορίζοντας μόνο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

Από το δεδομένο αυτό εύκολα προκύπτει και η συχνότητα του κύματος αν χρειαστεί. Έτσι για να την πιο κοινή περιοχή που χρησιμοποιούμε στην υπέρυθρη φασματοσκοπία, την μέσο υπέρυθρη περιοχή (Mid IR) ισχύουν τα εξής: ταχύτητα = c (ταχύτητα του φωτός) = 3×10^8 m/sec μήκος κύματος = $\lambda = 2,5 - 50 \mu\text{m}$ και οι κυματαριθμοί $\tilde{\nu} = \nu/c = 1/\lambda$ κυμαίνονται μεταξύ 400 και 4000 cm^{-1} με απλή αντικατάσταση στους τύπους (Βαλαβανίδης, 2006).

Η επίδραση της υπέρυθρης ακτινοβολίας επί των μορίων της ύλης είναι γνωστό ότι προκαλεί διεγέρσεις των δεσμών των ατόμων σε ανώτερες ενεργειακές στάθμες από αυτές της ισορροπίας, κατά το πρότυπο του αρμονικού ταλαντωτή. Από την κατάσταση ισορροπίας όπου το μήκος του δεσμού είναι $r_{\text{ισορ.}}$ για να μεταφερθεί ο δεσμός σε συστολή ή διαστολή σε μήκος δεσμού r' πρέπει να προσφερθεί ενέργεια ίση με

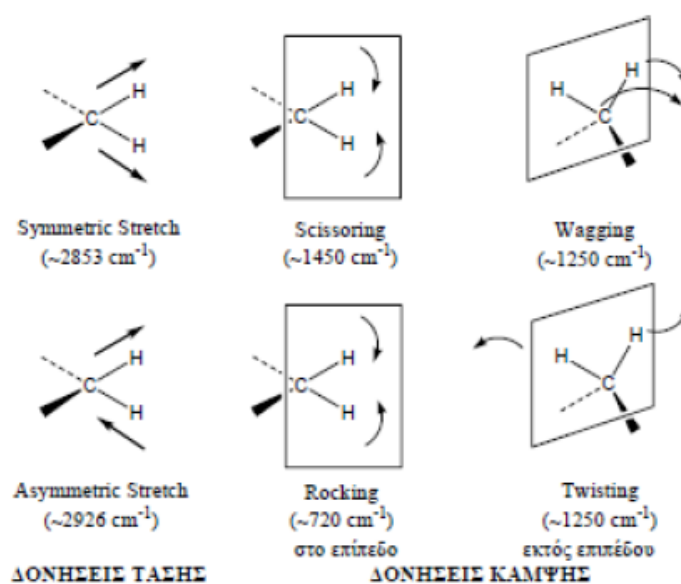
$$E = \frac{1}{2} f (r - r_{\text{ισορ.}})^2$$

Εξίσωση 1. Νόμος του Hooke

Οι συχνότητες απορρόφησης αντιστοιχούν στις ποσότητες ενέργειας που απαιτούνται για να αυξηθεί το πλάτος συγκεκριμένων μοριακών δονήσεων, όπως οι τάσεις (stretching) και οι κάμψεις (bending) των δεσμών. Η δόνηση τάσης χαρακτηρίζεται από μια συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους. Η δόνηση κάμψης χαρακτηρίζεται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δύο δεσμών και μπορεί να είναι τεσσάρων ειδών: ψαλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging), ή συστρεφόμενη (twisting) (Εικ.13). Κάθε κορυφή του υπέρυθρου φάσματος αντιστοιχεί σε μια κανονική μορφή δόνησης του συγκεκριμένου χημικού είδους.

Κάθε κανονικός τρόπος δόνησης ο οποίος προκαλεί μεταβολή στη διπολική ροπή του εξεταζόμενου χημικού είδους, είναι ενεργός δόνηση κατά IR.

Σύμφωνα με την κλασική θεωρία, αν ένα ετεροπυρηνικό διατομικό μόριο δονείται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα, η μοριακή διπολική ροπή επίσης ταλαντώνεται γύρω από την τιμή ισορροπίας της. Το ταλαντούμενο δίπολο απορροφά ενέργεια από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μόνο αν το τελευταίο ταλαντώνεται με την ίδια συχνότητα του διπόλου.



Εικόνα 13. Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δονήσεων μιας ομάδας -CH₂ και οι περιοχές απορρόφησης στην υπέρυθρη περιοχή (Pecksok et al., 1980).

Απαραίτητη όμως προϋπόθεση για την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής του κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι τα πολύ συμμετρικά μόρια δεν απορροφούν στη περιοχή αυτή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ενώ για την περίπτωση αυτή εξετάζεται η φασματοσκοπία Raman παρακάτω.

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Τη περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (O-H, NH₂, C≡N, C=O κλπ) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στη περιοχή 4000-1400 cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, η δε δεύτερη στην περιοχή 1400-600 cm⁻¹ στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολοκλήρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» finger print κάθε ένωσης (Βαλαβανίδης, 2006).

Όπως θα δούμε παρακάτω, στην πρακτική εφαρμογή της λήψης φάσματος IR παρουσιάζονται ζητήματα που περιλαμβάνουν την ουσία των ιδιοτήτων που εκμεταλλευόμαστε από την υπέρυθρη φασματοσκοπία. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε η χρήση μαθηματικής μετατροπής των ψηφιακών δεδομένων γνωστή και σαν μετατροπή βασισμένη σε αλγόριθμους του Fourier. Η μετατροπή των δεδομένων με τον τρόπο αυτό έδωσε το όνομά της στην μοντέρνα τεχνική λήψης φασμάτων, Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR). Το όργανο που χρησιμοποιείται για την λήψη των φασμάτων αυτών λέγεται φασματοφωτόμετρο FT-IR

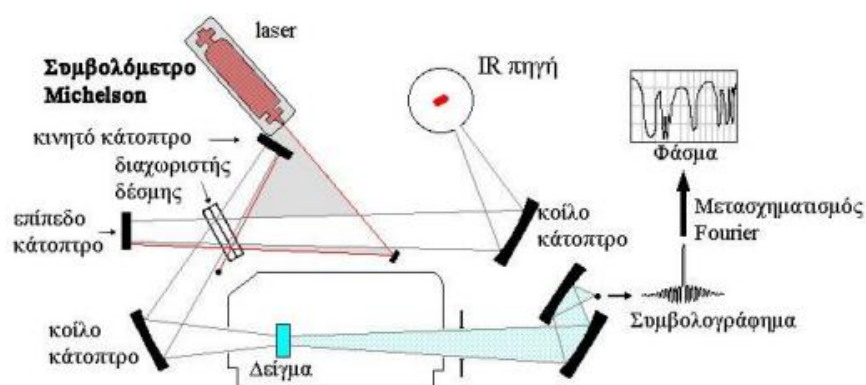
2.2.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier, (Fourier Transform Infrared, FTIR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές και βρίσκει πολλές εφαρμογές λόγω της υψηλής ταχύτητας και της ευαισθησίας της. Έχει επεκτείνει σε μεγάλο βαθμό τις δυνατότητες της φασματοσκοπίας IR και εφαρμόζεται σε περιοχές που είναι πολύ δύσκολο ή σχεδόν αδύνατο να αναλυθούν με την κοινή φασματοσκοπία IR. Σε ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR, αντί να εμφανίζεται η συχνότητα κάθε συστατικού διαδοχικά, όπως σε ένα κοινό φασματόμετρο IR, όλες οι συχνότητες εξετάζονται συγχρόνως. Έτσι ένα πλήρες φάσμα μπορεί να ληφθεί κατά τη διάρκεια μιας σάρωσης, ενώ ο ανιχνευτής εξετάζει όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα (Khan *et al.*, 2012).

Η καταγραφή φασμάτων με μετασχηματισμό κατά Fourier παρουσιάζει, εκτός των άλλων, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Ως «θόρυβος» ορίζονται εκείνα τα σήματα, τα οποία δεν αντιστοιχούν σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος και ο οποίος καθορίζει την ποιότητα και κατ' επέκταση την αξιολόγηση ενός φάσματος. Για την αξιολόγηση των σημάτων, χρησιμοποιείται ο όρος «λόγος σήματος προς θόρυβο, Signal to Noise Ratio, RSN» (Παππάς, 2013).

Ένα τυπικό φασματόμετρο FT-IR, αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα :

α) την πηγή υπερύθρου ακτινοβολίας, **β)** την πηγή λέιζερ, **γ)** το συμβολόμετρο Michelson και **δ)** τον ανιχνευτή.



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση φωματοφωτόμερου FTIR με συμβολόμετρο

Οι τεχνικές λήψης φάσματος διακρίνονται στις ακόλουθες:

Κλασικές τεχνικές - διαπερατότητας:

- Υγρά δείγματα: 1-2 σταγόνες δείγματος μεταξύ διαφανών πλακιδίων (παράθυρα) από υλικά που δεν απορροφούν στην περιοχή από 4000-600 cm^{-1} , όπως ZnSe, NaCl, KBr κ.ά.
- Στερεά δείγματα: Σε μορφή διαλύματος χρησιμοποιώντας κυψελίδες ή σε μορφή στερεών δισκίων, όπου 1-2 mg ουσίας αναμειγνύονται με 100-150 mg KBr και πιέζονται σε υδραυλική πρέσα για τη δημιουργία των δισκίων.
- Αέρια δείγματα: Τα δείγματα αερίων μετρούνται σε κυψελίδες, με κατάλληλα κάτοπτρα για πολλαπλές ανακλάσεις, με μεγάλη οπτική διαδρομή και υπό πίεση.

Σύγχρονες τεχνικές - ανάκλασης:

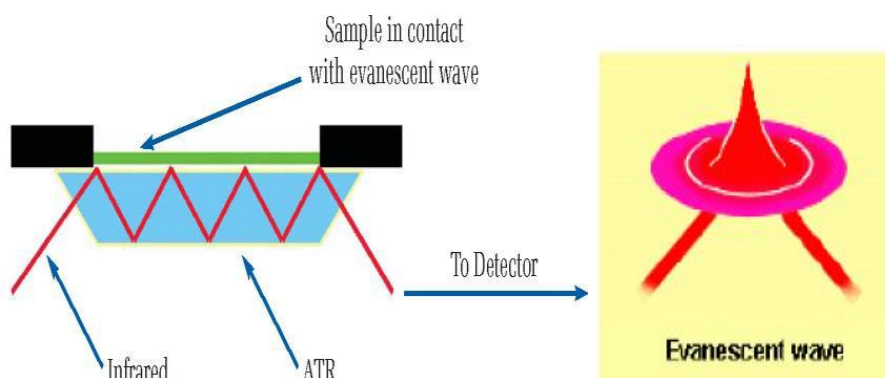
- Τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Infra-Red Fourier Transform Spectroscopy, DRIFTS).
- Τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance Spectroscopy, ATR).

2.2.2 Φάσματα IR Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR)

Ο συνηθέστερος τρόπος συλλογής φασμάτων IR είναι με την διάταξη της διαπερατότητας. Ωστόσο μόνο ορισμένα υλικά είναι αρκετά διαφανή και λεπτά ώστε να επιτρέπουν την διέλευση της δέσμης υπερύθρου και την συλλογή αξιόπιστου φάσματος. Εναλλάκτικά, προβαίνουμε στην αραίωση του δείγματος με βρωμιούχο κάλιο (KBr) και την παρασκευή δείγματος σε μορφή δισκίου (πελέτας). Η διαδικασία ενέχει σοβαρά μειονεκτήματα όπως το ότι δεν εφαρμόζεται σε υδατογενή δείγματα λόγω της υγροσκοπικότητας του KBr και δεν εφαρμόζεται σε κηρώδεις ουσίες επειδή αυτές δεν μπορούν να λειοτριβηθούν. Επίσης, είναι χρονοβόρα και είναι δυνατόν να προκαλέσει υδρόλυση ή ιονεναλλάγή του δείγματος και δεν είναι επαναλήψιμη καθώς το δείγμα δεν είναι ανακτήσιμο μετά την μέτρηση (Καμίτσος και Χρυσικός).

Η ιδανική λήψη του φάσματος υπερύθρου πρέπει να μην απαιτεί προετοιμασία του δείγματος, να εφαρμόζεται εξ ίσου σε στερεά, κόνεις και υγρά, να είναι επαναλήψιμη και μη καταστροφική για το δείγμα. Η κατ' εξοχήν μέθοδος συλλογής φασμάτων που συνδυάζει όλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα είναι γνωστή ως Εξασθενημένη Ολική Ανακλαστικότητα (Attenuated Total Reflectance, ATR).

Συνοπτικά, το δείγμα έρχεται σε επαφή με κρύσταλλο υψηλού δείκτη διάθλασης, περατό στο υπέρυθρο, μέσα από τον οποίο διέρχεται η οπτική δέσμη υπό γωνία ολικής ανάκλασης. Η δέσμη δημιουργεί ένα στάσιμο κύμα στην μεσεπιφάνεια κρυστάλλου δείγματος το οποίο συλλέγει το φάσμα του υλικού από ένα εξαιρετικά μικρό «βάθος διείσδυσης» της τάξης των λίγων μικρών (**Εικ.15**). Δείγματα σε μορφή σκόνης ή υμένια συγκρατούνται σε επαφή με τον κρύσταλλο με την βοήθεια ειδικής πρέσας (Καμίτσος και Χρυσικός).



Εικόνα 15. Ενδεικτική τομή διάταξης ATR με κρύσταλλο τεσσάρων ανακλάσεων. Η δέσμη υπερύθρου οδηγείται μέσω ενός στοιχείου εστίασης από ZnSe σε κρύσταλλο από διαμάντι υπό γωνία ολικής ανάκλασης.

Σε κάθε ανάκλαση, η ακτινοβολία διεισδύει στο δείγμα σε βάθος λίγων μόνο μικρομέτρων και απορροφάται στις χαρακτηριστικές συχνότητες απορρόφησης. Αποδεικνύεται (Perkin Elmer) ότι το βάθος διείσδυσης d_p , στο οποίο η ένταση της ακτινοβολίας υπερύθρου ελαττώνεται στο $1/e$ της αρχικής τιμής, δίνεται από τη σχέση

$$\lambda_0 / d_p = 2\pi n_1 [\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2]^{1/2} \quad (3-8)$$

και αποτελεί συνάρτηση των δεικτών διάθλασης n_1 και n_2 του κρυστάλλου και του δείγματος αντίστοιχα, της γωνίας πρόσπτωσης θ της ακτινοβολίας στον κρύσταλλο και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας στον αέρα λ_0 .

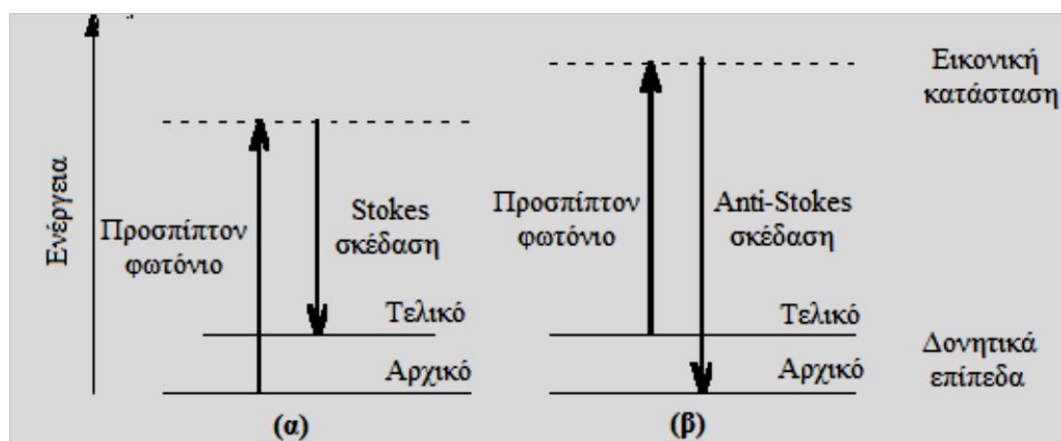
Η ένταση του κύματος μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από τη μεσοεπιφάνεια κρυστάλλου-δείγματος. Η ένταση του αποσβούμενου κύματος (evanescent wave) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του δείγματος.

Η τεχνική ATR είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την καταγραφή φασμάτων IR δύσκολων δειγμάτων τα οποία δεν μπορούν εύκολα να εξετασθούν με τη συμβατική μέθοδο. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής ATR που είναι η δυνατότητα μη καταστροφικής ανάλυσης υμενίων με σχετικά μεγάλο πάχος ή με πολύ υψηλούς συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας καθώς και η δυνατότητα ανάλυσης πολυστρωματικών δειγμάτων.

2.3 Φασματοσκοπία Raman

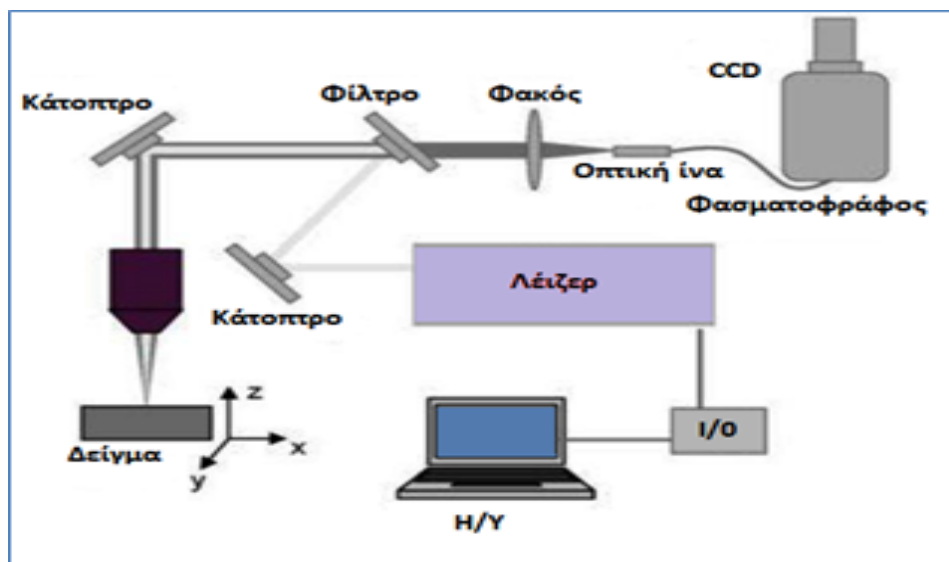
Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία σκεδάζεται από κάποια μόρια, ένα μικρό κλάσμα αυτής παρατηρείται να έχει διαφορετική συχνότητα από αυτή της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο δείγμα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φαινόμενο Raman. Το φαινόμενο Raman προκύπτει όταν μια δέσμη έντονης μονοχρωματικής ακτινοβολίας πέσει πάνω σε δείγμα που περιέχει μόρια, τα οποία, μπορούν να υφίστανται αλλαγή στη πολικότητά τους καθώς αυτά δονούνται. Οι περισσότερες συγκρούσεις των φωτονίων που προσπίπτουν πάνω στα μόρια είναι ελαστικές. Το ηλεκτρικό πεδίο που παράγεται από τα πολωμένα μόρια ταλαντώνεται στην ίδια συχνότητα με τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα που πέρασαν, έτσι, τα μόρια δρουν σαν μια πηγή στέλνοντας ακτινοβολία της ίδιας συχνότητας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία δεν ανυψώνει το μόριο σε κάποιο ιδιαίτερο ενεργειακό επίπεδο, αλλά φαινομενικά το μόριο μπορεί να θεωρηθεί ότι βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Όταν περάσουν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, τα πολωμένα μόρια σταματούν να ταλαντώνονται και επιστρέφουν στο αρχικό ενεργειακό τους επίπεδο σε μικρό χρονικό διάστημα. Η διεργασία αυτή ονομάζεται σκέδαση Rayleigh. Μια μικρή μερίδα από τα διεγερμένα μόρια μπορούν να υφίστανται αλλαγή στην πολικότητά τους κατά τη διάρκεια των κανονικών δονήσεων.

Αυτό αποτελεί τη βάση για το φαινόμενο Raman. Συνήθως, η προσπίπτουσα ακτινοβολία, συχνότητας ν_0 , απορροφάται από το μόριο στην χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Όταν το μόριο εκπέμπει επιστρέφοντας όχι στο αρχικό, αλλά σε ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο συχνότητας ν_1 η ακτινοβολία που εκπέμπεται είναι χαμηλότερης ενέργειας ή χαμηλότερης συχνότητας ($\nu_0 - \nu_1$) από την προσπίπτουσα. Η διεργασία αυτή ονομάζεται σκέδαση Raman Stokes. Μερικά από τα διεγερμένα μόρια επιστρέφουν σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο εκπέμποντας έτσι ακτινοβολία μεγαλύτερης συχνότητας από αυτή που προσπίπτει. Η διεργασία αυτή ονομάζεται σκέδαση Raman anti-Stokes. Στην Εικ.16 παρουσιάζεται ενεργειακό διάγραμμα, στο οποίο φαίνεται η σχέση μεταξύ σκέδασης Rayleigh και Raman. Η ένταση του σήματος Stokes είναι υψηλότερη από αυτή του σήματος anti-Stokes γι' αυτό και τα φασματοσκοπικά δεδομένα Raman ανταποκρίνονται περισσότερο στην πρώτη περίπτωση.



Εικόνα 16: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων για τη σκέδαση Raman (α) Stokes σκέδαση Raman (β) anti-Stokes σκέδαση Raman (Παππάς, 2013)

Τα φάσματα Raman παρουσιάζονται ως γραφήματα της έντασης της σκεδάζουσας ακτινοβολίας σε συνάρτηση της συχνότητάς της, η οποία εκφράζεται με τους κυματαριθμούς (cm^{-1}). Η ερμηνεία των φασμάτων γίνεται με χρήση πινάκων που συσχετίζουν τις διάφορες ομάδες των μορίων με τις αντίστοιχες συχνότητες.



Εικόνα 17: Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου Raman

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των φασμάτων Raman σε σχέση με φάσματα υπερύθρου οφείλεται στο ότι το ύδωρ δεν προκαλεί παρεμπόδιση, ενώ εμπόδιο στη χρήση της φασματοσκοπίας Raman είναι ο φθορισμός, ο οποίος αρκετές φορές προέρχεται από προσμίξεις του δείγματος. Σήμερα, το πρόβλημα αυτό έχει ξεπεραστεί σε σημαντικό βαθμό με τη χρήση πηγών laser εγγύς υπερύθρου. Η φασματοσκοπία Raman βρίσκει εφαρμογή στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ανόργανων, οργανικών και βιολογικών συστημάτων. Σε γενικές γραμμές, είναι τεχνική κατάλληλη για τη μελέτη της δομής και την διάκριση πολυμορφικών φάσεων καθώς και ένυδρων αλάτων, απαιτεί μικρή ποσότητα και ελάχιστη προεργασία δείγματος, καθώς επίσης είναι μη-καταστροφική για το δείγμα.

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές δόνησης IR και Raman είναι τεχνικές συμπληρωματικές. Τόσο το φάσμα Raman όσο και το φάσμα IR μπορεί να θεωρηθεί ως δακτυλικό αποτύπωμα μιας ένωσης. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές δόνησης χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για ποιοτικό όσο και για ποσοτικό προσδιορισμό.

2.4 Αιθέρια Έλαια και Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Μέχρι πρόσφατα δεν είχε ερευνηθεί εκτεταμένα εάν και σε ποιο βαθμό συμβάλλει το αιθέριο έλαιο στη συνολική αντιοξειδωτική δράση ενός φυτού, παρότι είχαν μελετηθεί οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες και η δράση του ως συντηρητικού (Farag et al., 1989a, 1989b, 1989c, 1990; Ismaiel and Pierson, 1990; Zaika, 1988; Nakatani, 1994). Αυτό ίσως να οφείλεται στο ιδιαίτερα ισχυρό άρωμα που προσδίδουν ορισμένα πτητικά συστατικά στο αιθέριο έλαιο γεγονός που περιορίζει τη δυνατότητα προσθήκης τους στα τρόφιμα.

Τα τελευταία χρόνια, τα αιθέρια έλαια αναγνωρίζονται και ως φυτοχημικά αντιοξειδωτικά και έχουν προταθεί ως υποκατάστατα συνθετικών αντιοξειδωτικών στη βιομηχανία τροφίμων, παράλληλα με τις συντηρητικές και αρωματικές τους ιδιότητες. Ταυτόχρονα, η χρήση αντιοξειδωτικών σε προϊόντα κοσμητικής είναι μεγάλη, τόσο για εμπορικούς και διαφημιστικούς όσο και για πρακτικούς σκοπούς. Και στο πεδίο αυτό, η παρουσία των αιθέριων ελαίων ενισχύεται από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.

Η δυσκολία μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης στα αιθέρια έλαια έγκειται στη πολυπλοκότητα του χημικού τους προφίλ. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που εστιάζουν σε μεμονωμένα χημικά συστατικά, αλλά η συμπεριφορά τους δεν συνάδει πάντα με αυτή του αιθερίου ελαίου.

Συχνά γίνεται αναφορά σε φαινόμενα συνέργειας ή παρεμπόδισης, αλλά η επιστημονική τεκμηρίωση είναι περιορισμένη. Ακόμα, η μεθοδολογία που ακολουθείται για τη μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης αλλάζει δραστικά τα αποτελέσματα. Στις περιπτώσεις στις οποίες ακολουθείται μία μόνο μέθοδος προσδιορισμού και για μικρό αριθμό αιθέριων ελαίων τα αποτελέσματα δεν είναι εύκολα συγκρίσιμα.

Μελέτες όπως αυτές των (Mantle *et al.*, 1998 ; Saleh *et al.*, 2010 ; Roberto and Baratta, 2000 ; Teixeira, B. *et al.*, 2013 παρουσιάζουν συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενός μεγάλου αριθμού αιθέριων ελαίων, με διάφορες μεθοδολογίες.

Συμπερασματικά, οι ισχυρότερες αντιοξειδωτικές δράσεις αποδίδονται σε ορισμένους μονοτερπενοειδείς H/C, σε οξυγονούχα μονοτερπένια και στις φαινόλες.

2.4.1 Μέθοδος μέτρησης φαινολικών συστατικών- Folin-Ciocalteu (FC)

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) (Folin *et al.*, 1915) είναι μία εύκολη αναλυτική τεχνική με καλή επαναληψιμότητα για τον προσδιορισμό των συνολικών πολυφαινολών και βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1998). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφοβολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}), πιθανώς $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$, χαρακτηριστικού κυανού χρώματος και λαμβάνει χώρα μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου (Huang *et al.*, 2005).

Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 730 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (Αναστασάκη, 2014). Το σύνολο των πολυφαινολών εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος τα οποία χρησιμοποιούνται σαν ποσοτικά πρότυπα (Chen *et al.*, 2015).

Στη συγκεκριμένη μέθοδο μετά από επώαση δείγματος και αντιδραστηρίων για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και απουσία φωτός, μετρίεται η απορρόφηση στα 725 nm με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis. Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τη χρήση αυτής της μεθόδου καθορίζεται από τα ισοδύναμα πρότυπα που χρησιμοποιούνται, από τη σειρά με την οποία προστίθενται τα αντιδραστήρια, και από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC), το οποίο περιέχει μολυβδαίνιο Mo (VI) (Folin *et al.*, 1927).

Η μέθοδος FC είναι απλή μέθοδος, δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό και είναι χρήσιμη για τον χαρακτηρισμό βοτανικών δειγμάτων (Prior *et al.*, 2005). Αν και εμφανίζει επαναληψιμότητα σε ένα ευρύ φάσμα φαινολικών ενώσεων, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να επηρεαστούν από άλλα μη-φαινολικά μόρια (Rover *et al.*, 2013). Η μέθοδος FC μπορεί επίσης να επηρεάζεται από έναν αριθμό παρεμβαλλόμενων ουσιών, όπως σάκχαρα, αρωματικές αμίνες, διοξείδιο του θείου, ασκορβικό οξύ, οργανικά οξέα κ.α. για αυτό το λόγο πρέπει να γίνονται οι κατάλληλες διορθώσεις (Prior *et al.*, 2005).

2.5 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού Φωτός (UV-Vis)

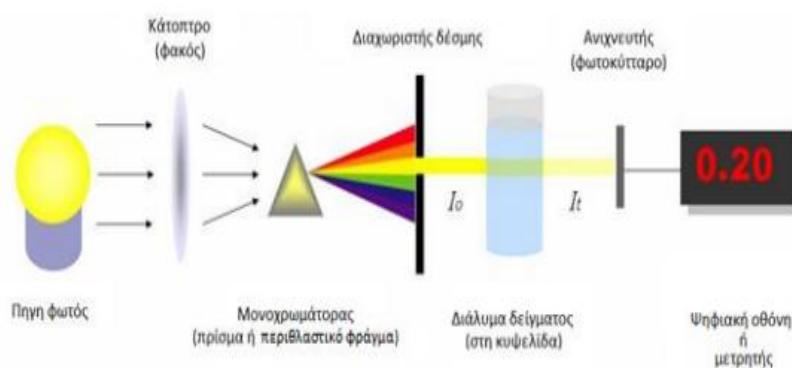
Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, επιτυγχάνεται απορρόφηση υπεριώδους (UV: 190 - 400 nm), ή ορατής ακτινοβολίας (visual: 400-800 nm), προκαλώντας ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δηλαδή διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στοιβάδας σθένους, που μεταβαίνουν από μια δεσμική σε μια αντιδεσμική κατάσταση, χωρίς όμως να αλλάζουν τον κύριο κβαντικό αριθμό. Ο μονοχρωμάτορας (πρίσμα, ή περιθλαστικό φράγμα), αναλύει τα λευκό φως στις διάφορες μονοχρωματικές περιοχές του και επιλέγει τα επιθυμητό μήκος κύματος με μεγάλη ακρίβεια (Εικ. 18). Ο διαχωριστής δέσμης, χωρίζει την εξερχόμενη δέσμη σε δύο ίσα τμήματα. Οι κυψελίδες, στις οποίες τοποθετείται το τυφλό και το δείγμα μέτρησης, κατασκευάζονται από χαλαζία για την περιοχή UV, ή και από ύαλο για την περιοχή VIS. Οι παραπάνω ανιχνευτές εντοπίζουν το σήμα που οφείλεται στην ουσία που θέλουμε να προσδιορίσουμε, και στην παρούσα φάση τη φαινολική ένωση. Ο ενισχυτής ενισχύει το εξερχόμενο σήμα. Η μέτρηση, ή και καταγραφή του σήματος γίνεται από ευπαθές φωτοκύτταρο και εκφράζεται σαν απορρόφηση, ή διαπερατότητα με βάση το νόμο του Lambert – Beer:

Όπου:

$$A = \epsilon * c * l$$

- ϵ : μοριακός συντελεστής απορρόφησης, (εκφράζει την απορρόφηση διαλύματος 1M της ουσίας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, λ), (1/M*cm),
- c : συγκέντρωση του διαλύματος, (mol/L),
- l : απόσταση που διανύει το φως-πάχος κυψελίδας, (1cm).

Τα σύγχρονα χρησιμοποιούμενα όργανα είναι κυρίως αυτογραφικά διπλής δέσμης, (ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται αυτόματα) και δίνουν τις μεταβολές της απορρόφησης, ή της διαπερατότητας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος.



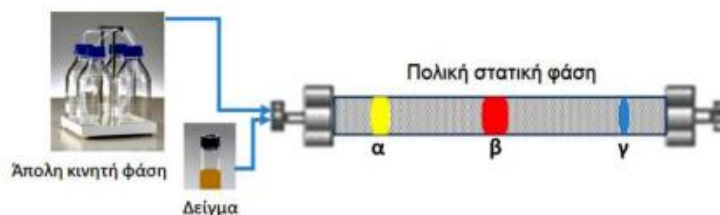
Εικόνα 18. Σχηματική διάταξη του φασματοφωτομέτρου UV/ VIS

2.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές χρωματογραφίας. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη διαχωριστική ικανότητα η οποία επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μεθοδολογία, το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών, όπου τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με συνεπακόλουθο να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Η ροή της κινητής φάσης εξασφαλίζεται μέσω αντλίας, γεγονός που επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης.

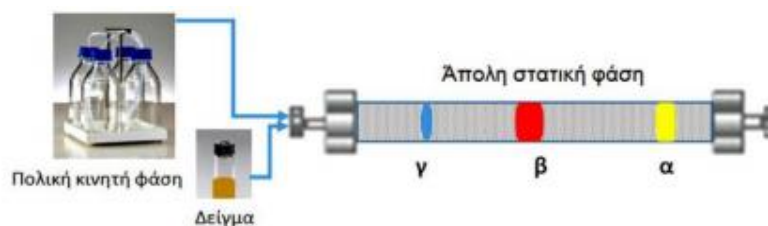
Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης οδηγεί σε αύξηση του εμβαδού επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο για να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και ελαττώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για το διαχωρισμό. Με βάση τη σχέση πολικότητας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, η τεχνική HPLC διακρίνεται σε (Stalikas, 2007; Allen *et al.*, 2005)

- HPLC κανονικής φάσης, όπου η στατική φάση είναι υγρή και η κινητή φάση μη πολική, προκειμένου να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, ως πληρωτικό υλικό (στατική φάση) χρησιμοποιείται οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3). Η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας, όπως, εξάνιο ή χλωροφόρμιο, ενώ δεν περιέχεται στην κινητή φάση νερό. Έτσι, οι πολικές ενώσεις στο διαχωριζόμενο μίγμα αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, συγκριτικά με τις άπολες ενώσεις (Εικ. 19). Επομένως, οι λιγότερο πολικές ενώσεις διαβαίνουν τη στήλη ταχύτερα και εκλούνται από αυτήν νωρίτερα. Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό χημικών ενώσεων που δεν διαλύονται στο νερό ή που υδρολύονται (και συνεπώς δε συνιστάται η παραμονή τους σε υδατικό περιβάλλον). Επίσης, εφαρμόζεται ευρέως στον διαχωρισμό ισομερών ουσιών.



Εικόνα 19. Χρωματογραφικός διαχωρισμός, με HPLC κανονικής φάσης, μίγματος αποτελούμενου από τριών τύπων μόρια που εδώ παρουσιάζονται ως κίτρινες, κόκκινες και μπλε ζώνες. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε.

HPLC αντίστροφης φάσης, κατά την οποία η ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α.), οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση απαρτίζεται από μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η έκλυση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με την ελάττωση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την αύξηση του περιεχόμενου σε αυτή ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Η ελάττωση της πολικότητας της κινητής φάση οδηγεί σε μείωση της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης. Επακόλουθο είναι η εκλεκτική έκλυση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη (Εικ. 20).



Εικόνα 20. Χρωματογραφικός διαχωρισμός, με HPLC αντίστροφης φάσης, μίγματος αποτελούμενου από μόρια τριών τύπων που εδώ παρουσιάζονται ως κίτρινες, κόκκινες και μπλε ζώνες. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε.

Επιπροσθέτως, σε μία χρωματογραφική ανάλυση εφαρμόζονται κυρίως δύο διαφορετικές τεχνικές έκλουσης:

- Ισοκρατική έκλουση (isocratic elution), κατά την οποία η κινητή φάση διατηρεί σταθερή σύσταση καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, και
- Βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης έχει προγραμματιστεί να μεταβάλλεται κατά την ανάλυση είτε γραμμικά (linear gradient), είτε σε διακριτά βήματα (step gradient), και συνεπώς και η πολικότητα του διαλύτη, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος.

Συνεπώς, μίγματα ουσιών ποικίλης προέλευσης, δύναται να διαχωριστούν και να αναλυθούν ποιοτικά και ποσοτικά με την HPLC, αρκεί να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα στατικής και κινητής φάσης, ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Γενικά, επιδιώκεται η εύρεση συνθηκών, στις οποίες τα συστατικά ενός δείγματος να συγκρατούνται σε κάποιο βαθμό στη στατική φάση, αλλά όχι πολύ ισχυρά. Αποδοτικός διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο αν εξασφαλισθεί διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των ζωνών των ουσιών, εξαιτίας του διαφορετικού βαθμού συγκρατήσεώς τους στη στατική φάση.

Διάφοροι ανιχνευτές, μπορούν να συνδεθούν με το σύστημα της HPLC για ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα. Αυτοί είναι οι εξής (Stalikas, 2007):

- Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (Diody array detector, DAD)
- Παράταξης φωτοδιόδων
- -Αγωγιμομετρικοί
- -Δείκτη διάθλασης
- -Φασματογράφοι μάζας
- -Ηλεκτροχημικοί
- -Φθορισμομετρικοί (Fluorescence detector, FLD)
- -Ραδιενέργειας
- -Σκεδασμού φωτός
- -Φλόγας (ιονισμού φλόγας, εκπομπής, φωτομετρικοί ανιχνευτές)

Σκοπός μελέτης

Η έρευνα των συστατικών της ρητίνης των πεύκων αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών λόγω της ευρείας χρήσης της σε σημαντικό αριθμό βιομηχανιών (αρωματοποιίας, φαρμακοποιίας, βιομηχανίας χρωμάτων, κ.λ.π). Η σύσταση της ποικίλει ανάλογα με το είδος του πεύκου, την ηλικία, την εποχή συλλογής της ρητίνης, τις κλιματικές και εδαφολογικές συνθήκες, την τεχνική ρητίνευσης καθώς και την τεχνική απόσταξης. Κάποια συστατικά (όπως π.χ. το α-πινένιο) απαντώνται σχεδόν σε όλα τα είδη πεύκου. Επίσης, η ρητίνη ορισμένων πεύκων είναι εξ ολοκλήρου διαφορετικής σύστασης από των υπολοίπων.

Ακόμη, μέσα στο ίδιο είδος πεύκου παρατηρούνται ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στη σύσταση της ρητίνης. Η γνώση της σύνθεσης της ρητίνης του κάθε δέντρου αποκτά ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση που κάποια βιοτεχνία/βιομηχανία ενδιαφέρεται για κάποιο ή κάποια συγκεκριμένα συστατικά.

Η μελέτη των τερπενικών ενώσεων παρουσιάζει γενικώς μεγάλες δυσχέρειες, λόγω της φύσεως τους. Μετακινήσεις διπλών δεσμών, μετατροπή κυκλικών ενώσεων σε άκυκλες, ως και σε άλλες ενώσεις με παρόμοια κυκλική δομή είναι φαινόμενα τα οποία απαντούν στην ομάδα αυτή ουσιών και καθιστούν δυσχερή την μελέτη τους.

Καθίσταται δε ακόμη περισσότερο δύσκολη η μελέτη τους όταν επιχειρούμε να τις μελετήσουμε εντός ενός μέσου, όπως στην περίπτωση μας είναι το ΠΔΠΟ (Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου) όπου πολλοί παράγοντες όπως χημικοί, φυσικοί, βιολογικοί είναι δυνατόν να επιδράσουν και να επηρεάσουν τη φύση τους.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν η διερεύνηση της χημικής σύστασης του είδους *Pinus halepensis* καθώς και η εύρεση των ουσιών εκείνων (πηκτικών και μη) που εκχυλίστηκαν σε υδροαλκοολικό διάλυμα (Πρότυπο διάλυμα

προσομοίωσης οίνου) ως συνέπεια της προσθήκης ρητίνης της χαλέπιας πεύκης σε αυτό.

Ειδικότερα, ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν :

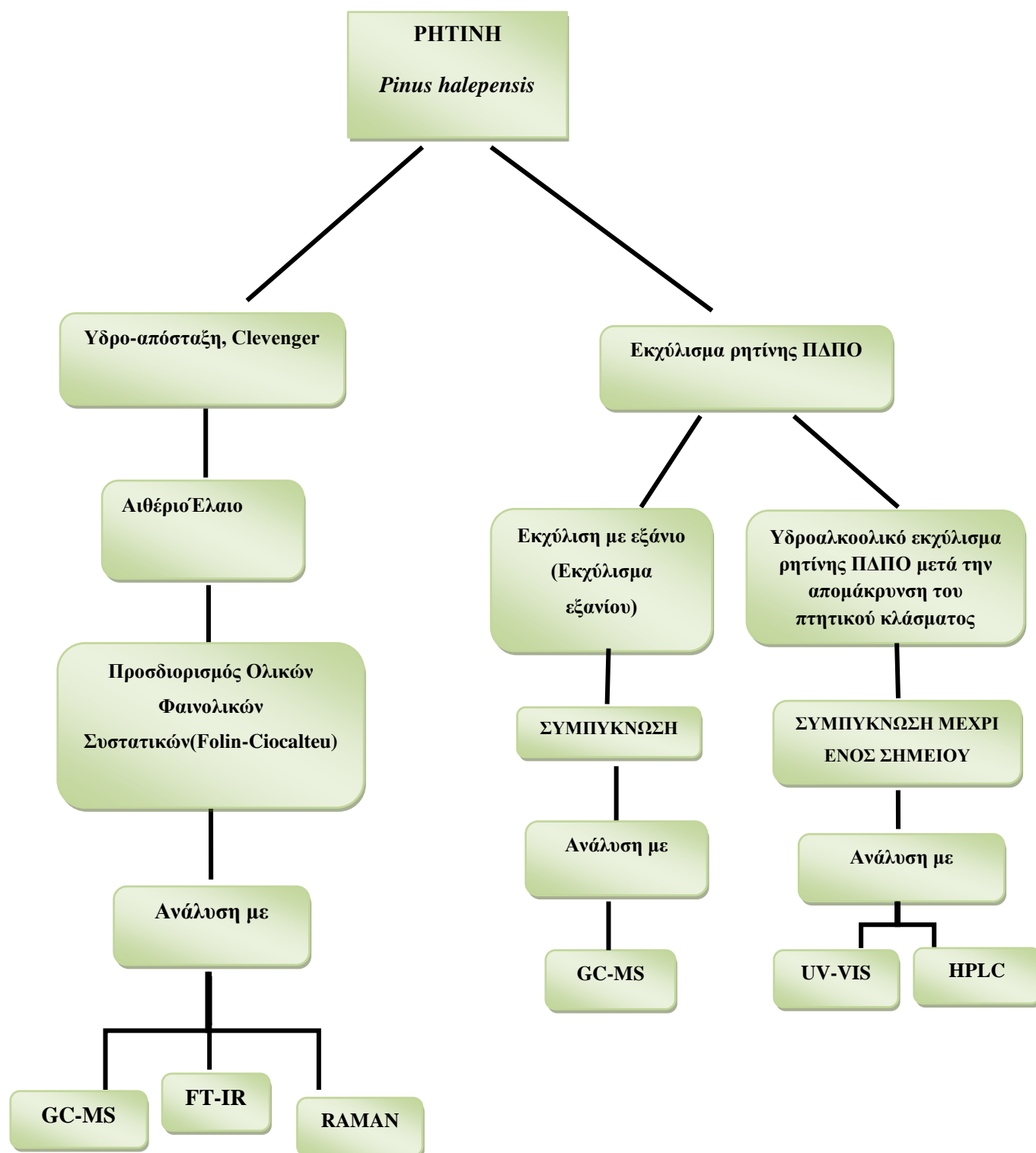
- η παραλαβή του αιθερίου ελαίου με υδροαπόσταξη σε συσκευή Clevenger
- η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του αιθερίου ελαίου του είδους *Pinus halepensis*
- η παραλαβή των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης μετά από προσθήκη αυτής σε υδροαλκοολικό διάλυμα (Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου)
- ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών (πητικών και μη) που εκχυλίστηκαν στα Πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου, ως αποτέλεσμα της προσθήκης σε αυτά ποσότητα ρητίνης της χαλέπιας πεύκης. Τα πτητικά συστατικά των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων λήφθηκαν με τη χρήση οργανικού διαλύτη και συγκεκριμένα του εξανίου (εκχύλισμα εξανίου).
- ο προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών του αιθερίου ελαίου ρητίνης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για την ποιοτική ανάλυση των αιθερίων ελαίων καθώς και των εκχυλισμάτων εξανίου χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (GC-MS) και για περαιτέρω επιβεβαίωση της ποιοτικής ανάλυσης των παραπάνω δειγμάτων έγινε καταγραφή των φασμάτων τους με υπέρυθη φασματοσκοπία (FT-IR) και φασματοσκοπία Raman .

Η ποσοτική ανάλυση τόσο των αιθερίων ελαίων όσο και των εκχυλισμάτων εξανίου αφορά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη ένωση Δωδεκανίου.

Επιπλέον, η ανάλυση των μη πτητικών συστατικών και συγκεκριμένα των ρητινικών οξέων (διτερπενικά οξέα) που πιθανόν να εκχυλίστηκαν στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ρητίνης προερχόμενα από το κολοφώνιο έγινε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (HPLC/DAD).

Στο παρακάτω εικόνα, παρουσιάζεται διαγραμματικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρούσα μελέτη.



Εικόνα 21. Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά-Συσκευές-Μέθοδοι

3.1 Φυτικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ρητίνη που προήλθε από πεύκα του είδους *Pinus halepensis*. Η προμήθεια των δειγμάτων ρητίνης που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στα υδροαλκοολικά διαλύματα (Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου) αλλά και στην παραλαβή των αιθερίων ελαίων ρητίνης, έγινε από διάφορα μέρη της Ελλάδας και συγκεκριμένα από την περιοχή της Χαλκιδικής, Βόρεια και Κεντρική Εύβοια και από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων στην Αττική. Το σύνολο των δειγμάτων ήταν έξι, εκ των οποίων το ένα είχε υποστεί επεξεργασία και περιείχε διοξείδιο του θείου (SO₂) (Πίνακας 4).

Για τα αιθέρια έλαια καθώς και για τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα, η ρητίνη κονιορτοποιήθηκε με το χέρι.

Πίνακας 4. Δείγματα ρητίνης *Pinus halepensis*

Προέλευση	Προμηθευτής	Έτος συλλογής	Κωδικοποίηση
Μέγαρα -Αττικής	Συνεταιρισμός Ρητίνης Μεγάρων	2016	PΣΜ+SO ₂
Μέγαρα -Αττικής	Συνεταιρισμός Ρητίνης Μεγάρων	2016	PΣΜ- SO ₂
Χαλκιδική	Εταιρεία Qaulity Resins	2017	PXQR
Βόρεια Εύβοια	Ιδιώτης	2017	PBE
Κεντρική Εύβοια	Ιδιώτης	2017	PKE
Χαλκιδική	Ιδιώτης	2017	PX

3.2 Απομόνωση, παραλαβή και μελέτη της χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis*

Διαλύτες-Αντιδραστήρια

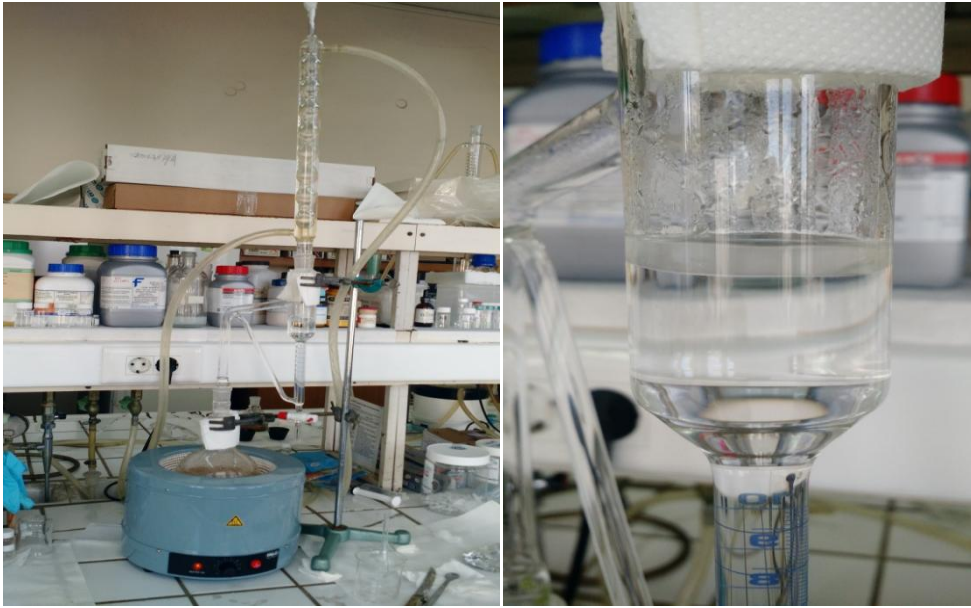
- Κανονικό Εξάνιο 99%, Carlo Erba Reagents S.A.S
- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO₄) 99%, Acros Organics
- Δωδεκάνιο καθαρότητας 99%, Target analysis
- Απιονισμένο νερό

3.2.1 Παραλαβή αιθερίου ελαίου με συσκευή Clevenger

Η ρητίνη αποστάχθηκε με την τεχνική της υδρο-απόσταξης με χρήση της συσκευής Clevenger (Εικ.22), η οποία περιγράφηκε στην Παράγραφο 1.4.2.

Για κάθε ένα από τα παραπάνω δείγματα ρητίνης *Pinus halepensis* ζυγίστηκαν 40 g θρυμματισμένης ρητίνης σε ζυγό ακριβείας τριών δεκαδικών και μεταφέρθηκαν σε γυάλινη εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη του 1 L, στην οποία προστέθηκαν 500 mL απιονισμένου H₂O. Αμέσως μετά, η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμομανδύα και συνδέθηκε με γυάλινη αποστακτική συσκευή Clevenger. Η παροχή θερμότητας ρυθμίστηκε, με στόχο την ήπια αύξηση της θερμοκρασίας και την παρεμπόδιση θερμικής διάσπασης διαφόρων χημικών ενώσεων, λόγω υπερθέρμανσης του φυτικού υλικού.

Στη συνέχεια, αφού επιτεύχθηκε η θερμοκρασία βρασμού του μείγματος, οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί μαζί με τα πτητικά συστατικά έρεαν προς τον ψυκτήρα, ο οποίος διαβρεχόταν με νερό βρύσης, με αποτέλεσμα την υγροποίησή τους. Η φάση του αιθερίου ελαίου που ήταν υπερκείμενη της υδατικής, συγκεντρώθηκε στο βαθμονομημένο σωλήνα της συσκευής, ενώ το αποσταζόμενο νερό ανακυκλωνόταν συνεχώς, επιστρέφοντας στη φιάλη. Η διαδικασία της απόσταξης ολοκληρώθηκε έπειτα από 3h από τη χρονική στιγμή που άρχισε ο βρασμός, καθώς η ποσότητα του αιθερίου ελαίου που είχε συλλεχθεί δεν αυξανόταν περαιτέρω.



*Εικόνα 22: Υδροαπόσταξη ρητίνης με συσκευή Clevenger-Αιθέριο
έλαιο ρητίνης*

3.2.2 Παραλαβή των αιθερίων ελαίων

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της απόσταξης, απομακρύνθηκε προσεκτικά η υδατική φάση (υδρόλυμα) ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά του αιθερίου ελαίου στο βαθμονομημένο σωλήνα και να σημειωθεί η ποσότητα του σε mL, από την οποία υπολογίζεται αργότερα η απόδοση, εκφρασμένη σε mL/100g ξηρού φυτικού υλικού. Στη συνέχεια, η ποσότητα του αιθερίου ελαίου καθώς και μικρή ποσότητα υδρόλυματος συλλέχθηκαν σε ποτήρι ζέσεως όπου με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur λήφθηκε προσεκτικά μόνο το αιθέριο έλαιο, το οποίο μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα $MgSO_4$ για την απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας που πιθανώς εξακολουθούσε να παραμένει στο αιθέριο έλαιο. Τέλος, το έλαιο φιλτραρίστηκε, σφραγίστηκε σε φιαλίδιο και φυλάχθηκε στην κατάψυξη, μέχρι να γίνει η ανάλυση του με αέριο χρωματογράφο (GC-MS).

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε για όλα τα δείγματα ρητίνης *Pinus halepensis*, παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τις αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο για κάθε δείγμα ρητίνης.

Πίνακας 5. Αποδόσεις αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis*

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΡΗΤΙΝΗΣ	ΕΤΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΡΗΤΙΝΗΣ (g)	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟΣΤΑΞΗΣ(h)	ΟΓΚΟΣ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΗΤΙΝΗΣ (mL)	ΑΠΟΔΟΣΗ (%) (v/w)
PΣM+SO ₂	2016	40,15	3	5,1	12,70
PΣM-SO ₂	2016	40,00	3	7,1	17,75
PXQR	2017	40,17	3	6,3	15,68
PBE	2017	42,45	3	4,2	9,89
PKE	2017	41,40	3	6,3	15,22
PX	2017	40,50	3	4,1	10,12

Η απόδοση της ρητίνης σε αιθέριο έλαιο για τα δείγματα που αποστάχθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Υψηλότερη απόδοση παρουσίασε το δείγμα Συνεταιρισμού Ρητίνης Μεγάρων το οποίο δεν είχε υποστεί επεξεργασία με SO₂ (17,75 %) και ακολουθούν με αξιόλογα ποσοστά το αιθέριο έλαιο ρητίνης από την Εταιρεία Quality Resins στην περιοχή της Χαλκιδικής (15,68 %) και το αιθέριο έλαιο ρητίνης από την περιοχή Κεντρικής Εύβοιας (15,22%). Τη χαμηλότερη απόδοση παρουσίασε το δείγμα ρητίνης προερχόμενο από την περιοχή Βόρειας Εύβοιας (9,89%).

Η ρητίνη (oleoresin) αποτελείται από το τερεβινθέλαιο (turpentine) και το κολοφώνιο (rosin). Η περιεκτικότητα σε τερεβινθέλαιο έχει βρεθεί να είναι 17,59% (ισχύει για ρητίνη από τη Β. Εύβοια) (Πετειναράκης κ.α., 2002) και 24% (Ανώνυμος, 1968). Ο Mitsopoulos (1987) σε πείραμα κοινού περιβάλλοντος 16 προελεύσεων χαλεπίου πεύκης βρήκε πως η ποικιλότητα της περιεκτικότητας της ρητίνης σε τερεβινθέλαιο μεταξύ των προελεύσεων κυμαινόταν από 24,8 έως 29,8%. Όπως σημειώνουν και οι Πετειναράκης κ.α. (2002), οι διαφορές στην περιεκτικότητα του τερεβινθελαίου οφείλονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην 'πητικότητα αυτού και

στην ευκολία απωλειών του σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας'. Το τερεβινθέλαιο λαμβάνεται με απόσταξη από τη ρητίνη και είναι το γνωστό σε όλους νέφτι το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως ως διαλύτης χρωμάτων ή ως καθαριστικό υγρό. Η ειδική στροφική ικανότητα (ad)20 του τερεβινθελαίου Β. Εύβοιας βρέθηκε κατά μέσο όρο +53,80, χαρακτηριζόμενο ως έντονα δεξιόστροφο (Πετειναράκης κ.α., 2002). Η μεγάλη δεξιόστροφη στροφική ικανότητα οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητα του τερεβινθελαίου σε α-πινένιο.

3.2.3 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αποδόσεων σε αιθέριο έλαιο της ρητίνης στην παράγραφο 3.2.2, υψηλότερη απόδοση παρουσίασε το δείγμα Συνεταιρισμού Ρητίνης Μεγάρων το οποίο δεν είχε υποστεί επεξεργασία με SO₂ (17,75 %), ενώ τη χαμηλότερη απόδοση παρουσίασε το δείγμα ρητίνης προερχόμενο από την περιοχή Βόρειας Εύβοιας (9,89%). Σημαντικά ποσοστά αποδόσεων εμφάνισαν επίσης το αιθέριο έλαιο ρητίνης από την Εταιρεία Quality Resins στην περιοχή της Χαλκιδικής (15,68 %) καθώς και το αιθέριο έλαιο ρητίνης από την περιοχή Κεντρικής Εύβοιας (15,22%). Γενικά, διαπιστώνεται ότι η απόδοση σε αιθέριο έλαιο της ρητίνης του *Pinus halepensis* είναι υψηλή, σε σχέση με άλλα φυτά. Για παράδειγμα, το φυτό θρούμπι έχει απόδοση 1,7-2,3% (Baher *et al.*, 2002), ενώ η ρίγανη 0,114% - 2,3% ανάλογα με τις συνθήκες υδροαπόσταξης (Zheljazkov, 2012). Ένα ακόμα παράδειγμα, αποτελεί η απόδοση σε αιθέριο έλαιο του φυτού *Pistacia lentiscus* (μαστιχόδεντρο). Οι αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο που απομονώθηκε από τα φύλλα, τα κλαδιά και τη ρητίνη του φυτού βρέθηκαν σε ποσοστό 0,5%, 0,2% και 2,8% αντίστοιχα (Magiatis *et al.*, 1999).

3.2.4 Προετοιμασία αιθέριων ελαίων για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Πριν από την ανάλυση των αιθέριων ελαίων με αέριο χρωματογράφο-φασματόμετρο μαζών (GC-MS) απαιτείται προεργασία. Τα αιθέρια έλαια αραιώθηκαν με κατάλληλες ποσότητες διαλύτη ώστε να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα και να είναι συμβατά με το μηχάνημα.

3.2.5 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος δωδεκανίου

Το δωδεκάνιο χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτική ανάλυση των συστατικών των αιθέριων ελαίων και των πτητικών συστατικών των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου). Η ποσοτική ανάλυση των παραπάνω συστατικών αφορά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τους με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου.

Παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα δωδεκανίου 1mg/ mL (1000 ppm), το οποίο περιείχε 5mg δωδεκανίου και 5mL εξανίου.

3.2.6 Προετοιμασία αιθερίων ελαίων

Πριν την εισαγωγή των πυκνών αιθερίων ελαίων για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC-MS) πραγματοποιήθηκε αραιώση 1/1000 (v/v) αυτών, ακολουθώντας την εξής διαδικασία: αρχικά εισάγονταν σε φιαλίδιο 10 μL αιθερίου ελαίου και 990 μL εξανίου (C₆H₁₄) πραγματοποιώντας έτσι την αραιώση 1/100 (v/v), στη συνέχεια λαμβάνονταν 100 μL από το φιαλίδιο με το αραιωμένο αιθέριο έλαιο με αραιώση 1/100 v/v, εισάγονταν σε νέο φιαλίδιο μαζί με 850 μL εξανίου και 50 μL από το πρότυπο διάλυμα δωδεκανίου, πραγματοποιώντας έτσι την αραιώση 1/1000 v/v.

3.2.7 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αιθέριων ελαίων ρητίνης *Pinus halepensis* με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Για τον διαχωρισμό των συστατικών των παραληφθέντων αιθερίων ελαίων της ρητίνης *Pinus halepensis* εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας ενώ για την ταυτοποίηση τους εφαρμόστηκε η φασματομετρία μαζών.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος (Trace GC ULTRA) συζευγμένος με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (DSQ II), της εταιρείας Thermo Scientific (Εικ. 23). Η στήλη του χρωματογράφου που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo-5MS (30m x 0,25 mm, ID, πάχος φιλμ 0,25 μm). Το αδρανές αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ήλιο (He) με ρυθμό ροής 1mL/min. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 220 °C και στη γραμμή διαβίβασης του ανιχνευτή (MS transfer line) 250 °C. Το πρόγραμμα ανάλυσης, το οποίο είχε διάρκεια 63,33 min, περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας της στήλης, η οποία αρχικά ήταν στους 60°C και τελικά αυξανόταν βαθμιαία μέχρι τους 250°C με ρυθμό 3 °C/min. Ο όγκος του προς ανάλυση δείγματος ήταν 1μL και εισαγόταν χειροκίνητα στο σύστημα έγχυσης με ένεση, με την τεχνική εισαγωγής δείγματος, splitless. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν *electron impact*, με την ενέργεια ορισμένη στα 70eV και εύρος μαζών 45-400 m/z. Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων καθορίστηκε στους 240 °C.

Η ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων έγινε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης, των δεικτών συγκράτησης Kovats (Kovats retention index) I και των φασμάτων μαζών με αυτών των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams07, και Xcalibur που υπάρχουν στο λογισμικό Xcalibur του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (Adams, 4th Edition).

Οι δείκτες συγκράτησης (Kovats index, KI) των παρακάτω πινάκων προέρχονται μετά ανάλυση μείγματος n-αλκανίων (C8-C22) κάτω από τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας της στήλης, στις οποίες αναλύθηκαν τα δείγματα των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων εξανίου, οι δείκτες δείγματος υπολογίστηκαν ακολουθώντας την τιμή Van den Dool και Krat.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του δείγματος χρησιμοποιείται συνήθως το εμβαδόν της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος. Επίσης, χρησιμοποιείται και το ύψος της κάθε κορυφής, το οποίο όμως δίνει λιγότερο αξιόπιστα αποτελέσματα. Στην συγκεκριμένη μελέτη ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων εξανίου ρητίνης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εσωτερικού προτύπου και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη ένωση δωδεκάνιο. Σε όλα τα δείγματα γινόταν προσθήκη γνωστής ποσότητας εσωτερικού προτύπου (50μL) τα οποία λαμβάνονταν από το πρότυπο διάλυμα δωδεκανίου γνωστής συγκέντρωσης (5mg/5mL) που παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5. Η ανάλυση κάθε δείγματος γινόταν εις τριπλούν. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε διαιρώντας τα εμβαδά των κορυφών των ενώσεων με το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου και πολλαπλασιάζοντας αυτόν το λόγο με τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (εκφρασμένη σε μg/mL αιθερίου ελαίου). Τα εμβαδά των κορυφών υπολογίστηκαν από το χρωματογράφημα ολικής σάρωσης (*full scan*).

Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation, SD) σε κάθε περίπτωση.



Εικόνα 23. Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε.

3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.3.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρητίνης του είδους *Pinus halepensis*

Στον Πίνακα 6 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των συστατικών των παραληφθέντων αιθέριων ελαίων ρητίνης από τις διάφορες περιοχές της Ελλάδας, με GC-MS. Οι υπολογισμοί για τις συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών στα αιθέρια έλαια πραγματοποιήθηκαν με αναγωγή στο φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την υδρο-απόσταξη και στον τελικό όγκο του αιθερίου ελαίου που παραλήφθηκε.

Υπολογίστηκαν οι ποσότητες των πτητικών συστατικών της ρητίνης από κάθε περιοχή. Οι συγκεντρώσεις τους εκφράζονται σε $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου.

Στο παράρτημα στο τέλος αυτής της μελέτης υπάρχουν τα χρωματογραφήματα GC-MS όλων των αιθέριων ελαίων που αναλύθηκαν. Ενδεικτικά παρακάτω παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα GC-MS (Εικ.24) του αιθερίου ελαίου το οποίο προήλθε από δείγμα της περιοχής Βόρειας Εύβοιας.

Πίνακας 6: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών που ανιχνεύθηκαν στα αιθέρια έλαια ρητίνης του είδους *Pinus halepensis* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

Α/Α	Δείκτης συγκράτησης (R.I)	Δείκτης συγκράτησης (R.I) Βιβλιογραφίας***	Συστατικά	Περιοχή προέλευσης δείγματος					
				ΡΣΜΑ*+SO ₂ **μg/mL*	ΡΣΜΑ*- SO ₂ μg/mL*	PXQR A* μg/mL*	PBE A* μg/mL A*	PKE A* μg/mL A*	PX A* μg/mL A*
ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ									
1	907	915,919	τρικυκλένιο	2737 ± 188	2626 ± 2	2339 ± 347	4182 ± 192	2746 ± 135	2005 ± 117
2	917	922, 927	α-πινένιο	773507 ± 2.668	890700 ± 16900	889002 ± 79858	827687 ± 1291	806850 ± 28199	795699 ± 31771
3	939	943,942	καμφένιο	32308 ± 993	21474 ± 2137	17027 ± 883	23907 ± 278	17084 ± 1495	17487 ± 1502
4	954	958	θούγια-2,4(10)-διένιο	1538 ± 13	1225 ± 46	-	-	-	-
5	968	970,974	β-πινένιο	9837 ± 606	12356 ± 1082	16020 ± 2026	10645 ± 792	15143 ± 443	11436 ± 577
6	979	981, 975	β-μυρκενίο	1302 ± 5	2926 ± 27	3120 ± 35	2025 ± 36	4287 ± 124	2180 ± 249
7	992	997,994	δ-3-καρένιο	7701 ± 550	1866 ± 58	26327 ± 3692	2151 ± 43	1098 ± 11	1963 ± 76
8	1014	1020, 1019	α-λιμονένιο	46296 ± 2.805	13089 ± 265	46703 ± 6090	22436 ± 267	26023 ± 718	35975 ± 2759
9	1048	1052,1046	(E)-β-οκτιμένιο	1302 ± 24	720 ± 70	971 ± 31	4125 ± 28	1035 ± 66	3025 ± 118
10	1074	1062, 1064	γ-τερπινένιο	3814 ± 101	2991 ± 27	7763 ± 846	10518 ± 161	3615 ± 28	8457 ± 370
11	1081	1088, 1085	τερπινολένιο	5408 ± 383	1349 ± 227	666 ± 21	1445 ± 223	573 ± 92	842 ± 398
12	1096	1091, 1094	ρ-κυμενένιο	516 ± 22	335 ± 93	260 ± 6	203 ± 5	252 ± 31	372 ± 220
ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΑ									
13	1112	1115	Fenchyl alcohol	3246 ± 124	-	332 ± 47	1207 ± 47	376 ± 39	647 ± 122
14	1120	1128,1125	α-καμφολενάλη	5327 ± 196	798 ± 30	-	960 ± 13	570 ± 5	317 ± 51
15	1127	1130	1-τερπινεόλη	-	-	-	1205 ± 37	325 ± 34	619 ± 85
16	1136	1141,1140	(-)-trans-πινोκαρβεόλη	1276 ± 27	535 ± 60	178 ± 10	452 ± 65	343 ± 32	-
17	1146	1143	S-cis-βερμπενόλη	789 ± 55	662 ± 89	309 ± 11	560 ± 89	301 ± 11	571 ± 45
18	1153	1145, 1144	καμφορά	373 ± 20	-	-	-	99 ± 2	-

19	1158	1164, 1161	πινοκαρβόνη	1438 ± 239	469 ± 47	-	648 ± 174	337 ± 34	267 ± 67
20	1169	1168, 1166	βορνεόλη	3052 ± 46	552 ± 73	425 ± 128	1725 ± 115	518 ± 3	835 ± 90,
21	1175	1179, 1177	τερπινεν-4-όλη	510 ± 15	685 ± 108	231 ± 48	535 ± 115	167 ± 23	305 ± 129
22	1189	1190, 1189	α-τερπινεόλη	4216 ± 207	2338 ± 572	3054 ± 347	6540 ± 159	2960 ± 9	5113 ± 231
23	1193	1194	μυρτενάλη	2103 ± 100	1130 ± 7	684 ± 11	2154 ± 292	-	-
24	1203	1203, 1206	βερμπενόνη	1749 ± 36	1284 ± 269	228 ± 29	332 ± 16	404 ± 63	142 ± 14
ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ									
25	1356	1370, 1376	(+)-κυκλοσατιβένιο	2521 ± 158	1355 ± 92	1167 ± 67	2070 ± 216	890 ± 8	994 ± 71
26	1363	1360, 1370	α-κοπαένιο	4856 ± 176	2731 ± 93	2487 ± 203	4343 ± 67	1994 ± 29	1945 ± 69
27	1406	1404, 1405	cis-β-καρνοφυλλένιο	6340 ± 320	9818 ± 669	13353 ± 309	36152 ± 679	4712 ± 256	9679 ± 268
28	1416	1420, 1417	trans-β-καρνοφυλλένιο	718 ± 71	781 ± 34	776 ± 164	12096 ± 18394	419 ± 39	576 ± 103
29	1437	1439, 1440	αρομαδενδρένιο	435 ± 51	454 ± 61	399 ± 14	1242 ± 52	183 ± 6	381 ± 96
30	1443	1449, 1453	α-χουμουλένιο	1224 ± 65	1671 ± 60	2161 ± 123	6146 ± 158	730 ± 16	1485 ± 77
31	1462	1468, 1480	d-γερμακρένιο	545 ± 18	360 ± 34	318 ± 26	414 ± 268	214 ± 12	-
32	1465	1471	β-σελινένιο	-	-	-	76 ± 11	-	184 ± 29
33	1485	1496, 1499	α-μουουρολένιο	8869 ± 254	5571 ± 140	4228 ± 49	8487 ± 532	3913 ± 80	3409 ± 263
34	1501	1509	δ-καδινένιο	1080 ± 129	775 ± 98	572 ± 36	1276 ± 54	487 ± 40	482 ± 26
ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ				886266	951657	1010198	909324	878947	879441
ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΑ				24079	8453	5441	16318	6400	8816
ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ				26588	23516	25461	73239	13542	19810
ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ				-	-	-	-	-	-
ΣΥΝΟΛΟ ΕΝΩΣΕΩΝ				936933	983626	1041100	998881	898889	908067

*A: αιθέριο έλαιο

PΣM+SO₂:Ρητίνη Συνεταιρισμού Μεγάρων Αττικής με προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO₂).

PΣM-SO₂:Ρητίνη Συνεταιρισμού Μεγάρων Αττικής χωρίς προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO₂)

PXQR : Ρητίνη Εταιρείας Qaulity Resins στη Χαλκιδική

PBE : Ρητίνη Βόρειας Έυβοιας

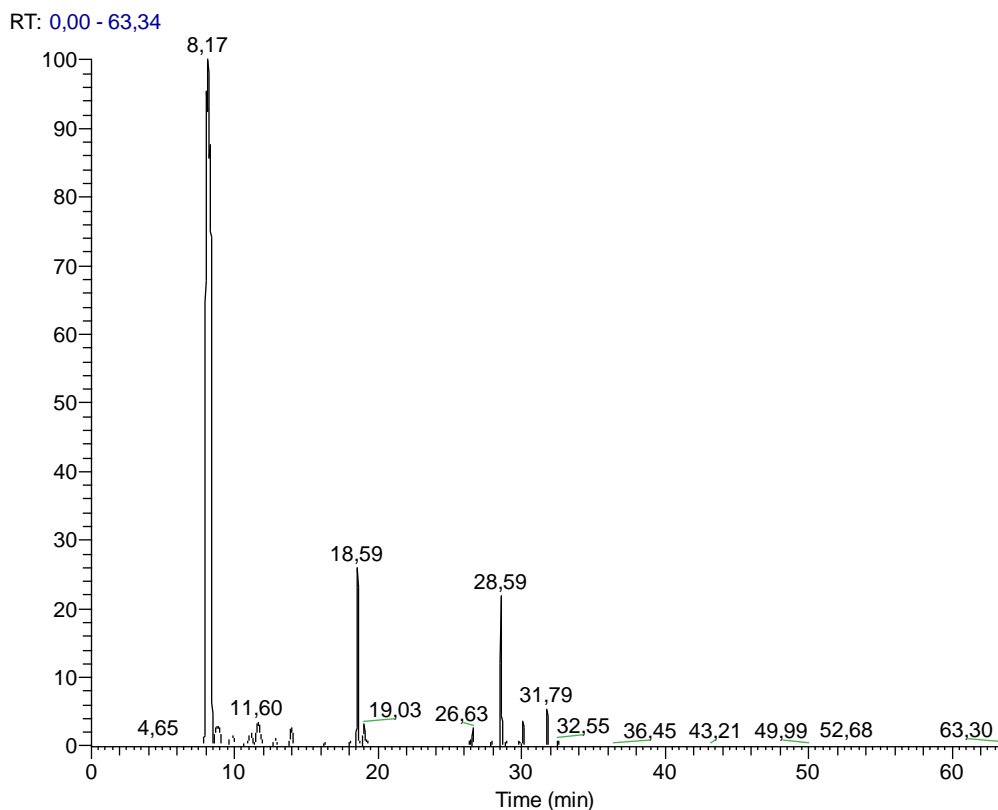
PKE : Ρητίνη Κεντρικής Έυβοιας

PX : Ρητίνη Χαλκιδικής

**μg/mL: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών εκφράζονται σε μg/mL αιθερίου ελαίου ρητίνης

***Δείκτης συγκράτησης (R.I) Βιβλιογραφίας: (Amri *et al.*, 2013 ; Fekih *et al.*, 2014 ; Ioannou *et al.*, 2014 ; Idzotic *et al.*, 2005 ; Macchioni *et al.*, 2003 ;

Dob *et al.*, 2005 ; Graikou *et al.*, 2012 ; Dob *et al.*, 2007 ; Hamrouni *et al.*, 2014



*Εικόνα 24. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Βόρειας Εύβοιας που παραλήφθηκε με την τεχνική της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC-MS.*

Στον Πίνακα 6 που αφορά την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών των αιθέριων ελαίων, φαίνονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών που περιέχονται σε όλη την ποσότητα αιθερίου ελαίου που αποστάχθηκε, το οποίο έχει προέλθει από 40g φυτικού υλικού.

Τα 34 συστατικά που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα 6 παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση που κυμάνθηκε από (898889-1041100 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου). Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι το αιθέριο έλαιο ρητίνης αποτελείται κυρίως από μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, η συγκέντρωση των

οποίων κυμάνθηκε από (878947-1010178 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από οξυγονούχα μονοτερπένια (5441-24079 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), σεσκιτερπένια (13542-73163 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και οξυγονούχα σεσκιτερπένια με συγκέντρωση που κυμάνθηκε απο (76-184 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου)

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στον παραπάνω πίνακα, το προφίλ των πτητικών συστατικών των αιθέριων ελαίων ρητίνης όλων των περιοχών της Ελλάδας που εξετάστηκαν είναι όμοιο με μικρές ποιοτικές διαφορές ανά περιοχή. Συγκεκριμένα, στο αιθέριο έλαιο ρητίνης από το Συνεταιρισμό Ρητίνης Μεγάρων το οποίο προήλθε από δείγμα επεξεργασμένο με προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO_2) ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν 32 συστατικά, τα οποία στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (936933 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5, το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του συγκεκριμένου δείγματος είναι το α -πινένιο με συγκέντρωση (773507 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων συστατικών ήταν πολύ μικρότερες του α -πινενίου, με τις μεγαλύτερες εξ αυτών να είναι οι ακόλουθες: λεμονένιο (46296 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), καμφένιο (32308 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -πινένιο (9837 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α -μουρολένιο (8869 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), δ -3-καρένιο (7701 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και β -καρνοφυλλένιο (6340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Αξιόλογες συγκεντρώσεις εμφανίζουν επίσης και οι ουσίες α -καμφολενάλη (5327 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), τερπινολένιο(5408 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α -κοπαένιο (4856 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και α -τερπινεόλη (4215 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο του μη επεξεργασμένου δείγματος ρητίνης του Συνεταιρισμού Μεγάρων ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 30 συστατικά, τα οποία στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (983626 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Εδώ κυριαρχούν τα συστατικά α -πινένιο (890673 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) όπως φαίνεται

και στον Πίνακα 6 και ακολουθούν με πολύ μικρότερα ποσοστά το καμφένιο (21474 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -πινένιο (12356 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), λεμονένιο (13089 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και β -καρνοφυλλένιο (9818 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Επίσης, σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν και το α -μουουρολένιο (5570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), γ -τερπινένιο (2991 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -μυρκένιο (2925 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και το α -κοπαένιο (2731 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου).

Στα αιθέρια έλαια ρητίνης από την περιοχή της Χαλκιδικής και συγκεκριμένα στο αιθέριο έλαιο ρητίνης από την Εταιρεία Quality Resins στη Χαλκιδική ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν 29 συστατικά, τα οποία στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (1041100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) συνόλου. Τα κύρια συστατικά τα οποία ανιχνεύτηκαν όπως φαίνεται στον πίνακα 6 ήταν το α -πινένιο (889002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ακολουθούν με πολύ μικρότερα ποσοστά το λεμονένιο (46703 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), δ -3-καρένιο (26327 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), καμφένιο (17027 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -πινένιο (16019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και β -καρνοφυλλένιο (13353 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Επίσης, σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν και το α -μουουρολένιο (4228 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), γ -τερπινένιο (7763 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και β -μυρκένιο (3119 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου).

Ενώ στο αιθέριο έλαιο της ρητίνης από την περιοχή της Χαλκιδικής ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν 29 συστατικά, τα οποία στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (908067 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5 τα συστατικά που κυριαρχούν είναι το α -πινένιο (795699 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ακολουθούν με πολύ μικρότερα ποσοστά το λεμονένιο (35975 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), καμφένιο (17487 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -πινένιο (11435 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), *cis*- β -καρνοφυλλένιο (9679 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και γ -

τερπινένιο (8457 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Επίσης, σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν και το α -μουουρολένιο (3409 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), ευκαλυπτόλη (7072 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α -τερπινεόλη (5113 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και (E)- β -οκιμένιο (3024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου).

Στα αιθέρια έλαια της ρητίνης Βόρειας και Κεντρικής Εύβοιας ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν 32 συστατικά στο αιθέριο έλαιο προερχόμενο από τη Βόρεια Εύβοια, τα οποία στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (998881 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Σε αυτήν την περίπτωση κυριαρχούν επίσης το α -πινένιο (827687 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) όπως διαπιστώνουμε και στον πίνακα 5 και ακολουθούν με πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις το *cis*- β -καρνοφυλλένιο (36152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) το καμφένιο (23907 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -πινένιο (10645 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), ευκαλυπτόλη (12374 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), λεμονένιο (22436 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και το γ -τερπινένιο (10518 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Επίσης, σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν και το *trans*-καρνοφυλλένιο (12096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α -μουουρολένιο (8487 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α -κοπαένιο (4343 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), τρικυκλένιο (4182 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α -χουμουλένιο (6146 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και α -τερπινεόλη (6504 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Τέλος, στο αιθέριο έλαιο ρητίνης Κεντρικής Εύβοιας ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν 31 συστατικά, τα οποία στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (889889 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Τα συστατικά που κυριαρχούν εδώ όπως φαίνεται και στον πίνακα 6 είναι το α -πινένιο (806850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ακολουθούν με μικρότερες συγκεντρώσεις το καμφένιο (17084 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), , λεμονένιο (26023 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), *cis*- β -καρνοφυλλένιο (4712 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β -πινένιο (15143 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και β -μυρκένιο (4287 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου).

Επίσης, σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν και το γ-τερπινένιο (3615 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α-τερπινεόλη (2960 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α-μουουρολένιο(3913 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ευκαλυπτόλη με συγκέντρωση (2096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου).

Παρατηρούμε ότι σχεδόν όλα τα πτητικά συστατικά που ανιχνεύτηκαν στα αιθέρια έλαια ρητίνης χαλέπιας πέυκης υπάρχουν στα δείγματα όλων των περιοχών παρουσιάζοντας βέβαια μικρές ποιοτικές αλλά και ποσοτικές διαφορές. Τα κυρίαρχα συστατικά παρουσίασαν παρόμοια εικόνα στα αιθέρια έλαια όλων των περιοχών έχοντας βέβαια σημαντικές ποσοτικές διαφορές. Αυτά είναι : το α-πινένιο (773507-890673 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), καμφένιο (17027-32308 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β-πινένιο (9837-16019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), λεμονένιο (13089-46703 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), δ-3-καρένιο (1098-26327 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) β-καρνοφυλλένιο (4712-36152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α-μουουρολένιο (3409-8869 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ακολουθούν με χαμηλότερες αλλά σημαντικές συγκεντρώσεις το γ-τερπινένιο (3615-10518 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), α-τερπινεόλη (2338-65399 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και το β-μυρκένιο (1302-4287 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) . Συγκεκριμένα το α-πινένιο το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό των αιθέριων ελαίων ρητίνης όλως των περιοχών, παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση (890673 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) στο αιθέριο έλαιο ρητίνης από το μη επεξεργασμένο δείγμα του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων ενώ το χαμηλότερο ποσοστό α-πινενίου (773507 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) εμφάνισε το αιθέριο έλαιο από το επεξεργασμένο δείγμα ρητίνης το οποίο περιείχε διοξείδιο του θείου (SO_2). Το λεμονένιο αποτέλεσε το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό στο αιθέριο έλαιο του επεξεργασμένου δείγματος του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων, στην περιοχή της Χαλκιδικής, στην Εταιρεία Quality Resins στη Χαλκιδική καθώς και στο δείγμα

Κεντρικής Εύβοιας παρουσιάζοντας συγκεντρώσεις (46296 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), (35975 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), (46703 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) (26023 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Ακόμη, το καμφένιο και το *cis*- β -καρνοφυλλένιο εμφάνισαν αρκετά αξιόλογες συγκεντρώσεις, με το καμφένιο να εμφανίζεται ως δεύτερο κυρίαρχο συστατικό στο μη επεξεργασμένο δείγμα Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με συγκέντρωση (21474 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ως το τρίτο κυρίαρχο συστατικό στο επεξεργασμένο δείγμα ρητίνης του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με συγκέντρωση (32308 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) καθώς και στο αιθέριο έλαιο ρητίνης στην περιοχή της Χαλκιδικής και της Βόρειας Εύβοιας με συγκέντρωση (17487 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και (23907 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) ενώ το *cis*- β -καρνοφυλλένιο εμφάνισε σημαντική συγκέντρωση στην περιοχή της Βόρειας Εύβοιας ως το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό (36152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Τέλος, σημαντική συγκέντρωση εμφάνισε και το δ -3-καρένιο το οποίο εμφανίζεται στα δείγματα όλων των περιοχών με χαμηλές συγκεντρώσεις αποτέλεσαν όμως το τρίτο κυρίαρχο συστατικό με συγκέντρωση (26327 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) στο δείγμα της Εταιρείας Quality Resins στη Χαλκιδική.

Τέλος, παρατηρούμε ότι κάποια πτητικά συστατικά των αιθέριων ελαίων τα οποία παρουσίασαν χαμηλές συγκεντρώσεις δεν εμφανίστηκαν σε όλες τις περιοχές. Χαρακτηριστικά αναφέρονται το θουγια-2,4(10)-διένιο το οποίο εμφανίστηκε στα δείγματα ρητίνης του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων, η καμφορά η οποία εμφανίστηκε στο επεξεργασμένο δείγμα ρητίνης του Συνεταιρισμού Μεγάρων αλλά και στο δείγμα της Κεντρικής Εύβοιας, η μυρτενάλη η οποία δεν εμφανίστηκε στο δείγμα της Κεντρικής Εύβοιας καθώς και στο δείγμα της Χαλκιδικής και τέλος, το β -σελινένιο το οποίο εμφανίστηκε μόνο στις περιοχές Βόρειας Εύβοιας και Χαλκιδικής.

3.3.2 Συζήτηση

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των συστατικών, παρατηρούμε πως υπάρχουν πολύ μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές τους. Οι μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των τερπενικών συστατικών είναι συχνό φαινόμενο, ιδιαίτερα αν οι συγκεντρώσεις είναι μικρές (Καρανίκας, 2008). Πολλές φορές μάλιστα, η τυπική απόκλιση είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από το μέσο όρο του αντίστοιχου συστατικού (Arrabal *et al.*, 2002 και 2005).

Από τη βιβλιογραφία καταδεικνύεται πως ο κύριος όγκος της έρευνας της ρητίνης της χαλέπιας πεύκης έχει κατευθυνθεί στην ανάλυση του τερεβινθελαιίου κυρίως και όχι του συνόλου της ρητίνης που περιέχει και το μη-πτητικό μέρος (κολοφώνιο). Ακόμη, αυτό που παρατηρείται από τη βιβλιογραφία είναι η μεγάλη ποικιλία των ιστών που αναλύθηκε η ρητίνη. Η ρητίνη των βελονών και των κλαδιών αποτέλεσε την κυριότερη πηγή ρητίνης που αναλύθηκε (Καρανίκας, 2008). Η επιλογή του ιστού εξαρτάται από τον εκάστοτε σκοπό της έρευνας. Οι περισσότερες έρευνες διενεργήθηκαν με σκοπό είτε τις συστηματικές μελέτες ή τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας των ατόμων σε προσβολές από έντομα ή ασθένειες (οπότε και αναλύθηκε ρητίνη βελονών ή φλοιού). Εξαίρεση αποτέλεσαν οι έρευνες των Iconomou *et al.*, (1964), Schiller και Grunwald (1987), Parajannopoulos *et al.*, (2001) και Karanikas *et al.*, 2010 οι οποίοι ανέλυσαν τη ρητίνη του ξυλώματος.

Συνεπώς, η ανάλυση του αιθερίου ελαίου βελονών ή φλοιού, σε προηγούμενες εργασίες, καθιστά δύσκολη τη σύγκριση τους με τη σύνθεση του αιθερίου ελαίου της ρητίνης της παρούσας εργασίας. Έτσι, σε πολλές περιπτώσεις, παρότι υπάρχει βιβλιογραφία σχετική με τη ρητίνη (τερεβινθέλαιο) της χαλέπιας

πέυκης (π.χ. Γαλλής, 1995), η διαφορετική ανάλυση και ο διαφορετικός ιστός δεν επιτρέπουν την σύγκριση.

Στην παρούσα εργασία εντοπίστηκαν 34 συστατικά, η ποιοτική σύνθεση των αιθέριων ελαίων της ρητίνης του είδους *Pinus halepensis* είναι παρόμοια με αναφορές προηγούμενων εργασιών (Iconomou *et al.*, 1964; Schiller and Grunwald, 1987; Macchioni *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006). Οι ποιοτικές διαφορές μεταξύ των εργασιών αναφέρονται στην παρουσία ή απουσία ορισμένων συστατικών. Για παράδειγμα, σε κάποιες εργασίες ως πρώτο συστατικό αναφέρεται το θουγένιο (thujene) (Roussis *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2006) ενώ στην παρούσα και σε άλλες (Macchioni *et al.*, 2003; Dob *et al.*, 2005) αναφέρεται το τρικυκλένιο. Τα δύο αυτά συστατικά έχουν παρόμοιο χρόνο έκλουσης (Rt) ή δείκτη συγκράτησης (RI) οπότε η αναγνώρισή τους καθίσταται προβληματική. Ακόμη, σε πολλές εργασίες (Roussis *et al.*, 1995; Macchioni *et al.*, 2003; Dob *et al.*, 2005) ανιχνεύθηκε το συστατικό φελλανδρένιο (phellandrene), το οποίο όμως δεν εντοπίστηκε στους (Parajannopoulos *et al.*, (2001) ; Karanikas *et al.*, 2010) καθώς και στην παρούσα εργασία . Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική προέλευση του ιστού της ρητίνης. Ένα ακόμη συστατικό που αναφέρεται στην παρούσα εργασία καθώς και σε άλλες (Roussis *et al.*, 1995; Gallis and Panetsos, 1997; Parajannopoulos *et al.*, 2001; Dob *et al.*, 2005 ; Karanikas *et al.*, 2010) είναι το καρνοφυλλένιο.

Τέλος, σε πολλές περιπτώσεις (Iconomou *et al.*, 1964; Schiller and Grunwald, 1987; Parajannopoulos *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006 ; Karanikas *et al.*, 2010) το α-πινένιο αποτελεί το κύριο συστατικό των μονοτερπενίων ενώ σημαντική συγκέντρωση εμφανίζει και το καρνοφυλλένιο (Roussis *et al.*, 1995; Gallis and Panetsos, 1997; Dob *et al.*, 2005) και το φελλανδρένιο (Macchioni *et al.*, 2003).

3.3.3 Συμπεράσματα

Από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου ρητίνης της χαλεπίου πεύκης (*Pinus halepensis Mill.*) βρέθηκε η ποιοτική και ποσοτική σύστασή του. Τα κύρια συστατικά που ταυτοποιήθηκαν είναι 34 και τα οποία εμφάνισαν κατά μέσο όρο συγκέντρωση (964840 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου). Από αυτά, τα 24 είναι μονοτερπένια και τα 10 είναι σεσκιτερπένια.

Τα κυριότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου ρητίνης της χαλεπίου πεύκης είναι η το α -πινένιο με συγκέντρωση που κυμάνθηκε από (773507-890673 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), το καμφένιο (17027-32308 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), το β -πινένιο (9837-16019 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), το λεμονένιο (13089-46703 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), το δ -3-καρένιο (1098-26327 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), το β -καρυοφυλλένιο (4712-36152 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου) και το α -μουουρολένιο (3409-8869 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου). Το α -πινένιο το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό των αιθέριων ελαίων ρητίνης όλως των περιοχών, παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση (890673 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου) στο αιθέριο έλαιο ρητίνης από το μη επεξεργασμένο δείγμα του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων ενώ τη χαμηλότερη συγκέντρωση α -πινενίου (773507 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου) εμφάνισε το αιθέριο έλαιο από το επεξεργασμένο δείγμα ρητίνης το οποίο περιείχε διοξείδιο του θείου.

Φαίνεται πως η προσθήκη διοξειδίου του θείου στο δείγμα ρητίνης του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων έχει κάποια επίδραση στη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου καθώς εμφάνισε χαμηλότερη συγκέντρωση α -πινενίου και υψηλότερες συγκεντρώσεις στα υπόλοιπα συστατικά σε αντίθεση με το δείγμα ρητίνης του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων στο οποίο δεν είχε γίνει προσθήκη διοξειδίου του θείου και το οποίο εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση α -πινενίου και

χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα υπόλοιπα συστατικά. Το συμπέρασμα αυτό όμως για να επιβεβαιωθεί απαιτεί περαιτέρω μελέτη επεξεργασμένων δειγμάτων ρητίνης. Το λιμονένιο αποτέλεσε το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό στο αιθέριο έλαιο του επεξεργασμένου δείγματος του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων, στην περιοχή της Χαλκιδικής, στην Εταιρεία Quality Resins στη Χαλκιδική καθώς και στο δείγμα Κεντρικής Εύβοιας παρουσιάζοντας τις ακόλουθες συγκεντρώσεις (46296 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), (35975 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου), (46703 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου) (26023 $\mu\text{g/mL}$ αιθερίου ελαίου).

3.4 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu του αιθέριου ελαίου ρητίνης

Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Πρότυπες Ενώσεις

- Διάλυμα Folin-Ciocalteu 2N, Merck KGaA
- Άνυδρο Ανθρακικό Νάτριο (Na_2CO_3) 99%, Merck KGaA
- Ακετόνη
- Καφεϊκό οξύ
- Απιονισμένο νερό

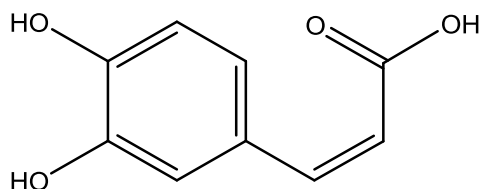
3.4.1 Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών Συστατικών

Μέθοδος *Folin-Ciocalteu*

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των αιθέριων ελαίων ρητίνης σε Ολικά Φαινολικά Συστατικά έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα Folin-Ciocalteu 0,2N και ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 7,5 g/100 mL.

Υπολογίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των αιθέριων ελαίων ρητίνης εις τριπλούν για στατιστικούς λόγους, καθώς και του καφεϊκού οξέος (Εικ.25) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη ουσία.



Εικόνα 25. Καφεϊκό οξύ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς με βάση το καφεϊκό οξύ, παρασκευάστηκε διάλυμα καφεϊκού οξέος σε ακετόνη συγκέντρωσης 1mg/mL, στη συνέχεια παρασκευάστηκαν με αραιώση 7 διαλύματα καφεϊκού οξέος με συγκεντρώσεις (0,5-2,0-4,0-8,0-16,0-32,0-50) µg/mL.

Αρχικά, τα αιθέρια έλαια ρητίνης αραιώθηκαν με αναλογία (1:100 v/v) πριν τη χρήση τους, όπου 20µL αιθερίου ελαίου ρητίνης τοποθετήθηκαν σε 1980 µL διαλύτη ακετόνης, αραιώση (1:100 v/v).

Για κάθε δείγμα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Σε καθαρό περιέκτη, προστέθηκαν 400 µL δείγματος και 100 µL νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mL διαλύματος Folin Ciocalteu και μετά από 5 min κάθε περιέκτης εμβολιάστηκε με 2 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Ακολούθησε ανάδευση των μιγμάτων για λίγα δευτερόλεπτα σε συσκευή ανάδευσης Vortex και στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στο σκοτάδι για 1,5 h. Κάθε 30 min, επαναλαμβάνονταν η ανάδευση τους στη συσκευή Vortex. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε μήκος κύματος $\lambda=765\text{nm}$ με φορητό φωτόμετρο Portable Datalonging Spectrophotometer, HACH, DR/2010.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για το πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Οι απορροφήσεις του καφεϊκού οξέος σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και έτσι υπολογίζεται η συνάρτηση με γραμμική παρεμβολή.

Για τα μηδενισμό του φωτόμετρου, παρασκευάστηκε με την ίδια διαδικασία τυφλό διάλυμα, στο οποίο αντί για 400 µL δείγματος, προστέθηκαν 400 µL ακετόνης.

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα αιθέρια έλαια ρητίνης καταναλώνουν το αντιδραστήριο με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του.

Το συνολικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των αιθέριων ελαίων εκφράζεται σε mg καφεϊκού οξέος/mL αιθερίου ελαίου.

Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται τόσο φαινολικά και πολυφαινολικά συστατικά όσο και άλλοι αναγωγικοί παράγοντες. Έτσι, αν και η μέθοδος χρησιμοποιείται συνήθως για τα ολικά φαινολικά συστατικά, μπορεί να δείξει γενικότερη αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται και σε άλλα συστατικά.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των αιθέριων ελαίων ρητίνης για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu παρατηρήθηκε ότι μετά την επώαση τους τα δείγματα εμφανίστηκαν θολά όπως φαίνεται και στη (Εικ. 26) και τα οποία καθιστούσαν μη αξιόπιστα τα αποτελέσματα απορρόφησης των δειγμάτων καθώς παρουσίαζαν υψηλή ανομοιομορφία μεταξύ της ίδιας τριπλέτας. Η θολότητα πιθανόν να οφειλόταν στην ανάμιξη των άπολων συστατικών των αιθέριων ελαίων με το υδατικό σύστημα (υδατικό διάλυμα Folin-Ciocalteu και ανθρακικού νατρίου) που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών των αιθέριων ελαίων. Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε επιτυχώς φιλτράροντας τα δείγματα με τη χρήση άπολου φίλτρου και εν συνεχεία μετρήθηκαν ξανά οι απορροφήσεις με το φωτόμετρο UV-Vis.



Εικόνα 26: Εικόνα πριν και μετά το φιλτράρισμα των δειγμάτων

3.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.5.1 Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης καφεϊκού οξέος (Folin Ciocalteu)

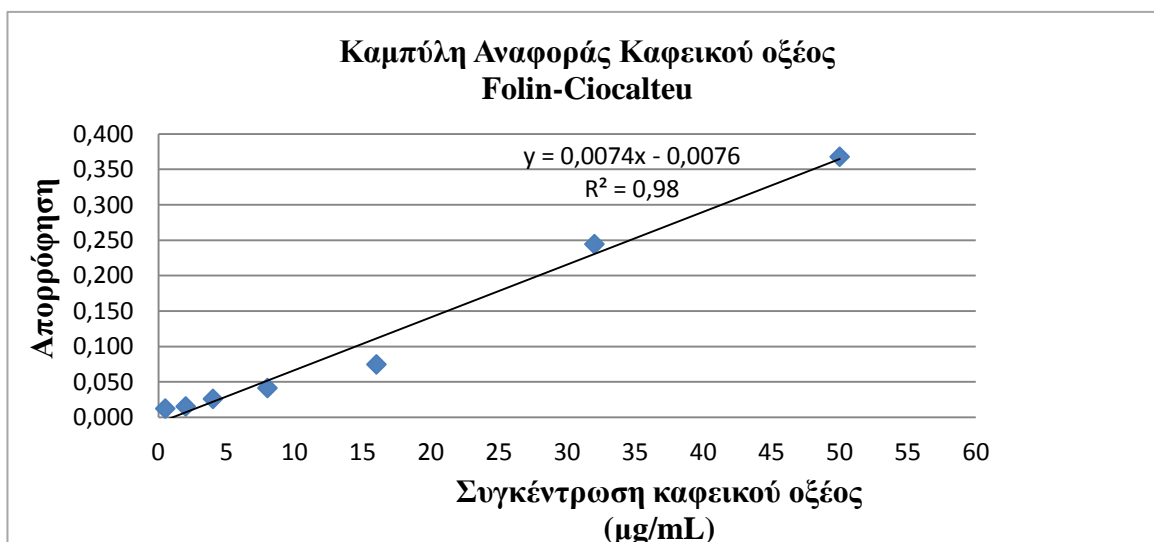
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απορρόφησης για την εξαγωγή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης από το φαινολικό περιεχόμενο, αναγράφονται στον Πίνακα 7

Πίνακας 7. Folin –Ciocalteu, Απορρόφηση καφεϊκού οξέος συναρτήσει συγκέντρωσης

Συγκέντρωση Καφεϊκού οξέος ($\mu\text{g/mL}$)	Απορρόφηση
0,5	0,013 \pm 0,002
2	0,016 \pm 0,002
4	0,026 \pm 0,001
8	0,042 \pm 0,004
16	0,075 \pm 0,005
32	0,245 \pm 0,005
50	0,368 \pm 0,001

Από τα δεδομένα προκύπτει η παρακάτω καμπύλη αναφοράς απορρόφησης-συγκέντρωσης καφεϊκού οξέος . Με γραμμική παρεμβολή υπολογίζεται η εξίσωση απορρόφησης-συγκέντρωσης καφεϊκού οξέος:

$$A = 0,0074x - 0,0076 \quad \text{Εξίσωση 1}$$



Εικόνα 27. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

3.5.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης αιθέριων ελαίων ρητίνης με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων απορρόφησης για τα αιθέρια έλαια ρητίνης του είδους *Pinus halepensis* αναγράφονται στον Πίνακα 8. Με βάση την εξίσωση 1 υπολογίζεται η συγκέντρωση σε ισοδύναμα μg καφεϊκού οξέος ανά mL αιθερίου ελαίου(αραιώση 1:100 v/v σε ακετόνη με αναγωγή σε mL καθαρής ουσίας αιθερίου ελαίου) . Το σφάλμα στην απορρόφηση αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση των τριών μετρήσεων.

Πίνακας 8. Folin-Ciocalteu, Απορρόφηση και αντιστοιχία σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος για τα αιθέρια έλαια ρητίνης του είδους *Pinus halpensis*

ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΗΤΙΝΗΣ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	ΙΣΟΔΥΝΑΜΑ ΚΑΦΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ($\mu\text{g/ml}$) ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ
Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων(+SO ₂)	0,097 \pm 0,009	1413,51 \pm 123,85
Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων(-SO ₂)	0,032 \pm 0,002	539,64 \pm 20,64
Χαλκιδική(Εταιρεία Quality resins)	0,014 \pm 0,004	287,39 \pm 47,46
Βόρεια Εύβοια	0,038 \pm 0,003	620,72 \pm 39,01
Κεντρική Εύβοια	0,021 \pm 0,008	381, 98 \pm 103,21
Χαλκιδική	0,021 \pm 0,002	390,99 \pm 20,64

3.5.3 Συζήτηση- Συμπεράσματα

Η αντιοξειδωτική δράση των αιθερίων ελαίων δε μελετάται συνήθως με τη μέθοδο των Folin-Ciocalteu και αυτό γιατί δεν είναι κανείς σίγουρος για τα συστατικά τα οποία συμμετέχουν στην αντίδραση (Prior *et al.*, 2005). Από τη μία πλευρά, η μέθοδος είναι ευαίσθητη όχι μόνο σε φαινολικά συστατικά αλλά και σε άλλους αναγωγικούς παράγοντες. Από την άλλη πλευρά, τα φαινολικά συστατικά στα αιθέρια έλαια δεν είναι φλαβονοειδή και πολυφαινόλες όπως σε φυτικά εκχυλίσματα, αλλά φαινολικά τερπενοειδή τα οποία καταλαμβάνουν συνήθως μικρό μέρος της σύστασης του ελαίου. Είναι λοιπόν δύσκολο να αποδοθούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες που ανιχνεύονται με τη μέθοδο αυτή για συγκεκριμένα συστατικά στα αιθέρια έλαια

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παράγραφο 3.5.2 δείχνουν πως τα αιθέρια έλαια δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση αντίστοιχη με αυτή του καφεϊκού οξέος. Από τα δείγματα που εξετάστηκαν, το αιθέριο έλαιο το οποίο προήλθε από το επεξεργασμένο δείγμα ρητίνης με προσθήκη SO₂ του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων εμφάνισε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα των οποίων η δράση ήταν κατά πολύ χαμηλότερη. Τα κύρια συστατικά του είναι το α-πινένιο, το λεμονένιο και το καμφένιο τα οποία δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση.

Πιθανόν η σχετικά υψηλή αντιοξειδωτική δράση αυτού του αιθερίου ελαίου να οφείλεται στην παρουσία (SO₂) ή και στην παρουσία άλλων συστατικών του αιθερίου ελαίου όπως οι αλκοόλες που μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες.

Όσον αφορά τη αντιοξειδωτική δράση των υπολοίπων αιθερίων ελαίων δεν παρουσιάζεται ιδιαίτερα σημαντική αφού σύμφωνα με τη χημική τους σύσταση δεν παρατηρείται κάποια φαινολική ένωση, δικαιολογώντας έτσι τη χαμηλή συγκέντρωση σε φαινολικά συστατικά. Το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια αυτά εμφανίζουν θετική αντίδραση στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ενώσεων που δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες.

3.6 Ανάλυση των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* με φασματοσκοπία FT-IR

Για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR των αιθερίων ελαίων της ρητίνης χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο της εταιρείας Thermo Electron Corporation τύπου Nicolet 6700 με πηγή ακτινοβολίας IR λυχνία νικελίου-χρωμίου (NiChrome), πηγή λέιζερ ατόμων ηλίου και νέου (HeNe) και διαχωριστή δέσμης βρωμιούχο κάλιο (KBr). Ο ανιχνευτής ήταν θερμικός, κατασκευασμένος από δευτεριωμένηθεική τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS). Το σύστημα της φασματοσκοπίας υπερέυθρου που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην (Εικ. 28)

Η φασματοσκοπική ανάλυση έγινε με την τεχνική της Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance spectroscopy, ATR), ενώ το εξάρτημα που χρησιμοποιήθηκε ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (internal reflection element, IRE) ήταν κρύσταλλος σεληνιούχου ψευδαργύρου (ZnSe) πάνω στον οποίο τοποθετήθηκε το δείγμα. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υγρής μορφής και προστέθηκαν 200 μ L δείγματος σε κάθε κρύσταλλο ATR. Η IR ακτινοβολία υπόκειται σε πολλαπλές διαδοχικές εσωτερικές ανακλάσεις.

Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, το φάσμα καταγράφει και εκείνα τα αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμούς και διοξείδιο του άνθρακα). Γι' αυτό, πριν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος, καταγράφεται ένα φάσμα αναφοράς (background), το οποίο λαμβάνεται με τον υποδοχέα του δείγματος χωρίς δείγμα. Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια, με τη βοήθεια του λογισμικού του φασματοφωτόμετρου, αφαιρείται αυτόματα από το συνολικό φάσμα. Τοποθετούνται 200 μ L δείγματος με πιπέτα και λαμβάνονται τα φάσματα.

Σε κάθε λήψη πραγματοποιούνται 100 σαρώσεις, η διαχωριστική ικανότητα είναι ρυθμισμένη στα 4 cm^{-1} και κάθε λήψη διαρκεί περίπου 2,5 min. Στη συνέχεια με το λογισμικό OMNIC γίνεται επεξεργασία των φασμάτων.

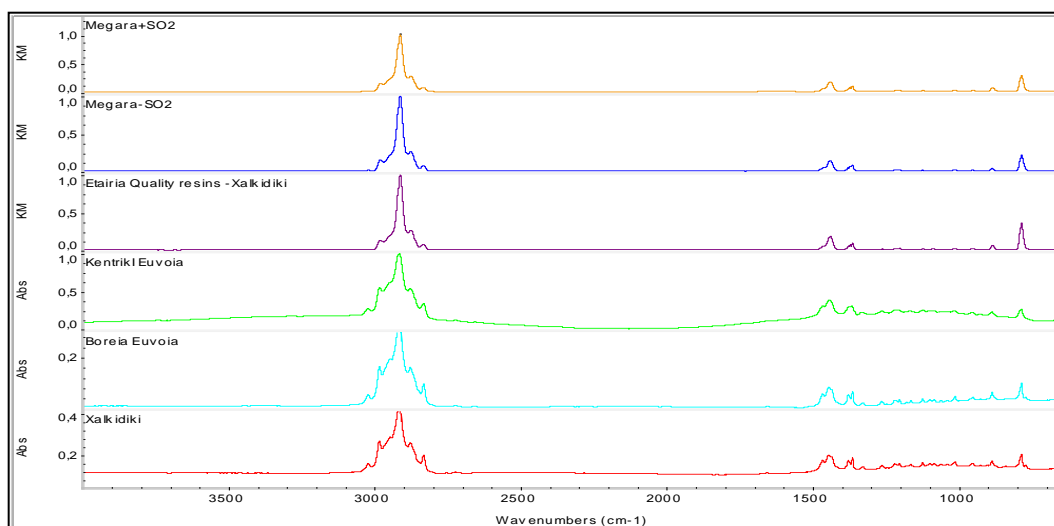
Κατά την επεξεργασία με το πρόγραμμα OMNIC 8.2.0.387, οι συνηθέστερες επεξεργασίες που γίνονται σε αυτό είναι η αυτόματη εξομάλυνση του σήματος (automatic smooth), κατά την οποία μειώνεται σε μεγάλο βαθμό ο θόρυβος με τη βοήθεια μίας μαθηματικής επεξεργασίας, χωρίς να αλλοιώνεται η εικόνα του φάσματος και έτσι βελτιώνεται ο λόγος RSN και η αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct), κατά την οποία διορθώνεται η βασική γραμμή των φασμάτων FT-IR, αφού συνήθως αποτελείται και από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν. Οι επεξεργασίες αυτές, που στοχεύουν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς, πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας τις εντολές του λογισμικού του φασματοφωτόμετρου.



Εικόνα 28. Το σύστημα της φασματοσκοπίας υπερύθρου που χρησιμοποιήθηκε.

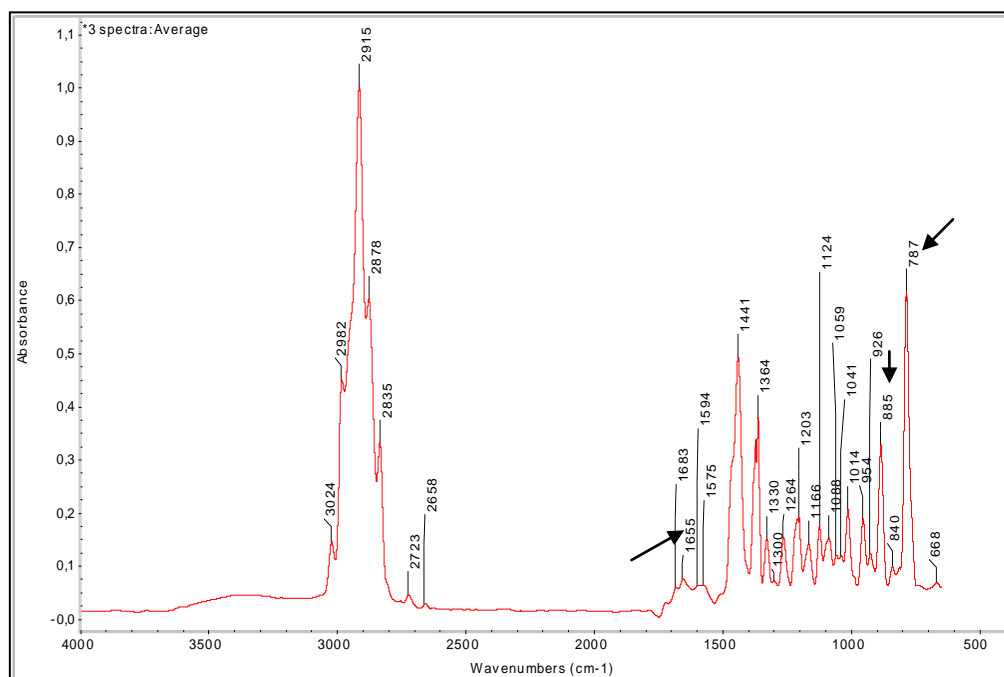
3.6.1 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα αιθέρια έλαια που προέκυψαν από την απόσταξη της ρητίνης *Pinus halepensis*, αναλύθηκαν και με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Συνολικά καταγράφηκαν φάσματα FT-IR σε έξι δείγματα αιθερίων ελαίων ΡΣΜΑ+SO₂, ΡΣΜΑ-SO₂, ΡΧQΡ, ΡΒΕ, ΡΚΕ, ΡΧ, που συλλέχθηκαν στο εργαστήριο από απόσταξη ρητίνης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα όλων των περιοχών είναι όμοια. Στην Εικόνα 28 παρουσιάζονται τα φάσματα των δειγμάτων όλων των περιοχών όπου παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα έχουν το ίδιο προφίλ. Η αναγνώριση και απόδοση των κορυφών των φασμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω πινάκων που περιέχουν τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις των διαφόρων λειτουργικών ομάδων με τους αντίστοιχους κυματαριθμούς.

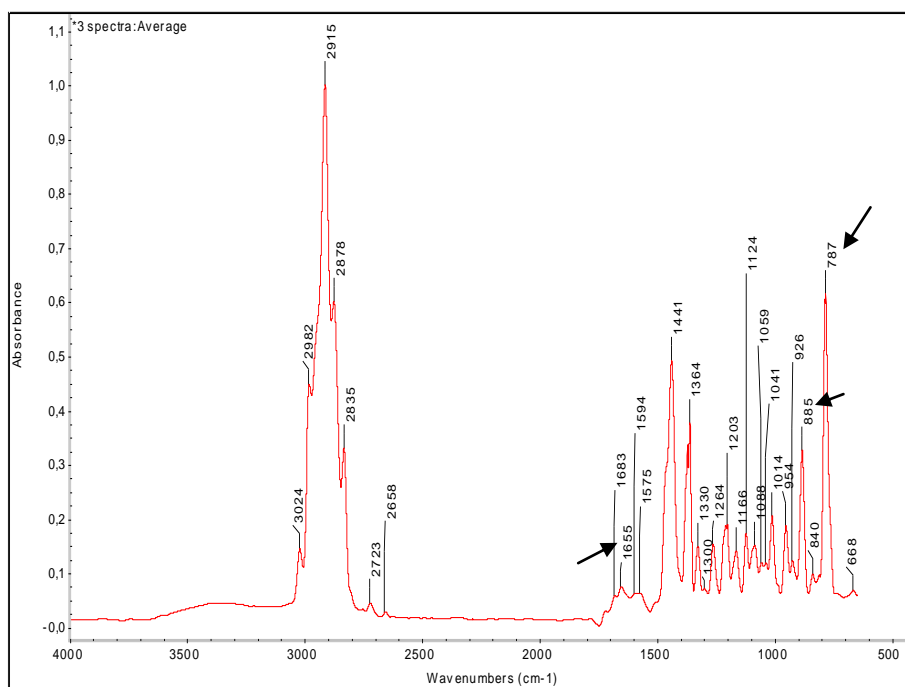


Εικόνα 28. Φάσματα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης των περιοχών που εξετάστηκαν

Στις εικόνες 29 και 30 που ακολουθούν παρουσιάζονται δύο τυπικά φάσματα FT-IR των αιθερίων ελαίων ρητίνης από τις δύο διαφορετικές προελεύσεις, τον Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων και την Εταιρεία quality resins στη Χαλκιδική. Στο παράρτημα στο τέλος αυτής της μελέτης υπάρχουν τα φάσματα FT-IR όλων των αιθερίων ελαίων που αναλύθηκαν.

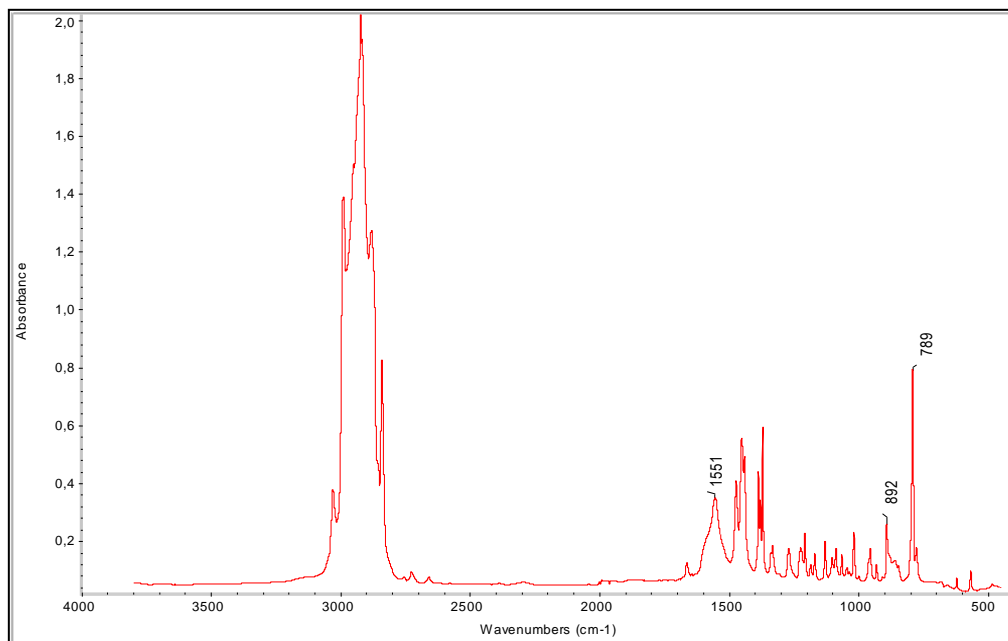


Εικόνα 29: Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης Pinus halepensis από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη δειοξειδίου του θείου.



Εικόνα 30. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης Pinus halepensis από την Εταιρεία Quality resins στην περιοχή της Χαλκιδικής.

Στα παραπάνω καταγραφόμενα φάσματα παρατηρούνται δύο κύριες περιοχές κορυφών, η πρώτη μεταξύ $3356\text{-}2658\text{ cm}^{-1}$ και η δεύτερη μεταξύ $1654\text{-}668\text{ cm}^{-1}$. Στην πρώτη περιοχή κοντά στα 2900 cm^{-1} (3024 cm^{-1} , 2982 cm^{-1} , 2915 cm^{-1} και 2835 cm^{-1}) εμφανίζεται μια κορυφή η οποία υπάρχει σε όλα τα φάσματα IR των δειγμάτων και στη οποία καταγράφονται οξείες κορυφές που οφείλονται σε συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσης -CH . Η δεύτερη περιοχή ($1736\text{-}651\text{ cm}^{-1}$) είναι η σημαντικότερη του φάσματος και περιλαμβάνει διάφορες χαρακτηριστικές απορροφήσεις των τερπενίων των αιθερίων ελαίων. Τα έξι φάσματα είναι ποιοτικά ίδια και όμοια με το φάσμα α -πινενίου (Εικ.31), το οποίο αποτελεί και το κυρίαρχο συστατικό στο αιθέριο έλαιο ρητίνης *Pinus halepensis*.



Εικόνα 31. Φάσμα FT-IR α-πινενίου

Συγκεκριμένα, στο φάσμα α-πινενίου (Εικ.31) το σήμα στην περιοχή 1680-1500 cm^{-1} αποδίδεται στον ενδοκυκλικό διπλό δεσμό C=C του δακτυλίου, η κορυφή στα 885 cm^{-1} σε δόνηση κάμψεως της ομάδας CH₂, ενώ το σήμα στα 787 cm^{-1} στη χαρακτηριστική δόνηση κάμψεως(-C-H). Τα φάσμα α-πινενίου έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα φάσματα των δειγμάτων όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε καλή συμφωνία και με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Schulz *et al.*, 2005 ; Schulz *et al.*, 2007) οι οποίοι μελέτησαν τα αιθέρια έλαια από διάφορα φυτά καθώς και πολύτιμες ουσίες φυτών εφαρμόζοντας φασματοσκοπικές μεθόδους FT-IR και Raman. Οι αποδόσεις των χαρακτηριστικών κορυφών των φασμάτων FT-IR παρουσιάζονται στον Πίνακα 9

Πίνακας 9. Κυριότερες συχνότητες και Λειτουργικές Ομάδες (Schulz *et al.*, 2005 ; Sculz *et al.*, 2007)

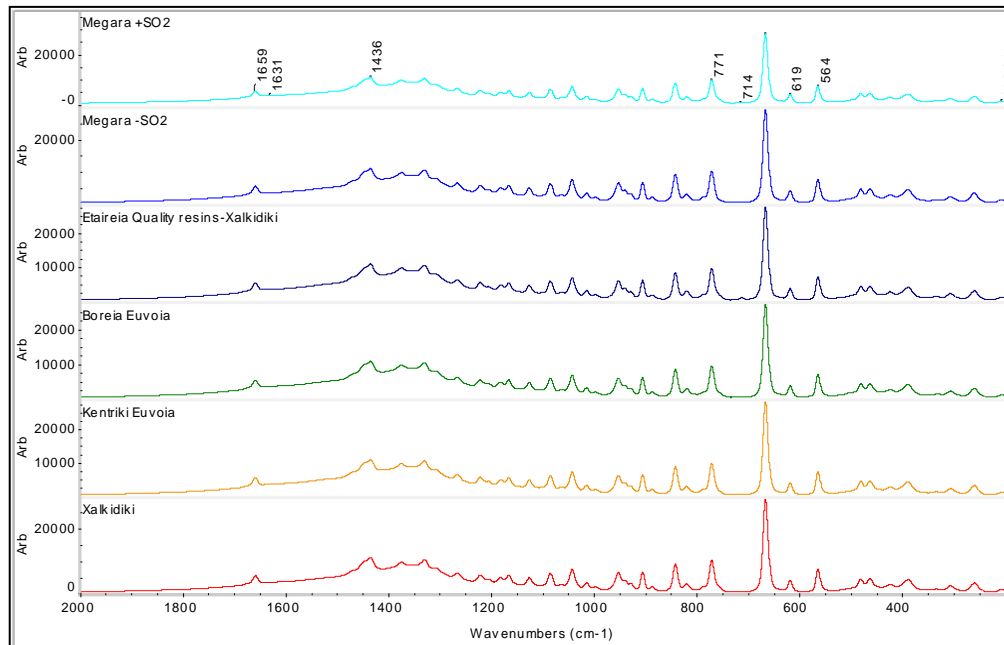
Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Λειτουργική Ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης	Ένταση
ο Περιοχή τάσης του υδρογόνου				
3024	=C-H (trans-)		Τάση	Πολύ αδύναμη
2982	-C-H (CH ₃)	Τάση του C-H (-CH ₃)	Ασύμμετρη	Μέτρια
2915	-C-H (CH ₂)	Τάση του C-H (-CH ₂ -)	Ασύμμετρη	Πολύ ισχυρή
2878, 2835	-C-H (CH ₂)	Τάση του C-H (-CH ₂ -)	Συμμετρική	Πολύ ισχυρή
ο Περιοχή τάσης του διπλού δεσμού				
1655	-C=C- (cis-)	Τάση διπλού δεσμού των cis αλκενίων	Τάση	Πολύ αδύναμη
ο Περιοχή άλλων παραμορφώσεων και κάμψεων				
1441	-C-H (CH ₂ , CH ₃)	Τάση του αλειφατικού -CH ₂ - και -CH ₃	Ψαλλιδοειδής κάμψη	Μέτρια
1364	-C-H (CH ₃)	Συμμετρική παραμόρφωση του -CH (-CH ₃)	Κάμψη	Μέτρια
1330	-O-H	Κάμψη -O-H	Κάμψη	Μέτρια
ο Περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος				
1264-1088	-C-H δακτύλιος	Δόνηση C-H δακτυλίου	δόνηση	Μέτρια
954	-HC=CH- (trans-)	Τάση του CH του trans – HC=CH-	Κάμψη εκτός επιπέδου	Αδύναμη
926	-HC=CH- (cis-)	Παραμόρφωση του =CH ₂ του >C=CH-	Κάμψη εκτός επιπέδου	Πολύ αδύναμη
885-787	-C-H, -CH ₂	Δόνηση κάμψης εκτός πεδίου	Κάμψη εκτός πεδίου	Μέτρια

3.7 Ανάλυση των πτητικών συστατικών του αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* με φασματοσκοπία RAMAN

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Vis-Raman (768 nm) της εταιρίας Advantage NIR το οποίο συνοδευόταν από το λογισμικό NuSpec. Τα εκχυλίσματα τοποθετούνταν σε σωλήνες τύπου NMR. Οι παράμετροι καταγραφής των φασμάτων ήταν: χρόνος ολοκλήρωσης καταγραφής του φάσματος 10 s και απαιτούμενος αριθμός φασμάτων 10, δηλαδή καταγράφονταν 10 φάσματα σε συνολικό χρόνο 10 s και το τελικό φάσμα προέκυπτε από τα 10 φάσματα. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν τρία φάσματα.

Η εξομάλυνση των φασμάτων και η βασική γραμμή διορθώθηκε αυτόματα με τη χρήση του λογισμικού του Omnic3.1. Τα δείγματα των αιθερίων ελαίων παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 15 λεπτά πριν την καταγραφή των φασμάτων Raman.

3.7.1 Αποτελέσματα-Συζήτηση



Εικόνα 32. Φάσματα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης των περιοχών που εξετάστηκαν

Συνολικά καταγράφηκαν φάσματα Raman σε έξι δείγματα αιθερίων ελαίων ΡΣΜΑ+SO₂, ΡΣΜΑ-SO₂, ΡΧQΡ, ΡΒΕ, ΡΚΕ, ΡΧ, που συλλέχθηκαν στο εργαστήριο από απόσταξη ρητίνης από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Τα δείγματα όλων των περιοχών παρουσίασαν ομοιότητα ως προς το πλήθος και το ύψος των κορυφών. Στην Εικόνα 32 παρουσιάζονται τα φάσματα των δειγμάτων όλων των περιοχών που εξετάστηκαν και στα οποία παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα έχουν το ίδιο προφίλ.

Τα έξι φάσματα είναι ποιοτικά ίδια και όμοια με το φάσμα Raman του α-πινενίου, το οποίο αποτελεί και το κυρίαρχο συστατικό στο αιθέριο έλαιο ρητίνης *Pinus halepensis*.

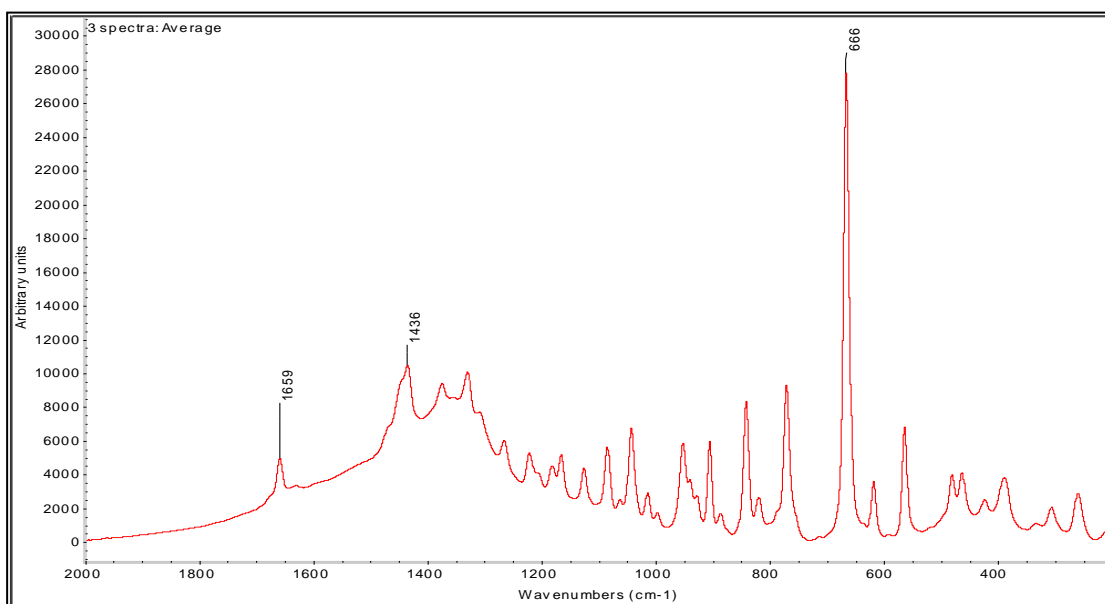
Στο φάσμα Raman του α-πινενίου (Εικ. 34), το σήμα στα 1659 cm^{-1} αποδίδεται στον ενδοκυκλικό διπλό δεσμό -C=C- του δακτυλίου, οι κορυφές στα 1436 cm^{-1} σε δονήσεις κάμψεως των ομάδων $\text{-CH}_2\text{-}$ και -CH_3 , ενώ το σήμα στα 667 cm^{-1} στη χαρακτηριστική δόνηση ολόκληρου του δακτυλίου (C-C). Η ταινία η οποία εμφανίζεται στην περιοχή $1028\text{-}1094\text{ cm}^{-1}$ ανταποκρίνεται στη δόνηση στρέψης του -CH_2 . Η κορυφή που παρουσιάζεται στην περιοχή $933\text{-}809\text{ cm}^{-1}$ οφείλεται στη δόνηση του σκελετού -C-C- .

Ενδεικτικά παρουσιάζεται το φάσμα Raman του αιθερίου ελαίου ρητίνης με προσθήκη διοξειδίου του θείου από την περιοχή των Μεγάρων (Εικ.33). Στο συγκεκριμένο φάσμα η πολύ έντονη κορυφή, που διακρίνεται στους 665 cm^{-1} , αντιστοιχεί στην παραμόρφωση του δακτυλίου του α-πινενίου. Σημειώνεται επίσης, πως οι παρακαείμενες κορυφές μέτριας έντασης, στην περιοχή χαμηλής συχνότητας (462cm^{-1} , 480 cm^{-1} , 563 cm^{-1} , 617cm^{-1} , 770cm^{-1}), οι οποίες εμφανίζουν συμφωνία, αποδίδονται επίσης σε παραμορφώσεις του εξαμελούς δακτυλίου.

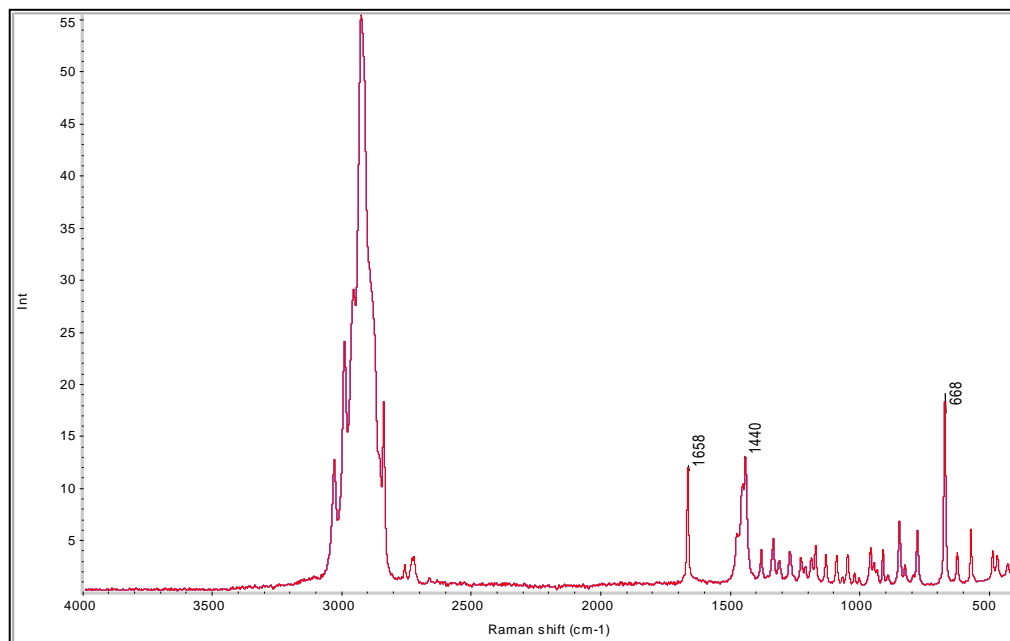
Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι το φάσμα Raman του α-πινενίου έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα φάσματα Raman των δειγμάτων καθώς και με αυτά των βιβλιογραφικών αναφορών (Schulz et al., 2005 ; Schulz et al., 2007) οι οποίοι μελέτησαν τα αιθέρια έλαια από διάφορα φυτά καθώς και πολύτιμες ουσίες φυτών εφαρμόζοντας φασματοσκοπικές μεθόδους FT-IR και Raman.

Πίνακας 10. Χαρακτηριστικές εντάσεις Raman αιθέριου ελαίου ρητίνης (Schulz et al., 2005)

Κυματάρημοι (cm^{-1})	Λειτουργική Ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης
1659	-C=C- (cis-)	Τάση διπλού δεσμού	Τάση
1436	-C-H (CH_2 , CH_3)	Τάση του αλειφατικού - CH_2 - και - CH_3	Ψαλλιδοειδής κάμψη
1028-1094	- CH_2	Δόνηση στρέψης του - CH_2	Στρέψη
933-809	-C-C-	Δόνηση σκελετού	
667	(C-C)	Δόνηση ολόκληρου δακτυλίου	



Εικόνα 33. Φάσμα Raman αιθέριου ελαίου ρητίνης από την περιοχή Συναιτερισμού ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη SO_2



Εικόνα 34: Φάσμα Raman α-πινενίου

Πράγματι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του GC-MS η χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου όλων των δειγμάτων ρητίνης κυριαρχείται από την ύπαρξη του α-πινενίου με συγκέντρωση που κυμάνθηκε από (773507-890673 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), ενώ σε αξιόλογες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν το λεμονένιο(13089-46703 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), το καμφένιο(17027-32308 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), β-πινένιο(9837-16019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και β-καρνοφυλλένιο (4712-36152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου).

3.8 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα των φασμάτων FT-IR και Raman των αιθερίων ελαίων ρητίνης *Pinus halepensis* και μετά από συσχέτιση αυτών με το φάσματα FT-IR και Raman του α -πινενίου προκύπτει πως τα βασικά συστατικά ενός αιθερίου ελαίου μπορούν να ανγνωριστούν από το φάσματα FT-IR και Raman αυτών. Οι προβλέψεις των κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων από τα φάσματα FT-IR και Raman επιβεβαιώνονται απ τα αποτελέσματα GC-MS. Το φάσμα FT-IR και Raman ενός αιθερίου ελαίου αποτελεί «δακτυλικό αποτύπωμα» για το ίδιο και χαρακτηρίζεται από την επικρατέστερη ουσία στο μίγμα. Τέλος, τα συστατικά που συμμετέχουν στη χημική σύσταση σε σχετικά μικρά ποσοστά δεν δείχνουν να επηρεάζουν το προφίλ του φάσματος.

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΡΟΑΛΚΟΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ (ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΟΙΝΟΥ-ΠΑΠΟ) ΡΗΤΙΝΗΣ ΤΗΣ ΧΑΛΕΠΙΑΣ ΠΕΥΚΗΣ

Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Πρότυπες ενώσεις

- L(+)-Τρυγικό οξύ Puriss Riedel-de Haën, Italy
- Αιθανόλη (96%)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) 1M
- Εξάνιο 98,66%, Fisher Chemical
- Κανονικό εξάνιο 99%, Carlo Erba Reagents S.A.S
- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο MgSO₄ 99%, Acros Organics
- Απιονισμένο νερό HPLC
- Ακετονιτρίλιο (AcCN) HPLC 99,9%, VMR
- Μυρμηγκικό οξύ (HCOOH) 99%, Carlo Erba Reagents S.A.S
- Δωδεκάνιο(C₁₂H₂₆) 99%, Target Analysis

4.1 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος προσομοίωσης οίνου-ΠΑΠΟ (Model Wine)

Σε ποτήρι ζέσεως με περίπου 500 mL απιονισμένου νερού, προστέθηκαν 125 mL αιθανόλης (96%) και 5g/L τρυγικού οξέος, μετά την ανάδευσή του περιεχομένου του μέχρι να διαλυθεί, έγινε ρύθμιση της ενεργού οξύτητάς του με πρότυπο διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (c=1 mol/L) σε τιμή pH ίση με 3,3 και συμπληρώθηκε ο όγκος του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη στο 1L με προσθήκη απιονισμένου νερού. Η περιεκτικότητα του διαλύματος αυτού σε αιθανόλη ήταν 12% (v/v).

4.1.1 Παρασκευή εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ

Παρασκευάστηκαν έξι εκχυλίσματα ΠΔΠΟ με προσθήκη ποσότητας ρητίνης *Pinus halepensis* σε ορισμένο όγκο. Συγκεκριμένα, για την παραλαβή των παραπάνω εκχυλισμάτων ρητίνης, ζυγίστηκε 1 g ρητίνης από κάθε δείγμα, θρυμματίστηκε και μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως με 100 mL ΠΔΠΟ. Ακολούθησε ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 1h. Για το διαχωρισμό του εκχυλίσματος ΠΔΠΟ από το αδιάλυτο τμήμα της ρητίνης, μεταφέρθηκε σταδιακά σε χωνί διήθησης, στο οποίο είχε τοποθετηθεί ειδικό πορώδες διηθητικό χαρτί (φίλτρο) όπου και διηθήθηκε για την απομάκρυνση της ρητίνης.

4.1.2 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Μετά την παραλαβή και διήθηση των παραπάνω εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ, ακολούθησε εκχύλιση με οργανικό διαλύτη για την παραλαβή των πτητικών συστατικών που μεταφέρθηκαν στο ΠΔΠΟ μετά την προσθήκη ρητίνης της Χαλέπιας πεύκης. Ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση του κάθε δείγματος ήταν το εξάνιο. Κατά την τεχνική αυτή το εκχύλισμα ΠΔΠΟ από κάθε δείγμα ερχόταν σε επαφή με τον όγκο του εξανίου στο εσωτερικό εκχυλιστικής χοάνης (Εικ.35), η οποία ανακινιόταν καλά μέχρι να αναμειχθούν οι δύο φάσεις που αρχικά σχηματίστηκαν.



Εικόνα 35: Διαχωριστική χοάνη

Μετά την ανάμειξη, επερχόταν έπειτα από μικρό χρονικό διάστημα η ισορροπία και διαχωρίζονταν οι φάσεις. Κατόπιν, παραλαμβάνονταν χωριστά οι δύο φάσεις, όπου φυλάσσονταν και η υδατική και η οργανική φάση. Για την καλύτερη, ποσοτικά, εκχύλιση των πτητικών συστατικών ρητίνης, η τεχνική πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε εκχύλισμα ΠΔΠΟ, χρησιμοποιώντας κάθε φορά 30 mL εξανίου. Στη συνέχεια, η οργανική φάση που παραλαμβάνονταν μεταφερόταν σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνωνόταν μέχρι ξηρού για την απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού (Εικ. 36) (Laborota 400 efficient, Heidolph). Το εσωτερικό της σφαιρικής φιάλης από το οποίο αναδυόταν η χαρακτηριστική οσμή ρητίνης, διαλυτοποιούνταν με την προσθήκη 1 mL εξανίου υψηλής καθαρότητας για GC-MS για την παραλαβή του πτητικού κλάσματος ρητίνης δηλαδή των ουσιών εκείνων που μεταφέρθηκαν στο εκχύλισμα ΠΔΠΟ ως συνέπεια της προσθήκης ρητίνης σε αυτό. Τέλος, μετά την έκπλυση του εσωτερικού της σφαιρικής φιάλης με την προσθήκη 1 mL εξανίου, το εκχύλισμα εξανίου μεταφερόταν σε φιαλίδιο, εισαγόταν άνυδρο θειικό μαγνήσιο, φιλτραριζόταν, και φυλασσόταν στο ψυγείο μέχρι

την ανάλυση του με αέριο χρωματογράφο(GC-MS). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και για τα έξι υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ρητίνης ΠΔΠΟ.

Τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ρητίνης ΠΔΠΟ μετά την απομάκρυνση των πτητικών συστατικών, μεταφέρονταν σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνωνόταν μέχρι ενός σημείου στον περιστρεφόμενο συμπυκνωτή κενού για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων οργανικής φάσης. Στη συνέχεια αποθηκεύονταν σε φιαλίδιο και φυλάσσονταν στο ψυγείο μέχρι την ανάλυση τους.



Εικόνα 36. Περιστροφικός συμπυκνωτής, Rotary evaporator

4.1.3 Μελέτη των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ

Για την παραλαβή των πτητικών καθώς και των μη πτητικών συστατικών τα οποία εκχυλίστηκαν μετά από προσθήκη της ρητίνης χαλέπιας πεύκης σε ΠΔΠΟ, εφαρμόστηκε η τεχνική της απλής εκχύλισης.

Τα πτητικά συστατικά (τερπένια) που εκχυλίστηκαν στο ΠΔΠΟ προερχόμενα από το αιθέριο έλαιο (τερεβινθέλαιο) ρητίνης και τα οποία λήφθηκαν μετά από εκχύλιση με οργανικό διαλύτη και συγκεκριμένα το εξάνιο (εκχυλίσματα εξανίου), αναλύθηκαν με την τεχνική GC-MS.

4.1.4 Προετοιμασία εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ για ανάλυση με GC-MS

Τα εκχυλίσματα εξανίου τα οποία περιέχουν τα πτητικά συστατικά τα οποία μεταφέρθηκαν στα ΠΔΠΟ ως συνέπεια της προσθήκη ρητίνης, πριν την ανάλυση τους με τον αέριο χρωματογράφο (GC-MS) εισήχθησαν 50 μ L πρότυπου διαλύματος δωδεκανίου για την ποσοτικοποίηση των πτητικών ουσιών.

4.1.5 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ με GC-MS

Για τον διαχωρισμό των πτητικών συστατικών των παραληφθέντων εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ, εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας.

Η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα εξανίου έγινε με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν και στην ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων ρητίνης όπως αυτές περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.7.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εσωτερικού προτύπου ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που εφαρμόστηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό

των συστατικών των αιθερίων ελαίων της ρητίνης όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.7

4.2 Αποτελέσματα- Συζήτηση

4.2.1 Ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Μετά την καταγραφή και αποθήκευση των αεριοχρωματογραφημάτων με θερμοπρογραμματιζόμενη έκλουση από 60 έως 250 °C και των φασμάτων μαζών, πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με σκοπό την ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών που περιέχονται στα εκχυλίσματα εξανίου, όπως και τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων που αντιστοιχούν σε κάθε ουσία.

Η ταυτοποίηση των συστατικών που περιέχονται στα αιθέρια έλαια έγινε με (GC-MS). Τα συστατικά αυτά ταυτοποιήθηκαν, όπως έχει προαναφερθεί, με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης (Retention time, RT) και του φάσματος μάζας τους, με τις αντίστοιχες βιβλιοθήκες του λογισμικού του μηχανήματος και την βιβλιογραφία. Οι δείκτες συγκράτησης (Kovats index, KI) των παρακάτω πινάκων προέρχονται μετά ανάλυση μείγματος n-αλκανίων (C8-C22) κάτω από τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας της στήλης όπου αναλύθηκαν και τα δείγματα των αιθερίων ελαίων και των εκχυλισμάτων εξανίου, οι δείκτες δείγματος υπολογίστηκαν ακολουθώντας την τιμή Van den Dool και Krat. Τα αιθέρια έλαια προέκυψαν από την υδρο-απόσταξη των δειγμάτων ρητίνης. Ακολουθεί παρουσίαση της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης, των πτητικών συστατικών και κάποιων αντιπροσωπευτικών χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων εξανίου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

Τα εκχυλίσματα εξανίου προέκυψαν μετά από εκχύλιση με εξάνιο των εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ παραλαμβάνοντας έτσι τα πτητικά συστατικά της ρητίνης. Ακολουθεί παρουσίαση της χημική σύστασης των εκχυλισμάτων εξανίου και κάποιων αντιπροσωπευτικών χρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων εξανίου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

4.2.2 Πτητικά συστατικά των εκχυλισμάτων κανονικού εξανίου των ΠΔΠΟ

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αναγνωρισμένα πτητικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν σε εκχυλίσματα εξανίου των ΠΔΠΟ ως αποτέλεσμα της προσθήκης σε αυτά ποσότητα ρητίνης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και που προέκυψαν μετά από ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS). Στην (Εικ.37) παρουσιάζεται ένα αέριο χρωματογράφημα των πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου του ΠΔΠΟ από την περιοχή της Χαλκιδικής.

Τα 54 συστατικά που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα παρουσίασαν στο σύνολο τους από κάθε περιοχή της Ελλάδας, συγκέντρωση που κυμάνθηκε από (177,28-720,78 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι η χημική σύσταση των εκχυλισμάτων εξανίου ως συνέπεια της προσθήκης ποσότητας ρητίνης *Pinus halepensis* σε ΠΔΠΟ, αποτελείται κυρίως από μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, η συγκέντρωση των οποίων κυμάνθηκε από (55,62-217,33 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), οξυγονούχα μονοτερπένια (67,18-355,43 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από σεσκιτερπένια (1,28-22,14 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) και οξυγονούχα σεσκιτερπένια με συγκέντρωση που κυμάνθηκε απο (1-2,29 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ).

Αρκετά σημαντικές ποσότητες εμφάνισαν και άλλες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες περιλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους αλειφατικές ενώσεις καθώς και παράγωγα ναφθαλενίου και βενζολίου οποία θεωρείται ότι προήλθαν από την αποδόμηση του αβιετικού οξέος πριν από την αρωματοποίηση (Severson *et al.*, 1972), οι οποίες στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση (1,89-124,73/ 100mL ΠΔΠΟ).

Πίνακας 11.ποιοτική Και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών που ανιχνεύθηκαν στα εκχυλίσματα εξανίου του ΠΔΠΟ μετά από προσθήκη ποσότητας ρητίνης Pinus halepensis από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

Α/Α	Δείκτης συγκράτησης (R.I)	Δείκτης συγκράτησης (R.I) Βιβλιογραφίας****	Συστατικά	Περιοχή προέλευσης δείγματος					
				ΡΣΜ+SO ₂ μg/ 100mL ΠΔΠΟ*	ΡΣΜ- SO ₂ μg/100mL ΠΔΠΟ*	PXQR μg/100mL ΠΔΠΟ*	PBE μg/100mL ΠΔΠΟ*	PKE μg/100mL ΠΔΠΟ*	PX μg/100mL ΠΔΠΟ*
1	920	922, 927	α-πινένιο	16,35 ± 0,28	24,96 ± 0,89	18,99 ± 0,68	20,73 ± 0,91	25,80 ± 0,90	62,89 ± 0,43
2	941	943,942	θουγια-2,4(10)-διένιο	14,98 ± 0,35	20,60 ± 1,81	5,01 ± 0,42	10,34 ± 1,70	25,50 ± 0,46	23,05 ± 0,99
3	981	981, 975	2,6-διμεθυλο-1,3,5,7-οκτατετραένιο	1,20 ± 0,33	3,08 ± 0,07	-	-	2,42 ± 0,11	4,05 ± 0,13
4	988	996	1,3,5-τριμεθυλοβενζόλιο	0,79 ± 0,16	0,75 ± 0,14	-	0,80 ± 0,05	1,22 ± 0,20	2,03 ± 0,27
5	995	997, 994	2,6-διμεθυλο-1,3,5,7-οκτατετραένιο ισομερές	15,55 ± 0,87	14,25 ± 1,01	5,73 ± 1,19	2,46 ± 0,11	13,06 ± 0,25	13,74 ± 0,04
6	1007	1005,1003	ευκαλυπτόλη	1,24 ± 0,06	2,92 ± 0,30	2,17 ± 0,30	19,50 ± 0,23	5,66 ± 0,60	15,40 ± 0,67
7	1018	1010, 1017	ρ-κυμένιο	3,39 ± 0,63	9,26 ± 1,29	1,85 ± 0,19	3,17 ± 0,06	2,78 ± 0,22	6,00 ± 0,06
8	1021	1020,1019	d-λιμονένιο	3,11 ± 0,14	2,52 ± 0,38	18,75 ± 0,81	34,40 ± 0,92	13,81 ± 1,60	59,92 ± 5,78
9	1029	1052, 1046	cis-β-οκμένιο	-	-	2,57 ± 0,31	7,46 ± 0,78	3,29 ± 0,14	11,09 ± 0,02
10	1043	1043, 1042	τολουόλιο-m-προπύλιο	1,39 ± 0,44	1,52 ± 0,53	-	3,06 ± 0,	1,58 ± 0,18	5,00 ± 0,02
11	1050	1050, 1051	1,3-δισαιθυλοβενζόλιο,	3,25 ± 0,08	5,28 ± 0,14	1,89 ± 0,42	11,37 ± 0,57	6,72 ± 0,05	14,73 ± 1,47
12	1059	1059, 1057	1-μέθυλο-2-προπυλοβενζόλιο	1,03 ± 0,04	1,13 ± 0,04	-	1,25 ± 0,07	1,68 ± 0,22	2,43 ± 0,03
13	1069	1067, 1070	4-αίθυλο-ο-ξυλόλιο	2,85 ± 0,22	1,36 ± 0,47	-	3,06 ± 0,06	4,35 ± 0,47	6,06 ± 0,48
14	1073	1072, 1075	βενζόλιο, 2-αίθυλο-1,3-διμεθύλιο	-	0,65 ± 0,15	-	-	-	-
15	1077	1062, 1064	γ-τερπινένιο	4,23 ± 0,10	6,41 ± 0,40	7,24 ± 1,49	23,98 ± 0,01	11,09 ± 1,17	43,59 ± 2,46
16	1084	1088, 1085	τερπινολένιο	14,65 ± 0,81	5,68 ± 0,64	2,27 ± 0,15	8,25 ± 0,05	0,54 ± 0,01	10,56 ± 0,11
17	1091	1091, 1094	π-κυμένιο	1,16 ± 0,00	1,95 ± 0,03	0,79 ± 0,14	2,73 ± 0,13	6,08 ± 1,40	2,18 ± 0,08
18	1100	1096, 1101	3-αίθυλο-ο-ξυλόλιο	0,85 ± 0,19	-	0,45 ± 0,13	1,52 ± 0,23	2,33 ± 0,06	2,84 ± 0,08

19	1108	1109, 1110	ντουρένιο	4,89 ± 0,01	1,96 ± 0,13	0,65 ± 0,05	1,63 ± 0,01	1,02 ± 0,13	5,01 ± 0,62
20	1115	1115	Φενχυλόλη	-	3,09 ± 0,86	4,33 ± 0,06	6,88 ± 1,01	5,21 ± 0,29	16,38 ± 0,28
21	1124	1128, 1125	α-καμφολενάλη	9,13 ± 0,09	2,45 ± 0,34	1,07 ± 0,23	2,00 ± 0,18	3,97 ± 0,30	3,93 ± 0,35
22	1131	1130	1-τερπινεόλη	3,43 ± 0,15	1,19 ± 0,12	0,98 ± 0,19	6,56 ± 0,01	4,31 ± 0,15	13,64 ± 1,08
23	1138	1140,1141	trans-πινοκαρβεόλη	12,11 ± 0,32	2,59 ± 0,17	1,40 ± 0,08	1,93 ± 0,13	4,17 ± 0,39	6,47 ± 0,20
24	1146	1143	S-cis-βερμπενόλη	1,90 ± 0,18	4,90 ± 0,57	1,60 ± 0,11	3,14 ± 0,16	3,99 ± 0,10	14,27 ± 1,31
25	1151	1145,1144	καμφορά	-	-	0,90 ± 0,11	-	0,91 ± 0,02	3,40 ± 0,12
26	1156	1150	ύδρο καμφένιο	1,59 ± 0,36	-	0,90 ± 0,32	-	-	-
27	1162	1164, 1161	πινοκαρβόνη	0,68 ± 0,03 ±	0,45 ± 0,03	-	2,75 ± 0,08	0,95 ± 0,11	6,98 ± 0,13
28	1171	1168, 1161	Βορνεόλη	6,86 ± 0,81	2,48 ± 0,07	7,11 ± 0,40	6,28 ± 0,71	6,19 ± 0,59	23,59 ± 1,62
29	1177	1179, 1177	τερπινεν-4-όλη	3,99 ± 0,14	5,91 ± 0,67	4,68 ± 0,21	2,52 ± 0,06	2,52 ± 0,26	15,10 ± 0,59
30	1182	1185, 1183	π-κυμέν-8-όλη	3,96 ± 1,19	-	-	-	-	-
31	1189	1189, 1190	α-τερπινεόλη	74,35 ± 1,63	10,60 ± 0,78	77,63 ± 2,20	32,19 ± 0,54	36,23 ± 1,60	200,94 ± 6,66
32	1196	1194	δευδροκαρβεόλη	10,46 ± 1,43	3,35 ± 0,14	11,80 ± 0,46	7,06 ± 0,12	5,16 ± 0,19	21,38 ± 0,04
33	1207	1203, 1206	Βερμπενόνη	27,54 ± 1,20	21,94 ± 0,62	0,99 ± 0,04	2,37 ± 0,09	8,00 ± 0,09	4,96 ± 0,42
34	1217	1217, 1219	trans-καρβεόλη	17,38 ± 1,05	0,62 ± 0,01	1,02 ± 0,03	-	0,83 ± 0,01	3,17 ± 0,10
35	1245	1244, 1242	d-καρβόνη	5,21 ± 0,60	2,11 ± 0,31	1,20 ± 0,12	0,48 ± 0,08	2,04 ± 0,07	2,98 ± 0,43
36	1254	1252	2,3-πινανεδιόλη	3,04 ± 0,40	0,61 ± 0,01	-	0,34 ± 0,02	1,18 ± 0,13	1,07 ± 0,19
37	1295	1330, 1293	1-μεθυλοναφθαλίνιο	22,06 ± 0,76	19,61 ± 0,06	0,38 ± 0,02	10,92 ± 0,07	22,19 ± 0,13	25,88 ± 2,44
38	1312	1300, 1307	2-μεθυλοναφθαλίνιο	14,05 ± 0,74	10,74 ± 0,92	-	6,71 ± 0,48	13,43 ± 0,10	13,88 ± 0,79
39	1370	1366, 1361	n-ενδεκανόλη	0,87 ± 0,01	0,85 ± 0,07	-	0,29 ± 0,10	-	-
40	1393	1393,1397	1-αιθυλοναφθαλίνιο	4,94 ± 0,43	3,07 ± 0,42	-	1,48 ± 0,04	2,91 ± 0,05	9,40 ± 0,58
41	1410	1409, 1411	1,8-διμεθυλοναφθαλίνιο	5,15 ± 0,80	5,98 ± 0,28	-	3,99 ± 0,12	4,90 ± 0,20	5,82 ± 0,60
42	1418	1414, 1415	1,7-διμεθυλοναφθαλίνιο	5,20 ± 0,20	5,25 ± 0,17	-	2,76 ± 0,12	5,91 ± 0,17	6,16 ± 0,77
43	1425	1421, 1420	1,8-διμεθυλοναφθαλίνιο ισομερές	3,59 ± 0,30	2,07 ± 0,27	-	1,83 ± 0,01	2,32 ± 0,04	2,01 ± 0,03
44	1440	1442, 1443	1,7-διμεθυλοναφθαλίνιο ισομερές	1,94 ± 0,21	1,63 ± 0,19	-	1,48 ± 0,15	3,06 ± 0,09	3,09 ± 0,21
45	1476	1472, 1466	2-μέθυλοβουτυρικό φαινυλαιθύλιο	2,55 ± 0,67	0,51 ± 0,01	-	0,81 ± 0,01	0,47 ± 0,14	0,76 ± 0,02
46	1484	1496, 1499	α-μουουρολένιο	2,00 ± 0,45	2,60 ± 0,05	2,03 ± 0,16	1,28 ± 0,07	2,47 ± 0,04	6,76 ± 0,04

47	1495	1485, 1505	1,4,6-τριμεθυλοναφθαλίνιο	2,11 ± 0,12	2,09 ± 0,09		0,40 ± 0,03	1,25 ± 0,04	1,36 ± 0,18
48	1502	1515	1,4,5-τριμεθυλοναφθαλίνιο	1,09 ± 0,41	0,94 ± 0,06	-	1,09 ± 0,07	2,11 ± 0,11	3,69 ± 0,17
49	1512	1505	1,4,6-τριμεθυλοναφθαλίνιο ισομερές	3,03 ± 0,79	1,07 ± 0,07	-	0,44 ± 0,08	1,04 ± 0,44	1,04 ± 0,26
50	1522	1515	1,4,5-τριμέθυλο ναφθαλίνιο ισομερές	1,15 ± 0,44	2,32 ± 0,14	-	0,99 ± 0,15	2,81 ± 0,10	3,01 ± 0,60
51	1531		3-(2-μέθυλο-προπένυλο)-1H-ινδένιο	1,64 ± 0,38	0,71 ± 0,18	-	0,92 ± 0,04	1,29 ± 0,16	1,02 ± 0,20
52	1545	1546	2,3,6-τριμεθυλοναφθαλίνιο	1,46 ± 0,21	1,83 ± 0,08	-	0,67 ± 0,12	1,45 ± 0,12	1,52 ± 0,04
53	1551	1552, 1547	1,6,7-τριμεθυλοναφθαλίνιο	1,22 ± 0,02	2,72 ± 0,19	-	0,74 ± 0,11	1,34 ± 0,02	1,36 ± 0,20
54	1578	1576, 1567	Οξείδιο του καρβοφυλλενίου	2,29 ± 0,10	2,18 ± 0,31	-	0,30 ± 0,00	1,20 ± 0,03	1,15 ± 0,13
ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΚΟΙ ΥΑΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ				55,68	71,20	55,62	107,89	105,78	217,33
ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΑ				190,59	67,18	117,52	94,34	94,35	355,43
ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ				1,97	1,99	2,25	1,28	2,47	22,14
ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ				2,29	2,18	-	1	1,20	1,15
ΆΛΛΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ***				112,49	85,15	1,89	63,9	87,56	124,73
ΣΥΝΟΛΟ ΕΝΩΣΕΩΝ				363,02	227,70	177,28	268,41	291,36	720,78

*ΠΑΠΟ: Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου

PΣΜ+SO₂:Ρητίνη Συνεταιρισμού Μεγάρων Αττικής με προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO₂),

PΣΜ-SO₂:Ρητίνη Συνεταιρισμού Μεγάρων Αττικής χωρίς προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO₂)

PXQR : Ρητίνη Εταιρείας Qaulity Resins στη Χαλκιδική

PBE : Ρητίνη Βόρειας Έυβοιας

PKE : Ρητίνη Κεντρικής Έυβοιας

PX : Ρητίνη Χαλκιδικής

**μg/100mL ΠΑΠΟ: Οι συγκεντρώσεις των συστατικών εκφράζονται σε μg/100mL ΠΑΠΟ

***Άλλες ενώσεις: Αλειφατικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, παράγωγα ναφθαλινίου, παράγωγα βενζολίου

****Δείκτης συγκράτησης (R.I) Βιβλιογραφίας:(Amri *et al.*, 2013 ; Fekih *et al.*, 2014 ; Ioannou *et al.*, 2014 ; Idzotic *et al.*, 2005 ; Macchioni *et al.*, 2003 ;

Dob *et al.*, 2005 ; Graïkou *et al.*, 2012 ; Dob *et al.*, 2007 ; Hamrouni *et al.*, 2014

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, το προφίλ των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ ως συνέπεια προσθήκης ρητίνης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας που εξετάστηκαν είναι όμοιο με μικρές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές ανά περιοχή.

Στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο είχε προστεθεί ρητίνη επεξεργασμένη με SO₂ από τον Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων ανιχνεύτηκαν 50 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 363,02 μg/100mL ΠΔΠΟ. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 11 το συστατικό το οποίο φαίνεται να μεταφέρθηκε από τη ρητίνη στο εκχύλισμα εξανίου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η α-τερπινόλη με συγκέντρωση 74,35 μg/100mL ΠΔΠΟ. Ακολουθούν, η βερμπενόνη με συγκέντρωση 27,54 μg/100mL ΠΔΠΟ, 1-μεθυλοναφθαλίνιο, trans-καρβεόλη, α-πινένιο, κοσμένιο, θουγια-2,4(10)-διένιο, τερπινολένιο, 2-μεθυλοναφθαλίνιο, trans-πινοκαρβεόλη, διυδροκαρβεόλη, α-καμφολενάλη με συγκέντρωση 22,06 μg/100mL ΠΔΠΟ, 17,38 μg/100mL ΠΔΠΟ, 16,35 μg/100mL ΠΔΠΟ, 15,55 μg/100mL ΠΔΠΟ, 14,98 μg/100mL ΠΔΠΟ, 14,68 μg/100mL ΠΔΠΟ, 14,05 μg/100mL ΠΔΠΟ, 12,11μg/100mL ΠΔΠΟ, 10,46 μg/100mL ΠΔΠΟ, 9,13 μg/100mL ΠΔΠΟ αντίστοιχα. Σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν οι ουσίες βορνεόλη με συγκέντρωση (6,86 μg/100mL ΠΔΠΟ), d-καρβόνη (5,21 μg/100mL ΠΔΠΟ), το 1-αίθυλο-ναφθαλίνιο (4,94 μg/100mL ΠΔΠΟ), το ντουρένιο (4,89 μg/100mL ΠΔΠΟ), γ-τερπινένιο (4,23 μg/100mL ΠΔΠΟ), τερπινεν-4-όλη (3,99 μg/100mL ΠΔΠΟ), π-κυμεν-8-όλη (3,96 μg/100mL ΠΔΠΟ). Αξιόλογες συγκεντρώσεις εμφάνισαν και παράγωγα του ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα και παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 112,49 μg/100mL ΠΔΠΟ.

Στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο είχε προστεθεί ρητίνη χωρίς προσθήκη SO₂ από τον Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων ανιχνεύτηκαν 51 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 227,70 μg/100mLΠΔΠΟ. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 11 το συστατικό το οποίο φαίνεται να μεταφέρθηκε από τη ρητίνη στο εκχύλισμα εξανίου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι το α-πινένιο με συγκέντρωση 24,96 μg/100mLΠΔΠΟ. Ακολουθούν, η βερμπενόνη, το θουγια-2,4(10)-διένιο, το 1-μεθυλοναφθαλίνιο, το κοσμένιο, το 2-μεθυλοναφθαλίνιο, η α-τερπινεόλη, η τερπινεν-4-όλη, το γ-τερπινένιο, το τερπινολένιο με συγκεντρώσεις 27,54 μg/100mLΠΔΠΟ, 20,60 μg/100mLΠΔΠΟ, 19,61 μg/100mLΠΔΠΟ, 14,25 μg/100mLΠΔΠΟ, 10,74 μg/100mLΠΔΠΟ, 10,60 μg/100mLΠΔΠΟ, 6,41 μg/100mLΠΔΠΟ, 5,91 μg/100mLΠΔΠΟ και 5,68 μg/100mLΠΔΠΟ αντίστοιχα. Αξιοσημείωτες είναι και οι συγκεντρώσεις των ουσιών S-cis-βερμπενόλη (4,90 μg/100mLΠΔΠΟ), διυδροκαρβεόλη (3,35 μg/100mLΠΔΠΟ), φενχολόλη (3,09 μg/100mLΠΔΠΟ) και το β-μυρκένιο (3,08 μg/100mLΠΔΠΟ). Επιπλέον, αξιοσημείωτες ήταν και οι συγκεντρώσεις των παράγωγων ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα και παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 85,15 μg/100mL ΠΔΠΟ.

Στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο είχε προστεθεί ρητίνη προερχόμενη από την Εταιρεία Quality Resins στη Χαλκιδική ανιχνεύτηκαν 30 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 177,28 μg/100mL ΠΔΠΟ. Από τον πίνακα 11 φαίνεται ότι το συστατικό το οποίο μεταφέρθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα ΠΔΠΟ ως αποτέλεσμα προσθήκης σε αυτό ποσότητας ρητίνης είναι η α-τερπινεόλη με συγκέντρωση 77,63 μg/100mL ΠΔΠΟ.

Ακολουθούν, το α-πινένιο, d-λιμονένιο, διυδροκαρβεόλη, τορεγιόλη, γ-τερπινένιο, βορνεόλη με συγκεντρώσεις 18,99 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 18,75 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 11,80 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 8,20 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 7,24 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 7,11 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ αντίστοιχα. Αξιόλογες συγκεντρώσεις εμφάνισαν και τα συστατικά κοσμένιο (5,73 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), μεθυλοευγενόλη (5,09 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (5,01 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), τερπενεν-4-όλη (4,68 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) φενχυλόλη (4,33 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Αξίζει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο εκχύλισμα εξανίου δεν εμφανίστηκαν παράγωγα ναφθαλινίου, ενώ οι συγκεντρώσεις των παραγώγων βενζολίου καθώς και των άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 1,89 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ.

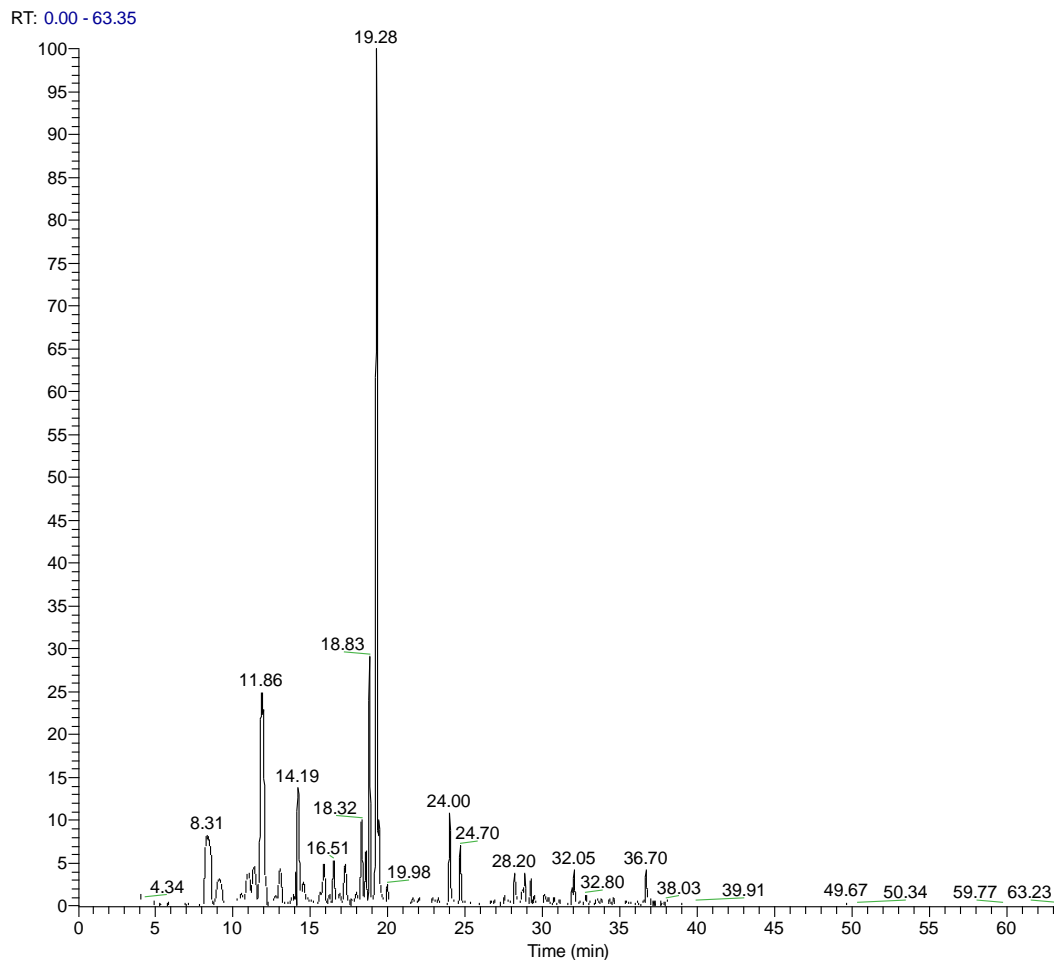
Στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο είχε προστεθεί ρητίνη προερχόμενη από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας ανιχνεύτηκαν 52 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 268,41 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Από τον πίνακα 11 φαίνεται ότι το συστατικό το οποίο μεταφέρθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα εξανίου ως αποτέλεσμα προσθήκης σε αυτό ποσότητας ρητίνης είναι το d-λιμονένιο με συγκέντρωση 34,40 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Ακολουθούν με μικρότερες αλλά σημαντικές συγκεντρώσεις τα συστατικά α-τερπινεόλη (32,19 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), γ-τερπινένιο (23,98 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), α-πινένιο (20,73 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), ευκαλυπτόλη (19,50 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 1-μεθυλο-ναφθαλίνιο (10,92 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (10,34 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), τερπινολένιο (8,25 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), cis-β-οκμένιο (7,46 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), διυδροκαρβεόλη (7,06 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), φενχυλόλη (6,88 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 2-μεθυλο-ναφθαλίνιο (6,71 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 1-τερπινεόλη (6,56 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ).

Αξιοσημείωτες ήταν και οι συγκεντρώσεις των παράγωγων ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα και παρουσιάζοντας στο σύνολο τους συγκέντρωση 63,9 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ.

Στο εκχύλισμα εξανίου στο οποίο είχε προστεθεί ρητίνη προερχόμενη από την περιοχή της Κεντρικής Εύβοιας ανιχνεύτηκαν 54 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 291,36 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Το συστατικό το οποίο φαίνεται να μεταφέρθηκε στο εκχύλισμα εξανίου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η α -τερπινεόλη (36,23 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) και ακολουθούν με μικρότερες συγκεντρώσεις τα συστατικά α -πινένιο (25,80 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (25,50 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 1-μεθυλοναφθαλίνιο (22,19 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), d-λιμονένιο (13,81 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 2-μεθυλοναφθαλίνιο (13,43 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), κοσμένιο (13,06 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Σημαντικές συγκεντρώσεις εμφάνισαν επίσης και τα συστατικά γ -τερπινένιο (11,09 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), βερμπενόνη (8 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), βορνεόλη (6,19 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), π -κυμένιο (6,08 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), φενχυλόλη (5,21 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), διυδροκαρβεόλη (5,16 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Αξιοσημείωτες ήταν και οι συγκεντρώσεις των παράγωγων ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα και παρουσιάζοντας στο σύνολο τους συγκέντρωση 87,56 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ.

Τέλος, στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο είχε προστεθεί ρητίνη προερχόμενη από την περιοχή της Χαλκιδικής ανιχνεύτηκαν 57 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 720,78 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Το συστατικό το οποίο φαίνεται να μεταφέρθηκε στο ΠΔΠΟ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η α -τερπινεόλη (200,94 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) και ακολουθούν με μικρότερες

συγκεντρώσεις τα συστατικά α-πινένιο (62,89 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), d-λιμονένιο (59,92 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), γ-τερπινένιο (43,59 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 1-μεθυλοναφθαλίνιο (25,88 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), βορνεόλη (23,59 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (23,05 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), δωδροκαρβεόλη (21,38 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), φενχυλόλη (16,38 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), ευκαλυπτόλη (15,40 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), τερπινέν-4-όλη (15,10 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), S-cis-βερμπενόλη (14,27 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 2-μεθυλο-ναφθαλίνιο (13,88 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), κοσμένιο (13,74 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 1-τερπινεόλη (13,64 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Αξιόλογες συγκεντρώσεις εμφάνισαν και τα συστατικά cis-β-οκιμένιο (11,09 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), τερπινολένιο (10,56 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), πινοκαρβόνη (6,98 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), trans-πινοκαρβεόλη (6,47 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), α-μουουρολένιο (6,76 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), βερμπενόνη (4,96 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Επιπλέον, σημαντικές ήταν και οι συγκεντρώσεις των παράγωγων ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα παρουσιάζοντας στο σύνολο τους συγκέντρωση 124,73 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ.



Εικόνα 37: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Χαλκιδική).

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στον πίνακα 11 και στις έξι περιπτώσεις των εκχυλισμάτων εξανίου των ΠΔΠΟ το προφίλ των πτητικών συστατικών είναι σχεδόν όμοιο με μικρές ποιοτικές αλλά σημαντικές ποσοτικές διαφορές ανα περιοχή ρητίνης. Το εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο είχε προστεθεί ποσότητα ρητίνης από την περιοχή της Χαλκιδικής εμφάνισε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε συστατικά (720,78 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) ενώ τις χαμηλότερες περιεκτικότητες σε συστατικά εμφάνισαν τα εκχυλίσματα εξανίου των ΠΔΠΟ στα οποία είχαν προστεθεί ποσότητες ρητίνης από τις περιοχές Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων

(227,70 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) και Εταιρεία Quality Resins στη Χαλκιδική (179,05 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Τα κυρίαρχα συστατικά παρουσίασαν παρόμοια εικόνα και στις έξι περιπτώσεις των εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ έχοντας βέβαια σημαντικές ποσοτικές διαφορές. Αυτά είναι: η α -τερπινεόλη με συγκέντρωση που κυμάνθηκε από 10,60 έως 200,94 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, α -πινένιο (16,35-62,89 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), d-λιμονένιο (3,11-59,92 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), γ -τερπινένιο (4,23-43,59 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (5,01-25,50 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), φενχυλόλη (3,09-16,38 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 1-μεθυλο-ναφθαλίνιο (0,38-25,88 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), 2-μεθυλο-ναφθαλίνιο (6,71-14,05 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), βορνεόλη (2,48-23,59 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), βερμπενόνη (0,99-27,54 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Η α -τερπινεόλη αποτέλεσε το κυρίαρχο συστατικό στα εκχυλίσματα από τις περιοχές Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με την προσθήκη δείγματος ρητίνης χωρίς διοξείδιο του θείου, Εταιρεία Quality Resins στη Χαλκιδική, Κεντρική Εύβοια και Χαλκιδική. Το εκχύλισμα εξανίου στο οποίο είχε προστεθεί ποσότητα ρητίνης από την περιοχή της Χαλκιδικής εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση α -τερπινεόλης (200,94 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), ενώ στα υπόλοιπα εκχυλίσματα η συγκέντρωσή της ήταν πολύ χαμηλότερη, με τη μικρότερη συγκέντρωση (10,60 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), να εμφανίζεται στο εκχύλισμα εξανίου από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων όπου είχε προστεθεί δείγμα ρητίνης το οποίο δεν περιείχε διοξείδιο του θείου. Το α -πινένιο αποτέλεσε κυρίαρχο συστατικό μόνο στο εκχύλισμα εξανίου του Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων όπου είχε προστεθεί ρητίνη χωρίς την προσθήκη διοξειδίου του θείου με συγκέντρωση 24,96 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Την υψηλότερη συγκέντρωση του α -πινενίου (62,89 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) εμφάνισε το εκχύλισμα εξανίου από την περιοχή της Χαλκιδικής αποτελώντας έτσι το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό. Το d-λιμονένιο αποτέλεσε το κυρίαρχο συστατικό στο εκχύλισμα εξανίου της περιοχής Βόρειας Εύβοιας με συγκέντρωση (34,40 $\mu\text{g}/100\text{mL}$

ΠΔΠΟ), ενώ εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση (59,92 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) στο εκχύλισμα εξανίου της Χαλκιδικής αποτελώντας το τρίτο κυρίαρχο συστατικό. Πρέπει να παρατηρηθεί ότι κάποια από συστατικά δεν εμφανίστηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα ΠΔΠΟ, χαρακτηριστικά αναφέρονται το π-κυμέν-8-όλη το οποίο εμφανίστηκε μόνο στο εκχύλισμα από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων χωρίς διοξείδιο του θείου με συγκέντρωση (3,96 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα παράγωγα ναφθαλινίου εμφανίστηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα εξανίου των ΠΔΠΟ εκτός εκείνο της Εταιρείας Quality resins στη Χαλκιδική, ενώ τα παράγωγα βενζολίου εμφανίστηκαν σε όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζοντας αξιόλογες συγκεντρώσεις.

Γενικά, από το σύνολο των πτητικών συστατικών που μεταφέρθηκαν στα ΠΔΠΟ τα μονοτερπένια εμφανίζονται ως κυρίαρχα συστατικά, ιδιαίτερα η α-τερπινεόλη, το d-λιμονένιο, α-πινένιο και το γ-τερπινένιο. Το α-πινένιο το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό των αιθερίων ελαίων ρητίνης σε ποσοστό 80% δεν παρουσίασε ιδιαίτερα μεγάλη συγκέντρωση στα εκχυλίσματα εξανίου όπως θα περιμέναμε, πιθανόν λόγω οξείδωσης και υψηλής πτητικότητας που μπορεί να υπέστη. Ακόμη, η παρουσία μιας ποικιλίας εξαιρετικά πτητικών αλειφατικών ενώσεων με χαμηλή αφθονία σε όλα τα εκχυλίσματα εξανίου των ΠΔΠΟ είναι μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση.

Από τη βιβλιογραφία καταδεικνύεται ότι μελέτες ανάλογου τύπου είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Χωρίς να αποφεύγεται ο κίνδυνος να καταλήξουμε σε λάθος συμπεράσματα, μπορεί να γίνει μια σύγκριση ώστε να υπάρχει μια γενικότερη εικόνα της σύνθεσης των υδραλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (ΠΔΠΟ) και από προηγούμενες παρόμοιες εργασίες. Η μοναδική εργασία που είναι σχετικά συγκρίσιμη με την παρούσα είναι των Jerkovic *et al.*, 2011, οι οποίοι μελέτησαν και

προσδιόρισαν το χημικό προφίλ των πτητικών και μη οργανικών συστατικών από σπάνιο ρητινώδες οργανικό ίζημα που λήφθηκε από αρχαίο ρωμαϊκό αμφορέα που βρέθηκε στην Αδριατική θάλασσα. Ο αμφορέας είναι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά προϊόντα της αρχαίας Μεσογείου. Το κρασί μεταφερόταν σε αμφορείς (*Amphorae vinariae*) χαρακτηριστικού μακριού σχήματος που συχνά ήταν επικαλυμμένα με ένα λεπτό στρώμα που προερχόταν συνήθως από ρητίνη πεύκου. Λόγω των υδρόφοβων ιδιοτήτων της, αυτή η ρητινώδης επίστρωση ενεργούσε ως αδιάβροχος παράγοντας που σφράγιζε το εσωτερικό των αμφορέων και έδινε στο κρασί μια ιδιαίτερη γεύση. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (χωρίς παραγωγοποίηση) και εκτέθηκε σε Headspace-μικροεκχύλιση στερεής φάσης (HS-SPME) ακολουθούμενη από GC και GC-MS αναλύσεις. Δύο ίνες διαφορετικής πολικότητας χρησιμοποιήθηκαν για την απόκτηση λεπτομερέστερης σύνθεσης του δείγματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η χημική σύσταση του υπολείμματος αποτελούνταν από υψηλά ποσοστά παραγώγων βενζολίου, ναφθαλινίου και φαιναθρενίου, μονοτερπένια και άλλες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με τα μονοτερπένια να αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά. Ακόμη, τα αποτελέσματα του GC και GC-MS από το διαλυμένο σε διχλωρομεθάνιο υπόλειμμα του αμφορέα αποκάλυψαν σημαντική παρουσία υψηλού μοριακού βάρους διτερπενίων με τα κυριότερα να ήταν το μέθυλο διυδροαβιετικό και το ρετένιο.

4.2.3 Πτητικά συστατικά των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ μετά από παραμονή σε ΠΔΠΟ ποσότητας ρητίνης για 12 ημέρες.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αναγνωρισμένα πτητικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν σε δύο εκχυλίσματα εξανίου του ΠΔΠΟ ως αποτέλεσμα της προσθήκης σε αυτά ποσότητας ρητίνης από την περιοχή Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων όπου στο ένα εκχύλισμα παρέμεινε ποσότητα ρητίνης (0,1g) σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες ενώ στο άλλο για 1h υπο συνεχή ανάδευση και που προέκυψαν μετά από ανάλυση με (GC-MS). Το εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ (12 ημέρες), συγκρίθηκε ως προς τη χημική του σύσταση με εκχύλισμα εξανίου ΠΔΠΟ (1h). Στις Εικ. 38 και 39 παρουσιάζονται τα αέρια χρωματογραφήματα των πτητικών συστατικών των εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ (εκχυλίσματα εξανίου) των 12 ημερών και 1h αντίστοιχα.

Τα 48 συστατικά που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 157,25 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ για το εκχύλισμα εξανίου όπου η ρητίνη παρέμεινε για 12 ημέρες και 131,21 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ για το εκχύλισμα εξανίου όπου η ρητίνη παρέμεινε για 1h. Από τον πίνακα 12 προκύπτει ότι η χημική σύσταση των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ όπου η ρητίνη παρέμεινε για 12 ημέρες και 1h αντίστοιχα, αποτελείται κυρίως από μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, η συγκέντρωση των οποίων είναι 24,63 και 14,67 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, οξυγονούχα μονοτερπένια 64,18 και 16,80 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από σεσκιτερπένια 2,46 και 1,52 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ) και οξυγονούχα σεσκιτερπένια με συγκέντρωση 2,94 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ τα οποία εμφανίστηκαν μόνο στο εκχύλισμα εξανίου όπου η ρητίνη παρέμεινε για 1h σε ΠΔΠΟ. Αρκετά σημαντικές ποσότητες εμφάνισαν και άλλες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες περιλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους αλειφατικές ενώσεις καθώς και

παράγωγα ναφθαλενίου και βενζολίου, οι οποίες στο σύνολο τους εμφάνισαν συγκέντρωση 67,94 και 97,59 µg/100mL ΠΔΠΟ.

Πίνακας 12: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών που ανιχνεύτηκαν σε εκχυλίσματα ΠΔΠΟ μετά από παραμονή ποσότητας ρητίνης σε αυτά για 12 ημέρες και 1h

A/A	Δείκτης συγκράτησης (R.I)	Δείκτης συγκράτησης (R.I) Βιβλιογραφίας**	Συστατικά		
				ΡΣΜ- SO ₂ µg/100mL ΠΔΠΟ* Ποσότητα ρητίνης 0,1g-Παραμονή σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες	ΡΣΜ- SO ₂ µg/100mL ΠΔΠΟ* Ποσότητα ρητίνης 0,1g-Παραμονή σε ΠΔΠΟ για 1 ώρα
1	917	922, 927	α-πινένιο	-	3,11 ± 0,04
2	939	943, 942	θουγια-2,4(10)-διένιο	8,40 ± 0,95	4,76 ± 0,54
3	988	996	1,3,5-τριμεθυλοβενζόλιο	1,56 ± 0,58	1,09 ± 0,03
4	995	997, 994	2,6-διμεθυλο-1,3,5,7- οκτατετραένιο	5,88 ± 0,49	1,45 ± 0,17
5	1007	1005, 1003	ευκαλυπτόλη	2,53 ± 0,57	-
6	1018	1010, 1017	p-κυμένιο	-	0,29 ± 0,07
7	1021	1020, 1019	d-λιμονένιο	6,91 ± 0,93	2,26 ± 0,15
8	1029	1052, 1046	cis-β-οικιμένιο	1,57 ± 0,30	0,69 ± 0,01
9	1043	1043, 1042	τολουόλιο-m-προπύλιο	-	0,77 ± 0,10
10	1050	1050, 1051	Βενζόλιο, 1,3-διαίθυλο-	1,35 ± 0,18	2,12 ± 0,03
11	1059	1059, 1057	1-μέθυλο-2-προπυλοβενζόλιο	-	0,73 ± 0,02
12	1069	1067, 1070	4-αίθυλο-ο-ξυλόλιο	1,49 ± 0,22	1,74 ± 0,09
13	1077	1062, 1064	γ-τερπινένιο	0,61 ± 0,13	2,03 ± 0,07
14	1084	1088, 1085	τερπινολένιο	4,00 ± 1,20	0,50 ± 0,01
15	1091	1091, 1094	π-κυμενένιο	3,14 ± 0,79	1,32 ± 0,16
16	1100	1096, 1101	3-αίθυλο-ο-ξυλένιο	2,61 ± 0,35	-
17	1115	1115	Φενχολόλη	0,73 ± 0,01	4,29 ± 0,56
18	1124	1128, 1125	α-καμφολενάλη	2,36 ± 0,25	0,66 ± 0,08
19	1138	1140, 1141	trans-πινοκαρβεόλη	1,63 ± 0,19	1,12 ± 0,04
20	1146	1143	S-cis-βερμπενόλη	2,51 ± 0,30	1,40 ± 0,20
21	1156	1150	ύδρο καμφένιο	2,22 ± 0,16	-
22	1162	1164, 1161	πινοκαρβόνη	0,49 ± 0,19	-
23	1171	1168, 1161	βορνεόλη	1,18 ± 0,16	-

24	1177	1179, 1177	τερπινεν-4-όλη	4,06 ± 0,57	1,14 ± 0,13
25	1189	1189, 1190	α-τερπινεδόλη	3,98 ± 0,98	3,76 ± 0,74
26	1196	1194	διυδροκαρβεόλη	25,31 ± 1,42	-
27	1207	1203, 1206	βερμπενόνη	3,70 ± 0,57	3,80 ± 0,04
28	1217	1217, 1219	trans-καρβεόλη	10,83 ± 1,07	-
29	1245	1244, 1242	d-καρβόνη	1,28 ± 0,02	0,63 ± 0,10
30	1254	1252	2,3-πινενοδιόλη	1,37 ± 0,35	-
31	1295	1330, 1293	1-μεθυλοναφθαλίνιο	-	12,18 ± 0,16
32	1312	1300, 1307	2-μεθυλοναφθαλίνιο	-	7,78 ± 0,63
33	1370	1366, 1361	n-ενδεκανόλη	0,43 ± 0,11	0,43 ± 0,01
34	1393	1393,1397	1-αιθυλοναφθαλίνιο	0,64 ± 0,14	-
35	1410	1409, 1411	1,8-διμεθυλοναφθαλίνιο	-	2,79 ± 0,13
36	1418	1414, 1415	1,7-διμεθυλοναφθαλίνιο	-	3,01 ± 0,06
37	1425	1421, 1420	1,8-διμεθυλοναφθαλίνιο ισομερές	-	0,93 ± 0,05
38	1440	1442, 1443	1,7-διμεθυλοναφθαλίνιο ισομερές	-	0,28 ± 0,08
39	1476	1472, 1466	2-μεθυλοβουτυρικό φαινυλαιθύλιο	1,35 ± 0,29	0,30 ± 0,07
40	1484	1496, 1499	α-μουσουρολένιο	0,80 ± 0,07	0,89 ± 0,06
41	1495	1485, 1505	1,4,6-τριμέθυλο ναφθαλίνιο	-	0,66 ± 0,13
42	1502	1515	1,4,5-τριμέθυλο ναφθαλίνιο	-	1,40 ± 0,05
43	1512	1505	1,4,6-τριμέθυλο ναφθαλίνιο ισομερές	-	0,91 ± 0,16
44	1522	1515	1,4,5-τριμέθυλο ναφθαλίνιο ισομερές	-	1,19 ± 0,06
45	1531		3-(2-μέθυλο-προπένυλο)-1H- ινδένιο	-	1,04 ± 0,12
46	1545	1546	2,3,6-τριμέθυλο-ναφθαλίνιο	-	0,78 ± 0,04
47	1551	1552, 1547	1,6,7-τριμέθυλο ναφθαλίνιο	-	0,54 ± 0,03
48	1578	1576, 1567	Οξείδιο του καρυοφυλλενίου	-	1,90 ± 0,28
ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ				24,63	13,60
ΟΞΥΓΟΝΩΜΕΝΑ ΜΟΝΟΤΕΡΠΗΝΙΑ				64,18	16,80
ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ				1,23	1,32
ΟΞΥΓΟΝΩΜΕΝΑ ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΗΝΙΑ				-	1,9
ΆΛΛΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ(μικρού μοριακού βάρους αλειφατικές ενώσεις καθώς και παράγωγα ναφθαλινίου και βενζολίου)				67,21	97,59
ΣΥΝΟΛΟ ΕΝΩΣΕΩΝ				157,25	131,21

*ΠΑΠΟ: Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου

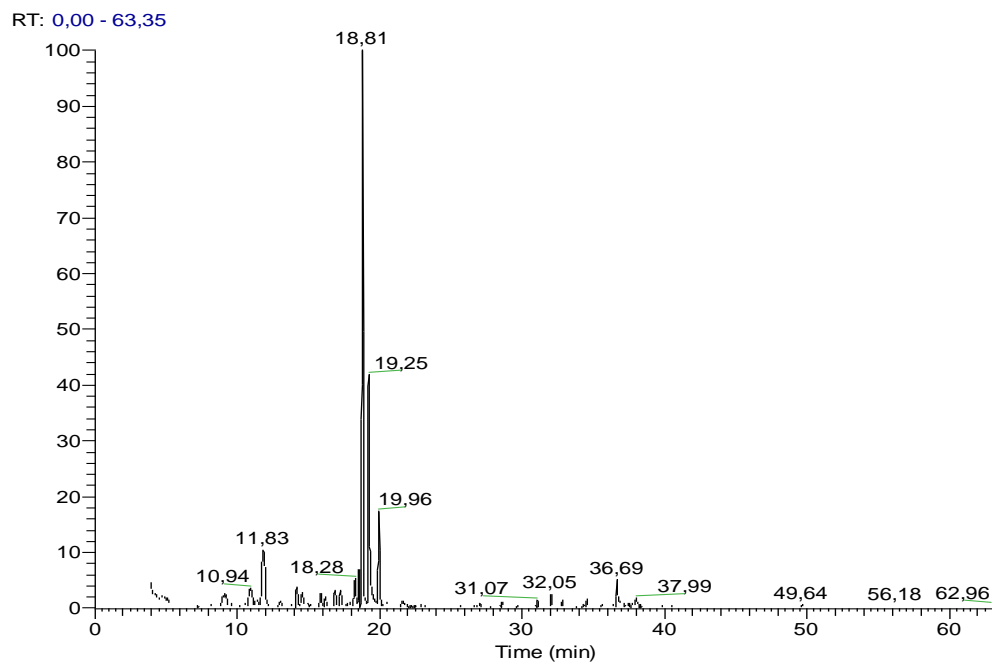
ΡΣΜ-SO₂:Ρητίνη Συνεταιρισμού Μεγάρων Αττικής χωρίς προσθήκη διοξειδίου του θείου (SO₂)

**Δείκτης συγκράτησης (R.I) Βιβλιογραφίας:(Amri *et al.*, 2013 ; Fekih *et al.*, 2014 ; Ioannou *et al.*, 2014 ; Idzajtich *et al.*, 2005 ; Macchioni *et al.*, 2003 ; Dob *et al.*, 2005 ; Graikou *et al.*, 2012 ; Dob *et al.*, 2007 ; Hamrouni *et al.*, 2014

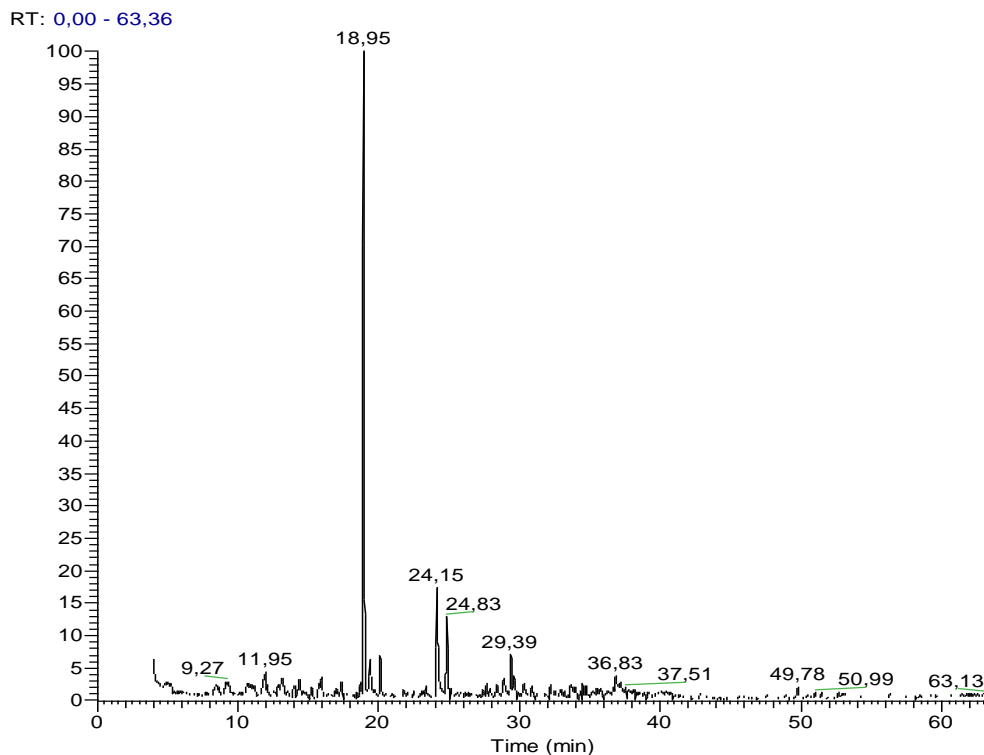
Στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο η ρητίνη παρέμεινε για 12 ημέρες ανιχνεύτηκαν 30 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 157,25 μg/100mL ΠΔΠΟ. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 12 το συστατικό το οποίο φαίνεται να μεταφέρθηκε από τη ρητίνη στο εκχύλισμα εξανίου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η δευδροκαρβεόλη με συγκέντρωση 25,31 μg/100mL ΠΔΠΟ. Ακολουθούν, trans-καρβεόλη, θουγια-2,4(10)-διένιο, d-λιμονένιο, κοσμένιο, τερπινέν-4-όλη, τερπινολένιο, με συγκέντρωση 10,93 μg/100mL ΠΔΠΟ, 8,40 μg/100mL ΠΔΠΟ, 6,91 μg/100mL ΠΔΠΟ, 5,88 μg/100mL ΠΔΠΟ, 4,06 μg/100mL ΠΔΠΟ, 4,00 μg/100mL ΠΔΠΟ, Σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν οι ουσίες α-τερπινεόλη, βερμπενόνη, p-κυμένιο, με συγκεντρώσεις 3,98 μg/100mL ΠΔΠΟ, 3,70 μg/100mL ΠΔΠΟ, 3,14 μg/100mL ΠΔΠΟ. Αξίζει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο δείγμα δεν εμφάνισε παράγωγα ναφθαλινίου ενώ μικρή ήταν και η παρουσία των παραγώγων βενζολίου. Η συγκέντρωση που εμφάνισαν στο σύνολο τους μαζί με τις υπόλοιπες αλειφατικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους ήταν 67,21 μg/100mL ΠΔΠΟ.

Τέλος, στο εκχύλισμα εξανίου του ΠΔΠΟ στο οποίο η ρητίνη παρέμεινε για μία ώρα ανιχνεύτηκαν 39 ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 131,21 μg/100mL ΠΔΠΟ. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 12 το συστατικό το οποίο φαίνεται να μεταφέρθηκε από τη ρητίνη στο εκχύλισμα εξανίου

σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι 1-μεθυλοναφθαλίνιο με συγκέντρωση 12,18 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Ακολουθούν, 2-μεθυλοναφθαλίνιο, θουγια-2,4(10)-διένιο, φενχολόλη με συγκέντρωση 7,78 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 4,76 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 4,29 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Σημαντικές συγκεντρώσεις εμφανίζουν και οι ουσίες βερμπενόνη,α-τερπινεόλη, α-πινένιο με συγκεντρώσεις 3,80 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 3,76 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 3,11 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ. Αξιοσημείωτες ήταν και οι συγκεντρώσεις των παράγωγων ναφθαλινίου και βενζολίου καθώς και άλλων αλειφατικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που εμφανίστηκαν στο εκχύλισμα και παρουσίασαν στο σύνολο τους συγκέντρωση 97,59 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ.



Εικόν 38: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου μετά από παραμονή της ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων)



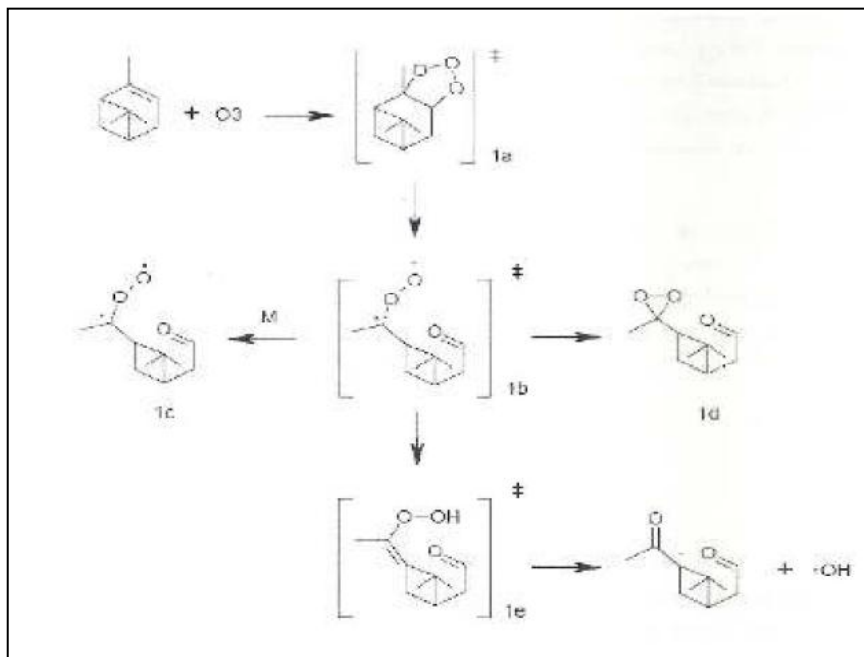
Εικόνα 39: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου μετά από παραμονή της ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 1h. Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 12 παρατηρούμε σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ στα οποία η ρητίνη παρέμεινε υπό ανάδευση για 12 ημέρες και 1h. Το εκχύλισμα εξανίου (12ημέρες) εμφανίζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε συστατικά και μικρότερο αριθμό ενώσεων σε αντίθεση με το εκχύλισμα εξανίου (1h) το οποίο εμφανίζει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε συστατικά και μεγαλύτερο αριθμό ενώσεων. Όσον αφορά τις ποιοτικές διαφορές μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων παρατηρούμε ότι στο εκχύλισμα εξανίου(12 ημέρες) δεν εμφανίζονται τα παράγωγα ναφθαλινίου ενώ μικρή είναι και η παρουσία των παραγώγων βενζολίου.

Τα κυρίαρχα συστατικά παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα και στα δύο εκχυλίσματα παρά το γεγονός ότι έχει χρησιμοποιηθεί ποσότητα ρητίνης από το ίδιο δείγμα. Συγκεκριμένα, στο εκχύλισμα εξανίου (12 ημέρες) τα κυρίαρχα συστατικά ήταν δευδροκαρβεόλη με συγκέντρωση 25,31 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, trans-καρβεόλη (10,93 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (8,40 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), d-λιμονένιο (6,91 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), ενώ στο εκχύλισμα εξανίου (1h) τα κυρίαρχα συστατικά ήταν το 1-μεθυλοναφθαλίνιο με συγκέντρωση 12,18 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ, 2-μεθυλοναφθαλίνιο (7,78 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ), θουγια-2,4(10)-διένιο (4,76 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ΠΔΠΟ).

Αξίζει να σημειωθεί μια σημαντική ποιοτική διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων ΠΔΠΟ καθώς στο εκχύλισμα εξανίου (12 ημέρες) δεν εμφανίζεται το α -πινένιο, το συστατικό που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο αιθέριο έλαιο ρητίνης, πιθανόν η απουσία του α -πινενίου να οφείλεται στην έκθεση αυτού στο ατμοσφαιρικό όζον. Συγκεκριμένα, κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό και την εκπομπή των τερπενίων είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, η ηλικία του φυτού και το όζον καθώς έχει βρεθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση όζοντος επηρεάζει τον ρυθμό σχηματισμού των τερπενίων. Βρέθηκε ότι συγκεκριμένα τερπένια όπως το α -πινένιο και το λιμονένιο αυξάνουν τις συγκεντρώσεις τους σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα άλλα τερπένια, όταν εκτεθεί το φυτό σε υψηλές συγκεντρώσεις όζοντος (Llusia *et al.*, 2002 ; Penuelas *et al.*, 1998 ; Kim, 2000) Τα τερπένια και συγκεκριμένα τα μονοτερπένια αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή των χημικά ενεργών ουσιών της ατμόσφαιρας καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στη συνολική χημεία της ατμόσφαιρας και αλληλεπιδρούν με πολλές διαφορετικές χημικές ουσίες. Είναι οι κύριες πρόδρομες ενώσεις στο σχηματισμό του τροποσφαιρικού όζοντος και των ριζών υδροξυλίου.

Η αντίδραση μεταξύ όζοντος και τερπενίων είναι μια πολυσύνθετη αντίδραση πολλών σταδίων. Στην (Εικ.40) φαίνεται ο μηχανισμός της οζονόλυσης του α-πινενίου, αρχίζει με προσθήκη όζοντος στο διπλό δεσμό, ώστε να προκύψει ένα οζονίδιο, όπου μετά αποσυντίθεται σε δύο καρβονύλια. Κάτω από ατμοσφαιρικές συνθήκες, τα χημικώς ενεργά καρβονύλια πρόκειται μετά από σύγκρουση να υποστούν ισομερείωση και να δώσουν υδροϋπεροξείδιο. Στη συνέχεια ακολουθεί η διάσπαση του δεσμού του οξυγόνου με το υδροξύλιο, ώστε να δημιουργηθεί μια ρίζα υδροξυλίου και μια υποκατεστημένη ρίζα αλκυλίου. Μετά η ρίζα αλκυλίου ανακατατάσσεται σε εστέρα και ακολουθεί η αποσύνθεση.



Εικόνα 40. Αντίδραση όζοντος και τερπενίων

4.3 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα GC-MS των εκχυλισμάτων εξανίου του ΠΔΠΟ(12 ημέρες και 1h), αποκάλυψαν τη μεταφορά σε αυτά 48 ενώσεων. Η χημική σύσταση αυτών αποτελούνταν κυρίως από από μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, οξυγονούχα μονοτερπένια και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από σεσκιτερπένια και οξυγονούχα σεσκιτερπένια. Αρκετά σημαντικές ποσότητες εμφάνισαν και άλλες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες περιλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους αλειφατικές ενώσεις καθώς και παράγωγα ναφθαλενίου και βενζολίου. Από το σύνολο των πτητικών συστατικών που μεταφέρθηκαν στα εκχυλίσματα ΠΔΠΟ τα μονοτερπένια εμφανίζονται ως κυρίαρχα συστατικά, με τα κυριότερα να είναι η α-τερπινεόλη, το d-λιμονένιο, α-πινένιο και το γ-τερπινένιο.

Όσον αφορά το εκχύλισμα εξανίου ΠΔΠΟ στα οποία η ρητίνη παρέμεινε σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες και 1h τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές. Το εκχύλισμα εξανίου (12 ημέρες) σε αντίθεση με το εκχύλισμα εξανίου (1h), παρουσίασε μικρότερο αριθμό ενώσεων, υψηλότερη περιεκτικότητα σε συστατικά, απουσία παράγωγων ναφθαλενίου και βενζολίου ενώ αξιοσημείωτη είναι και η απουσία του α-πινενίου. Τα κυρίαρχα συστατικά των δύο εκχυλισμάτων παρουσίασαν διαφορετική εικόνα στα δύο εκχυλίσματα, πιθανόν λόγω του διαφορετικού χρόνου παραμονής της ρητίνης σε αυτά καθώς και άλλων παραγόντων που φαίνεται να επηρεάζουν τα πτητικά συστατικά. Συγκεκριμένα, στο εκχύλισμα εξανίου(12 ημέρες) τα κυρίαρχα συστατικά ήταν δευδροκαρβεόλη, trans-καρβεόλη, θουγια-2,4(10)-διένιο, d-λιμονένιο, ενώ στο εκχύλισμα εξανίου(1 ώρα) τα κυρίαρχα συστατικά ήταν το 1-μεθυλοναφθαλίνιο, 2-μεθυλοναφθαλίνιο και το θουγια-2,4(10)-διένιο.

4.4 Ανάλυση υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (ΠΔΠΟ) με υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανεστραμμένης Φάσης (HPLC-RP)

Ανάλυση HPLC-DAD

Μετά την απομάκρυνση των πτητικών συστατικών τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ρητίνης (ΠΔΠΟ) εξετάστηκαν για την παρουσία μη πτητικών οργανικών ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους (διτερπενικά οξέα) προερχόμενα από το κολοφώνιο. Αρχικά, αναλύθηκαν με το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) για τον προσδιορισμό των μεγίστων απορροφήσεων (λ_{max}) των ρητινικών οξέων και στη συνέχεια με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος (HPLC/DAD).

Η ανάλυση της υδατικής φάσης των ΠΔΠΟ, έγινε με σύστημα Agilent Model 1100 HPLC, εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector, DAD) (Εικ.41). Η στήλη ήταν OPTI-GUARD SUPELCO Analytical (Sigma-Aldrich) C18 ανεστραμμένης φάσης, μήκους 250 mm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm και πορώδους υλικού πλήρωσης (5 μ m). Η κινητή φάση ήταν συνδυασμός δύο διαλυτών. Ο διαλύτης Α ήταν δις απεσταγμένο νερό ρυθμισμένο σε pH 2,5 με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος 0,1% v/v και ο διαλύτης Β ήταν ακετονιτρίλιο υψηλής καθαρότητας (99,9) για HPLC. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη από το λογισμικό του συστήματος στη σταθερή τιμή 0,5mL/min και η πίεση της στήλης κυμαινόταν από 60-68 bar από τη στιγμή της ένεσης μέχρι την έκλουση των ουσιών. Επίσης, η στήλη ήταν θερμοστατούμενη σε ειδικό φούρνο για HPLC (Column heater-Model 7971, Jones Chromatography) διατηρώντας μια μέση τιμή θερμοκρασίας γύρω στους 25⁰C, καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία.



Εικόνα 41: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις.

Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλο προγραμματισμό του οργάνου, ώστε να γίνει καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων ήταν το HP ChemStation. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης φαίνεται στην Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε

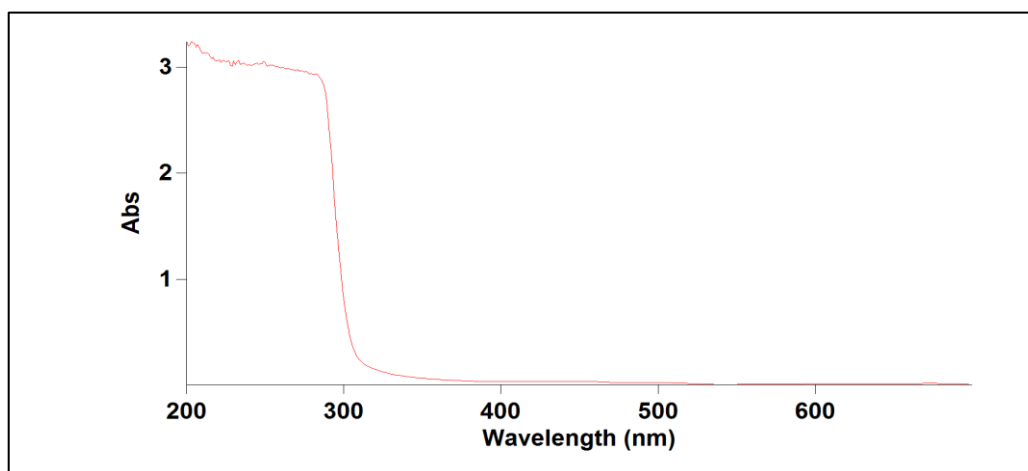
Χρόνος (min)	Ροή (mL/min)	Διαλύτης B: ACN (%)	Διαλύτης A:H₂O σε pH=2,5 (%)
0	0,5	60	40
15	0,5	80	20
25	0,5	90	10
40	0,5	90	10
42	0,5	60	40

Τα δείγματα εισάγονταν στο σύστημα με ειδική σύριγγα, σε βαλβίδα υψηλής πίεσης Rheodyne τύπου 7125 και ο όγκος του δείγματος ήταν 20μL. Ο χρόνος καταγραφής των χρωματογραφημάτων ρυθμίστηκε στα 42 min. Η καταγραφή των εκλούμενων συστατικών γίνονταν συνεχώς με καταγραφή του φάσματος απορρόφησης από τον ανιχνευτή διάταξης διόδων, καθώς και σε επιλεγμένα μήκη κύματος. Αυτά ήταν στα 220, 240, 250, 268 και 350 nm, μήκη κύματος στα οποία τα ρητινικά οξέα (διτερπενικά οξέα) εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και τα φάσματα UV-VIS των δειγμάτων που καταγράφηκαν και της βιβλιογραφία (Kersten *et al.*, 2006).

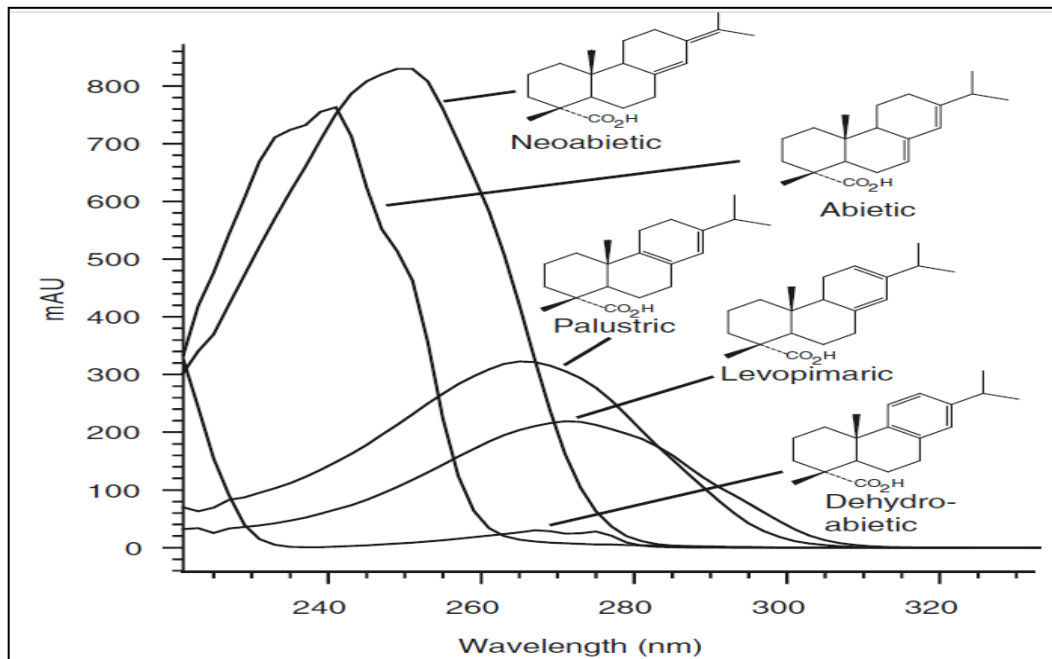
4.5 Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.5.1 Αποτελέσματα της ανάλυσης των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (ΠΔΠΟ) με (HPLC-DAD)

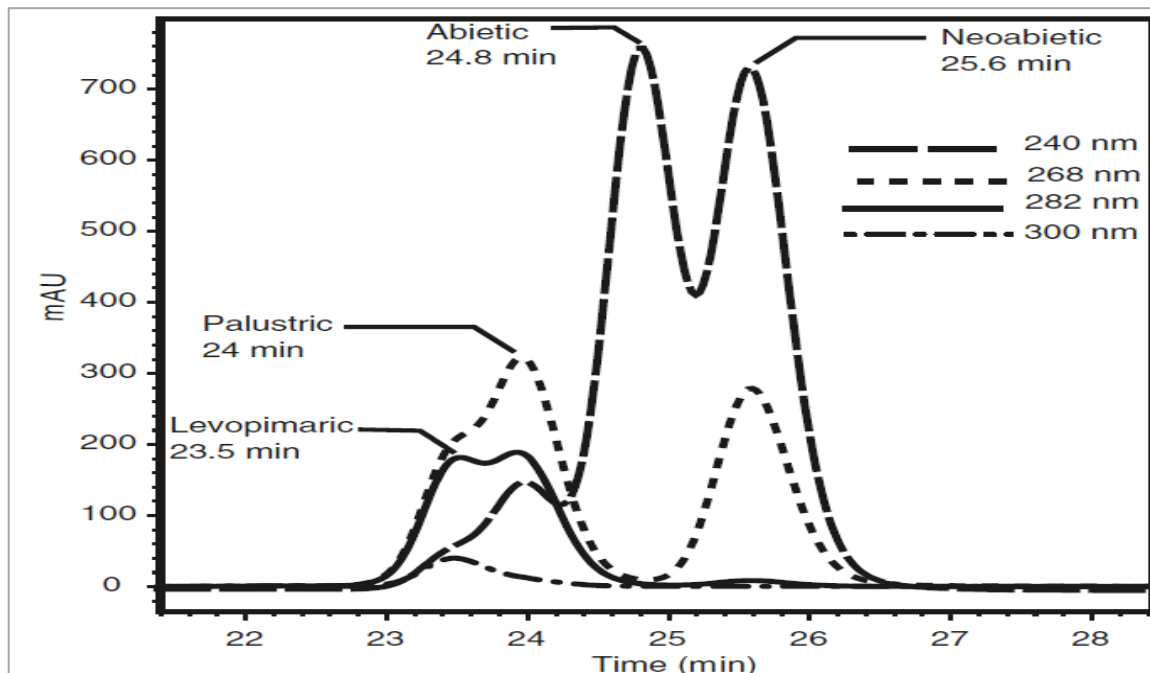
Λόγω έλλειψης προτύπων ουσιών ρητινικών οξέων και για να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε τα ρητινικά οξέα που πιθανόν να μεταφέρθηκαν στα ΠΔΠΟ από το κολοφώνιο της ρητίνης, πρίν την ανάλυση των υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης (ΠΔΠΟ), αναλύθηκε δείγμα καθαρής ρητίνης *Pinus halepensis*. Συγκεκριμένα, ποσότητα ρητίνης 500 mg θρυμματίστηκε με τη βοήθεια γουδιού και μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη όπου προστέθηκαν 4mL MeOH και ακολούθησε διάλυση με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια, διηθήθηκε με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και αραιώθηκε σε αναλογία 1:100 (v/v). Το δείγμα επεξεργάστηκε με τη χρήση πολικών φίλτρων, καταγράφηκε το φάσμα UV-Vis (Εικ. 42) και ακολούθως αναλύθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (Εικ.45-52). Η ταυτοποίηση των ρητινικών οξέων βασίστηκε στο χρόνο έκλουσης σε συνδυασμό με το UV-Vis φάσμα τους σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα και τη σχετική βιβλιογραφία.



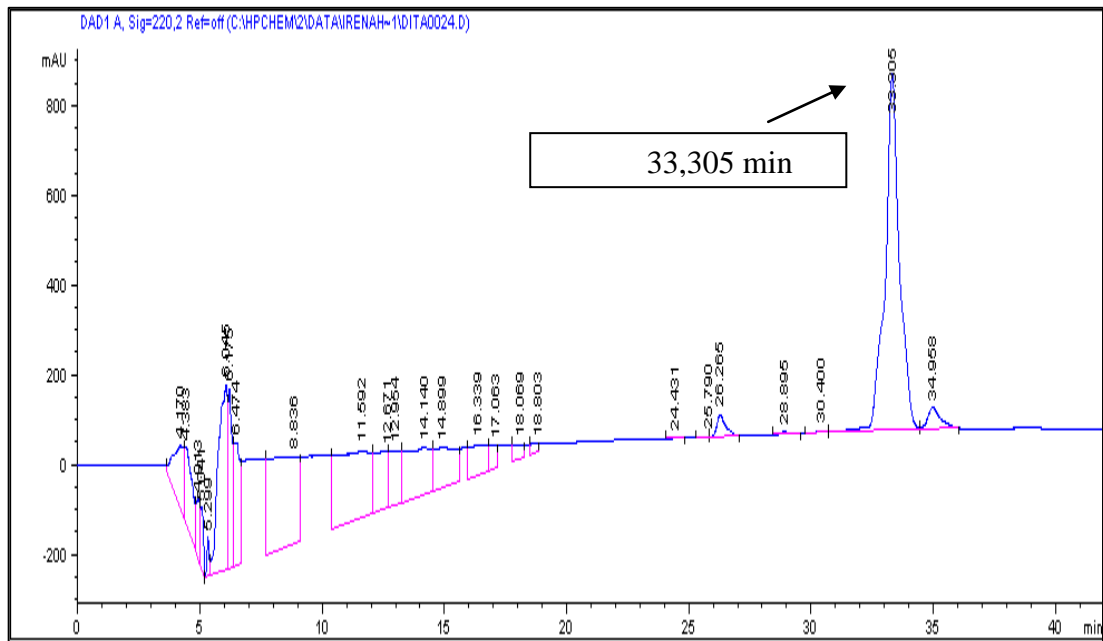
Εικόνα 42. Φάσμα UV-Vis του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης



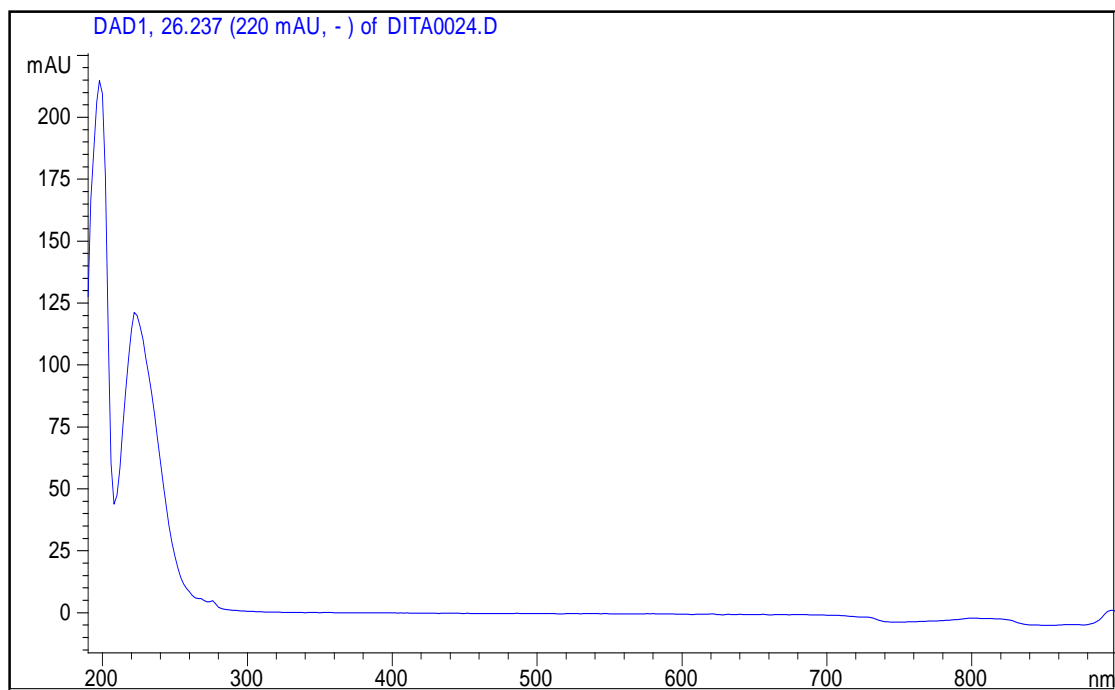
Εικόνα 43. Φάσματα UV-Vis πέντε ρητινικών οξέων (σε αιθανόλη 95%, v/v) στα οποία εντοπίζεται το λ_{max} κάθε ουσίας (Kersten et al., 2006)

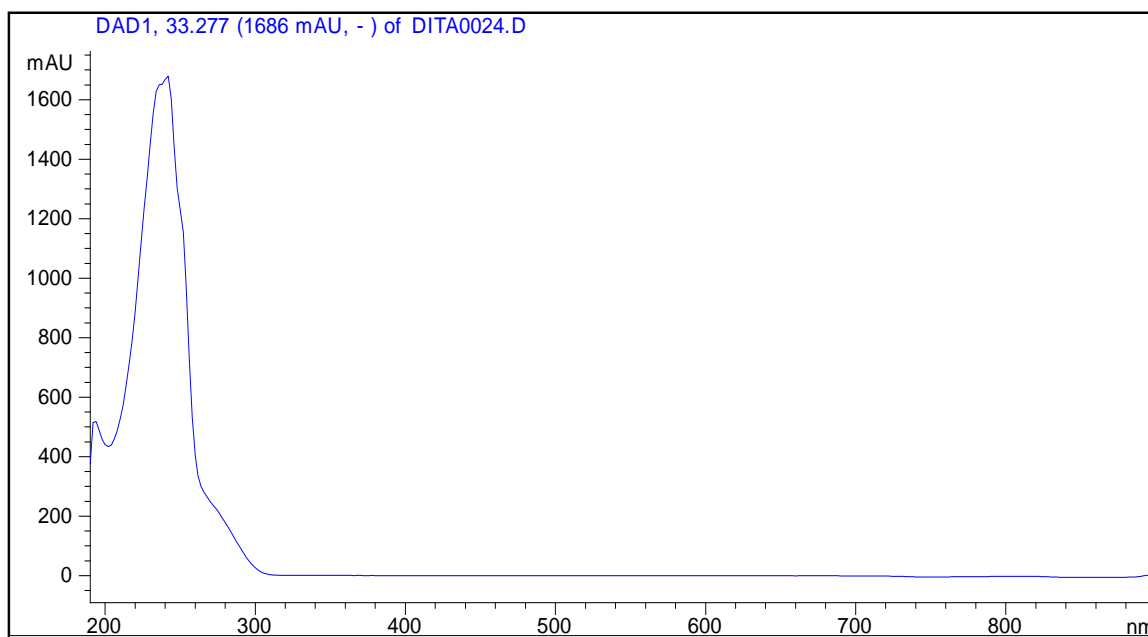
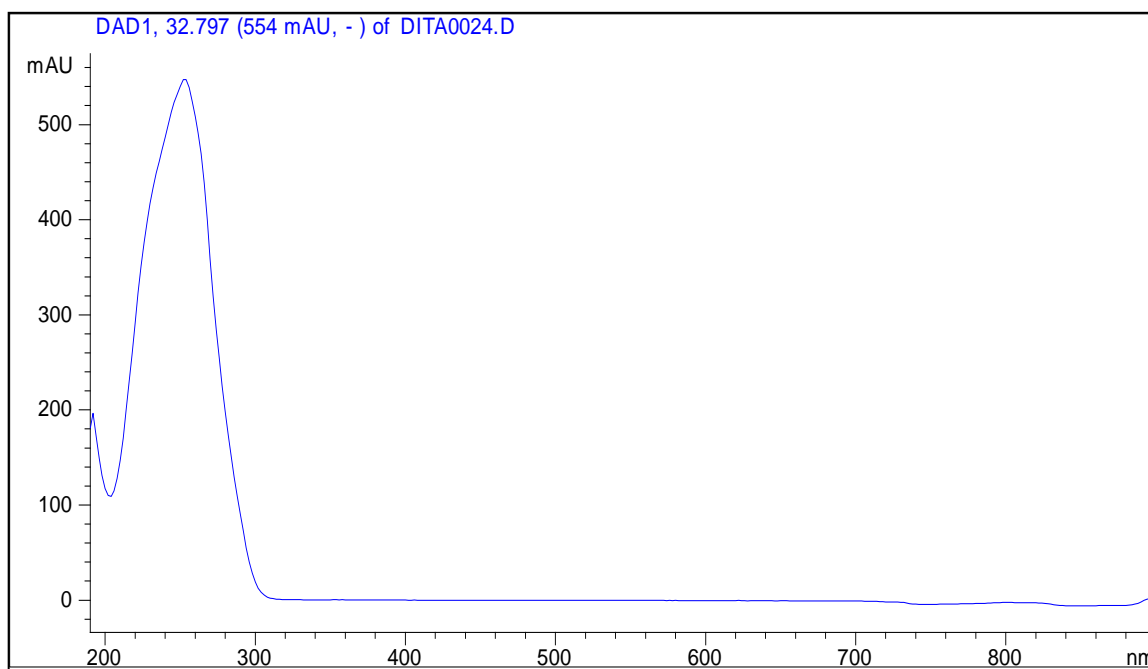


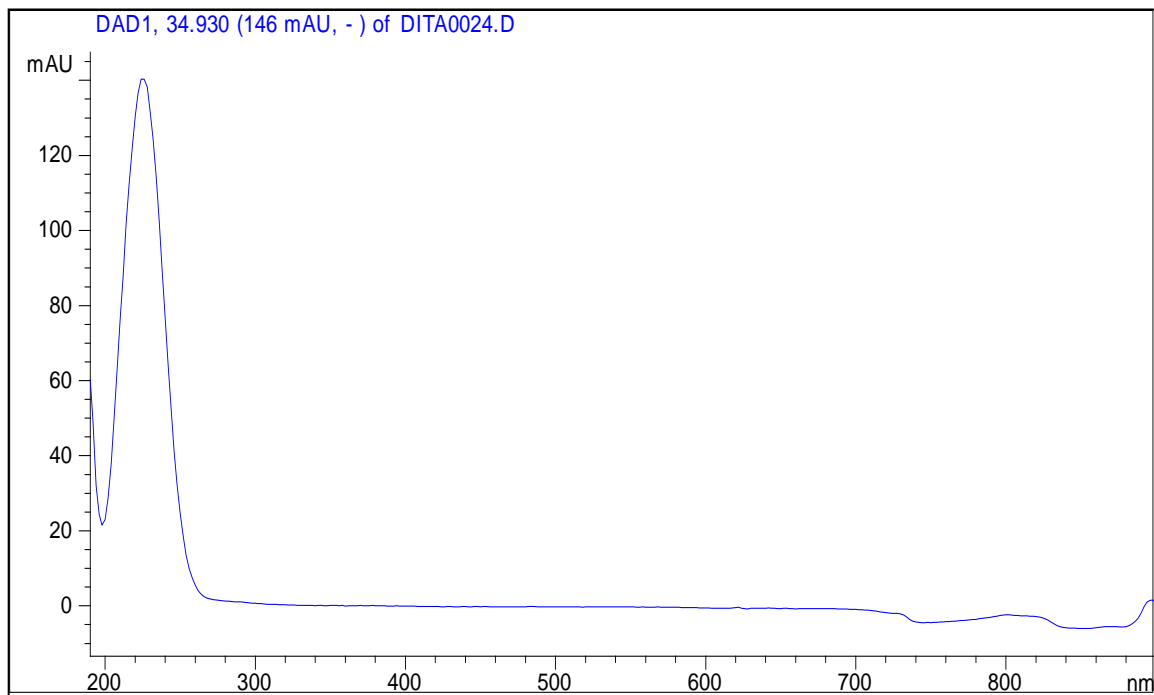
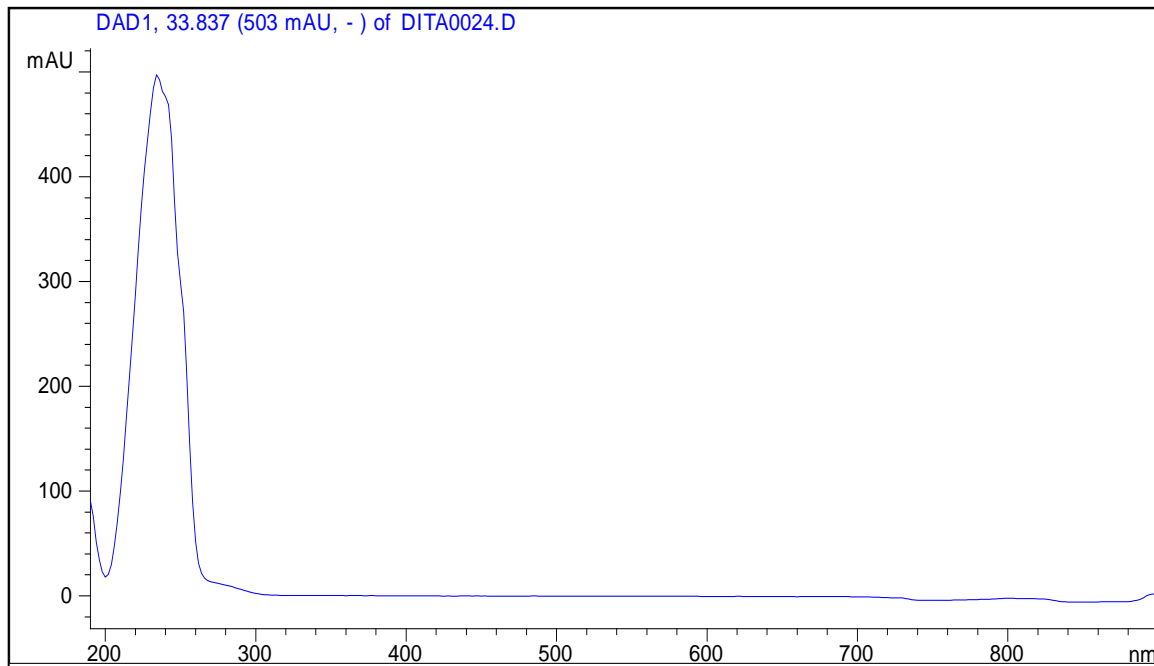
Εικόνα 44. Χρωματογράφημα HPLC πρότυπου διαλύματος ρητινικών οξέων όπου φαίνονται οι χρόνοι έκλουσής τους σε συνδυασμό με το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης τους (λ_{max}) (Kersten et al., 2006)



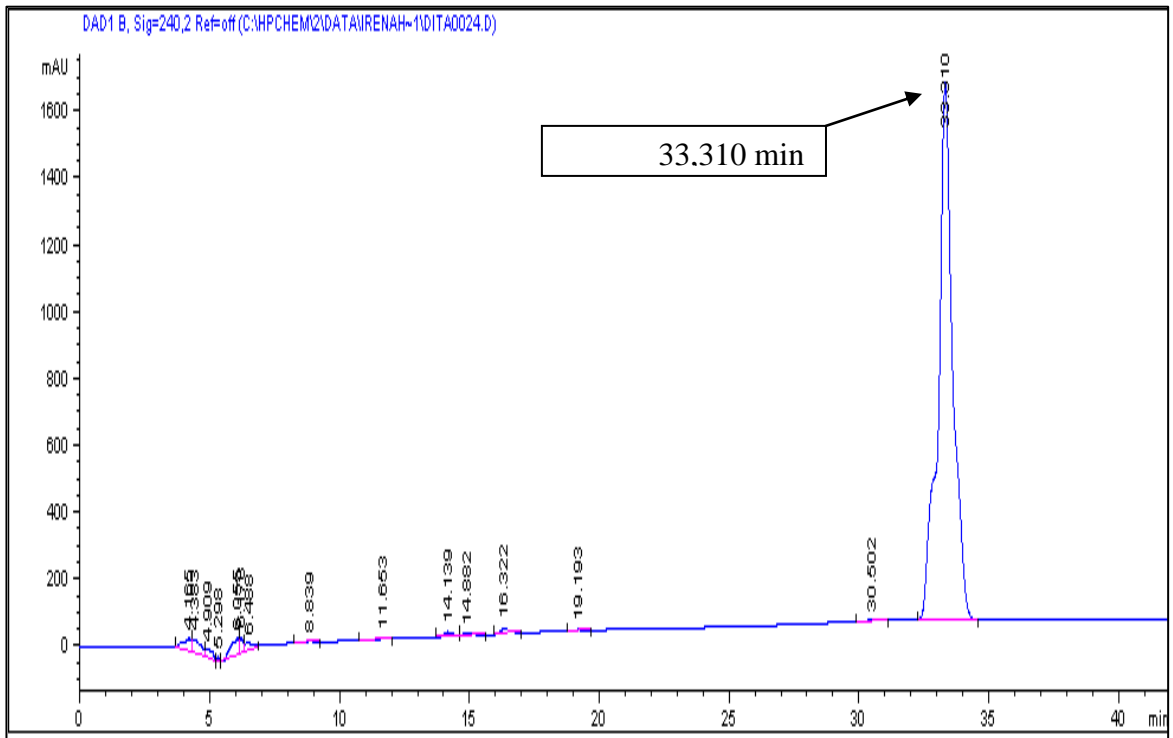
Εικόνα 45. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 220nm.



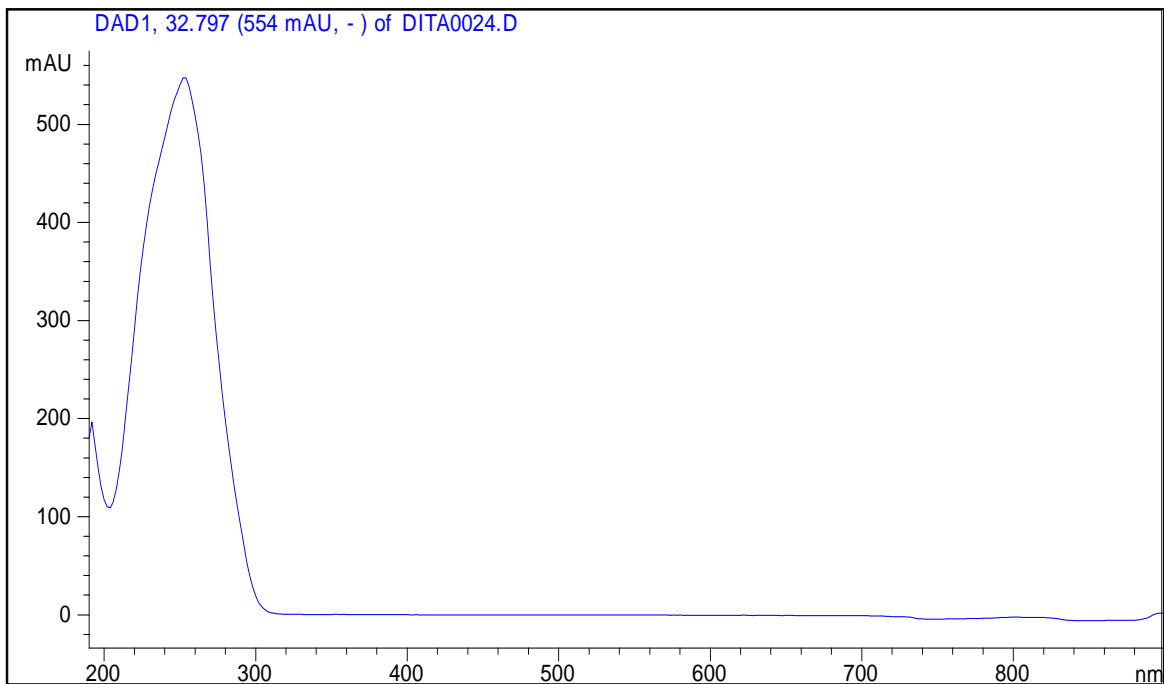


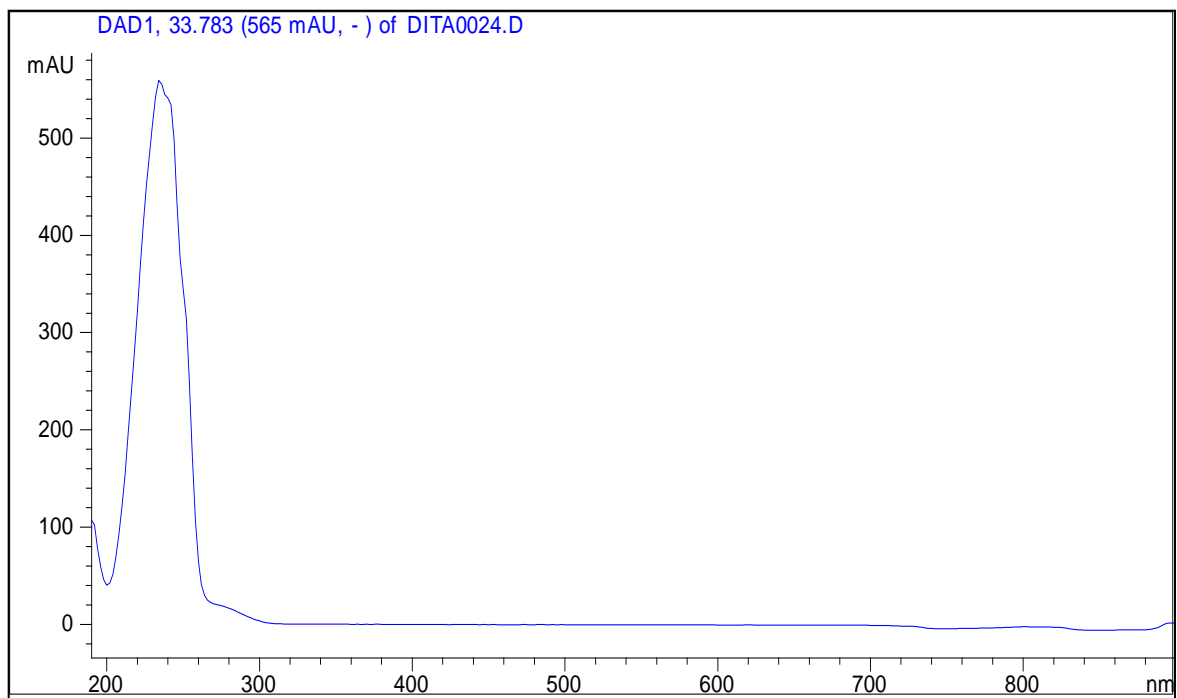
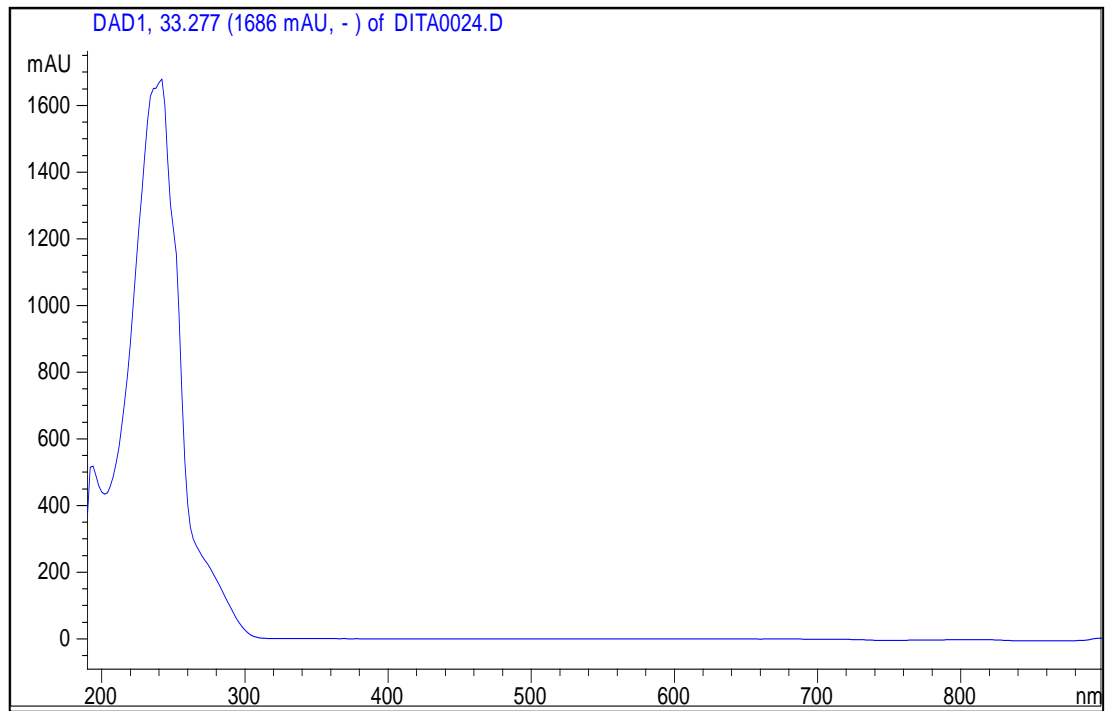


Εικόνα 46. Φάσματα UV-Vis κύριων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 220 nm

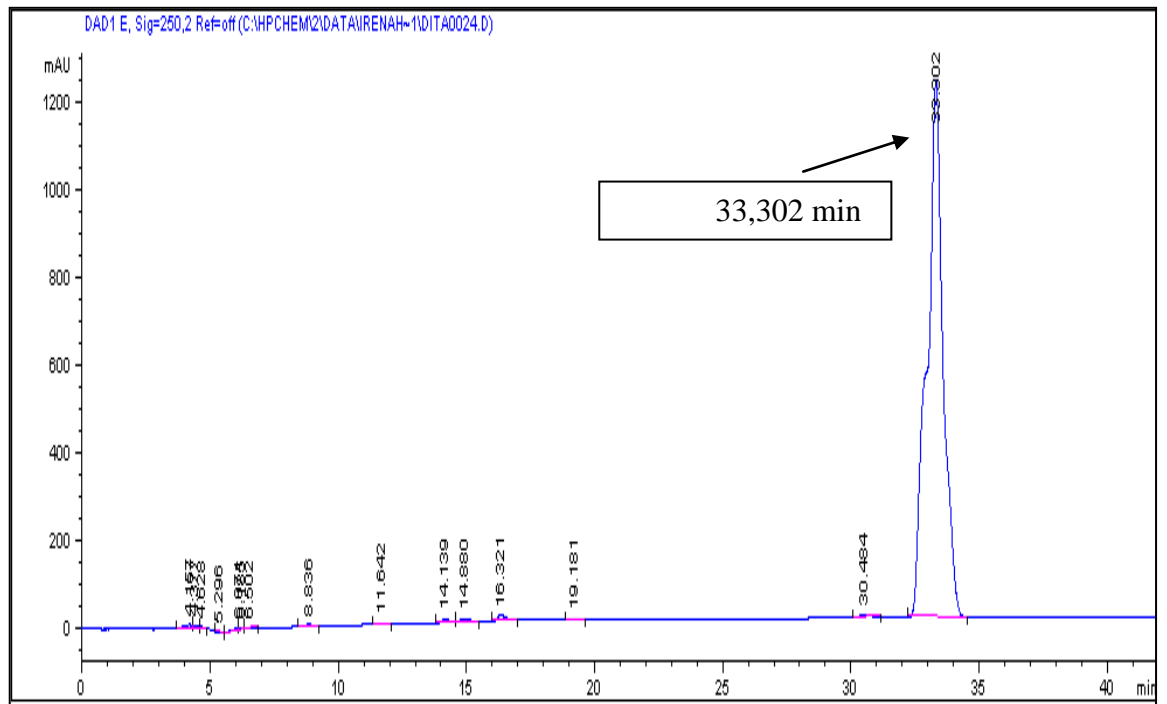


Εικόνα 47. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 240nm

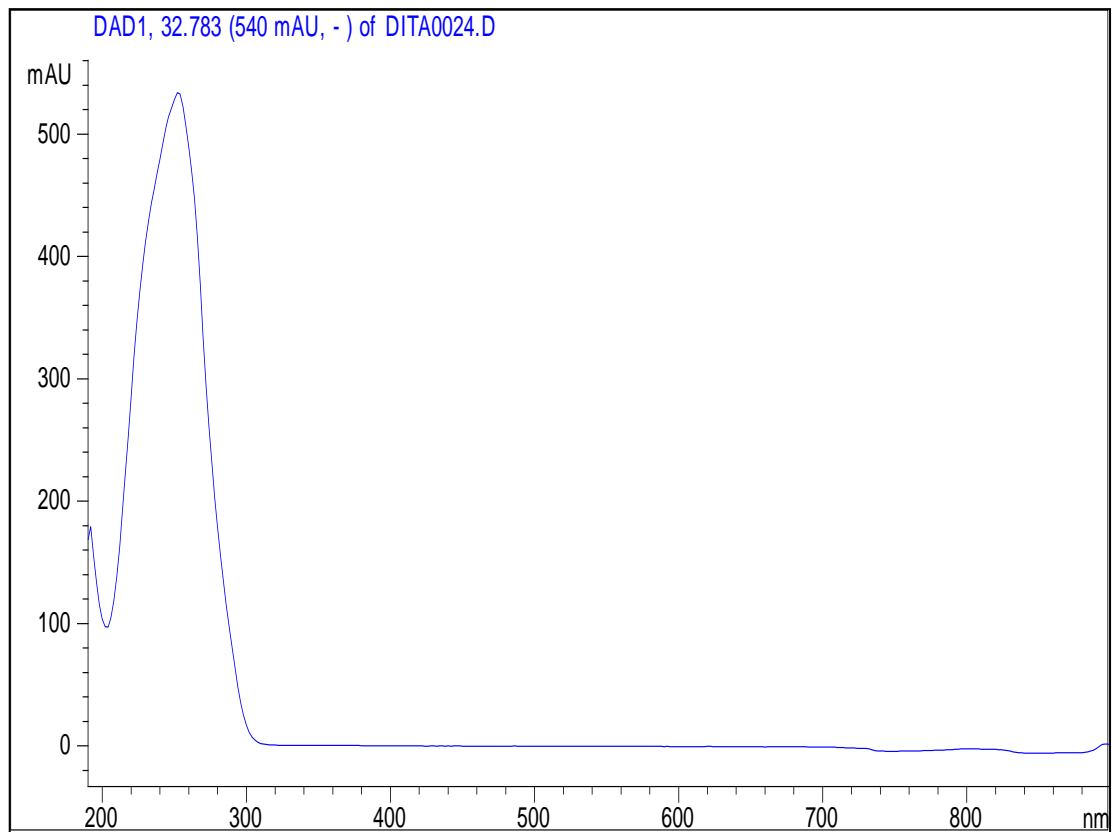


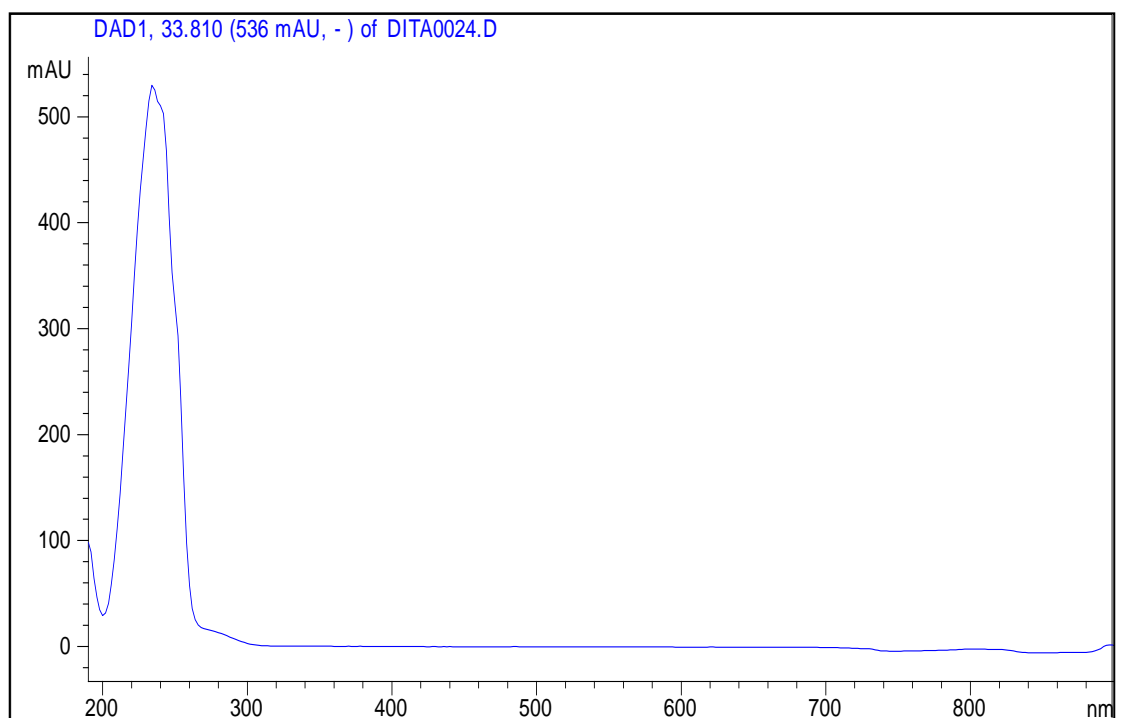
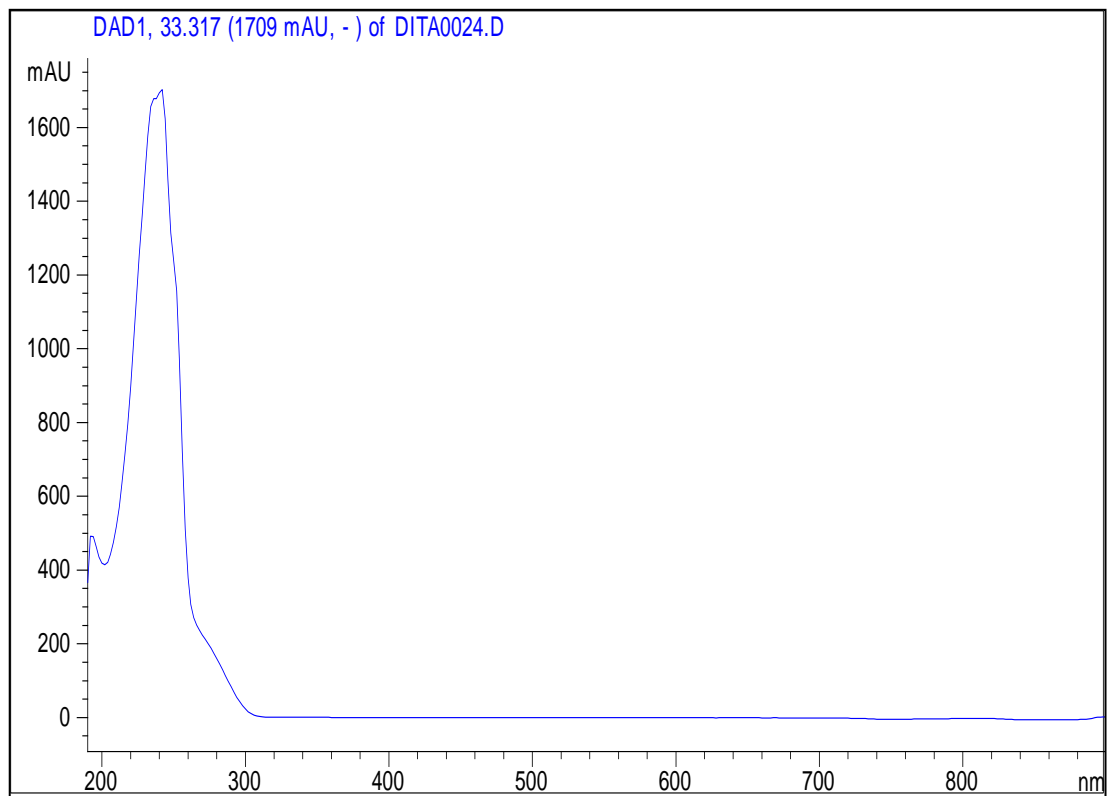


Εικόνα 48. Φάσματα UV-Vis κύριων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 240 nm

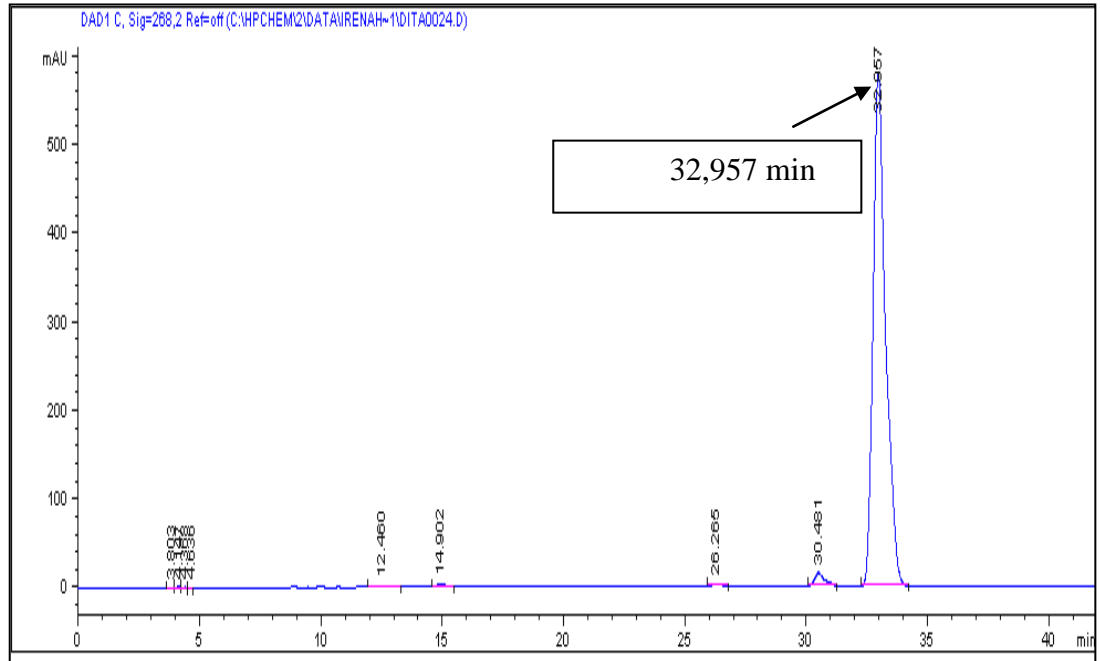


Εικόνα 49. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 250nm

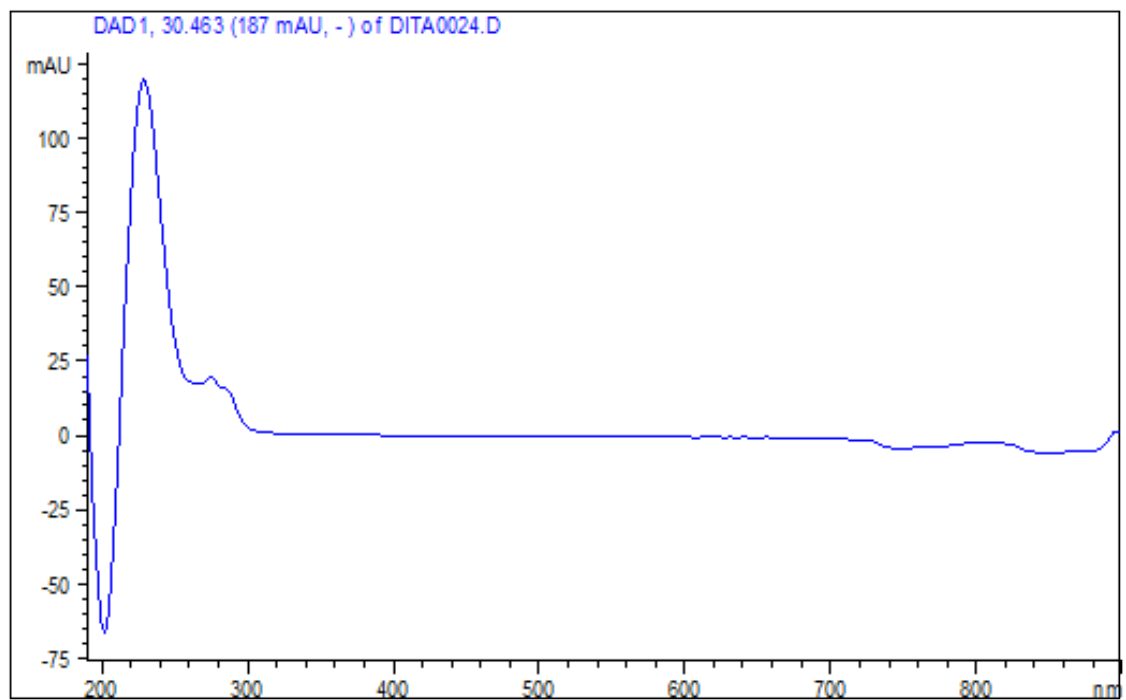
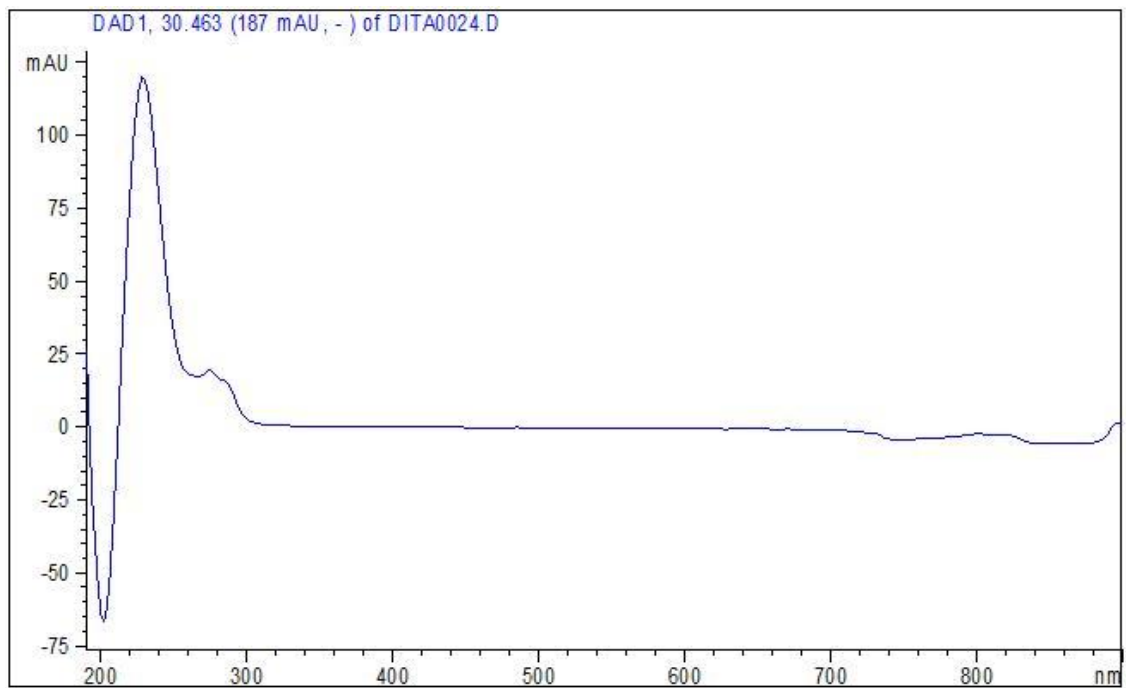


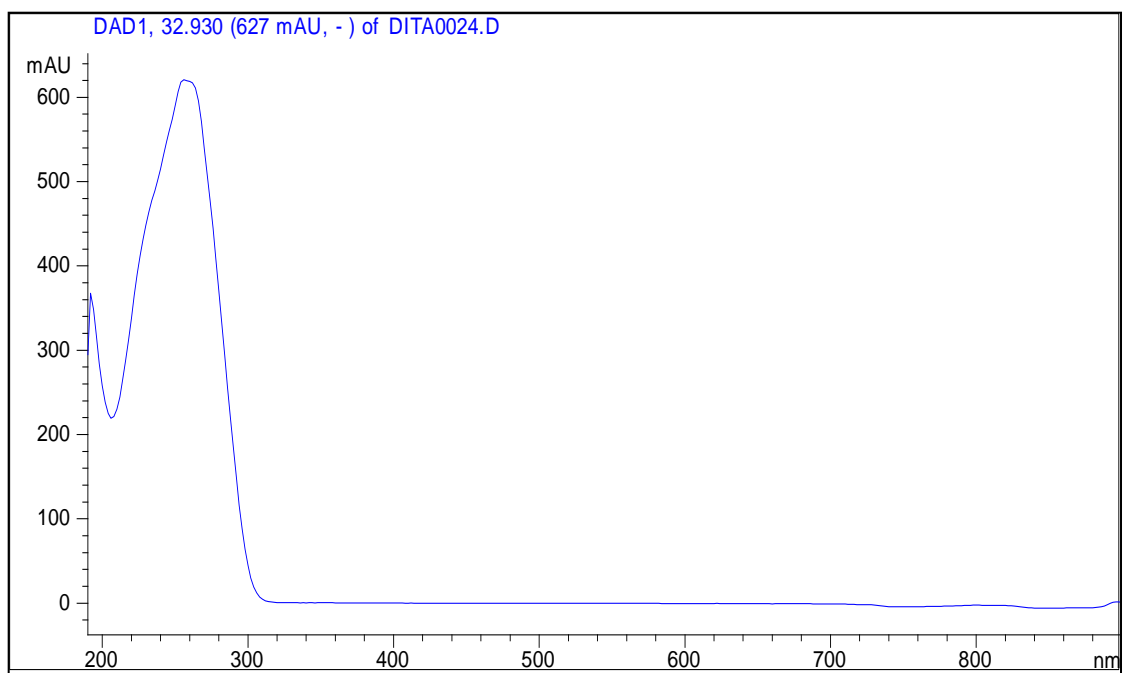
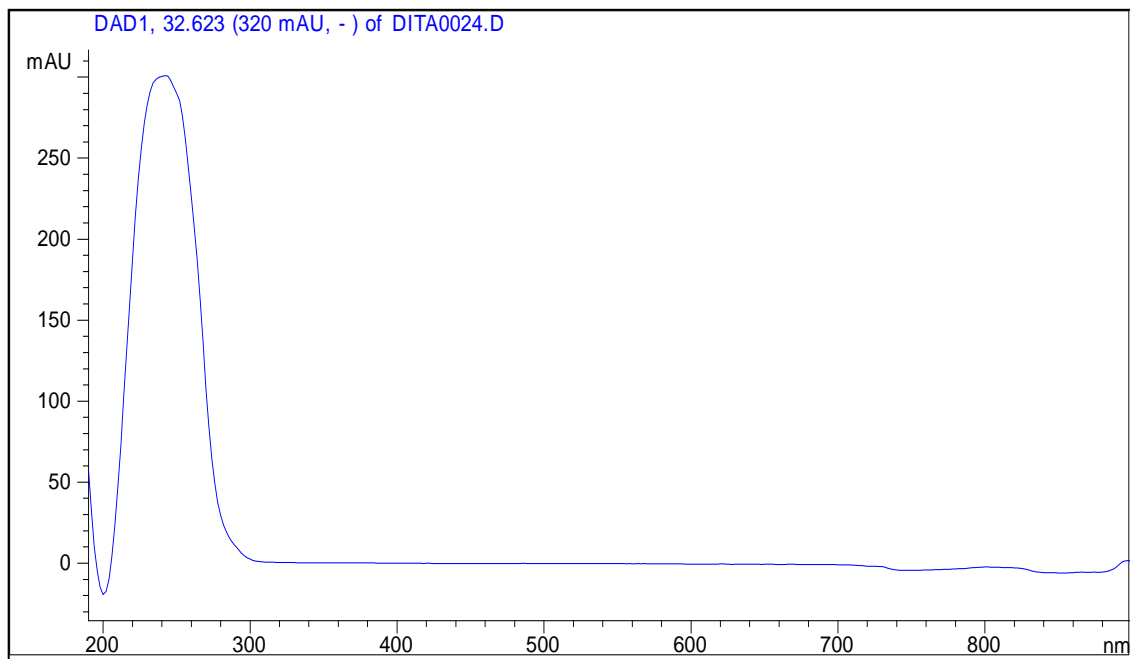


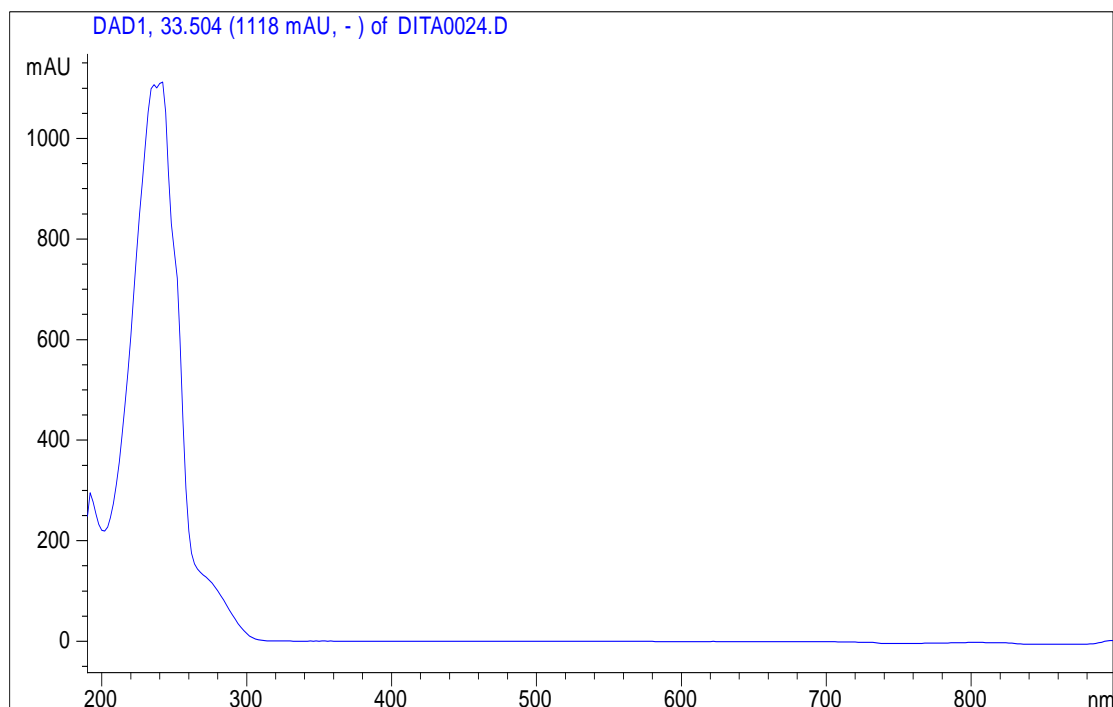
Εικόνα 50. Φάσματα UV-Vis κύριων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 250 nm



Εικόνα 51. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 268 nm



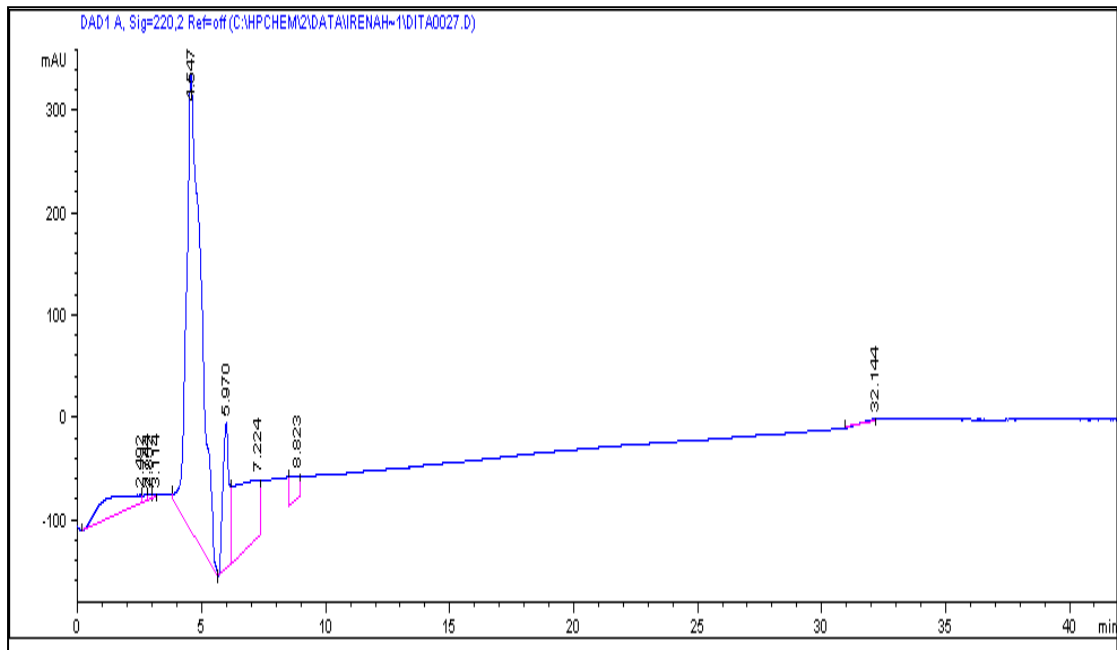




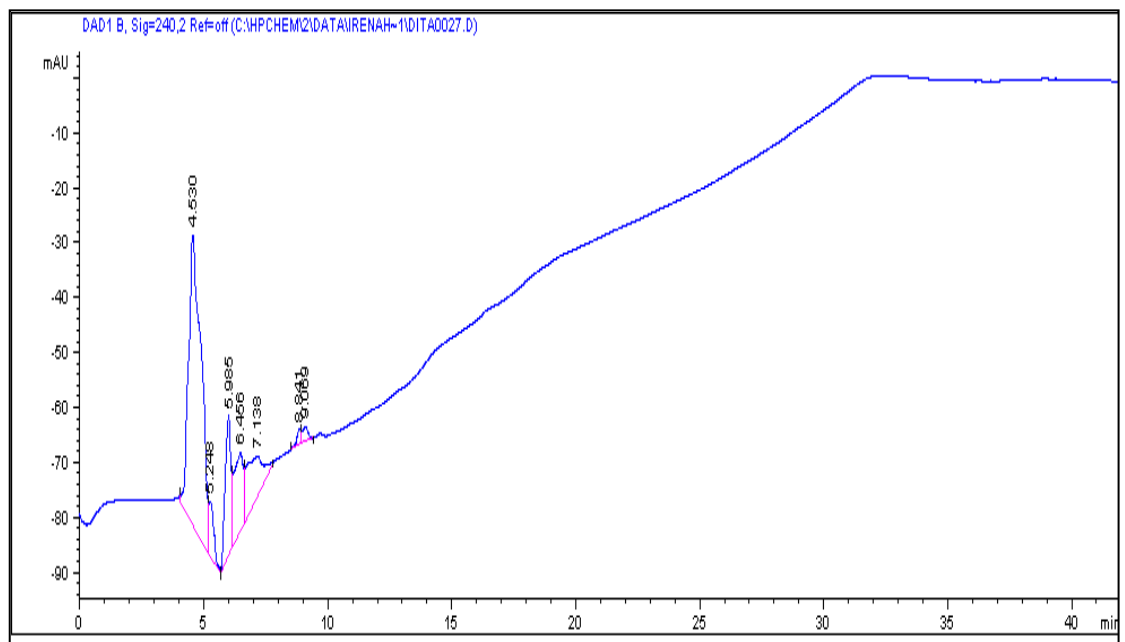
Εικόνα 52. Φάσματα UV-Vis κύριων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 268 nm

Σύμφωνα με τα παραπάνω χρωματογραφήματα του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης καθώς και τα φάσματα UV-Vis των κύριων συστατικών που ανιχνεύθηκαν στα διαφορετικά μήκη κύματος της χρωματογραφικής ανάλυσης, εντοπίζεται μια κορυφή υψηλής αφθονίας στα 33,3 min περίπου, η οποία αποτελείται από μίγμα ουσιών που αποδίδονται στα περιεχόμενα ρητινικά οξέα του εκχυλίσματος, μετά από σύγκριση των πειραματικών δεδομένων της ανάλυσης και αντίστοιχων της βιβλιογραφίας.

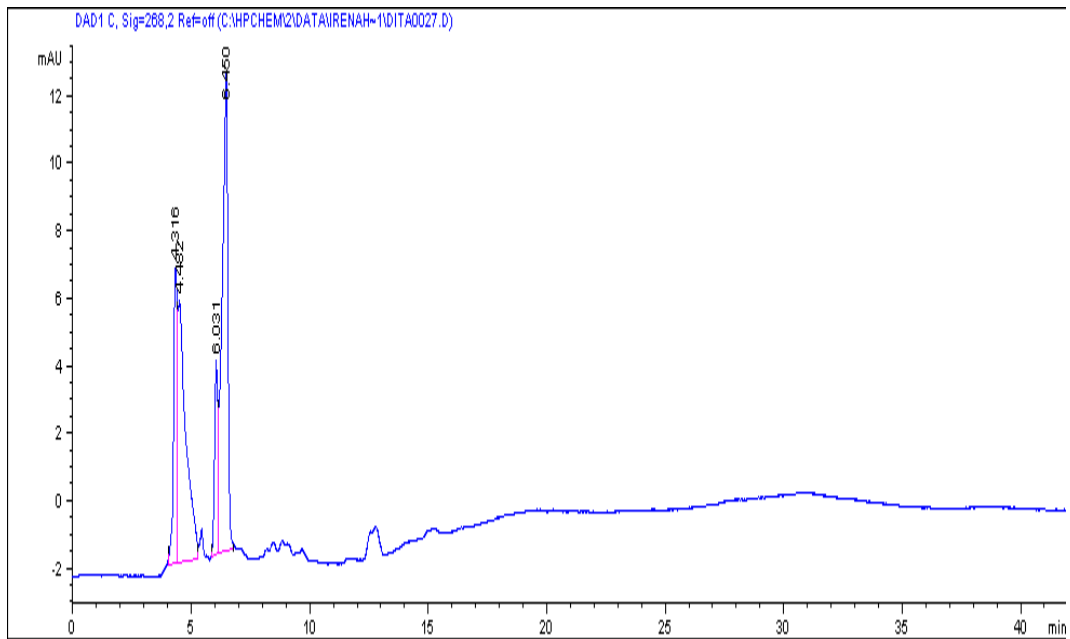
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την HPLC ανάλυση του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος δείγματος ρητίνης (ΠΔΠΟ) από την Κεντρική Εύβοια.



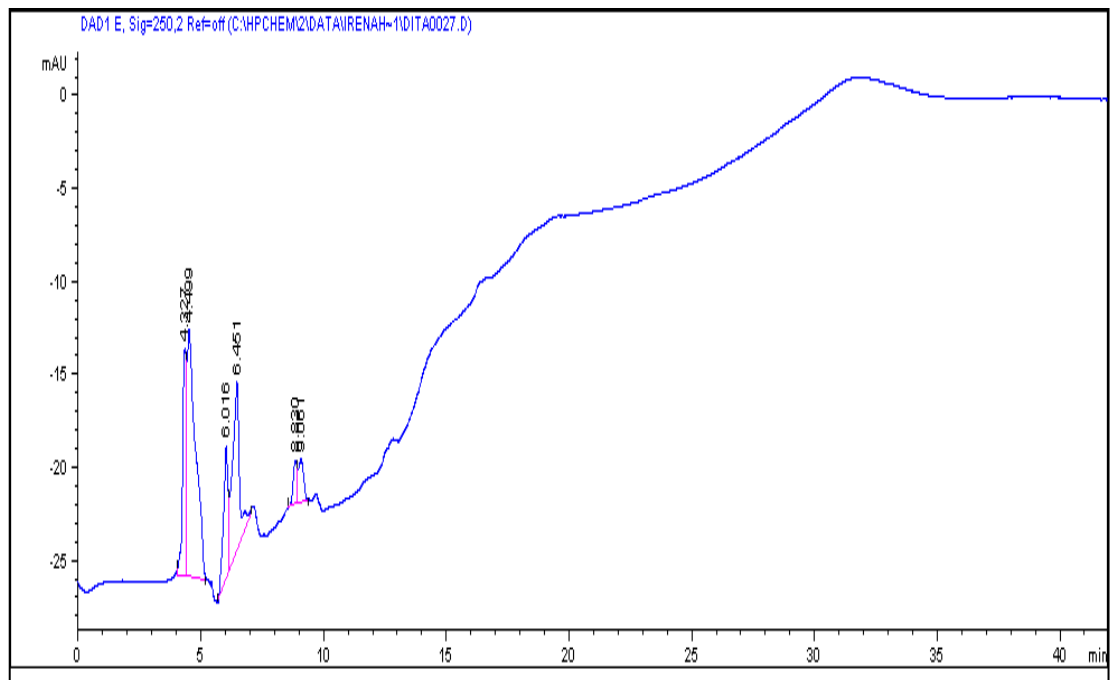
Εικόνα 53. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm (Κεντρική Εύβοια)



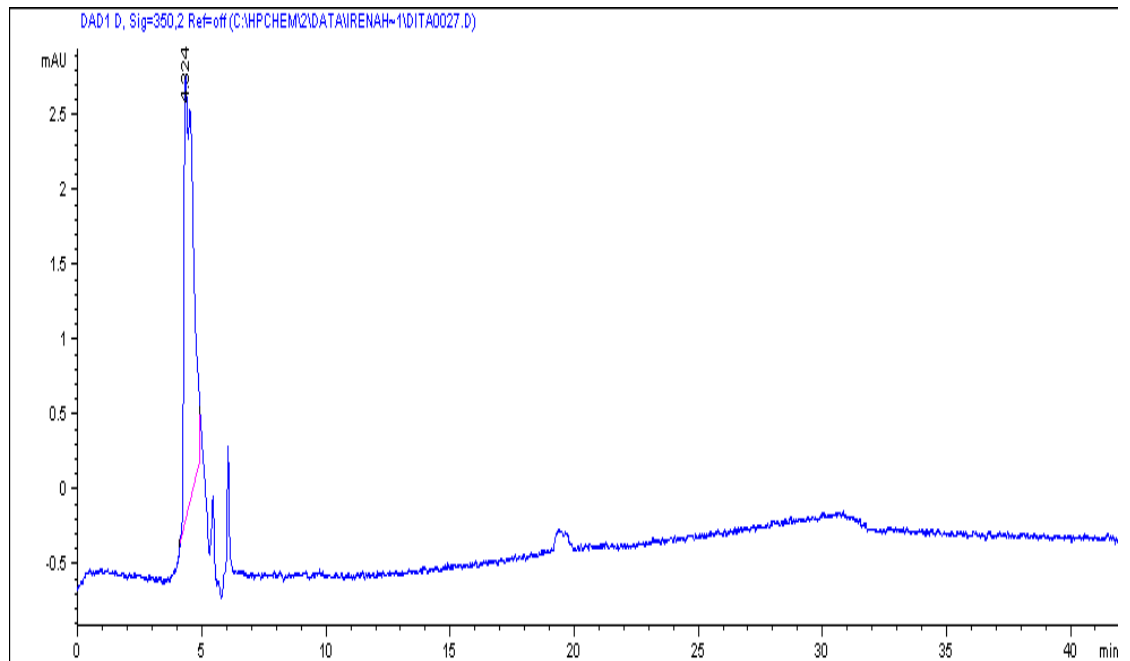
Εικόνα 54. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 240nm (Κεντρική Εύβοια)



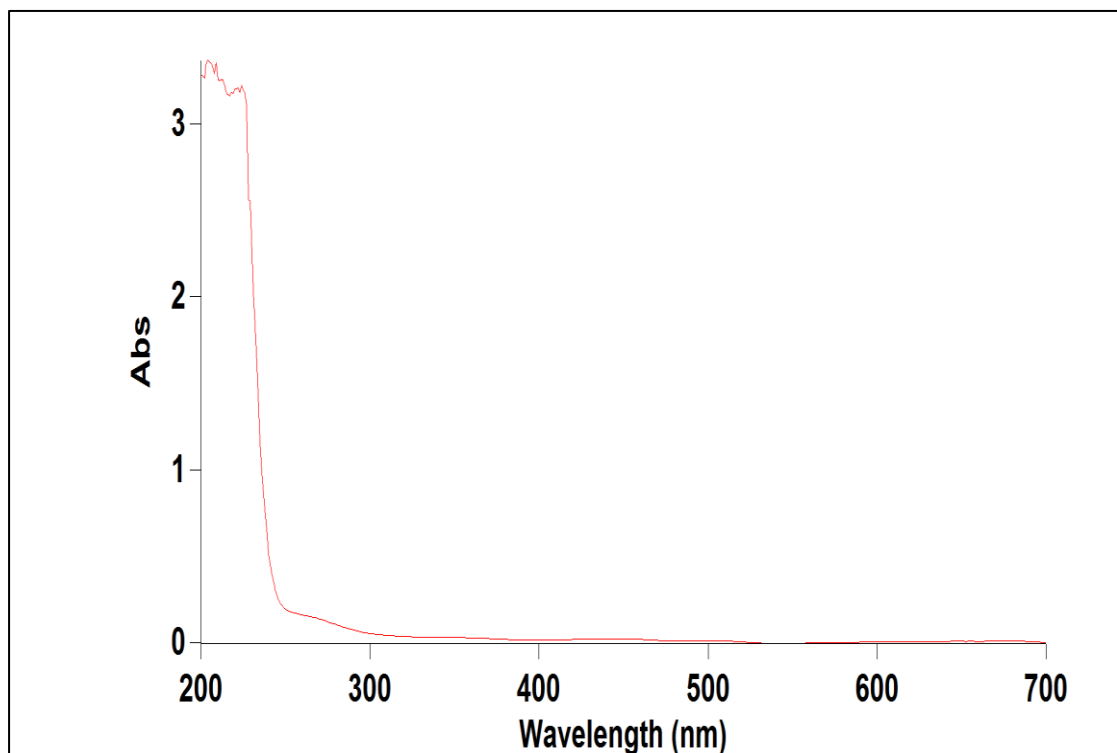
Εικόνα 55. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 268nm (Κεντρική Εύβοια)



Εικόνα 56. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 250nm (Κεντρική Εύβοια)



Εικόνα 57. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 350nm (Κεντρική Εύβοια)



Εικόνα 58. Φάσμα UV-vis υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ(Κεντρικής Εύβοιας)

Τα αποτελέσματα του παραπάνω χρωματογραφήματος του υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ΠΔΠΟ (Εικ. 53-57) από δείγμα ρητίνης της περιοχής Κεντρικής Εύβοιας καθώς και τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων των υπολοίπων υδροαλκοολικών εκχυλισμάτων ρητίνης ΠΔΠΟ, τα οποία παρατίθενται στο παράρτημα, συγκρίθηκαν με αυτά του χρωματογραφήματος του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης (Εικ.45-52). Διαπιστώνεται τελικά ότι στα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ΠΔΠΟ δεν ανιχνεύθηκαν ρητινικά οξέα καθώς δεν ανιχνεύθηκε κάποια χρωματογραφική κορυφή στην αναμενόμενη χρονική περιοχή, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής HPLC ανάλυσης του μεθανολικού εκχυλίσματος της ρητίνης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, αλλά και τα αντίστοιχα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Πιθανόν τα ρητινικά οξέα να μη μεταφέρθηκαν στα ΠΔΠΟ, για να μπορέσουμε όμως να επιβεβαιώσουμε αυτό το συμπέρασμα θα πρέπει να πραγματοποιηθούν συμπληρωματικά πειράματα υγρής χρωματογραφίας, HPLC-DAD και LC-MS, έχοντας στη διάθεσή μας πρότυπα ρητινικά οξέα, ώστε να επιτευχθεί ασφαλής απόδοση κορυφών στα χρωματογραφήματα, λαμβάνοντας υπόψη τους χρόνους έκλουσης των προτύπων, τα φάσματα UV-Vis και μαζών τους.

4.6 Συμπεράσματα

Από τη μελέτη προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα: α) η μέθοδος της υδροαπόσταξης με συσκευή Clevenger είναι αποτελεσματική στην παραλαβή-απομόνωση της κύριας χημικής ομάδας τερπενικών ουσιών που χαρακτηρίζει το αιθέριο έλαιο ρητίνης. Το αιθέριο έλαιο ρητίνης του είδους *Pinus halepensis* χαρακτηρίζεται από υψηλές αποδόσεις (9,89-17,75%v/w), ενώ τα αποτελέσματα ως προς την περικτικότητα του σε ολικά φαινολικά συστατικά με τη μέθοδο Folín-Ciocalteu, έδειξαν ότι δεν εμφανίζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της χημικής του σύστασης με GC-MS καθώς δεν ανιχνεύτηκαν φαινολικές ενώσεις. Όσον αφορά την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των αιθερίων ελαίων των περιοχών που εξετάστηκαν παρουσιάζονται μικρές ποιοτικές αλλά σημαντικές ποσοτικές διαφορές. Τα κύρια συστατικά που ταυτοποιήθηκαν είναι 34 τα οποία εμφάνισαν κατά μέσο όρο συγκέντρωση (964840 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Από αυτά, τα 24 είναι μονοτερπένια και τα 10 είναι σεσκιτερπένια.

Τα κυριότερα συστατικά του αιθερίου ελαίου ρητίνης της χαλέπιας πεύκης είναι η το α -πινένιο με συγκέντρωση που κυμάνθηκε από (773507-890673 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και ακολουθούν με μικρότερες συγκεντρώσεις το καμφένιο(17027-32308 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), το β -πινένιο(9837-16019 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), το λεμονένιο(13089-46703 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), το δ -3-καρένιο (1098-26327 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου), το β -καρυοφυλλένιο (4712-36152 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου) και το α -μουουρολένιο (3409-8869 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθερίου ελαίου). Τα αιθέρια έλαια των περιοχών Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων (μη επεξεργασμένο δείγμα ρητίνης) και Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις α -πινενίου,

ενώ το d-λιμονένιο το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου ρητίνης εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση στις περιοχές Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων (επεξεργασμένο δείγμα) και Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική. Ακόμη, το βασικότερο συστατικό όλων των αιθερίων ελαίων, το α-πινένιο επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα των φασμάτων FT-IR και Raman β) η προσθήκη ρητίνης στα πρότυπα διαλύματα προσομοίωσης οίνου και η παραμονή σε αυτά υπο συνεχή ανάδευση για μία ώρα, αφού εκχυλίστηκαν με οργανικό διαλύτη και συγκεκριμένα το εξάνιο για την παραλαβή των πτητικών συστατικών της ρητίνης, τα αποτελέσματα GC-MS αποκάλυψαν τη μεταφορά σε αυτά 54 ενώσεων. Οι οποίες αποτελούνταν κυρίως από μονοτερπενια και σεσκιτερπένια. Αρκετά σημαντικές ποσότητες εμφάνισαν και άλλες κατηγορίες ενώσεων οι οποίες περιλαμβάνουν μικρού μοριακού βάρους αλειφατικές ενώσεις καθώς και παράγωγα ναφθαλενίου και βενζολίου. Τα μονοτερπένια εμφανίζονται ως κυρίαρχα συστατικά, με τα κυριότερα να είναι η α-τερπινεόλη, το d-λιμονένιο, α-πινένιο και το γ-τερπινένιο με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από (10,60-200,94/100mL ΠΔΠΟ), (3,11-59,92/100mL ΠΔΠΟ), (16,35-62,89/100mL ΠΔΠΟ), (4,23-43,59/100mL ΠΔΠΟ). Τέλος, τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα ρητίνης ΠΔΠΟ τα οποία μετά την απομάκρυνση του πτητικού κλασματος εξετάστηκαν για την παρουσία ρητινικών οξέων, τα αποτελέσματα της ανάλυσης τους με HPLC-DAD τα οποία συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα HPLC-DAD του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης δεν έδειξαν την παρουσία αυτών των ενώσεων, για επιβεβαίωση όμως αυτών των αποτελεσμάτων θα πρέπει να πραγματοποιηθούν συμπληρωματικά πειράματα υγρής χρωματογραφίας, HPLC-DAD και LC-MS, έχοντας στη διάθεσή μας πρότυπα ρητινικά οξέα, ώστε να επιτευχθεί ασφαλής απόδοση κορυφών στα χρωματογραφήματα, λαμβάνοντας υπόψη τους χρόνους έκλυσης των προτύπων, τα φάσματα UV-Vis και μαζών

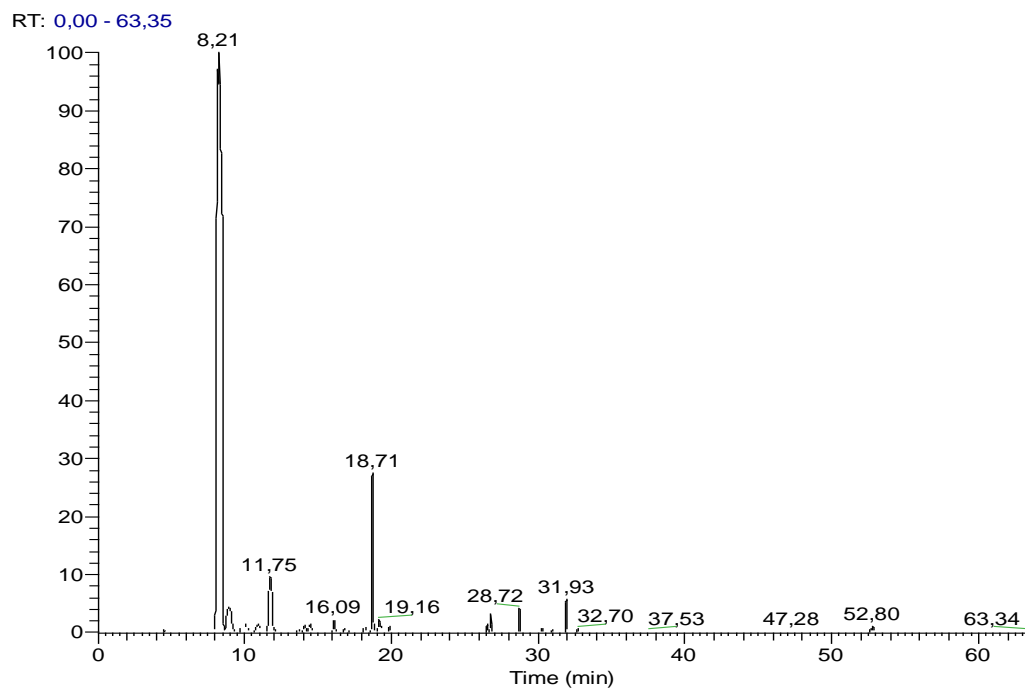
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. Κατάλογος Συντμήσεων

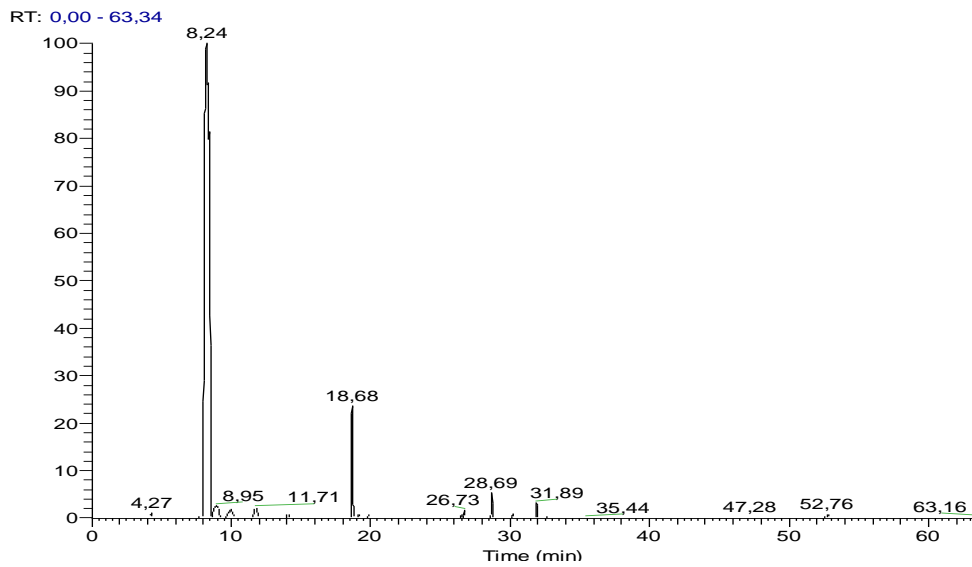
ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΑΓΓΛΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής φωτοδιοδίων
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
HD	Hydro-Distillation	Υδρο-απόσταξη
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
RP	Reversed Phase	Ανεστραμμένης Φάσης
RI	Retention Index	Δείκτης Συγκράτησης
Infra -Red, IR	Infra-Red Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου
FT	Fourier Transormation	Μετασχηματισμός Fourier
UV-Vis	Ultra Violet-Visible	Υπεριώδους-Ορατού (Φασματοφωτομετρία)
ΠΔΠΟ	Model Wine	Πρότυπο διάλυμα προσομοίωσης οίνου

II. Αέρια Χρωματογραφήματα

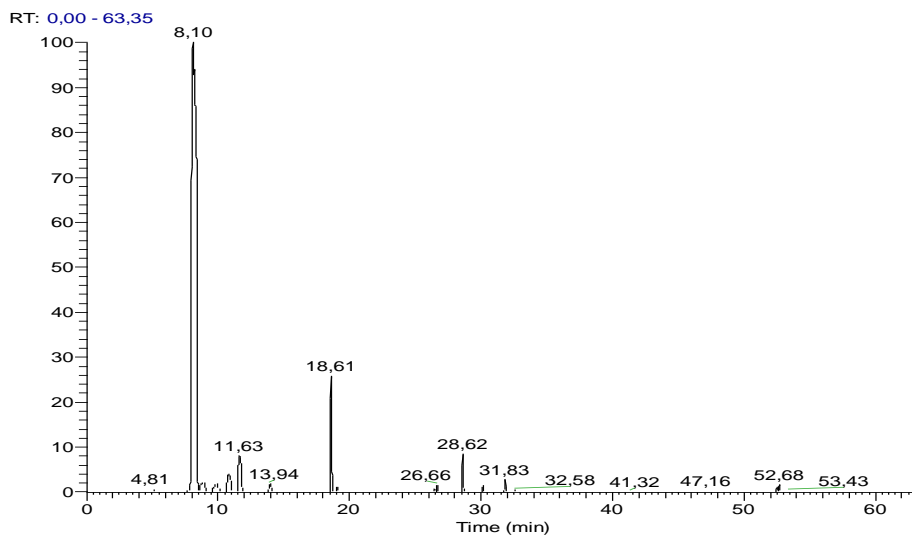
a) Αέρια χρωματογραφήματα αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis*



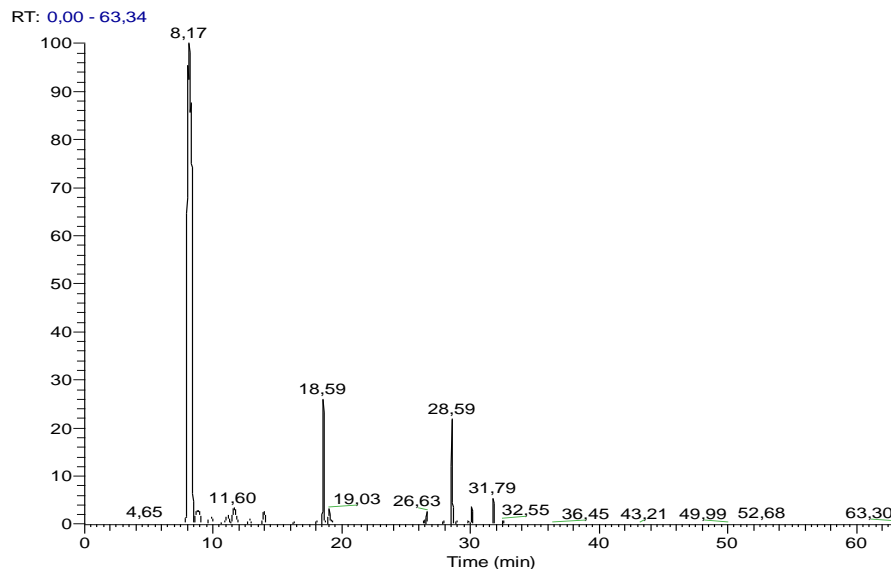
Εικόνα 59: Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη SO_2 που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης .



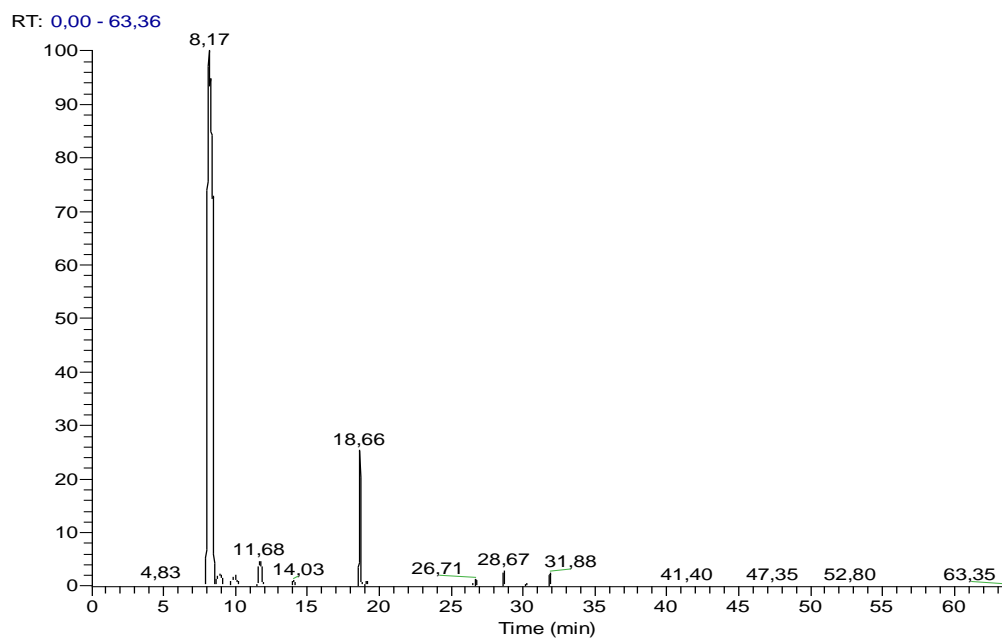
Εικόνα 60. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη SO_2 που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης



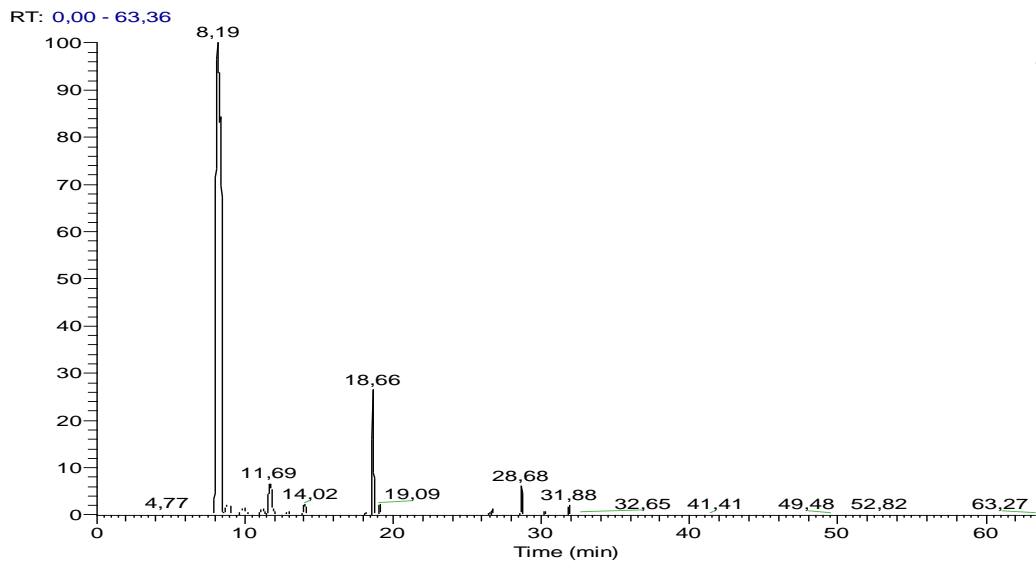
Εικόνα 61. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Χαλκιδικής Εταιρείας Quality Resins που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.



Εικόνα 62: Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Βόρειας Εύβοιας που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.

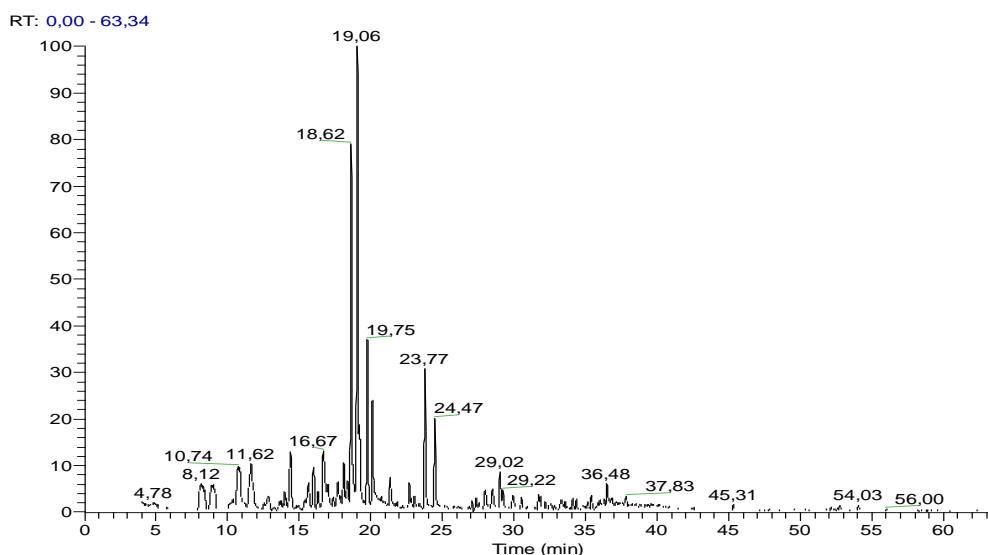


Εικόνα 63. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Κεντρικής Εύβοιας που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.

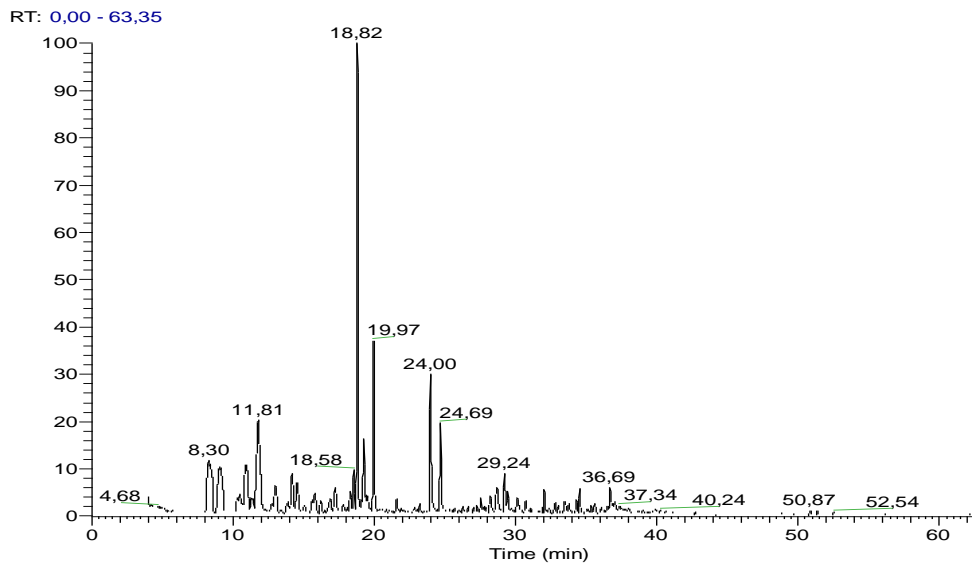


Εικόνα 64. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* περιοχής Χαλκιδικής που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.

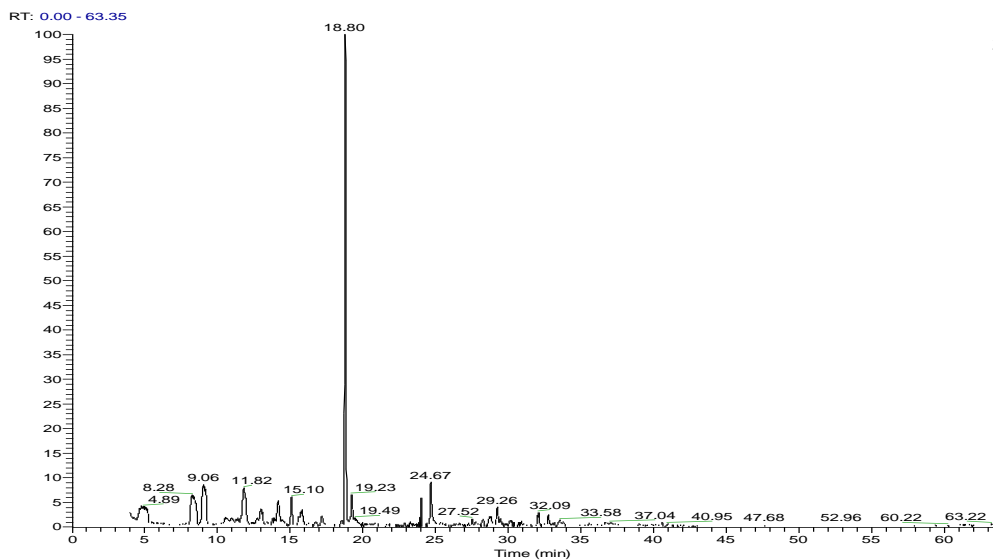
b) Αέρια χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων εξανίου



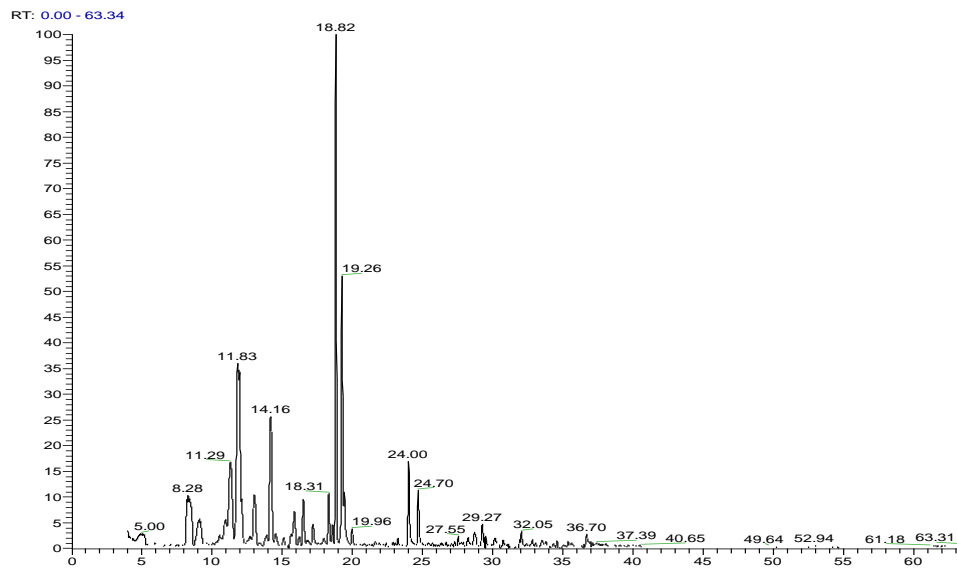
Εικόνα 65. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου του ΠΔΠΟ (Δείγμα Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη SO_2).



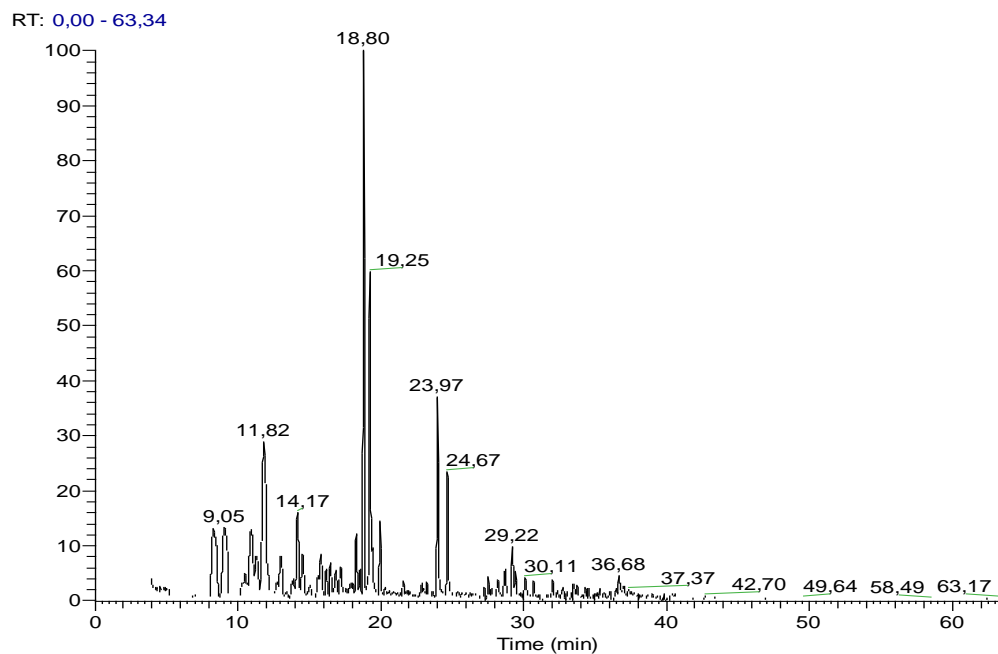
Εικόνα 66. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου του ΠΔΠΟ (Δείγμα Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη SO_2)



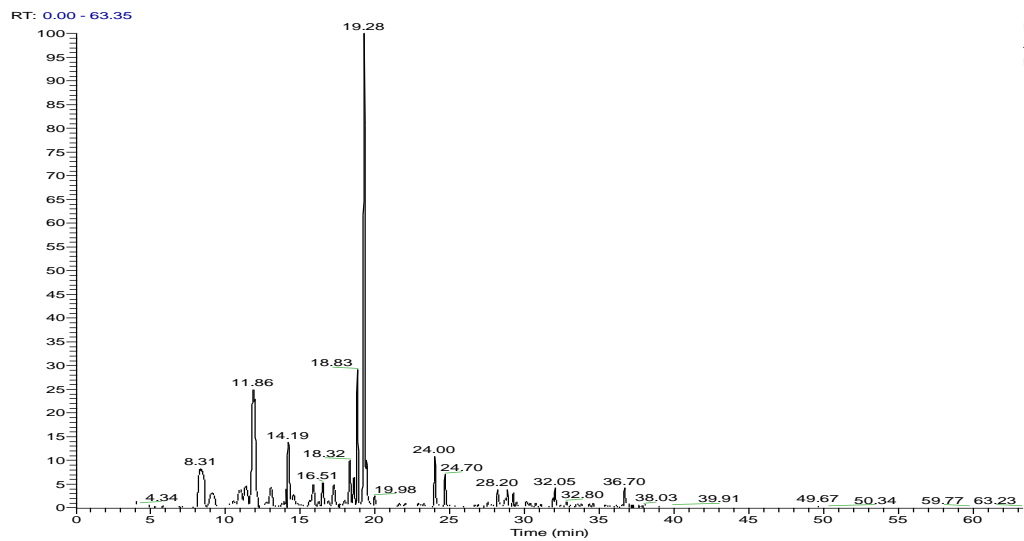
Εικόνα 67. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου του ΠΔΠΟ (Δείγμα Εταιρείας Quality Resins).



Εικόνα 68. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Βόρειας Εύβοιας)

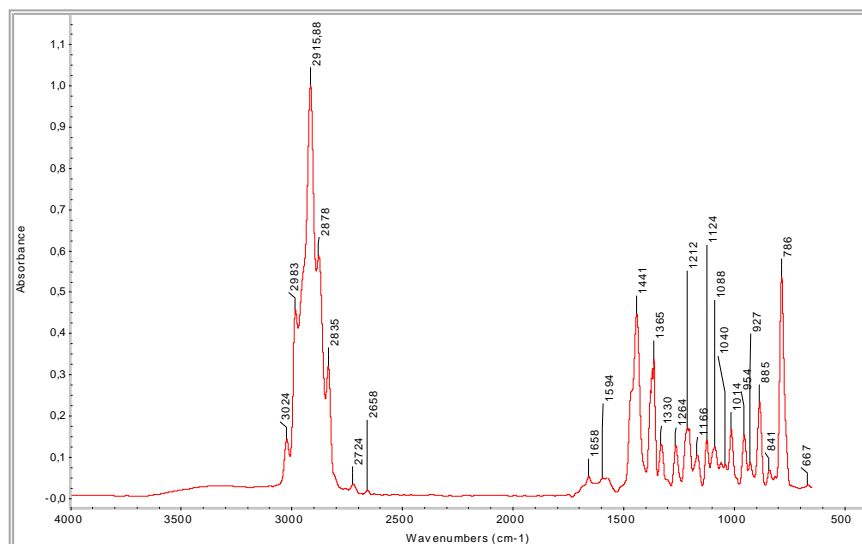


Εικόνα 69. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Κεντρικής Εύβοιας)

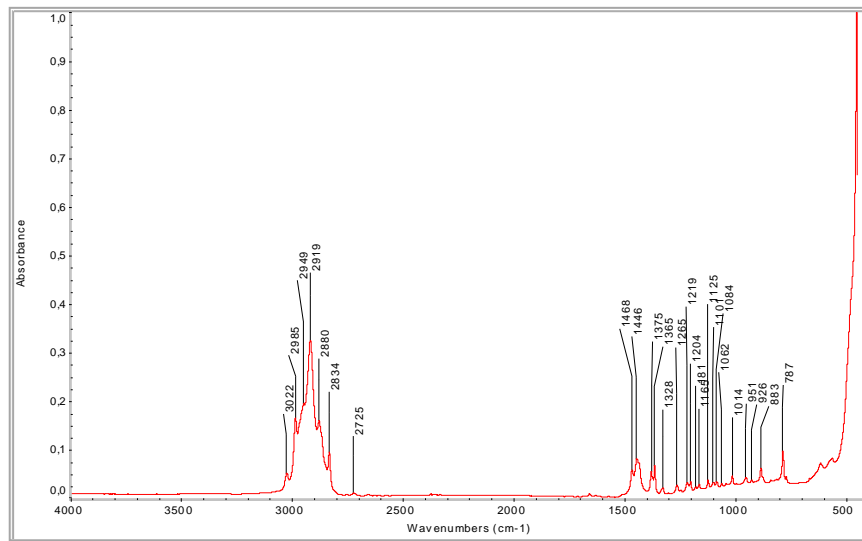


Εικόνα 70. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου του ΠΔΠΟ (Δείγμα Χαλκιδικής)

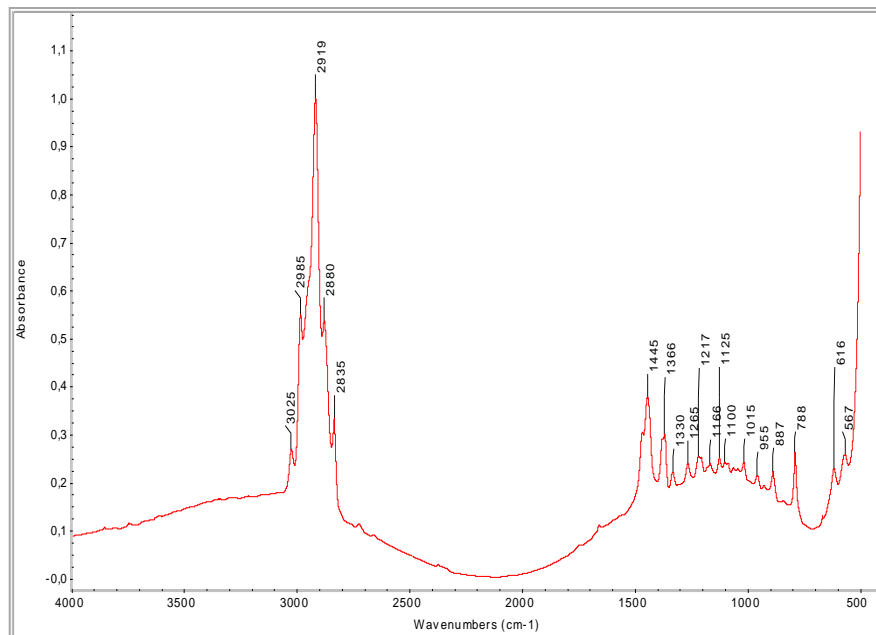
III. Φάσματα FT-IR αιθερίων ελαίων ρητίνης *Pinus halepensis*



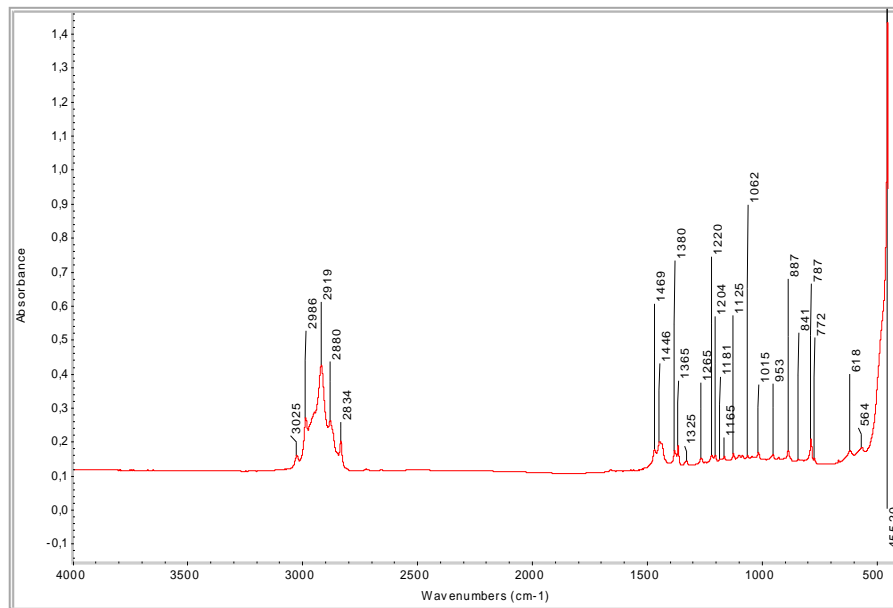
Εικόνα 71. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη διοξειδίου του θείου.



Εικόνα 72. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας

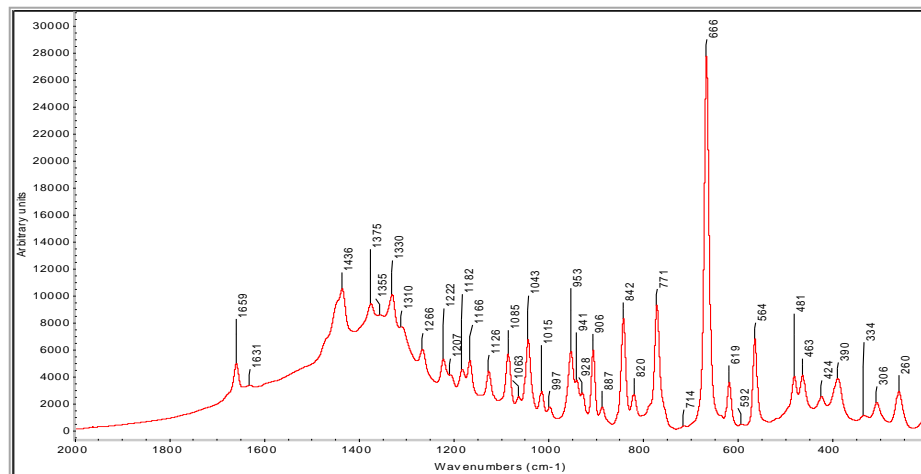


Εικόνα 73. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* από την περιοχή της Κεντρικής Εύβοιας

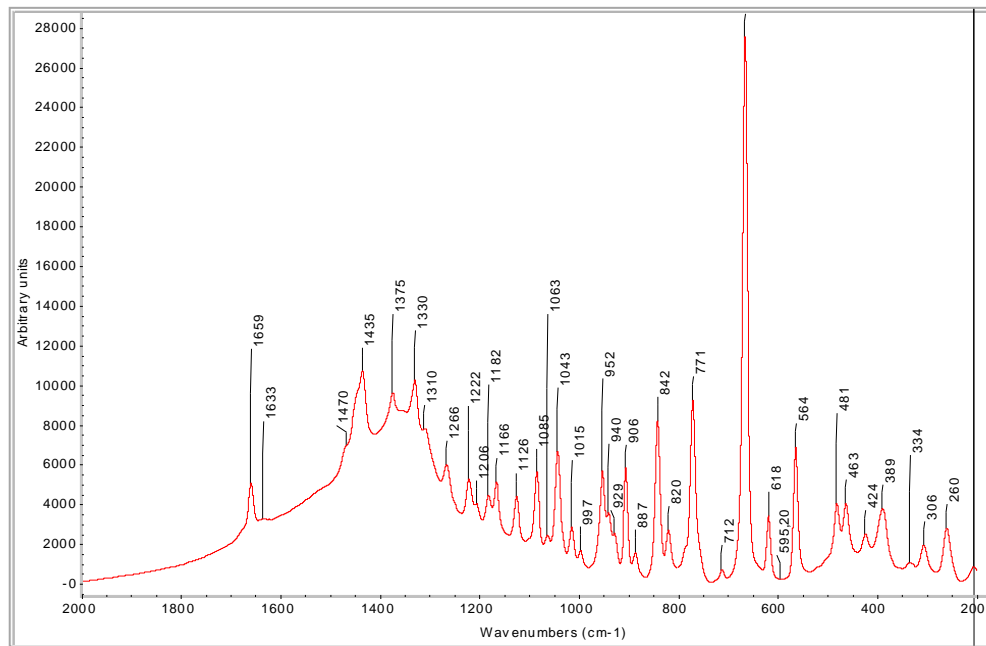


Εικόνα 74. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis* από την περιοχή της Χαλκιδικής

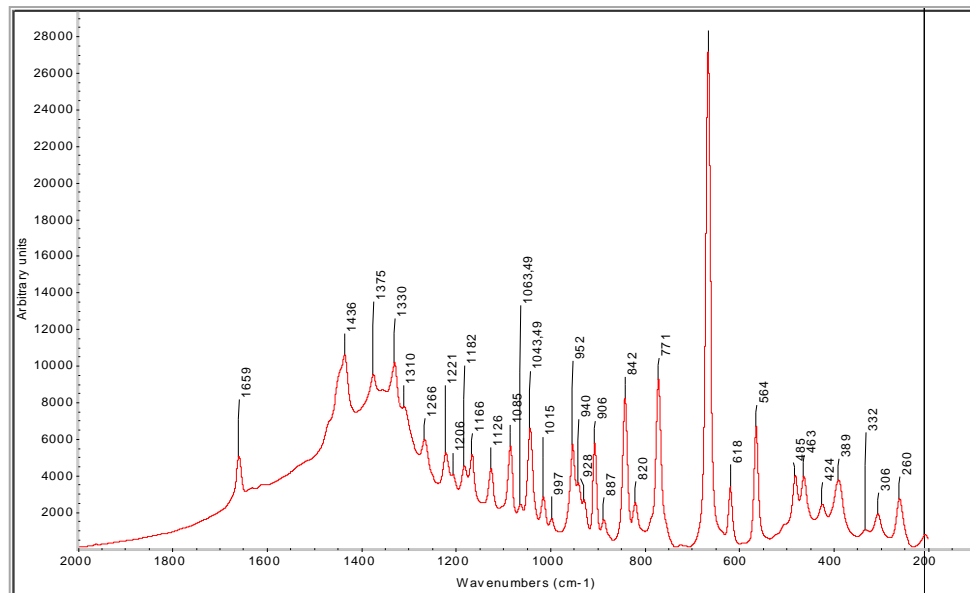
IV. Φάσματα RAMAN αιθερίου ελαίου ρητίνης *Pinus halepensis*



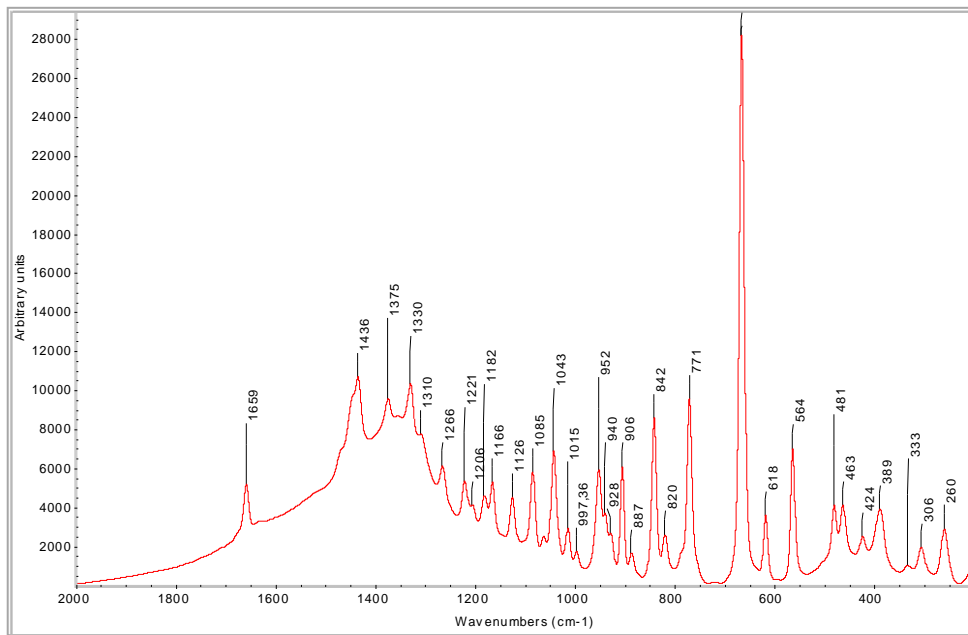
Εικόνα 75. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή την περιοχή Συνατερισμού ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη SO₂



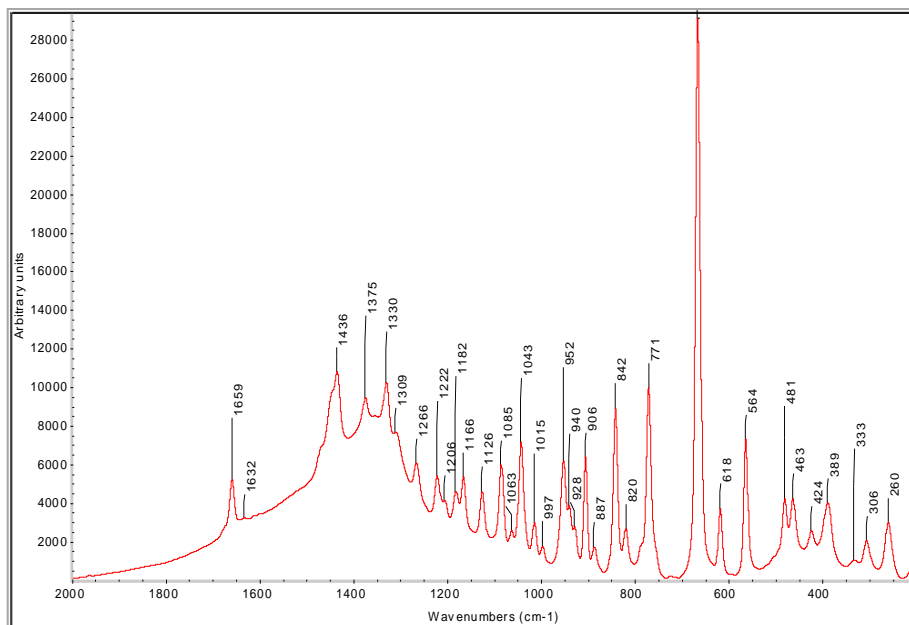
Εικόνα 76. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή την Χαλκιδικής Εταιρεία Quality Resins.



Εικόνα 77. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας



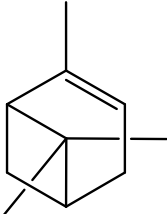
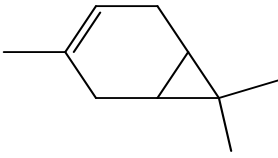
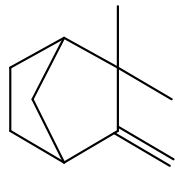
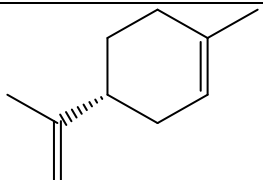
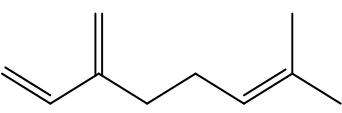
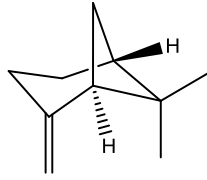
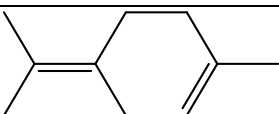
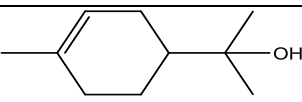
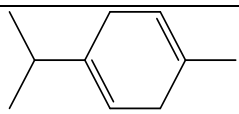
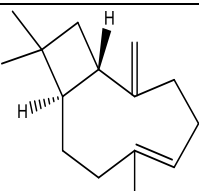
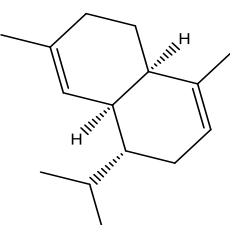
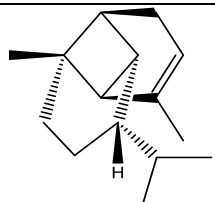
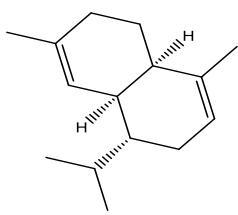
Εικόνα 78. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή της Κεντρικής Εύβοιας



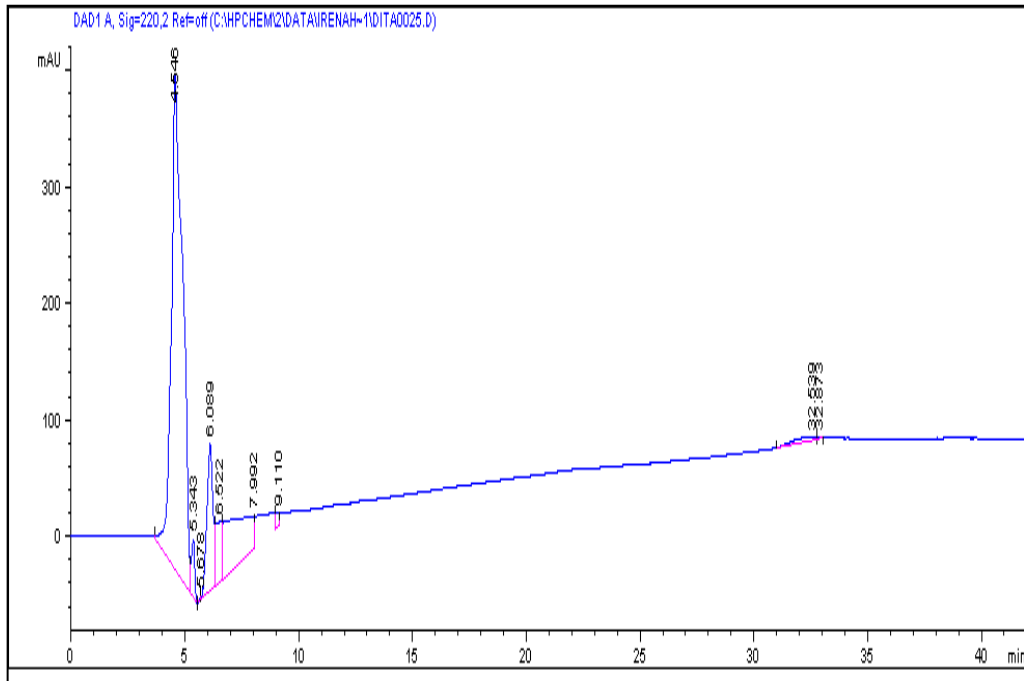
Εικόνα 79. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή της Χαλκιδικής

V. Πίνακας Δομών Κυριότερων Συστατικών

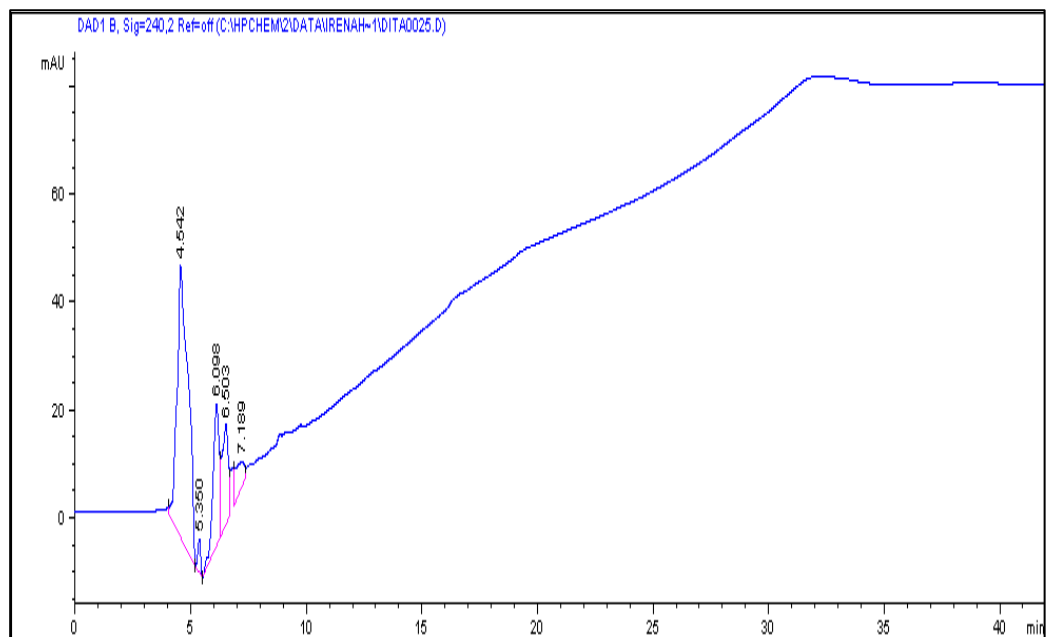
Πίνακας 14. Χημικές δομές των κυριότερων τερπενικών συστατικών που περιέχονται στα αιθέρια έλαια ρητίνης και στα εκχυλίσματα εζανίου(ΠΔΠΟ).

 α-πινένιο	 δ-3-καρένιο	 καμφένιο
 d-λιμονένιο	 μυρκένιο	 β-πινένιο
 τερπινολένιο	 α-τερπινεόλη	 γ-τερπινένιο
 β-καρυοφυλλένιο	 α-χουμουλένιο	 α-κοπαένιο
 α-μουουρολένιο		

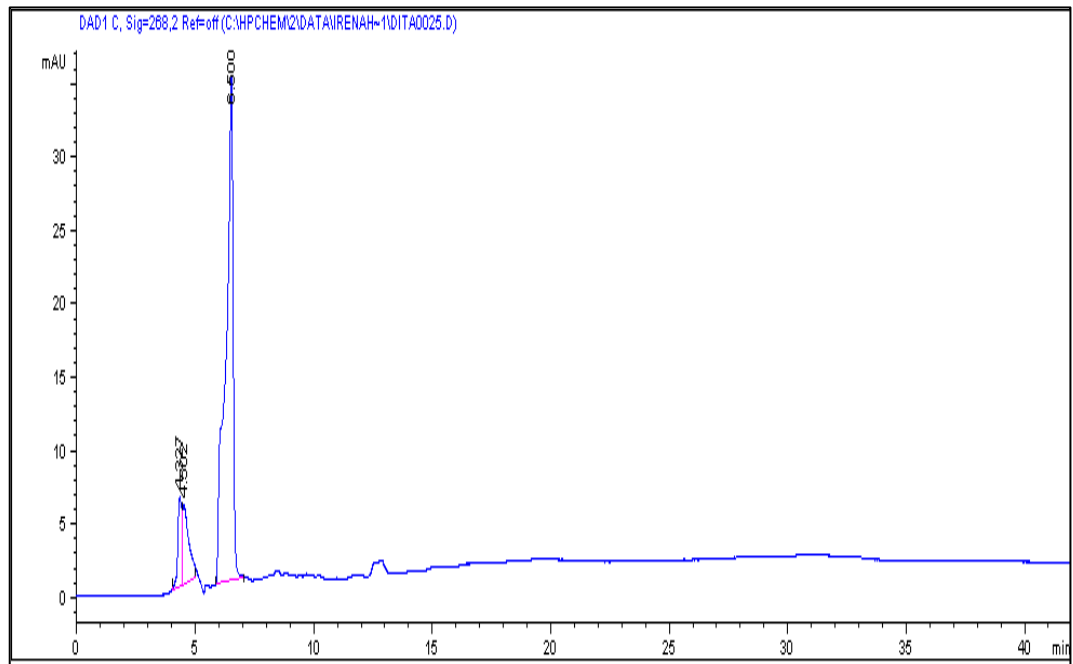
VI. Χρωματογραφήματα HPLC/DAD



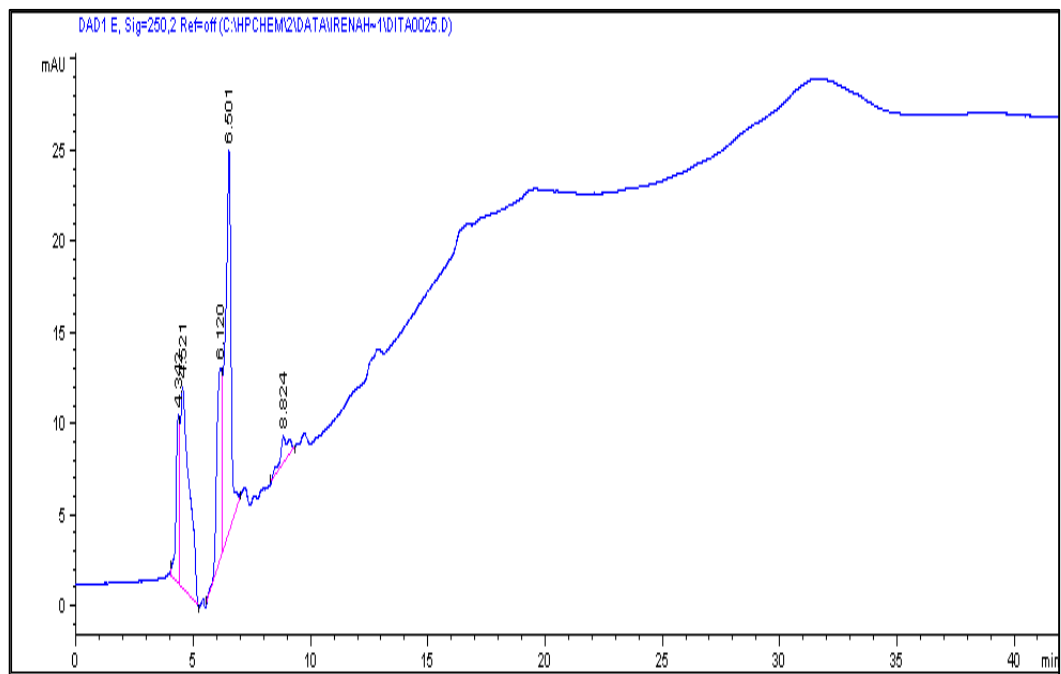
Εικόνα 80. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO₂)



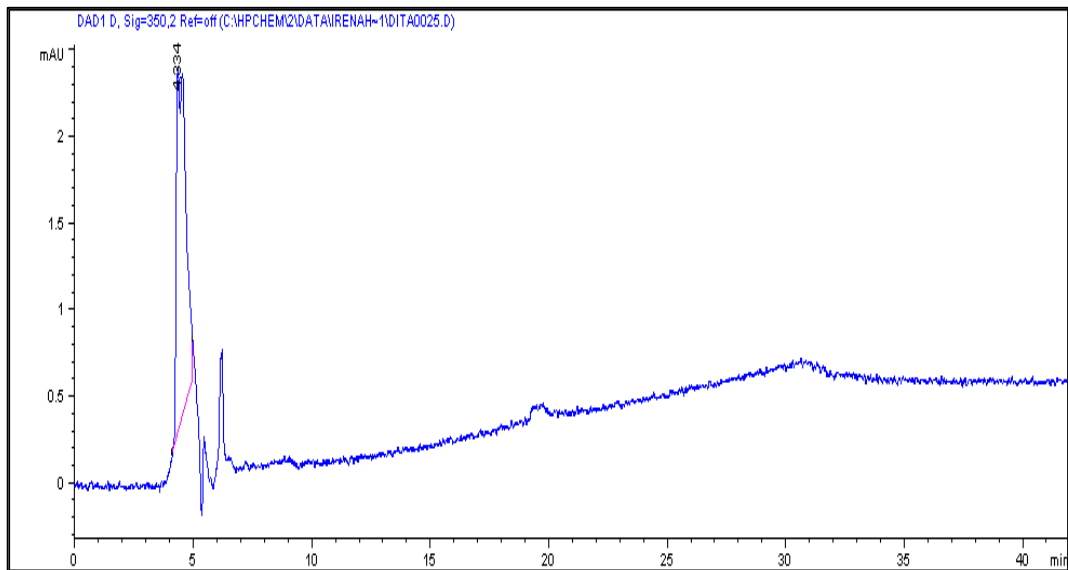
Εικόνα 81. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 240nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO₂)



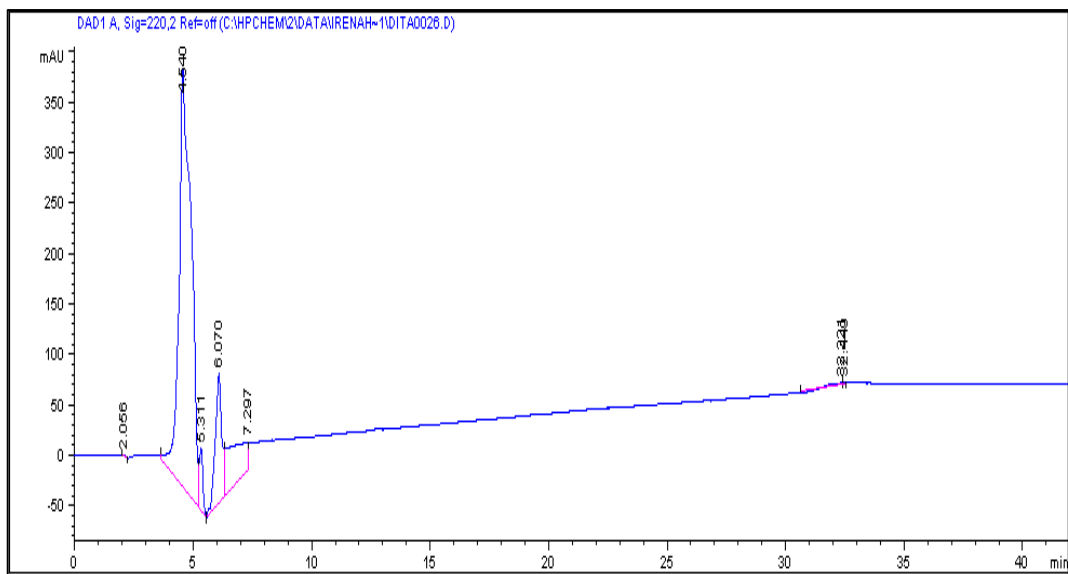
Εικόνα 82. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 268nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO₂)



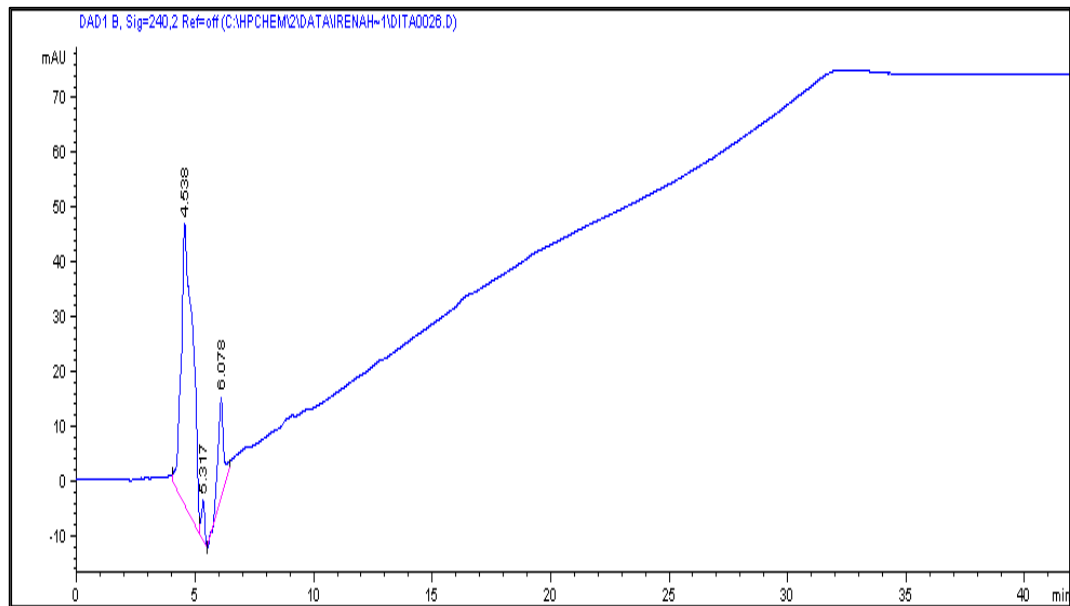
Εικόνα 83. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 250nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO₂)



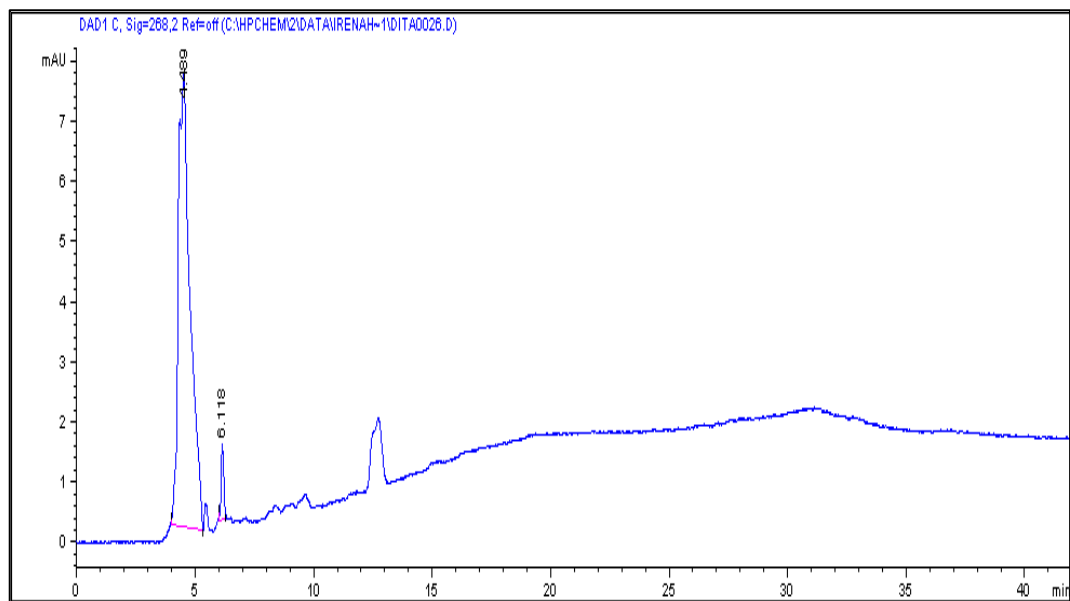
Εικόνα 84. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 350nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO₂)



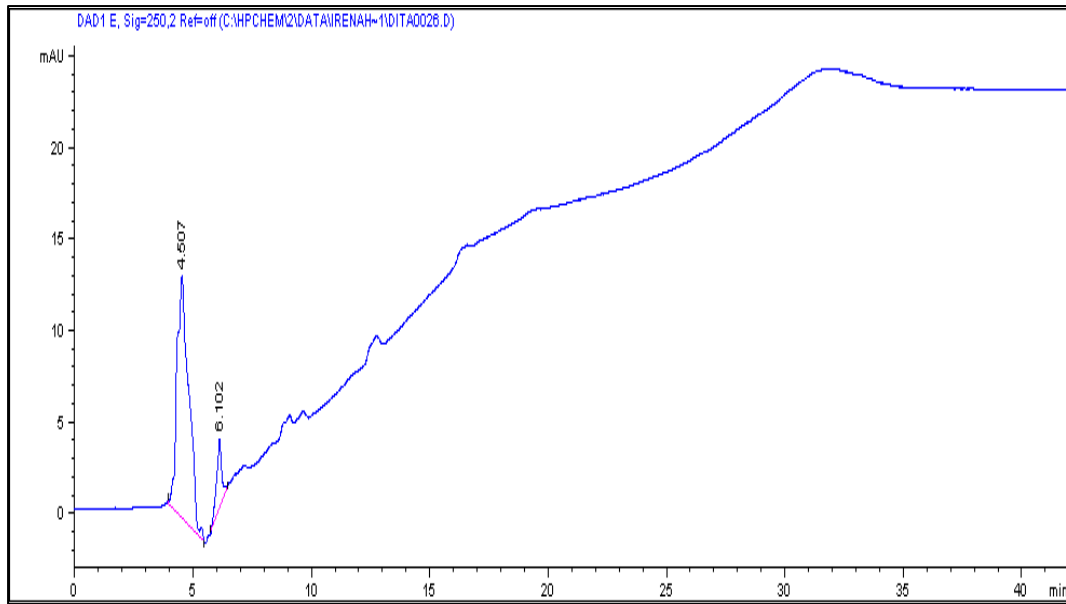
Εικόνα 85. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)



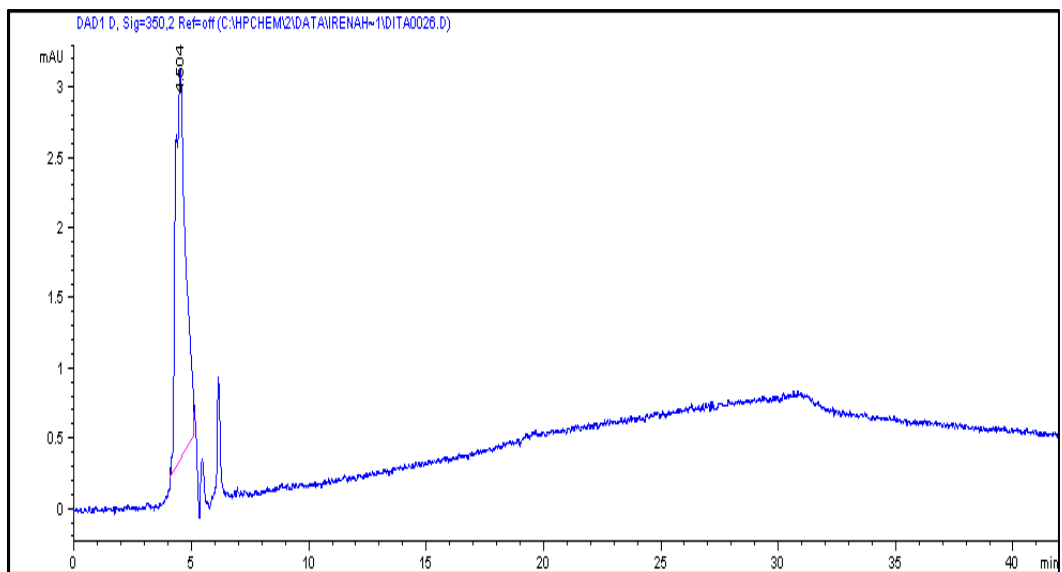
Εικόνα 86. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 240nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)



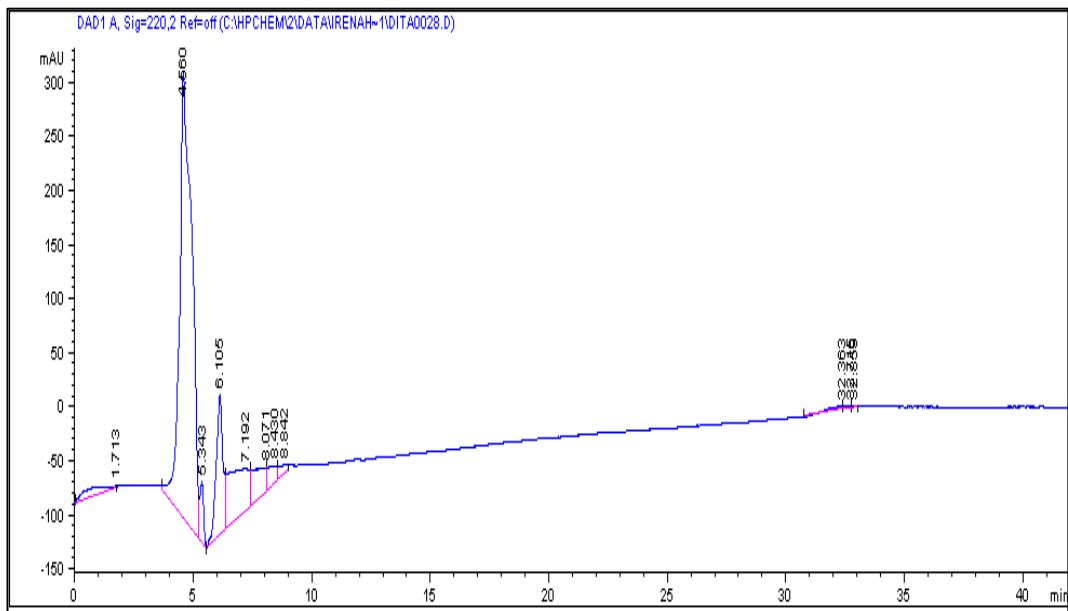
Εικόνα 87. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 268nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)



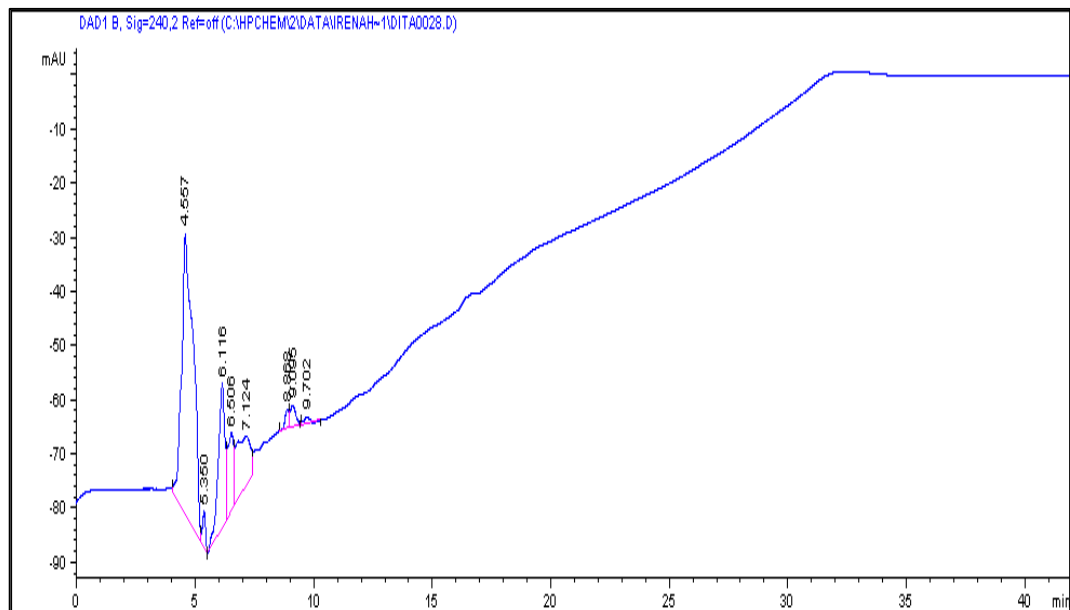
Εικόνα 88. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 250nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)



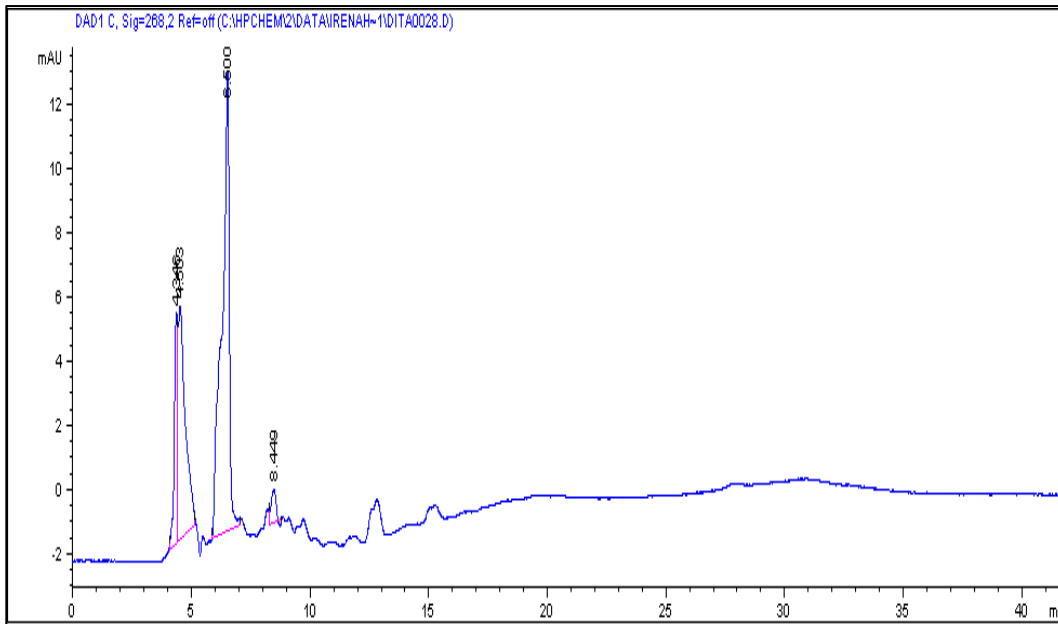
Εικόνα 89. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 350nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)



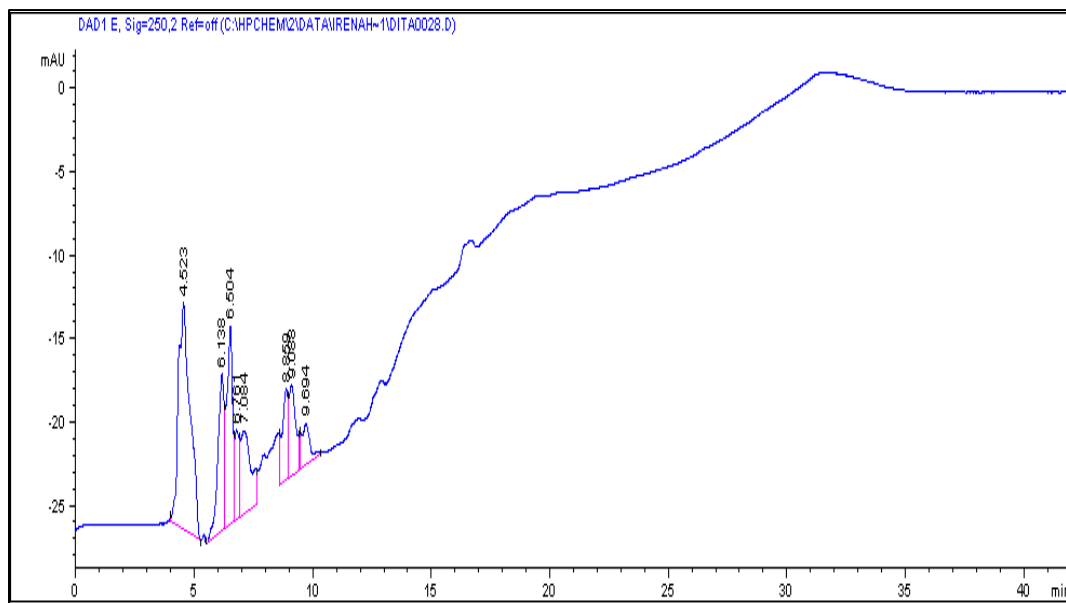
Εικόνα 90. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm (Χαλκιδικής)



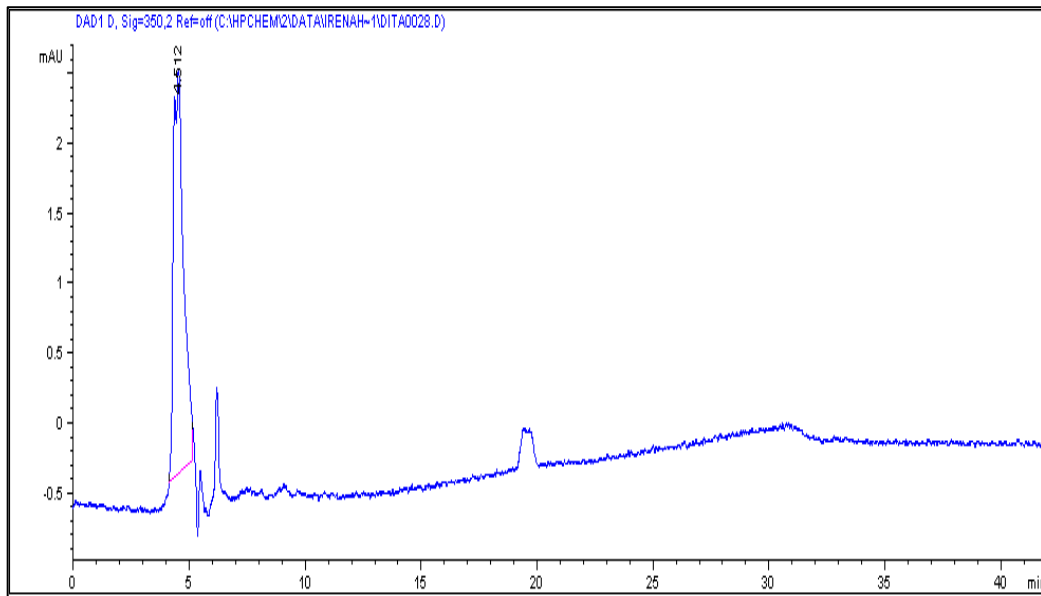
Εικόνα 91. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 240nm (Χαλκιδικής)



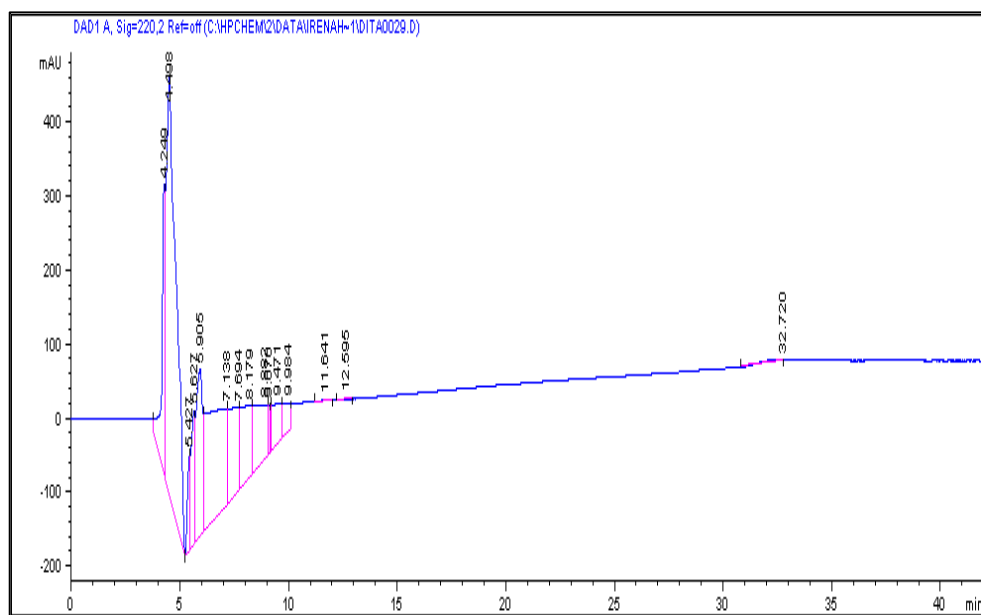
Εικόνα 92. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 268nm (Χαλκιδικής)



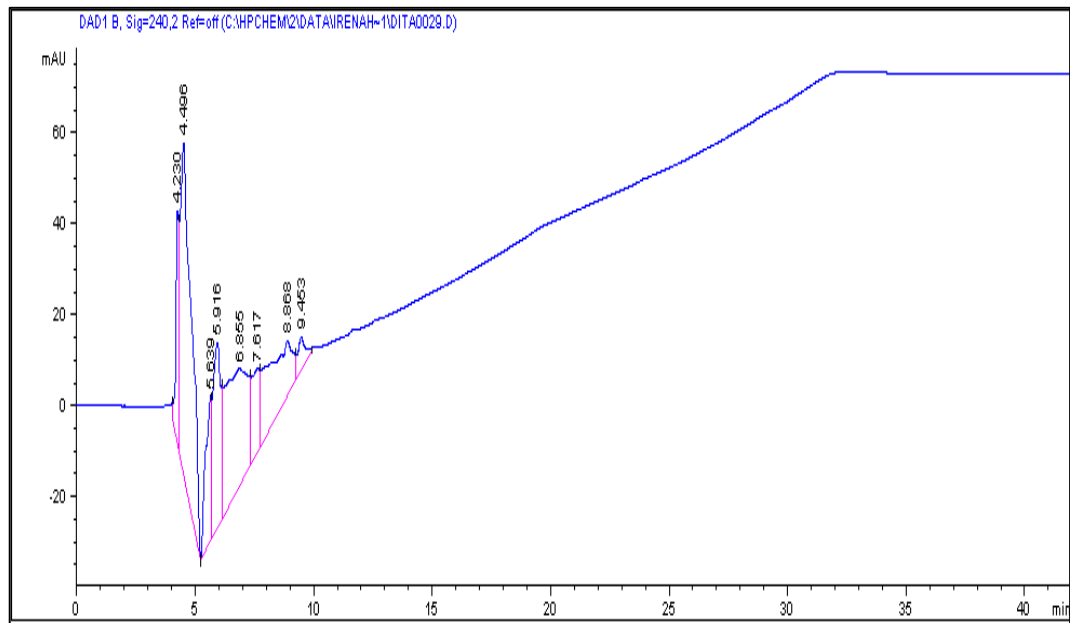
Εικόνα 93. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 250nm (Χαλκιδικής)



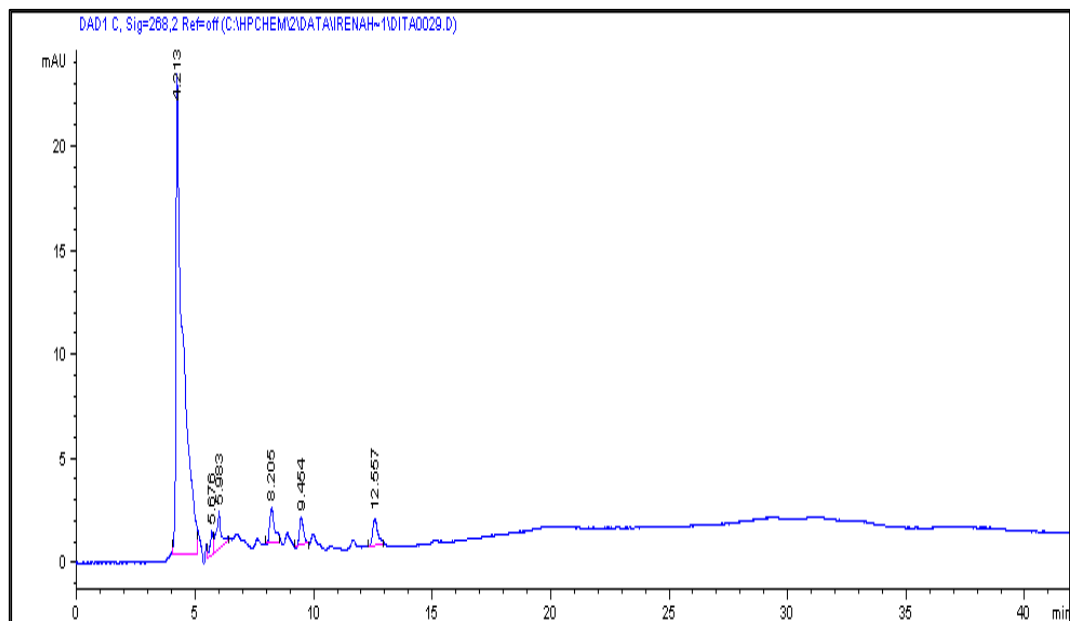
Εικόνα 94. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 350nm (Χαλκιδικής)



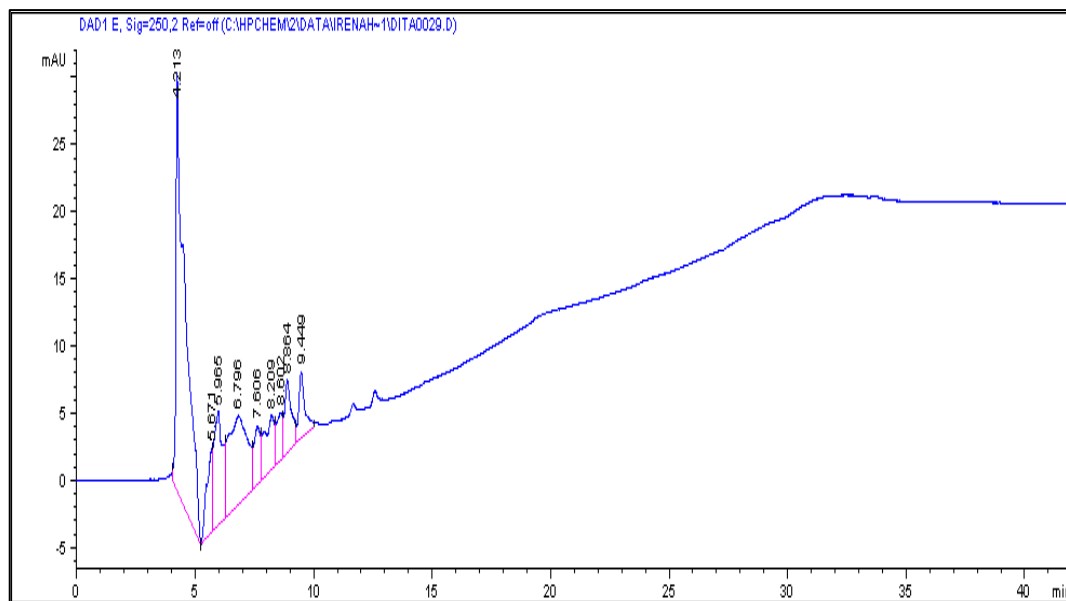
Εικόνα 95. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες(Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO2)



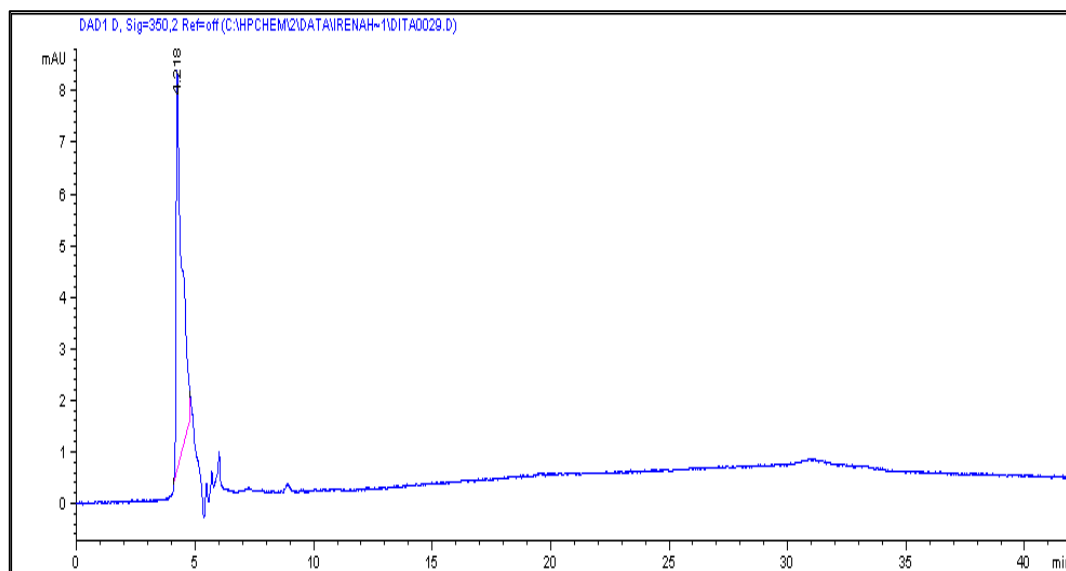
Εικόνα 96. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 240nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO2)



Εικόνα 97. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 268nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO2)

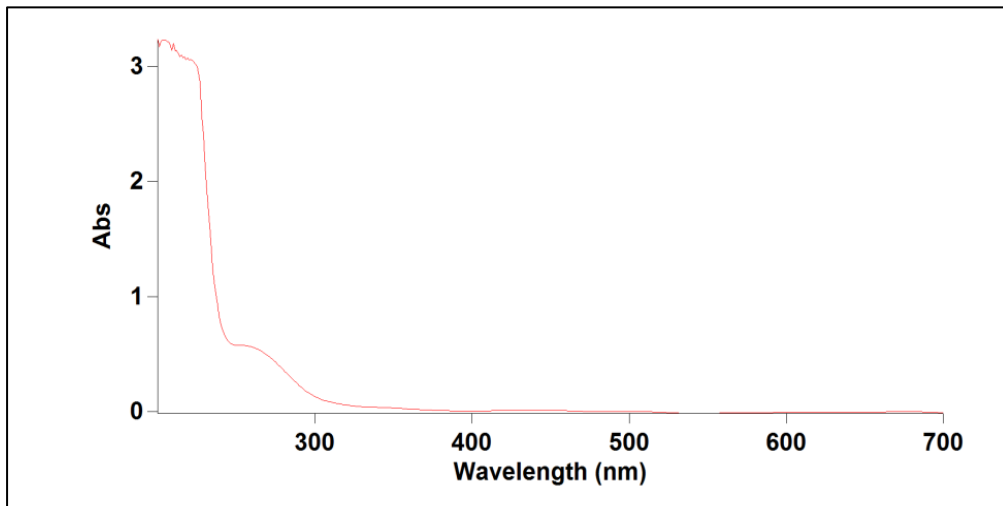


Εικόνα 98. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 250nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO2)

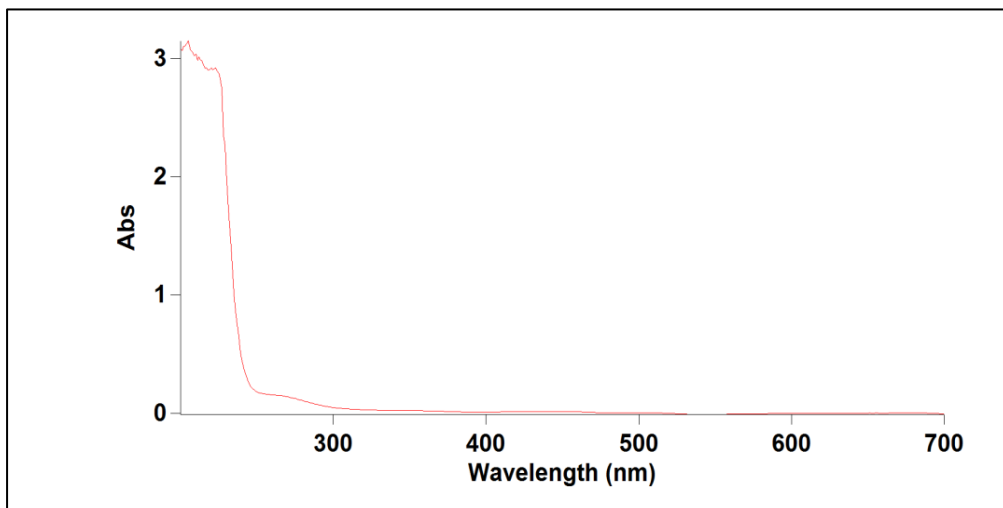


Εικόνα 99. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 350nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO2)

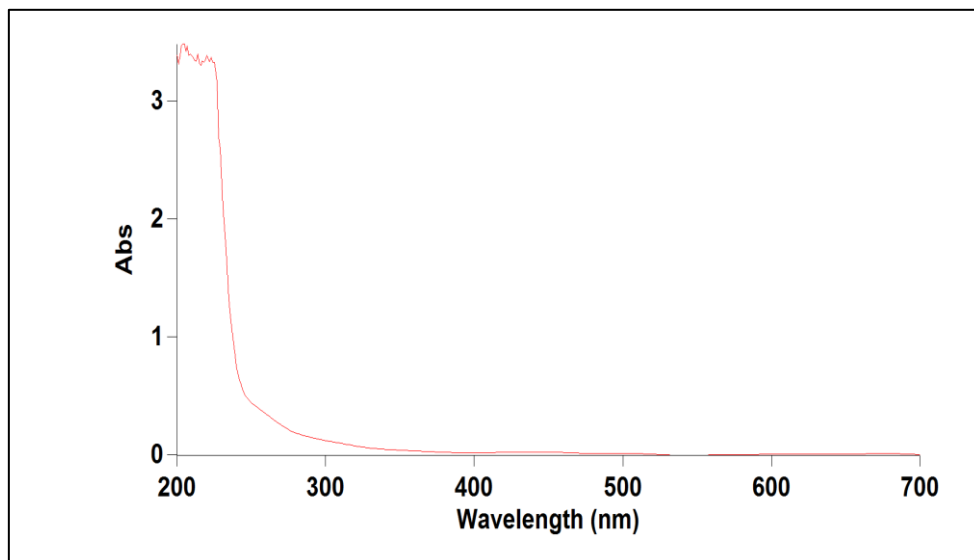
VII. Φάσματα UV-Vis



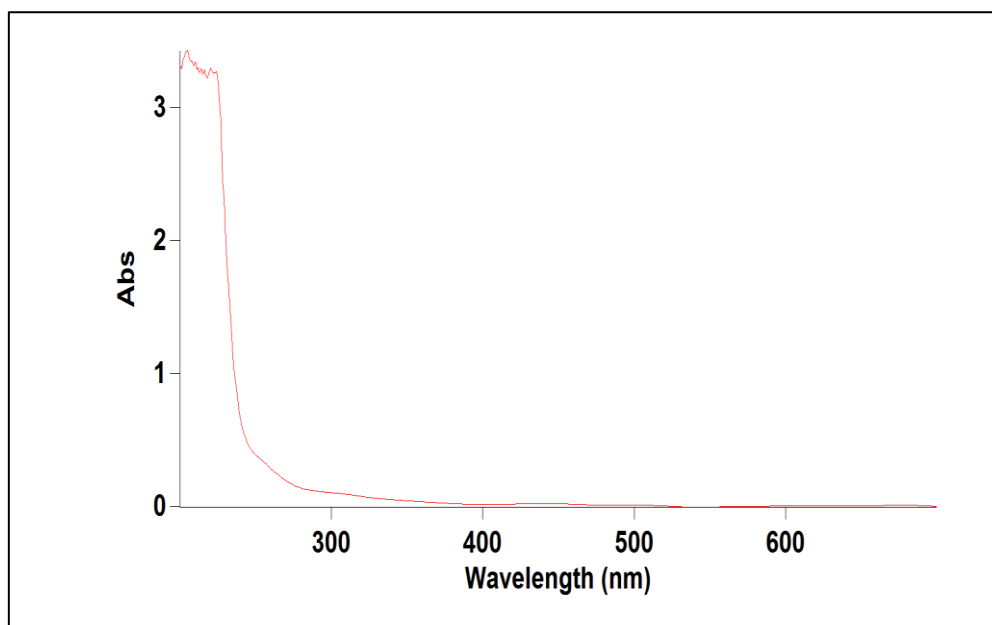
Εικόνα 100. Φάσμα UV-Vis υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+SO₂)



Εικόνα 101. Φάσμα UV-Vis υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)



Εικόνα 102. Φάσμα UV-Vis υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ (Χαλκιδική)



Εικόνα 103. Φάσμα UV-Vis υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ μετά από παραμονή ρητίνης για 12 ημέρες σε ΠΔΠΟ (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO2)

VIII. Καταλογος Εικονων

Εικόνα 1. <i>Pinus halepensis</i>	3
Εικόνα 2. Ωριμοι κώνοι <i>P. Halepensis</i>	4
Εικόνα 3 . Γεωγραφική εξάπλωση <i>Pinus halepensis</i>	6
Εικόνα 4. Συλλογή ρητίνης.....	12
Εικόνα 5. Απεικόνιση του ισοπρενίου	19
Εικόνα 6. Παραδείγματα τερπενίων:.....	21
Εικόνα 7. Χημικές δομές των δεικτών κολοφωνίου.....	36
Εικόνα 8. Απεικόνιση της αποστακτικής συσκευής Clevenger.....	41
Εικόνα 9. Απεικόνιση των βασικών τμημάτων ενός εριοχρωματογράφου.....	46
Εικόνα 10: Διάγραμμα ενός φασματομέτρου μαζών	50
Εικόνα 11. Σχηματικό διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου συζευγμένου με φασματογράφο μαζών	51
Εικόνα 12 . Δομή δωδεκανίου	54
Εικόνα 13. Δονήσεις τάσης και κάμψης των μοριακών δονήσεων μιας ομάδας -CH ₂ και οι περιοχές απορρόφησης στην υπέρυθρη περιοχή	57
Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμερου FTIR με συμβολόμετρο.....	60
Εικόνα 15. Ενδεικτική τομή διάταξης ATR	62
Εικόνα 16: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων για τη σκέδαση Raman	64
Εικόνα 17: Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου Raman	65
Εικόνα 18. Σχηματική διάταξη του φασματοφωτομέτρου UV/ VIS	71
Εικόνα 19. Χρωματογραφικός διαχωρισμός	73
Εικόνα 20. Χρωματογραφικός διαχωρισμός, με HPLC αντίστροφης φάσης.....	74

Εικόνα 21. Διάγραμμα ροής πειραματικής πορείας	79
Εικόνα 22: Υδροαπόσταξη ρητίνης με συσκευή Clevenger-Αιθέριο έλαιο ρητίνης.....	83
Εικόνα 23. Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε.....	90
Εικόνα 24. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Βόρειας Εύβοιας που παραλήφθηκε με την τεχνική της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC-MS.....	95
Εικόνα 25. Καφεϊκό οξύ	105
Εικόνα 26: Εικόνα πριν και μετά το φιλτράρισμα των δειγμάτων.....	107
Εικόνα 27. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης καφεϊκού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	109
Εικόνα 28. Το σύστημα της φασματοσκοπίας υπερύθρου που χρησιμοποιήθηκε.....	114
Εικόνα 28. Φάσματα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης των περιοχών που εξετάστηκαν	115
Εικόνα 29: Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη δειοξειδίου του θείου.....	116
Εικόνα 30. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από την Εταιρεία Quality resins στην περιοχή της Χαλκιδικής.	117
Εικόνα 31. Φάσμα FT-IR α-πινενίου	118
Εικόνα 32. Φάσματα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης των περιοχών που εξετάστηκαν	121
Εικόνα 33. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη SO ₂	123
Εικόνα 34: Φάσμα Raman α-πινενίου	124
Εικόνα 35: Διαχωριστική χοάνη	128
Εικόνα 36. Περιτροφικός συμπυκνωτής, Rotary evaporator	129
Εικόνα 37: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Χαλκιδική).	143
Εικόνα 38: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου μετά από παραμονή της ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων).....	151

Εικόν 39: Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος ξανίου μετά από παραμονή της ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 1h. Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων)	152
Εικόνα 40: Αντίδραση όζοντος και τερπενίων	154
Εικόνα 41: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις.	157
Εικόνα 45. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 220nm.....	161
Εικόνα 46. Φάσματα UV-Vis κύριων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος ρητίνης στα 220 nm ..	163
Εικόνα 53. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm (Κεντρική Εύβοια)	172
Εικόνα 54. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 240nm (Κεντρική Εύβοια)	172
Εικόνα 55. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 268nm (Κεντρική Εύβοια)	173
Εικόνα 56. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 250nm (Κεντρική Εύβοια)	173
Εικόνα 57. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 350nm (Κεντρική Εύβοια)	174
Εικόνα 58. Φάσμα UV-vis υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ(Κεντρικής Εύβοιας)	174
Εικόνα 59: Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη SO ₂ που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης	179
Εικόνα 60. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη SO ₂ που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης	180
Εικόνα 61. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Χαλκιδικής Εταιρείας Quality Resins που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.....	180
Εικόνα 62: Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Βόρειας Εύβοιας που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.	181
Εικόνα 63. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Κεντρικής Εύβοιας που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.	181

Εικόνα 64. Αέριο χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> περιοχής Χαλκιδικής που παραλήφθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης.....	182
Εικόνα 65. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη SO ₂).....	182
Εικόνα 66. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη SO ₂).....	183
Εικόνα 67. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Εταιρείας Quality Resins).	183
Εικόνα 68. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Βόρειας Εύβοιας).....	184
Εικόνα 69. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Κεντρικής Εύβοιας).....	184
Εικόνα 70. Αέριο χρωματογράφημα πτητικών συστατικών εκχυλίσματος εξανίου (Δείγμα Χαλκιδικής).....	185
Εικόνα 71. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από το Συνεταιρισμό ρητίνης Μεγάρων χωρίς προσθήκη δειοξειδίου του θείου.....	185
Εικόνα 72. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας.....	186
Εικόνα 73. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από την περιοχή της Κεντρικής Εύβοιας.....	186
Εικόνα 74. Φάσμα FT-IR αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από την περιοχή της Χαλκιδικής.....	187
Εικόνα 75. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή την περιοχή Συνεταιρισμού ρητίνης Μεγάρων με προσθήκη SO ₂	187
Εικόνα 76. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή την Χαλκιδικής Εταιρεία Quality Resins.	188
Εικόνα 77. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας	188
Εικόνα 78. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή της Κεντρικής Εύβοιας	189
Εικόνα 79. Φάσμα Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης από την περιοχή της Χαλκιδικής.....	189
Εικόνα 80. Χρωματογράφημα υδροαλκοολικού εκχυλίσματος ρητίνης ΠΔΠΟ στα 220nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO ₂).....	191

Εικόνα 81. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 240nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO ₂).....	191
Εικόνα 82. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 268nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO ₂).....	192
Εικόνα 83. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 250nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO ₂).....	192
Εικόνα 84. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 350nm (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+ SO ₂).....	193
Εικόνα 85. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 220nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)	193
Εικόνα 86. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 240nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)	194
Εικόνα 87. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 268nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)	194
Εικόνα 88. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 250nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)	195
Εικόνα 89. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 350nm (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική)	195
Εικόνα 90. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 220nm (Χαλκιδικής).....	196
Εικόνα 91. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 240nm (Χαλκιδικής).....	196
Εικόνα 92. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 268nm (Χαλκιδικής).....	197
Εικόνα 93. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 250nm (Χαλκιδικής).....	197
Εικόνα 94. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 350nm (Χαλκιδικής).....	198
Εικόνα 95. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 220nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες(Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO ₂).....	198
Εικόνα 96. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 240nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO ₂).....	199
Εικόνα 97. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 268nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO ₂).....	199

Εικόνα 98. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 250nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO ₂).....	200
Εικόνα 99. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος ΠΔΠΟ στα 350nm μετά από παραμονή ρητίνης σε ΠΔΠΟ για 12 ημέρες (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO ₂).....	200
Εικόνα 100. Φάσμα UV-Vis εκχυλίσματος ΠΔΠΟ (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων+SO ₂).....	201
Εικόνα 101. Φάσμα UV-Vis εκχυλίσματος ΠΔΠΟ (Εταιρεία Quality resins στη Χαλκιδική).....	201
Εικόνα 102. Φάσμα UV-Vis εκχυλίσματος ΠΔΠΟ (Χαλκιδική).....	202
Εικόνα 103. Φάσμα UV-Vis εκχυλίσματος ΠΔΠΟ μετά από παραμονή ρητίνης για 12 ημέρες σε ΠΔΠΟ (Συνεταιρισμός ρητίνης Μεγάρων-SO ₂).....	202

IX. Καταλογος Πινακων

Ρητίνη, πεύκο, υδροαπόσταξη, αιθέριο έλαιο, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, FT-IR, Raman, α-πινένιο, μέθοδος Folin Ciocalteu.....v	
Resin, pinus, hydrodistillation, essential oil, Extraction with organic solvent, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, , High performance Liquid Chromatography, FT-IR, Raman, α-pinene, Folin Ciocalteu methodviii	
Πίνακας 1. Συστατικά τερεβινθελαίου ελληνικών δέντρων χαλέπιας και τραχείας πεύκης (Οικονόμου κ.α.,1964)..... 30	
Πίνακας 2. Συστατικά τερεβινθελαίου ελληνικών και παραμεσογειακών πληθυσμών (Schiller and Grunwald, 1987a)..... 31	
Πίνακας 3. Μερικά από τα συστατικά που αναφέρθηκαν ότι υπάρχουν στα κολοφώνια (Joye et al. 1967, Luong et al. 1999, Illing et al. 2009) 35	
Πίνακας 4. Δείγματα ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> 81	
Πίνακας 5. Αποδόσεις αιθερίου ελαίου ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> 85	
Πίνακας 6: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών που ανιχνεύτηκαν στα αιθέρια έλαια ρητίνης του είδους <i>Pinus halepensis</i> από διάφορες περιοχές της Ελλάδας 92	
Πίνακας 7. Folin –Ciocalteu, Απορρόφηση καφεϊκού οξέος συναρτήσει συγκέντρωσης 108	
Πίνακας 8. Folin-Ciocalteu, Απορρόφηση και αντιστοιχία σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος για τα αιθέρια έλαια ρητίνης του είδους <i>Pinus halpensis</i> 110	
Πίνακας 9. Κυριότερες συχνότητες και Λειτουργικές Ομάδες (Schulz et al., 2005 ; Sculz et al., 2007) 119	
Πίνακας 10. Χαρακτηριστικές εντάσεις Raman αιθερίου ελαίου ρητίνης (Schulz et al., 2005) 123	
Πίνακας 11.ποιοτική Και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών που ανιχνευτήκαν στα εκχυλίσματα εξανίου του ΠΔΠΟ μετά από προσθήκη ποσότητας ρητίνης <i>Pinus halepensis</i> από διάφορες περιοχές της Ελλάδας..... 134	
Πίνακας 12: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών που ανιχνεύτηκαν σε εκχυλίσματα ΠΔΠΟ μετά από παραμονή ποσότητας ρητίνης σε αυτά για 12 ημέρες και 1h 148	
Πίνακας 13: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε 158	

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F.Z., Lazzouni, H.A., Rebiahi, S.A., Ziani Cherif, C., and Bessiere (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(22)*, pp. 5433-5436

Agrow (2007). *Agrow's Top 20: 2007 Edition – DS258 Informa Health Care, London*

Amri, Ismail., Hamrouni, Lamia., Hanana, Mohsen., Gargouri, Samia., Fezzani, Tarek ., Jamoussi, Bassem (2013) Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological Agriculture & Horticulture, 2013 Vol. 29, No. 2, 91–106*

Amri, Ismail., Hamrouni, Lamia., Hanana, Mohsen., Gargouri, Samia., Fezzani, Tarek., Jamoussi, Bassem (2016). Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems. *Biological Agriculture & Horticulture, 2013* and MCF-7 cell lines. *Research in Pharmaceutical Sciences, 11(6): 476-483*

Aranda F. J. and J. Villalan, Biochim (1997). *Biophys. Acta, Biomembr., 1327, 171.*

Arrabal, C., Cortijo, M., de Simon, B.F., García-Vallejo, M.C. and Cadahía, E. (2005) Differentiation among five Spanish *Pinus pinaster* provenances based on its oleoresin terpenic composition. *Biochem. Syst. Ecol., 33: 1007-1016.*

Arrabal, C., Cortijo, M., de Simón, B.F., García-Vallejo, M.C. and Cadahía, E. (2002) *Pinus pinaster* oleoresin in plus trees. *Holzforschung, 56: 261-266.*

Atta, A. M., El-Saeed, S. M. Farag, R. K (2006). *React. Funct. Polym. 66, 1596-1608.*

Axelsson, Sara., Eriksson, Kare., Nilsson, Ulrika (2011) Determination of resin acids during production of wood pellets—a comparison of HPLC/ESI-MS with the GC/FID MDHS 83/2 method. *Journal of Environmental Monitoring, 13, 2940–2945.*

Ayars, H. Altman, C. Frazier, E. Chi, Y. (1989) *J. Allergy Clin. Immunol.* 83 610.

Babushok V. I., Linstrom P. J. and Zenkevich I. G., (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland 20899, USA.*

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.

Bamman, M.W. (1936) Vertical resin ducts in the secondary wood of the Abietineae. *Phytol.*, 35: 11-46.

Benderoth M., Textor S., Windson A.J., Mitchell-Olds T., Gershenzon J., Kroymann J. (2006). Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 103(24): 9118 – 9123

Bicchi, C., (2000). Gas Chromatography III / Essential oils. *Encyclopedia of Separation Science 2007, Academic Press, 2744-2755.*

Bonikowskia, Radosław., Celińskib, Konrad., Wojnicka-Póltorakb, Aleksandra., Malińsk, Tomasz. (2014) Composition of Essential Oils Isolated from the Needles of *Pinus uncinata* and *P. uliginosa* Grown in Poland. *Natural Product Communications Vol. 10 (2) 2015*

Botham, P. A., Lees, D., Illing, H. P. Malmfors, T. ,Regul. (2008), *Toxicol. Pharmacol.* 52, 257-263.

Bouzenna, Hafsia., Hfaiedh, Najla., Bouaziz, Mouhamed., Giroux-Metges, Marie-Agnès., Elfeki, Abdelfattah., Talarmin, Hélène. (2017) Cytoprotective effects of essential oil of *Pinus halepensis* L. against aspirin-induced toxicity in IEC-6 cells. *Archives Of Physiology And Biochemistry*

Bråred-Christensson, J., Matura, M., Backtorp, C., Borje, A., Nilsson, J. L. G., Karlberg, A.-T. (2006) *Contact Derm.* 55, 230 – 237.

Brooker M.I.H., Kleinig D.A. (2006). *Field guide to eucalypts, Vol. 1, South-eastern Australia*

Burge, M. G. Harries, I. O'Brien and J. Pepys. (1980) *Clin. Exp. Allergy*, 10, 137.

Burge, P. S. (1984) *Clin. Immunol. Allergy*, 4, 55-81.

Burge, P. S., Edge, G., Hawkins, R., White, V. Taylor, A. J., (1981) ,*Thorax* 36, 828-834.

Butler, A.R. and Wu, Y.L., (1992) Artemisin (qingshaosu): a new type of antimalarial drug. *Chem. Soc. Rev.* pp. 85-90.

Camilo López-Alarcón, Ana Denicola., (2013) Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta, Volume 763, Pages 1–10.*

Chambel, M.R., Climent, J., Pichot, C., Ducci, F., (2013). Mediterranean Pines (*Pinus halepensis* Mill. and *brutia* Ten.). In: *Pâques, L.E. (Ed.), Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives, Managing Forest Ecosystems. Springer Netherlands, Dordrecht.*

Chang, J., Hanover, J.,W., (1991). Geographic variation in the monoterpene composition of black spruce. *Can. J. For. Res.* 21, 796–1800.

Chundnoff, M. (1962). Resin tapping of *Pinus halepensis* Mill. by bark chipping and acid stimulation. *J. Israel For. Assoc.*, 12: 118-127.

Croteau, R., Johnson, M.A. (1985). Biosynthesis of terpenoid wood extractives. In: Higuchi T. (Ed.), *Biosynthesis and Biodegradation of wood components, Academic Press, Orlando, FL, 379–439.*

Djerrada, Zineb., Kadika, Leila., Djouahri, Abderrahmane. (2015) Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 74 440–449

Dob, T., Berramdane, T. and Chelgoum, C. (2005) Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *C. R. Chimie*, 8: 1939-1945.

Dob, Tahar., Berramdane, Tayeb., Chelghoum, Chaabane, (2011) Essential Oil Composition of *Pinus halepensis* Mill. from Three Different Regions of Algeria. *Journal of Essential Oil Research*

Dorman, K. (1947). Better pines for turpentine. *Amer. Forests*, 53: 498-500.

Drake P.L., Mendham D.S., White D.A., Ogden G.N. (2009). A comparison of growth, photosynthetic capacity and water stress in *Eucalyptus globulus* coppice regrowth and seedlings during early development. *Tree physiology*; 29(5): 663 – 674

Duduku Krishnaiah, Rosalam Sarbatly, Rajesh Nithyanandam, (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species, *Food and Bioproducts Processing* 89 217–233.

Ehrin and A. T. Karlberg, (1990) *Contact Dermatitis*, 23, 359.

Estlander, T. Jolanki, R. Alanko, K. Kanerva, L. *Contact Dermatitis*, 2001, 44, 213.

Fekih, Nadia., Allali, Hocine., Merghache, Salima., Chaïb, Faïza., Merghache, Djamila El Amine, Mohamed., Djabou, Nassim., Muselli, Alain., Tabti, Boufeldja., Costa, Jean., (2014) Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pac J Trop Dis* 2014; 4(2): 97-103

Fiebach, K.Grimm, D. (2002) *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Berlin

Figueiredo A.R., Campos F., Freitas V., Hogg T., Couto J.A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*; 25(1): 105 – 112

Folin O., V. Ciocalteu, (1927) On tyrosine and tryptophan determinations in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 73 (2), pp. 627–650.

Folin O., W. Denis. (1915) A colorimetric method for the determination of phenol (and derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 22 (2), pp. 305–308.

Frankel, E.N., S.W. Huang, J. Kanner and J.B. German. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils versus emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42:1054-1059.

Gäfvvert, E., Shao, L. P., Karlberg, A. T., Nilsson, U., Nilsson, J. L., (1994) *Chem. Res. Toxicol.* 7, 260 – 266.

Gallis, A.T. and Panetsos, K.P. (1997) Use of cortical terpenes to discriminate *Pinus brutia* (TEN.), *Pinus halepensis* (MILL.) and their hybrids. *Silvae Genetica*, 46: 82 - 88.

Gaussen H., (1993). Heywood V.H. and Chater A.O.. Pinus L. Tutin et al. (eds), Flora Europaea, Second Edition, Cambridge University Press, 1: 40-44.

Graikou, K., Gortzi, O., Mantanis, G., Chinou, I. (2012) Chemical composition and biological activity of the essential oil from the wood of *Pinus heldreichii* Christ. var. *Leucodermis*. *Eur. J. Wood Prod.* (2012) 70:615–620

Guimarães Rafaela, Maria João Sousa, Isabel C.F.R. Ferreira, (2010) Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants, *Industrial Crops and Products, Volume 32, Issue 2, , Pages 152–156.*

Guri, Anilda., Kefalas, Panagiotis., Roussis, Vassilios (2006) Antioxidant Potential of Six Pine Species. *Phytother. Res.* 20, 263–266

Hamrouni, Lamia., Hanana, Mohsen., Amri, Ismail., Romaned, Abd Errahmane., Gargouri, Samia., Jamoussi, (2014) Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*

Harborne, J.R. and Tomas-Barberan, F.A. (eds) (1991) Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. *Clarendon Press, Oxford, pp.439.*

Harris D.C. (2009). *Quantitative Chemical Analysis, 7th edition, W. H. Freeman and Company*

Hausen, B. Borries, M. Budianto E and K. Krohn (1993) *Contact Dermatitis, 29, 234.*

Hausen, B. M., Boerries, M., Budianto, E., Krohn, K., (1993) *Contact Derm. 29, 234 – 240.*

Hezari, M. and Croteau, R. (1997) Taxol biosynthesis: an update. *Planta Med., 63: 291- 295*

Hodges, J.D., Elam, W.W. and Bluhm, D.R. (1981) Influence of resin duct size and number on oleoresin flow in the southern pines. *Southern Forest Experiment Station, Research ote, SO-266, pp.1-3.*

Huang, D., Boxin, O., & Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind antioxadant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.*

Hussain S.Z., Maqbool K., (2014). GC-MS: Principle, Technique and it's application in Food Science. *International Journal of Current Science; 13: E 116 – 126*

Idzotic, Marilena ., Kajba, Davorin., Franjic, Josip. (2005) Differentiation of F1 hybrids *P. nigra* J. F. Arnold x *P. sylvestris* L., *P. nigra* J. F. Arnold x *P. densiflora* Siebold et Zucc., *P. nigra* J. F. Arnold x *P. thunbergiana* Franco and their parental species by needle volatile composition. *Biochemical Systematics and Ecology* 33 (2005) 427–439

Ikonomou, N., Valkanas, G. and Büchi, J. (1964). Composition of gum turpentine of *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* grown in Greece. *Journal of Chromatography*, 16, 29-33.

Illing, H. P. A., Malmfors, T. Rodenburg, L. ,Regul. Toxicol. Pharm. 2009, 54, 234-241.

Ioannou, Efstathia., Koutsaviti, Aikaterini ., Tzakou, Olga., Roussis, Vassilios. (2013) The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species. *Phytochem Rev*

Iwamoto, M., Minami, T., Tokuda, H., Ohtsu, H. and Tanaka, R. (2003) Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*. *Planta Med.*, 69: 69-72.

Jerković, Igor., Marijanović , Zvonimir., Gugić, Mirko., Roje, Marin (2011) Chemical Profile of the Organic Residue from Ancient Amphora Found in the Adriatic Sea Determined by Direct GC and GC-MS Analysis. *Molecules* 2011, 16, 7936-7948

Joye, N. M. Lawrence, R. V. ,J. Chem. Eng. Data (1967), 12, 279-282.

Karanikas, C, Walker, V., Scaltsoyiannes. A., Comte, G., Bertrand, C. (2010). High vs. low yielding oleoresin *Pinus halepensis* Mill. Trees GC terpenoids profiling as diagnostic tool. *Ann. For. Sci.*, 67, 412 (1-8)

Karanikas, Christoforos., Walker, Vincent., Scaltsoyiannes, Apostolos., Comte, Gilles., Bertrand, Cédric., (2009) High vs. low yielding oleoresin *Pinus halepensis* Mill. trees GC terpenoids profiling as diagnostic tool. *Ann. For. Sci.* 67 (2010) 412

Karlberg, A., Gäfvert, E. Lidén, C. ,J. Am. Acad. Dermatol. (1995), 33, 427-432.

Karlberg, A.-T. (1991), *Am. J. Contact Dermatitis*, 2, 43.

Karlberg, A.-T. A. Boman, U. Hacksell, S. Jacobsson, J. Labs and G. Nilsson, (1988) *Contact Dermatitis*, 19, 166.

- Karlberg, A.-T.**, (1988) *Acta Derm. Venereol.* 139, 1 – 43.
- Karlberg, A.-T., Bohlinder, K., Boman, A., Hacksell, U., Hermansson, J., Jacobsson, S., Nilsson, J. L. G., J** (1988). *Pharm. Pharmacol.* 40, 42 – 47.
- Karlberg, A.-T., G_fvert, E.**, *Contact Derm.* 1996, 35, 201 – 207.
- Keeling C.I., Bohlmann K.J.** (2006). Diterpene resin in conifers. *Phytochemistry*; 67(22): 2415– 2423
- Keira, T. Aizawa, Y. Karube, H. Niituya, H. Shinohara, S Kuwashima, A H. Harada and T. Takata**, (1997) *Ind. Health*, 35, 1.
- Kim, Jo-Chun** (2000), Factors Controlling Natural VOC Emissions in a Southeastern US Pine Forest
- Kossuth, S.V., McCall, E., Ledbetter, J.** (1988). Clone certification by use of cortical monoterpenes as biochemical markers. *Silvae Genet.*, 37, 73–76.
- Kovats, E.** (1958) Gas chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. I. Retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helv. Chim. Acta*, 41: 1915-1932
- Kuroda, K. and Shimaji, K.** (1983) Traumatic resin canal formation as a marker of xylem growth. *Forest Sci.*, 29: 653-659.
- Lang, K. J.** (1994). *Abies alba* Mill.: Differentiation of provenances and provenance groups by the monoterpene patterns in the cortex resin of twigs. *Biochem. System. Ecol.*, 22, 53–63.
- Langenheim, J.H.** (1994) Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, 20: 1223-1280.
- Lewinsohn, E., Gijzen, M. and Croteau, R.** (1991). Defense Mechanisms of Conifers : Differences in Constitutive and Wound-Induced Monoterpene Biosynthesis Among Species. *Plant Physiol*, 96: 44-49.
- Liang-Yu Chen, Chien-Wei Cheng, Ji-Yuan Liang,,** (2015) Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols, *Food Chemistry, Volume 170, 1 March, Pages 10–15.*
- Liu, X., Xin, W. Zhang, J. ,Bioresour.** (2010) *Technol.* 101, 2520-2524.
- Llusia, J., Penuelas, J., Gimeno, B. S.,** (2002), Seasonal and Species-Specific Response of VOC Emissions by Mediterranean Woody Plant to Elevated Ozone Concentrations

Lü, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.14, 840–860.

Luong, J. H. T., Rigby, T., Male, K. B. Bouvrette, P., (1999) *Electrophoresis*, 20, 1546-1554.

Macchioni, F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S. and Ansaldi, M. (2003) Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Fragr. J.*, 18: 139-143.

Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis AL, Chinou IB, Mitaku S., (1999) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia.*, *Planta Med.* Dec;65(8):749-52.

Mandaogade, P. M., Satturwar, P. M., Fulzele, S. V., Gogte, B. B. Dorle, A. K., (2002) *React. Funct. Polym.* 50, 233-242.

Mantle, D., Anderton, J., Falkous, G., Barnes, M., Jones, P., Perry, E. (1998) Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B121, pp. 385–391.

McKeon Louise (2014) Characterisation and determination of rosin compositions

Mergen, F. (1955). Grafting slash pine in the field and in the greenhouse. *Jour. For.* 58: 836-842.

Meullemiestre, A. Kamal, I., Maache-Rezzoug, Z., Chemat, F., Rezzoug, S. A. (2013) Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Oils Extracted from *Pinus pinaster* Sawdust Waste. Screening of Different Innovative Isolation Techniques. *Waste Biomass Valor* April

Minami, T., Wada, S., Tokuda, H., Tanabe, G., Muraoka, O. and Tanaka, R. (2002) Potential antitumor-promoting diterpenes from the cones of *Pinus luchuensis*. *J. at. Prod.*, 65: 1921-1923.

Mirov, N. T., Iloff, P. M. (1955). Chemical composition of gum turpentine. XXIII, A Report on Three Mediterranean Species: *Pinus pinea* (cultivated in California), *P. halepensis* (from Israel) and *P. brutia* (from Cyprus). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 186-189.

Mitani, K., Fujioka, M., Uchida, A., Kataoka, H. (2007) Analysis of abietic acid and dehydroabietic acid in food samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. School of Pharmacy, Shujitsu University, Nishigawara, Okayama 703-8516, Japan. *Journal of Chromatography A*, 1146 (2007) 61–66

Mitsopoulos, D.J. (1987) Variation in turpentine content of Aleppo pine oleoresin. *Holzforschung*, 39: 94-97.

Nahal I. (1983). Le pin brutia (*Pinus brutia* Ten. Subsp. *brutia*), *Premeiere partie. Foret Mediterraneeenne*, 5 : 165-172.

Nicolet Instrument Corporation, Raman Accessory User's Guide, Magna IR.

Nilsson, N. Berglund, F. Lindahl, S. Axelsson, T. Redeby, Lassen, P., Karlberg, A.-T. (2008) *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 2784.

Nilsson, Ulrika., Berglund, Naghmeh., Lindahl, Fredrik., Axelsson, Sara., Redeby, Theres., Lassen, Pia., Karlberg, Ann-Therese., (2008) SPE and HPLC/UV of resin acids in colophonium containing

Oerke E.C. (1999). CHAPTER 3 – Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. *Crop Production and Crop Protection*; 72 – 301, 304 – 741

Olivares-Pérez, A., Ibarra-Torres, J. C., Ortiz-Gutiérrez, M., Pérez-Cortés, M. Fuentes-Tapia, (2005) *I. Opt. Mater.* 2005, 27, 1825-1831.

Osman Yener, H. Saadet D. Saygideger, Sarikurkcu, Cengiz ., Yumrutas, Onder. (2014) Evaluation of Antioxidant Activities of Essential Oils and Methanol Extracts of *Pinus* Species. *TEOP* 17 (2) pp 295 - 302

Ozaki, A. Yamaguchi, Y. Fujita, T. Kuroda, K. Endo, G. (2005) *Food Addit. Contam.* 22 1053.

Papaioannou, I. and Megalophonos, K. (1966). Effect of the height of face, of the method, and time of turpentinizing and of the underwood on the resin flow of *Pinus halepensis* Mill. VI. World Congress, Madrid, vol. III: 3508-3517.

Papajannopoulos, A.D., Song, Z.Q., Liang, Z.Q. and Spanos, J.A. (2001) GC-MS analysis of oleoresin of three Greek pine species. *Holz Roh- Werkstoff*, 59: 443-446.

Parker F., (1983) “Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman spectroscopy in Biochemistry”, Chapter 1, Plenum Press, New York,.

Pecksok R, L. Shields, T. Cairns, I. G. McWilliam, 'Σύγχρονες μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση', Απόδοση στα ελληνικά: Σ. Βολιώτης, 2η έκδοση (Αθήνα, 1980), Εκδόσεις Γ. Α. Πνευματικός.

Penuelas, J., Llusia, J., Gimeno, B. S. (1998), Effects of Ozone Concentrations on Biogenic Volatile Organic Compounds Emission in the Mediterranean Region

Perkin Elmer, FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)

Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 237-243.

Prior, R., Wu, X., Schaich, K., (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 4290 – 4302.

Prinz, U. Müllner, J. Heilmann, K. Winkelmann, O. Sticher, E. Haslinger and A. Hübner, J. Nat. Prod., (2002), 65, 1530.

Prior R.L., X. Wu, K. Schaich, (2005), Standardized methods for the determination of Chemistry, 53 antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agriculture and Food* (10) pp. 4290–4302.

Products. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2784 – 2790

Pureswaran, D. S., Gries, R., Borden, J. H., (2004). Quantitative variation in monoterpenes in four species of conifers. *Biochem. System. Ecol.* 32, 1109–1136.

Quezel, P. (1985) Les Pins du Groupe “Halepensis”. *Ecologie, Vegetation, Ecophysiologie.* In: Le pin d'Alep et le pin brutia dans la sylviculture mediterraneenne, CIHEAM, Paris, pp. 11-23

Raffa, K.F., Phillips, T.W., Salom, S.M. (1993). Strategies and mechanisms of the host colonization by bark beetles. In: Schowalter. T.D., Filip, G. (Eds.), *Beetle-Pathogen Interactions on Conifer Forest.* Academic Press. London, pp: 103-128.

Reid, R.W., Whitney, H.S. and Watson, J.A. (1987) Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungi. *Can. J. Bot.*, 45: 1115-1126.

Roussis, V., Petrakis, P.V., Ortiz, A. and Mazomenos, B.E. (1995) Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*, 39: 357-361.

Roussis, Vassilios., Petrakis, Panos., Ortiz, Antonio., Mazomenos, Basillis. (1994) Volatile Constituents Of Needles Of Five Pinus Species Grown In Greece. *Phytochemistry*, Vol. 39, No. 2, pp. 357-361, 1995

Sadhra, S., Gray, C. N. Foulds, I. S. ,J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. (1997), 700, 101-110.

Sadou, Nina., Seridi, Ratiba., Djahoudi, Abdelghani ., Hadeef, Youcef. (2015) Chemical composition and antibacterial activity of the needles essential oil of *Pinus halepensis* Mill. from north east of Algeria. *Rev. Sci. Technol., Synthèse 30: 33-39 (2015)*

Saleh, M., Clark, S., Woodart, B., Deolu-Sobogun, (2010) Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Essential Oils, *Ethnicity and Disease*, S1-78 – S1-82.

Salem, Mohamed., Ali, Hayssam., Basalah, Mohammed. Essential Oils from Wood, Bark, and Needles of *Pinus roxburghii* Sarg. From Alexandria, Egypt: Antibacterial and Antioxidant Activities. *BioResources 9(4)*, 7454-7466.

Santos, A. M., Vasconcelos, T., Mateus, E., Farrall, M .H., Gomes da Silva, M. D. R., Paiva, M. R., Branco, M. (2006). Characterization of the volatile fraction emitted by phloems of four pinus species by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1105, 191–198.

Sarvmeili, Najmeh., Jafarian-Dehkordi, Abbas., Zolfaghari, Behzad. Cytotoxic effects of *Pinus eldarica* essential oil and extracts on HeLa

Schiller, G. and Grunwald, C. (1987a) Resin monoterpenes in wide-range provenance trials of *Pinus halepensis* Mill. in Israel. *Silvae Genetica*, 36: 109-114.

Schiller, G. and Grunwald, C. (1987b) Cortex resin monoterpene composition in *Pinus brutia* provenances grown in Israel. *Biochem. System. Ecol.*, 15: 389-394.

Schopmeyer, C.S. (1953). The characteristics of a high-gum-yielding tree. Southeastern Forest Experiment Station. Research Notes No. 39 : 2.

Schopmeyer, C.S. (1957). Diagnostic techniques for the selection of slash pines having high yields of oleoresin. *Der Züchter*, 4. Sonderheft, 88.

Schulz, Hartwig, Baranska, Malgorzata (2006) Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43 (2007) 13–25

Schulz, Hartwig, Ozkan, Gulcan, Baranska, Malgorzata, Kruger, Hans, Ozcan, Musa, (2005) Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 39 (2005) 249–256

Schwarz K., Frankel E.N., German J.B., (1996) Partition behaviour of antioxidative phenolic compounds in heterophasic systems, *Lipid / Fett*, Volume 98, Issue 3, pages 115–121.

Sebastian E.W. Opitz, Samo Smrke, Bernard A. Goodman, Chahan Yeretjian, (2014) Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays, *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, Pages 253–264.

Severson, R. F., Schuller, W. H., and Lawrence, R. V., (1972) Pyrolyses of certain resin acid at 800°C, *J. Chem. Eng. Data*, 17(2) 250-252.

Shain, L. (1967) Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*. *Phytopathol.*, 57: 1034-1045.

Shimaji, K. and Nagatsuka, Y. (1971) Pursuit of the time sequence of annual ring formation in Japanese fir (*Abies firma* Sieb. et Zucc.). *J. Jpn. Wood Res. Soc.*, 17: 122-128.

Shrimpton, D.M. (1973) Extractives associated with wound response to lodgepole pine attacked by the mountain pine beetle and associated microorganisms. *Can. J. Bot.*, 51: 527-534.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1998) Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteu reagent *Methods of Enzymology*, 299, 152-178.

Skoog, D. A., Holler, J. F., Nieman, T. A. (2002). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης. 5η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα.

Skotti Efstathia, Eirini Anastasaki, Georgia Kanellou, Moschos Polissiou, Petros A. Tarantilis (2014) Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek.

Smith, C. R. Bowerbank, P. B. Savage, D. B. Drown, M. L. Lee, W. Alexander, W. Jederberg and K. Still, Appl. Occup. Environ. Hyg., (1999), 14, 171.

Smith, P. A., Son, P. S., Callaghan, P. M., Jederberg, W. W., Kuhlmann, K. Still, K. R., Toxicology (1996), 111, 225-238.

Smith, R.H. (1966) Resin quality as a factor to the resistance of pines to bark beetles. In: *Breeding Pest-Resistant Trees*. H.Gerhold, R. McDermoyy, E. Schreiner, J. Winieski(eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 189-196.

Söderberg, T.A. Johansson, A. R. Toxicol. 107 (1996) 99.

Souto, J. C., Yustos, P., Ladero, M. Garcia-Ochoa, F. ,Bioresour. Technol. (2011), 102, 3504-3511.

Squillace, A.E. and Fisher G.S. (1966). Evidences of the inheritance of turpentine composition in slash pine. U.S.F.S. Res. Pap. NC-6 : 53-59

Sunzel, B. Söderberg, A. Reuterving, O. Hallmans, G. Holm, E. Hänsröm, L. Biol. Trace Elem. Res. 31 (1991) 33.

Tadesse, W., Nanos N., Aunon F.J., Arrabal C., Garcia C., Gil L., Alia R., Pardos A. (2001). Genetic improvement of resin yield from maritime pine in Spain. *Forest Chemicals Review* Jan-Feb. : 10-16

Teixeira, B. et al, (2013) Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils, *Industrial Crops and Products*, 43, pp. 587-595.

Thanos. , (1978), US 4105462, US 4105462, Non-crystallizing rosin

Toivola, D.M. Isomaa, B. Chem. Biol. Interact. 79 (1991) 65.

Tsanaktsidis, C.G., Scaltsoyiannes, A. V., Katsidi, E.X., Christidis, S.G., Tzilantonis, G.T., (2014). Use of Natural Resin to Reduce Water Content in Diesel Fuel. *Chem. Technol. Fuels Oils* 49, 497–501.

Ulukanli, Zeynep., Karabörklü, Salih., Bozok, Fuat., Ates, Burhan., Erdogan, Selim., Cenet, Menderes., Karaaslan, Merve Göksin (2014) Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2014, 12(12): 0901–0910 using analytical approaches. School of chemical sciences, Dublin City University

Valtcho D. Zheljzakov, (2012) Distillation Time Changes Oregano Essential Oil Yields and Composition but Not the Antioxidant or Antimicrobial Activities, *HORT SCIENCE* 47(6):777–784.

Verlet, N. (1993) Commercial aspects. In: *Volatile Oil Crops: Their Biology Biochemistry and Production.* (eds. R.K.M. Hay and P.G. Waterman), Longman Scientific and Technical, Essex, UK, pp. 137-174.

Verlet, N. (1993) Commercial aspects. In: *Volatile Oil Crops: Their Biology Biochemistry and Production.* (eds. R.K.M. Hay and P.G. Waterman), Longman Scientific and Technical, Essex, UK, pp. 137-174.

Wildy D.T., Pate J.S., Bartle J.R. (2000). Variations in composition and yield of leaf oils from alley-farmed oil mallees (*Eucalyptus* spp.) at a range of contrasting sites in the Western Australian wheatbelt. *Forest Ecology and Management*; 134(1-3): 205 – 217

Wilson, L. A. (2003). Use of spices in the food industry, *Spices and flavouring crops.* Encyclopedia of food sciences and nutrition-second edition-vol.9, Academic press, 5460-5465.

Wright, J.W. (1976). Introduction to Forest Genetics. New York, San Francisco, London. 111 121

Yamada, A., Ezaki, Y., Matsuo, K., Yarita, T. Nomura, A. ,J. Chromatogr. A. (1995), 709, 345-349.

Yang, X. Zhao, H. T., Wang, J., Meng, Q., Zhang, H., Yao, L., Zhang, Y. C., Dong, A. J., Ma, Y., Wang, Z. Y., Xu, D. C., Ding, Y. (2010) Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of pine cones of *Pinus armandii* from the Southwest region of China. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(16), pp. 1668-1672, 18 August

Yesil-Celiktas, Ozlem., Ganzera, Markus., Akgun, Ismail., Sevimli, Canan., Korkmaza, Kemal S., Bedir, Erdal. (2009) Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *Wiley Interscience*, 5 March

Zahra F. Baher, Mehdi Mirza, Mahlega Ghorbanli and Mohamad Bagher Rezaii, (2002) The influence of water stress on plant height, herbal and essential oil yield and composition in *Satureja hortensis* L., *Flavour Fragr. J.* 17: 275–277

Zeng, Wei-Cai., Zhang, Zeng., Gao, Hong., Jia, Li-Rong., He, Qiang. (2012) Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*). *Journal of Food Science* Vol. 77, Nr. 7

Zinkel, D. F. Russell, J. (1989), Naval Stores; Production, Chemistry, Utilization, Pulp Chemicals Association, New York.

Zinkel, D.F., (1975). Naval stores: Sylvichemicals from pine. Applied Polymer Symposium. 28: 309-327.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αθανασιάδης, Ν.Η. (1986) Δασική Βοτανική: Δέντρα και θάμνοι των δασών της Ελλάδος II. Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ. 17-19.

Αναστασάκη Ειρήνη, (2014) «Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της Μεσογειακής χλωρίδας. Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας», Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Χημείας.

Βάρβογλης, Γ., Αλεξάνδρου, Ν. (1970). Οργανική Χημεία.

Δαμιανός, Κ.Β., (1933). Ρητίνη και παράγωγα. Αθήνα. Αυτοτελής έκδοση.

Δαφέρερα Δήμητρα, (2003) Παραλαβή, ανάλυση με χρωματογραφικές-φασματοσκοπικές μεθόδους και βιολογική δράση αιθερίων ελαίων αρωματικών φυτών. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών Γενικό Τμήμα Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Καμίτσος Ε. Ι. & Γ. Δ. Χρυσικός ‘Φασματοσκοπική ταυτοποίηση φαρμακευτικών ουσιών και εκδόχων. Βιομηχανική εφαρμογή φασματοσκοπίας ATR’, Εργαστήριο φασματοσκοπικών εφαρμογών Ινστιτούτου Θεωρητικής & Φυσικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Τεχνική Αναφορά ΤΔ003.01.

Καρανίκας, Χριστόφορος. (2008). Επιλογή και βιοχημική (ισοενζυμική) ανάλυση υψηλοαποδοτικών για ρητίνη γενοτύπων χαλεπίου πεύκης (*Pinus halepensis Mill.*) - Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ρητίνης. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Δασικής Γενετικής και Βελτίωσης Δασοπονικών Ειδών.

Καρανίκας, Χριστόφορος. Μήτρας, Δημήτριος. Τσακτσίρα, Μαρία. Απόστολος, Σκαλτσογιάννης. (2010) Ισοενζυμική ανάλυση επιλεγμένων ατόμων χαλεπίου πεύκης (*Pinus halepensis Mill.*) για παραγωγή ρητίνης και εφαρμογή μοριακών δεικτών για την ταυτοποίησή τους. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Δασικής Γενετικής και Βελτίωσης Δασοπονικών Ειδών.

Καραολάνογλου, Α. και Κούκιος Ε., (2002). Νέα προϊόντα από ρητίνη ξύλου. Ημερίδα Καινοτομικά Προϊόντα Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας από Ρητίνη του Πεύκου. Ε.Μ.Π. Πολυτεχνειούπολη.

Μουλαλής, Α. (1981). Ποικιλότητα στην ρητινοπαραγωγή της χαλεπίου πεύκης στην Κασσάνδρα Χαλκιδικής. Επιστημονική Επετηρίδα της Γεωπονικής και Δασολογικής Σχολής. Τόμος – Αφιέρωμα προς τιμήν του ομότιμου καθηγητή Χρ. Σπ. Μουλόπουλου, Α.Π.Θ., Τόμος ΚΔ', Αρ. 19.

Μπέτζιος, Β. (1978). Συμβολή εις την μελέτην του ρητινίτου οίνου. Διατριβή επί διδακτορία, Ανωτ. Γεωπ. Σχολή Αθηνών.

Ντάφης, Σ.Α. (1987) Οικολογία των δασών χαλεπίου και τραχείας πεύκης. Δάση χαλεπίου και τραχείας πεύκης. Ελληνική ιασολογική Εταιρεία, Πρακτ. Επιστ. Συνάντησης Χαλκίδας, Θεσσαλονίκη, σελ. 17-25.

Οικονόμου, Α. (1987) Τα δάση χαλεπίου πεύκης της Κασσάνδρας. γάση χαλεπίου και τραχείας πεύκης. Ελληνική ιασολογική Εταιρεία, Πρακτ. Επιστ. Συνάντησης Χαλκίδας, Θεσσαλονίκη, σελ.134-138.

Παπαδημητρακόπουλος, Δ., (1991). Φυσική ρητίνη πεύκου: Μια ελληνική πρώτη ύλη με ιστορικό παρελθόν, βιομηχανικό παρών και ερευνητικό μέλλον. 3ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Χρωμάτων, Αθήνα.

Παπαϊωάννου, Ι.Κ. (1935) Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis* Mill.), η πεύκη πιτυούντος (*P. pithyusa* Stev.) και η τραχεία πεύκη (*P. brutia* Ten.) εν Ελλάδι. Γραφείον Εκδόσεων, Αθήναι.

Παπαιωάννου, Ι.Κ. (1935). Η χαλέπιος πεύκη (*Pinus halepensis* Mill.), η πεύκη πιτυούντος (*P. Pithyusa* Stev.) και η τραχεία πεύκη (*P. brutia* Ten.) εν Ελλάδι. Γραφείον Εκδόσεων, Αθήναι.

Παππάς Χρήστος (2013). Αυτοματοποιημένες Μέθοδοι Ανάλυση Φυσικών Προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Πετειναράκης, Ι.Χ., Κάββουρας, Π.Κ. και Σάμιος, Γ. (2002) Ποιότητα ρητίνης χαλεπίου πεύκης προέλευσης Βόρειας Εύβοιας και προϊόντων πρώτης επεξεργασίας αυτής. Δασική Έρευνα, 15: 61-70.

Σαρλής, Γ. (1994). Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Σουλελής Χ., Φαρμακογνωσία, Θεσσαλονίκη 2000, ISBN: 960-317-052-6

Στεφανόπουλος, Ο. (1976). Ο ρητινίτης οίνος. Επιστημονική επετηρίδα, Τόμος 5, Τεύχος 1, Ανωτ. Βιομηχ. Σχολή Θεσσαλονίκης.

στη Χαλκιδική. Επιστ. Επετ. Τμ. Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος ΚΓ

Τσουμής, Γ. Θ. (1978). Συγκομιδή Δασικών Προϊόντων. Θεσσαλονίκη. Σελ.: 135- 152.

Τσουμής, Γ.Θ. (1969) Πρόοδοι και προβλήματα εις την παραγωγήν ρητίνης εκ των Ελληνικών δασών. Δασικά Χρονικά, 132: 8-15.

Τσουμής, Γ.Θ. και Βουλγαρίδης, Η. (1980). Πειραματική ρητίνευση χαλεπίου πεύκης

Φιλίππου, Ι.Α. (1986) Χημεία και Χημική Τεχνολογία του Ξύλου. Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.

Φιλίππου, Ι.Α. (1986). Χημεία και χημική τεχνολογία του ξύλου. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη. Σελ. 319-337.