

### **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ** ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ **«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

### ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ ΜΕ ΔΕΥΤΕΡΙΟ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Δομική, Κινητική και Θερμοδυναμική προσέγγιση με NMR



Χαλκίδου Φωτεινή Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

Copyright  $\ensuremath{\mathbb{C}}$  2017 Foteini Chalkidou. All Rights Reserved.

# ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ ΜΕ ΔΕΥΤΕΡΙΟ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Δομική, Κινητική και Θερμοδυναμική προσέγγιση με NMR

υπό

Φωτεινή Χαλκίδου

Μεταπτυχιακή Εργασία

υποβληθείσα για την εκπλήρωση των προϋποθέσεων απονομής

Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης (ΜΔΕ)

του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

2017

© Χαλκίδου Φωτεινή



### Ο Επιβλέπων:

Καθηγητής του Τμήματος Χημείας **Γεροθανάσης Π. Ιωάννης** 

## Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

**Γεροθανάσης Π. Ιωάννης**, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής

Τζάκος Γ. Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας



## Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιωάννη Π. Γεροθανάση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Κύριο Ιωάννη Γεροθανάση, για την ανάθεση του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, για την συνεχή επίβλεψη, καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις εύστοχες υποδείξεις, το ενδιαφέρον του, για την προθυμία του να βοηθήσει σε κάθε μου απορία καθώς και για την επιστημονική κατάρτιση και το επιστημονικό ήθος που μου δίδαξε.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπ. Καθηγητή κ. Σίσκο Μιχάλη για την άμεση συνεργασία και καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές, τις υποδείξεις και την ανεκτίμητη γνώση που μου προσέφερε.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Επ. Καθ. Ανδρέα Τζάκο του Τμήματος Χημείας και την Αν. Καθ. Ελένη Μπαϊρακτάρη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις υποδείξεις και διορθώσεις που πρότειναν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Ευχαριστώ θερμά την αγαπημένη συνεργάτη Δρ. Αλεξάνδρα Πριμηκύρη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας, την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Τσιαφούλη Κωνσταντίνο και Ελένη Αλεξανδρή για την συνεργασία μας, καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Αντώνη Τσιαϊλάνη, Χρήστο Χατζηγιάννη, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Ρένο Βρέττο και Δημήτρη Διαμαντή για το φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τον καλό μου φίλο Λάμπρο Σιώζο και την καλή μου φίλη και συνάδελφο Λουρίδα Ειρήνη που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και μου στάθηκαν σε κάθε δυσκολία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου, Έφη και Χρήστο, τον δεύτερο πατέρα μου Στέλιο καθώς και την αγαπημένη μου γιαγιά Σοφία και τον αδερφό μου Στέλιο, για την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ήταν οι άνθρωποι που με ενθάρρυναν να ακολουθήσω τα ενδιαφέροντά μου και στάθηκαν δίπλα μου παρέχοντας ηθική και υλική βοήθεια επιτρέποντάς μου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου. Σ' αυτούς αφιερώνω τη διατριβή με όλη μου την αγάπη.

# Περιεχόμενα

El	ΕΙΣΑΓΩΓΗ						
10	ο Κεφ	άλαιο – Κατάλυση -ΚΙΕ17					
	1.1	Πράσινη Χημεία					
	1.2	Κατάλυση17					
	1.3	Καταλύτης18					
	1.4	Ομογενής και ετερογενής κατάλυση18					
	1.5	Κατάλυση με Νερό					
	1.6	Κατάλυση σε διαλύματα οξέων/βάσεων/ταυτόχρονη οξεοβασική19					
	1.7	Κατάλυση δευτερίωσης αρωματικών υποστρωμάτων σε διαλύματα οξέων και βάσεων20					
	1.8	Κινητικό Ισοτοπικό Φαινόμενο21					
	1.9	Δευτερίωση Αρωματικών υποστρωμάτων-Κατάλυση με Οξέα23					
	1.10	Δευτερίωση αρωματικών υποστρωμάτων – κατάλυση σε βασικές συνθήκες25					
	1.11	Δευτερίωση Οργανικών Υποστρωμάτων - Κατάλυση με Μέταλλο					
	1.12	Καταλυόμενη από Pd <i>ortho</i> - επιλεκτική δευτερίωση αρωματικών υδρογονανθράκων					
	1.13	Αξιολόγηση της κατάλυσης με Pd/H2 στην ανταλλαγή H/D30					
20	ο Κεφ	άλαιο – Θεωρία του NMR31					
	2.1	Το Δευτέριο-Ιστορική αναδρομή31					
	2.2	Το Τρίτιο-Ιστορική αναδρομή31					
	2.3	Αρχές της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)32					
	2.4	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού με παλμική τεχνική μετασχηματισμού Fourier					
	2.5	Φασματοσκοπία μιας διάστασης 1D $^{1}$ H NMR37					
	2.6	Σύζευξη σπιν – σπιν					
	2.7	Σύζευξη σπιν – σπιν ενός δεσμού					
	2.8	Σύζευξη σπιν – σπιν δύο δεσμών (δίδυμη σύζευξη)41					
	2.9	Σύζευξη σπιν - σπιν τριών δεσμών (γειτονική σύζευξη)43					
	2.10	Εξάρτηση της γειτονικής σύζευξης από τη δίεδρη γωνία φ43					
	2.11	Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D) μέσω απλού κβάντου ${}^{1}$ H- ${}^{13}$ C (Heteronuclear Single Quantum Corelation, HSQC ${}^{1}$ H- ${}^{13}$ C NMR)45					
	2.12	Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D) μέσω πολλαπλών δεσμών <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C (Heteronuclear Multiple Bond Correlation <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC NMR)46					
	2.13	Ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D) μέσω του Φαινομένου NOE <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H					

2.1	4 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης υποκαταστατών στον υποδοχέα με χρήση NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR)48							
2.1	5 Εφαρμογή της φασματοσκοπικής τεχνικής NMR σε κινητικές και θερμοδυναμικές μελέτες50							
30 Ka	<b>3ο Κεφάλαιο – Βασικές αρχές κινητικής</b> 53							
3.1	Ο Νόμος Ταχύτητας μιας αντίδρασης53							
3.2	Εξίσωση Arrhenius60							
3.3	Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius62							
3.4	Εξίσωση Eyring63							
3.5	Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring66							
3.6	ο Ab Initio Υπολογισμοί67							
<b>4ο Κεφάλαιο - Φλαβονοειδή</b> 69								
4.1	Φλαβονοειδή69							
4.2	Υποκατηγορίες φλαβονοειδών69							
4.3	Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φλαβονοειδών							
4.4	Βιοσυνθετική πορεία φλαβονοειδών74							
4.5	Σ Χημική δομή των φλαβονοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό							
4.6	ο Πρόσδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος							
4.7	΄ Βιολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών							
4.8	β Άμεση αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών							
4.9	Βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών και πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων77							
4.1	.0 Βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών, πρόληψη διαβήτη							
4.1	1 Βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών, πρόληψη του καρκίνου							
4.1	2 Βιολογικές ιδιότητες του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη							
ПЕІР	ΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ							
50 Ka	φάλαιο-Σκοπός του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (ΜΔΕ)83							
60 Ka	ε <b>φάλαιο – Οργανολογία - Μέθοδοι</b> 85							
6.1	. Πρότυπες ενώσεις85							
6.2	85							
6.3	διαλύτες85							
6.4	Οργανολογία – Λογισμικά85							
6.5	Μέθοδοι δομικής μελέτης φλαβονοειδών σε δευτεριωμένους διαλύτες86							
6.6	Μέθοδος διαπίστωσης ανταλλαγής των πρωτονίων 2, 4 και 6 του μορίου της ρεζορκινόλης							
6.7	΄ Μέθοδος κινητικής μελέτης της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 του μορίου της ταξιφολίνης87							

6.8	Μέθοδος θερμοδυναμικής μελέτης της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 του μορίου της ταξιφολίνης						
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ							
7ο Κεφ	7ο Κεφάλαιο – Δομικές Μελέτες93						
7.1	Δομικές μελέτες φλαβονοειδών με φασματοσκοπία NMR93						
7.2	Ταυτοποίηση ταξιφολίνης με φασματοσκοπία 1D <sup>1</sup> H και 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC, <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC NMR						
7.3	Ταυτοποίηση της ναρινγενίνης με φασματοσκοπία 1D $^{1}$ H και 2D $^{1}$ H- $^{13}$ C HSQC, $^{1}$ H- $^{13}$ C HMBC NMR						
7.4	Ταυτοποίηση εριοδικτυόλης με φασματοσκοπία 1D <sup>1</sup> H και 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HSQC, <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC NMR						
7.5	Δομική μελέτη της ταξιφολίνης με φασματοσκοπία 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY NMR109						
7.6	Δομική μελέτη της ταξιφολίνης με τη χρήση θεωρητικών υπολογισμών density functional theory (DFT)						
7.7	Δομική μελέτη της ναρινγενίνης με φασματοσκοπία 2D <sup>1</sup> Η- <sup>1</sup> Η NOESY NMR118						
7.8	Δομική μελέτη της εριοδικτυόλης με φασματοσκοπία 2D $^1$ H- $^1$ H NOESY NMR 121						
7.9	Μελέτη αλληλεπίδρασης της ταξιφολίνης με την πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA) με φασματοσκοπία STD NMR124						
80 Kɛd	φάλαιο – Κινητικές Μελέτες						
8.1	Μελέτη κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων στο μόριο της ταξιφολίνης						
90 Kɛd	<b>9ο Κεφάλαιο – Θερμοδυναμικές Μελέτες</b> 151						
9.1	Θερμοδυναμική Μελέτη της αντίδρασης ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων στο μόριο της ταξιφολίνης – Εξίσωση Arrhenius151						
9.2	Θερμοδυναμική μελέτη της αντίδρασης ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων στο μόριο της ταξιφολίνης – Εξίσωση Eyring156						
9.3	Θεωρητικοί υπολογισμοί DFT, με τις μεθόδους B3LYP/6-31G+d και M06-2X/6- 31G+d. Πραγματοποιήθηκαν από τον Αν. Καθηγητή του τμήματος Χημείας Σίσκο Μιχαήλ						
10ο Συμπεράσματα Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης							
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ							



# Περίληψη

Η παρούσα διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης (ΜΔΕ) διαπραγματεύεται τα ακόλουθα:

Στο 1° Κεφάλαιο παρουσιάζεται η βιβλιογραφική έρευνα που αφορά τις ήδη υπάρχουσες μεθόδους κατάλυσης αντιδράσεων δευτερίωσης διαφόρων φαινολικού τύπου ουσιών και οργανικών υποστρωμάτων και επεξήγηση του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου (ΚΙΕ). Στο επόμενο κεφάλαιο πραγματοποιείται ανάπτυξη της θεωρίας του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και της θεωρίας των επιμέρους μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία. Σε επόμενο στάδιο γίνεται αναφορά στο δυναμικό NMR, τον Νόμο Ταχύτητας μιας αντίδρασης ενώ ακολουθεί επεξήγηση των εξισώσεων Arrhenius και Εyring η συμβολή των οποίων ήταν σημαντική για την απόδοση των κινητικών και θερμοδυναμικών πειραματικών δεδομένων. Επιπλέον γίνεται αναφορά στους αb initio θεωρητικούς υπολογισμούς. Ακολουθεί βιβλιογραφική έρευνα που αφορά τα φλαβονοειδή, τις επιμέρους κατηγορίες και τον σημαντικό ρόλο που έχουν στην υγεία του ανθρώπου.

Η επόμενη ενότητα αποτελεί το πειραματικό μέρος, στο οποίο αναγράφεται ο σκοπός του Μ.Δ.Ε., τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για τη διεκπεραίωση αυτών.

Στην τρίτη ενότητα λαμβάνει χώρα η ανάλυση και η συζήτηση του συνόλου των δομικών, κινητικών, θερμοδυναμικών αποτελεσμάτων, καθώς και αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης της ταξιφολίνης με BSA.

Τέλος, δίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός που απορρέει από τα πειραματικά και τα θεωρητικά δεδομένα.

## **Summary**

The objective of this MSc thesis is the investigation, with the use of proton NMR spectroscopy, of the catalytic role of  $H_2O$  in the direct activation of aromatic C– H bonds without the use of late transmission metals. H/D exchange reactions, as monitored by <sup>1</sup>H NMR, were achieved with the use of D<sub>2</sub>O and common phosphate buffer at neutral pH and near ambient temperatures. The unique catalytic role of  $H_2O$ , through keto-enol tautomerization, was demonstrated with DFT theoretical calculations.

Specifically, taxifoline, naringenin and eriodictyol were structurally characterized with the use of 1D <sup>1</sup>H, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 1H-<sup>13</sup>C HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR spectroscopy and DFT theoretical calculations. The structural data of taxifolin were compared with the single crystal X-ray structure. Taxifolin – bovine serum albumin (BSA) complex was studied by the use of STD and tr-NOESY NMR spectroscopy.

Detailed studies of Taxifolin's C-6 and C-8 H/D exchange reaction was kinetically and thermodynamically studied by using 1D <sup>1</sup>H NMR, in various temperatures (10-55 °C), pD=7.6 & 9.6 and phosphate buffer solution (2.5mM, 25mM, 50mM, special value 1M). The experimental results were confirmed by DFT theoretical calculations. The results of the thermodynamic approach in combination with the DFT theoretical values clearly demonstrate the unique catalytic role of water. As a result a new molecular mechanism was proposed.

# Εισαγωγή

Η αντίδραση υποκατάστασης του υδρογόνου από δευτέριο και κατ επέκταση από τρίτιο, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον διότι οι επισημασμένες με δευτέριο ενώσεις χρησιμοποιούνται σε πληθώρα επιστημονικών τομέων. Είναι απαραίτητες ως υλικά αναφοράς στη φασματοσκοπία μάζας, καθώς και σε φαρμακοκινητικές και μεταβολικές μελέτες στα πλαίσια της ανάπτυξης φαρμάκων. Ιδιαίτερα στην περίπτωση που η συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνει χώρα σε π-αρωματικό σύστημα είναι ακόμη μεγαλύτερη η ανάγκη εύρεσης της μηχανιστικής πορείας καθώς και της καταλυτικής δράσης που τελείται κατά τη διάρκεια του φαινομένου, δεδομένου ότι τα αρωματικά πρωτόνια είναι αδύνατο να ανταλλάσσονται (Crabtree 2004; Pony Yu et al. 2016; Ribas et al. 2010; Simmons and Hartwig 2012; Siskin and Katritzky 2001).

## 1ο Κεφάλαιο - Κατάλυση -ΚΙΕ

#### 1.1 Πράσινη Χημεία.

Η Πράσινη Χημεία (Green Chemistry) έκανε την εμφάνιση της στον επιστημονικό χώρο στα τέλη του 20<sub>ου</sub> αιώνα. Ονομάζεται και Βιώσιμη Χημεία (Sustainable Chemistry) έχει όμως επικρατήσει ο όρος Πράσινη Χημεία, ο οποίος δόθηκε από τον Paul Anastas το 1990. Ο ακριβής ορισμός που έδωσε είναι ο εξής: «Πράσινη Χημεία είναι η χρησιμοποίηση ενός συνόλου αρχών με την εφαρμογή των οποίων μειώνεται ή εξαλείφεται η χρήση ή η δημιουργία επικίνδυνων ουσιών στις διεργασίες σχεδιασμού, παραγωγής και εφαρμογής των χημικών προϊόντων» (P T Anastas and Warner 1998).

Παρά τα μεγάλα οφέλη της κοινωνίας από τα επιτεύγματα της Χημείας και της Τεχνολογίας, η αλόγιστη χρήση των χημικών ουσιών, ο τρόπος λειτουργίας της Χημικής Βιομηχανίας και ο τρόπος διάθεσης των αποβλήτων τους, έχουν πολύ συχνά κακές έως και ολέθριες επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον. Ακόμη και χημικές ουσίες οικιακής χρήσης (αστικά απόβλητα), είναι εν πολλοίς καταστροφικές για το περιβάλλον. Η αλόγιστη χρήση των χημικών ουσιών δημιούργησε μεγάλα προβλήματα όπως το φαινόμενο του θερμοκηπίου, το φωτοχημικό νέφος, τη ρύπανση του εδάφους, των υδάτων, και του αέρα, την τρύπα του όζοντος, την καταστροφή διαφόρων οικοσυστημάτων, τα χημικά ατυχήματα, ποικίλες ασθένειες και καρκινογενέσεις, καθώς και την εξάντληση των μη ανανεώσιμων πηγών πρώτων υλών και παραγωγής ενέργειας. Λύση στα παραπάνω προβλήματα πρέπει να μπορεί να δώσει η ίδια η χημεία. Είναι ευθύνη και υποχρέωση όλων των χημικών που απασχολούνται στην έρευνα, στην εκπαίδευση και στη βιομηχανία να αναλάβουν πρωταγωνιστικό ρόλο για την επίλυση των προβλημάτων. Αυτό ξεκίνησε με την εμφάνιση και την ανάπτυξη της Πράσινης και Βιώσιμης Χημείας (Paul T. Anastas and Zimmerman 2007).

#### 1.2 Κατάλυση.

Ο όρος κατάλυση, προτάθηκε το 1835 από τον Jöns Jakob Berzelius (1779-1848). (Wisniak 2010) Αποτελεί κομμάτι της βασικής διεπιστημονικής έρευνας και κατέχει κυρίαρχη θέση στο επίπεδο βιομηχανικών εφαρμογών. Περίπου το 90% της βιομηχανικής παραγωγής χημικών προϊόντων, φαρμακευτικών υλών και υλικών, όπως επίσης το 100% όλων των υγρών καυσίμων επιτελείται με καταλυτικές διεργασίες. Σύμφωνα με μια έκθεση του Οργανισμού Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ) περίπου το 30 - 40% του Ακαθάριστου Εγχώριου Προϊόντος (ΑΕΠ) των ανεπτυγμένων κρατών παράγεται με τη βοήθεια καταλυτικών συστημάτων (Σδούκος and Πομώνης 2010).

#### 1.3 Καταλύτης.

Είναι μια χημική ένωση που επηρεάζει την ταχύτητα και την κατεύθυνση (εκλεκτικότητα) μιας χημικής αντίδρασης και μεταβάλει την ενέργεια ενεργοποίησης, χωρίς να επιφέρει μεταβολή στη θερμοδυναμική ισορροπία της τελευταίας και χωρίς να καταναλώνεται αισθητά η ίδια. Οι καταλύτες ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες :

- Ομογενείς καταλύτες: οι συγκεκριμένοι καταλύτες και τα αντιδρώντα σώματα βρίσκονται στην ίδια φάση (συνήθως υγρή).
- Ετερογενείς καταλύτες: οι καταλύτες αυτοί βρίσκονται σε διαφορετική φάση (συνήθως στη στερεή) από τα αντιδρώντα σώματα (συνήθως υγρά ή αέρια).
- c. Βιολογικοί καταλύτες ή βιοκαταλύτες: οι καταλύτες αυτοί είναι συνήθως ένζυμα τα οποία καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, αλλά πολλές φορές γίνεται χρήση ριβοζύμων, ένζυμα τα οποία αποτελούνται από ριβονουκλεϊκα οξέα (RNA) (Ross 2012; Σδούκος and Πομώνης 2010).

#### 1.4 Ομογενής και ετερογενής κατάλυση.

Η κατάλυση διακρίνεται σε ομογενή και στην ετερογενή με βάση την ομογένεια ή μη των αντιδρώντων και του καταλύτη. Στην ομογενή ο καταλύτης και τα αντιδρώντα βρίσκονται στην ίδια φάση (υγρή φάση). Στην ετερογενή κατάλυση, ο καταλύτης είναι συνήθως στερεό σώμα, ενώ τα αντιδρώντα βρίσκονται στην υγρή ή στην αέρια φάση. Επειδή στην περίπτωση αυτή η αντίδραση διεξάγεται στην επιφάνεια του στερεού, η ετερογενής κατάλυση ονομάζεται και επιφανειακή κατάλυση. Στην ομογενή κατάλυση ο καταλύτης μπορεί να είναι ένα μόριο, ένα ιόν ή ένα σύμπλοκο ιόν, ενώ στην ετερογενή, η καταλυτική δράση εκδηλώνεται σε ορισμένες μόνο θέσεις της καταλυτικής επιφάνειας, τις δραστικές θέσεις, των οποίων η συγκέντρωση, και πολύ περισσότερο η φύση, πολύ δύσκολα προσδιορίζονται. Η αύξηση της ταχύτητας των αντιδράσεων που επιτυγχάνεται με τη χρήση καταλυτών είναι της τάξης των 10<sup>10</sup> (Ross 2012).

#### 1.5 Κατάλυση με Νερό.

Οι περισσότερες οργανικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε πολικούς ή μη πολικούς οργανικούς διαλύτες σύμφωνα με την αρχή ότι «τα όμοια διαλύονται στα όμοια». Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι οργανικοί διαλύτες έχουν την τάση να ενεργοποιούν και να επιδιαλυτώνουν τα αντιδρώντα σώματα. Πλέον στο προσκήνιο εμφανίζεται το νερό ως διαλύτης οργανικών αντιδράσεων, και γι ` αυτόν τον λόγο έχουν ξεκινήσει φυσικοχημικές μελέτες σε αντιδράσεις ομογενούς και ετερογενούς κατάλυσης με νερό (Breslow 1991; Chanda and Fokin 2009; Isley et al. 2015; Jung and Marcus 2007; Lindström and Lindstro 2002; Marx et al. 1998; Narayan et al. 2005; Otto and Engberts 2003).

#### 1.6 Κατάλυση σε διαλύματα οξέων/βάσεων/ταυτόχρονη οξεοβασική.

Η πρωτονιακή κατάλυση ως καταλυτικός κλάδος υπάρχει από το 1850 όταν ο Ludwig Ferdinand Wilhelmy (1812 – 1864) διαπίστωσε ότι η ιμβερτοποίηση της σουκρόζης προς φρουκτόζη και γλυκόζη, επιταχύνεται υπό την παρουσία οξέων (Cook, Sealants, and Wiley 1991).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ομογενούς πρωτονιακής κατάλυσης είναι η κατάλυση με οξέα σε υδατικά διαλύματα. Η καταλυτική, δράση των πρωτονίων, που είναι ο μικρότερος καταλύτης, συνίσταται στο ότι καθιστούν ευκολότερη την απόσπαση ομάδων που περιέχουν Ο, S ή Ν και επομένως το σχηματισμό καρβανιόντων ως ασταθών ενδιαμέσων. Τα οξέα καταλύουν αντιδράσεις, όπως οι αφυδατώσεις αλκοολών προς αλκένια ή αιθέρες, αντιδράσεις προσθήκης ύδατος, αλκοόλης ή R-οξέος σε αλκένια προς σχηματισμό αλκοολών, αιθέρων η εστέρων. Τα οξέα καταλύουν επιπλέον αντιδράσεις πολυμερισμού, ισομερισμού και αλκυλίωσης ολεφινών, αλκυλίωσης αρωματικών υδρογονανθράκων, σκελετικού ισομερισμού και πυρόλυσης παραφινών. Σε πολλές οργανικές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται διάφορες βάσεις ως καταλύτες. Ορισμένα παραδείγματα είναι οι αντιδράσεις συμπύκνωσης, υδρόλυσης οξειδίων προς αλκοόλες και ιωδιώσεις οργανικών μορίων. Στις περιπτώσεις αυτές η αντίδραση ξεκινάει με την απόσπαση πρωτονίου από το οργανικό μόριο εξαιτίας της δράσης του βασικού καταλύτη. Μία αντίδραση μπορεί να καταλυθεί τόσο από οξέα όσο και από βάσεις. Για παράδειγμα η κατάλυση μπορεί να γίνει από ένα οξύ και από τη συζυγή του βάση, όπως συμβαίνει στην αντίδραση ιωδίωσης της ακετόνης με τη χρήση οξέος και της συζυγούς του βάσης ως καταλύτες. Στις περίπτωση αυτή το οξύ και η συζυγής του βάση προσβάλλουν ταυτόχρονα το οργανικό μόριο σε διαφορετικές θέσεις (McMurry 2016).

1.7 Κατάλυση δευτερίωσης αρωματικών υποστρωμάτων σε διαλύματα οξέων και βάσεων.



Εικόνα 1.7.1 Υποκατάσταση αρωματικών πρωτονίων βενζοϊκού δακτυλίου από δευτέριο.

Οι ενώσεις οι οποίες έχουν υποστεί μερική ή πλήρη δευτερίωση παρουσιάζουν μια μικρή διαφοροποίηση στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως μείωση στην υδροφοβικότητα και αλλαγή στην pKa όταν γειτνιάζουν με ιονίζουσες ομάδες. Λόγω του ότι ο δεσμός άνθρακα-δευτερίου είναι ισχυρότερος του δεσμού άνθρακα-υδρογόνου, σπάει πολύ πιο δύσκολα και σε αυτό οφείλεται το γεγονός ότι η ταχύτητα διάσπασης είναι πολύ πιο αργή. Η συσχέτιση της ταχύτητας με την ισχύ του δεσμού ονομάζεται κινητικό ισότοπο φαινόμενο (KIE).

Ο λόγος  $k_H$  /  $k_D$  που εξάγεται από το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο δευτερίωσης, παρέχει πληροφορίες που μας βοηθούν να εξακριβώσουμε τη φύση της μεταβατικής κατάστασης στο στάδιο προσδιορισμού της ταχύτητας της αντίδρασης διάσπασης ενός δεσμού X - Η. Δεδομένου ότι πολλές αντιδράσεις είναι πολλαπλών σταδίων, το παρατηρούμενο κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο δίνει πληροφορίες ως συνδυασμός των επιμέρους ισοτοπικών φαινομένων όλων των σταδίων. Ως εκ τούτου, η κατανόηση του ισοτοπικού φαινομένου κατά την κατάσταση ισορροπίας έχει σημασία για την ερμηνεία της κινητικής της αντίδρασης δευτερίωσης (Gómez-Gallego and Sierra 2011; Simmons and Hartwig 2012).



Εικόνα 1.7.2 Πρωταρχικό Κινητικό Ισοτοπικό Φαινόμενο. (Gómez-Gallego and Sierra 2011)

#### 1.8 Κινητικό Ισοτοπικό Φαινόμενο.

Το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο πηγάζει από δύο θεωρίες. Η πρώτη είναι η κβαντομηχανική εκδοχή και υποστηρίζει ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες και για τις αντιδράσεις που περιλαμβάνουν πολύ ελαφριά άτομα υπάρχουν σήραγγες οι οποίες περνούν μέσα από την καμπύλη του ενεργειακού φράγματος προς σχηματισμό προϊόντων. Προσεγγιστικά για την εξήγηση αυτού ισχύει ο τύπος:

$$P = exp\left[-2\left(\frac{2m(V_0-E)}{h^2}\right)^{1/2}a\right]$$

όπου το p αποτελεί την πιθανότητα διάνοιξης σηράγγων μέσω του ενεργειακού φράγματος.

Από τον τύπο απορρέει το συμπέρασμα ότι η πιθανότητα διάνοιξης σηράγγων είναι ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία και εξαρτάται:

- a) από τη μάζα (m) του σωματιδίου,
- b) την ενέργεια (E) των σωματιδίων και
- c) το **ύψος** και το **πλάτος (V**0) του φράγματος

Υπό κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας ,η παρουσία της σήραγγας έχει ελάχιστη συμβολή στην ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης. Ωστόσο, δεδομένου ότι η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία καθώς όλο και λιγότερα από τα αντιδρώντα σώματα έχουν ενέργεια επαρκή για να ξεπεράσουν το ενεργειακό φράγμα, σε χαμηλές θερμοκρασίες η συνεχής συμβολή των σηράγγων μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα κατά τη διεκπεραίωση της συνολικής αντίδρασης.

Λόγω της εξάρτησης του p από τη μάζα συνάγεται το συμπέρασμα ότι διαφορετικά ισότοπα έχουν και διαφορετικές πιθανότητες διάνοιξης σηράγγων και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση κινητικού ισοτοπικού φαινομένου.

Συνήθως το Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο προκαλείται από διαφορές στις Ενέργειες Ενεργοποίησης σε αντιδράσεις οι οποίες περιέχουν διαφορετικά ισότοπα και για κάθε ισότοπο το ενεργειακό διάγραμμα στο στάδιο των αντιδρώντων ή στο μεταβατικό στάδιο, είτε και στα δύο στάδια μαζί, έχει διαφορετικό σημείο μηδέν για τις ενέργειες των δονητικών του σταθμών. Οι συχνότητες δόνησης και κατ' επέκταση οι ενέργειες των δονητικών σταθμών, εξαρτώνται από την ανοιγμένη μάζα του δονητικού συστήματος (Pechukas 1981).

$$\omega_e = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Η ενέργεια της βασικής δονητικής στάθμης  $\frac{1}{2}$  ħωe είναι αντιστρόφως ανάλογη του μ<sup>1/2</sup>.



**Εικόνα 1.8.1** Ενεργειακό διάγραμμα επίδρασης του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου στο ενεργειακό φράγμα μιας αντίδρασης που περιέχει μία πρωτονιωμένη και μία δευτεριωμένη ένωση (Pechukas 1981).

Δεδομένου ότι στη μεταβατική κατάσταση οι δεσμοί είναι συνήθως πιο χαλαροί από ότι στο στάδιο των αντιδρώντων, τα δονητικά επίπεδα απέχουν λιγότερο μεταξύ τους. Ως αποτέλεσμα, η ενέργεια ενεργοποίησης γίνεται υψηλότερη, και ως εκ τούτου η αντίδραση πιο αργή για το βαρύτερο ισότοπο, («απλό» ισοτοπικό φαινόμενο). Το μέγιστο ισοτοπικό φαινόμενο επιτυγχάνεται όταν ο δεσμός που περιλαμβάνει το ισότοπο έχει διασπαστεί πλήρως στη μεταβατική κατάσταση και στην προκειμένη περίπτωση η διαφορά των ενεργειών ενεργοποίησης είναι η διαφορά ενεργειών των βασικών ενεργειακών σταθμών στο στάδιο των αντιδρώντων. Σε μερικές αντιδράσεις η διαφορά μεταξύ των βασικών ενεργειακών σταθμών του μεταβατικού σταδίου είναι αυτή που έχει τον καθοριστικό ρόλο και αυτό είναι το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο. Στην προκειμένη περίπτωση η ενέργεια ενεργοποίησης είναι μεγαλύτερη για το ελαφρύτερο ισότοπο και παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο στο οποίο το βαρύτερο ισότοπο αντιδρά ταχύτερα.

Το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο μπορεί να εκφραστεί με μαθηματικό τρόπο με τη χρήση της εξίσωσης Arrhenius είτε της εξίσωσης Eyring από τη θεωρία του μεταβατικού σταδίου. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius, οι τιμές για τα δύο ισότοπα είναι οι εξής:

> $k_{H} = A_{H} exp[-E_{A}(H)/k_{B}T]$  $k_{D} = A_{D} exp[-E_{A}(D)/k_{B}T]$

Υποθέτοντας ότι οι προ-εκθετικοί όροι είναι οι ίδιοι και για τα δύο ισότοπα (προσεγγιστικά: με τη χρήση της θεωρίας του μεταβατικού σταδίου μπορεί να γίνει υπολογισμός του λόγου k<sub>H</sub> / k<sub>D</sub>, με τις εκάστοτε συναρτήσεις των δύο ισοτόπων), το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο, k<sub>H</sub> / k<sub>D</sub>, ως εκ τούτου είναι:

$$k_H/k_D = exp[-{E_A(H)-E_A(D)}/k_BT]$$

Και η πιο περιορισμένη εκδοχή του μέγιστου κινητικού ισοτοπικού φαινομένου είναι η εξής:

$$k_{H}/k_{D} = exp[-{E_0(H)-E_0(D)}/k_BT]$$

όπου E<sub>0</sub>(H) και E<sub>0</sub>(D) οι ενέργειες θεμελιώδους κατάστασης των πρωτονιωμένων και των δευτεριωμένων αντιδρώντων (Pechukas 1981).

#### 1.9 Δευτερίωση Αρωματικών υποστρωμάτων-Κατάλυση με Οξέα

Η δευτερίωση αρωματικών συστημάτων επέρχεται έπειτα από προσθήκη ισχυρών δευτεριωμένων οξέων κατά Brönsted ή αντίστοιχα οξέων κατά Lewis σε συνδυασμό με μια πηγή δευτερίου. Ο Wähälä και η ερευνητική του ομάδα, απέδειξαν ότι τα φαινολικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων και των φλαβονοειδών, είναι σε θέση να δευτεριωθούν, όταν τα τελευταία παραμείνουν σε μίγμα D<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub> και D<sub>2</sub>O στους 100 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες τα στερεοχημικά παρεμποδισμένα πρωτόνια υποκαθίστανται δυσκολότερα από δευτέριο (Di Mari, Supple, and Rapoport 1966; Rasku et al. 1999).

Η *meta* – θέση του Β δακτυλίου σε φαινολικά συστήματα όπως αυτό στην *Εικόνα* **1.9.2.**, έχει 0% πιθανότητα να υποστεί ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση λόγω του ισχυρού ενεργοποιητικού χαρακτήρα της υδροξυλομάδας του δακτυλίου B, (McMurry 2016; Atzrodt et al. 2007).

Ένα παράδειγμα δευτερίωσης είναι αυτό της ισοφλαβόνης δαϊζδεΐνης *Εικόνα* **1.9.2.** (a), η οποία δευτεριώνεται έπειτα από βρασμό στους 100 °C υπό όξινες και άνυδρες συνθήκες. Σε ενώσεις όπως η εντερολακτόνη, *Εικόνα 1.9.2.* (b), πραγματοποιείται πλήρης ανταλλαγή αρωματικών πρωτονίων με απόδοση >99%, σε θερμοκρασία δωματίου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που βρίσκονται σε ανενεργή *meta*-θέση. Τα άτομα υδρογόνου μη πολικών αρωματικών υποστρωμάτων όπως είναι η ναφθαλίνη και το ισοπρόπυλο – βενζόλιο Εικόνα 1.9.2. (c), και 1.9.2 (d), δεν ανταλλάσσονται με την παρουσία όξινων συνθηκών του μίγματος AlBr<sub>3</sub>, EtAlCl<sub>2</sub> και MoCl<sub>5</sub>. Παρόλαυτα παρατηρήθηκε ότι ανταλλάσσονται όταν στο μίγμα γίνει προσθήκη του [D6] – βενζολίου. Αρωματικές ενώσεις όπως η φαινόλη, η η ανιλίνη και η βενζαλδεΰδη αναστέλλουν τη δευτερίωση άλλων ανισόλη, αρωματικών υποστρωμάτων σχηματίζοντας σύμπλοκα με οξέα Lewis δηλαδή με ενώσεις όπου σε άλλες περιπτώσεις δρουν καταλυτικά. Καλές πηγές δευτερίου είναι τα κατά Brönsted οξέα DCI,  $D_2SO_4$ , AcOD και το CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D σε υποβοηθούμενες από μικροκύματα αντιδράσεις δευτερίωσης. Ο Jones και οι συνεργάτες του, έπειτα από κατεργασία του υδροχλωρικού άλατος της 2-μεθυλανιλίνης με μόνη πηγή δευτερίου το D<sub>2</sub>O και θέρμανση 2 λεπτών **Εικόνα 1.9.1**, διέκριναν ποσοτική δευτερίωση. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε και σε παράγωγα της αμινοπυριδίνης όπου παρατηρήθηκε άμεση δευτερίωση και ανάλογα με το υπόστρωμα, στις θέσεις ortho και para ως προς την αμινομάδα, το ποσοστό δευτερίωσης ήταν υψηλό (Atzrodt et al. 2007).



Εικόνα 1.9.1 Ανταλλαγή Η / D στην υδροχλωρική 2-μεθυλανιλίνη έπειτα από ακτινοβόληση με μικροκύματα.



Εικόνα 1.9.2 Ανταλλαγή πρωτονίων με δευτέριο σε αρωματικές ενώσεις (α) Δαϊζδεΐνη, (β) εντερολακτόνη, (γ) ναφθαλίνη, (δ) ισοπρόπυλο – βενζόλιο.

Ένα φαινόμενο που θα μας απασχολήσει ιδιαίτερα στο πειραματικό μέρος είναι η δευτερίωση με φωσφορικά ιόντα. Στο παράδειγμα που παρατίθεται στη συνέχεια πραγματοποιείται δευτερίωση ιμίνης - γενικός τύπος της ένωσης **3a Εικόνα 1.9.3**. (a), με χρήση ενός χειρόμορφου φωσφορικού οξέος - ένωση **3c Εικόνα 1.9.3** (a) και την 2-δευτέριο-βενζοθειαζολίνης - ένωση **3b Εικόνα 1.9.3**. (a). Ο προτεινόμενος μηχανισμός **Εικόνα 1.9.3** (b) χωρεί μέσω μιας εξαιρετικά οργανωμένης μεταβατικής κατάστασης κι αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως η διάσπαση του δεσμού άνθρακα-δευτερίου είναι το καθοριστικό βήμα της αντίδρασης (Sakamoto, Mori, and Akiyama 2012).



**Εικόνα 1.9.3. (a)** Αντίδραση δευτερίωσης με φωσφορικά ιόντα **(b)** προτεινόμενες μηχανισμός της αντίδρασης της ιμίνης με τη 2-δευτεριωμένη βενζοθειαζόλη

# 1.10 Δευτερίωση αρωματικών υποστρωμάτων - κατάλυση σε βασικές συνθήκες.

Εκτός από τις όξινες συνθήκες κατάλυσης που προαναφέρθηκαν, ανάλογα αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν και με βασικές συνθήκες. Στις βασικώς καταλυόμενες αντιδράσεις ανταλλαγής H→D συνήθως γίνεται υποκατάσταση όξινων ατόμων υδρογόνου με δευτέριο μέσω κετονικής – ενολικής ισορροπίας. Σε καρβονυλικές ενώσεις όπως οι κετόνες, οι αλδεΰδες, οι εστέρες και τα καρβοξυλικά οξέα, η ανταλλαγή των όξινων πρωτονίων με δευτέριο γίνεται με εκλεκτικότητα (> 90% D) και υψηλή απόδοση. Επίσης τα γ πρωτόνια των α, β – ακόρεστων κετονών όπως το στερεοειδές ανδροστενδιόνη, ένωση **1α Εικόνα 1.10.1. (α)**, η τεστοστερόνη, και η κορτιζόνη ανταλλάσσονται μέσω σύζευξης. Οι συνθήκες που απαιτούνται για την ανταλλαγή στη συγκεκριμένη αντίδραση είναι αλκαλικές και περιλαμβάνουν 12.5% NaOD σε D<sub>2</sub>O, θερμοκρασία 65 °C και αναμονή ~65 ωρών. Σε περίπτωση όπου απαιτείται άνυδρο μέσον το μεθοξείδιο του νατρίου σε διάλυμα MeOD είναι μια χρήσιμη εναλλακτική. Επιπρόσθετο παράδειγμα βασικής κατάλυσης, αποτελεί η ισοτοπική ανταλλαγή του πρωτονίου της μεθυλομάδας της άρυλομέθυλο-δικετόνης με δευτέριο **2a Εικόνα 1.10.1. (β)**. Η ανταλλαγή πραγματοποιήθηκε από τους Berthelette και Scheigetz με τριεθυλαμίνη, D<sub>2</sub>O/τετραϋδροφουράνιο σε θερμοκρασία δωματίου. Στην προκειμένη περίπτωση το ποσοστό επιτυχίας της αντίδρασης ήταν συνάρτηση της βάσης, του υποστρώματος και του διαλύτη (Scheigetz et al. 2004).



**Εικόνα 1.10.1.** (**a**) Αντίδραση ισοτοπικής ανταλλαγής με σύζευξη στην ανδροστενδιόνη, (**β**) καταλυόμενη υπό βασικές συνθήκες ανταλλαγή Η / D στην άρυλο–μέθυλο-δικετόνη. (Atzrodt et al. 2007).

#### 1.11 Δευτερίωση Οργανικών Υποστρωμάτων - Κατάλυση με Μέταλλο.

Ο ρόλος που έχουν τα μέταλλα στον τομέα της κατάλυσης είναι εξίσου σημαντικός με αυτόν του pH. Υπάρχει πληθώρα αναφορών όπου μέταλλα όπως το ιρίδιο, ο λευκόχρυσος, το ρόδιο, το νικέλιο, κ.α., καταλύουν αντιδράσεις δευτερίωσης αρωματικών και αλειφατικών υποστρωμάτων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους κατάλυσης. Μερικά από αυτά είναι η χρήση ήπιων συνθηκών αντίδρασης και η συνήθης απουσία παραπροϊόντων αφυδραλογόνωσης, υδρόλυσης, επιμερισμού, προϊόντων διάσπασης προστατευτικών ομάδων, καθώς και ανεπιθύμητων προϊόντων προσθήκης δευτερίου σε πολλαπλούς δεσμούς.

Μεταξύ των μέταλλων που καταλύουν αντιδράσεις ανταλλαγής ισοτόπων είναι και το παλλάδιο (Atzrodt et al. 2007), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης σε διάφορες μορφές. Εξ αυτών οι πιο συχνές είναι αυτές που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του κρυσταλλικού παλλαδίου. Όταν το υδρογόνο έρχεται σε επαφή με το μεταλλικό παλλάδιο, σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο υδρίδιο στο οποίο τα άτομα του υδρογόνου καταλαμβάνουν θέσεις οκταέδρου στο μεταλλικό πλέγμα του μετάλλου και στη συνέχεια ακολουθεί διάχυση των ατόμων του υδρογόνου στο εσωτερικό του μεταλλικού καταλύτη, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.1.1.** (Mirich et al. 2015).



**Εικόνα 1.11.1.** Μοριακή επιφάνεια υδρογόνου και Pd(111) : (a) Μοριακό υδρογόνο (ή δευτέριο) προσεγγίζει την επιφάνεια του Pd, (b) Δέσμευση στην επιφάνεια (Φυσική προσρόφηση), (c) διάσπαση σε άτομα που καταλαμβάνουν οκταεδρικούς χώρους μεταξύ των μορίων του Pd, και (d) διάχυση από εσοχή σε εσοχή σε όλη την ποσότητα του παλλαδίου (Mirich et al. 2015).

Το πείραμα που περιγράφεται αφορά την ανταλλαγή υδρογόνου με δευτέριο μεθανίου μέσω ετερογενούς κατάλυσης. Ως καταλύτης μόριο TOU στο χρησιμοποιείται παλλάδιο εμπλουτισμένο με αλούμινα που κύριο χαρακτηριστικό του είναι ότι προσφέρει μεγάλη πορώδη επιφάνεια πάνω στην οποία προσροφώνται τα άτομα του υδρογόνου σύμφωνα με τη θεωρία της προσρόφησης: τα αντιδρώντα μόρια (αέρια ή υγρά) προσροφώνται στην επιφάνεια του στερεού καταλύτη. Υπό της συνθήκες αυτές οι δεσμοί των μορίων εξασθενούν ή ακόμα διασπώνται, οπότε υποβοηθείται η αντίδραση. Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε, ο καταλύτης εσωκλείεται σε γυάλινο σωλήνα μέσα από τον οποίο διαβιβάζονται τα αντιδρώντα με αερίων (ετερογενής κατάλυση). тην μορφή Η μελέτη ανταλλαγής Η/D πραγματοποιήθηκε, αρχικά μεταξύ H<sub>2</sub> και D<sub>2</sub> και στην συνέχεια μεταξύ CH<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>. Το πρώτο πείραμα, έδειξε ότι όταν μέσα από το καταλυτικό σωλήνα διοχετευτεί ισομοριακό μείγμα H<sub>2</sub> με D<sub>2</sub> η ανταλλαγή προς HD λαμβάνει χώρα ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες όπως αυτή των 77 Κ ωστόσο σε χαμηλό ποσοστό. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνεται και το ποσοστό του προϊόντος. Σε θερμοκρασία φλόγας (περίπου 350 °C) η αντίδραση συμβαίνει και χωρίς καταλύτη ενώ κάτω από τους 350 °C η ύπαρξη καταλύτη είναι αναγκαία (Mirich et al. 2015).



**Εικόνα 1.11.2. (a)** Μείγμα Η<sub>2</sub> και D<sub>2</sub> διαπερνά τον καταλύτη Pd **(b)** Η χημειοπροσρόφηση οδηγεί τα άτομα Η και D στο να κινηθούν ελεύθερα διαμέσου των εσοχών, και **(c)** Τα άτομα Η και D απελευθερώνονται ως HD. Οι αντιδράσεις a→b και b→c είναι αντιστρεπτές (Mirich et al. 2015).



**Eikóva 1.11.3.** <sup>1</sup>H NMR φάσμα H<sub>2</sub> και DH σε θερμοκρασία δωματίου.  $\delta$ =4,634 ppm (H<sub>2</sub>),  $\delta$ =4,599 ppm (HD), σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, σταθερά σύζευξης J=42.7 Hz (Mirich et al. 2015).

Η χημική μετατόπιση του HD βρίσκεται σε χαμηλότερη συχνότητα από αυτή του H<sub>2</sub> εξαιτίας του ισοτοπικού φαινομένου δευτερίου. Συνδυασμός των ολοκληρώσεων του φάσματος και των δεδομένων από την στοιχειομετρία της αντίδρασης οδήγησαν στα εξής αποτελέσματα για την κινητική της αντίδρασης: Πηλίκο αντίδρασης Q=1.6, Kc= 3.24 (273 K), Kc=3.28 (298 K), Kc= 4 (υψηλές θερμοκρασίες).

Όσον αφορά την ανταλλαγή μεταξύ δευτερίου και μεθανίου, βρέθηκε ότι αυτή δεν πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, εξαιτίας της ενέργειας των 79 kcal/mol που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του δεσμού C-H στα αλκάνια. Έτσι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες ανώτερες των 300 °C.

Υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί για την ανταλλαγή Η/D μεταξύ του μεθανίου και του D<sub>2</sub>. Ο πρώτος είναι η μονή ανταλλαγή στην οποία μόνο ένα άτομο Η υποκαθίσταται κατά την αλληλεπίδραση με την επιφάνεια του καταλύτη. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι αυτός της πολλαπλής ανταλλαγής σύμφωνα με τον οποίο συμβαίνει ανταλλαγή που οδηγεί σε μεθάνιο-d<sub>4</sub>. Έρευνες μάλιστα έχουν δείξει ότι οι δύο μηχανισμοί δρουν ταυτόχρονα παράγοντας μεθάνιο-d<sub>1</sub> και μεθάνιο-d<sub>4</sub> αλλά πολύ μικρά ποσοστά μεθανίου-d<sub>2</sub> και μεθανίου-d<sub>3</sub>.

Το 1959 ο Kemball πρότεινε έναν μηχανισμό και για τις δύο ανταλλαγές. Για την μονή ανταλλαγή θεώρησε ότι δημιουργείται ως ενδιάμεσο ένα μόριο CH<sub>3</sub>[Pd] ενώ για την πολλαπλή δημιουργείται το ενδιάμεσο CH<sub>2</sub>[PdPd]. Το 1974 ο Fernnet πρότεινε έναν εναλλακτικό μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο η μονή ανταλλαγή περιλαμβάνει συντονισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ CH<sub>4</sub> και D[Pd] χωρίς τον σχηματισμό δεσμού Pd-C ενώ ο μηχανισμός της πολλαπλής ανταλλαγής είναι παρόμοιος με αυτόν του Kemball. Οι δύο μηχανισμοί που περιγράφηκαν παραπάνω αφορούν συνθήκες χαμηλής πίεσης του μεθανίου και μεγάλης επιφάνειας επαφής του δευτερίου με τον καταλύτη.

Κατά την πραγματοποίηση του πειράματος παρατηρήθηκε ότι απουσία καταλύτη δεν συμβαίνει ανταλλαγή ακόμα και σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, κάτι

που αποκλείει την ύπαρξη μηχανισμού άμεσης υποκατάστασης. Από την άλλη πλευρά σε συνθήκες p=1 atm και T=300-525 °C , παρατηρήθηκαν και τα 5 προϊόντα δευτερίωσης του μεθανίου, το οποίο υποδεικνύει ότι είναι πιθανό να ακολουθείται οποιοσδήποτε από τους δύο μηχανισμούς, δηλαδή της μονής υποκατάστασης ( που μπορεί να συμβαίνει παραπάνω από μια φορά στο ίδιο μόριο) ή της πολλαπλής υποκατάστασης ή ακόμα και ένας συνδυασμός των δύο αυτών μηχανισμών.

Σε αντίθεση με το μεθάνιο και τα αλκάνια γενικότερα, το αλκένια χρησιμοποιούν διαφορετικό τρόπο δευτερίωσης παρουσία Pd ως καταλύτη. Τα αλκένια αρχικά σχηματίζουν δεσμό με το Pd μέσω του π δεσμού τους και στην συνέχεια η ανταλλαγή μεταξύ του δευτερίου και του υδρογόνου προκύπτει μέσω του μηχανισμού υδρογόνωσης των Horiuti-Polan *Εικόνα 1.11.4.* (Mirich et al. 2015).



Εικόνα 1.11.4. Μηχανισμός υδρογόνωσης των Horiuti-Polan (Mirich et al. 2015).

# 1.12 Καταλυόμενη από Pd ortho - επιλεκτική δευτερίωση αρωματικών υδρογονανθράκων.

Λόγω της εκτενούς χρήσης του φαινυαιθανικού οξέως σε φάρμακα, η κατευθυνόμενη *ortho*-δευτερίωσή του, θα είναι ένα σημαντικό βήμα, αφού οι τρέχουσες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είτε απαιτούν πολλαπλά στάδια στην συνθετική πορεία, είτε είναι μη εκλεκτικές για την *ortho*-θέση. Η πρώτη δυνατή μέθοδος είναι η επιλεκτική *ortho*-δευτερίωση των παραγώγων της βενζαμίδης μέσω κατευθυνόμενης στοιχειομετρικής *ortho*-μετάλλωσης που ακολουθείται από ανθρακική ομολογοποίηση. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση κατιονικών συμπλόκων ιριδίου ως καταλύτη για *ortho*-μετάλλωση / δευτερίωση των παραγώγων των βενζοϊκών οξέων. Αυτή η μέθοδος, παρόλο που χρησιμοποιείται αρκετά, απαιτεί επίσης ένα βήμα ανθρακικής ομολογοποίησης για να επιτευχθεί η σύνθεση *ortho*δευτεριωμένων φαινυλαιθανικών οξέων. Η τρίτη πιθανή μέθοδος είναι η χρήση ετερογενών μικτών μετάλλων μετάπτωσης ως καταλύτες και D<sub>2</sub> για την δευτερίωση του φαινυλαιθανικού οξέος. Αυτή η μέθοδος μπορεί να μην είναι συμβατή με την ύπαρξη λειτουργικών ομάδων που είναι επιρρεπείς σε υδρογόνωση.

Μια εναλλακτική αντίδραση είναι κατάλυση με Pd(II) του φαινυλαιθανικού οξέος αφότου ενεργοποιηθεί ο δεσμός C-H σε *ortho*-θέση. Οι ιδανικές συνθήκες της αντίδρασης είναι: κατεργασία του οργανικού υποστρώματος με Pd(OAc)<sub>2</sub> (10 mol % ) και NaCO<sub>3</sub> σε τέτρα - δευτεριωμένο αιθανικό οξύ. Ο προτεινόμενος μηχανισμός ξεκινάει με ενεργοποίηση του δεσμού C-H για την δημιουργία άρυλο-παλλαδίου(II). Αυτό το ενδιάμεσο αντιδρά στην συνέχεια με D+ και δίνει το δευτεριωμένο προϊόν καθώς και τον αναγεννημένο καταλύτη Pd (II), όπως φαίνεται στον καταλυτικό κύκλο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.12.1. (b)** (Ma et al. 2014).



Εικόνα 1.12.1. (a) Αντίδραση του φαινυλαιθανικού οξέος, (b) προτεινόμενος καταλυτικός κύκλος (Ma et al. 2014).

#### 1.13 Αξιολόγηση της κατάλυσης με $Pd/H_2$ στην ανταλλαγή H/D.

Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η καταλυόμενη από Pd/H<sub>2</sub> βενζυλική ανταλλαγή H/D μεταξύ D<sub>2</sub>O και DA (*δεϋδροαμπιετινάλη*: ένωση του ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών) βρέθηκε να είναι αποτελεσματική για περισσότερο από το 97% των ατόμων ενσωματώνοντας τουλάχιστον ένα άτομο δευτερίου ενώ το 14% των ατόμων είχε και τα τρία βενζυλικά υδρογόνα υποκατεστημένα με δευτέριο. Η ύπαρξη των δευτεριωμένων προϊόντων μελετήθηκε με την βοήθεια δεδομένων φασματοσκοπίας NMR <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H. Λόγω στερικών παρεμποδίσεων του DA δεν συμβαίνει ανταλλαγή στον άνθρακα 7 του μορίου *Εικόνα 1.13.1 (a)* (Petros and Shah 2014).



**Εικόνα 1.13.1. (a)** Δομή της δεϋδροαμπιετινάλης, **(b)** Σύνθεση της <sup>2</sup>H-DA (Petros and Shah 2014)

## 2ο Κεφάλαιο - Θεωρία του NMR

#### 2.1 Το Δευτέριο-Ιστορική αναδρομή.

Το δευτέριο ή υδρογόνο-2 (σύμβολο D ή <sup>2</sup>H, επίσης γνωστό ως βαρύ υδρογόνο) είναι το ένα από τα δύο σταθερά ισότοπα του υδρογόνου. Η φυσική του αφθονία στους ωκεανούς της Γης είναι περίπου 1 άτομο δευτερίου ανά 6.420 άτομα υδρογόνου-1 (που ονομάζεται και «πρώτιο»). Έτσι, το δευτέριο αντιπροσωπεύει περίπου το 0,0156% (ή 0,0312% κατά μάζα) του συνόλου του φυσικά υπάρχοντος υδρογόνου στους ωκεανούς, ενώ το πιο κοινό ισότοπο, το πρώτιο αντιπροσωπεύει μια αφθονία πάνω από 99,98%. Η αφθονία του δευτερίου αλλάζει ελαφρά από το ένα είδος φυσικού νερού σε άλλο.

Ο πυρήνας του δευτερίου, που ονομάζεται «δευτερόνιο», περιέχει ένα πρωτόνιο και ένα νετρόνιο, ενώ ο αντίστοιχος του πολύ πιο άφθονου πρώτιου δεν περιέχει κανένα νετρόνιο. Το όνομα του δευτερίου σχηματίστηκε από την ελληνική λέξη «δεύτερος», που δηλώνει ότι ο πυρήνας του περιέχει δύο σωματίδια. Το δευτέριο ανακαλύφθηκε το 1931 από τον *Harold Urey*, και γι' αυτό του απονεμήθηκε το Βραβείο Νόμπελ το 1934. Η ανακάλυψη αυτή ακολουθήθηκε από την ανακάλυψη του νετρονίου, το 1932, που έκανε την πυρηνική δομή του δευτερίου προφανή. Σύντομα μετά την ανακάλυψη του δευτερίου, ο *Urey* και άλλοι παρασκεύασαν δείγματα του βαρέως ύδατος, στο οποίο το δευτέριο έχει υψηλότερη συγκέντρωση (έως και 100% στο «καθαρό βαρύ ύδωρ») από ότι στο φυσικό νερό (J. Hudson 1992; I. Asimov 2008).

#### 2.2 Το Τρίτιο-Ιστορική αναδρομή.

Το τρίτιο ἡ υδρογόνο-3 (σύμβολο Τ ἡ <sup>3</sup>Η, επίσης γνωστό ως υπερβαρύ υδρογόνο) είναι ἐνα ραδιενεργό ισότοπο του υδρογόνου. Ο πυρήνας του τρίτιου, που μερικές φορές ονομάζεται «τριτόνιο», περιέχει ἐνα (1) πρωτόνιο και δύο (2) νετρόνια. Το τρίτιο είναι πολύ σπάνιο στη Γη, όπου ιχνοποσότητες του ισοτόπου σχηματίζονται κατά την επίδραση της κοσμικής ακτινοβολίας στην ατμόσφαιρα του πλανήτη. Το όνομα αυτού του ισοτόπου προέρχεται από την ελληνική λέξη «τρίτος».

Το τρίτιο είναι ένα ασυνήθιστο προϊόν της πυρηνικής σχάσης του ουράνιου-235, του πλουτώνιου-239 και ουράνιου-233, με μια παραγωγή ανά περίπου 10.000 σχάσεις. Αυτό σημαίνει ότι η έκλυση ή η ανάκτηση του τριτίου πρέπει να θεωρηθεί μια διεργασία των πυρηνικών αντιδραστήρων, ιδιαίτερα στην επανεπεξεργασία των πυρηνικών καυσίμων και την αποθήκευση των αναλωμένων πυρηνικών καυσίμων. Η παραγωγή του τριτίου, σ' αυτήν την περίπτωση δεν είναι το ζητούμενο, αλλά μάλλον ένα παραπροϊόν (J. Hudson 1992; Sir Basil Schonland 1968).

#### 2.3 Αρχές της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).

Το NMR **ανακαλύφθηκε** το **1946**, στο Πανεπιστήμιο του Harvard από τους Purcell, Pound και Torrey και στο Πανεπιστήμιο του Stanford από τους Bloch, Hansen και Packard. Έκτοτε, η φασματοσκοπική τεχνική NMR εφαρμόζεται σε στερεά, υγρή και αἑρια κατάσταση, σε ποικίλες δομικές, κινητικές και θερμοδυναμικές ἑρευνες και αποτελεί μια διαδεδομένη μέθοδο απεικόνισης (MRI). (Lambert 2004). Στον χώρο της ἑρευνας ἑχει αποφέρει συνολικά 6 βραβεία Νόμπελ τα οποία σχετίζονται ἁμεσα με την τεχνική NMR (Lambert 2004; Freeman 2003).

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) προκύπτουν από διεγερμένους μαγνητικά πυρήνες, οι οποίοι βρίσκονται υπό την επίδραση ισχυρού ομογενούς μαγνητικού πεδίου (Αλεξάνδρου 1992). Αναλυτικά, οι πυρήνες του <sup>1</sup>Η και του <sup>13</sup>C, καθώς και άλλοι πυρήνες με πυρηνικό spin I≠0 – λόγω του φορτίου τους μπορούν να θεωρηθούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες οι οποίοι έχουν την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με εξωτερικό μαγνητικό πεδίου είναι τυχαίος. Αντίθετα, ο προσανατολισμός των πυρήνων – απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου είναι τυχαίος. Αντίθετα, ο προσανατολισμός αυτός παύει να είναι τυχαίος και αποκτά συγκεκριμένη διεύθυνση αμέσως μόλις ο πυρήνας τεθεί υπό την επίδραση ενός ισχυρού ομογενούς μαγνητικού πεδίου **Εικόνα** 2.3.1.a, b.



**Εικόνα 2.3.1. (α)** Τυχαίος προσανατολισμός πυρηνικών σπιν απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου Βο, **(b)** Συγκεκριμένος προσανατολισμός πυρηνικών σπιν παρουσία πεδίου Βο (Πηγή: <u>http://www.authorstream.com/Presentation/Darshantelange-1542377-nmr-spectroscopy-ppt/</u>)





Οι πιθανοί προσανατολισμοί ενός πυρήνα με spin I είναι 2I+1, **Εικόνα 2.3.2.** Πιο συγκεκριμένα, ο πυρήνας του πρωτονίου <sup>1</sup>H, όπου I=½, έχει δύο προσανατολισμούς του spin μέσα σε μαγνητικό πεδίο Bo, ένας εκ των δύο είναι ο παράλληλος προσανατολισμός σε σχέση με την διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου, I=+½ (**a state**), (χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη) και τον αντιπαράλληλο, όπου I=-½ ) (**β state**), (υψηλότερη ενεργειακή στάθμη) **Εικόνα 2.3.3.** 



**Εικόνα 2.3.3.** Ενεργειακές Στάθμες πυρήνα <sup>1</sup>Η (I=±1/2) σε μαγνητικό πεδίο. (Πηγή:<u>http://www.authorstream.com/Presentation/Darshantelang</u> <u>e-1542377-nmr-spectroscopy-ppt/</u>)

Επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας συχνότητας ν στο σύστημα που βρίσκεται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, προκαλεί συντονισμό ενώ παράλληλα πραγματοποιείται απορρόφηση ενέργειας. Οι πυρήνες από την βασική κατάσταση +½ διεγείρονται στην -½ και επανέρχονται στην αρχική κατάσταση ισορροπίας μέσω των πορειών αποδιέγερσης, οι οποίες εκφράζονται από τους χρόνους χαλάρωσης T<sub>1</sub> και T<sub>2</sub>. Μεταβάσεις μεταξύ της βασικής ενεργειακής κατάστασης α και της διεγερμένης β, προκαλούνται από τυχαίως μεταβαλλόμενα μαγνητικά πεδία με συχνότητα παραπλήσια της συχνότητας συντονισμού του υπό μελέτη πυρήνα, δημιουργώντας έτσι αποκατάσταση που περιγράφεται από το διαμήκη χρόνο αποδιέγερσης T<sub>1</sub> (longitudinal relaxation time) καθώς γειτονικοί ομοειδείς πυρήνες ανταλλάσσουν ενέργεια με αποτέλεσμα τη μεταβολή των συχνοτήτων συντονισμού των πυρηνικών spin. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε απώλεια φάσης συνοχής των spin (dephasing of coherence) και ο αριθμός των πυρήνων της διεγερμένης στάθμης δεν μεταβάλλεται και περιγράφεται από τον εγκάρσιο χρόνο αποδιέγερσης T<sub>2</sub> (transverse relaxation time) (Atta-ur-Rahman 1986).



**Εικόνα 2.3.4.** Διάγραμμα των χρόνων Τ1 και Τ2 ως συνάρτηση του χρόνου συσχέτισης. τ<sub>c</sub> = Μοριακός χρόνος συσχέτισης, ο χρόνος που χρειάζεται το μόριο για να περιστραφεί κατά 1 rad. (Τροποποιήθηκε από Πηγή: Hans J. Reich 2017)

Ως **ΔΕ** συμβολίζεται η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο προσανατολισμών spin και γενικότερα μεταξύ δύο γειτονικών ενεργειακών σταθμών και δίνεται από την σχέση:

$$\Delta E = h\nu = h\gamma \frac{Bo}{2\pi} = 2\mu Bo \Delta E$$

όπου **h** είναι η σταθερά του Plank, **Bo** είναι η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, **γ** ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα, ο οποίος αποτελεί μια σταθερά για κάθε πυρήνα (26,753 s<sup>-1</sup>gauss<sup>-1</sup> για τον πυρήνα <sup>1</sup>H) και **μ** η μαγνητική ροπή του πυρήνα. Η ενεργειακή διαφορά **ΔΕ** είναι ανάλογη προς την ένταση του μαγνητικού πεδίου **B**<sub>0</sub> και του γυρομαγνητικού λόγου του πυρήνα **γ**.



**Εικόνα 2.3.5.** Διάγραμμα συσχέτισης των ραδιοσυχνοτήτων (κάθετος άξονας) συγκριτικά με τις τιμές της έντασης του μαγνητικού πεδίου B<sub>0</sub> (Πηγή: <u>http://www.authorstream.com/Presentation/Darshantelange-1542377-nmr-spectroscopy-ppt</u>/).

Nuclei	R <sub>f</sub> (MHz)	Bº (T)	γ/2π (MHz/T)
<sup>1</sup> Η	500.00	11.74	42.58
<sup>13</sup> C	125.74	11.74	10.71
2H	76.78	11.74	6.54
<sup>19</sup> F	470.54	11.74	40.08
31 <b>p</b>	202.51	11.74	17.25

**Εικόνα 2.3.6.** Τιμές R<sub>f</sub> / γ των πυρήνων που απεικονίζονται. (Πηγή: <u>http://www.authorstream.com/Presentation/Darshantelange-1542377-nmr-spectroscopy-ppt/</u>).

Η κατανομή των πληθυσμών ανάμεσα στις ενεργειακές στάθμες δίνεται από τη σχέση Boltzmann:

$$\frac{N_{-1/2}}{N_{+1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{KT}} = e^{\frac{2\mu Bo}{KT}}$$



(Πηγή: http://www.authorstream.com/Presentation/Darshantelange-1542377-nmr-spectroscopy-ppt/)

Από τη σχέση αυτή, προκύπτει ότι υπάρχει μία μικρή περίσσεια των πυρήνων που βρίσκονται στη βασική κατάσταση Ν<sub>+1/2</sub> σε σχέση με την διεγερμένη Ν<sub>-1/2</sub>. Παρ' όλα αυτά όμως η διαφορά αυτή είναι αρκετή για την εμφάνιση του σήματος συντονισμού (Γεροθανάσης 2000; Βαλαβανίδης 2006).

(Πηγή: http://www.authorstream.com/Presentation/Darshantelange-1542377-nmr-spectroscopy-ppt/)

Για παράδειγμα σε ένα όργανο των 100 MHz, εάν 10<sup>6</sup> πυρήνες βρίσκονται στη χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη, στη διεγερμένη βρίσκονται 999987. Αυτή η περίσσεια των 13 πυρήνων στη βασική κατάσταση λαμβάνεται ως σήμα από το όργανο. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της πληθυσμιακής διαφοράς μεταξύ των δύο ενεργειακών σταθμών και ως εκ τούτου εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου (Atta-ur-Rahman 1986).

# 2.4 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού με παλμική τεχνική μετασχηματισμού Fourier.

Τα 1975 απἑκτησε τερἀστιο ενδιαφἑρον η παλμική φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (pulsed Fourier transform NMR). Στη μεθοδολογία αυτή οι πυρήνες διεγεἰρονται ταυτόχρονα με διακοπτόμενους παλμούς διἀρκειας ορισμἑνων μs. Με τη διακοπή του παλμού τα spin αποδιεγεἰρονται και γίνεται καταραφή του χρονικού φἀσματος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή *Εικόνα 2.4.1.* Η διεργασία παλμόςκαταγραφή του χρονικού φἀσματος επαναλαμβἀνεται μἑχρι να ληφθεί φἀσμα ικανοποιητικού λόγου σήματος προς θόρυβο (signal/noise, S/N), ο οποίος είναι ανἀλογος προς την τεραγωνική ρίζα του αριθμού των επαναλαμβανόμενων διεργασιών. Το συνολικό χρονικό σήμα μετασχηματίζεται σε φἀσμα συχνοτήτων με την μαθηματικήαναλογία Fourier μἑσω της χρήσης ηλεκτρονικού υπολογιστή (Γεροθανἀσης 2000).



Εικόνα 2.4.1. (Πηγή: <u>http://mri-q.com/fourier-transform-ft.html</u>)
#### 2.5 Φασματοσκοπία μιας διάστασης 1D <sup>1</sup>H NMR.

Κάθε χημικά διακριτός πυρήνας <sup>1</sup>Η ενός μορίου συντονίζεται σε ελάχιστα διαφορετική αλλά ανιχνεύσιμη συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου. Η ακριβής θέση κάθε κορυφής καλείται χημική μετατόπιση. Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις οφείλονται στα μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία, τα οποία δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια που «προστατεύουν» τους πυρήνες από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονιακή προστασία που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα υδρογόνου *Εικόνα 2.5.1.* (Γεροθανάσης 2000). Για τη μέτρηση των χημικών μετατοπίσεων χρησιμοποιείται η κλίμακα δ (ppm) η οποία δίνεται από την επόμενη σχέση:



**Εικόνα 2.5.1.** Εύρος των χημικών μετατοπίσεων <sup>1</sup>Η διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων (Γεροθανάσης 2000).

Ένα φάσμα <sup>1</sup>Η NMR δίνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- 1. Αριθμός των σημάτων: δίνει τον αριθμό των χημικά μη ισοδύναμων πρωτονίων.
- Σχάση spin spin ενός πρωτονίου: από σύζευξη των πυρηνικών σπιν γειτονικών ατόμων, δίνει τον αριθμό των συζευγμένων πρωτονίων. Ισχύει ο γενικός κανόνας ν + 1, που σημαίνει ότι πρωτόνια με ν ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια εμφανίζουν ν + 1 κορυφές στο φάσμα NMR.
- Εμβαδόν (ολοκλήρωμα) κάθε κορυφής: είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που δημιουργούν την κορυφή.

4. Χημικές μετατοπίσεις: δίνουν πληροφορίες για το ηλεκτρονιακό περιβάλλον των υδρογόνων του υπό μελέτη μορίου. Πυρήνες οι οποίοι προστατεύονται πιο πολύ από τα ηλεκτρόνια εντοπίζονται σε μικρότερες τιμές δ στο φάσμα NMR, ενώ πυρήνες που προστατεύονται λιγότερο εμφανίζονται σε μεγαλύτερες τιμές δ Εικόνα 2.5.1.

Το μειονέκτημα της φασματοσκοπίας <sup>13</sup>C, συγκριτικά με την φασματοσκοπία μιας διάστασης <sup>1</sup>H, είναι η μικρή τιμή του γυρομαγνητικού του λόγου και η πολύ μικρή περιεκτικότητα του άνθρακα-13 στο φυσικό περιβάλλον (≈1.11 %). Αυτό έχει ως συνέπεια τη μειωμένη ευαισθησία του (σχετική ευαισθησία ως προς το <sup>1</sup>H ≈ 1/400) (Breitmaier 2003). Πλεονεκτεί στο ότι έχει μεγάλη κλίμακα χημικών μετατοπίσεων *Εικόνα 2.5.2.* και κατά συνέπεια μεγάλη διαγνωστική σημασία. Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων <sup>13</sup>C είναι περίπου 200 ppm, δηλαδή 20 φορές μεγαλύτερη, σε σχέση με την κλίμακα χημικών μετατοπίσεων <sup>1</sup>H (Bovey 1987; Γεροθανάσης 2000).



**Εικόνα 2.5.2.** Εύρος των χημικών μετατοπίσεων <sup>13</sup>C διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων (Γεροθανάσης 2000).

#### 2.6 Σύζευξη σπιν - σπιν.

Στα φάσματα NMR οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές ομάδες (διπλές, τριπλές, τετραπλές κορυφές κλπ.) λόγω της αλληλεπίδρασης των σπιν των γειτονικών πυρήνων. Η πολλαπλότητα (λεπτή υφή) των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin – spin. Η παρουσία ισοδύναμων γειτονικών πυρήνων με σπιν J=1/2 προκαλεί σχάση της απορρόφησης σε n+1 κορυφές. Η σχετική ένταση συνιστωσών κορυφών σε μια πολλαπλή κορυφή δίνεται από το τρίγωνο του Pascal *Εικόνα 2.6.1.* 



Στη σύζευξη spin – spin, δύο πυρήνων **A** και **X**, **Εικόνα 2.6.2. (a)** οι οποίοι συνδέονται απ' ευθείας μέσω ενός δεσμού ή η σύνδεσή τους γίνεται μέσω περισσοτέρων δεσμών, οι κορυφές σχάζονται σε δύο συνιστώσες και αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν περισσότερες ενεργειακές στάθμες μεταξύ των οποίων μπορούν να συμβούν μεταπτώσεις των πυρήνων μετά τη διέγερσή τους.

Το ερώτημα το οποίο τίθεται είναι το γιατί υπάρχουν περισσότερες ενεργειακές στάθμες. Υποθέτοντας ότι υπάρχει ένα σύστημα δύο πυρήνων **Α-Χ** και ότι ο πυρήνας **Χ** έχει την ίδια πιθανότητα να έχει παράλληλο ή αντιπαράλληλο σπιν συγκριτικά με τον **Α** *Εικόνα 2.6.2. (b)*, υπάρχουν τέσσερις ενεργειακές στάθμες, οι οποίες ορίζονται από τον προσανατολισμό των δύο σπιν *Εικόνα 2.6.2. (c)*. Μεταξύ των σταθμών συμβαίνουν μεταπτώσεις, οι οποίες μεταφράζονται ως σήματα στο φάσμα NMR.



Εικόνα 2.6.2 .(a) Σχάση πυρήνων Α και Χ, (b) παράλληλο ή αντιπαράλληλο σπιν πυρήνα Χ, (c) τέσσερις ενεργειακές στάθμες, οι οποίες ορίζονται από τον προσανατολισμό των δύο σπιν.

#### 2.7 Σύζευξη σπιν – σπιν ενός δεσμού

Στην περίπτωση που έχει δημιουργηθεί σύζευξη πυρήνων **A** και **X**, λόγω της σύνδεσης των τελευταίων με απλό δεσμό (π.χ. <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H), η σύζευξη τους, αποτελεί την πληροφορία για τον προσανατολισμό των αντίστοιχων μαγνητικών ροπών, μ<sub>A</sub> και μ<sub>X</sub> και μεταδίδεται μέσω των δεσμικών ηλεκτρονίων **Εικόνα 2.7.1.(a)**. Λόγω των διαφορετικών προσανατολισμών των μαγνητικών ροπών του πυρήνα **A**, δημιουργούνται διαφορετικές καταστάσεις για τον πυρήνα **X** κι έτσι ο πυρήνας **X**, έχει διαφορετικές ενέργειες. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και στον πυρήνα **A**.



**Εικόνα 2.7.1. (a)** Σύζευξη σπιν - σπιν απλού δεσμού πυρήνων Α και Χ, (b) Σύγκριση μεταξύ των ενεργειών των πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο σπιν.

Ο παράλληλος προσανατολισμός των σπιν επιφέρει αποσταθεροποίηση, στις ενεργειακές στάθμες (αα, ββ). Ο αντιπαράλληλος προσανατολισμός των σπιν επιφέρει σταθεροποίηση στις ενεργειακές στάθμες (αβ, βα), **Εικόνα 2.7.1.(b)**. Εστιάζοντας στο διάγραμμα Εικόνα 2.7.2.(a), διακρίνεται η σταθεροποίηση των σταθμών (αβ, βα) και η αποσταθεροποίηση των σταθμών (αα, ββ). Ο συνδυασμός των δύο αυτών καταστάσεων οδηγεί σε θετική τιμή της σταθεράς σύζευξης (J>O). Οι ΔΕ των μεταπτώσεων Α1 και Α2 διαφέρουν, συνεπώς η κάθε μία αντιστοιχεί σε διαφορετική συχνότητα και κατ' επέκταση στο φάσμα ο πυρήνας Α αντιστοιχεί σε σήμα διπλής κορυφής. Η σταθερά σύζευξης **J**, εκφράζει την ενέργεια αλληλεπίδρασης των πυρήνων Α και Χ και είναι ανεξάρτητη του πεδίου Β<sub>0</sub>. Εστιάζοντας στο διάγραμμα, *Εικόνα 2.7.2.(b)* παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο. Δηλαδή οι στάθμες με αντιπαράλληλα σπιν αποσταθεροποιούνται και οι στάθμες με παράλληλα σπιν σταθεροποιούνται. Ο συνδυασμός των δύο αυτών καταστάσεων οδηγεί σε αρνητική τιμή της σταθεράς σύζευξης (J<0). Συνεπώς, και σε αυτή την περίπτωση, οι ΔΕ των μεταπτώσεων Α1 και Α2 είναι διαφορετικές και αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικές συχνότητες δηλαδή σε δύο κορυφές του φάσματος. Ο καθορισμός του πρόσημου της σταθεράς σύζευξης δεν είναι εφικτός, για τον λόγο ότι οι κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικές μεταπτώσεις αλλάζουν θέση.



**Εικόνα 2.7.2. (a)** Ενεργειακό διάγραμμα καταστάσεων οι οποίες οδηγούν σε θετική τιμή της σταθεράς σύζευξης (J>0), (b) Ενεργειακό Διάγραμμα καταστάσεων οι οποίες οδηγούν σε αρνητική τιμή της σταθεράς σύζευξης (J<0).

#### 2.8 Σύζευξη σπιν - σπιν δύο δεσμών (δίδυμη σύζευξη).

Στην συγκεκριμένη περίπτωση σύζευξης οι πυρήνες απέχουν δύο δεσμούς και ο προσανατολισμός του σπιν του ενός μεταδίδεται στο σπιν του άλλου μέσω των δεσμικών ηλεκτρονίων πρωτονίου. Η παράλληλη διάταξη των σπιν (αα, ββ) των δύο πρωτονίων έχει χαμηλότερη ενέργεια (σταθεροποιείται) από την αντιπαράλληλη διάταξη (αβ, βα) (αποσταθεροποιείται). Αποτέλεσμα αυτού, είναι η εμφάνιση διπλής κορυφής στο φάσμα. Η σταθερά δίδυμης σύζευξης <sup>2</sup>**J**<sub>HH</sub> είναι θετική ή αρνητική ανάλογα με το εάν τα σπιν των πρωτονίων είναι παράλληλα ή αντιπαράλληλα.



Εικόνα 2.8.1. Σύγκριση μεταξύ των ενεργειών των πυρήνων παράλληλου και αντιπαράλληλου σπιν.

Η τιμή της σταθεράς δίδυμης σύζευξης <sup>2</sup>**J**<sub>HH</sub> δύο πυρήνων **Α** και **Χ** εξαρτάται:

- a. Από την ηλεκτραρνητικότητα του υποκαταστάτη σε α- ή β-θέση.
- **b.** Από τον υβριδισμό του άνθρακα (γωνία δεσμού H-C-H).
- **c.** Από γειτονικούς δεσμούς π.
- **d.** Από τη γωνία φ που σχηματίζει ο δεσμός C-H και το γειτονικό τροχιακό π.



**Εικόνα 2.8.2.** Παραδείγματα παραμέτρων από τις οποίες εξαρτάται η τιμή της σταθεράς δίδυμης σύζευξης <sup>2</sup>**J**<sub>HH</sub>.

#### 2.9 Σύζευξη σπιν - σπιν τριών δεσμών (γειτονική σύζευξη).

Στη γειτονική σύζευξη, εκτός από την αλληλεπίδραση των σπιν μέσω των ηλεκτρονίων σ, πραγματοποιείται επικάλυψη των γειτονικών τροχιακών sp<sup>3</sup> των δύο ατόμων άνθρακα. Η συνεισφορά εξαρτάται από τον βαθμό επικάλυψης των τροχιακών, δηλαδή από τη γωνία που σχηματίζουν τα δύο sp<sup>3</sup> τροχιακά.



Η τιμή της σταθεράς σύζευξης τριπλού δεσμού εξαρτάται:

- **a.** Από το μήκος του δεσμού C-C,R<sub>µ,ν</sub>.
- **b.** Από τις γωνίες θ και θ' των δεσμών H-C-C.
- **с.** Από την ηλεκτραρνητικότητα υποκαταστάτη R.
- **d.** Από τη δίεδρη γωνία φ των δεσμών C-H.



Εικόνα 2.9.1. Παραδείγματα παραγόντων από τους οποίους εξαρτάται η τιμή της σταθεράς σύζευξης τριών δεσμών.

#### 2.10 Εξάρτηση της γειτονικής σύζευξης από τη δίεδρη γωνία φ.

Η δίεδρη γωνία *φ* μεταβάλλεται από 0° μέχρι 360° με την περιστροφή γύρω από το δεσμό C-C. Ορισμένες όμως διαμορφώσεις είναι περισσότερο σταθερές *Εικόνα 2.9.1*. Στην καμπύλη Karplus παρατηρείται ότι η γειτονική σύζευξη έχει τη μεγαλύτερη τιμή για γωνίες *φ* = 0° και 180°, τη μικρότερη για *φ* = 90° και ενδιάμεσες τιμές για γωνίες 60° και 120° *Εικόνα 2.9.2.* 



Εικόνα 2.10.1. Διαμορφώσεις δίεδρης γωνίας φ των δεσμών C-H.



Εικόνα 2.10.2 Ανάλυση διαμορφώσεων μέσω της εξίσωσης και της καμπύλης Karplus.

Η πειραματική τιμή της σταθεράς σύζευξης προκύπτει από το μέσο όρο των σταθερών σύζευξης για όλες τις γωνίες *φ* από 0° έως 360°, λαμβάνοντας υπόψη τους πληθυσμούς των μορίων σε κάθε διαμόρφωση. Έτσι, αν θεωρήσουμε ότι οι πληθυσμοί των μορίων στις διαμορφώσεις Ι, ΙΙ και ΙΙΙ είναι *ρ*Ι, *ρ*ΙΙ και *ρ*ΙΙ, αντίστοιχα, τότε η σταθερά σύζευξης υπολογίζεται από την εξίσωση:



## 2.11 Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D) μέσω απλού κβάντου <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Heteronuclear Single Quantum Corelation, HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR).

Με τη χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών μαγνητικών πυρήνων. Το μειονέκτημα της δισδιάστατης ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (με άμεσα παρατηρούμενο πυρήνα τον <sup>13</sup>C) είναι όπως τονίστηκε η πολύ μικρή ευαισθησία. Αύξηση της ευαισθησίας του πυρήνα <sup>13</sup>C επιτυγχάνεται, όταν η παρατήρηση της συμπεριφοράς του γίνεται διαμέσου της επίδρασης που ασκεί στον, μεγαλύτερης ευαισθησίας, πυρήνα του πρωτονίου. Με τον τρόπο αυτό ο πυρήνας του πρωτονίου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταγραφή του σήματος. Η φασματοσκοπία 2D HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C συσχετίζει πυρήνες πρωτονίου με πυρήνες άνθρακα-13 που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη. Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δισδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης <sup>1</sup>*J*.

Η παλμική ακολουθία του πειράματος 2D HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C μπορεί, περιγραφικά, να διακριθεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (Α) επιτυγχάνεται η μεταφορά μαγνήτισης από τον πυρήνα του πρωτονίου στον πυρήνα του άνθρακα-13. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται και η καταστολή των σημάτων συντονισμού των πυρήνων πρωτονίου που δε συζεύγνυνται με πυρήνες άνθρακα-13. Στο δεύτερο στάδιο (Β) η μαγνήτιση μεταφέρεται από τον <sup>13</sup>C στον πυρήνα <sup>1</sup>Η και ανιχνεύεται. Η παλμική ακολουθία έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δισδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης <sup>1</sup>*J*<sub>HC</sub> (Parella and Belloc 2001). Κατά τρόπο ανάλογο γίνεται και η εφαρμογή της φασματοσκοπίας 2D HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N NMR που συσχετίζει ζεύγη πυρήνων <sup>1</sup>Η και <sup>15</sup>N του αμινοξικού σκελετού πρωτεϊνών.

Οι σταθερές σύζευξης <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H μέσω ενός δεσμού ποικίλουν από 120 μέχρι 320 Hz. Οι σταθερές σύζευξης <sup>1</sup> $J_{CH}$  αυξάνουν κατά τη μεταβολή του υβριδισμού από  $sp^3$ σε sp, σύμφωνα με την αύξηση του ποσοστού συμμετοχής του s τροχιακού στον υβριδισμό. Τυπικές τιμές είναι: CH<sub>4</sub>  $(sp^3)^1J_{CH} = 125$  Hz, H<sub>2</sub>C=CH<sub>2</sub>  $(sp^2)$  <sup>1</sup> $J_{CH} = 157$  Hz και HC=CH (sp) <sup>1</sup> $J_{CH} = 250$  Hz (Breitmaier 2003; Γεροθανάσης 2000).

#### 2.12 Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D) μέσω πολλαπλών δεσμών <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Heteronuclear Multiple Bond Correlation <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR).

Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία 2D HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR, η τεχνική HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων άνθρακα-13 που συζεύγνυνται με πυρήνες πρωτονίου οι οποίοι απέχουν πλέον του ενός δεσμού, συνήθως δύο έως τέσσερις δεσμούς (<sup>2-4</sup> J<sub>CH</sub>). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C περιλαμβάνει αρχικά ένα παλμό 90° με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες συζεύξεις <sup>1</sup>J<sub>CH</sub>, έτσι ώστε οι διασταυρούμενες κορυφές, που τελικά θα προκύπτουν, να αντιστοιχούν σε συζεύξεις <sup>n</sup>J<sub>CH</sub> (όπου n > 1). Ο δεύτερος παλμός 90° <sup>13</sup>C δημιουργεί μεταπτώσεις μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται υπό την επίδραση του παλμού <sup>1</sup>H 180° που ακολουθεί. Τέλος, με την εφαρμογή του παλμού 90° και την καταγραφή του φάσματος, προκύπτει ο δισδιάστατος χάρτης της τεχνικής HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (Atta-ur-Rahman, 1986).

Οι σταθερές σύζευξης  ${}^{2}J_{CH}$  каї  ${}^{3}J_{CH}$  είναι μικρότερες και έχουν τιμές μεταξύ 1 -10 Hz. Ως σύζευξη μακράς εμβέλειας, θεωρούμε τη σύζευξη μεταξύ πυρήνων οι οποίοι βρίσκονται σε απόσταση τεσσάρων ή περισσότερων δεσμών ( ${}^{n}J$  (n  $\geq$  4)). Επειδή η αλληλεπίδραση των πυρήνων εξασθενεί με την αύξηση του αριθμού των δεσμών, η σταθερά σύζευξης μακράς εμβέλειας αναμένεται να είναι πολύ μικρή (συνήθως 0.1 - 3 Hz).

#### 2.13 Ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D) μέσω του Φαινομένου NOE <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR).

Σε διάλυμα είναι δυνατή η μελέτη της διαμόρφωσης φυσικών προϊόντων με την χρήση φασματοσκοπίας NOESY και ROESY NMR (υπολογισμός αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων) και τον υπολογισμό των δίεδρων γωνιών μέσω μετρήσεων των σταθερών σύζευξης (Carlomagno 2012). Η φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY έχει σημαντικές εφαρμογές στη μελέτη δομικών χαρακτηριστικών βιολογικών μακρομορίων όπως πεπτιδίων, πρωτεϊνών (Johnson, Jaudzems, and Wüthrich 2010), DNA και RNA (Tzakos et al. 2004). Με τη χρήση της μελετώνται πυρήνες που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 5 Å και είναι δυνατός ο υπολογισμός των αποστάσεων των πυρήνων στο χώρο με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (Wurhrich, n.d.).

Στο δισδιάστατο πείραμα <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY οι διασταυρούμενες κορυφές οφείλονται στην ανταλλαγή μαγνήτισης λόγω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μέσω του χώρου. Η ένταση των σημάτων εξαρτάται από το ποσοστό ανταλλαγής μαγνήτισης των πυρήνων Α και Β και τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης των spin (τ). Όταν ο χρόνος ανάμιξης είναι περίπου ίσος με το μικρότερο χρόνο αποδιέγερσης (T1) των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων, τότε παρατηρείται η μέγιστη ένταση των διασταυρούμενων κορυφών (Bovey 1987).

Το φαινόμενο ΝΟΕ ως ολοκλήρωμα της περιοχής ενός πρωτονίου έχει μία εξάρτηση από την απόσταση r μεταξύ δύο πρωτονίων που συζεύγνυται μέσω χώρου της μορφής r<sup>-6</sup>. Έτσι παρέχει μία σημαντική μεθοδολογία για την ανίχνευση ζεύγους πρωτονίων τα οποία στο χώρο είναι κοντά το ένα στο άλλο ακόμα και αν διαχωρίζονται από ένα μεγάλο αριθμό δεσμών. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική μελέτη των αποστάσεων, αλλά υπό κατάλληλες προϋποθέσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ποσοτικές μετρήσεις αποστάσεων όπως, για παράδειγμα, είναι η μέτρηση των εντάσεων ΝΟΕ για μία σειρά διαφορετικών χρόνων ανάμιξης και στην συνέχεια η συσχέτιση των εντάσεων με το χρόνο (Breton and Reynolds 2013).

Η μέγιστη τιμή του φαινομένου ΝΟΕ εξαρτάται από το μοριακό χρόνο συσχέτισης, που κατά ένα μεγάλο μέρος καθορίζεται από το μοριακό βάρος της ένωσης και το ιξώδες του διαλύτη. Μεγαλύτερα μοριακά βάρη και υψηλό ιξώδες οδηγούν σε μεγαλύτερους χρόνους συσχέτισης. Έτσι, η τιμή ΝΟΕ είναι θετική για μικρά μόρια (MB<600), κοντά στο μηδέν για ενδιάμεσου μεγέθους μόρια (MB 700-1200) και αρνητική για μεγάλα μόρια π.χ. πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες (MB>1200). Σε περιπτώσεις μορίων ενδιάμεσου MB εφαρμόζεται η τεχνική ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy) όπου όλες οι κορυφές είναι θετικές για όλα τα μόρια ανεξαρτήτως μοριακού βάρους (Breton and Reynolds 2013).

Το φαινόμενο ΝΟΕ αναπτύσσεται δυναμικά ως συνάρτηση του χρόνου και στη συνέχεια φθίνει λόγω αποδιέγερσης κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάμιξης. Έτσι, η τιμή ΝΟΕ για δεδομένο Β<sub>0</sub> ως συνάρτηση του χρόνου ανάμιξης παρουσιάζει μέγιστη τιμή η οποία εξαρτάται από το χρόνο συσχέτισης, το μοριακό βάρος και την απόσταση μεταξύ των πρωτονίων. Γενικά, μόρια μεγάλου μοριακού βάρους (MW) αναπτύσσουν φαινόμενο ΝΟΕ γρήγορα ενώ τα μικρού MW μόρια πιο αργά. Για το λόγο αυτό οι μέγιστες τιμές ΝΟΕ για μεγάλα μόρια μετατοπίζονται σε μικρότερους χρόνους ανάμιξης. Μικρότερη απόσταση μεταξύ των πρωτονίων οδηγεί σε πιο γρήγορη εξέλιξη των ΝΟΕ και μετατόπιση του μέγιστου ΝΟΕ σε μικρότερους χρόνους ανάμιξης.

Σε κάθε πείραμα ΝΟΕ ο καθορισμός του πειραματικού χρόνου ανάμιξης είναι η πιο σημαντική παράμετρος. Σε μικρά μόρια, επιλέγεται ένας μέσος χρόνος ανάμιξης που μεγιστοποιεί το ΝΟΕ, εκτός αν σκοπός είναι η μέτρηση της απόστασης με ακρίβεια. Για μεγάλα μόρια, οι χρόνοι ανάμιξης πρέπει να είναι μικροί έτσι ώστε η ανάπτυξη του φαινομένου ΝΟΕ να βρίσκεται στην περιοχή της γραμμικής συσχέτισης και να αποφευχθεί το φαινόμενο της διάχυσης των spin (spin diffusion).

Στην *Εικόνα 2.12.1.* απεικονίζεται η μεταβολή της έντασης του φαινομένου NOE ενός συστήματος δύο πυρήνων ως συνάρτηση του γινομένου ω<sub>0</sub>τ<sub>c</sub>. Διακρίνονται τρεις περιοχές:

- 1. Γρήγορη ταχύτητα περιστροφής ( $ω_0 T_c << 1$ ), NOE (max) = 0.5
- 2. Πολύ αργή ταχύτητα περιστροφής ( $ω_0 τ_c > 1$ ), NOE = -1
- Ενδιάμεση ταχύτητα περιστροφής (ω<sub>0</sub>τ<sub>c</sub> ~ 1), όπου το φαινόμενο NOE αλλάζει πρόσημο, ενώ σε κάποια περιοχή ω<sub>0</sub>τ<sub>c</sub> γίνεται ίσο με μηδέν.

Η ενδιάμεση περιοχή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το μέγεθος του μορίου, το ιξώδες του διαλύματος, τη θερμοκρασία, την ένταση του πεδίου Β<sub>0</sub> (τη συχνότητα ω<sub>0</sub>) και, μερικές φορές, από το pH του διαλύματος.



**Εικόνα 2.13.1** Εξάρτηση του φαινόμενου ΝΟΕ από το γινόμενο ω<sub>0</sub>τ<sub>c</sub>, όπου, ω<sub>0</sub> είναι η συχνότητα περιστροφής Larmor του πυρήνα και τ<sub>c</sub> ο χρόνος συσχέτισης των πυρήνων που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου. Τα ΝΟΕ μορίων μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους έχουν αντίθετα σήματα.

# 2.14 Προσδιορισμός του επίτοπου πρόσδεσης υποκαταστατών στον υποδοχέα με χρήση NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR).

Η φασματοσκοπία STD NMR έχει ευρεία εφαρμογή στον χαρακτηρισμό των συμπλόκων υποκαταστάτη-πρωτεΐνης και στηρίζεται στην παρατήρηση του πυρηνικού φαινομένου Overhauser των σημάτων συντονισμού του υποκαταστάτη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τεχνική σάρωσης, για τον προσδιορισμό ενώσεων «οδηγών» ή ως εργαλείο για την ταυτοποίηση τμημάτων του υποκαταστάτη που μετέχουν στην πρόσδεση. Έχει χρησιμοποιηθεί στην κλινική χημεία, για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων και για τη σάρωση βιβλιοθήκης τέτοιων μορίων με ποικιλία συγγένειας πρόσδεσης. Έχει επίσης ευρεία εφαρμογή στη σάρωση νέων βιβλιοθηκών διαφόρων τύπων μορίων όπως μεταβολιτών, φαρμάκων σε υποδοχείς πρόσδεσης (όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων), (Pons et al. 2008).

Ο όρος «επίτοπος πρόσδεσης» χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπία NMR για τον χαρακτηρισμό των υδρογόνων του υποκαταστάτη που βρίσκονται πιο κοντά στην πρωτεΐνη κατά την πρόσδεση, (Mayer, 2001).

Με την τεχνική STD NMR μπορούν να προκύψουν πολύ σημαντικές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που αφορούν την ταυτοποίηση των τμημάτων του υποκαταστάτη που βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα λόγω μεταφοράς κορεσμού, ενώ είναι δυνατή και η ομαδική χαρτογράφηση του επίτοπου.

Το πείραμα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι σε έναν προσδεδεμένο υποκαταστάτη, με σταθερά αποσύνδεσης,  $K_D$ , να κυμαίνεται μεταξύ  $10^{-7}$  και  $10^{-3}$  mol  $L^{-1}$ , υπάρχει ανταλλαγή μεταξύ της προσδεδεμένης και της ελεύθερης κατάστασης του μορίου. Βασικά, με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η αφαίρεση ενός φάσματος στο οποίο η πρωτεΐνη ακτινοβολείται επιλεκτικά σε μια περιοχή που περιέχει μόνο κορυφές συντονισμού της πρωτείνης (π.χ. από τα 0 έως τα -1 ppm) με ένταση κορυφών I<sub>SAT</sub> (εντός συντονισμού φάσμα), από ένα φάσμα που καταγράφεται χωρίς κορεσμό της πρωτεΐνης (εκτός συντονισμού), με ένταση κορυφών Ι<sub>0</sub>. Στο φάσμα διαφοράς (I<sub>STD</sub> = I<sub>0</sub> - I<sub>SAT</sub>) παραμένουν μόνο τα σήματα του υποκαταστάτη που έχουν λάβει μεταφορά κορεσμού από την πρωτεΐνη μέσω διάχυσης spin λόγω πυρηνικού φαινομένου Overhauser. Σε ενώσεις που μπορεί να βρίσκονται στο διάλυμα αλλά δεν προσδένονται στον υποδοχέα δεν λαμβάνει χώρα μεταφορά κορεσμού και τα σήματά τους θα έχουν την ίδια ένταση και στους δύο τύπους φασμάτων και, συνεπώς δεν θα εμφανιστούν σήματα στο φάσμα διαφοράς. Η διαφορά στην ένταση των κορυφών λόγω μεταφοράς κορεσμού μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και να αποτελέσει ένδειξη της ισχύος πρόσδεσης. Για ένα μόριο που προσδένεται σε έναν υποδοχέα, μόνο τα σήματα των υδρογόνων που βρίσκονται κοντά στην πρωτεΐνη (≤5 Å) και λαμβάνουν μεταφορά κορεσμού θα εμφανιστούν στο φάσμα διαφοράς. και από αυτά, εκείνα που βρίσκονται πιο κοντά στην πρωτεΐνη θα έχουν πιο έντονα σήματα λόγω πιο αποτελεσματικής μεταφοράς μαγνήτισης (Nobrega and Cabrita 2011).

Πιο αναλυτικά, σε ένα πείραμα NMR <sup>1</sup>Η επιλέγεται η περιοχή όπου θα πραγματοποιηθεί η ακτινοβόληση της πρωτεΐνης και πρέπει η συχνότητα αυτή να είναι μετατοπισμένη τουλάχιστον κατά 1.2 ppm σε σχέση με την πιο κοντινή συχνότητα συντονισμού του υποκαταστάτη (φάσμα εντός συντονισμού). Ο υποκαταστάτης που είναι προσδεδεμένος στην πρωτεΐνη θα κορεστεί επίσης και ο βαθμός κορεσμού εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής του στη θέση πρόσδεσης. Η αποσύνδεση του υποκαταστάτη θα έχει ως συνέπεια την μεταφορά του κορεσμού στο διάλυμα όπου ο ελεύθερος υποκαταστάτης δίνει σήματα συντονισμού. Στα πρωτόνια του υποκαταστάτη που αλληλεπιδρούν με τα πρωτόνια της πρωτεΐνης μέσω ενός διαμοριακού trNOE παρατηρείται μείωση της έντασης. Σε ένα δεύτερο πείραμα η συχνότητα ακτινοβόλησης επιλέγεται σε μια τιμή που να βρίσκεται μακριά από οποιοδήποτε σήμα είτε υποκαταστάτη είτε πρωτεΐνης, για παράδειγμα στα 400 ppm ή 20000 Hz (φάσμα εκτός συντονισμού). Το φάσμα καταγράφεται και παράγει ένα τυπικό φάσμα NMR του μίγματος. Αφαίρεση των δύο φασμάτων οδηγεί σε ένα φάσμα διαφοράς στο οποίο είναι ορατά μόνο σήματα των πρωτονίων που ενισχύθηκαν λόγω μεταφοράς κορεσμού ενώ όλα τα υπόλοιπα μόρια χωρίς ικανότητα πρόσδεσης απουσιάζουν, (Meyer and Peters 2003).

# 2.15 Εφαρμογή της φασματοσκοπικής τεχνικής NMR σε κινητικές και θερμοδυναμικές μελέτες.

Θερμοδυναμικές και κινητικές διεργασίες με ενεργειακό φράγμα μεταξύ των 20 και 100 kJ / mol μπορούν να μελετηθούν λεπτομερώς με την φασματοσκοπική τεχνική 1D <sup>1</sup>H NMR. Η μελέτη περιλαμβάνει μεταβολή της θερμοκρασίας και λήψη των αντίστοιχων φασμάτων. (García et al. 2002; Sureshan et al. 2004). Οι Oki και Yamamoto παρατήρησαν ότι στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του 2-ισοπροπυλο-2'-μεθοξυδιφαινυλίου και των παραγώγων του, η παρουσία του χειρόμορφου άξονα καθιστά τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων της ισοπρόπυλο ομάδας διαστερεοτοπικά. Σε υψηλότερη θερμοκρασία, η περιστροφή γύρω από τον άξονα που ορίζεται από το χειρόμορφο διφαινύλιο, είναι σχετικά γρήγορη σε σύγκριση με τη χρονική κλίμακα NMR και παρατηρείται επικάλυψη των διαστερεοτοπικών σημάτων μεθυλίου. Από την ανάλυση των εξαρτώμενων από τη θερμοκρασία φασμάτων 1D <sup>1</sup>H NMR του 2-ισοπροπυλο-2'-μεθοξυδιφαινυλίου η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίστηκε 80,4 kJ / mol στους 86 °C (C. Lee and Lee 1995; Porto et al. 2008) *Εικόνα 2.15.1.* 



**Εικόνα 2.15.1.** ΝΜR μελέτη της εναντιο-μετατροπής των 2-ισοπροπυλ-2'μεθοξυδιφαινυλίων (Wolf 2007).

Εισαγωγή της μεθόξυ και νιτρο-ομάδας σε *para*-θέσεις του 2-ισοπροπυλο-2'μεθοξυδιφαινυλίου μειώνει το ενεργειακό φράγμα περιστροφής. Η ενδομετατροπή των στερεοϊσομερών που εμφανίζουν διαστερεοτοπικούς πυρήνες μπορεί να μελετηθεί με φασματοσκοπία NMR μεταβλητής θερμοκρασίας (δυναμικό-NMR) όταν η αντίδραση είναι αργή στην χρονική κλίμακα NMR. Αυτό συμβαίνει όταν:

$$k \ll \pi \frac{\Delta v}{\sqrt{2}}$$

Όπου k είναι η σταθερά ταχύτητας ενδομετατροπής και Δν είναι ο διαχωρισμός των κορυφών των σημάτων NMR σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου η επίδραση του φαινομένου ανταλλαγής είναι αμελητέα. Μια ιδιαίτερα απλή κατάσταση προκύπτει όταν δύο πυρήνες (AB), εμφανίζουν οξείς κορυφές ίσης έντασης, οι οποίες υποβάλλονται σε χημική ανταλλαγή με αποτέλεσμα τη διεύρυνση της γραμμής και τη συγχώνευση τους με τη θέρμανση (Wolf 2007) *Εικόνα 2.15.2.* 



**Εικόνα 2.15.2.** Επίδραση του φαινομένου χημικής ανταλλαγής στα φάσματα NMR (Wolf 2007).

Σε μια τέτοια περίπτωση, μπορεί κανείς να διακρίνει καλά διαχωρισμένα σήματα σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου οι δύο πυρήνες δεν δείχνουν μετρήσιμη ανταλλαγή. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, η ταχύτητα ανταλλαγής γίνεται γρηγορότερη σε σχέση με τη χρονική κλίμακα NMR και καταλήγει να είναι ορατό ένα μέσο σήμα. Ελλείψει οποιασδήποτε σύζευξης, η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης, της αλληλομετατροπής μπορεί να υπολογιστεί από την εξής σχέση:

$$k_{T_c} = \pi \; rac{\Delta v}{\sqrt{2}}$$

(2.15.β.)

Όπου k<sub>Tc</sub> είναι η σταθερά ταχύτητας στη θερμοκρασία μέσης κατάστασης T<sub>c</sub> και Δν είναι η διαφορά μεταξύ των χημικών μετατοπίσεων των δύο σημάτων χωρίς ανταλλαγή (σε χαμηλές θερμοκρασίες, T « T<sub>c</sub>).

Η σχέση που δίνει την ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης είναι η εξής:

(2.15.y.) 
$$\Delta G^{\neq} = 19.1 \cdot 10^{-3} T_c (9.97 + \lg T_c - \lg |v_A - v_B|)$$

Όπου ΔG<sup>+</sup> είναι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs εκφρασμένη σε kJ / mol. T<sub>c</sub> είναι η θερμοκρασία της μέσης κατάστασης σε Kelvin και v<sub>A</sub> και v<sub>B</sub> είναι οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων A και B σε Hz. Av υφίσταται σύζευξη μεταξύ των ανταλλάξιμων πυρήνων, η σταθερά ταχύτητας μπορεί να εκτιμηθεί με την χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

(2.15.5.) 
$$k_{T_c} \approx 2.22 \sqrt{(\Delta v^2 + 6 J_{AB}^2)}$$

Όπου JAB είναι η σταθερά σύζευξης μεταξύ πυρήνων Α και Β εκφρασμένη σε Hz.

# 3ο Κεφάλαιο - Βασικές αρχές κινητικής

#### 3.1 Ο Νόμος Ταχύτητας μιας αντίδρασης.

Η μελέτη της κινητικής μιας χημικής αντίδρασης πραγματοποιείται με την χρήση της διαφορικής εξίσωσης του νόμου ταχύτητας ή τον νόμο ταχύτητας έπειτα από ολοκλήρωση. Μέσω του νόμου της ταχύτητας δίνεται η δυνατότητα εύρεσης πληθώρας πληροφοριών σχετικά με την πρόοδο μιας αντίδρασης, ενώ παράλληλα μπορεί να πραγματοποιηθεί πρόβλεψη της συγκέντρωσης των αντιδρώντων μέσα στο μίγμα, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης ενδιαμέσων με σημαντικό βιοχημικό ρόλο.

Σχεδόν σε όλες τις πειραματικές διεργασίες που αφορούν την χημική κινητική χρησιμοποιείται ο νόμος ταχύτητας έπειτα από ολοκλήρωση. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι εκφράζεται με βάση το πειραματικά δεδομένα της συγκέντρωσης και του χρόνου. Αφετέρου δίνεται η δυνατότητα χρήσης ηλεκτρονικού υπολογιστή προκειμένου να γίνει εύρεση των αριθμητικών λύσεων στις περιπτώσεις πιο περίπλοκων μηχανισμών αντιδράσεων. Ακολουθεί ανάλυση μιας σειράς απλών περιπτώσεων που αφορούν τον νόμο της ταχύτητας.

#### a. Αντιδράσεις μηδενικής τάξης:

Για μία χημική αντίδραση μηδενικής τάξης ο νόμος ταχύτητας είναι της μορφής:

A  $\rightarrow$  products,  $v = -\frac{d[A]}{dt} = k_r$ 

Zeroth-order rate law

η συγκέντρωση του Α μειώνεται γραμμικά με τον χρόνο έως ότου αντιδράσει όλο το Α. Ο νόμος ταχύτητας έπειτα από ολοκλήρωση έχει την μορφή:

$[A] = [A]_0 - k_t for k_t < [A]_0$	Zeroth-order	
	integrated	
$[A] = 0 \text{ for } \kappa_{\rm r} t > [A]_0$	rate law	J

#### b. Αντιδράσεις πρώτης τάξης:

Για μία χημική αντίδραση πρώτης τάξης ο νόμος της ταχύτητας έχει την εξής μορφή:

$$A \rightarrow \text{products}, v = -\frac{d[A]}{dt} = k_r[A]$$

First-order rate law

Ο νόμος ταχύτητας έπειτα από ολοκλήρωση έχει την μορφή:

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k_r t$$
(First-order integrated rate law)

όπου το [A]<sub>0</sub> εκφράζει την αρχική συγκέντρωση του A. Δύο εναλλακτικές μορφές της εξίσωσης είναι οι εξής:

 $\ln [A] = \ln [A]_0 - k_r t$  (a)

 $[A] = [A]_0 e^{-k_r t}$  (b)

Παρατηρείται ότι η εξίσωση (a) εκφράζει εκθετική μείωση της συγκέντρωσης με την πάροδο του χρόνου *Εικόνα 3.1.1.* Ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των αντιδράσεων πρώτης τάξης, είναι ότι η συγκέντρωση του αντιδρώντος μειώνεται εκθετικά με το χρόνο.



**Εικόνα 3.1.1.** Η εκθετική μείωση της συγκέντρωσης του αντιδρώντος σώματος σε μία πρώτης τάξης αντίδραση. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της σταθεράς ταχύτητας, τόσο ταχύτερη είναι η μείωση (P.W. Ankins 2006).

Η εξίσωση (b) επιτρέπει την πρόβλεψη της συγκέντρωσης του Α για οποιαδήποτε χρονική στιγμή από την αρχή μιας αντίδρασης. Ωστόσο, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση για το αν μια αντίδραση είναι πρώτης τάξης και για τον προσδιορισμό της σταθεράς ταχύτητας. Η εξίσωση (a) επιτρέπει την πρόβλεψη της τάξης μέσω του γραφήματος ln[A] έναντι του t. Εάν η αντίδραση είναι πρώτης τάξης δημιουργείται μια ευθεία γραμμή *Εικόνα 3.1.2.* Εάν οι πειραματικές τιμές δεν δίνουν ευθεία γραμμή όταν εφαρμοστούν στην συγκεκριμένη εξίσωση τότε η αντίδραση δεν είναι πρώτης τάξης. Εάν η γραμμή είναι ευθεία τότε προκύπτει από την ίδια εξίσωση, της οποίας η κλίση είναι -kr, η σταθερά ταχύτητας μέσω του γραφήματος.



**Εικόνα 3.1.2.** Προσδιορισμός της σταθεράς ταχύτητας σε μία αντίδραση πρώτης τάξης. Λαμβάνεται ευθεία με κλίση –kr. Η ένωση που απεικονίζεται είναι η προπρανολόλη, ένας από τους πρώτους β-αναστολείς (P.W. Ankins 2006).

Αποτελεσματικός δείκτης του ποσοστού περαίωσης μιας χημικής αντίδρασης πρώτης τάξης είναι ο χρόνος ημιζωής, t<sub>1/2</sub>. Αποτελεί τον χρόνο που χρειάζεται για μειωθεί η αρχική συγκέντρωση ενός μορίου κατά το ήμισυ. Αντικαθιστώντας το [A] με <sup>1</sup>/<sub>2</sub> [A]0 και το t με t<sub>1/2</sub> στην εξίσωση του νόμου ταχύτητας πρώτης τάξης έπειτα από ολοκλήρωση, υπάρχει δυνατότητα εύρεσης του χρόνου ημιζωής της ένωσης A:

$$k_{\rm r}t_{1/2} = -\ln\frac{\frac{1}{2}[{\rm A}]_0}{[{\rm A}]_0} = -\ln\frac{1}{2} = \ln 2$$

Συνεπώς ισχύει η σχέση:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_r}$$

Half-life of a first-order reaction



**Εικόνα 3.1.3. α)** Η μοριακή συγκέντρωση της αναδιπλωμένης αιμοσφαιρίνης έπειτα από διαδοχικές μετρήσεις. **b)** Σε πρώτης τάξης αντίδραση, η συγκέντρωση του χημικού είδους σε κάθε διαδοχική χρονική περίοδο διάρκειας t<sub>1/2</sub>, μειώνεται κατά το ήμισυ της αρχικής τιμής κατά την περίοδο αυτή. Έπειτα από Ν περιόδους, η συγκέντρωση μειώνεται κατά (1/2)<sup>N</sup> της αρχικής συγκέντρωσης (P.W. Ankins 2006).

Παράδειγμα για την καλύτερη κατανόηση του χρόνου ημιζωής αποτελεί η αντίδραση μετουσίωσης της αιμοσφαιρίνης. Αποτελεί αντίδραση πρώτης τάξης. Επειδή η σταθερά ταχύτητας για την μετουσίωση της αιμοσφαιρίνης είναι 2.00 × 10-4 s-1 στους 60 °C, ο χρόνος ημιζωής της αναδιπλωμένης αιμοσφαιρίνης είναι 57.7 λεπτά. Συνεπώς, η αρχική συγκέντρωση της αναδιπλωμένης αιμοσφαιρίνης μειώνεται κατά το ήμισυ στα 57.7 λεπτά και στη συνέχεια στο μισό από αυτή την συγκέντρωση στα επόμενα 57.7 λεπτά. *Εικόνα 3.1.3. α, β.* 

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι αποτελεσματικός δείκτης του ποσοστού περαίωσης μιας χημικής αντίδρασης πρώτης τάξης είναι και η χρονική σταθερά τ. Αποτελεί τον χρόνο που χρειάζεται για μειωθεί η αρχική συγκέντρωση ενός είδους κατά 1/e. Αντικαθιστώντας το [A] με 1/e [A]0 και το t με τ στην εξίσωση του νόμου ταχύτητας πρώτης τάξης έπειτα από ολοκλήρωση προκύπτει η εξίσωση:

$$k_{\rm r}\tau = -\ln\left(\frac{[{\rm A}]_0/{\rm e}}{[{\rm A}]_0}\right) = -\ln\frac{1}{{\rm e}} = 1$$

Συνεπώς,

$$\tau = \frac{1}{k_{\rm r}}$$

Time constant of a first-order decay

Όσο μεγαλύτερη είναι η χρονική σταθερά τ μιας αντίδρασης πρώτης τάξης, τόσο πιο αργή είναι η μείωση της συγκέντρωσης των αντιδρώντων με την πάροδο του χρόνου.

#### c. Αντιδράσεις δεὑτερης τάξης:

Για μία χημική αντίδραση δεύτερης τάξης ο νόμος της ταχύτητας έχει την εξής μορφή:

 $A \rightarrow \text{products}$   $v = -\frac{d[A]}{dt} = k_r[A]^2$  Second-order rate law

Υποθέτοντας ότι η συγκέντρωση του A σε t=0 είναι [A]<sub>0</sub> και ο νόμος της ταχύτητας δεύτερης τάξης έπειτα από ολοκλήρωση έχει την εξής μορφή:

 $\frac{1}{[A]_0} - \frac{1}{[A]} = -k_r t$ 

Second-order integrated rate law

Προκύπτουν οι παρακάτω μορφές της εξίσωσης:

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k_r t \quad (c)$$
$$[A] = \frac{[A]_0}{1 + k_r t [A]_0} \quad (d)$$

Η εξίσωση δευτέρας τάξης έπειτα από ολοκλήρωση δείχνει ότι για να ελεγχθεί αν μια αντίδραση είναι δεύτερης τάξης, πρέπει η γραφική παράσταση 1/[A] έναντι του t να είναι μια ευθεία γραμμή. Εάν η απεικόνιση είναι ευθεία, τότε η αντίδραση είναι δεύτερης τάξης για την ένωση A και η κλίση της γραμμής είναι ίση με τη σταθερά ταχύτητας *Εικόνα 3.1.4*. Η εξίσωση (c) επιτρέπει την πρόβλεψη της συγκέντρωσης του A σε κάθε χρονική στιγμή από την έναρξη της αντίδρασης *Εικόνα 3.1.5.* Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του A πλησιάζει στο μηδέν με πολύ πιο αργό ρυθμό σε μια αντίδραση δεύτερης τάξης συγκριτικά με μια πρώτης τάξης *Εικόνα 3.1.6.* (P.W. Ankins 2006).



**Εικόνα 3.1.4** Προσδιορισμός της σταθεράς ταχύτητας σε αντίδραση δεύτερης τάξης. Η γραφική παράσταση του 1/[A] έναντι του t δίνει μία ευθεία γραμμή και η κλίση της ευθείας ισούται με k<sub>r</sub> (P.W. Ankins 2006).



**Εικόνα 3.1.5.** Οι αλλαγές που παρουσιάζει η καμπύλη της συγκέντρωσης του Α στην δεύτερης τάξης αντίδραση σε σχέση με τον χρόνο (P.W. Ankins 2006).



**Εικόνα 3.1.6.** Σύγκριση γραφήματος συγκέντρωσης προς χρόνο αντιδράσεων πρώτης και δεύτερης τάξης (P.W. Ankins 2006).

#### **3.2 Εξίσωση Arrhenius**.

Η γενική μορφή της εξίσωσης Arrhenius είναι η εξής:

$$\mathbf{k} = \mathbf{A} \ \mathbf{e}^{-\frac{\mathbf{E}a}{\mathbf{R}\mathbf{T}}}$$

όπου k είναι η σταθερά ταχύτητας, T η απόλυτη θερμοκρασία, Ea είναι η ενέργεια ενεργοποίησης, R η παγκόσμια σταθερά ιδανικών αερίων και A ο προεκθετικός όρος. Στα πλαίσια της χημικής κινητικής η σταθερά ταχύτητας k, θεωρείται σταθερά αναλογίας της συγκέντρωσης των αντιδρώντων σωματιδίων με αυτή των συνολικών σωματιδίων της αντίδρασης. Αποτελεί ένδειξη της ταχύτητας με την οποία αντιδρούν τα σώματα A και B σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

#### rate = k[A]<sup>a</sup>[B]<sup>b</sup>

Η σταθερά ταχύτητας k, της εξίσωσης Arhenius παραμένει σταθερή. Εφόσον αλλάξει η θερμοκρασία η σταθερά ταχύτητας επηρεάζεται. Η φυσική σημασία της ενέργειας ενεργοποίησης μπορεί να αποδοθεί, ως το ελάχιστο ποσό ενέργειας που απαιτείται για να ολοκληρωθεί μία αντίδραση **Εικόνα 3.2.1.** 



**Εικόνα 3.2.1.** Διάγραμμα προόδου μιας χημικής αντίδρασης καθώς τα αντιδρώντα σωματίδια μετατρέπονται σε προϊόντα, (P.W. Ankins 2006).

Από την Εικόνα 3.2.2. εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- 1. Η θερμοκρασία ενός χημικού συστήματος επηρεάζει την κατανομή των ενεργειών,
- Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία όλο και περισσότερα σωματίδια έχουν την δυνατότητα να υπερνικήσουν το ενεργειακό φράγμα προς σχηματισμό προϊόντων,
- Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται και η πιθανότητα ενός μορίου να αντιδράσει.



**Εικόνα 3.2.2.** Διάγραμμα συσχέτισης αριθμού σωματιδίων με την κινητική ενέργεια ενός συστήματος, (P.W. Ankins 2006).

Ο προεκθετικός παράγοντας ή αλλιώς προεκθετικός όρος Α είναι γνωστός και ως παράγοντας συχνότητας. Παρά το ότι είναι σύνηθες να περιγράφεται ως ανεξάρτητος από τη θερμοκρασία, στην πραγματικότητα εξαρτάται διότι σχετίζεται με τις μοριακές κρούσεις, οι οποίες συνδέονται άμεσα με τη θερμοκρασία *Εικόνα 3.2.3.* Οι μονάδες μέτρησης του προεκθετικού όρου Α εξαρτώνται από την τάξη της αντίδρασης και κατ' επέκταση από τις μονάδες της σταθεράς ταχύτητας της αντίδρασης. Σε αντίδραση πρώτης τάξης, η μονάδα μέτρησης του προεκθετικού όρου είναι s<sup>-1</sup>. σχετίζεται με την συχνότητα των κρούσεων των αντιδρώντων σωμάτων καθώς και με τον ευνοϊκό προσανατολισμό αυτών ώστε να μπορέσει να επέλθει κρούση. Αποτελεί το μέτρο του ποσοστού επιτυχίας μιας αντίδρασης (P.W. Ankins 2006; Chang 2005).



**Εικόνα 3.2.3.** Προκειμένου να επέλθει κρούση, η κινητική ενέργεια των σωμάτων κατά μήκος της τροχιάς της κρούσης πρέπει να υπερβαίνει την ελάχιστη τιμή της Ε<sub>α</sub>. Λαμβάνεται υπόψη η κινητική ενέργεια (ή ταχύτητα) που βρίσκεται στην γραμμή κρούσης ενώ οι άλλες συνιστώσες δεν συμμετέχουν ενεργειακά, (P.W. Ankins 2006).

#### 3.3 Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius.

Στους υπολογισμούς γίνεται χρήση της γραμμικής μορφής της εξίσωσης Arrhenius η οποία έχει ως ακολούθως:

$$lnK = -\frac{Ea}{R}\frac{1}{T} + lnA$$

όπου Εα είναι η ενέργεια ενεργοποίησης και εκφράζεται σε Kcal mol<sup>-1</sup> ή KJ mol<sup>-1</sup>, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin (K), K είναι η σταθερά ταχύτητας s<sup>-1</sup>, A ο προεκθετικός παράγοντας s<sup>-1</sup> και R η παγκόσμια σταθερά ιδανικών αερίων (1.9872036(11)×10<sup>-3</sup> kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>). Η συγκεκριμένη απεικόνιση της εξίσωσης Arrhenius είναι της μορφής y=ax+b και αποτελεί μια ευθεία της οποίας η κλίση είναι ο λόγος  $-\frac{E\alpha}{R}$ .



Εικόνα 3.3.1. Γραφική παράσταση της εξίσωσης Arrhenius, (P.W. Ankins 2006).

#### **3.4 Εξίσωση Eyring.**

Τόσο η εξίσωση Arrhenius όσο και η εξίσωση Eyring περιγράφουν την εξάρτηση της ταχύτητας μιας αντίδρασης από τη θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, η εξίσωση Arrhenius μπορεί να εφαρμοστεί μόνο στην κινητική των αντιδράσεων των μορίων σε αέρια φάση, ενώ η Eyring μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την μελέτη αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε διάλυμα ή σε αντιδράσεις μεικτής φάσης, εκεί δηλαδή όπου δεν ισχύει η απλή θεωρία των κρούσεων. Επιπλέον η εξίσωση Arrhenius βασίζεται στην εμπειρική παρατήρηση της ταχύτητας μιας αντίδρασης και την άμεση συσχέτισή της με τη θερμοκρασία (Chang 2005).

Η εξίσωση Eyring αναπτύχθηκε από τον Henry Eyring το **1935** και βασίζεται στη θεωρία του μεταβατικού σταδίου. Σύμφωνα με την θεωρία του μεταβατικού σταδίου τα αντιδρώντα σώματα έρχονται σε επαφή και εάν η ενέργεια του κάθε σώματος είναι επαρκής σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο, *Εικόνα 3.4.1.* Στην συνέχεια κάποια από αυτά μετατρέπονται σε προϊόντα.



**Εικόνα 3.4.1.** Σχηματισμός ενδιαμέσου συμπλόκου, σύμφωνα με την θεωρία της μεταβατικής κατάστασης, (P.W. Ankins 2006).

Πιο συγκεκριμένα με την εξίσωση Eyring δίνεται η δυνατότητα για ακριβέστερο υπολογισμό της σταθεράς ταχύτητας μιας αντίδρασης σε σχέση με την Arrhenius και παρέχει μια σαφή εικόνα για το πώς προχωρά μια αντίδραση σε μοριακό επίπεδο. Η εξίσωση έχει την μορφή:

$$k=\frac{k_BT}{h}e^{-\frac{\bigtriangleup H^{\frac{3}{4}}}{BT}}e^{\frac{\bigtriangleup S^{\frac{3}{4}}}{B}} \quad \text{(i)}$$

Έστω ότι αντιδρούν δύο μόρια Α, Β και παράγεται το προϊόν C, τότε ισχύει:

$$K = \frac{[C]}{[A][B]}$$
 (iii)

 $A \rightarrow D \rightarrow C$ 

Κ είναι η σταθερά ισορροπίας και εκφράζεται ως αναλογία των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων και του προϊόντος. Στη μεταβατική κατάσταση **Εικόνα 3.4.2.** 

σχηματίζεται το ενεργοποιημένο σύμπλοκο (ασταθές ενδιάμεσο) AB<sup>±</sup>, άρα αντίστοιχα ισχύει :

$$A + B \rightleftharpoons AB^{\dagger} \rightarrow C$$
 (iv)  
 $K^{\ddagger} = \frac{[AB]^{\ddagger}}{[A][B]}$  (v)

Η ταχύτητα της αντίδρασης ισούται με τον αριθμό των ενεργοποιημένων συμπλόκων που διασπώνται προς σχηματισμό προϊόντων. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση του συμπλόκου με την υψηλότερη ενέργεια πολλαπλασιάζεται με τη συχνότητα αυτού προκειμένου να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα.

$$\begin{array}{rcl} rate &=& v[AB^{\ddagger}] & \mbox{(vi)} \\ &=& v[A][B]K^{\ddagger} & \mbox{(vii)} \end{array}$$

Η ταχύτητα μπορεί να ξαναγραφεί:

$$rate = k[A][B]$$
 (viii)

και έπειτα από συνδυασμό των (vii) και (viii) προκύπτει:

$$\begin{split} k[A][B] &= v[A][B]K^{\ddagger} & \text{(ix)} \\ k &= vK^{\ddagger} & \text{(x)} \end{split}$$

όπου **u** είναι η συχνότητα δόνησης, **k** είναι η σταθερά ταχύτητας και **K**<sup>‡</sup> είναι η θερμοδυναμική σταθερά ισορροπίας.

Επιπλέον η σχέση που μέσω της οποίας υπολογίζεται η συχνότητα δόνησης **u** είναι η εξής:

$$v = rac{k_BT}{h}$$
 (xi)

όπου **k**<sub>B</sub> είναι η σταθερά του Boltzmann (1.381 x 10<sup>-23</sup> J/K), **T** η απόλυτη θερμοκρασία σε μονάδες Kelvin (K) και **h** είναι η σταθερά του Planck (6.626 x 10<sup>-34</sup> Js). Από την αντικατάσταση της **(xi)** στην εξίσωση **(x)** προκύπτει:

$$k = \frac{k_B T}{h} K^{\ddagger}$$
 (xii)

Ακολουθεί απεικόνιση δύο βασικών θερμοδυναμικών εξισώσεων:

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln K^{\ddagger} \quad \text{(xiv)}$$
  
$$\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger} \quad \text{(xv)}$$

όπου ως **ΔG**<sup>\*</sup> (kJ · mol<sup>-1</sup>) συμβολίζεται η ενέργεια Gibbs του ενδιαμέσου σταδίου, ως **ΔH**<sup>\*</sup> (kJ · mol<sup>-1</sup>) η ενθαλπία, ως **ΔS**<sup>\*</sup> (J · mol<sup>-1</sup> · K<sup>-1</sup>) η εντροπία και R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.3145 J/mol K). Συνδυασμός των εξισώσεων (x) και (xi) και επίλυση ως προς InK\*:

$$\ln K^{\ddagger} = -\frac{\Delta H^{\ddagger}}{RT} + \frac{\Delta S^{\ddagger}}{R} \quad (xvi)^{*}$$

Τέλος η εξίσωση **Eyring**, προκύπτει από αντικατάσταση της εξίσωσης **(xii)** στην εξίσωση **(ix)** ως εξής :

$$k = rac{k_BT}{h}e^{-rac{\Delta H^{\ddagger}}{RT}}e^{rac{\Delta S^{\ddagger}}{R}}$$
 (xvii)



**Εικόνα 3.4.2.** Ενεργειακό διάγραμμα της αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης (SN<sub>2</sub>) μεταξύ του βρωμομεθανίου και του ανιόντος υδροξειδίου προς σχηματισμό μεθανόλης και βρωμίου. Απεικονίζεται το ενεργειακό φράγμα καθώς και η ενέργεια ενεργοποίησης, που αποτελεί το απαιτούμενο ποσό ενέργειας έτσι ώστε να μπορέσει να έρθει εις πέρας η αντίδραση. Στη μεταβατική κατάσταση, στο σημείο της μέγιστης ενέργειας, σχηματίζεται το ασταθές ενδιάμεσο , **AB**<sup>\*</sup>.

Ακολουθεί σύντομη περιγραφή της φυσικής σημασίας των κύριων όρων της εξίσωσης:

- ΔG: η μέγιστη ποσότητα του μη εκτατού έργου που μπορεί να εξαχθεί από ένα κλειστό σύστημα. Στο συγκεκριμένο σύστημα λαμβάνει χώρα ανταλλαγή θερμότητας και έργου με το αντίστοιχο περιβάλλον, αλλά όχι ύλη. Οι διεργασίες πραγματοποιούνται υπό σταθερή θερμοκρασία και πίεση, ενώ υπόκειται στην εφαρμογή εξωτερικών παραγόντων, όπως η ηλεκτρική και μαγνητική ενέργεια.
- ΔΗ: θερμοδυναμικό μέγεθος που αντιπροσωπεύει το ολικό ποσό θερμότητας που περιέχει ένα θερμοδυναμικό σύστημα.
- S: είναι η έννοια μέσω της οποίας μετράται η αταξία. Η μέγιστη τιμή της αντικατοπτρίζει την πλήρη αποδιοργάνωση και ομογενοποίηση των πάντων, ενώ ισοδυναμεί με την παύση της ζωής ή της εξέλιξης.

**ΔS:** ἐπειτα από αφαίρεση της ἐννοιας της πληροφορίας που δεν είναι αντικειμενικά μετρήσιμη, η μορφή εντροπίας αφορά μόνο θερμικές μεταβολές, υπολογίζεται και είναι σαφώς ορισμένη εκτατή μεταβλητή ενός θερμοδυναμικού συστήματος.

#### 3.5 Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring

Στους υπολογισμούς γίνεται χρήση της γραμμικής μορφής της εξίσωσης Eyring η οποία έχει ως ακολούθως:

$$ln\frac{K}{T} = -\frac{\Delta H^{\frac{1}{2}}}{R}\frac{1}{T} + ln\frac{kB}{h} + \frac{\Delta S^{\frac{1}{2}}}{R}$$

όπου ΔG<sup>‡</sup> είναι η ενέργεια Gibbs της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης (Kcal mol <sup>-1</sup>) ή (KJ mol<sup>-1</sup>), ΔH<sup>‡</sup> είναι η ενθαλπία της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης (Kcal mol<sup>-1</sup>) ή (KJ mol<sup>-1</sup>) και ΔS<sup>‡</sup> είναι η εντροπία της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>) ή (J mol<sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>). Η k<sub>B</sub> είναι η σταθερά Boltzmann και ισούται με (1.381 x 10<sup>-23</sup> J K <sup>-1</sup>) ή (0,32984183 x 10<sup>-3</sup> x 10<sup>-23</sup> Kcal K <sup>-1</sup>), Τ είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin (K), K η σταθερά ταχύτητας σε (s<sup>-1</sup>), R η παγκόσμια σταθερά του Planck (6.626 x 10<sup>-34</sup> Js) ή (1,582611 x 10<sup>-3</sup> x 10<sup>-34</sup> kcal s).

Ο προσδιορισμός των τιμών **ΔΗ**<sup>\*</sup> και **ΔS**<sup>\*</sup> γίνεται από τα κινητικά δεδομένα που λαμβάνονται από την γραφική παράσταση  $\ln \frac{k}{T}$  έναντι της τιμής  $\frac{1}{T}$ . Η γραφική παράσταση της εξίσωσης *Εικόνα 3.5.1.* είναι μια ευθεία γραμμή με αρνητική κλίση,  $-\frac{\Delta H_{\ddagger}}{R}$ , και επιπρόσθετο όρο b την τιμή  $\frac{\Delta S_{\ddagger}}{R} + \ln \frac{kB}{h}$  (Chang 2005).



Εικόνα 3.5.1. Γραφική παράσταση της εξίσωσης Eyring.

#### **3.6** Ab Initio Υπολογισμοί.

Οι ab initio υπολογισμοί σε μόρια ξεκίνησαν από τους Heitler – London το 1927 όταν επιχείρησαν να μελετήσουν το H<sub>2</sub> και το 1950 προχώρησαν τις μελέτες τους και σε μεγαλύτερα μόρια, καθώς επήλθε ανάπτυξη καταλληλότερων μηχανημάτων. Όλο και περισσότεροι ab initio υπολογισμοί άρχισαν να πραγματοποιούνται από τα τέλη του 1960, οπότε μελετήθηκαν πολυατομικά μόρια με μεθόδους υπολογισμού ηλεκτρονιακής πυκνότητας που βασίζονται στο αυτοσυνεπές πεδίο, Self Consistent Field (SCF) και στη θεωρία συναρτησιακών πυκνοτήτων, Density Functional Theory (DFT).

Οι σημαντικότεροι ab initio υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση της ενέργειας θεμελιώδους κατάστασης του H<sub>2</sub>. Σταθμό σε αυτούς τους υπολογισμούς αποτέλεσαν αυτοί των James και Coolidge το 1933. Οι συγκεκριμένοι επιστήμονες, ελάττωσαν το σφάλμα κατά μία τάξη μεγέθους. Οι τελευταίοι υπολογισμοί στο ίδια θέμα έγιναν από τους Kolos και Roothaah το 1960 και στην συνέχεια από τους Kolos-Wolniewicz, οι οποίοι πέτυχαν βελτίωση κατά μία τάξη μεγέθους και κατέληξαν το 1967 να έχουν ουσιαστικά ακριβή αποτελέσματα.

Οι υπολογισμοί ab initio γίνονται με ηλεκτρονικό υπολογιστή σε περιπτώσεις ημιεμπειρικών θεωριών, προκειμένου να γίνει επικύρωση των εννοιών της θεωρίας σθένους δεσμού. Τέτοιοι υπολογισμοί έχουν επίσης την δυνατότητα να προβλέπουν αριθμητικές τιμές μετρήσιμων ποσοτήτων, που αποτελούν σημαντική βοήθεια σε επίπεδο πειραματικών μελετών καθώς έτσι ορίζεται η κατεύθυνση μελλοντικών πειραμάτων ή αποτρέπεται η διεξαγωγή πειραμάτων τα οποία οδηγούν σε άτοπο.

Το πλεονέκτημα που έχουν οι μέθοδοι ab initio έναντι των ημιεμπειρικών μεθόδων υπολογισμού, είναι η μεγάλη δυνατότητα τους προς βελτίωση. Σε πολλά ημιεμπειρικά μοντέλα δεν υπάρχει τρόπος για βελτιώσεις, και η αξιοπιστία μιας πρόβλεψης εκτιμάται από το πόσες φορές το μοντέλο αποδεικνύεται σωστό, και πόσες φορές λανθασμένο.

Οι ημιεμπειρικοί υπολογισμοί δίνουν ενέργειες που μπορούν να είναι υψηλότερες ή χαμηλότερες από τις ακριβείς. Η βελτίωση ενός υπολογισμού ab initio (τουλάχιστον για τη θεμελιώδη κατάσταση ή γενικότερα για την χαμηλότερη κατάσταση μιας δεδομένης συμμετρίας) θα μετατοπίσει τις ενέργειες πάντοτε προς τα κάτω και πλησιέστερα προς την πραγματική ενέργεια. (Murrell John N. Kettle Sydney F. Tedder John M. 2006).

### 4ο Κεφάλαιο - Φλαβονοειδή

#### 4.1 Φλαβονοειδή.

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια οικογένεια περισσοτέρων από 6.500 νωνέμωιλυδοοδυ πολυφαινολικών ενώσεων συγκαταλέγονται каі στους δευτερογενείς φυτικούς μεταβολίτες εκτελώντας λειτουργίες όπως η προσέλκυση εντόμων επικονιαστών, η καταπολέμηση βλαβερών μικροβιακών μολύνσεων και η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης στα φυτά (Shashank and Abhay 2013). Η βιοδιαθεσιμότητα και η βιολογική τους δράση στον άνθρωπο φαίνεται ότι επηρεάζεται έντονα από τη χημική τους σύσταση. Από τη δεκαετία του 1990, ξεκίνησε η αυξημένη ζήτηση των διαιτητικών φλαβονοειδών λόγω της πιθανούς συμβολής τους στην υγεία του ανθρώπου μέσω διατροφής πλούσιας σε φρούτα και λαχανικά. Είναι σημαντικό λοιπόν να αναφερθεί ο ρόλος των διαιτητικών φλαβονοειδών στην υγεία και στην πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο.

#### 4.2 Υποκατηγορίες φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε δώδεκα μεγάλες υποκατηγορίες με βάση την χημική τους δομή, έξι εκ των οποίων, είναι οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβονόλες, οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες καθώς και οι ισοφλαβόνες. *Εικόνα 4.2.1., Εικόνα 4.2.2., Πίνακας 4.2.3.* Οι γλυκοσυλιωμένες φλαβονόλες συνδέονται με τουλάχιστον ένα μόριο σακχάρου και αποτελούν την πιο διαδεδομένη υποκατηγορία φλαβονοειδών στη διατροφή (Xiao et al. 2013; Manach C, Scalbert A, Morand C 2004).



Εικόνα 4.2.1 Ταξινόμηση φλαβονοειδών σε έξι μεγάλες κατηγορίες βάση την χημική τους δομή.



Εικόνα 4.2.2 Ταξινόμηση φλαβονοειδών σε κατηγορίες και υποκατηγορίες με βάση τη χημική τους δομή.

(Πίνακας 4.2.3) Υποκατηγορίες φλαβονοειδών-δομή-διατροφικές πηγές			
Υποκατηγορἱα Φλαβονοειδών – Δομἡ Φλαβονοειδών	Φλαβονοειδή στη Διατροφή	Διατροφικἑς Πηγἑς	
Ανθοκυανιδίνες*	R1=H, R2=H: <b>Πελαργονιδίνη</b> R1=OH, R2=H <b>: Κυανιδίνη</b> R1=R2=OH: <b>Δελφινιδίνη</b> R1=OCH3, R2=OH: <b>Πετουνιδίνη</b> R1=R2=OCH3: <b>Μαλβιδίνη</b>	Μελιτζάνες, ραπανάκια Κόκκινο κρασί, φασόλια, μούρα Ρόδια, κεράσια, μούρα Κεράσια, φράουλες Κεράσια, μούρα, φραγκοστάφυλο	
$Φλαβανόλες  \begin{array}{c}                                     $	Μονομερή-Κατεχίνες: (Δομή α) R1=H, R2=R3=OH: (+)-Κατεχίνη (Δομή β) R1=H, R4=OH: (-)-Επικατεχίνη R1=OH, R4=OH: (-)- Επιγαλλοκατεχίνη R1=H, R4=Άλας Γαλικού Οξέος: Γαλλικό Άλας της (-)- επικατεχίνης R1=OH, R4= Άλας Γαλικού Οξέος : Γαλλικό Άλας της (-)-Γάλλο επιγαλλοκατεχίνης R1=OH, R4=ΟH: (+)- Γαλλοκατεχίνη R1=H, R4= Άλας Γαλικού Οξέος : Γαλλικό άλας της (+)- Γάλλοκατεχίνης R1=OH, R4=Gal late: Γαλλικό άλας	Τσάι (κυρίως στο λευκό, στο πράσινο και στο μαύρο τέιον), προϊόντα με βάση το κακάο , σταφύλια, μούρα, μήλα	

HO + GH + OH + HO + GH + OH + OH + OH +	Διμερή και Πολυμερή: Προανθοκυανιδίνες	Μούρα, μήλα , προϊόντα με βάση το κακάο, κόκκινα σταφύλια, κόκκινο κρασί
$HO \qquad OH \qquad HO \qquad OH \qquad OH \qquad HO \qquad OH \qquad$	Θειαφλαβίνες, θειαρουβιγίνες	Μαύρο τσάι
Φλαβονόλες HO HO OH O HO OH O HO OH O HO OH O HO OH O	R1=OCH <sub>3</sub> , R2=OH, R3=H: <b>Ισοραμνετίνη</b> R1=H, R2= OH, R3=H: <b>Καεμφερόλη</b> R1=OH, R2= OH, R3=H: <b>Κερσετίνη</b> R1=OH, R2= OH, R3=OH: <b>Μυρισετίνη</b>	Κρεμμύδια, κρεμμυδάκια, λάχανο, μπρόκολο, φλούδα μήλου, μούρα, τσάι, ελαιόλαδο
Φλαβόνες HO R1 OH OH OH OH OH OH OH OH OH OH	R1=H, R2=OH, R3=H: <b>Απιγενίνη</b> R1=H, R2=OH, R3=OH: <b>Λουτεολίνη</b> R1=OH, R2=H, R3=H: <b>Βαϊκαλεϊνη</b> R1=H, R2=H, R3=H <b>: Χρυσίνη</b>	Μαϊντανός, θυμάρι, σἑλινο, καυτερή πιπεριά, σἑλινο, κρεμμύδια


#### 4.3 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φλαβονοειδών

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των φλαβονοειδών που απαντώνται εκτός των άλλων και στη διατροφή, είναι η επιλεκτική απορρόφησή τους από συγκεκριμένα όργανα του ανθρωπίνου σώματος. Μετά την εντερική απορρόφησή τους, έχουν την δυνατότητα να μεταβολίζονται ταχέως και εξολοκλήρου στα εντερικά και ηπατικά κύτταρα, ενώ σε επόμενο στάδιο υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης τους ως μεταβολίτες φάσης ΙΙ, στην κυκλοφορία του αίματος και στα ούρα (Rothwell et al. 2016). Οι βιολογικές ιδιότητες αυτών των μεταβολιτών ενδέχεται να είναι διαφορετικές από εκείνες των μητρικών τους ενώσεων (Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A 2012).

#### 4.4 Βιοσυνθετική πορεία φλαβονοειδών.

Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών ως πρωταρχικό στάδιο έχει την συμπύκνωση ενός μορίου 4-κουμαρόυλο - CoA και τριών μορίων μηλόνυλο - CoA, προς σχηματισμό της χαλκόνης της ναρινγενίνης. Η αντίδραση αυτή διεξάγεται από το ένζυμο συνθάση της χαλκόνης (CHS). Η χαλκόνη ισομεριώνεται σε μια φλαβανόνη από το ένζυμο ισομεράση της χαλκόνης φλαβανόνης (CHI). Από το κάθε ενδιάμεσο που σχηματίζεται μπορεί να συντεθεί και μια διαφορετική κατηγορία φλαβονοειδών. Η φλαβονόνη 3-υδροξυλάση (F3H) καταλύει τη στερεοεκλεκτική 3β-υδροξυλίωση της (2S)-φλαβανόνης σε διϋδροφλαβονόλες. Για τη σύνθεση ανθοκυανινών, η διϋδροφλαβονυλο αναγωγάση (DFR) καταλύει την αναγωγή προς φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίδινης (ANS). Ο σχηματισμός των γλυκοζιτών καταλύεται από την UDP γλυκόζη-φλαβονοειδο-3-Ο-γλυκόζυλο τρανσφεράση (UFGT), η οποία σταθεροποιεί την ανθοκυανιδίνη με 3-Ο-γλυκοζυλίωση (Winkel-Shirley 2002).



Εικόνα 4.4.1 Βιοσυνθετική πορεία φλαβονοειδών, (Πηγή <u>www.kegg.jp</u>).

#### 4.5 Χημική δομή των φλαβονοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει τη μεταβολική πορεία και τη βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών είναι η χημική τους δομή. Τα περισσότερα φλαβονοειδή απαντώνται σε βρώσιμα φυτά και τρόφιμα με την β-γλυκοζιτική μορφή, συνδεδεμένα με ένα ή περισσότερα μόρια γλυκοζιτών (Williamson 2003). Εξαίρεση αποτελούν οι φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες) καθώς και τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στη σόγια (ισοφλαβόνες) και έχουν υποστεί ζύμωση. Κατά την διαδικασία της ζύμωσης, τα ένζυμα β-γλυκοσιδάσες, υδρολύουν τα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή, με συνέπεια την αποδέσμευση τους από τους γλυκοζίτες τους (Németh et al. 2003).

Τα φλαβονοειδή που βρίσκονται στην γλυκοζιτική τους δομή είναι τόσο σταθερά που ακόμη και αν υποστεί μεταποίηση το τρόφιμο στο οποίο βρίσμονται ή αν μαγειρευτεί, τα περισσότερα από αυτά φτάνουν στο λεπτό έντερο ανέπαφα (Gonzales et al. 2015). Εκτιμάται ότι τα γλυκοσυλιωμένα φλαβονοειδή αρχικά διεισδύουν από το στρώμα βλέννας του εντέρου και αποδεσμεύονται από τον ή τους γλυκοζίτες τους πάνω στην κυτταρική επιφάνεια πριν ακολουθήσει η απορρόφηση τους. Τα φλαβονοειδή που δεν μπορούν να απογλυκοζυλιωθούν στο λεπτό έντερο κατά πάσα πιθανότητα υδρολύονται με την βοήθεια βακτηριακών ενζύμων στο κόλον (Németh et al. 2003). Έπειτα από την υδρόλυσή τους ακολουθεί τάχιστη αποικοδόμηση των ἀγλυκων φλαβονοειδών, περιορίζοντας ἐτσι την απορρόφησή αυτών από το παχύ ἐντερο (Monagas, Urpi-sarda, and Fernando 2010).

Συνήθως τις προανθοκυανιδίνες τις συναντούμε σαν πολυμερή. Πιθανότατα σε αυτή την μορφολογική ιδιαιτερότητα οφείλεται το γεγονός ότι δεν απορροφώνται από το έντερο. Αντίθετα οι φλαβαν-3-όλες και οι προκυανιδίνες είναι μονομερή, συνεπώς μπορούν να απορροφηθούν από το έντερο, καθώς μετασχηματίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα σε 5-(υδροξυφαίνυλο)-γ-βαλερολακτόνες. Οι τελευταίες απεκκρίνονται στα ούρα με τη μορφή του θειϊκού άλατος , αλλά και ως γλυκουρονιδικοί μεταβολίτες **Εικόνα 4.5.1**.



**Εικόνα 4.5.1.** Δομές μερικών μεταβολιτών.

Σε επόμενο στάδιο οι βαλερολακτόνες αποικοδομούνται περαιτέρω από την κολονική μικροχλωρίδα σε μικρότερα φαινολικά οξέα και αρωματικές ενώσεις. Η κολονική μικροχλωρίδα μεταβολίζει και τους εστέρες γαλλικού οξέος των φλαβονοειδών που ανήκουν στην υποκατηγορία της φλαβαν-3-όλης, δημιουργώντας άλας γαλλικού οξέος, το οποίο καταβολίζεται περαιτέρω σε πυρογαλλόλη. Οι φλαβονοειδικοί μεταβολίτες οι οποίοι προέρχονται από μικροοργανισμούς, απορροφώνται εντός του κυκλοφορικού συστήματος και απεκκρίνονται αμφότερα και σε ελεύθερη μορφή και ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα ούρα (Monagas, Urpisarda, and Fernando 2010).

#### 4.6 Πρόσδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος.

Η βιοδιαθεσιμότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγγένεια δέσμευσης σε πρωτεΐνες (Xiao et al. 2013). Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια δέσμευσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και ενδεχομένως μικρότερη βιοδιαθεσιμότητα στην κυκλοφορία του αίματος. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχει άμεση συσχέτιση της συγγένειας δέσμευσης με τα δομικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν και πιο συγκεκριμένα με την ύπαρξη μεθυλομάδων, γαλλικού οξέος και άλατος γαλλικού οξέος. Η γλυκοζυλίωση ενδέχεται να μειώνει τη συγγένεια 76 πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αγλυκόνες έχουν περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή. Πιστεύεται ότι η γλυκουρονιδίωση διευκολύνει την απέκκριση των φλαβονοειδών από το σώμα, αλλά παράλληλα τα γλυκουρονίδια δείχνουν μικρή συγγένεια με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Συνεπώς είναι δυνατό να διαχέονται σε ιστούς-στόχους, όπου μπορεί να λάβει χώρα απογλυκουρονιδίωση (Gonzales et al. 2015).

#### 4.7 Βιολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή είναι γνωστά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι αντιβακτηριδιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και οι αντιηπαροτοξικές δράσεις. Δρουν κατά της αρτηριοσκλήρυνσης, έχουν αντιαλλεργική δράση, κατά της οστεοπόρωσης και έχουν την ικανότητα να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, και να αναστέλλουν την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, ενώ υπάρχουν αναφορές για αντικαρκινική δράση (Akao, itoh, Ohguchi, Iinuma, & Nozawa, 2008; Benavente-Garcia & Castillo, 2008; Patel, Shukla, & Gupta, 2007)

#### 4.8 Άμεση αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών.

Τα φλαβονοειδή δεσμεύουν αποτελεσματικά ελεύθερες ρίζες σε in vitro δοκιμές (Chun, Kim, and Lee 2003; Heijnen et al. 2001). Ωστόσο, ακόμη και αν γίνει πρόσληψη αρκετά μεγάλης ποσότητας φλαβονοειδών από τον άνθρωπο, η συγκέντρωση των τελευταίων στο πλάσμα καθώς και η συγκέντρωσή τους μέσα στα κύτταρα προβλέπεται ότι είναι 100 έως 1000 φορές μικρότερη από τις συγκεντρώσεις των άλλων αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το ουρικό οξύ και η γλουταθειόνη. Τα περισσότερα φλαβονοειδή που απαντώνται στο σώμα είναι με τη μορφή μεταβολιτών και κατ' επέκταση μερικά από αυτά έχουν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα στην αρχική τους μορφή (Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A 2012) Για τους παραπάνω λόγους, η σχετική συμβολή των διαιτητικών φλαβονοειδών στην in vivo αντιοξειδωτική λειτουργία του πλάσματος και των ιστών είναι σχεδόν αμελητέα (Blumberg 2003; Lotito and Frei 2006; Williams, Spencer, and Rice-Evans 2004).

# 4.9 Βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών και πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων.

Τα φλαβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι **(1)** καταπολεμούν την φλεγμονή μέσω καταστολής της έκφρασης προφλεγμονωδών μεσολαβητών, (Espley et al. 2014; Kim et al. 2011; S. G. Lee et al. 2014), **(2)** καταστέλλουν την έκφραση των πρωτεϊνών αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης (vasculae cell adhesion molecules)

οι οποίες συμβάλλουν στην πρόσληψη λευκών αιμοσφαιρίων από το αίμα προς το αρτηριακό τοίχωμα κατά τη διάρκεια φλεγμονής και κατ' επέκταση τα λευκοκύτταρα δεν έχουν δυνατότητα πρόσδεσης στα αρτηριακά τοιχώματα, (Mauray et al. 2012; Wang, Izawa, and Stahl 2014), **(3)** αυξάνουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από την ενδοθηλιακή συνθάση μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), βελτιώνοντας έτσι την αγγειακή ενδοθηλιακή λειτουργία, (Edirisinghe et al. 2011), **(4)** αναστέλλουν το ένζυμο το οποίο μετατρέπει την αγγειοπιεστίνη (ADH), επάγοντας έτσι την αγγειακή χαλάρωση, (Hidalgo, Isidra, and Pascual-teresa 2012), **(5)** αναστέλλουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (X.-Q. Chen et al. 2013) και τέλος **(6)** περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την μετανάστευση η οποία επέρχεται κατά τη διάρκεια της αθηρογένεσης (Ahmad, Khan, and Alkharfy 2013).

#### 4.10 Βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών, πρόληψη διαβήτη.

Πολλά αποτελέσματα ερευνών έχουν αποδείξει ότι τα φλαβονοειδή επηρεάζουν τη διαδικασία της πέψης, της απορρόφησης και το μεταβολισμό των υδατανθράκων (Hanhineva et al. 2010). Δεν παραλείπεται η αναφορά στις αντιδιαβητικές ιδιότητες που έχουν βρεθεί ότι διαθέτουν κάθε μία ξεχωριστά από τις έξι υποκατηγορίες αυτών. Έχει αναφερθεί ότι (1) βελτιώνουν την έκκριση ινσουλίνης και τη βιωσιμότητα των παγκρεατικών β-κυττάρων υπό γλυκοτοξικές ή προφλεγμονώδεις συνθήκες, (2) αυξάνουν την πρόσληψη της ινσουλινοεξαρτώμενης γλυκόζης από τα κύτταρα-στόχους και (3) προστατεύουν τα μυϊκά κύτταρα έναντι της επαγόμενης από τα λιπαρά οξέα αντίστασης στην ινσουλίνη. Έρευνες υποστηρίζουν ακόμη ότι τα φλαβονοειδή βοηθούν στη μείωση της υπεργλυκαιμίας και βελτιώνουν την ανοχή στη γλυκόζη σε ζωικά μοντέλα παχυσαρκίας ή / και σε ζωικά μοντέλα σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Tech 2014).

#### 4.11 Βιολογικές ιδιότητες φλαβονοειδών, πρόληψη του καρκίνου.

Τα φλαβονοειδή έχει διαπιστωθεί ότι **(1)** εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οι οποίες μπορούν να βλάψουν μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένου και του DNA (Delgado et al. 2008; Erba et al. 2012), **(2)** επεμβαίνουν στα ένζυμα βιομετασχηματισμού και στους μεταφορείς εκροής, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων χημικών ουσιών και βοηθούν στην απέκκριση τους (Schwarz, Kisselev, and Roots 2005; Moon, Wang, and Morris 2006), **(3)** ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, και την επιδιόρθωση του DNA ενώ παράλληλα μπορούν να ενεργοποιούν αποπτωτικά μονοπάτια (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) σε περίπτωση μη αναστρέψιμης βλάβης του DNA (Suh et al. 2009). Τέλος, έπειτα από αποτελέσματα ερευνών βοηθούν στην αναστολή του προμεταστατικού σταδίου και της αγγειογένεσης (Ravishankar et al. 2015; Santos et al. 2015).

#### 4.12 Βιολογικές ιδιότητες του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη.

Από ἑρευνες που ἑχουν πραγματοποιηθεί, αποδείχθηκε ότι η ταξιφολίνη **(1)** παρουσιάζει αντι-ϊκή δράση, αποδεκτές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, μειώνει την συγκέντρωση της LDL- χοληστερόλης στον ορό του αίματος και στο ήπαρ, (Raj and Kumar 2015), **(2)** των επαγόμενων από ακτινοβολία δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) (Arutyunyan et al. 2016), **(3)** ἑχει αντι-φλεγμονώδη δράση (Gupta et al. 1971) και **(4)** αντιοξειδωτικές και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις ἑναντι διαφορετικών καρκινικών κυττάρων, (Z. R. Zhang et al. 2012; Brusselmans et al. 2005; Pardede and Koketsu 2017). Ειδικότερα ἑχει διαπιστωθεί ότι **(5)** αναστἑλλει την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, και τελευταίες ἑρευνες ἑχουν αποδείξει ότι **(6)** αλληλεπιδρά ἁμεσα με την πρωτεϊνη αλβουμίνη (BSA), (Shi et al. 2010; Y. Zhang et al. 2011; Mohseni-shahri et al. 2016).

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5ο Κεφάλαιο-Σκοπός του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

Κατά την διάρκεια της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (ΜΔΕ) ταυτοποιήθηκαν τα πρωτόνια του πρωτονίου του C-6 και του πρωτονίου του C-8 της (+)-ταξιφολίνης, της ναρινγενίνης και της εριοδικτυόλης και μελετήθηκαν οι αντίστοιχες δομές με φασματοσκοπία 1D <sup>1</sup>Η και 2D <sup>1</sup>Η-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>Η-<sup>13</sup>C HMBC, <sup>1</sup>Η-<sup>1</sup>Η NOESY NMR και DFT θεωρητικούς υπολογισμούς. Τα πειραματικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τις κρυσταλλικές δομές που υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία.

Ακολούθησε αξιολόγηση της βιολογικής δράσης της ταξιφολίνης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα STD και tr-NOESY προκειμένου να γίνει μελέτη συμπλοκοποίησης της (+)-ταξιφολίνης με την πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA)

Πραγματοποιήθηκε παρατήρηση του φαινομένου ανταλλαγής των πρωτονίων 2, 4, 6 της ρεζορκινόλης με 1D <sup>1</sup>Η φασματοσκοπία NMR σε θερμοκρασία 60 °C / 333 Κ και ουδέτερο pD, (7.6) και συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων 2.5mM.

Στα πλαίσια της αντίδρασης δευτερίωσης των πρωτονίων του C-6 και του C-8 του μορίου της ταξιφολίνης, έγινε κινητική και θερμοδυναμική μελέτη με φασματοσκοπία 1D <sup>1</sup>Η NMR μεταβλητής θερμοκρασίας (10-55°C), σε ουδέτερο και βασικό pD, (7.6 και 9.6) και συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων 2.5mM έως 1 M. Τα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με DFT θεωρητικούς υπολογισμούς.

Από τα πειραματικά δεδομένα και τις θεωρητικές μελέτες ακολούθησε πρόταση ενός νέου μηχανισμού.

### 6ο Κεφάλαιο - Οργανολογία - Μέθοδοι

#### 6.1 Πρότυπες ενώσεις.

- 1. (+)-ταξιφολίνη C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (>90%) της εταιρίας Extrasynthese (Genay, France),
- 2. (±)-ναρινγενίνη C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> (≥95%) της εταιρίας Sigma-Aldrich,
- 3. εριοδικτυόλη C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (≥99%) της εταιρίας Extrasynthese (Genay, France),
- 4. ρεζορκινόλη C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (99%) της εταιρίας Sigma Aldrich,
- 5. φαινόλη C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O (≥99%) της εταιρίας Sigma Aldrich.

#### 6.2 Αντιδραστήρια.

- 1. φωσφορικό νάτριο Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O (≥98%) της εταιρίας Sigma Aldrich,
- μονόξινο φωσφορικό νάτριο Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (98.5-100.5%) της εταιρίας Sigma – Aldrich,
- δισόξινο φωσφορικό νάτριο NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (98-101%) της εταιρίας Sigma Aldrich.

#### 6.3 Διαλύτες.

- 1. δευτεριωμένο νερό (99.9%) της εταιρίας Sigma Aldrich,
- 2. δευτεριωμένος διαλύτης ακετόνη d<sub>6</sub> (99.9%) της εταιρίας Sigma Aldrich,
- δευτεριωμένος διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο d<sub>6</sub> (99.9%) της εταιρίας Sigma – Aldrich.

#### 6.4 Οργανολογία - Λογισμικά.

Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στους φασματογράφους NMR Avance I 400 MHz και Avance II 500 MHz της εταιρίας Bruker. Ο εξοπλισμός βρίσκεται στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού ΤοpSpin 3.5.b.91pl7. Η επεξεργασία των κινητικών και των θερμοδυναμικών δεδομένων έγινε με την βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης OriginPro 8. Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με την χρήση των λογισμικών γραφιστικού σχεδιασμού CorelDRAW και Photoshop CC, ενώ ο σχεδιασμός των δομών των ενώσεων με την χρήση του προγράμματος ChemDraw Professional.

# 6.5 Μέθοδοι δομικής μελέτης φλαβονοειδών σε δευτεριωμένους διαλύτες.

Μελετήθηκε η δομή του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη με φασματοσκοπία 1D <sup>1</sup>H каι 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC каι <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR στους δευτεριωμένους ακετόνη-d<sub>6</sub> θερμοκρασία των 10°C 283K διαλύτες στη 1 каі σε διμέθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub> στη θερμοκρασία των 25°C / 298K, καθώς και σε δευτεριωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων με pD=7.6 στη θερμοκρασία των 25°C / 298K. Αντίστοιχα μελετήθηκε η δομή των φλαβονοειδών ναρινγενίνη και εριοδικτυόλη με 1D <sup>1</sup>H και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC και <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR σε δευτεριωμένο διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> στη θερμοκρασία των 10°C / 283K. Τα 1D και 2D πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο φασματογράφο Avance II 500 MHz της εταιρίας Bruker του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για την λήψη των φασμάτων 1D <sup>1</sup>H και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR στον δευτεριωμένο διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub>, έγινε προσθήκη 2.5 mM ταξιφολίνης η οποία διαλύθηκε πλήρως . Έγινε χρήση της παλμικής ακολουθίας zg, hsqcetgpsi και hmbcgpndqf αντίστοιχα και οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: P1=12 μs, PL1=4dB, te=25°C/298K, td=33k για το 1D και td=2k για τα 2D, ενώ οι πειραματικοί χρόνοι ήταν 3min46s, 4h41min και 10h39min αντιστοίχως.

Για την λήψη των φασμάτων 1D <sup>1</sup>H και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων σε D<sub>2</sub>O, με pD=7.6, συγκέντρωσης 2,5 mM, έγινε προσθήκη 5 mM ταξιφολίνης η οποία διαλύθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό. Έγινε χρήση της παλμικής ακολουθίας zg, hsqcetgpsi και hmbcgpndqf αντίστοιχα και οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: P1=9.6 μs, PL1=4dB, te=25°C/298K, td=33k για το 1D και td=2k για τα 2D, ενώ οι πειραματικοί χρόνοι ήταν 5min17s, 2h56min και 7h3min αντιστοίχως.

Για την λήψη των φασμάτων 1D <sup>1</sup>H και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR στον δευτεριωμένο διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub>, έγινε προσθήκη 5 mM ταξιφολίνης και για τα αντίστοιχα πειράματα 5 mM ναρινγενίνης και εριοδικτυόλης. Τα φλαβονοειδή διαλύθηκαν πλήρως. Έγινε χρήση της παλμικής ακολουθίας zg, hsqcetgpsi και hmbcgpndqf αντίστοιχα και οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: P1=9 μs, PL1=4dB, te=10°C/283K, td=33k για το 1D και td=2k για τα 2D, ενώ οι πειραματικοί χρόνοι ήταν a) 1min55s, 2h50min και 6h49min για την ταξιφολίνη, β) 57s, 2h50min και 6h49min για την ναρινγενίνη και γ) 1min55s, 2h22min και 6h5min για την εριοδικτυόλη.

Για την λήψη των φασμάτων 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY στον δευτεριωμένο διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub>, έγινε προσθήκη 2.5 mM ταξιφολίνης και αντίστοιχα 2.5 mM ναρινγενίνης και εριοδικτυόλης. Τα φλαβονοειδή διαλύθηκαν πλήρως. Έγινε χρήση της παλμικής ακολουθίας noesygpph και οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: P1=9 μs, PL1=4dB, td=1k, te=10°C/283K, d8=1s και d8=0.5s ενώ οι πειραματικοί χρόνοι

ήταν a) 2h39min και 2h57min για την ταξιφολίνη, β) 2h39min και 2h57min για την ναρινγενίνη και γ) 2h39min και 2h57min για την εριοδικτυόλη.

Για την λήψη των φασμάτων STD στο ρυθμιστικό διάλυμα PBS με pD=7.4, σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, έγινε προσθήκη 2.5 mM ταξιφολίνης και σε αναλογία 1:100 της πρωτεΐνης αλβουμίνη (BSA). Η ταξιφολίνη διαλύθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ η πρωτεΐνη διαλύθηκε πλήρως. Έγινε χρήση της παλμικής ακολουθίας zgesgp και της stddiffesgp.3. αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε επιλεκτικός κορεσμός του δείγματος με μια σειρά παλμών τύπου Gaussian (Gaussian-shaped) με 1% περικοπή ο καθένας με διάρκεια 50 ms με διαχωρισμό χρονικής καθυστέρησης 1 ms. Ο χρόνος κορεσμού ορίστηκε στα 2s. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο εντός συντονισμού πείραμα στα 0.43 ppm, όπου δεν εμφανίζονται σήματα των υποκαταστατών και στο εκτός συντονισμού φάσμα στα 400 ppm όπου δεν εμφανίζεται κάποιο σήμα NMR. Οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: P1=14.99μs, PL1=4dB, o1=2352.93Hz, te=25°C/298K και ο πειραματικός χρόνος για το πρωτονιακό ήταν a) 4min11s ενώ αντίστοιχα για το STD πείραμα β)1h32min.

## 6.6 Μέθοδος διαπίστωσης ανταλλαγής των πρωτονίων 2, 4 και 6 του μορίου της ρεζορκινόλης.

Η ανταλλαγή των πρωτονίων 2, 4, 6 της ρεζορκινόλης διαπιστώθηκε με 1D <sup>1</sup>Η φασματοσκοπία NMR. Για την λήψη των φασμάτων 1D <sup>1</sup>Η έγινε προσθήκη 2.5 mM ρεζορκινόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων σε D<sub>2</sub>O, σε pD=7.6, συγκέντρωσης 2.5 mM. Το δείγμα διατηρήθηκε για 144h μέσα σε υδρόλουτρο, σε θερμοκρασία 60 °C / 333 K.

## 6.7 Μέθοδος κινητικής μελέτης της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 του μορίου της ταξιφολίνης.

Η κινητική μελέτη της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6, καθώς και του πρωτονίου του C-8 του μορίου της ταξιφολίνης έγινε με 1D <sup>1</sup>H Φασματοσκοπία NMR μεταβλητής θερμοκρασίας. Ο αριθμός των φασμάτων για την δημιουργία μίας μεμονωμένης καμπύλης κινητικής της αντίδρασης του πρωτονίου του C-6 ήταν 15 έως 45 φάσματα. Ο αριθμός των φασμάτων για την δημιουργία μίας μεμονωμένης καμπύλης πης αντίδρασης του πρωτονίου του C-8 ήταν 35 έως 75 φάσματα. Για την λήψη των φασμάτων 1D έγινε προσθήκη 2.5 mM ταξιφολίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων σε D<sub>2</sub>O, σε pD=7.6, συγκέντρωσης 2.5 mM, 25mM και 50 mM, καθώς και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων με pD=9.6 συγκέντρωσης 25mM, 50 mM και 1 M.

 Η παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων με pD=7.6 συγκέντρωσης 2.5 mM, 25mM και 50mM, σε D<sub>2</sub>O έγινε με προσθήκη 23% δισόξινου φωσφορικού νατρίου NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O / μονόξινο φωσφορικό νάτριο Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.

 Η παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων σε pD=9.6 συγκέντρωσης 25mM, 50 mM και 1 M, σε D<sub>2</sub>O έγινε με προσθήκη 45% φωσφορικού νατρίου Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O / δισόξινο φωσφορικό νάτριο NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.

Έγινε χρήση της παλμικής ακολουθίας zg και οι παράμετροι του οργάνου ρυθμίστηκαν ως εξής: P1=9-12 μs, d1=26-34 s, td=65.5k, te=10°C/283K-55°C/328K ενώ οι πειραματικοί χρόνοι κυμάνθηκαν από 3min-30min ανά φάσμα, ανάλογα με το pD, την συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα και τη θερμοκρασία.

Οι καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6, καθώς και του πρωτονίου του C-8 του μορίου της ταξιφολίνης έγιναν με την βοήθεια του λογισμικού OriginPro 8 και από το NL Fit έγινε προσαρμογή των δεδομένων στο Movτέλο ExpDec1, της εξίσωσης y = A1\*exp(-x/t1) + y<sub>0</sub>.

#### 6.8 Μέθοδος θερμοδυναμικής μελέτης της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 του μορίου της ταξιφολίνης.

Οι καμπύλες θερμοδυναμικής μελέτης που αφορούν την εύρεση της ενέργειας ενεργοποίησης και του προεκθετικού όρου της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6, καθώς και του πρωτονίου του C-8 του μορίου της ταξιφολίνης έγιναν με τη γραμμική μορφή της εξίσωσης Arrhenius:  $lnK = -\frac{Ea}{R}\frac{1}{T} + lnA$ , όπου Ea είναι η ενέργεια ενεργοποίησης και εκφράζεται σε Kcal mol<sup>-1</sup> ή KJ mol<sup>-1</sup>, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin (K), *K* είναι η σταθερά ταχύτητας s<sup>-1</sup>, A ο προεκθετικός παράγοντας s<sup>-1</sup> και R η παγκόσμια σταθερά ιδανικών αερίων 1.9872036(11)×10<sup>-3</sup> kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. Η συγκεκριμένη έκφραση της εξίσωσης Arrhenius είναι της μορφής y=ax+b και αποτελεί μια ευθεία της οποίας η κλίση είναι ο λόγος  $-\frac{Ea}{R}$ .

Οι καμπύλες θερμοδυναμικής μελέτης που αφορούν την εύρεση τιμών ΔH<sup>‡</sup> και ΔS<sup>‡</sup> της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6, καθώς και του πρωτονίου του C-8 του μορίου της ταξιφολίνης έγιναν με την γραμμική μορφή της εξίσωσης Eyring:  $ln\frac{K}{T} = -\frac{\Delta H^{\frac{3}{2}}}{R} + ln\frac{kB}{h} + \frac{\Delta S^{\frac{3}{2}}}{R}$ , όπου ΔG<sup>‡</sup> είναι η ενέργεια Gibbs της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης Kcal mol<sup>-1</sup> ή KJ mol<sup>-1</sup>, ΔH<sup>‡</sup> είναι η ενθαλπία της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης Kcal mol<sup>-1</sup> ή KJ mol<sup>-1</sup> και ΔS<sup>‡</sup> είναι η εντροπία της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης Kcal mol<sup>-1</sup> ή KJ mol<sup>-1</sup> και ΔS<sup>‡</sup> είναι η εντροπία της μεταβατικής κατάστασης με μονάδες μέτρησης Kcal mol<sup>-1</sup> ή J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> ή J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>. Η k<sub>B</sub> είναι η σταθερά Boltzmann και ισούται με 1.381 x 10<sup>-23</sup> J K<sup>-1</sup> ή 0,32984183 x 10<sup>-3</sup> x 10<sup>-23</sup> Kcal K<sup>-1</sup>, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin (K), K η σταθερά ταχύτητας σε s<sup>-1</sup>, R η παγκόσμια σταθερά Ιδανικών αερίων ίση με

1.9872036(11)×10<sup>-3</sup> kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> και h είναι η σταθερά του Planck 6.626 x 10<sup>-34</sup> Js ή 1,582611 x 10<sup>-3</sup> x 10<sup>-34</sup> kcal s. Ο προσδιορισμός των τιμών ΔH<sup>‡</sup> και ΔS<sup>‡</sup> γίνεται από τα κινητικά δεδομένα που λαμβάνονται από την γραφική παράσταση  $\ln \frac{k}{T}$  έναντι της τιμής  $\frac{1}{T}$ . Η γραφική παράσταση είναι μια ευθεία γραμμή με αρνητική κλίση,  $-\frac{\Delta H \ddagger}{R}$ , και επιπρόσθετο όρο b την τιμή  $\frac{\Delta S \ddagger}{R} + \ln \frac{kB}{h}$ .

### Αποτελέσματα-Συζήτηση

### 7ο Κεφάλαιο - Δομικές Μελέτες

#### 7.1 Δομικές μελέτες φλαβονοειδών με φασματοσκοπία NMR.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός άρθρων, στα οποία κύριο αντικείμενο μελέτης είναι η συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών των φλαβονοειδών με τις βιολογικές τους ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται κυρίως από την χημική δομή των φλαβονοειδών. Σε αρκετά άρθρα τονίζεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού C2-C3 στο δακτύλιο C, αυξάνει την δραστικότητα των φλαβονοειδών παρέχοντας μια πιο σταθερή ρίζα του φλαβονοειδούς μέσω σύζευξης και ηλεκτρονιακού απεντοπισμού. Επιπλέον η παρουσία υδροξυλικών πρωτονίων ή μεθόξυ- υποκαταστάσεων αντίστοιχα, όπως και ο αριθμός ή η θέση τους μπορούν να αυξήσουν ή να ελαττώσουν τη δραστικότητά των φλαβονοειδών (Heim, Tagliaferro, and Bobilya 2002).

Στο εργαστήριό μας έγινε μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων φλαβονοειδών με διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C2-C3 του δακτυλίου C. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε η ομάδα φλαβονοειδών που απεικονίζεται στην *Εικόνα 7.1.1.* Πρόσφατα βρέθηκε ότι αποτελούν κύριο συστατικό της Ελληνικής ρίγανης με σύγχρονές τεχνικές φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H-NMR υψηλής ανάλυσης (Charisiadis et al. 2017). Κύριο κριτήριο επιλογής τους, ήταν η απουσία του διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων C2-C3 των φλαβονοειδών. Συνεπώς τα αποτελέσματα που προκύπτουν έπειτα από συσχέτιση της δομής και της δραστικότητάς τους θα εξάγουν συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης τους (Dai and Mumper 2010).



Εικόνα 7.1.1. Δομές των τριών φλαβονοειδών που επιλέχθηκαν για την μελέτη συσχέτισης δομής-δραστικότητας απουσία διπλού δεσμού C2-C3 (1) Ταξιφολίνη, (2) Ναρινγενίνη, (3) Εριοδικτυόλη.



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 4.48 (<sup>1</sup>H, dd, J=11.1, 4.0, H-3), 4.96 (<sup>1</sup>H, d, J=11.1, H-2), 5.82 (<sup>1</sup>H, d, J=2.0, H-8), 5.87 (<sup>1</sup>H, d, J=2.0, H-6), 6.73 (<sup>1</sup>H, d, J=8.0, H-5'), 6.75 (<sup>1</sup>H, dd, J=8.0, 1.5, H-6'), 6.8 (<sup>1</sup>H, d, J=1.5, H-2'), 10.90 (<sup>1</sup>H, br s, **7-OH**), 11.91 (<sup>1</sup>H, s, **5-OH**)

**Εικόνα 7.2.1.** Περιοχή φάσματος 1D <sup>1</sup>Η NMR (500 MHz) (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη διμέθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub> (T=298K, αριθμός παλμών=32, td=33k, πειραματικός χρόνος= 3min46s).



**Εικόνα 7.2.2.** Φάσμα 2D  ${}^{1}H^{-13}C$  HSQC NMR (500 MHz) της (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη διμέθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub> (T=298K, αριθμός παλμών=40, td=2k, πειραματικός χρόνος = 4h41min).



**Εικόνα 7.2.3.** Φάσμα 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR (500 MHz) της (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη διμέθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub> (T=298K, αριθμός παλμών=88, td=2k, πειραματικός χρόνος = 10h39min).



**Εικόνα 7.2.4.** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR (500 MHz) της (+)ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη διμέθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub> (T=298K, αριθμός παλμών=88, td=2k, πειραματικός χρόνος = 10h39min). **(A)** Περιοχή διασταύρωσης κορυφών του πρωτονίου της C5(OH) με τον C-6 της ταξιφολίνης. **(B)** Περιοχή διασταύρωσης κορυφών του πρωτονίου του C-6 με τον C5, καθώς και του πρωτονίου του C-8 με τον C9 της ταξιφολίνης.

	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)
2	4.96	84.02
3	4.48	72.49
С3(ОН)	5.72	72.49
C4(=0)	-	198.32
С5(ОН)	11.91	164.40
6	5.87	97.07
7	(-OH)	168.40
8	5.82	96.11
9	-	163.58
10	-	101.13
1'	-	128.91
2′	6.87	116.29
C3′(OH)	9.00	146.20
C4′(OH)	9.00	146.70
5′	6.73	116.12
6′	6.75	120.47

**Πίνακας 7.2.5.** Χημικές μετατοπίσεις της (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη διμέθυλοσουλφοξείδιο-d<sub>6</sub>, T=298K.



<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>): 2.72 (<sup>1</sup>H, dd, J=17.1, 2.4, H-3eq), 3.21 (<sup>1</sup>H, dd, J=17.1, 13.2, H-3ax), 5.46 (<sup>1</sup>H, dd, J=13.2, 2.4, H-2), 5.95 (<sup>1</sup>H, d, J=1.8, H-8), 5.96 (<sup>1</sup>H, d, J=1.8, H-6), 6.9 (<sup>1</sup>H, br d, J=8.4, H-5'), 6.9 (<sup>1</sup>H, br d, J=8.4, H-3'), 7.41 (<sup>1</sup>H, d, J=8.4, H-4'), 7.44 (<sup>1</sup>H, d, J=8.4, H-6'), 12.21 (<sup>1</sup>H, s, **5-OH**)

**Εικόνα 7.31.** Περιοχή φάσματος 1D<sup>1</sup>Η NMR (500 MHz) της ναρινγενίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=8, td=33k, πειραματικός χρόνος=57s).



**Εικόνα 7.3.2.** Φάσμα 2D  ${}^{1}H_{-}{}^{13}C$  HSQC NMR (500 MHz) της ναρινγενίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη – d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=24, td=2k, πειραματικός χρόνος = 2h50min).



**Εικόνα 7.3.3.** Φάσμα 2D<sup>1</sup>H<sup>13</sup>C HMBC NMR (500 MHz) της ναρινγενίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=56, td=2k, πειραματικός χρόνος = 6h49min).



**Енко́va 7.3.4.** Епіλεγμένη періоχή φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR (500 MHz) тης vapivyεvívης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, аріθμός паλμών=24, td=2k, пεіраμатіко́ς χρόνος = 2h50min) **(A)** Περιοχή διασταύρωσης кориφών των H6-C6 каі H8-C8. Епіλεγμένες періоχές φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR (500 MHz) της vapivyεvívης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, аріθμός παλμών=56, td=2k, пεіраμатіко́ς χρόνος = 6h49min). **(B)** Περιοχή διασταύρωσης κορυφών του πρωτονίου C5(OH) με τον άνθρακα 6 της vapivyεvívης. **(C)** Περιοχή διασταύρωσης των κορυφών H6-C10.

	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)
2	5.46	79.61
3a(eq)	2.72	43.06
3b(ax)	3.21	43.06
C4(=0)	-	196.97
С5(ОН)	12.20	164.87
6	5.95	96.43
С7(ОН)	9.67	166.6
8	5.96	95.47
9	-	164.43
10	-	102.83
1′	-	130.17
2′	7.41	128.79
3′	6.90	115.85
C4′(OH)	8.61	158.37
5′	6.90	115.85
6′	7.41	128.79

Πίνακας 7.3.5. Χημικές μετατοπίσεις της ναρινγενίνης σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub>, T=283K.



<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>): 2.71 (<sup>1</sup>H, ddd, J=17.0, 3.0, 0.7, H-3a), 3.16 (<sup>1</sup>H, ddd, J=17.0, 12.7, 1.2, H-3b), 5.40 (<sup>1</sup>H, dd, J=12.7, 3.0, H-2), 5,95 (<sup>1</sup>H, br dd, J=2.3, 1.37, H-8), 5.94 (<sup>1</sup>H, br dd, J=2.3, 0.92, H-6), 6.87 (<sup>1</sup>H, br d, J=8.0, H-5'), 6.88 (<sup>1</sup>H, br dd, J=8.0, 1.8, H-6'), 7.04 (<sup>1</sup>H, d, J=1.8, H-2'), 12.21 (<sup>1</sup>H, s, 5-OH)

**Εικόνα 7.4.1.** Περιοχή φάσματος 1D <sup>1</sup>Η NMR (500 MHz) της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=16, td=33k, πειραματικός χρόνος=1min55s).



**Εικόνα 7.4.2.** Φάσμα 2D  ${}^{1}H^{-13}C$  HSQC NMR (500 MHz) της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη –  $d_{6}$  (T=283K, αριθμός παλμών=20, td=2k, πειραματικός χρόνος = 2h22min).



**Εικόνα 7.4.3.** Φάσμα 2D  ${}^{1}H^{-13}C$  HMBC NMR (500 MHz) της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- $d_{6}$  (T=283K, αριθμός παλμών=50, td=2k, πειραματικός χρόνος = 6h5min).



**Енко́va 7.4.4.** Епіλεγμένη періоχή φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR (500 MHz) тης εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, аріθμός паλμών=20, td=2k, пеіраμатіко́ς χρόνος = 2h22min) **(A)** Періоχή διασταύρωσης кориφών των H6-C6 каі H8-C8. Епіλεγμένες періоχές φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR (500 MHz) της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, аріθμός паλμών=50, td=2k, пеіраμатіко́ς χρόνος = 6h5min). **(B)** Періоχή διασταύρωσης кориφών του πρωτονίου της C5(OH) με τον άνθρακα 6 της εριοδικτυόλης. **(C)** Περιοχή διασταύρωσης των κορυφών H8-C9.

	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)
2	5.40	80,08
3a(eq)	2.71	43.51
3b(ax)	3.16	43.51
C4(=0)	-	197.71
С5(ОН)	12.20	165.60
6	5.94	96.85
С7(ОН)	9.68	167.34
8	5.95	95.93
9	-	164.74
10	-	103.57
1′	-	131.77
2′	7.04	114.70
С3′(ОН)	8.19	146.52
C4′(OH)	8.19	146.96
5′	6.87	115.98
6′	7.88	119.24

Πίνακας 7.4.5. Χημικές μετατοπίσεις της εριοδικτυόλης σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub>, T=283K.


<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>): 4.63 (<sup>1</sup>H, dd, J=11.39, 5.05, H-3), 4.79 (<sup>1</sup>H, d, J=5.05, **3**-OH), 5.03 (<sup>1</sup>H, d, J=11.39, H-2), 5.94 (<sup>1</sup>H, d, J=1.32, H-8), 5.98 (<sup>1</sup>H, d, J=1.32, H-6), 6.86 (<sup>1</sup>H, d, J=8.18, H-5'), 6.92 (<sup>1</sup>H, dd, J=8.18, 1.32, H-6'), 7.07 (<sup>1</sup>H, d, J=1.32, H-2'), 8.14 (<sup>1</sup>H, d, J=2.5, **3',4'-OH**), 9.79 (<sup>1</sup>H, s, **7-OH**), 11.76 (<sup>1</sup>H, d, J=1.32, **5-OH**)

**Εικόνα 7.5.1.** Περιοχή φάσματος 1D <sup>1</sup>Η NMR 500 MHz (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- $d_6$  (T=283K, αριθμός παλμών=16, td=33k, πειραματικός χρόνος= 1min55s).



**Εικόνα 7.5.2.** Φάσμα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR (500 MHz) της (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, td=1k, πειραματικός χρόνος=2h39min).



**Εικόνα 7.5.3.** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 2D<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, td=1k, πειραματικός χρόνος=2h39min). **(A)** Περιοχή διασταύρωσης των κορυφών του πρωτονίου της C5(OH) με το πρωτόνιο 6 της ταξιφολίνης. **(B)** Περιοχή διασταύρωσης κορυφών του πρωτονίου του C2 με το πρωτόνιο του C6', του πρωτονίου του C3 με το πρωτόνιο του C6', του πρωτονίου του C2 με το σύγκριση βιασταύρωσης στο δισδιάστατο χάρτη αντιστοιχεί στα πρωτόνια των C6' και C2 σε σύγκριση με την αντίστοιχη των πρωτονίων των C-6' και C3. Το μοντέλο ταξιφολίνης που απεικονίζεται είναι αποτέλεσμα θεωρητικών υπολογισμών DFT.

	Taxifolin's Peaks	Integral [abs]	Integral [rel]	Intensity [abs]
<b>r</b> 1	H2'-H3	-1625900	0,76300	-135190
<b>r</b> 2	H2'-H2	-1890400	0,88710	-164652
r <sub>3</sub>	H6'-H3	-1124700	0,52780	-78350
<b>r</b> 4	H6'-H2	-2131000	1,00000	-157447
<b>r</b> 5	H2-H8	-97545	0,04580	-9789
<b>r</b> 6	H2-H3	-849415	0,39860	-82411
<b>r</b> 7	H2'-H8	-40799	0,01915	-5593
<b>r</b> 8	С5(ОН)-Н3	-88903	0,04175	-9125
<b>r</b> 9	С5(ОН)-Н6	-231435	0,10860	-16931
<b>r</b> 10	С3(ОН)-Н3	-732610	0,34380	-57414
<b>r</b> 11	С3(ОН)-Н8	-61207	0,02870	-8130
<b>r</b> 12	С3(ОН)-Н2'	-45883	0,02150	-6620

**Πίνακας 7.5.4.** Συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης των τιμών ολοκλήρωσης και εντάσεως με τις αντίστοιχες κορυφές διασταύρωσης, στο φάσμα 2D<sup>1</sup>H<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της (+)-ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, td=1k, πειραματικός χρόνος=2h39min).

	Ratio of proton distances
<b>r</b> <sub>1</sub> / <b>r</b> <sub>2</sub>	1.0254
$r_2 / r_1$	0.9752
<b>r</b> <sub>3 / <b>r</b><sub>4</sub></sub>	1.1124
<b>r</b> 4 / <b>r</b> 3	0.8990

Πίνακας 7.5.5. Πίνακας λόγων των τιμών διατομικής απόστασης των πρωτονίων των ανθράκων C6' –C2 προς την τιμή των πρωτονίων των C2' –C2, καθώς και των C2' –C3 προς C6' –C3 και αντίστροφα, για το μόριο της ταξιφολίνης.



**Εικόνα 7.5.6. (Α)** και **(Β)** Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ταξιφολίνης με το ένζυμο TcmN ARO/ CYC ή αρωματάση/κυκλάση (απεικόνιση cartoon, τα σημεία πρόσδεσης είναι χρώματος μπλε) Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας που περιγράφεται γύρω από την ταξιφολίνη προέρχεται από τον χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων 1.7 Å 2F<sub>o</sub> - F<sub>c</sub> που έχει σχεδιαστεί σε 1.0 σ. (M. Lee, Ames, and Tsai 2012).



Εικόνα 7.5.7. Κρυσταλλική δομή της ταξιφολίνης, (Selivanova et al. 1999).



**Εικόνα 7.5.8.** Οι πιο σταθερές δομές των τεσσάρων στερεοϊσομερών της ταξιφολίνης έπειτα από AM1 και ab initio θεωρητικούς υπολογισμούς. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν δεσμούς υδρογόνου, (Trouillas and Fagn 2004).



Εικόνα 7.5.9. Δομή ΙΙ ταξιφολίνης με αρίθμηση.

Η μελέτη της διαμόρφωσης των φλαβονοειδών στο χώρο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς δεν υπάρχουν κρυσταλλικές δομές για τα περισσότερα από αυτά. Το γεγονός αυτό περιορίζει τη συσχέτιση των δομικών τους χαρακτηριστικών με τις ποικίλες δράσεις τους.

Από τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι κρυσταλλικές δομές των φλαβονοειδών αποτελούνται από δύο ανεξάρτητα μόρια, τα οποία διαφέρουν στον προσανατολισμό του βενζοϊκού δακτυλίου Β (3', 4'διυδροξυφαινύλιο). Η κρυσταλλική δομή της ταξιφολίνης, Εικόνα 7.5.7., αποτελείται από δύο διαμορφομερή. Η μία διαμόρφωση παρουσιάζει στον ετεροκυκλικό δακτύλιο C, ασύμμετρη διαμόρφωση ημι-ανάκλυδρου με ένα επίπεδο σύστημα τεσσάρων ατόμων O(1)-C(9)-C(10)-C(4), *Εικόνα 7.5.9*. Παρόμοια δομή έχει και η δεύτερη διαμόρφωση. Η απόκλιση των ανθράκων C(2) και C(3) του ενός εκ των δύο διαμορφομερών από το επίπεδο είναι 0.562 και -0.106 Å, ενώ αντίστοιχα στο δεύτερο διαμορφομερές αποκλίνουν κατά 0.515 και -0.232 Å. Η δίεδρη γωνία О(1)-С(2)-С(1')-С(2') тои αρωματικού δακτυλίου В (3', 4′στρέψης διυδροξυφαινύλιο) ως προς τον ετεροκυκλικό δακτύλιο C του διαμορφομερούς Ι είναι 78.4°, ενώ του διαμορφομερούς ΙΙ είναι 57.7°, αντίστοιχα.

Οι δύο διαμορφώσεις έχουν κατά τον ίδιο τρόπο προσανατολισμένους τους πλευρικούς υποκαταστάτες του ετεροκυκλικού δακτυλίου C. Πιο συγκεκριμένα και στα δύο διαμορφομερή, η υδροξυλομάδα που βρίσκεται στον C(3) και ο αρωματικός δακτύλιος B (3', 4'-διυδροξυφαινύλιο) στον C(2) καταλαμβάνουν ισημερινές θέσεις. Η αντίστοιχη δίεδρη γωνία C(10)-C(4)-C(3)-O(3) είναι ίση με -153,4° για τη I και ίση με -161,0° για την II, ενώ η δίεδρη γωνία C(9)-O(1)-C(2)-C(1') είναι ίση με - 178,5° για την I και ίση με -173,5° για την II αντίστοιχα.

Τα αξονικά υδρογόνα H(2) και H(3) καταλαμβάνουν θέσεις trans μεταξύ τους με τις δίεδρες γωνίες H(2)-C(2)-C(3)-H(3) ίσες με 178,6° και -164,9° στο Ι και ΙΙ, αντίστοιχα. Τα δύο διαμορφομερή έχουν ίδια μήκη δεσμών και διαφέρουν μόνο στο μήκος του C(2)-C(3). Ο δεσμός C(2)-C(3) της μίας διαμόρφωσης ισούται με 1.503(7) Å, ενώ της δεύτερης με 1.519(6) Å, ο δεσμός C(2)-O(1) με 1.467(6) Å ενώ για την δεύτερη με 1.445(6) Å, (Selivanova et al. 1999).

Από την κρυσταλλική δομή συμπεραίνεται ότι η πληθυσμιακά ευνοούμενη και κατ' επέκταση το πιο σταθερή δομή της ταξιφολίνης είναι η ΙΙ, *Εικόνα 7.5.7.,* με φορά στρέψης των πρωτονίων που συνδέονται στους C-5' και C-6' προς την πλευρά του πρωτονίου του C-8.

Η φασματοσκοπία 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>Η NOESY NMR έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία στη μελέτη δομών διαφόρων μορίων. Τα δεδομένα που προκύπτουν από ένα πείραμα NOESY βοηθούν στην κατανόηση της διαμόρφωσης ενός μορίου στο χώρο, διότι δύο πρωτόνια που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 5 Å αποδίδουν μία κορυφή διασταύρωσης στον δισδιάστατο χάρτη.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη της στρέψης του αρωματικού δακτυλίου B σε σχέση με το βενζοπυρονικό επίπεδο των δακτυλίων A και C στα φλαβονοειδή ταξιφολίνη, ναρινγενίνη και εριοδικτυόλη με χρήση της φασματοσκοπίας 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR. Έχει διαπιστωθεί ότι η δυνατότητα στρέψης των δακτυλίων αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική δομική ιδιότητα και μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική δράση των φλαβονοειδών, (Wright et al. 2010).

Πιο συγκεκριμένα από το φάσμα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR (500 MHz) της (+)ταξιφολίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub>, θερμοκρασία 283K και χρόνο ανάμειξης d8=1s, *Εικόνα 7.5.2.*, παρατηρείται ότι οι κορυφές διασταύρωσης NOE έχουν αντίθετη φάση από τη διαγώνιο όπως και αναμένεται λόγω του μικρού χρόνου συσχέτισης τ<sub>c</sub>. Εστιάζοντας στην περιοχή διασταύρωσης κορυφών των πρωτονίων των C-2, C-3 με τα πρωτόνια των C-2',C-6' και C-5' του μορίου της ταξιφολίνης *Εικόνα 7.5.3.*, και λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές ολοκλήρωσης, *Πίνακας 7.5.4.*, διαπιστώνεται ότι η πιο ισχυρή κορυφή διασταύρωσης στο δισδιάστατο χάρτη αντιστοιχεί στα πρωτόνια των C6' και C2, πράγμα που σημαίνει ότι η διατομική απόσταση των H6' και H2 είναι η ελάχιστη των αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων και των ολοκληρωμάτων των κορυφών διασταύρωσης της επιλεγμένης περιοχής φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της (+)-ταξιφολίνης (5mM), *Πίνακας 7.5.5.*, διαπιστώνεται ότι η στρέψη του δακτυλίου Β έξω από το επίπεδο των Α και C είναι αντίστοιχη με το μοντέλο που απεικονίζεται στην **Εικόνα 7.5.3.** Τα σήματα ΝΟΕ μεταξύ των πρωτονίων των ανθράκων C3 - C2', C2 - C2', C3 - C6', C8 - C2', C8 - C2, C3(OH) - C6', C3(OH) - C2', C5(OH) - C6 καθώς και των πρωτονίων των ανθράκων C7(OH) – C8 είναι επίσης διακριτά στο φάσμα, διότι η οι διατομικές τους αποστάσεις είναι μικρότερες από 5 Å. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρατηρούνται NOE σήματα που αντιστοιχούν σε συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων των υδροξυλομάδων C3'(OH), C4'(OH) και του πρωτονίου του άνθρακα C8, αλλά και του πρωτονίου του C2' με το πρωτόνιο του C8. Αυτές οι κορυφές διασταύρωσης είναι πιθανόν να οφείλονται στην προσέγγιση του πρωτονίου του C8 τόσο με τα πρωτονία των υδροξυλομάδων C3'(OH), C4'(OH) δοο και με το πρωτόνιο του C2', λόγω της ικανότητας περιστροφής του δακτυλίου Β γύρω από το δεσμό C2-C1', (Cody and Luft 1994).

Από τα φάσματα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR συμπεραίνεται ότι η πληθυσμιακά ευνοούμενη και κατ' επέκταση το πιο σταθερή δομή της ταξιφολίνης είναι η ΙΙ, *Εικόνα 7.5.7.,* με φορά στρέψης των πρωτονίων που συνδέονται στους C-5' και C-6' προς την πλευρά του πρωτονίου του C-8, δεδομένα που συμφωνούν απόλυτα με αυτά της κρυσταλλικής δομής.

Αντίστοιχες είναι οι παρατηρήσεις για τα φάσματα 2D NOESY NMR των φλαβονοειδών ναρινγενίνη και εριοδικτυόλη τα οποία παρουσιάζονται στα επόμενα υποκεφάλαια.

## 7.6 Δομική μελέτη της ταξιφολίνης με τη χρήση θεωρητικών υπολογισμών density functional theory (DFT).

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν από τον Αν. Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Σίσκο Μιχαήλ. Βασίστηκαν στη θεωρία συναρτησιακής πυκνότητας DFT και πιο συγκεκριμένα έγιναν με την υβριδική τριπαραμετρική συναρτησιακή M06-2X (τύπου Μινεσότα), που δημιουργήθηκε από τους Zhao και Truhlar και σύνολο βάσης 6-31G+d.

Από την *Εικόνα 7.6.1.* διαπιστώνεται ότι η κλίση της γωνίας O(1)-C2-C1' στο μόριο της ταξιφολίνης ισούται με 108.2°, ενώ της C3-C2-C1' με 112.8°. Οι μετρήσεις είναι αποτέλεσμα θεωρητικών υπολογισμών DFT/ M06-2X/6-31G+d.

Στην **Εικόνα 7.6.2.** γίνεται απεικόνιση των διατομικών αποστάσεων του πρωτονίου του C3 με το πρωτόνιο του C2', του πρωτονίου του C2 με το πρωτόνιο του C2', του πρωτονίου του C3 με το πρωτόνιο του C6', του πρωτονίου του C2 με το πρωτόνιο του C6' καθώς και του πρωτονίου του C8 με το πρωτόνιο του C2', του πρωτονίου του C8 με το πρωτόνιο του C2, C3(OH) με το πρωτόνιο του C6', του πρωτονίου της C3(OH) με το πρωτόνιο του C2', του πρωτονίου της C5(OH) με το πρωτόνιο του C6 και του πρωτονίου της C7(OH) με το πρωτόνιο του C8, στο μόριο της ταξιφολίνης ως αποτέλεσμα θεωρητικών υπολογισμών DFT/ M06-2X/6-31G+d. Η διατομική απόσταση των πρωτονίων των C3 - C2' ισούται με 2.516 Å, των C2 - C2' με 3.779 Å, των C3 - C6' με 4.425 Å, των πρωτονίων των C2 - C6' με 2.343 Å, καθώς και των C8 - C2' με 4.626 Å, των C8 - C2 με 4.211 Å, των C3(OH) - C6' με 3.513 Å, 116 των C3(OH) - C2' με 3.888 Å, των C5(OH) - C6 με 3.533 Å και των πρωτονίων των C7(OH) - C8 με 3.520 Å.

Τα DFT θεωρητικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα πειραματικά δεδομένα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR και συμφωνούν απόλυτα με αυτά της κρυσταλλικής δομής.

Διαπιστώνεται ότι η δομή του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη που μελετάται κινητικά και θερμοδυναμικά ως προς το φαινόμενο ανταλλαγής H→D σε υδατικό διάλυμα, είναι αυτή ακριβώς που απεικονίζεται στις **Εικόνες 7.6.1. και 7.6.2.** 



**Εικόνα 7.6.1.** Απεικόνιση της κλίσης της γωνίας του δακτυλίου Β, σε σχέση με το επίπεδο που δημιουργείται από τους δακτυλίους Α και C στο μόριο της ταξιφολίνης ως αποτέλεσμα θεωρητικών υπολογισμών DFT/ M06-2X/6-31G+d.



Εικόνα 7.6.2. Απεικόνιση των διατομικών αποστάσεων των πρωτονίων της ταξιφολίνης ως αποτέλεσμα θεωρητικών υπολογισμών DFT/ M06-2X/6-31G+d.



**Εικόνα 7.7.1.** Φάσμα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της ναρινγενίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- $d_6$  (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, πειραματικός χρόνος=2h39min).



**Εικόνα 7.7.2.** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 2D  ${}^{1}H{}^{1}H$  NOESY NMR 500 MHz της ναρινγενίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, πειραματικός χρόνος=2h39min). Περιοχή διασταύρωσης των κορυφών του πρωτονίου C5(OH) με τα πρωτόνια 3a, 3b και 6 στο μόριο της ναρινγενίνης.

Naringenin's Peaks	Integral [abs]	Integral [rel]	Intensity [abs]
H2'H6'-H3b	-3251000	0,8834	-217708
H2-H3a	-3680150	1,0000	-240746
H2'H6'-H2	-3600150	0,9783	-273380
H2'H6'-H3a	-448065	0,1218	-33491
H2-H3b	-600870	0,1633	-40298
С5(ОН)-НЗа	-108244	0,0294	-10447
C5(OH)-H3b	-67395	0,0183	-7564
С5(ОН)-Н6	-112500	0,0306	-13075

**Πίνακας 7.7.3.** Συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης των τιμών ολοκλήρωσης και εντάσεως με τις αντίστοιχες κορυφές διασταύρωσης, στο φάσμα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της (±)-ναρινγενίνης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, td=1k, πειραματικός χρόνος=2h39min).



**Εικόνα 7.7.4.** Οι πιο σταθερές δομές των συμπλόκων ναρινγενίνη β-κυκλοδεξτρίνη έπειτα από θεωρητικούς υπολογισμούς Docking (a) διαμοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, (b) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, (c) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Απεικόνιση συμπλόκου ναρινγενίνης με DNA (d) διαμοριακές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, (e) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και (f) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Yousuf, Muthu, and Enoch 2013).



**Εικόνα 7.8.1.** Φάσμα 2D  ${}^{1}H{}^{-1}H$  NOESY NMR (500 MHz) της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη- $d_{6}$  (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, πειραματικός χρόνος=2h39min).



**Εικόνα 7.8.2.** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, πειραματικός χρόνος=2h39min). Περιοχή διασταύρωσης των κορυφών του πρωτονίου C5(OH) με τα πρωτόνια 3a, 3b και 6 στο μόριο της εριοδικτυόλης.

Eriodictyol's Peaks	Integral [abs]	Integral [rel]	Intensity [abs]
H3b-H3a	-15934667	1,0000	-87325
H2'-H3b	-1661767	0,1104	-70153
H6'-H3b	-1501467	0,0880	-98666
H2'-H3a	-137808	0,0087	-19512
H6'-H3a	-151420	0,0095	-19538
H2-H3a	-3299667	0,2071	-67181
H2-H3b	-475130	0,0298	-72256
H2'-H2	-1859300	0,1167	-155092
H6'-H2	-2280867	0,1431	-174323
С5(ОН)-Н6	-58307	0,0035	-12668

**Πίνακας 7.8.3.** Συγκεντρωτικός πίνακας συσχέτισης των τιμών ολοκλήρωσης και εντάσεως με τις αντίστοιχες κορυφές διασταύρωσης, στο φάσμα 2D<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR 500 MHz της εριοδικτυόλης (5mM) σε διαλύτη ακετόνη-d<sub>6</sub> (T=283K, αριθμός παλμών=6, d8=1s, td=1k, πειραματικός χρόνος=2h39min).



**Εικόνα 7.8.4.** Δομή του συμπλόκου εριοδικτυόλης - JNK, από θεωρητικούς υπολογισμούς Docking. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν δεσμούς υδρογόνου (Ε. Lee et al. 2013).

## 7.9 Μελέτη αλληλεπίδρασης της ταξιφολίνης με την πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA) με φασματοσκοπία STD NMR.

Η φαρμακευτική έρευνα τα τελευταία χρόνια εστιάζει στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φαρμάκων-υποκαταστατών με διάφορους πρωτεϊνικούς υποδοχείς. Στην εισαγωγή αναφέρθηκαν πολλές από τις δράσεις του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη, που το καθιστούν ενδεχόμενο υπολιπιδαιμικό, αντι-φλεγμονώδες, αντιοξειδωτικό, αντιπολλαπλασιαστικό φάρμακο ή πιθανό φορέα φαρμάκου με επιλεγμένη χρήση συγκεκριμένου μηχανισμού του μεταβολικού της μονοπατιού για στόχευση. Ένας μηχανισμός στόχευσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι η γλυκοζυλίωση. Η τελευταία, ενδέχεται ότι μειώνει τη συγγένεια πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αγλυκόνες έχουν περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή. Πιστεύεται ότι η γλυκουρονιδίωση διευκολύνει την απέκκριση των φλαβονοειδών από το σώμα, αλλά παράλληλα τα γλυκουρονίδια δείχνουν μικρή συγγένεια με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Συνεπώς είναι δυνατό να διαχέονται σε ιστούς-στόχους, όπου μπορεί να λάβει χώρα απογλυκουρονιδίωση (Gonzales et al. 2015). Συνεπώς η αλληλεπίδραση του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη με την μεγαλύτερη σε ποσοστό πρωτεΐνη του ορού του αίματος αλβουμίνη (SA), αποτελεί μία πρώτη ένδειξη ότι ένας ευρύτερος μηχανισμός επιλεγμένης στόχευσης μπορεί να λάβει χώρα.

Η αλληλεπίδραση του φλαβονοειδούς ταξιφολίνη με την πρωτεΐνη του ορού του αίματος αλβουμίνη (BSA), καθώς και η συμπεριφορά ορισμένων κοινών ιόντων κατά την αλληλεπίδρασή τους, ερευνήθηκαν το 2010 από τον Shi και τους συνεργάτες του, με φθορισμομετρία και φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδουςορατού (Uv-Vis). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ταξιφολίνη περιορίζει ισχυρά τον φθορισμό της BSA μέσω μιας στατικής διαδικασίας σβέσης, Εικόνα 7.9.1.a. Από τα θερμοδυναμικά αποτελέσματα, φάνηκε ότι το υδρόφοβο τμήμα παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση, διότι παρουσία των ιόντων Cu<sup>2+</sup>, Mq<sup>2+</sup>, AI<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, F<sup>-</sup>, NO<sup>-</sup> <sup>3</sup> και SO<sub>2</sub><sup>-4</sup>, οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ΔG είναι αρνητικές που σημαίνει ότι οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται αυθόρμητα, ενώ παράλληλα οι τιμές ΔΗ και ΔG είναι θετικές. Επιπλέον μετρήθηκαν οι αποστάσεις μεταφοράς ενεργειών μεταξύ της BSA και της ταξιφολίνης απουσία και παρουσία ορισμένων κοινών ιόντων, βάση της θεωρίας του Föster. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αποστάσεις μεταφοράς ενεργειών δεν επηρεάζονται. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώθηκε ότι η διαμόρφωση της BSA υφίσταται σημαντική αλλαγή κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου BSA-ταξιφολίνη, με φθορισμομετρία δύο και τριών διαστάσεων, Εικόνες *7.9.1.b έως 7.9.1.f,* (Shi et al. 2010).



**Εικόνα 7.9.1. a)** Σταδιακή μείωση της έντασης του φθορισμού της BSA, έπειτα από προσθήκη ταξιφολίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, **b)** υπέρθεση του φάσματος απορρόφησης της ταξιφολίνης (2×10<sup>6</sup>M) και του φθορισμού της BSA (2×10<sup>6</sup>M), **c)** φάσμα φθορισμού του συμπλόκου BSA-ταξιφολίνης σε pH=7.4 σε Δλ=15nm, **d)** φάσμα φθορισμού του συμπλόκου BSA-ταξιφολίνης σε pH=7.4 σε Δλ=60nm, **e)** φάσμα τριών διαστάσεων φθορισμού του συμπλόκου BSA-ταξιφολίνης σε pH=7.4 σε Δλ=15nm και **f)** αντίστοιχο διάγραμμα περιγράμματος, (Shi et al. 2010).

Το **2011** ο Zhang και οι συνεργάτες του μελέτησαν την αλληλεπίδραση του συμπλόκου ταξιφολίνης – BSA με φάρμακο, (Y. Zhang et al. 2011).

Στα πλαίσια της φασματοσκοπίας NMR έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές οι οποίες επιτρέπουν την μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με υποκαταστάτες (ligands). Στη συγκεκριμένη διατριβή, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης της ταξιφολίνης με την πρωτεΐνη του ορού του αίματος αλβουμίνη (BSA), με STD NMR. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των αρωματικών πρωτονίων των ανθράκων C2', C5' και C6' του δακτυλίου B, καθώς και των αρωματικώνανταλλάξιμων πρωτονίων του C6 και του C8 του δακτυλίου A της ταξιφολίνης με 125 την πρωτεΐνη BSA. Η παρατήρηση έγινε μέσω του φάσματος διαφοράς STD NMR, *Εικόνα 7.92.* 



**Енко́va 7.9.2.** Фа́оџата NMR (500 MHz) уна тлу µєλє́тл аддлдялібраоло тло (+)таξіфодіуло (2.5mM) µє тлу прытеїул аддоиµіул (BSA), оє риθµютіко біадиµа PBS pD=7.4 оє біади́тл D<sub>2</sub>O (**a**) Фа́оџа 1D <sup>1</sup>H NMR тло таξіфодіуло (T=298K, аріθµо́с падµώv=32,  $t_{aq}=2.196s$ , пеіраµатіко́с хро́уос=4min11s). (**b**) Фа́оµа 1D <sup>1</sup>H NMR тло таξіфодіуло кан тло аддоиµіуло ή BSA (T=298K, аріθµо́с падµώv=32,  $t_{aq}=2.196s$ , пеіраµатіко́с хро́уос=4min11s). (**c**) Фа́оµа STD біафора́с тыу опµа́тыу тло таξіфодіуло кан тло аддоиµіуло (εντός συντονισµоµ=0.43ppm кан εкто́с συντονισµоµ=400ppm, хро́уос кореоµоµ (saturation time)=2s, T=298K, аріθµо́с падµώv=8\*8 ки́кдоис, пеіраµатіко́с хро́уос=1h32min).

## 8ο Κεφάλαιο - Κινητικές Μελέτες

## 8.1 Μελέτη κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων στο μόριο της ταξιφολίνης

Έπειτα από εκτενή βιβλιογραφική έρευνα, διαπιστώθηκε ότι είναι εξαιρετικά περιορισμένος ο αριθμός των άρθρων σχετικά με την μελέτη της συμπεριφοράς των αρωματικών πρωτονίων ως προς το φαινόμενο ανταλλαγής με δευτέριο. Η πρώτη σχετική παρατήρηση αφορούσε την δομή της ένωσης ρεζορκινόλη και της παρεμφερούς ένωσης φλορογλουκινόλη, έγινε από τους Hand και Horowitz το **1964**. Με φασματοσκοπική τεχνική NMR διαπιστώθηκε ότι σε pD=8, και διαλύτη D<sub>2</sub>O τα πρωτόνια 2,4 και 6 ανταλλάσσονται πλήρως με δευτέριο μέσα σε μία ώρα (Hand et al. 1964).

Το **1993** παρατηρήθηκε η συμπεριφορά των ανθοκυανινών και των αρωματικών τους πρωτονίων σε οξινισμένη δευτεριωμένη μεθανόλη (CD<sub>3</sub>OD) από τον Pedersen και την ομάδα του και τα πρωτόνια αυτά ταυτοποιήθηκαν εύκολα ως δύο διακριτές διπλές κορυφές. Όταν το δείγμα όμως αποθηκεύτηκε για τρεις μήνες και στη συνέχεια επαναλήφθηκε το πείραμα διαπιστώθηκε ότι οι εντάσεις των κορυφών των 6 και 8 είχαν ελαττωθεί σημαντικά ενώ για τα υπόλοιπα πρωτόνια δεν προέκυψε αλλαγή. Η εξήγηση που δόθηκε ήταν ότι τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν παρόμοιο ρυθμό ανταλλαγής με το δευτέριο λόγω της *meta* - υποκατάστασης με άτομα οξυγόνου στον ίδιο δακτύλιο, (Pedersen et al. 1993).

Το **1994** ο Υαο και ο Evilia θεώρησαν ότι η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης ανταλλαγής H→D του βενζοϊκού δακτυλίου με OD<sup>-</sup> είναι 3 τάξεις μεγέθους υψηλότερη στους 400 °C συγκριτικά με αυτή των 25 °C σε νερό. Το πρωτόνιο στην *ortho* θέση βρέθηκε ότι ήταν ελαφρώς πιο όξινο από αυτά στη *meta* ή *para* θέση στην 1,2-διφαίνυλουδραζίνη και το νιτροβενζόλιο, όταν αντιδρούν υπό βασικές συνθήκες σε διάλυμα D<sub>2</sub>O στους 400°C. Ωστόσο αντιμετώπισαν ορισμένες δυσκολίες όταν επιχείρησαν να προβούν σε κινητικές και θερμοδυναμικές μελέτες, λόγω αδυναμίας να διατηρηθούν σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας (Yao and Evilia 1994).

Το **1997**, επιτεύχθηκε δευτερίωση των αρωματικών πρωτονίων των δακτυλίων Α και Β του φλαβονοειδούς γενιστεΐνης από την Wắhắlắ και τους συνεργάτες της, έπειτα από μια εναλλαγή όξινων και βασικών συνθηκών σε χρονικό διάστημα των τριών ημερών (Rasku et al. 1997), ενώ το **1999** επιτεύχθηκε δευτερίωση υπό τις ίδιες συνθήκες της δαϊδεζίνης και της διϋδροδαϊδίνης (Rasku et al. 1999). Ο Bai και η ερευνητική του ομάδα το **2000** για πρώτη φορά κατόρθωσε να αποδείξει με λεπτομερή κινητική και θερμοδυναμική μελέτη ότι η ρεζορκινόλη δευτεριώνεται σε καθαρό δευτεριωμένο νερό, υπό τις συνθήκες των 200-450 °C (723 K) σε πίεση 400 bar (Bai, Palmer, and Yonker 2000).

Η δευτερίωση του βενζιμιδαζολίου επιτεύχθηκε σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και 35% κατά βάρος DCl, υπό μικροκύματα 9-140 W, σε θερμοκρασίες 100-175°C και χρόνο 30-60 min, από τους Vaidyanathan και Surber (Vaidyanathan and Surber **2005**). Το **2007**  μελετήθηκαν οι χρόνοι ημιζωής των πρωτονίων του C-6 και C-8 φλαβονοειδών που ανήκουν στην κατηγορία των ανθοκυανιδινών και των πυρανθοκυανιδίνων. Κατά τη μελέτη ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη-d<sub>4</sub> σε συνδυασμό με CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>D:CD<sub>3</sub>OD (5:95, v/v) και σε θερμοκρασία δωματίου. Το ποσοστό δευτερίωσης του πρωτονίου του C-6 ήταν από 2-29% σε διάστημα 24h και έως 58% σε διάστημα 85h, ενώ 12-31% ήταν το ποσοστό δευτερίωσης του πρωτονίου του C-8 σε διάστημα 24h και έως 58% σε διάστημα 51h.

Όπως έγινε αντιληπτό από τις αναφορές που υπάρχουν έως τώρα στην διεθνή βιβλιογραφία, το φαινόμενο ανταλλαγής των αρωματικών πρωτονίων με δευτέριο έχει παρατηρηθεί αρκετές φορές, αλλά το αποτέλεσμα έδειξε ότι δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά.

Αφορμή για την έναρξη της έρευνας αυτής αποτέλεσε η παρατήρηση της ελάττωσης του ολοκληρώματος του πρωτονίου του C-6, κατά την αλληλεπίδραση του αναλόγου κερσετίνης-αλανίνης και της ταξιφολίνης με την πρωτεΐνη BcL-2 υπερεκφρασμένη σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα με πειράματα in-cell NMR. ("Πριμηκύρη Αλεξάνδρα Βιολόγος, Msc Διδακτορική Διατριβή Ιωάννινα 20 13," n.D.) Στη μετέπειτα πορεία κατά την εκπόνηση του παρόντος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης διαπιστώθηκε ότι ανταλλάσσεται και το πρωτόνιο 8, συνεπώς ακολούθησαν εκτενείς μελέτες στο μόριο της ταξιφολίνης, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε ότι ανταλλάσσονται κατά τον ίδιο τρόπο τα πρωτόνια 2, 4 και 6 της ρεζορκινόλης.



**Εικόνα 8.1.1.** Περιοχή φασμάτων 1D <sup>1</sup>Η NMR (400 MHz) που επιδεικνύει την αντίδραση ανταλλαγής των πρωτονίων 2, 4 και 6 της ρεζορκινόλης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6. T=60°C /333 K, αριθμός παλμών=8, tacq=3.96s, πειραματικός χρόνος=4min avá φάσμα. (**A**) Αρχικό φάσμα και (**B**) φάσμα μετά τη χρονική περίοδο 72h και (**Γ**) φάσμα μετά τη χρονική περίοδο 144h.



**Εικόνα 8.1.2.** Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων 1D <sup>1</sup>Η NMR (500 MHz) που επιδεικνύει την αντίδραση ανταλλαγής των πρωτονίων του C-6 και C-8 του δακτυλίου A του μορίου της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6. T=35°C /308 K, αριθμός παλμών=56, tacq=3.17s, πειραματικός χρόνος=27min avá φάσμα. **(a)** Αρχικό φάσμα και **(b)** φάσμα μετά τη χρονική περίοδο 54h.



**Εικόνα 8.1.3.** Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων 1D <sup>1</sup>Η NMR (500 MHz) που επιδεικνύει την αντίδραση ανταλλαγής των πρωτονίων του C-6 και C-8 του δακτυλίου B του μορίου της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6. T=35°C /308 K, αριθμός παλμών=56, tacq=3.17s, πειραματικός χρόνος=27min avá φάσμα. **(a)** Αρχικό φάσμα και **(b)** φάσμα μετά τη χρονική περίοδο 54h.



**Εικόνα 8.1.4.** Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων 1D<sup>1</sup>Η NMR (500 MHz) που επιδεικνύει την αντίδραση ανταλλαγής των πρωτονίων του C-6 και C-8 του δακτυλίου B του μορίου της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6. T=35°C /308 K, αριθμός παλμών=56, tacq=3.17s, πειραματικός χρόνος=27min ανά φάσμα. Υπέρθεση φασμάτων που λήφθηκαν κατά την χρονική περίοδο των 54h (a) μετωπική (b) πλάγια.

Πραγματοποιήθηκε λήψη διαδοχικών φασμάτων 1D <sup>1</sup>H, σε φασματογράφο NMR (500 MHz), σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης (1atm, 1bar, 14,7 p.s.i.), σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6. Σε διάστημα 72h διαπιστώθηκε ότι ανταλλάσσεται το 91,5% των πρωτονίων 4 και 6, και το 65% του πρωτονίου 2 της ρεζορκινόλης (2.5 mM) *Εικόνα 8.1.1.B.* Το δείγμα διατηρήθηκε σε υδρόλουτρο στους 60°C /333 K και στο διάστημα των 144h έγινε πλήρης δευτερίωση των πρωτονίων *Εικόνα 8.1.1.Γ.* 

Αντίστοιχα ἑπειτα από λήψη διαδοχικών φασμάτων 1D <sup>1</sup>H, σε φασματογράφο NMR (500 MHz), σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (T=35°C /308 K) και πίεσης (1atm, 1bar, 14,7 p.s.i.), σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6, σε διάστημα 54h διαπιστώθηκε ότι τα αρωματικά πρωτόνια 6 και 8 στον δακτύλιο A της ταξιφολίνης (2.5 mM), ανταλλάσσονται πλήρως **Εικόνα 8.1.2.a, b.** παρότι οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται διαφέρουν σημαντικά από τις ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH που χρησιμοποιήθηκαν στη βιβλιογραφία (Yao and Evilia 1994; Bai, Palmer, and Yonker 2000; Vaidyanathan and Surber 2005; Pedersen et al. 1993; Wähälä 2007; Sharma and Hartwig 2015; Rasku 2000; Rasku et al. 1999; Jordheim et al. 2007).

Στις ίδιες συνθήκες, σύγκριση των ίδιων φασμάτων έδειξε ότι τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου Β της ταξιφολίνης δεν ανταλλάσσονται με το δευτέριο *Εικόνα 8.1.3.* 

Κατόπιν πλάγιας υπέρθεσης των πολλαπλών, διαδοχικών φασμάτων 1D <sup>1</sup>H, *Εικόνα* 8.1.4.*a, b.* έγινε φανερό ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες (διαλύτης, συγκέντρωση φλαβονοειδούς, συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων, pD) μπορεί να γίνει κινητική μελέτη της αντίδρασης ανταλλαγής των δύο αρωματικών πρωτονίων με το δευτέριο.



**Εικόνα 8.1.5.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 8.1.6.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 8.1.7.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 8.1.8.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 8.1.9.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 8.1.10.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 8.1.11.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 8.1.12.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 8.1.13.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 8.1.14.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 8.1.15.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1 M) pD=9.6.



**Εικόνα 8.1.16.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1 M) pD=9.6.

Η μελέτη κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6, καθώς και του πρωτονίου του C-8 του μορίου της ταξιφολίνης πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία 1D <sup>1</sup>Η NMR μεταβλητής θερμοκρασίας. Η κάθε καμπύλη κινητικής αποτελείται από ένα σύνολο σημείων όπου το κάθε ένα από αυτά αντιστοιχεί στο ολοκλήρωμα της κορυφής του πρωτονίου του C-8 ή του πρωτονίου του C-6 αντιστοίχως, για δεδομένη χρονική στιγμή. Το πρωτόνιο του C-2' στον δακτύλιο Β της ταξιφολίνης, δίνει διακριτό σήμα NMR (δ=6.87ppm). Δεν ανταλλάσσεται, **Εικόνα 8.1.3.** οπότε χρησιμοποιήθηκε ως κορυφή αναφοράς κατά την ολοκλήρωση.

Οι επιμέρους καμπύλες μεμονωμένα αποτελούν μια καλή πηγή πληροφοριών για συγκεκριμένες συνθήκες. Η σύγκριση ενός ευρύτερου αριθμού καμπυλών, μπορεί να δώσει μια ολοκληρωμένη εικόνα της κινητικής του φαινομένου ανταλλαγής.

Σύγκριση των καμπυλών κινητικής κάθε πρωτονίου **Εικόνες 8.1.2. έως 8.1.16.** για συγκεκριμένο pD και συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει την κινητική της αντίδρασης δευτερίωσης των πρωτονίων (αντίστοιχα μείωση της θερμοκρασίας επιβραδύνει).

Πιο συγκεκριμένα, σε pD 7.6 και συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα 2.5mM, η καμπύλη κινητικής των πρωτονίων του C-6 και του C-8 στη θερμοκρασία των 35 °C έδειξε ότι ο χρόνος ημιζωής του πρωτονίου του C-8 είναι 1844.26±61.16min ενώ ο αντίστοιχος του πρωτονίου του C-6 είναι 367.27±8.77min. Με αύξηση της θερμοκρασίας για παράδειγμα στους 50°C και διατήρηση των υπόλοιπων συνθηκών σταθερών, ο χρόνος ημιζωής του πρωτονίου του C-8 ελαττώνεται στα 379.2±9.69min, ενώ ο αντίστοιχος του πρωτονίου του C-6 στα 113.25±7.78min *Εικόνα 8.1.17*. Παρατηρείται δηλαδή ότι το πρωτόνιο του C-6 κινητικά ανταλλάσσεται με μεγαλύτερη ταχύτητα. Σε pD 9.6 διακρίνεται αντίστοιχο αποτέλεσμα ἑπειτα από αύξηση της θερμοκρασίας.

Από τα δεδομένα συνάγεται το συμπέρασμα ότι η οποιαδήποτε μεταβολή στη θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα δευτερίωσης των πρωτονίων του C-6 και C-8 του Α αρωματικού δακτυλίου της ταξιφολίνης και η ταχύτητα της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου C-6 με δευτέριο είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα αντίδρασης του πρωτονίου C-8 σε ουδέτερο και βασικό pD, σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 10°C-55°C **Εικόνες 8.1.2.** έως **8.1.16.**


**Εικόνα 8.1.17.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6, στις θερμοκρασίες των **35°C / 308K** (πάνω) και **50°C / 323K** (κάτω).

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε σύγκριση των καμπυλών κινητικής κάθε πρωτονίου για συγκεκριμένο pD και θερμοκρασία, έπειτα από μεταβολή στη συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων από 2.5mM σε 50mM. Έγινε φανερό ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων αυξάνει την ταχύτητα δευτερίωσης των πρωτονίων (αντίστοιχα μείωση της συγκέντρωσης επιβραδύνει την ταχύτητα).

Πιο συγκεκριμένα, σε pD 7.6, θερμοκρασία 35°C / 308 K και συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα 2.5mM, η καμπύλη κινητικής των πρωτονίων του C-6 και του C-8 έδειξε ότι ο χρόνος ημιζωής του πρωτονίου του C-8 είναι 1844.26±61.16min ενώ ο αντίστοιχος του πρωτονίου του C-6 είναι 367.27±8.77min. Με αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων σε 50 mM και διατήρηση των υπόλοιπων συνθηκών σταθερών, ο χρόνος ημιζωής του πρωτονίου του C-8 ελαττώνεται σε 695.07±25.49min, ενώ ο αντίστοιχος του πρωτονίου του C-6 στα 48.06±2.36min *(Εικόνα 8.1.18.)*. Παρατηρείται επίσης ότι το πρωτόνιο του πρωτονίου του C-6 κινητικά αντικαθίσταται με μεγαλύτερη ταχύτητα, έπειτα από αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα. Σε pD=9.6 παρατηρείται αντίστοιχο αποτέλεσμα.

Από τα δεδομένα γίνεται φανερό ότι η οποιαδήποτε μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα επηρεάζει την ταχύτητα δευτερίωσης των πρωτονίων του C-6 και C-8 του αρωματικού δακτυλίου Α της ταξιφολίνης. Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 με δευτέριο είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα αντίδρασης του πρωτονίου του C-8 κατά τη μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων, σε ουδέτερο και βασικό pD, σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 10°C-55°C (Εικόνες 8.1.2. έως 8.1.16.).



**Εικόνα 8.1.18.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O σε pD=7.6, στη θερμοκρασία των 35°C / 308K και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης **2.5 mM** (πάνω καμπύλες), **50 mM** (κάτω καμπύλες).

Η επόμενη σύγκριση αφορά τις καμπύλες κινητικής κάθε πρωτονίου για συγκεκριμένη θερμοκρασία και συγκεκριμένη συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων στο κάθε διάλυμα, έπειτα από μεταβολή του pD από 7.6 σε 9.6. Παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον το ότι η αύξηση του pD επιταχύνει την κινητική της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του C-6 και ταυτόχρονα επιβραδύνει την αντίδραση δευτερίωσης του πρωτονίου του C-8. Διαπιστώθηκε ότι σε pD=9.6, στις θερμοκρασίες όπου η κινητική της δευτερίωσης του πρωτονίου του C-8 είναι πολύ αργή. Ως συνέπεια αυτό οδήγησε στο να γίνει παρακολούθηση του φαινομένου ανταλλαγής σε διαφορετική περιοχή θερμοκρασιών για το του πρωτονίου του C-6 σε σχέση με το του πρωτονίου του C-8.

Η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα που επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη για τη συγκεκριμένη σύγκριση είναι τα **25mM**. Στο σημείο αυτό για να αποφευχθεί η σύγχυση σε μια ενδεχόμενη σύγκριση με τα αποτελέσματα των προηγούμενων συγκρίσεων, θα ήταν καλό να τονιστεί ότι η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων στις τελευταίες είναι 2.5mM και 50mM αντίστοιχα.

Σε θερμοκρασία 35°C / 308 K, συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα 25mM και pD 7.6, από την καμπύλη κινητικής των πρωτονίων του C-6 και του C-8 προκύπτει ότι ο χρόνος ημιζωής του πρωτονίου του C-8 είναι 594.06±37.39min ενώ ο αντίστοιχος του πρωτονίου του C-6 81.2±9.02min. Με αύξηση του pD σε 9.6 και διατήρηση των υπόλοιπων συνθηκών σταθερών, ο χρόνος ημιζωής του πρωτονίου του C-8 αυξάνεται στα 724.42±7.8min, ενώ ο αντίστοιχος του C-6 μειώνεται στα 34.82±0.73min. *Εικόνα 8.1.19.* Παρατηρείται επίσης ότι η ταχύτητα της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του C-6 είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πρωτονίου του C-8 όταν αλλάζει το pD από 7.6 σε 9.6.

Γίνεται επομένως σαφές ότι αύξηση του pD, αυξάνει την ταχύτητα δευτερίωσης του πρωτονίου του C-6, ενώ μειώνει την ταχύτητα δευτερίωσης του πρωτονίου του C-8 στον αρωματικό δακτύλιο A της ταξιφολίνης. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι η ταχύτητα ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα αντίδρασης του πρωτονίου του C-8 έπειτα από μεταβολή στο pD, σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 10°C-55°C (Εικόνες 8.1.2. έως 8.1.16.).



**Εικόνα 8.1.19.** Καμπύλες κινητικής της αντίδρασης ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O σε θερμοκρασία 35°C / 308K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων με συγκέντρωση 25 mM και **pD=7.6** (πάνω καμπύλες), **pD=9.6** (κάτω καμπύλες).

## 90 Κεφάλαιο - Θερμοδυναμικές Μελέτες

9.1 Θερμοδυναμική Μελέτη της αντίδρασης ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων στο μόριο της ταξιφολίνης - Εξίσωση Arrhenius.



**Εικόνα 9.1.1** Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 9.1.2** Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 9.1.3** Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 9.1.4** Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 9.1.5** Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 9.1.6** Εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1 M) pD=9.6.

Εξίσωση Arrhenius							
Buffer 's concentration		Πρωτόνιο του C-8		Πρωτόνιο του C-6			
	ρυ	E <sub>a</sub> (kcal mol⁻¹)	A (sec <sup>-1</sup> )	E <sub>a</sub> (kcal mol⁻¹)	A (sec <sup>-1</sup> )		
2.5 mM	7.6	21.94±0.76	<b>10</b> <sup>10.52</sup> ± 10 <sup>0.53</sup>	14.52±2.23	<b>10</b> <sup>5.96</sup> ± 10 <sup>1.55</sup>		
25 mM	7.6	19.40±1.59	<b>10</b> <sup>8.99</sup> ± 10 <sup>1.13</sup>	14.62±0.47	<b>10</b> <sup>6.52</sup> ± 10 <sup>0.33</sup>		
50 mM	7.6	19.95±0.18	<b>10</b> <sup>9.54</sup> ± 10 <sup>0.13</sup>	21.24±1.96	<b>10</b> <sup>11.6</sup> ±10 <sup>1.40</sup>		

Buffer 's concentration	рD	Πρωτόνια	о тоџ С-8	Πρωτόνιο του C-6		
		E <sub>a</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	A (sec <sup>-1</sup> )	E <sub>a</sub> (kcal mol <sup>-1</sup> )	A (sec <sup>-1</sup> )	
2.5 mM	9.6	*	*	*	*	
25 mM	9.6	19.06±1.80	<b>10</b> <sup>8.68</sup> ± 10 <sup>1.25</sup>	17.26±0.40	<b>10</b> <sup>8.72</sup> ± 10 <sup>0.29</sup>	
50 mM	9.6	20.23±0.78	<b>10</b> <sup>10.25</sup> ± 10 <sup>0.78</sup>	17.55±0.40	<b>10</b> <sup>9.19</sup> ± 10 <sup>0.40</sup>	
1 M	9.6	16.58±1.22	<b>10</b> <sup>7.39</sup> ± 10 <sup>1.22</sup>	9.34±0.51	<b>10</b> <sup>3.41</sup> ± 10 <sup>0.51</sup>	

**Πίνακας 9.1.7.** Ποσοτικά αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης Arrhenius στην αντίδραση δευτερίωσης των αρωματικών πρωτονίων του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.

\* Δεν κατέστη δυνατή η μέτρηση διότι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων με τιμή pD=9.6 και συγκέντρωση 2.5mM βρίσκεται κοντά ή κάτω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού.



**Εικόνα 9.1.8.** Σύγκριση των γραφικών παραστάσεων της εξίσωσης **Arrhenius** στην αντίδραση δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-6** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.1.9.** Σύγκριση των γραφικών παραστάσεων της εξίσωσης **Arrhenius** στην αντίδραση δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-8** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.

9.2 Θερμοδυναμική μελέτη της αντίδρασης ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων στο μόριο της ταξιφολίνης – Εξίσωση Eyring.



**Εικόνα 9.2.1** Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (2.5 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 9.2.2** Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 9.2.3** Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=7.6.



**Εικόνα 9.2.4** Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (25 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 9.2.5** Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (50 mM) pD=9.6.



**Εικόνα 9.2.6** Εφαρμογή της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση ανταλλαγής του πρωτονίου του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (1 M) pD=9.6.

Εξίσωση Eyring								
Buffer 's concentration		Πρωτόνιο του C-8			Πρωτόνιο του C-6			
	pD	ΔH <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	-T∆S <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	∆G <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	ΔH <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	-T∆S <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	ΔG <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	
2.5 mM	7.6	21.31±0.76	3.73	25.04	13.89±2.23	9.95	23.84	
25 mM	7.6	18.79±1.59	5.80	24.59	14.01±0.47	9.17	23.18	
50 mM	7.6	19.34±0.18	5.05	24.39	20.63±1.96	2.24	22.87	

Buffer 's concentration	рD	п	Ι <mark>ρωτόνιο του C</mark> ·	-8	Πρωτόνιο του C-6			
		∆H <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	-T∆S <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	∆G <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	∆H <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	-T∆S <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	∆G <sup>#</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	
2.5 mM	9.6	*	*	*	*	*	*	
25 mM	9.6	18.43±1.79	6.24	24.67	16.67±0.4	6.15	22.81	
50 mM	9.6	19.62±0.77	4.07	23.69	16.96±0.4	5.51	22.46	
1 M	9.6	15.96±1.22	7.98	23.94	8.76±0.5	13.38	22.14	

**Πίνακας 9.2.7.** Ποσοτικά αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης Eyring στην αντίδραση δευτερίωσης των αρωματικών πρωτονίων του C-6 και C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.

\* Δεν κατέστη δυνατή η μέτρηση διότι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων με τιμή pD=9.6 και συγκέντρωση 2.5mM βρίσκεται κοντά ή κάτω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού.



**Εικόνα 9.2.8.** Σύγκριση των γραφικών παραστάσεων της εξίσωσης **Eyring** στην αντίδραση δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-6** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.2.9.** Σύγκριση των γραφικών παραστάσεων της εξίσωσης **Eyring** στην αντίδραση δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-8** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.2.10.** Γραφική παράσταση τιμών του ενθαλπικού και εντροπικού παράγοντα στο φαινόμενο ανταλλαγής των αρωματικών πρωτονίων του C-6 και του C-8 της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.2.11.** Γραμμική εξάρτηση των μεταβολών ενθαλπίας (ΔΗ<sup>#</sup>) – εντροπικού όρου (ΤΔS<sup>#</sup>) της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-6** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.2.12.** Γραμμική εξάρτηση των μεταβολών ενθαλπίας (ΔΗ<sup>#</sup>) – εντροπικού όρου (ΤΔS<sup>#</sup>) της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-8** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.2.13.** Γραμμική εξάρτηση των μεταβολών ενθαλπίας (ΔΗ<sup>#</sup>) – εντροπίας (ΔS<sup>#</sup>) της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-6** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.



**Εικόνα 9.2.14.** Γραμμική εξάρτηση των μεταβολών ενθαλπίας (ΔΗ<sup>#</sup>) – εντροπίας (ΔS<sup>#</sup>) της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του **C-8** της ταξιφολίνης (2.5 mM) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων διαφορετικών συγκεντρώσεων και τιμών pD.

Έναν αιώνα πριν ο Constable παρατήρησε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση της ενθαλπίας και της εντροπίας ενεργοποίησης κατά την διάρκεια μετρήσεων στην αντίδραση αφυδρογόνωσης της αιθανόλης με διαφορετικούς καταλύτες. Κάθε προσπάθεια για αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης και κατ' επέκταση μείωση της ενθαλπίας ενεργοποίησης με νέο καταλύτη οδηγούσε σε μη αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθώς ο εντροπικός όρος δρούσε αντισταθμιστικά. Ο όρος που χρησιμοποιήθηκε έκτοτε για την περιγραφή του φαινομένου είναι «enthalpy-entropy compensation effect-(EEC)» ή φαινόμενο αντιστάθμισης, αλλά και πολλοί άλλοι όπως «κανόνας-θ», «Meyer–Neldel», «Zawadzki–Bretszanjder». Παρόμοιο φαινόμενο είναι η ισοκινητική συσχέτιση «isokinetic relationships-(IKR)», (Linert and Yelon 2013).

Το φαινόμενο ΕΕC (και το IKR), παρατηρήθηκε επίσης κατά θερμοδυναμική ανάλυση αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών - υποκαταστατών (ligands) και νουκλεϊνικών οξέων (Sharp 2001), στη θερμοδυναμική σχηματισμού μυκιλλίων, (K. S. Sharma and Rakshit 2004; Mukherjee, Mukherjee, and Moulik 1994; L.-J. Chen, Lin, and Huang 1998), στη μελέτη σχηματισμού μικρογαλακτωμάτων (Hait and Moulik 2001), καθώς και στη χημεία τροφίμων, (Borea et al. 1998).

Ειδικότερα σε μία σειρά αντιδράσεων στις οποίες: (a) τα αντιδρώντα παραμένουν τα ίδια και αλλάζει ο διαλύτης ή (b) αλλάζει ένας υποκαταστάτης των αντιδρώντων ενώ το περιβάλλον παραμένει ίδιο, η ενθαλπία (ΔH<sub>i</sub>), η εντροπία (ΔS<sub>i</sub>) και η ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG<sub>i</sub>) μεταβάλλονται σύμφωνα με την σχέση: **(1)** ΔG<sub>i</sub> = ΔH<sub>i</sub> - T ΔS<sub>i</sub>. Επιπλέον εάν η αντίδραση υπακούει στην θεωρία της μεταβατικής κατάστασης ή την θεωρία των κρούσεων, κατά κανόνα ισχύουν οι σχέσεις Eyring – Arrhenius. Συνεπώς η σταθερά ταχύτητας (k<sub>i</sub>), ο προεκθετικός όρος (A<sub>i</sub>), η ενέργεια ενεργοποίησης (E<sub>a,i</sub>), η ενθαλπία ενεργοποίησης (ΔH<sup>#</sup><sub>i</sub>), καθώς και η εντροπία ενεργοποίησης (ΔS<sup>#</sup><sub>i</sub>) μεταβάλλονται σύμφωνα με τις εξισώσεις: **(2)** k<sub>i</sub> = A<sub>i</sub> exp(-E<sub>a,i</sub>/RT) και **(3)** k<sub>i</sub> = (k<sub>B</sub>T/h)exp(ΔS<sup>#</sup><sub>i</sub>/R)exp(-ΔH<sup>#</sup><sub>i</sub>/RT), (οι σχέσεις αναλύονται διεξοδικά στο 3<sub>o</sub> Κεφάλαιο). Μερικές φορές επικρατεί γραμμική συσχέτιση των όρων InA<sub>i</sub>, E<sub>a,i</sub> καθώς και των TΔS<sup>#</sup>, ΔH<sup>#</sup>:

(4) In A<sub>i</sub> = a + E<sub>a,i</sub>/Rβ, (5) ΔH<sup>#</sup><sub>i</sub> = a + β ΔS<sup>#</sup><sub>i</sub> ή (6) ΔH<sub>i</sub> = a + β ΔS<sub>i</sub>, όπου τα a και β αποτελούν σταθερές. Αυτό το φαινόμενο είναι το «enthalpy-entropy compensation effect» ή φαινόμενο αντιστάθμισης, (Liu and Guo 2001).

Αντίστοιχα έχει διαπιστωθεί ότι σε σειρές αντιδράσεων στις οποίες: (a) τα αντιδρώντα παραμένουν τα ίδια και αλλάζει ο διαλύτης ή (b) αλλάζει ένας υποκαταστάτης των αντιδρώντων ενώ το περιβάλλον παραμένει ίδιο, παρουσιάζεται ένα κοινό σημείο τομής με υπέρθεση των καμπυλών **In A<sub>i</sub> - 1/T**. Αυτό είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των αντιδράσεων με ισοκινητική συσχέτιση «isokinetic relationships-(IKR)». Το σημείο τομής ορίζει την ισοκινητική θερμοκρασία. Σε αυτή, οι σταθερές ταχύτητας (k<sub>i</sub>) συγκλίνουν και οι διαφορές μεταξύ των **Ink**<sub>i</sub>, ελαχιστοποιούνται, δηλ. στο σημείο αυτό υπάρχει η μικρότερη δυνατή τιμή επιλεκτικότητας και κατ' επέκταση άμεση συσχέτιση της ισοκινητική σχέση, συνδέεται άμεσα με το περιβάλλον στο οποίο εξελίσσεται το φαινόμενο και αποδίδεται σε χημικές αλληλεπιδράσεις αλλά και σε αντιστρεπτή μεταφορά ενέργειας μεταξύ των αντιδρώντων και του διαλύτη (Linert, 1990).

Παράλληλα ανασκόπηση σχετικών ἀρθρων που κἀνουν λὀγο για την ισοκινητική συσχἑτιση (isokinetic relation), οδήγησε στο ὀτι η εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων που προτἀθηκε από τον Exner μπορεί να αποτελέσει μια καλή μαθηματική επαλήθευση του φαινομἑνου, (O Exner and Belunek 1973; O. Exner 1970; B. O. Exner 1973; Otto Exner 2000; O Exner 1972).

Από την θερμοδυναμική συσχέτιση των αρωματικών πρωτονίων του C-6 και του C-8 της ταξιφολίνης **Εικόνες 9.2.10., 9.2.11, 9.2.12,** αποδεικνύεται ότι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs διατηρείται σταθερή έπειτα από οποιαδήποτε μεταβολή στο pH, στη θερμοκρασία ή στη συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων του υδατικού διαλύματος. Αποδεικνύεται ότι το «compensation effect» ή φαινόμενο αντιστάθμισης λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση.

Η σύνδεση του φαινομένου ανταλλαγής των αρωματικών πρωτονίων με το «compensation effect» ή φαινόμενο αντιστάθμισης, καθώς και με την ισοκινητική συσχέτιση «isokinetic relationships-(IKR)» είναι θεμελιώδης. Από το θερμοδυναμικό προφίλ των αρωματικών πρωτονίων του C-6 και του C-8 της ταξιφολίνης *Εικόνες 9.2.10., 9.2.11, 9.2.12,* και από την κλίση της καμπύλης ενθαλπίας (ΔΗ<sup>#</sup>) – εντροπικού όρου (TΔS<sup>#</sup>) της αντίδρασης δευτερίωσης του πρωτονίου του C-8 καθώς του πρωτονίου του C-6 της ταξιφολίνης *Εικόνες 9.2.11.* και *9.2.12.,* αποδεικνύεται η ύπαρξη ενός αντισταθμιστικού παράγοντα που δεν μπορεί να είναι άλλος από αυτόν του νερού. Ο ρόλος του νερού στη διατήρηση της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG<sup>i</sup>) του συστήματος, παρά τις αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν στη θερμοκρασία, στο pH, ή στην συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων, φαίνεται ότι είναι καθοριστικός. Συνεπώς, μείωση του ενθαλπικού παράγοντα ΔΗ<sup>#</sup>λόγω σχηματισμού ισχυρών δεσμών υδρογόνου με τα μόρια H<sub>2</sub>O αντισταθμίζεται από τη μεταβολή του εντροπικού παράγοντα (TΔS<sup>#</sup>) λόγω περιορισμών των βαθμών ελευθερίας αυτών των μορίων H<sub>2</sub>O.

### 9.3 Θεωρητικοί υπολογισμοί DFT, με τις μεθόδους B3LYP/6-31G+d και M06-2X/6-31G+d. Πραγματοποιήθηκαν από τον Αν. Καθηγητή του τμήματος Χημείας Σίσκο Μιχαήλ.

Η ταυτομέρεια είναι μια ειδική περίπτωση συντακτικής ισομέρειας, κατά την οποία το μόριο μιας χημικής ένωσης βρίσκεται σε δύο μορφές (ταυτομερείς μορφές ή ταυτομερή) που μετατρέπονται η μία στην άλλη με μεταφορά ενός ατόμου ή μιας χαρακτηριστικής ομάδας μεταξύ δύο θέσεων και ταυτόχρονη ανταλλαγή της θέσης ενός διπλού και ενός γειτονικού απλού δεσμού. Η συνηθέστερη περίπτωση ταυτομέρειας αφορά την μετακίνηση ενός πρωτονίου, κατά την μετατροπή μίας κετονικής-αλειφατικής ένωσης σε ενόλη (Giannini et al. 2000; Kalia, Sharma, and Kaith 2007). Το **2010** οι Alagona, Ghio και Nagy απέδειξαν με DFT υπολογισμούς χρησιμοποιώντας σαν μέθοδο B3LYP/6-31++G\*\* την καταλυτική επίδραση του νερού στην αντίδραση ενολικής-κετονικής ταυτομέρειας του πυρουβικού και της ακετυλακετόνης, (Alagona, Ghio, and Nagy 2010).

Επιπλέον τα κινητικά και θερμοδυναμικά δεδομένα του Μεταπτυχιακού, *Εικόνες 9.2.8. έως 9.2.12, Πίνακες 9.1.7. και 9.2.7.,* αποδεικνύουν την ύπαρξη ενός αντισταθμιστικού παράγοντα που δεν μπορεί να είναι άλλος από αυτόν του νερού.

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί βασίστηκαν στη θεωρία συναρτησιακής πυκνότητας DFT και πιο συγκεκριμένα έγιναν με την υβριδική τριπαραμετρική συναρτησιακή B3LYP του Becke και σύνολο βάσης 6-31G+d, (Becke 1993). Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος M06-2X (τύπου Μινεσότα), που δημιουργήθηκε από τους Zhao και Truhlar με το ίδιο σύνολο βάσης, (Zhao and Truhlar 2008). Η μέθοδος M06-2X περιλαμβάνει τη χρήση ανταλλαγής Hartree-Fock, την ενέργεια υπολογισμού πυκνότητας δεύτερης τάξης και τη χρήση βαριάς παραμετροποίησης προκειμένου να αυξηθεί η ακρίβεια της DFT για την αξιολόγηση των ασθενών αλληλεπιδράσεων. Είναι εν γένει σε θέση να περιγράψει με μεγαλύτερη ακρίβεια τις αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας.

Η χρήση λοιπόν των κβαντομηχανικών υπολογισμών σε επίπεδο DFT/B3LYP/6-31G+d και M06-2X/6-31G+d επιβεβαίωσαν τα πειραματικά δεδομένα και τη δραματική μείωση που υφίσταται η ελεύθερη ενέργεια Gibbs με την χρήση διακριτών μορίων νερού στη μεταβατική κατάσταση κατά το φαινόμενο ενολικήςκετονικής ταυτομέρειας σε αρωματικά συστήματα. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης μορφής ταυτομέρειας, είναι η χαμηλότερη ενέργεια της ενολικής μορφής έναντι της κετονικής μορφής, γεγονός αναμενόμενο διότι στο ενολικό ισομερές ο δακτύλιος Α είναι αρωματικός.

Πιο συγκεκριμένα, έγιναν θεωρητικοί υπολογισμοί με τοποθέτηση μορίου-ων νερού στην περιοχή μεταξύ των C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 καθώς και στην περιοχή μεταξύ των C7(OH) και του πρωτονίου του C-6. Κατά την θεωρητική προσέγγιση πραγματοποιήθηκε:

- υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, απουσία μορίου-ων νερού από το περιβάλλον της ενολικής-κετονικής μορφής και της μεταβατικής κατάστασης της ταξιφολίνης *Εικόνες 9.3.1.* και *9.3.2.* Η τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs υπολογίστηκε:
  - α. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d, όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 6.85 Kcal/mol,
  - b. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 6.98 Kcal/mol,
  - c. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 58.56 Kcal/mol, Εικόνα 9.3.3.(a), το οποίο θερμοδυναμικά είναι αδύνατο να συμβεί.
  - d. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 59.26 Kcal/mol, το οποίο θερμοδυναμικά είναι αδύνατο να συμβεί, Εικόνα 9.3.3.(d),
  - ε. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 10.11 Kcal/mol,
  - f. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 10.12 Kcal/mol,
  - g. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 63.00 Kcal/mol, το οποίο θερμοδυναμικά είναι αδύνατο να συμβεί.
  - με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 63.76 Kcal/mol, το οποίο θερμοδυναμικά είναι αδύνατο να συμβεί.
- 2. Υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, παρουσία ενός μορίου νερού κοντά στις θέσεις C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 καθώς και στις C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 της ενολικής-κετονικής μορφής, καθώς και της μεταβατικής κατάστασης της ταξιφολίνης *Εικόνες 9.3.1.* και *9.3.2*. Η τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs υπολογίστηκε:
  - α. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 7.74 Kcal/mol,

- b. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 7.99 Kcal/mol,
- c. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 35.44 Kcal/mol, Εικόνα 9.3.3.(b),
- με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 36.03 Kcal/mol, Εικόνα 9.3.3.(e),
- ε. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 12.91 Kcal/mol,
- f. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στην κετονική μορφή της ταξιφολίνης, στα 12.37 Kcal/mol,
- g. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 35.75 Kcal/mol,
- h. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 36.10 Kcal/mol.
- Ακολούθησε ο υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, παρουσία δύο μορίων νερού κοντά στις θέσεις C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 καθώς και στις C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 της μεταβατικής κατάστασης της ταξιφολίνης *Εικόνες 9.3.1.* και *9.3.2*. Η τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs υπολογίστηκε:
  - α. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 25.49 Kcal/mol, Εικόνα 9.3.3.(c),
  - b. με την μέθοδο DFT/B3LYP/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 26.06 Kcal/mol, Εικόνα 9.3.3.(f),
  - c. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 24.26 Kcal/mol,

 d. με την μέθοδο DFT/M06-2X/6-31G+d όταν η προσέγγιση πραγματοποιείται από την περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 στη μεταβατική κατάσταση της ταξιφολίνης, στα 24.80 Kcal/mol.

Η θεωρητική τιμή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του συμπλόκου της ταξιφολίνης στη μεταβατική κατάσταση με τα δύο μόρια νερού της μεθόδου DFT/M06-2X/6-31G+d για το πρωτόνιο του **C-6** είναι κοντά στην πειραματική των **22.9±0.6 Kcal/mol**, ενώ η ελεύθερη ενέργεια Gibbs του συμπλόκου της ταξιφολίνης στη μεταβατική κατάσταση με τα δύο μόρια νερού για το πρωτόνιο του **C-8** ταυτίζεται με την πειραματική των **24.8±0.9 Kcal/mol**. του συμπλόκου ενολκετο-ταξιφολίνης με το μοριακό πλέγμα νερού. Διαπιστώνεται ότι είναι εφικτή παράλληλη ύπαρξη της κετονικής μορφής της ταξιφολίνης στο διάλυμα. Επιπλέον η σταδιακή μείωση της ελεύθερης ενέργειας Gibbs κατά την θεωρητική προσέγγιση ενός και δύο μορίων νερού στην περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 της ταξιφολίνης επιβεβαιώνει τον καταλυτικό ρόλο του νερού κατά το φαινόμενο της ανταλλαγής των αρωματικών πρωτονίων.



**Εικόνα 9.3.1.** Ενεργειακό διάγραμμα, σε (kcal/mol), ταυτομέρειας της (+)-ταξιφολίνης. Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs υπολογίστηκαν (**a**) με τις DFT μεθόδους B3LYP/6-31G+d και (**β**) M06-2X/6-31G+d, απουσία νερού, παρουσία ενός και δύο μορίων νερού στην περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του **C-6** στο μόριο της (+)-ταξιφολίνης.



**Εικόνα 9.3.2.** Ενεργειακό διάγραμμα, σε (kcal/mol), ταυτομέρειας της (+)-ταξιφολίνης. Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs υπολογίστηκαν **(a)** με τις DFT μεθόδους B3LYP/6-31G+d και **(β)** M06-2X/6-31G+d, απουσία νερού, παρουσία ενός και δύο μορίων νερού στην περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του **C-8** στο μόριο της (+)-ταξιφολίνης.



**Εικόνα 9.3.3.** Διαμορφώσεις της μεταβατικής κατάστασης της (+)-ταξιφολίνης, απουσία νερού, παρουσία ενός ή δύο μορίων νερού (a), (b), (c) στην περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-6 ή αντίστοιχα (d), (e), (f) στην περιοχή μεταξύ του πρωτονίου της C7(OH) και του πρωτονίου του C-8 του μορίου.

# Συμπεράσματα

## 10 ο Συμπεράσματα Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.



**Εικόνα 10.1.1.** Μηχανισμός ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων. Αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης σε όξινες ή βασικές συνθήκες και διαλύτη δευτεριωμένο νερό.

Ο έως τώρα επικρατέστερος μηχανισμός ανταλλαγής αρωματικών πρωτονίων είναι μια αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης η οποία πραγματοποιείται είτε με την χρήση καταλυτών είτε υπό ισχυρά όξινες ή βασικές συνθήκες *Εικόνα* 10.1.1. Τούτο οφείλεται στο γεγονός ότι τα π – αρωματικά συστήματα είναι πολύ σταθερά *Εικόνα* 10.1.2. Σαν συνέπεια η απόσπαση υδρογόνου και η δημιουργία του σ-συμπλόκου προϋποθέτει την καταστροφή του αρωματικού συστήματος. Ο μηχανισμός αυτός ακολουθεί μία διαδικασία δύο σταδίων. Σε πρώτο στάδιο το δευτεριωμένο νερό ως διαλύτης, μεταφέρει ένα άτομο δευτερίου σε αρωματικό άνθρακα του δακτυλίου και σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο σσύμπλοκο. Σε επόμενο στάδιο, το υδρογόνο που συνδέεται σε αυτόν τον άνθρακα απομακρύνεται από το ενδιάμεσο, ενώ παράλληλα το αρνητικά φορτισμένο άτομο οξυγόνου του υποκαταστάτη επί του δακτυλίου σταθεροποιεί το ενδιάμεσο, με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού ανταλλαγής.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα, συνάγεται το συμπέρασμα ότι αντιδράσεις υποκατάστασης Η → D πραγματοποιούνται και σε ουδέτερο pH. Συνεπώς, ο μηχανισμός που απεικονίζεται στην **Εικόνα 10.1.3.** και πιο συγκεκριμένα μια ενολική-κετονική ταυτομέρεια (Faizi et al. 2010), θα μπορούσε να λάβει χώρα, θέτοντας υπό αμφισβήτηση τον ήδη υπάρχοντα μηχανισμό, **Εικόνα 10.1.1.** 

Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις ανταλλαγής Η → D παρουσία D<sub>2</sub>O και ως καταλύτη κάποιο οξύ ή βάση διαπιστώθηκε ότι για να πραγματοποιηθεί δευτερίωση αρωματικών πρωτονίων, οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται είναι γενικά χρονοβόρες, όπως π.χ. η κατάλυση δευτερίωσης με κάποιο ανόργανο οξύ ή με NaOD που απαιτεί δύο με τρεις μέρες. Για την επίτευξη δευτερίωσης με D<sub>2</sub>O σε υψηλές θερμοκρασίες, 190°C, απαιτείται ειδικός εξοπλισμός ανθεκτικός σε υψηλές πιέσεις, ενώ η κατάλυση της δευτερίωσης από μέταλλα όπως π.χ. η πλατίνα παρουσιάζει χαμηλή ισοτοπική καθαρότητα.

Συνεπώς σε αντίθεση με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα η ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο σε αρωματικά συστήματα λαμβάνει χώρα σε υδατικό διάλυμα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε ουδέτερο pH λόγω του μοναδικού καταλυτικού ρόλου που έχει το νερό.



**Εικόνα 10.1.2** Σύγκριση των τιμών των ενθαλπιών υδρογόνωσης του κυκλοεξενίου, του 1,3-κυκλοεξαδιενίου και του βενζολίου. Το βενζόλιο είναι κατά 150 kJ/mol (36 kcal/mol) σταθερότερο από την αναμενόμενη τιμή (McMurry 2016).



**Εικόνα 10.1.3.** Προτεινόμενος μηχανισμός δευτερίωσης αρωματικών υποστρωμάτων σε διαλύτη D<sub>2</sub>O με ενολική-κετονική ταυτομέρεια.

Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι:

- 1. Το νερό παίζει κυρίαρχο ρόλο στις βιολογικές διεργασίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαταλύτης,
- 2. η δράση του συγκαταλέγεται στις μεθόδους πράσινης χημείας,
- 3. μπορούν να επιτευχθούν χαμηλότερες θερμοκρασίες αντίδρασης λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του στο διάλυμα και
- 4. ανοίγονται νέοι ορίζοντες μελέτης καταλυτικού ρόλου των μορίων νερού σε βιολογικά συστήματα.

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Αλεξάνδρου** Ν.Ε. 1992. Γενική Οργανική Χημεία: Δομή–Φάσματα –Μηχανισμοί, Τεύχος Β'. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- **Βαλαβανίδης** Α.Π. 2006. Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.
- **Γεροθανάσης** Ι.Π. 2000. Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων. Εκδόσεις Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, 2000. Πάτρα.
- Πριμηκύρη Α., 20 13. Διδακτορική Διατριβή.
- **Σδούκος** και **Πομώνης**. 2010. Χημικές Διεργασίες Της Χημικής Τεχνολογίας. Εκδόσεις Τζιόλα. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Ahmad Ajaz, Rao M a Khan, and Khalid M Alkharfy. 2013. "Effects of Selected Bioactive Natural Products on the Vascular Endothelium." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 62 (2): 111–21. doi:10.1097/FJC.0b013e3182927e47.
- Akao Yukihiro, Tomohiro itoh, Kenji Ohguchi, Munekazu Iinuma, and Yoshinori Nozawa. 2008.
  "Interactive Effects of Polymethoxy Flavones from Citrus on Cell Growth Inhibition in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16 (6): 2803–10. doi:10.1016/j.bmc.2008.01.058.
- Alagona Giuliano, Caterina Ghio, and Peter I Nagy. 2010. "The Catalytic Effect of Water on the Keto-Enol Tautomerism. Pyruvate and Acetylacetone: A Computational Challenge." *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 12 (35): 10173–88. doi:10.1039/c003999c.
- Anastas and Warner. 1998. Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press. Vol. 73. doi:10.1159/000143289.
- **Anastas** Paul T., and Julie B. Zimmerman. 2007. "Design through the 12 Principles of Green Engineering." *IEEE Engineering Management Review*. doi:10.1109/EMR.2007.4296421.
- **Arutyunyan**, Korystova, Kublik, Levitman, Shaposhnikova, and Korystov, 2016. "Taxifolin and Fucoidin Abolish the Irradiation-Induced Increase in the Production of Reactive Oxygen Species in Rat Aorta" 160 (5): 635–38. doi:10.1007/s10517-016-3236-2.
- Atta-ur-Rahman. 1986. Nuclear Magnetic Resonance. New York: Springer-Verlag.
- **Atzrodt,** Jens, Volker Derdau, Thorsten Fey, and Jochen Zimmermann. 2007. "The Renaissance of H/D Exchange." *Angewandte Chemie International Edition* 46 (41): 7744–65. doi:10.1002/anie.200700039.
- Bai Shi, Bruce J. Palmer, and Clement R. Yonker. 2000. "Kinetics of Deuterium Exchange on Resorcinol in D2O at High Pressure and High Temperature." *The Journal of Physical Chemistry A* 104 (1): 53–58. doi:10.1021/jp991192r.
- **Becke** Axel D. 1993. "Density-Functional thermochemistry.III. The Role of Exact Exchange." *The Journal of Chemical Physics* 98 (7): 5648. doi:10.1063/1.464913.
- **Benavente-Garcla** O., and J. Castillo. 2008. "Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-Inflammatory Activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (15): 6185–6205. doi:10.1021/jf8006568.
- **Blumberg** Jeffrey. 2003. "Introduction to the Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet." *The Journal of Nutrition*

133 (10): 3244S-3246S. doi:10.3945/ajcn.113.060186.Am.

- Borea Pier Andrea, Katia Varani, Stefania Gessi, Paola Gilli, and Alessandro Dalpiaz. 1998. "Receptor Binding Thermodynamics as a Tool for Linking Drug Efficacy and Affinity." *Farmaco* 53 (4): 249– 54. doi:10.1016/S0014-827X(98)00017-2.
- **Bovey** F A. 1987. "Carbon-13 NMR Spectroscopy, High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry, 3rd Revised Edition, by Eberhard Breitmaier and Wolfgang Voelter, VCH, New York, 1987, 515 Pp. Price \$135.00." *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters* 25 (10). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 425–26. doi:10.1002/pol.1987.140251008.
- **Breitmaier** Eberhard. 2003. "Short Introduction to Basic Principles and Methods." In *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry*, 1–10. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/0470853069.ch1.
- Breslow Ronald. 1991. "Hydrophobic Effects on Simple Organic Reactions in Water." Accounts of Chemical Research 24 (6): 159–64. doi:10.1021/ar00006a001.
- **Breton** Rosemary C., and William F. Reynolds. 2013. "Using NMR to Identify and Characterize Natural Products." *Natural Product Reports* 30 (4): 501. doi:10.1039/c2np20104f.
- **Brusselmans** Koen, Ruth Vrolix, Guido Verhoeven, and Johannes V. Swinnen. 2005. "Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase Activity." *Journal of Biological Chemistry* 280 (7): 5636–45. doi:10.1074/jbc.M408177200.
- **Carlomagno** Teresa. 2012. "NMR in Natural Products: Understanding Conformation, Configuration and Receptor Interactions." *Natural Product Reports* 29 (5): 536. doi:10.1039/c2np00098a.
- Chanda Arani, and Valery V Fokin. 2009. "Organic Synthesis ' On Water ' Organic Synthesis ' On Water .'" Chemical Reviews 109 (February): 725–48. doi:10.1021/cr800448q.

Chang Raymond. 2005. Physical Chemistry for the Biosciences. CA: University Science. Sausalito.

- **Charisiadis** Pantelis, Vassiliki G. Kontogianni, Constantinos G. Tsiafoulis, Andreas G. Tzakos, and Ioannis P. Gerothanassis, 2017. "Determination of Polyphenolic Phytochemicals Using Highly Deshielded OH <sup>1</sup>H-NMR Signals." *Phytochemical Analysis* 28 (3): 159–70. doi:10.1002/pca.2656.
- **Chen**, Li-Jen, Shi-Yow Lin, and Chiung-Chang Huang. 1998. "Effect of Hydrophobic Chain Length of Surfactants on Enthalpy–Entropy Compensation of Micellization." *The Journal of Physical Chemistry B* 102 (22): 4350–56. doi:10.1021/jp9804345.
- **Chen** Xiao-Qiang, Xian-Bo Wang, Rong-Fa Guan, Jue Tu, Zhao-Hui Gong, Na Zheng, Jie-Hong Yang, Yu-Yan Zhang, and Miao-Miao Ying. 2013. "Blood Anticoagulation and Antiplatelet Activity of Green Tea (-)-Epigallocatechin (EGC) in Mice." *Food & Function* 4 (10): 1521–25. doi:10.1039/c3fo60088b.
- **Chun** Ock Kyoung, Dae Ok Kim, and Chang Yong Lee. 2003. "Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (27): 8067–72. doi:10.1021/jf034740d.
- **Cody** Vivian, and Joseph R. Luft. 1994. "Conformational Analysis of Flavonoids: Crystal and Molecular Structures of Morin Hydrate and Myricetin (1:2) Triphenylphosphine Oxide Complex." *Journal of Molecular Structure* 317 (1–2): 89–97. doi:10.1016/0022-2860(93)07867-V.
- **Crabtree** Robert H. 2004. "Organometallic Alkane CH Activation." *Journal of Organometallic Chemistry*. doi:10.1016/j.jorganchem.2004.07.034.

- **Dai** Jin and Russell J Mumper. 2010. "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties," 7313–52. doi:10.3390/molecules15107313.
- **Delgado** Maria Eugenia, Ana Isabel Haza, Núria Arranz, Almudena García, and Paloma Morales. 2008. "Dietary Polyphenols Protect against N-Nitrosamines and Benzo(a)pyrene- Induced DNA Damage (Strand Breaks and Oxidized Purines/pyrimidines) in HepG2 Human Hepatoma Cells." *European Journal of Nutrition* 47 (8): 479–90. doi:10.1007/s00394-008-0751-6.
- **Edirisinghe** Indika, Katarzyna Banaszewski, Jack Cappozzo, Danielle Mccarthy, and Britt M Burtonfreeman. 2011. "Effect of Black Currant Anthocyanins on the Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Vitro in Human Endothelial Cells," 8616–24.
- **Erba** Daniela, M. Cristina Casiraghi, Cristina Martinez-Conesa, Giancarlo Goi, and Luca Massaccesi. 2012. "Isoflavone Supplementation Reduces DNA Oxidative Damage and Increases O-β-N-Acetyl-D-Glucosaminidase Activity in Healthy Women." *Nutrition Research* 32 (4). Elsevier Inc.: 233–40. doi:10.1016/j.nutres.2012.03.007.
- **Espley** Richard V, Christine a Butts, William a Laing, Sheridan Martell, Hannah Smith, Tony K McGhie, Jingli Zhang, et al. 2014. "Dietary Flavonoids from Modified Apple Reduce Inflammation Markers and Modulate Gut Microbiota in Mice." *The Journal of Nutrition* 144 (2): 146–54. doi:10.3945/jn.113.182659.

Exner Otto. 1973. "The Enthalpy-Entropy Relationship" 10 (14).

Exner Otto. 1972. "(Z A)," 37 (1970).

- Exner Otto. 1970. "Determination of the Isokinetic Temperature." Nature 227 (5256): 366–67. doi:10.1038/227366a0.
- **Exner** Otto, and V Belunek. 1973. "THE GENERAL CASE The Proportionality Constant f3 Is Called the Isokinetic Temperature, While the , Inter-" 38 (1972): 781–98.
- Exner, Otto. 2000. "Entropy–enthalpy Compensation and Anticompensation: Solvation and Ligand Binding." *Chemical Communications*, no. 17: 1655–56. doi:10.1039/b002758h.
- Faizi Shaheen, Humaira Siddiqi, Aneela Naz, Samina Bano, and Lubna. 2010. "Specific Deuteration in Patuletin and Related Flavonoids via Keto - Enol Tautomerism: Solvent- and Temperature-Dependent 1H-NMR Studies." *Helvetica Chimica Acta* 93 (3): 466–81. doi:10.1002/hlca.200900249.
- **Freeman** Ray. 2003. Magnetic Resonance in Chemistry and Medicine. New York: Oxford University Press.
- **García** Rosa, José M Seco, Saulo a Vázquez, Emilio Quiñoá, and Ricardo Riguera. 2002. "Absolute Configuration of Secondary Alcohols by 1H NMR: In Situ Complexation of Alpha-Methoxyphenylacetic Acid Esters with barium(II)." *The Journal of Organic Chemistry* 67 (13): 4579–89.
- Giannini F., C. Devia, A. Rodríguez, R. Enriz, F. Suvire, H. Baldoni, R. Furlan, and S. Zac-Chino. 2000. "The Importance of Keto-Enol Forms of Arylpropanoids Acting as Antifungal Compounds." *Molecules* 5 (3): 580–82.
- Gómez-Gallego Mar, and Miguel A. Sierra. 2011. "Kinetic Isotope Effects in the Study of Organometallic Reaction Mechanisms." Chem. Rev. 111 (8): 4857–4963. doi:10.1021/cr100436k.
- **Gonzales** Gerard Bryan, Guy Smagghe, Charlotte Grootaert, Moises Zotti, Katleen Raes, and John Van Camp. 2015. "Flavonoid Interactions during Digestion, Absorption, Distribution and

Metabolism: A Sequential Structure-Activity/property Relationship-Based Approach in the Study of Bioavailability and Bioactivity." *Drug Metabolism Reviews* 0 (0). Informa Healthcare USA, Inc: 1–16. doi:10.3109/03602532.2014.1003649.

- **Gupta** M. B., Bhalla T. N., Gupta G. P., Mitra C. R., and Bhargava K. P. 1971. "Anti-Inflammatory Activity of Taxifolin." *Japanese Journal of Pharmacology* 21 (3): 377–82. doi:10.1128/AAC.03728-14.
- Hait S. K., and S P Moulik. 2001. "Physicochemical Studies on Microemulsions . 7 . Dynamics of Percolation and Energetics of Clustering in Water / AOT / Isooctane and Water / AOT / Decane W / O Microemulsions in Presence of Hydrotopes (Sodium Salicylate , R -Naphthol , -Naphthol , Resorci," 7145–54.
- Hanhineva Kati, Riitta Törrönen, Isabel Bondia-Pons, Jenna Pekkinen, Marjukka Kolehmainen, Hannu Mykkänen, and Kaisa Poutanen. 2010. "Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism." International Journal of Molecular Sciences 11 (4): 1365–1402. doi:10.3390/ijms11041365.
- Heijnen, Haenen, Van Acker, Van Der Vijgh and A. Bast. 2001. "Flavonoids as Peroxynitrite Scavengers: The Role of the Hydroxyl Groups." *Toxicology in Vitro* 15 (1): 3–6. doi:10.1016/S0887-2333(00)00053-9.
- Heim Kelly E., Anthony R. Tagliaferro, and Dennis J. Bobilya. 2002. "Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships." *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10): 572–84. doi:10.1016/S0955-2863(02)00208-5.
- Hidalgo Maria, Sonsoles Martin-santamaria Isidra, and Gerald Rimbach Sonia De Pascual-teresa. 2012. "And Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Anthocyanins and Their Gut Metabolites," 295–306. doi:10.1007/s12263-011-0263-5.

Asimov 2008. "Το Χρονικό Των Επιστημονικών Ανακαλύψεων." Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

- Isley Nicholas A., Roscoe T H Linstadt, Sean M. Kelly, Fabrice Gallou, and Bruce H. Lipshutz. 2015. "Nucleophilic Aromatic Substitution Reactions in Water Enabled by Micellar Catalysis." Organic Letters 17 (19): 4734–37. doi:10.1021/acs.orglett.5b02240.
- Hudson, 1992. The History of Chemistry. MacMillan.
- Johnson Margaret A., Kristaps Jaudzems, and Kurt Wüthrich. 2010. "NMR Structure of the SARS-CoV Nonstructural Protein 7 in Solution at pH6.5." *Journal of Molecular Biology* 402 (4). Elsevier Ltd: 619–28. doi:10.1016/j.jmb.2010.07.043.
- Jordheim Monica, Torgils Fossen, Jon Songstad, and Øyvind M. Andersen. 2007. "Reactivity of Anthocyanins and Pyranoanthocyanins. Studies on Aromatic Hydrogen-Deuterium Exchange Reactions in Methanol." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (20): 8261–68. doi:10.1021/jf071132f.
- Jung Yousung, and R. A. Marcus. 2007. "On the Theory of Organic Catalysis 'on Water." Journal of the American Chemical Society 129 (17): 5492–5502. doi:10.1021/ja068120f.
- Kalia Susheel, Anju Sharma, and B. S. Kaith. 2007. "Ab Initio Study of Gas Phase and Water-Assisted Tautomerization of Maleimide and Formamide." *Journal of Chemical Sciences* 119 (6): 617–24. doi:10.1007/s12039-007-0077-6.
- Kawaii S, Y Tomono, E Katase, K Ogawa, and M Yano. 1999. "Antiproliferative Activity of Flavonoids on Several Cancer Cell Lines." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. doi:10.1271/bbb.63.896.
- Kim Min-Cheol, Su-Jin Kim, Dae-Seung Kim, Yong-Deok Jeon, Sung Joo Park, Ho Sub Lee, Jae-Young Um, and Seung-Heon Hong. 2011. "Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Mediators by Suppressing NF-κB in Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages." Immunopharmacology and Immunotoxicology 33 (3): 525–32. doi:10.3109/08923973.2010.547500.
- **Lambert** Joseph B and Eugene P Mazzola. 2004. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Princliples, Applications, and Experimental Methods. Upper Saddle River: Pearson Education.

Lee C., and T Lee. 1995. "Accounts Chemical." Society 28 (8): 950182. doi:10.1021/ar00058a001.

- Lee Eunjung, Ki-woong Jeong, Areum Shin, Bonghwan Jin, Hum Nath Jnawali, Bong-hyun Jun, and Jee-young Lee. 2013. "Binding Model for Eriodictyol to Jun-N Terminal Kinase and Its Anti-Inflammatory Signaling Pathway" 46 (12): 594–99.
- Lee Ming-yue, Brian D Ames, and Shiou-chuan Tsai. 2012. "Insight into the Molecular Basis of Aromatic Polyketide Cyclization: Crystal Structure and in Vitro Characterization of WhiE-ORFVI."
- Lee Sang Gil, Bohkyung Kim, Yue Yang, Tho X. Pham, Young Ki Park, Jose Manatou, Sung I. Koo, Ock K. Chun, and Ji Young Lee. 2014. "Berry Anthocyanins Suppress the Expression and Secretion of Proinflammatory Mediators in Macrophages by Inhibiting Nuclear Translocation of NF-κB Independent of NRF2-Mediated Mechanism." *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (4). Elsevier Inc.: 404–11. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.12.001.
- Lindström Ulf M, and Ulf M Lindstro. 2002. "Stereoselective Organic Reactions in Water." *Chemical Reviews* 102: 2751–72. doi:10.1021/cr010122p.
- Linert Wolfgang, and Arthur Yelon. 2013. "Isokinetic Relationships: Preface." Monatshefte Fur Chemie 144 (1): 1–2. doi:10.1007/s00706-012-0863-9.
- Liu Lei, and Qing-xiang Guo. 2001. "Isokinetic Relationship, Isoequilibrium Relationship, and Enthalpy – Entropy Compensation." *Chemical Society Reviews*, 673–95.
- Lotito Silvina B., and Balz Frei. 2006. "Consumption of Flavonoid-Rich Foods and Increased Plasma Antioxidant Capacity in Humans: Cause, Consequence, or Epiphenomenon?" *Free Radical Biology and Medicine* 41 (12): 1727–46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.
- Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A, Frei B. 2012. "Metabolic Conversion of Dietary Flavonoids Alterstheir Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties." *Free Radical Biology & Medicin* 51 (2): 454–63. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.032.METABOLIC.
- Ma Sandy, Giorgio Villa, Peter S. Thuy-Boun, Anna Homs, and Jin Quan Yu. 2014. "Palladium-Catalyzed Ortho-Selective C-H Deuteration of Arenes: Evidence for Superior Reactivity of Weakly Coordinated Palladacycles." *Angewandte Chemie - International Edition* 53 (3): 734–37. doi:10.1002/anie.201305388.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., 2004. "Bioavailability, Polyphenols: Food Sources and." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727–47. doi:10.1038/nature05488.
- Mari Di, J. Supple, and H. Rapoport, 1966. "Mass Spectra of Naphthoquinones. Vitamin K1(20)." Journal of the American Chemical Society 88 (6): 1226–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5910960.
- Marx Dominik, M E Tuckerman, J. Hutter, and Michele Parrinello. 1998. "The Nature of the Hydrated Excess Proton in Water." *Nature* 397 (6720): 601–4. doi:10.1038/17579.

- Mauray A., C. Felgines, C. Morand, A. Mazur, A. Scalbert, and D. Milenkovic. 2012. "Bilberry Anthocyanin-Rich Extract Alters Expression of Genes Related to Atherosclerosis Development in Aorta of Apo E-Deficient Mice." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 22 (1). Elsevier Ltd: 72–80. doi:10.1016/j.numecd.2010.04.011.
- Mayer Moriz, and Bernd Meyer. 2001. "Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor," no. 5: 6108–17.

McMurry John. 2016. "Organic Chemistry," 1518. doi:10.1016/B0-08-043751-6/08302-X.

- **Meyer** Bernd, and Thomas Peters. 2003. "NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors." *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (8): 864–90.
- Mirich Anne, Trisha Hoette Miller, Elsbeth Klotz, and Bruce Mattson. 2015. "Heterogeneous Catalysis: Deuterium Exchange Reactions of Hydrogen and Methane." *Journal of Chemical Education* 92 (12): 2087–93. doi:10.1021/acs.jchemed.5b00360.
- **Mohseni-shahri,** Fatemeh Sadat, Mohammad Reza Housaindokht, Mohammad Reza Bozorgmehr, and Ali Akbar Moosavi-movahedi. 2016. "Influence of Taxifolin on the Human Serum Albumin – Propranolol Interaction : Multiple Spectroscopic and Chemometrics Investigations and Molecular." *Journal of Solution Chemistry* 45 (2). Springer US: 265–85. doi:10.1007/s10953-016-0435-4.
- **Monagas** Maria, Mireia Urpi-sarda, and S Fernando. 2010. "Insights into the Metabolism and Microbial Biotransformation of Dietary Flavan-3-Ols and the Bioactivity of Their Metabolites," 233–53. doi:10.1039/c0fo00132e.
- **Moon** Young Jin, Xiaodong Wang, and Marilyn E. Morris. 2006. "Dietary Flavonoids: Effects on Xenobiotic and Carcinogen Metabolism." *Toxicology in Vitro* 20 (2): 187–210. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.048.
- **Mukherjee** Kallol, Dulal C. Mukherjee, and Satya P. Moulik. 1994. "Thermodynamics of Micellization of Aerosol OT in Binary Mixtures of Water, Formamide, Ethylene Glycol, and Dioxane." *The Journal of Physical Chemistry* 98 (17): 4713–18. doi:10.1021/j100068a037.
- **Murrell J**ohn N. Kettle Sydney F. Tedder John M. 2006. Ο ΧΗΜΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ Μια Εισαγωγή Στην Κβαντική Χημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2nd ed. Ηράκλειο Κρήτης.
- Narayan Sridhar, John Muldoon, M. G. Finn, Valery V. Fokin, Hartmuth C. Kolb, and K. Barry Sharpless. 2005. "On Water': Unique Reactivity of Organic Compounds in Aqueous Suspension." Angewandte Chemie - International Edition 44 (21): 3275–79. doi:10.1002/anie.200462883.
- Németh Kitti, Geoff W. Plumb, Jean Guy Berrin, Nathalie Juge, Ralf Jacob, Hassan Y. Naim, Gary Williamson, Dallas M. Swallow, and Paul A. Kroon. 2003. "Deglycosylation by Small Intestinal Epithelial Cell β-Glucosidases Is a Critical Step in the Absorption and Metabolism of Dietary Flavonoid Glycosides in Humans." *European Journal of Nutrition* 42 (1): 29–42. doi:10.1007/s00394-003-0397-3.
- Nobrega Franklin L, and Eurico J Cabrita. 2011. "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding," no. July 2016: 990–94. doi:10.1021/ed101169t.
- **Oi** Naomi, Hanyong Chen, Myoung Ok Kim, Ronald A. Lubet, Ann M. Bode, and Zigang Dong. 2012. "Taxifolin Suppresses UV-Induced Skin Carcinogenesis by Targeting EGFR and PI3K." *Cancer*

*Prevention Research* 5 (9): 1103–14. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0397.

- **Otto** Sijbren, and Jan B F N Engberts. 2003. "Hydrophobic Interactions and Chemical Reactivity." *Society* 44 (0): 2809–20.
- Ankins J. de Paula, 2006. *Physical Chemistry for the Life Sciences*. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- **Pardede** Antoni, and Mamoru Koketsu. 2017. "Antioxidant and Antileukemic Activity of Chemical Components from Bark of Mangifera Casturi," no. 2. Comparative Clinical Pathology: 499–504. doi:10.1007/s00580-016-2387-x.
- Parella T, and J Belloc. 2001. "Spin-State-Selective Excitation in Selective 1D Inverse NMR Experiments." *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.: 1997)* 148 (1): 78–87. doi:10.1006/jmre.2000.2205.
- **Patel** Deendayal, Sanjeev Shukla, and Sanjay Gupta. 2007. "Apigenin and Cancer Chemoprevention: Progress, Potential and Promise (Review)." *International Journal of Oncology* 30 (1): 233–45. doi:10.3892/ijo.30.1.233.
- Pechukas Philip. 1981. "Transition State Theory," 159–77.
- **Pedersen** Atle T., ??yvind M. Andersen, Dagfinn W. Aksnes, and Willy Nerdal. 1993. "NMR of Anthocyanins: Assignments and Effects of Exchanging Aromatic Protons." *Magnetic Resonance in Chemistry* 31 (11): 972–76. doi:10.1002/mrc.1260311104.
- **Petros** Robby a, and Jyoti Shah. 2014. "Evaluation of the Efficiency of Pd/H2 -Catalyzed Benzylic H/D Exchange of Dehydroabietinal with D(2) O and Synthesis of a Tritium-Labeled Analogue." *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 57 (1): 53–56. doi:10.1002/jlcr.3117.
- Pohjoispä Monika, Eija Leppälä, and Kristiina Wähälä. 2007. "Synthesis of Stable Deuterium Labelled Lignan Derivatives and Studies of H/D Exchange at the Aromatic Sites." *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 50 (5–6): 521–22. doi:10.1002/jlcr.1238.
- **Pons,** J, N Evrard-Todeschi, G Bertho, J Gharbi-Benarous, V Tanchou, R Benarous, and J P Girault. 2008. "Transfer-NMR and Docking Studies Identify the Binding of the Peptide Derived from Activating Transcription Factor 4 to Protein Ubiquitin Ligase Beta-TrCP. Competition STD-NMR with Beta-Catenin." *Biochemistry* 47 (1): 14–29. doi:10.1021/bi7014212.
- **Pony Yu**, Renyuan, David Hesk, Nelo Rivera, István Pelczer, and Paul J Chirik. 2016. "Iron-Catalysed Tritiation of Pharmaceuticals A Thorough Understanding of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of a Drug in Animal Models Is a Critical Component of Drug Discovery and Development." *Nature* 529 (5). doi:10.1038/nature16464.
- **Porto** Silvia, José Manuel Seco, Juan Félix Espinosa, Emilio Quiñoá, and Ricardo Riguera. 2008. "Resin-Bound Chiral Derivatizing Agents for Assignment of Configuration by NMR Spectroscopy." *Journal of Organic Chemistry* 73 (15): 5714–22. doi:10.1021/jo800469c.
- **Raj** Utkarsh, and Pritish Kumar. 2015. "Flavonoids as Multi-Target Inhibitors for Proteins Associated with Ebola Virus : In Silico Discovery Using Virtual Screening and Molecular Docking Studies." *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. International Association of Scientists in the Interdisciplinary Areas. doi:10.1007/s12539-015-0109-8.
- Rasku Sirpa, and Kristiina W??h??l?? 2000. "Synthesis of Deuterium Labeled Polyhydroxy Flavones and 3-Flavonols." *Tetrahedron* 56 (6): 913–16. doi:10.1016/S0040-4020(99)01085-6.
- Rasku Sirpa, Kristiina Wähälä, Jorma Koskimies, and Tapio Hase. 1999. "Synthesis of Isoflavonoid Deuterium Labeled Polyphenolic Phytoestrogens." *Tetrahedron* 55 (11): 3445–54.

doi:10.1016/S0040-4020(98)01153-3.

- Ravishankar Divyashree, Kimberly A. Watson, Samuel Y. Boateng, Rebecca J. Green, Francesca Greco, and Helen M I Osborn. 2015. "Exploring Quercetin and Luteolin Derivatives as Antiangiogenic Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry* 97. Elsevier Masson SAS: 259–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.056.
- **Ribas** Xavi, Carlos Calle, Albert Poater, Alicia Casitas, Laura Gómez, Raül Xifra, Teodor Parella, et al. 2010. "Facile C-H Bond Cleavage via a Proton-Coupled Electron Transfer Involving a C-H...Cu(II) Interaction." *Journal of the American Chemical Society* 132 (35): 12299–306. doi:10.1021/ja101599e.
- Ross Julian R.H. 2012. "Heterogeneous Catalysis Chemistry in Two Dimensions." *Heterogeneous Catalysis*, 1–15. doi:10.1016/B978-0-444-53363-0.10001-5.
- Rothwell Joseph A., Mireia Urpi-Sarda, Maria Boto-Ordoñez, Rafael Llorach, Andreu Farran-Codina, Dinesh Kumar Barupal, Vanessa Neveu, Claudine Manach, Cristina Andres-Lacueva, and Augustin Scalbert. 2016. "Systematic Analysis of the Polyphenol Metabolome Using the Phenol-Explorer Database." *Molecular Nutrition and Food Research* 60 (1): 203–11. doi:10.1002/mnfr.201500435.
- **Sakamoto** Tsubasa, Keiji Mori, and Takahiko Akiyama. 2012. "Chiral Phosphoric Acid Catalyzed Enantioselective Transfer Deuteration of Ketimines by Use of Benzothiazoline as a Deuterium Donor: Synthesis of Optically Active Deuterated Amines." *Organic Letters* 14 (13): 3312–15. doi:10.1021/ol3012869.
- Santos Balbino L., Mona N. Oliveira, Paulo L C Coelho, Bruno P S Pitanga, Alessandra B. Da Silva, Taís Adelita, Victor Diógenes A Silva, et al. 2015. "Flavonoids Suppress Human Glioblastoma Cell Growth by Inhibiting Cell Metabolism, Migration, and by Regulating Extracellular Matrix Proteins and Metalloproteinases Expression." Chemico-Biological Interactions 242: 123–38. doi:10.1016/j.cbi.2015.07.014.
- **Scheigetz** John, Carl Berthelette, Chun Li, and Robert J. Zamboni. 2004. "Base-Catalyzed Deuterium and Tritium Labeling of Aryl Methyl Sulfones." *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 47 (12): 881–89. doi:10.1002/jlcr.880.
- Schwarz Dieter, Pyotr Kisselev, and Ivar Roots. 2005. "CYP1A1 Genotype-Selective Inhibition of Benzo[a]pyrene Activation by Quercetin." *European Journal of Cancer* 41 (1): 151–58. doi:10.1016/j.ejca.2004.08.011.
- Selivanova, I A, N A Tyukavkinafl Yu A Kolesnik, V N Nesterov, L N Kuleshova, I V A Khutoryanskii, B N Bazhenov, and M Yu Saibotalov. 1999. "Of Dihydroquercetin" 33 (4): 222–24.
- Sharma Ankit, and John F Hartwig. 2015. "Metal-Catalysed Azidation of Tertiary C-H Bonds Suitable for Late-Stage Functionalization." *Nature* 517 (7536). Nature Publishing Group: 600–604. doi:10.1038/nature14127.
- Sharma K. Shivaji, and A. K. Rakshit. 2004. "Thermodynamics of Micellization and Interfacial Adsorption of Polyoxyethylene (10) Lauryl Ether (C12E10) in Water." Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry 43 (2): 265–69.
- Sharp Kim. 2001. "Entropy Enthalpy Compensation : Fact or Artifact ?" *Protein Science* 10: 661–67. doi:10.1110/ps.37801.Cp.
- **Shashank** K, and KP Abhay. 2013. "Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview." *The Scientif World J* 4 (2): 32–48.

Shi Xiaolei, Xuwen Li, Yantao Sun, Wei Wei, Ruijie Yang, Hanqi Zhang, and Yongri Jin. 2010. "In Vitro

Study of the Binding of Taxifolin to Bovine Serum Albumin and the Influence of Common Ions on the Binding," 482–94. doi:10.1007/s10953-010-9516-y.

Simmons Eric M., and John F. Hartwig. 2012. "On the Interpretation of Deuterium Kinetic Isotope Effects in C-H Bond Functionalizations by Transition-Metal Complexes." Angewandte Chemie -International Edition. doi:10.1002/anie.201107334.

Schonland, 1968. "The Atomists (1805-1933)." Clarendon Press, Oxford.

- Siskin Michael, and Alan R. Katritzky. 2001. "Reactivity of Organic Compounds in Superheated Water: General Background." *Chemical Reviews*. doi:10.1021/cr000088z.
- **Suh** Yewseok, Farrukh Afaq, Jeremy J. Johnson, and Hasan Mukhtar. 2009. "A Plant Flavonoid Fisetin Induces Apoptosis in Colon Cancer Cells by Inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-κB-Signaling Pathways." *Carcinogenesis* 30 (2): 300–307. doi:10.1093/carcin/bgn269.
- Sureshan Kana M., Tomomi Miyasou, Satoshi Miyamori, and Yutaka Watanabe. 2004. "O-Acetylmandelic Acid as a Reliable Chiral Anisotropy Reagent for the Determination of Absolute Configuration of Alcohols." *Tetrahedron Asymmetry* 15 (21): 3357–64. doi:10.1016/j.tetasy.2004.09.018.
- Tech Virginia. 2014. "NIH Public Access" 9 (1): 25–53. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.06.003.Recent.
- Theriault, Q Wang, S C Van Iderstine, B Chen, a a Franke, and K Adeli. 2000. "Modulation of Hepatic Lipoprotein Synthesis and Secretion by Taxifolin, a Plant Flavonoid." *Journal of Lipid Research* 41 (12): 1969–79.
- **Trouillas** Patrick, and Catherine Fagn. 2004. "Food Chemistry A Theoretical Study of the Conformational Behavior and Electronic Structure of Taxifolin Correlated with the Free Radical-Scavenging Activity" 88: 571–82. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.009.
- **Tzakos** Andreas G., Patrick Fuchs, Nico A J Van Nuland, Anastasios Troganis, Theodore Tselios, Spyros Deraos, John Matsoukas, Ioannis P. Gerothanassis and Alexandre M J. J. Bonvin, 2004. "NMR and Molecular Dynamics Studies of an Autoimmune Myelin Basic Protein Peptide and Its Antagonist: Structural Implications for the MHC II (I-A U)-Peptide Complex from Docking Calculations." *European Journal of Biochemistry* 271 (16): 3399–3413. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04274.x.
- Vaidyanathan Srirajan and Bruce W. Surber. 2005. "Microwave Mediated Hydrogen Deuterium Exchange: A Rapid Synthesis of 2H-Substituted Benzimidazole." *Tetrahedron Letters* 46 (31): 5195–97. doi:10.1016/j.tetlet.2005.05.110.
- **Verma** Sharad, Amit Singh, and Abha Mishra. 2012. "Taxifolin Acts as Type I Inhibitor for VEGFR-2 Kinase: Stability Evaluation by Molecular Dynamic Simulation." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2 (1): 41–46.
- Wang Dian, Yusuke Izawa, and Shannon S Stahl. 2014. "Pd-Catalyzed Aerobic Oxidative Coupling of Arenes : Evidence for Transmetalation between Two Pd (II) -Aryl Intermediates Pd-Catalyzed Aerobic Oxidative Coupling of Arenes : Evidence for Transmetalation between Two Pd (II) -Aryl Intermediates," no. li. doi:10.1021/ja505405u.
- Williams Robert J., Jeremy P E Spencer, and Catherine Rice-Evans. 2004. "Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?" *Free Radical Biology and Medicine* 36 (7): 838–49. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001.
- Williamson Gary, 2003. "Common Features in the Pathways of Absorption and Metabolism of Flavonoids." In *Phytochemicals*. CRC Press. doi:doi:10.1201/9780203506332.ch2.

- Winkel-Shirley Brenda. 2002. "Biosynthesis of Flavonoids and Effects of Stress." *Current Opinion in Plant Biology* 5 (3): 218–23. doi:10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
- Wisniak Jaime. 2010. "The History of Catalysis. From the Beginning to Nobel Prizes." *Educ. Quim.* 21 (1): 60–69.
- **Wolf** Christian. 2007. Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds. Dynamic Stereochemistry of Chiral Compounds. doi:10.1039/9781847558091.
- Wright Bernice, Leonardo A. Moraes, Charles F. Kemp, William Mullen, Alan Crozier, Julie A. Lovegrove, and Jonathan M. Gibbins. 2010. "A Structural Basis for the Inhibition of Collagen-Stimulated Platelet Function by Quercetin and Structurally Related Flavonoids." *British Journal of Pharmacology* 159 (6): 1312–25. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00632.x.
- Xiao Jianbo, Guoyin Kai, Koichiro Yamamoto, and Xiaoqing Chen. 2013. "Advance in Dietary Polyphenols as α-Glucosidases Inhibitors: A Review on Structure-Activity Relationship Aspect." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 53 (8): 818–36. doi:10.1080/10408398.2011.561379.
- Yao Jiong, and Ronald F Evilia. 1994. "Deuteration of Extremely Weak Organic Acids by Enhanced Acid-Base Reactivity in Supercritical Deuteroxide Solution." *Journal of the American Chemical Society* 116 (25): 11229–33. doi:10.1021/ja00104a003.
- Yousuf Sameena, Israel V Muthu, and Vijayan Enoch. 2013. "Binding Interactions of Naringenin and Naringin with Calf Thymus DNA and the Role of β -Cyclodextrin in the Binding" 14 (2): 770–81. doi:10.1208/s12249-013-9963-z.
- Zhang Yuping, Shuyun Shi, Xiaoqin Chen, Wei Zhang, Kelong Huang, and Mijun Peng. 2011. "Investigation on the Interaction between Ilaprazole and Bovine Serum Albumin without or with Different C-Ring Flavonoids from the Viewpoint of Food À Drug Interference," 8499–8506.
- Zhang Zhong Rong, Mazen Al Zaharna, Matthew Man-kin Wong, Sung-kay Chiu, and Hon-yeung Cheung. 2013. "Taxifolin Enhances Andrographolide-Induced Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells via Spindle Assembly Checkpoint Activation" 8 (1). doi:10.1371/journal.pone.0054577.
- **Zhao** Yan, and Donald G. Truhlar. 2008. "Exploring the Limit of Accuracy of the Global Hybrid Meta Density Functional for Main-Group Thermochemistry, Kinetics, and Noncovalent Interactions." *Journal of Chemical Theory and Computation* 4 (11): 1849–68. doi:10.1021/ct800246v.