ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
Τμήμα Χημείας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Βιοανόργανης Χημείας

ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης

Μπαρμπαρόσου Κλημεντίνη
Χημικός Μηχανικός

Δήμητρα Κόβαλ Λαιμπρόζη

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000

Αφιερώνεται με αγάπη στη Μητέρα μου
και στους Καθηγητές μου Ι. Αναστασοπούλου,
Θ. Θεοφανίδη και Ι. Γεροθανάση

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών (ΕΠΕΑΕΚ) της Βιοανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο βαθιές μου ευχαριστίες στους καθηγητές μου Ι. Αναστασοπούλου, Αναπλ. Καθηγήτρια του Ε.Μ.Π. και Θ. Θεοφανίδη, Καθηγητή του Ε.Μ.Π., για την ανάθεση του θέματος και την συμπαράστασή τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω με όλη μου την καρδιά τον καθηγητή μου στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ι. Γεροθανάση και τον Δρ. Α. Τρογκάνη για τη βοήθειά τους στη λήψη και ερμηνεία των NMR φασμάτων.

Ευχαριστώ ακόμη τον Dr. Abil Aliev στο University College London για την λήψη των φασμάτων NMR στερεάς κατάστασης των συμπλόκων ενώσεων.

Κλείνοντας θα ήθελα ολόψυχα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου, η οποία στέκεται δίπλα μου ενισχύοντας με την αγάπη της το έργο μου.

Μπαρμπαρόσου Κλημεντίνη

Ιωάννινα, 2000

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 4

1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA 4
2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΝΑΤΡΙΟΥ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 6
3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 7
4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΒΑΡΙΟΥ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 9
5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΚΑΔΜΙΟΥ ΩΣ ΤΟΞΙΚΟ ΜΕΤΑΛΛΟ 9
6. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΥΡΙΝΙΚΗ ΒΑΣΗ 11
   - 6.1. Διαμορφώσεις της Πουρινικής Βάσης ως προς το Δακτύλιο του Σακχάρου 11
   - 6.2. Αλληλεπιδράσεις Μεταλλικών Ιόντων και Πουρινικής Βάσης 12
7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΡΙΒΟΖΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ 12
   - 7.1. Διαμορφώσεις του Δακτυλίου της Ριβόζης 12
   - 7.2. Αντίδραση Μεταλλικών Ιόντων με τα Σάκχαρα των Νουκλεοτιδίων 14
8. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΦΩΣΦΟΡΙΚΗ ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΟΔΙΩΝ 14
9. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 15
   - 9.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Ακτινιβολίας με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR Spectroscopy) 15
   - 9.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Στερεάς Κατάστασης (Solid State NMR Spectroscopy) 16

i. Ανισοτροπική Αλληλεπίδραση Διπόλου-Διπόλου 17
ii. Ανισοτροπία Χημικής Μετατόπισης 18
9.3. Λήψη NMR Φασμάτων Υψηλής Διαχωριστικής Ανάλυσης Στερεάς Κατάστασης 18
9.3.1. Αποσύζευξη ^{1}H με υψηλή ενέργεια 18
9.3.2. Περιστροφή υπό μαγική γωνία (Magic Angle Spinning-MAS) 19
9.3.3. Διασταυρούμενη πόλωση (Cross Polarization-CP) 20
9.3.4. Ανάλυση των Παράπλευρων Απορροφήσεων 21
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 22
1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 22
2. ΟΡΓΑΝΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ 22
3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 23
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ 24
5. ΛΗΨΗ NMR ΦΑΣΜΑΤΩΝ ^{31}P ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ 26
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 27
1. ΦΑΣΜΑΤΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR) 27
1.1. Φάσματα υπερύθρου του μετά ναρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης 27
1.2. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου Mg-5΄-GMP·$5H_2O$ 38
1.3. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου Ba-5΄-GMP·$5H_2O$ 44
1.4. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου Cd-5΄-GMP·$5H_2O$ 50
2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^{31}P NMR ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ 57
3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^{13}C NMR ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ 69
4. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^{15}N NMR ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ 85
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 98

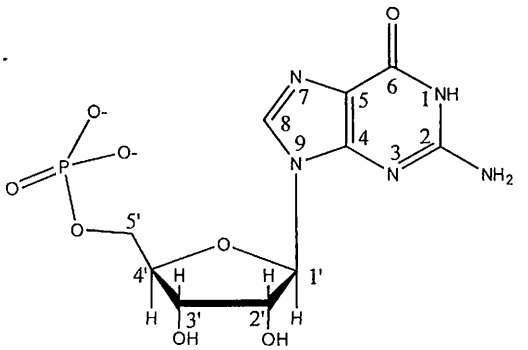
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι πλέον σαφές ότι τα μεταλλικά ιόντα παίζουν σημαντικό ρόλο στα βιολογικά μόρια και γενικά στη ζωή[1-8]. Οι επιστήμονες έχουν στραφεί στη μελέτη του μηχανισμού της αντίδρασής των με τις δραστικές θέσεις των βιολογικών συστημάτων. Είναι γνωστό ότι πολλά από τα μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές αντιδράσεις διαθέτουν άτομα οξυγόνου, αζώτου, θείου ή φωσφορικές ομάδες και σάκχαρα. Εξέχουσα θέση στον επιστημονικό χώρο, όπως προκύπτει από το μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων κατέχουν τα νουκλεοτίδια[1-11].

Τα νουκλεοτίδια, οι «δομικοί λίθοι της ζωής», που ως γνωστόν απαρτίζουν τις έλικες των RNA και DNA, αποτελούνται από μία ετεροκυκλική βάση συνδεδεμένη με μία ριβόζη (σάκχαρο) με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό και φέρουν μία φωσφορική ομάδα στις θέσεις 3΄- και 5΄- του μορίου. Έχει αποδειχθεί, ότι τα μεταλλικά ιόντα επηρεάζουν τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή, τη σταθερότητα καθώς και τις διαμορφώσεις των RNA και DNA[6].

Στην παρούσα εργασία μελετάται η αντίδραση των κατιόντων νατρίου (Na^+), μαγνησίου (Mg^{2+}), βαρίου (Ba^{2+}) και καδμίου (Cd^{2+}) με το νουκλεοτιδίο 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (5΄-GMP), η δομή του οποίου φαίνεται στο Σχ. 1. Ως γνωστόν τα ιόντα Na^+ και Mg^{2+} απαντώνται στους ζώντες οργανισμούς ως ενυδατωμένα κατιόντα της μορφής $M(H_2O)_n^{2+}$ και εμφανίζουν μεγάλη τάση ανταλλαγής των μορίων νερού με άλλους υποκαταστάτες[12]. Το βάριο απαντάται ως $BaSO_4$ σε μερικά κύτταρα φυτών[13]. Το κάδμιο όπως και το βάριο δεν υπάρχουν γενετικά στον οργανισμό μας, αλλά παρατηρήθηκε ότι είναι τοξικά και απαντώνται σε βιομηχανικά βεβαρημένες περιοχές[14].

Το γεγονός ότι η έκθεση σε κάδμιο δύναται να οδηγήσει σε καρκινογένεση, μας ώθησε στο να συμπεριλάβουμε και το στοιχείο αυτό στην έρευνά μας. Τα ιόντα νατρίου, μαγνησίου και βαρίου, ως σκληρά οξέα κατά Lewis, αντιδρούν εύκολα



Σχ.1. Στερεοχημικός τύπος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με τις αριθμήσεις των θέσεων των ατόμων

κυρίως με άτομα οξυγόνου που είναι σκληρές βάσεις κατά Lewis. Παρ'όλα αυτά αναφέρεται σημαντικός αριθμός περιπτώσεων, όπου αλληλεπιδρούν με άτομα N, που είναι μαλακές βάσεις κατά Lewis, ενώ το κατιόν του καδμίου ως μαλακό οξύ κατά Lewis, προτιμά να αλληλεπιδρά με μαλακές βάσεις κατά Lewis.

Τα μεταλλικά ιόντα αλληλεπιδρούν με το 5΄-GMP άμεσα ή έμμεσα, μέσω δεσμών υδρογόνου, με τα δύο αρνητικά φορτισμένα άτομα οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας. Επίσης η θέση N7 και το καρβονύλιο C6=O της πουρινικής βάσης καθώς και τα δύο υδροξύλια στις θέσεις C2΄ και C3΄ του δακτυλίου της ριβόζης είναι πιθανές θέσεις αντίδρασης. Ο τρόπος αντίδρασης μεταλλικού ιόντος-νουκλεοτιδίου εξαρτάται από τη φύση του μετάλλου και του νουκλεοτιδίου (υποκαταστάτη, L=Ligand).

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αντίδραση του μετάλλου με το νουκλεοτίδιο είναι το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του μεταλλικού ιόντος και οι ιδιότητες του μεταλλικού ιόντος αυτού καθ'αυτού[11]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η μελέτη της επίδρασης των παραπάνω μεταλλικών ιόντων στην τελική διαμόρφωση του νουκλεοτιδίου[4]. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν οι ενώσεις των ιόντων μαγνησίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη και συγκρίθηκαν με το μετά νατρίου άλας αυτής. Για τη μελέτη της δομής των ανωτέρω ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) σε συνδυασμό με φασματοσκοπία πολυπυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P, ^{13}C και ^{15}N στερεάς κατάστασης (^{31}P, ^{13}C, ^{15}N CP/MAS NMR Spectroscopy). Οι προκύπτουσες δομές από τη φασματοσκοπία

συγκρίθηκαν, όπου ήταν δυνατόν, με τις υπάρχουσες κρυσταλλικές δομές των εν λόγω ενώσεων. Αυτό έγινε για να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία των φασματοσκοπικών μεθόδων, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η λήψη κρυσταλλικών δομών. Τέλος δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην επίδραση που φαίνεται να ασκεί ο βαθμός ενυδάτωσης πάνω στη διαμόρφωση του συμπλόκου, αφού ως γνωστόν η ενυδάτωση καθορίζει τη μορφή A-, B- ή Z- του DNA[6]. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα άλατα της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης που φέρουν τρία και έξι μόρια νερού.

ΙΙ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

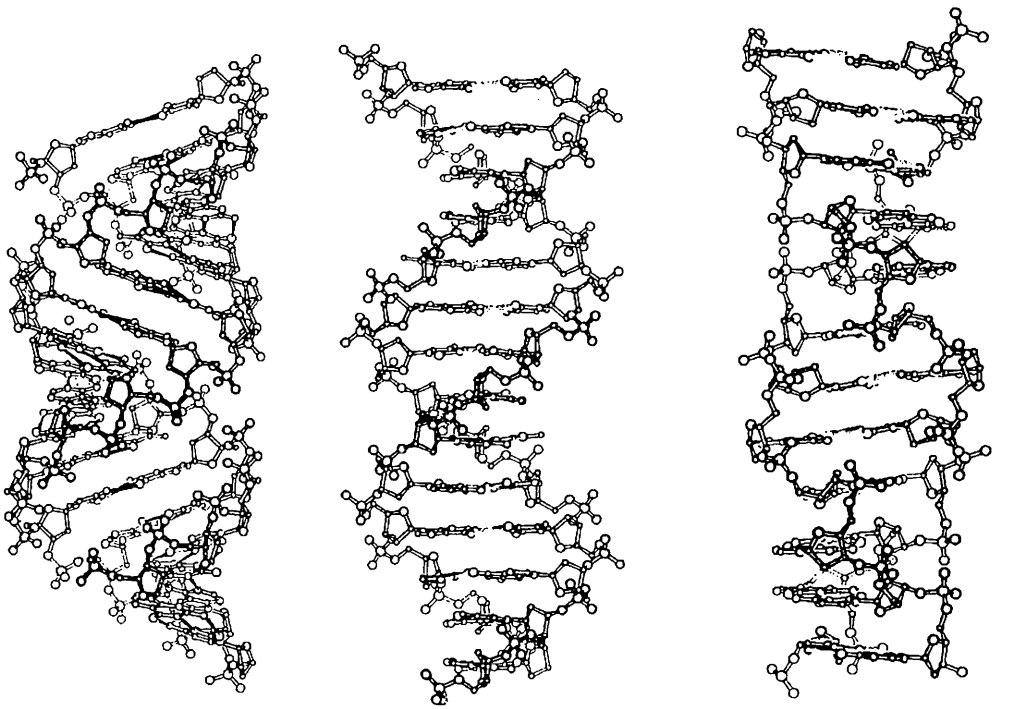
Η ονοματολογία των σημαντικότερων νουκλεοτιδίων παρατίθεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. *Ονοματολογία των κυριοτέρων πουρινικών και πυριμιδινικών βάσεων και των αντιστοίχων νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων*

Βάση	**Νουκλεοζίτης**	**Νουκλεοτίδιο**
Αδενίνη (*πουρίνη*)	Αδενοσίνη	Αδενυλικό Οξύ ή Μονοφωσφορική Αδενοσίνη (AMP)
Γουανίνη (*πουρίνη*)	Γουανοζίνη	Γουανυλικό Οξύ ή Μονοφωσφορική Γουανοζίνη (GMP)
Κυτοσίνη (*πυριμιδίνη*)	Κυτιδίνη	Κυτιδυλικό Οξύ ή Μονοφωσφορική Κυτοσίνη (CMP)
Ουρακίλη (RNA) (*πυριμιδίνη*)	Ουριδίνη	Ουριδυλικό Οξύ ή Μονοφωσφορική Ουριδίνη (UMP)
Θυμίνη (DNA) (*πυριμιδίνη*)	Θυμιδίνη	Θυμιδιλυκό Οξύ ή Μονοφωσφορική Θυμιδίνη (TMP)
Υποξανθίνη (*πουρίνη*)	Ινοσίνη	Ινοσινικό Οξύ ή Μονοφωσφορική Ινοσίνη (IMP)

Μελέτες που έγιναν με περίθλαση ακτίνων-Χ απέδειξαν ότι το DNA μπορεί να λάβει τρεις μορφές, την A-, B- και Z-[15]. Οι δομές αυτές σχηματίζονται από δύο έλικες που συγκρατούνται μεταξύ τους με ζεύγη βάσεων Watson-Crick, μέσω δεσμών υδρογόνου (Σχ. 2). Από τις μορφές αυτές οι A- και B- είναι δεξιόστροφες

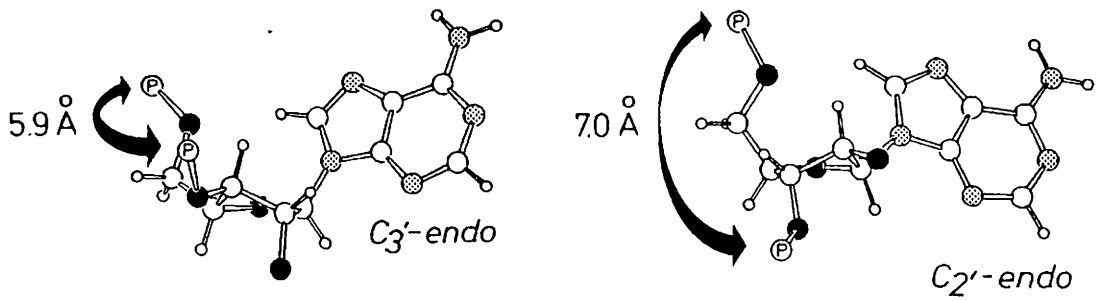
ενώ η Z- είναι αριστερόστροφη. Οι μορφές αυτές επηρεάζονται από το βαθμό ενυδάτωσης του DNA.



A-DNA **B-DNA** **Z-DNA**

Σχ.2. A-, B- και Z-DNA. Στον τύπο A- διακρίνεται καθαρά η κλίση των ζευγών των βάσεων ως προς τον κατακόρυφο άξονα της διπλής έλικας[6]

Έχει βρεθεί ότι σε υδατικά διαλύματα επικρατεί η B- μορφή του DNA, όπου η ριβόζη παίρνει διαμόρφωση *C2΄-endo*[6,16]. Αντίθετα όταν το ποσοστό του νερού που αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα περιορίζεται και μάλιστα πέφτει κάτω του 75 %, τότε το DNA μεταπίπτει στην A- μορφή, προκαλώντας συγχρόνως αλλαγή της διαμόρφωσης της ριβόζης σε *C3΄-endo* (βλ. Σχ.3).



Σχ.3. C3'-endo και C2'-endo διαμορφώσεις του δακτυλίου της ριβόζης οι οποίες παρατηρούνται στις μορφές A- και B- του DNA αντίστοιχα. Αναγράφονται οι αποστάσεις P-P (Å)[6].

Η ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων επηρεάζεται από το βιολογικό περιβάλλον της διπλής έλικας:

$$C2'\text{-}endo \leftrightarrow C3'\text{-}endo \qquad (1)$$

Η παρουσία των μεταλλικών ιόντων επηρεάζει τη διαμόρφωση του DNA. Τα μεταλλικά ιόντα εξουδετερώνουν τα φορτία του DNA και επειδή, ως γνωστό, δεσμεύουν μόρια νερού από το περιβάλλον του, αναγκάζουν το DNA να αποκτήσει *C3'-endo* διαμόρφωση[16].

2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΝΑΤΡΙΟΥ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το νάτριο, ^{11}Na, καταλαμβάνει τη ενδέκατη θέση του Περιοδικού Συστήματος, και ανήκει στην ομάδα ΙΑ των «αλκαλίων». Χάνει εύκολα το ηλεκτρόνιο της εξωτερικής του στοιβάδας, και σχηματίζει το κατιόν Na^+ με δυναμικό ιονισμού 5,139 eV[17]:

$$Na \rightarrow Na^+ + e^- \qquad (2)$$

Αποτελεί σκληρό οξύ κατά Lewis και αντιδρά με σκληρές βάσεις κατά Lewis, όπως είναι τα άτομα του οξυγόνου, με τα οποία ενώνεται χαλαρά (weak binder). Ως ελεύθερο κατιόν σχηματίζει άλατα και σπάνια παρουσιάζει ενδιαφέρον όταν είναι δεσμευμένο. Το νάτριο αποτελεί το κυριότερο εξωκυττάριο κατιόν. Η ολική

συγκέντρωσή του σε ενήλικα ανέρχεται σε 40-60 mmol/l, από τα οποία το 60-70 % είναι ελεύθερο και ως εκ τούτου μπορεί να αντιδρά με ανταλλαγή ιόντων. Το υπόλοιπο 40 % είναι συνδεδεμένο στα οστά και σε άλλα σημεία του σώματος, με συνέπεια να μην είναι διαθέσιμο[18]. Στον οργανισμό το συναντάμε κυρίως ως ενυδατωμένο κατιόν, $Na(H_2O)_6^+$ και λαμβάνει μέρος σε απλές ηλεκτρολυτικές λειτουργίες ή εξουδετερώνει αρνητικά φορτισμένες ομάδες βιολογικών οργανικών μορίων, όπως είναι οι καρβοξυλικές, φωσφορικές και θειϊκές ομάδες των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων[18]. Το κατιόν του νατρίου αποτελεί επίσης το σημαντικότερο κατιόν του πλάσματος του αίματος στο οποίο η συγκέντρωσή του ανέρχεται στα 133-147 mmol/l[18].

Η κατανομή των ιόντων νατρίου τόσο στο ενδοκυττάριο όσο και στο εξωκυττάριο περιβάλλον εξαρτάται από την ενεργότητα των μεμβρανών που τα διαχωρίζουν.

3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το μαγνήσιο, ^{12}Mg, καταλαμβάνει τη δωδέκατη θέση του Περιοδικού Συστήματος και ανήκει στην ομάδα ΙΙΑ των «αλκαλικών γαιών». Χάνει εύκολα τα δύο ηλεκτρόνια της εξωτερικής του στοιβάδας σχηματίζοντας το σταθερό κατιόν, Mg^{2+}, με δυναμικού ιονισμού 15,035 eV[17]:

$$Mg \rightarrow Mg^{2+} + 2e^- \qquad (3)$$

Το κατιόν Mg^{2+} είναι σκληρό οξύ κατά Lewis και γι'αυτόν τον λόγο αντιδρά ισχυρά με σκληρές βάσεις κατά Lewis, όπως είναι το οξυγόνο, χωρίς όμως να αποκλείεται και η αλληλεπίδρασή του με άτομα αζώτου, που είναι μαλακή βάση κατά Lewis.

Είναι γνωστό ότι τα κατιόντα του μαγνησίου (Mg^{2+}) ενυδατώνονται αμέσως μόλις έρθουν σε επαφή με το νερό σύμφωνα με την αντίδραση (4)[22,23]:

$$Mg^{2+} + 6H_2O \rightarrow [Mg(H_2O)_6]^{2+} \qquad (4)$$

Επειδή τα ιόντα Mg^{2+} είναι ενυδατωμένα, σχηματίζουν με άλλα μόρια τόσο άμεσους δεσμούς όσο και δεσμούς υδρογόνου μέσω των μορίων νερού.

Το μαγνήσιο είναι το δεύτερο, μετά το κάλιο, σε αφθονία μεταλλικό κατιόν του εξωκυττάριου υγρού. Η συγκέντρωσή του τόσο στο ενδοκυττάριο όσο και στο εξωκυττάριο χώρο ανέρχεται σε 10^{-3} M[12]. Το μαγνήσιο μαζί με τα άλλα μεταλλικά ιόντα της ζωής[24] Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} και Mn^{2+} συνδέεται με τις βιολογικές λειτουργίες του κυτταρικού πυρήνα. Συμμετέχει σε βασικές διεργασίες μεταβολισμού, στην οξεοβασική ισορροπία και στα οξειδοαναγωγικά συστήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις που ενισχύουν τη διαπίστωση για την αντικαρκινική δράση του μαγνησίου[4,19-23].

Η αντίδραση των ιόντων μαγνησίου με βιομόρια συνήθως γίνεται με αντικατάσταση ενός εκ των συντεταγμένων μορίων ύδατος του κατιόντος από έναν υποκαταστάτη L (Ligand)[22,23,25] σύμφωνα με το σχήμα:

$$[Mg(H_2O)_6]^{2+} + xL \rightarrow [Mg(H_2O)_{6-x}L_x]^{2+} + x(H_2O), \qquad (5)$$

όπου x = 1-6.

Είναι επίσης γνωστή η συμμετοχή του μαγνησίου, ως καταλύτη, στις αντιδράσεις φωσφορυλίωσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), η οποία αποτελεί τη βασική πηγή ενέργειας του οργανισμού[26]. Η απελευθέρωση ενέργειας και ο καταλυτικός ρόλος του Mg^{2+} φαίνεται στις αντιδράσεις (6)-(8):

$$ATP + H_2O \xrightarrow{Mg^{2+}} ADP + P_i + H^+ \qquad \Delta G^0 = -30 \text{ kJ/mol} \qquad (6)$$

$$ADP + H_2O \xrightarrow{Mg^{2+}} AMP + P_i + H^+ \qquad \Delta G^0 = -30 \text{ kJ/mol} \qquad (7)$$

$$AMP + H_2O \xrightarrow{Mg^{2+}} A + P_i + H^+ \qquad \Delta G^0 = -13 \text{ kJ/mol} \qquad (8)$$

όπου P_i: Ανόργανη φωσφορική ομάδα.

4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΒΑΡΙΟΥ ΣΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το βάριο, ^{56}Ba, καταλαμβάνει την πεντηκοστή έκτη θέση του Περιοδικού Συστήματος, και ανήκει, όπως και το μαγνήσιο, στην ομάδα ΙΙΑ των «αλκαλικών γαιών». Χάνει τα δύο ηλεκτρόνια της εξωτερικής του στοιβάδας έτσι ώστε να σχηματίζει το κατιόν Ba^{2+}, με δυναμικό ιονισμού 10,004 eV[17]:

$$Ba \rightarrow Ba^{2+} + 2e^{-} \qquad (9)$$

Όπως και το μαγνήσιο είναι σκληρό οξύ κατά Lewis και επομένως αντιδρά με σκληρές βάσεις κατά Lewis όπως το οξυγόνο.

Το βάριο απαντάται, όπως προαναφέραμε στην εισαγωγή, σε κύτταρα φυτών[13]. Το ιόν του βαρίου Ba^{2+} είναι τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό, η δε τοξικότητά του οφείλεται στον ανταγωνισμό με τα ιόντα K^{+} επειδή έχουν το ίδιο περίπου μέγεθος (η ιοντική ακτίνα των ιόντων Ba^{2+} και K^{+} είναι 1,34 και 1,33 Å αντίστοιχα[27]). Επίσης δεσμεύεται στα ιοντικά κανάλια του κυττάρου, μέσω των οποίων γίνεται η μεταφορά ιόντων νατρίου και καλίου, παρεμποδίζοντας τόσο την ανταλλαγή ιόντων Na^{+}-K^{+}όσο και την μεταφορά του καλίου αυτή καθαυτή[28,29].

5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΑΤΙΟΝΤΟΣ ΚΑΔΜΙΟΥ ΩΣ ΤΟΞΙΚΟ ΜΕΤΑΛΛΟ

Το κάδμιο, ^{48}Cd, καταλαμβάνει την τεσσαρακοστή όγδοη θέση του Περιοδικού Συστήματος. Ανήκει στα μέταλλα εκείνα που γειτονεύουν με τα μεταβατικά και χαρακτηρίζεται ως «συνορεύον» (borderline). Είναι μαλακό οξύ κατά Lewis και επομένως αντιδρά με μαλακές βάσεις κατά Lewis όπως είναι τα άτομα N των ετεροκυκλικών πουρινικών δακτυλίων[30].

Χάνει τα δύο ηλεκτρόνια της εξωτερικής του στοιβάδας σχηματίζοντας το κατιόν Cd^{2+} με δυναμικό ιονισμού 16,908 eV[17]:

$$Cd \rightarrow Cd^{2+} + 2e^{-} \qquad (10)$$

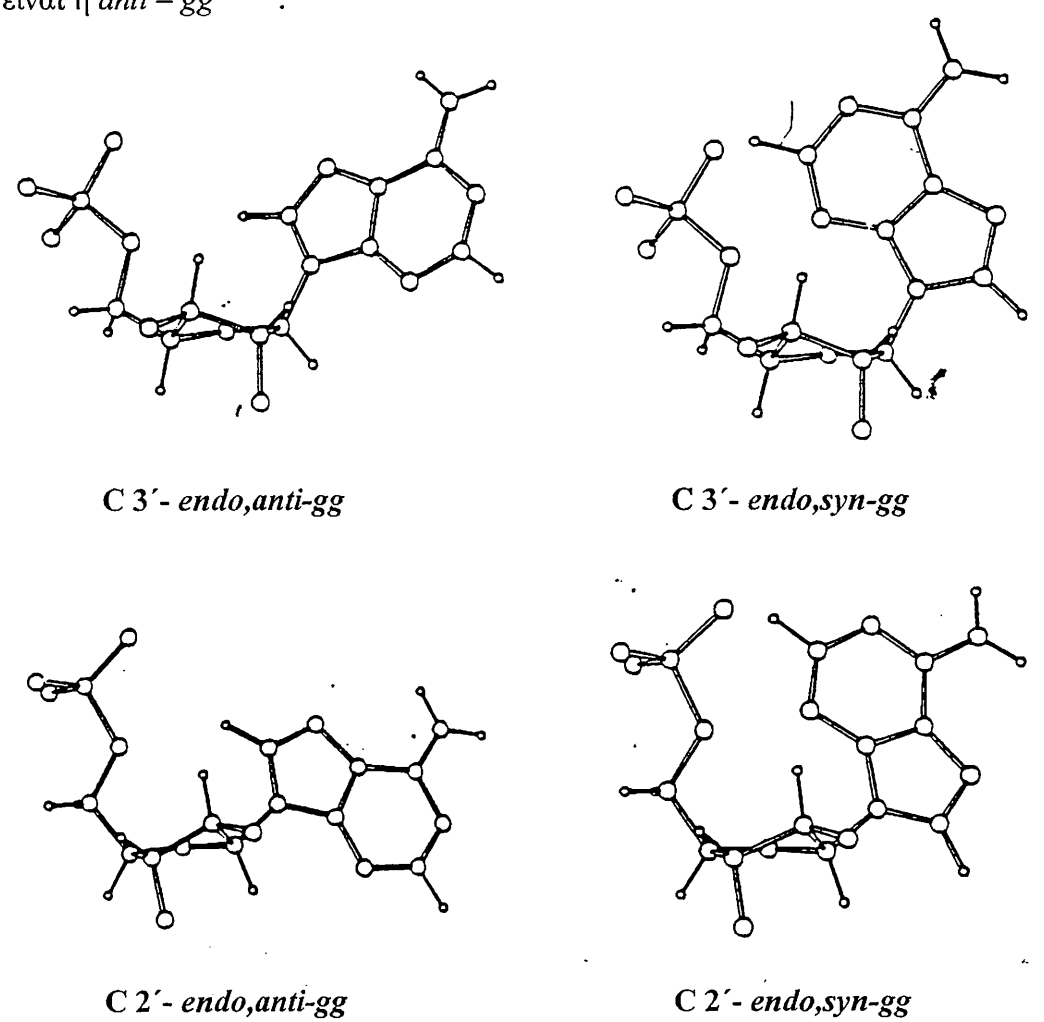
Το ιόν του καδμίου (Cd^{2+}) είναι πολύ τοξικό για τον οργανισμό επειδή αντικαθιστά τα ιόντα Ca^{2+} και Zn^{2+} στις βασικές λειτουργίες τους και μάλιστα όταν τα ιόντα αυτά βρίσκονται σε συγκεντρώσεις κάτω του φυσιολογικού ορίου[31]. Αναφέρεται ότι αντιδρά τόσο με τις βάσεις όσο και με τις φωσφορικές ομάδες του DNA προκαλώντας, ως σύμπλοκο, σχάση της διπλής έλικας. Παρεμποδίζει την επιδιόρθωση της βλάβης αυτής, γι'αυτό συγκαταλέγεται στα καρκινογόνα στοιχεία[32]. Απαντάται, όπως και το βάριο, σε βιομηχανικά βεβαρημένες περιοχές, ειδικά όπου υπάρχουν βιομηχανίες επεξεργασίας μετάλλων και εισέρχεται στον οργανισμό κυρίως με την τροφή. Έχει ανιχνευτεί τόσο σε φρέσκα προϊόντα και κυρίως σε θαλασσινά[14].

6. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΟΥΡΙΝΙΚΗ ΒΑΣΗ

6.1. Διαμορφώσεις της Πουρινικής Βάσης ως προς το Δακτύλιο του Σακχάρου

Στο Σχ.4 φαίνονται οι διαμορφώσεις του σακχάρου της 5΄-μονοφωσφορικής αδενοσίνης, C3΄– *endo* και C2΄– *endo* για προσανατολισμό *anti-gg (gauche-gauche)* και *syn-gg*.

Μελέτες FT-IR και NMR φασματοσκοπίας έχουν δείξει ότι σε υδατικό διάλυμα παρατηρείται ισορροπία *syn – anti* διαμόρφωσης. Γενικά, η διαμόρφωση που ως επί το πλείστον αποκτούν τα περισσότερα από τα συνήθη νουκλεοτίδια σε ουδέτερο pH είναι η *anti – gg*[6,23,34].



*Σχ.4. Προσανατολισμός **anti** και **syn** της 5΄-μονοφωσφορικής αδενοσίνης για την διαμόρφωση C3΄– endo και C2΄– endo του σακχάρου. Εδώ παρουσιάζεται η gauche – gauche διαμόρφωση του μορίου σε σχέση με τον δεσμό C4΄–C5΄*[35].

6.2. Αλληλεπιδράσεις Μεταλλικών Ιόντων και Πουρινικής Βάσης

Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος της πουρινικής βάσης των νουκλεοτιδίων (αδενίνης, γουανίνης ή υποξανθίνης), περιέχει αρκετά άτομα αζώτου, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πιθανές θέσεις αντίδρασης ενός μεταλλικού ιόντος. Η πιθανότητα αυτή εξαρτάται από το pH του διαλύματος που επηρεάζει την πρωτονίωση ή μη των νουκλεοτιδίων και συνεπώς τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμού με το μεταλλικό ιόν. Έτσι σε pH>9,5 το άζωτο N1 της γουανοζίνης είναι πιο βασικό του N7. Παρά το γεγονός ότι το N1 είναι το πιο βασικό άτομο αζώτου (τουλάχιστον 100 φορές πιο βασικό από το N7) στις πουρίνες (για την 5΄-GMP σημειώνουμε pK_a (N1) = 9,5, pK_a (N7) = 2,5 και για την 5΄-IMP αντίστοιχα pK_a (N1) = 9,0, pK_a (N7) = 1,3), τα μεταλλικά ιόντα παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη τάση δεσμού στο N7[36]. Υπάρχει επίσης η άποψη ότι σε ουδέτερο pH παρατηρείται ανταγωνισμός μεταξύ των δύο αυτών θέσεων[36]. Η αντίδραση του μεταλλικού ιόντος με τα άτομα αζώτου της βάσης εξαρτάται επίσης και από στερεοχημικούς παράγοντες όπως στην περίπτωση του N3, το οποίο βρίσκεται πλησίον του N9 (Σχ.1). Έχει παρατηρηθεί ότι σε βασικές συνθήκες και ιδιαίτερα για 6-οξο νουκλεοτίδια, όπως η 5΄-GMP και 5΄-IMP, λαμβάνει χώρα η δέσμευση των μεταλλικών ιόντων στη θέση N1 και ο σχηματισμός χηλικών συμπλόκων[36]. Γενικά, το καρβονυλικό οξυγόνο (O6) της βάσης, αντιδρά με διάφορα μεταλλικά ιόντα, μόνο μέσω δεσμών υδρογόνου.

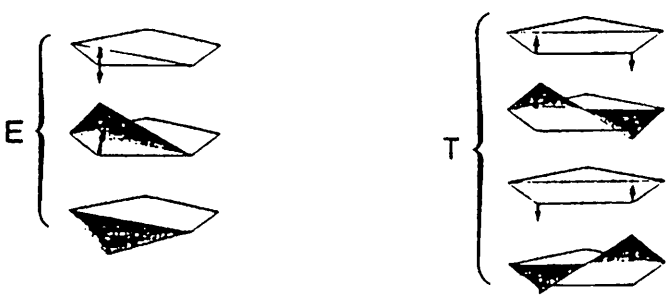
7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΡΙΒΟΖΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

7.1. Διαμορφώσεις του Δακτυλίου της Ριβόζης

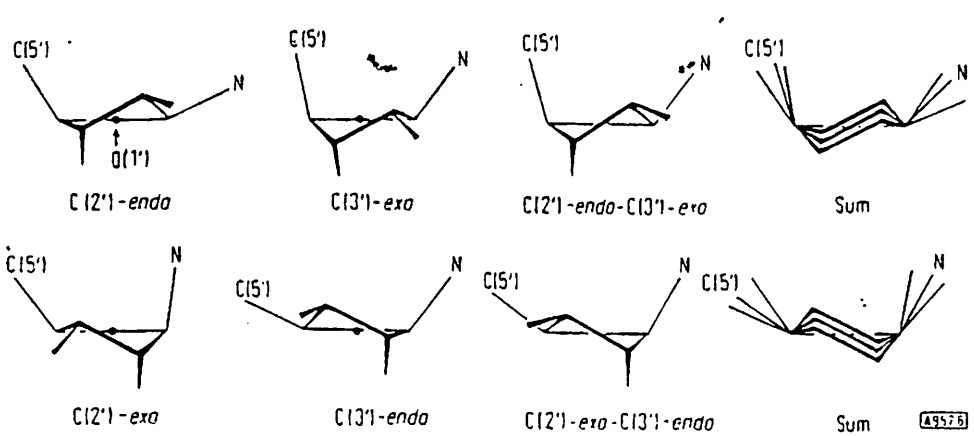
Ο πενταμελής δακτύλιος της ριβόζης των νουκλεοτιδίων μπορεί να πάρει συνήθως δύο διαμορφώσεις, τη διαμόρφωση φακέλου (E=Envelope) και τη διαμόρφωση συστροφής (T=Twist) (Σχ.5). Στη διαμόρφωση φακέλου τα άτομα C1΄, C2΄, C4΄ και O ορίζουν το επίπεδο ενώ το άτομο άνθρακα C3΄ είναι εκτός επιπέδου. Στη διαμόρφωση συστροφής τα άτομα C1΄, C4΄ και O ορίζουν ένα επίπεδο και τα άτομα C2΄ και C3΄ βρίσκονται εκατέρωθεν του επιπέδου αυτού. Όταν τα άτομα που βρίσκονται εκτός επιπέδου πρόσκεινται προς το μέρος του εξωκυκλικού C5΄

άνθρακα του νουκλεοτιδίου η διαμόρφωση καλείται *endo*, στην αντίθετη περίπτωση *exo* (Σχ.6).

Περιστροφή της βάσης γύρω από το δεσμό N9-C1′ προκαλεί απομάκρυνσή της από το σάκχαρο, οπότε η διαμόρφωση λέγεται *anti*, ενώ όταν πλησιάζει προς αυτό λέγεται *syn* (Σχ.4, σελ.11).



Σχ.5. Διαμορφώσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Στην διαμόρφωση (E), 4 από τα 5 άτομα του δακτυλίου βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο ενώ το πέμπτο αποκλίνει. Στην (T), 3 από τα 5 άτομα είναι συνεπίπεδα ενώ τα άλλα δύο βρίσκονται εκατέρωθεν αυτού του επιπέδου[6]



Σχ.6. Σχετική θέση του σακχάρου ως προς τα άτομα N(9) και C(5′)[3].

7.2. Αντίδραση Μεταλλικών Ιόντων με τα Σάκχαρα των Νουκλεοτιδίων

Γενικά τα υδροξύλια των θέσεων 2΄ και 3΄ του σακχάρου (ριβόζη) ενός νουκλεοτιδίου, θεωρούνται «σκληρές» βάσεις, και επειδή είναι προσιτά, αποτελούν πολύ πιθανές θέσεις αντίδρασης των μεταλλικών ιόντων της $1^{ης}$ και $2^{ης}$ ομάδας του Περιοδικού Πίνακα[7]. Έχει διαπιστωθεί ότι τα μεταλλικά ιόντα Ca(II), Cd(II), Ba(II) και Sr(II) μπορούν να αντιδράσουν με τα υδροξύλια των θέσεων 2΄ και 3΄ του σακχάρου των νουκλεοτιδίων 5΄-IMP και 5΄-GMP όμως η δομή τους δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί[38].

8. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΦΩΣΦΟΡΙΚΗ ΟΜΑΔΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Οι φωσφορικές ομάδες, λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν, εν γένει μπορούν να αντιδράσουν με όλα τα μεταλλικά ιόντα (αλκάλια, αλκαλικές γαίες, μεταβατικά και βαρέα μέταλλα), γεγονός που τις καθιστά σημαντικές στα βιολογικά συστήματα. Η σπουδαιότητα απορρέει από το γεγονός ότι με την αντίδραση του μεταλλικού ιόντος εξουδετερώνεται το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων και επομένως συμβάλλουν στη σταθεροποίηση ή μη της διπλής έλικας του DNA ή RNA. Η αλληλεπίδραση μετάλλων-φωσφορικής ομάδας (ιοντικός δεσμός), δύναται να είναι είτε άμεση, είτε έμμεση μέσω δεσμών υδρογόνου. Ο βαθμός ενυδάτωσης του μεταλλικού ιόντος επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις.

Τα μεταλλικά ιόντα Cu(II), Cd(II), Ni(II) Zn(II) και Co(II), μπορούν να συνδέονται με τα οξυγόνα της φωσφορικής ομάδας καθώς και με το N7 της πουρινικής βάσης σχηματίζοντας χηλικά ή μακροχηλικά σύμπλοκα[38].

9. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

9.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Ακτινοβολίας με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR Speetroscopy)

Η φασματοσκοπία δονήσεων κατατάσσεται στις φυσικοχημικές μεθόδους ανάλυσης και προσδιορισμού της μοριακής δομής και στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη.

Βασική προϋπόθεση ώστε ένα μόριο να παρέχει υπέρυθρο φάσμα, είναι η μεταβολή της διπολικής του ροπής καθώς αυτό δονείται. Έτσι ομοπυρηνικά διατομικά ή συμμετρικά μόρια, όπως H_2, Cl_2 και γενικά A_2, δεν απορροφούν στην περιοχή του υπέρυθρου, αφού δεν μεταβάλλεται η διπολική ροπή, μ, κατά τη διάρκεια της ταλάντωσής τους. Η φασματοσκοπία του υπερύθρου χρησιμοποιεί εκείνη την περιοχή του φάσματος που εκτείνεται μεταξύ 2,5-25 μm (4000-400 cm^{-1}). Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τα υπέρυθρα φάσματα αφορούν κυρίως την παρουσία διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων σ'αυτό, την ισχύ των δεσμών μεταξύ των ατόμων του μορίου και τη συμμετρία του μορίου. Οι πληροφορίες αυτές εκφράζονται ως ενεργειακές μεταβολές. Οι μεταβολές της ενέργειας αποδίδονται στα φάσματα ως κυματαριθμοί ($\tilde{\nu}$) οι οποίοι για ένα διατομικό μόριο A-B ορίζονται ως:

$$\tilde{\nu} = (1/2\pi c)\,(k/\mu)^{1/2} \quad (cm^{-1}) \qquad (11)$$

όπου k η σταθερά δυναμικού του δεσμού A-B και μ η ανηγμένη μάζα [$\mu = m_A m_B/(m_A+m_B)$].

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι περισσότερο εύχρηστη σε σχέση με την NMR και ESR φασματοσκοπία, γιατί δεν προϋποθέτει κατά την λήψη του φάσματος μιας ουσίας κάποιες ειδικές συνθήκες παρασκευής του δείγματος και χρήσης του οργάνου[39].

9.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Στερεάς Κατάστασης (Solid State NMR Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) βασίζεται εν γένει στην αλληλεπίδραση του μαγνητικού πεδίου των πυρήνων των μορίων και ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Η συχνότητα συντονισμού αυτών των πυρήνων ορίζεται από τη σχέση:

$$\nu = (\gamma/2\pi)\, B_0\, (1-\sigma) \qquad (12)$$

όπου: γ, ο γυρομαγνητικός λόγος, χαρακτηριστικός για κάθε πυρήνα, B_0, το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο και σ η σταθερά προάσπισης (shielding constant), η οποία εξαρτάται άμεσα από την ηλεκτρονιακή κατανομή γύρω από τον εξεταζόμενο πυρήνα.

Στα φάσματα NMR υπολογίζουμε την διαφορά της συχνότητας συντονισμού μεταξύ του εξεταζόμενου πυρήνα και ενός πυρήνα αναφοράς (reference nucleus). Η διαφορά αυτή καλείται *χημική μετατόπιση*, είναι αδιάστατο μέγεθος και συμβολίζεται με το γράμμα (δ). Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τη σχέση:

$$\delta = 10^6\, (\sigma_{ref}-\sigma) \qquad (13)$$

Οι τιμές της χημικής μετατόπισης (δ) εκφράζονται ως μέρη ανά εκατομμύριο, ppm (parts per million).

Τα φάσματα NMR στερεών ενώσεων, σε αντίθεση με εκείνα των υδατικών διαλυμάτων, παρουσιάζουν πολύ ευρείες κορυφές, οι οποίες απαιτούν ειδική ανάλυση. Η αδυναμία λήψης φασμάτων NMR υψηλής διαχωριστικής ανάλυσης, στη στερεά κατάσταση, οφείλεται στην ανισοτροπική αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου και στην ανισοτροπία χημικής μετατόπισης (CSA)[40,41].

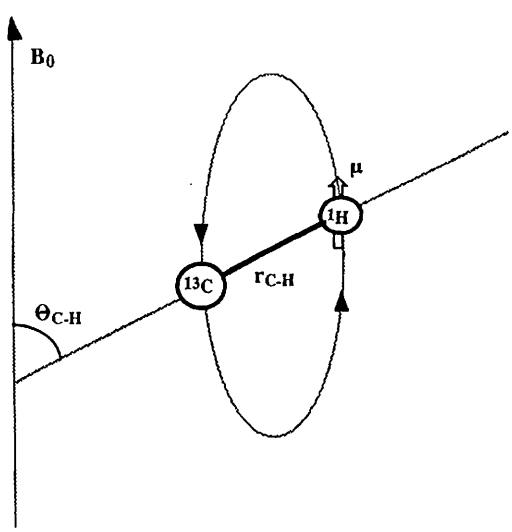
i. Ανισοτροπική Αλληλεπίδραση Διπόλου-Διπόλου

Το τοπικό μαγνητικό πεδίο στον πυρήνα για παράδειγμα του ^{13}C (το ίδιο ισχύει και για τούς πυρήνες ^{31}P και ^{15}N) σε μία οργανική στερεή ένωση δίνεται από τη σχέση:

$$B_{loc} = \pm h/4\pi\, \gamma_H\, [(3\cos^2\theta_{C\text{-}H} - 1)]/r^3_{C\text{-}H} \qquad (14)$$

όπου $r_{C\text{-}H}$ η απόσταση μεταξύ των δύο πυρήνων C-H και $\theta_{C\text{-}H}$ η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ της ευθείας που ενώνει τους πυρήνες και της διεύθυνσης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 (Σχ.7).

Εάν οι τιμές των $r_{C\text{-}H}$ και $\theta_{C\text{-}H}$ είναι καθορισμένες σε όλο το δείγμα, όπως για παράδειγμα για μεμονωμένα ζεύγη ^{13}C-^{1}H ενός μονοκρυστάλλου, η αλληλεπίδραση αυτή θα είχε ως αποτέλεσμα τη σχάση του σήματος του ^{13}C σε δύο ίσες κορυφές. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από τον προσανατολισμό του κρυστάλλου ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0. Το γεγονός ότι στα οργανικά στερεά είναι δύσκολο να έχουμε μονοκρυστάλλους οδηγεί σε ένα πλήθος τιμών $r_{C\text{-}H}$ και $\theta_{C\text{-}H}$, με



Σχ.7. Επίδραση του μαγνητικού πεδίου στον πυρήνα του ^{13}C, το οποίο επάγεται από τη μαγνητική ροπή του πυρήνα ^{1}H [40].

αποτέλεσμα οι κορυφές του φάσματος να είναι πλατειές (εύρος πολλών kHz).

ii. Ανισοτροπία Χημικής Μετατόπισης

Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα εξαρτάται από τον προσανατολισμό του μορίου ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Έτσι, ακόμα και στην περίπτωση απουσίας ανισοτροπικής αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου εμφανίζεται χημική μετατόπιση. Η χημική μετατόπιση εξαρτάται από τη γωνία θ μεταξύ του εφαρμοζόμενου πεδίου και του κύριου άξονα ως προς τον οποίο ορίζεται η χημική μετατόπιση και υπολογίζεται από τη σχέση $3\cos^2\theta-1$. Επειδή σε ένα δείγμα που δεν είναι μονοκρύσταλλος κάθε μόριο αποκτά διαφορετικό προσανατολισμό, παρατηρείται διασπορά κορυφών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση συνεχούς φάσματος.

Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα με μη συμμετρικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον υπολογίζεται από τρεις χαρακτηριστικές τιμές (δ_{11}, δ_{22} και δ_{33}) που ορίζουν τις τρεις κύριες συνιστώσες του τανυστή χημικής μετατόπισης δ. Οι τρεις αυτές κύριες συνιστώσες του τανυστή χημικής μετατόπισης δ, προκύπτουν με διαγωνοποίηση ενός πίνακα 3x3 (αλληλεπίδραση σε τρεις διαστάσεις). Η διαγωνοποίηση γίνεται με κατάλληλη επιλογή του κύριου συστήματος συντεταγμένων, έτσι ώστε η τιμή να μην είναι μηδενική[42].

9.3. Λήψη NMR Φασμάτων Υψηλής Διαχωριστικής Ανάλυσης Στερεάς Κατάστασης

Προκειμένου να αποσβέσουμε τη διεύρυνση των κορυφών και τους μεγάλους χρόνους αποδιέγερσης πυρήνων, όπως των ^{13}C, ^{31}P και ^{15}N, μπορούμε να εφαρμόσουμε ταυτόχρονα συνδυασμό τριών τεχνικών, (α) της αποσύζευξης ^{1}H με υψηλή ενέργεια, (β) της περιστροφής υπό μαγική γωνία και (γ) της διασταυρούμενης πόλωσης. Ο συνδυασμός αυτός θεωρείται ότι αποτελεί μια δυναμική τεχνική στη μελέτη στερεών ενώσεων.

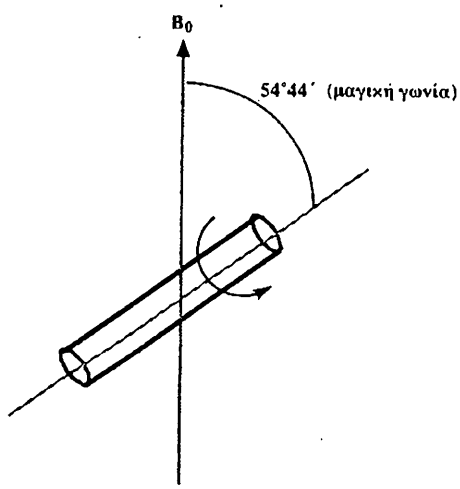
9.3.1. Αποσύζευξη ^{1}H με υψηλή ενέργεια

Για τη μελέτη πυρήνων, όπως ^{13}C, ^{31}P και ^{15}N, η εξάλειψη της διεύρυνσης που οφείλεται στην αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου είναι σχετικά απλή, αφού το τοπικό μαγνητικό πεδίο B_{loc} προκύπτει μόνο από άφθονους πυρήνες του μορίου όπως το ^{1}H.

Όταν η αλληλεπίδραση είναι ετεροπυρηνική, η αποσύζευξη των πρωτονίων από τους εξεταζόμενους πυρήνες άνθρακα, φωσφόρου ή αζώτου καθίσταται εφικτή εφαρμόζοντας την τεχνική του διπλού συντονισμού. Η σύζευξη στη στερεά κατάσταση είναι της τάξης αρκετών χιλιάδων Hz και προκειμένου να απαλειφθεί απαιτεί την εφαρμογή πολύ ισχυρού παλμού ισχύος 100 Watt ή περισσότερο[42,43]. Έχει βρεθεί πειραματικά, ότι για ισχύ 100 Watt, παλμός 90°, καλύπτει ένα πεδίο συχνοτήτων μεγαλύτερο από από τη σταθερά σύζευξης, J_{AX} των δύο πυρήνων, όπου A= ^{1}H και X= ^{13}C, ^{15}N ή ^{31}P. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εξάλειψη της σύζευξης μεταξύ του εξεταζόμενου πυρήνα (^{13}C, ^{31}P ή ^{15}N) και του ^{1}H και επομένως την εξάλειψη της διεύρυνσης που προκαλείται στο φάσμα λόγω αυτής.

9.3.2. Περιστροφή υπό μαγική γωνία (Magic Angle Spinning-MAS)

Όπως προαναφέρθηκε, η χημική ανισοτροπία εξαρτάται από τη γωνία περιστροφής σύμφωνα με τον παράγοντα ($3\cos^2\theta$-1). Προκειμένου δηλαδή να εξαλειφθούν οι ανισοτροπικές αλληλεπιδράσεις αρκεί να μηδενιστεί ο παράγοντας ($3\cos^2\theta$-1), δηλαδή η γωνία θ πρέπει να λάβει την τιμή 54°44΄. Η γωνία αυτή των 54°44΄ ονομάζεται «μαγική γωνία» = θ_m[44]. Στην πράξη η γωνία θ λαμβάνει όλες τις τιμές μεταξύ 0° και 180° προκαλώντας τη διεύρυνση των κορυφών. Παρ'όλα αυτά, περιστροφή του δείγματος γύρω από έναν άξονα με κλίση 54°44΄ ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο μπορεί να φέρει, στο μέσο χρόνο, όλα τα ανύσματα στη «μαγική διεύθυνση» (Σχ.8). Η συχνότητα περιστροφής θα πρέπει να είναι τουλάχιστον συγκρίσιμη με τις διαφορές στη συχνότητα που εμφανίζονται στο δείγμα. Για παράδειγμα, προκειμένου να εξαλειφθεί η επίδραση της ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης στον ^{31}P, απαιτείται συνήθως συχνότητα περιστροφής της τάξης των 2 kHz[45]. Σε πειράματα όπου το εύρος συχνοτήτων της ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης είναι μεγαλύτερο από τη συχνότητα περιστροφής, πολλές λεπτές κορυφές εμφανίζονται περιοδικά εκατέρωθεν της ισοτροπικής χημικής μετατόπισης. Η χημική μετατόπιση των παράπλευρων αυτών κορυφών είναι ίση με τη συχνότητα περιστροφής του δείγματος και η ένταση της κάθε κορυφής εξαρτάται από το μέγεθος της CSA (Chemical Shift Anisotropy) για δεδομένη συχνότητα.



Σχ.8. Περιστροφή δείγματος υπό μαγική γωνία[40].

9.3.3. Διασταυρούμενη πόλωση (Cross Polarization-CP)

Η διασταυρούμενη πόλωση εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου ορισμένοι πυρήνες, όπως για παράδειγμα ο ^{31}P, παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία και μεγάλους χρόνους αποδιέγερσης[46]. Η βασική ιδέα στηρίζεται στη χρήση πυρήνων μεγάλης φυσικής αναλογίας με μεγάλο γυρομαγνητικό λόγο, όπως είναι το πρωτόνιο, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας των λιγότερο ευαίσθητων πυρήνων μέσω μεταφοράς μαγνητισμού. Επιπλέον ο μικρός χρόνος αποδιέγερσης του ^{1}H επιτρέπει τη γρήγορη επανάληψη της λήψης του σήματος και συνεπώς πρόσθετη αύξηση της ευαισθησίας.

Μεταφορά ενέργειας (πόλωσης των spin) μεταξύ των πυρήνων ^{1}H και ^{31}P καθίσταται εφικτή στο περιστρεφόμενο πλαίσιο εφόσον ισχύει η συνθήκη Hartmann-Hahn:

$$\gamma_{31P} B_{31P} = \gamma_{1H} B_{1H} \qquad (15)$$

Σε αυτή την περίπτωση η ένταση του σήματος ^{31}P ενισχύεται κατά ένα παράγοντα 2,5, ο οποίος αντιστοιχεί στην τιμή του λόγου γ_{1H}/γ_{31P}. Ομοίως, για την περίπτωση των πυρήνων ^{13}C και ^{15}N έχουμε ενίσχυση της έντασης του σήματός τους κατά έναν παράγοντα 4 και 10 αντίστοιχα.

9.3.4. Ανάλυση των Παράπλευρων Απορροφήσεων

Από μελέτες NMR σε στερεά κατάσταση μπορούν να ληφθούν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή του μορίου όταν η ταχύτητα περιστροφής είναι αρκετά μικρή, οπότε δεν έχουμε πλήρη εξάλειψη της ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης. Σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζονται γύρω από την ισοτροπική χημική μετατόπιση πολλές λεπτές κορυφές, που ισαπέχουν μεταξύ τους τόσο όσο η συχνότητα περιστροφής. Καθώς η ταχύτητα περιστροφής αυξάνει, ο αριθμός των παράπλευρων μετατοπίσεων ελαττώνεται και η σχετική ένταση της κεντρικής ισοτροπικής κορυφής ενισχύεται. Είναι σημαντικό να λεχθεί ότι η μορφή του φάσματος των παράπλευρων απορροφήσεων ουσιαστικά εκφράζει τον τύπο ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης. Συνεπώς, από την ανάλυση των φασμάτων υπό συνθήκες MAS (Magic Angle Spinning) επιτρέπεται ο προσδιορισμός της τιμής των τριών κυρίων συνιστωσών της χημικής μετατόπισης. Η ταυτοποίηση της σειράς των απορροφήσεων είναι εύκολη επειδή η θέση της κεντρικής κορυφής είναι ανεξάρτητη της ταχύτητας περιστροφής, ενώ η απόσταση μεταξύ των παράπλευρων απορροφήσεων καθορίζονται από αυτήν.

Ο τύπος της ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης εκφράζει την τρισδιάστατη απεικόνιση των πυρήνων και επομένως παρέχει, σε σύγκριση με την ισοτροπική τιμή, μια περισσότερο ολοκληρωμένη βάση για τη μελέτη και ερμηνεία της δομής.

ΙΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν χωρίς καμία άλλη κατεργασία τα εξής αντιδραστήρια:

1. Ενυδατωμένο με τρία μόρια νερού άλας νατρίου της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$), της εταιρείας Aldrich Chemical, M.B.= 461,24.
2. Ενυδατωμένο με έξι μόρια νερού άλας νατρίου της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$), της εταιρείας Sigma Chemical, M.B.= 513,4.
3. Άλας θειϊκού μαγνησίου, με επτά μόρια νερού ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), της εταιρείας Carlo Erba, M.B.= 246,49.
4. Άλας του χλωριούχου βαρίου, με δύο μόρια νερού ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$), της εταιρείας Fluka, M.B.= 244,28.
5. Άλας του χλωριούχου καδμίου, άνυδρο, ($CdCl_2$), της εταιρείας Aldrich Chemical, M.B.= 183,31.
6. Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη της εταιρείας Reidel-de Haën.
7. Η ξήρανση των προϊόντων έγινε σε ξηραντήρα κενού, ο οποίος περιείχε χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) πρώτα και στη συνέχεια πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5).

2. ΟΡΓΑΝΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα:

1. Αναλυτικός ζυγός SCALTEC SBC 33 για την ακριβή ζύγιση των αντιδραστηρίων.
2. Στοιχειακός Αναλυτής C, N, H, S της εταιρείας Carlo Erba.

3. Για τη λήψη των φασμάτων υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου, Spectrum GX FT-IR System της εταιρείας Perkin Elmer, με διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} και 25 σαρώσεις για κάθε φάσμα. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή από 4000 έως 400 cm^{-1}, η δε επεξεργασία τους έγινε με πρόγραμμα ανάλυσης "Spectrum v2,00 (1998)" της εταιρείας Perkin Elmer.
4. Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στερεάς κατάστασης ^{31}P, ^{13}C και ^{15}N CP/MAS λήφθηκαν με φασματόμετρο Bruker MSL-300. Για τα φάσματα ^{31}P CP/MAS η ταχύτητα περιστροφής (MAS spinning speed) ήταν 2 kHz, ενώ το δείγμα βρισκόταν υπό μαγική γωνία. Οι χημικές μετατοπίσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας ως εξωτερική πρότυπη ένωση αναφοράς διάλυμα H_3PO_4 85%. Για τα φάσματα ^{13}C CP/MAS χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS), ενώ για τα φάσματα ^{15}N CP/MAS χρησιμοποιήθηκε ως εξωτερική ένωση αναφοράς το νιτρομεθάνιο.

3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Παρασκευάστηκαν με δις απεσταγμένο νερό, υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 10^{-2} M στις προβλεπόμενες αναλογίες μετάλλου προς υποκαταστάτη.

Για την παρασκευή των ενώσεων Mg^{2+}-5΄-GMP χρησιμοποιήθηκε το τρις-ενυδατωμένο μετά νατρίου άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$) σε αναλογία μεταλλικού ιόντος προς υποκαταστάτη M:L = 1:1 και 2:1 (mol:mol), όπου M=Mg^{2+} και L=5΄-GMP^{2-} προκειμένου να δούμε αν η αναλογία επηρεάζει το προϊόν της αντίδρασης[3].

Για την παρασκευή των ενώσεων Ba-5΄-GMP και Cd-5΄-GMP χρησιμοποιήθηκε αναλογία M:L = 1:1 (mol:mol), όπου M=Ba^{2+} ή Cd^{2+} και L=5΄-GMP^{2-}.

Ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων και ελαφρά θέρμανσή τους σε υδατόλουτρο. Σε όλες τις περιπτώσεις το pH των διαλυμάτων βρέθηκε ουδέτερο και ίσο με 7. Τέλος τα δείγματα αφέθηκαν στο ψυγείο (8 °C) για 24 ώρες. Τα σύμπλοκα του βαρίου και του κάδμίου κατέπεσαν ως ίζημα και λήφθηκαν με διήθηση υπό κενό. Στην περίπτωση του μαγνησίου προστέθηκε ποσότητα αιθανόλης ίσου όγκου προς το διάλυμα, ώστε να διαχωρισθεί το σχηματισθέν σύμπλοκο. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό και έκπλυση του λευκού ιζήματος με διάλυμα

αιθανόλης/νερού σε αναλογία, 1:1.

Τα προϊόντα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα κενού και μετά την ξήρανση λειοτριβήθηκαν και αφού κλείστηκαν αεροστεγώς (parafilm), φυλάχτηκαν σε χώρο χαμηλής θερμοκρασίας (8 ^{o}C) .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Στον Πίνακα 3 δίνονται οι πειραματικές τιμές και οι θεωρητικοί υπολογισμοί της εκατοστιαίας σύστασης της ένωσης Mg-5΄-GMP·xH_2O. Βάσει θεωρητικών υπολογισμών υπολογίζουμε τον αριθμό των μορίων του νερού που συμμετέχουν στη δομή ώστε να προτείνουμε την πιθανή αντίδραση.

Πίνακας 3. *Πειραματικοί και θεωρητικοί % υπολογισμοί της σύστασης του προϊόντος της αντίδρασης των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη Mg-5΄-GMP·xH_2O, όπου x=0-5*

	Πειραματικά δεδομένα	**0 H_2O (%)**	**1.H_2O (%)**	**2.H_2O (%)**	**3.H_2O (%)**	**4.H_2O (%)**	**5.H_2O (%)**
C	25,22	31,15	29,76	28,49	27,32	26,25	25,25
N	14,26	18,16	17,35	16,61	15,93	15,30	14,72
H	4,19	3,14	3,49	3,82	4,13	4,40	4,66

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3, ο πλησιέστερος προς τα πειραματικά δεδομένα για τον C, το N και το H, μοριακός τύπος για την ένωση των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη είναι εκείνος που περιέχει πέντε (5) μόρια νερού (Mg-5΄-GMP·5H_2O). Έτσι η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην περίπτωση των ιόντων μαγνησίου, πρέπει να ακολουθεί την εξίσωση:

$$MgSO_4 + 5'\text{-}GMPNa_2 \xrightarrow{H_2O} Mg\text{-}5'\text{-}GMP\cdot 5H_2O + Na_2SO_4 \qquad (16)$$

Στον Πίνακα 4 δίνονται οι πειραματικές τιμές και οι θεωρητικοί υπολογισμοί της εκατοστιαίας σύστασης της ένωσης Ba-5΄-GMP·xH_2O. Βάσει θεωρητικών υπολογισμών υπολογίζουμε τον αριθμό των μορίων του νερού που συμμετέχουν στη δομή.

Πίνακας 4. *Πειραματικοί και θεωρητικοί % υπολογισμοί της σύστασης του προϊόντος της αντίδρασης των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη Ba-5΄-GMP·xH₂O, όπου x=0-5*

	Πειραματικά δεδομένα	**0 H_2O (%)**	**1 H_2O (%)**	**2 H_2O (%)**	**3 H_2O (%)**	**4 H_2O (%)**	**5 H_2O (%)**
C	20,34	24,09	23,25	22,47	21,73	21,05	20,40
N	12,13	14,05	13,56	13,10	12,67	12,27	11,89
H	3,55	2,43	2,73	3,02	3,28	3,53	3,76

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4, ο πλησιέστερος προς τα πειραματικά δεδομένα για τον C, το N και το H, μοριακός τύπος για την ένωση των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη είναι εκείνος που περιέχει πέντε (5) μόρια νερού (Ba-5΄-GMP·5H_2O). Έτσι η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην περίπτωση των ιόντων μαγνησίου, πρέπει να ακολουθεί την εξίσωση:

$$BaCl_2 + 5'\text{-}GMPNa_2 \xrightarrow{H_2O} Ba\text{-}5'\text{-}GMP{\cdot}5H_2O + 2NaCl \qquad (17)$$

Στον Πίνακα 5 δίνονται οι πειραματικές τιμές και οι θεωρητικοί υπολογισμοί της εκατοστιαίας σύστασης της ένωσης Cd-5΄-GMP·xH_2O. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 5, ο πλησιέστερος προς τα πειραματικά δεδομένα για τον C, το N και το H, μοριακός τύπος για την ένωση των ιόντων καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη είναι εκείνος που περιέχει πέντε (5) μόρια νερού (Cd-5΄-GMP·5H_2O).

Πίνακας 5. *Πειραματικοί και θεωρητικοί % υπολογισμοί της σύστασης του προϊόντος της αντίδρασης των ιόντων καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη Cd-5΄-GMP·xH₂O, όπου x=0-5*

	Πειραματικά δεδομένα	**0.H_2O (%)**	**1.H_2O (%)**	**2.H_2O (%)**	**3.H_2O (%)**	**4.H_2O (%)**	**4.5.H_2O (%)**	**5.H_2O (%)**
C	21,44	25,36	24,43	23,57	22,76	22,01	21,65	21,31
N	13,03	14,78	14,24	13,74	13,27	12,83	12,62	12,42
H	3,65	2,55	2,87	3,16	3,44	3,69	3,81	3,93

Έτσι η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην περίπτωση των ιόντων μαγνησίου, πρέπει να ακολουθεί την εξίσωση:

$$CdCl_2 + 5'\text{-}GMPNa_2 \xrightarrow{H_2O} Cd\text{-}5'\text{-}GMP{\cdot}5H_2O + 2NaCl \qquad (18)$$

Πρέπει να αναφερθεί ότι λάβαμε ως περισσότερο προσεγγιστική την % σύσταση του άνθρακα.

5. ΛΗΨΗ NMR ΦΑΣΜΑΤΩΝ ^{31}P ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Για τη λήψη NMR φασμάτων ^{31}P εφαρμόστηκε η τεχνική ενίσχυσης του σήματος του φωσφόρου μέσω της εγκάρσιας πολωσιμότητας του πρωτονίου (Cross Polarization). Η περιστροφή του δείγματος έγινε υπό «μαγική γωνία» (54,7°) (Τεχνική Magic Angle Spinning) ώστε να περιοριστεί, όπως προαναφέρθηκε, ο παράγοντας της ανισοτροπίας που εισάγεται λόγω διαφορετικού αθροιστικού μαγνητικού πεδίου και που οδηγεί στην έντονη διεύρυνση του καταγραφομένου φάσματος.

Η συχνότητα περιστροφής του δείγματος ήταν ίση με 2 kHz. Στη συχνότητα περιστροφής των 2 kHz, παρατηρείται ένα σύνολο κορυφών οι οποίες είναι δορυφορικές της ισοτροπικής. Οι κορυφές αυτές μας δίνουν πληροφορίες σχετικά με το είδος της ανισοτροπίας του φάσματος[45]. Για τις τρεις κύριες συνιστώσες δ_{11}, δ_{22} και δ_{33} της ισοτροπικής χημικής μετατόπισης, δ_{iso}, χρησιμοποιήθηκε η σύμβαση που προτάθηκε από τον Haeberlen[47] σύμφωνα με την οποία ισχύει:

$$|\delta_{iso} - \delta_{33}| \geq |\delta_{iso} - \delta_{22}| \geq |\delta_{iso} - \delta_{11}|$$

$$\eta = (\delta_{11} - \delta_{22})/(\delta_{iso} - \delta_{33})$$

$$\Delta\delta = -\delta_{33} - 0.5\,(\delta_{11} + \delta_{22})$$

όπου ο όρος $\Delta\delta$ είναι η παράμετρος που εκφράζει την ανισοτροπία χημικής μετατόπισης, ο όρος δ_{iso} ισούται με $(\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33})/3$ ενώ ο όρος **η** αποτελεί την παράμετρο ασυμμετρίας. Για $\eta = 0$ ισχύει η αξονική συμμετρία όπου ($\delta_{11} = \delta_{22}$) ή ($\delta_{22} = \delta_{33}$) αντίστοιχα. Για $0<\eta<1$ εμφανίζεται ασυμμετρία και ισχύει $\delta_{11} \neq \delta_{22} \neq \delta_{33}$.

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΦΑΣΜΑΤΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR)

1.1. Φάσματα υπερύθρου του μετά νατρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης

α) 5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O

Στο Σχ.9. παρουσιάζουμε το υπέρυθρο φάσμα του 5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O για την περιοχή από 4000 έως 400 cm^{-1}. Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ των 4000 και 2700 cm^{-1} φαίνονται οι συμμετρικές (sym) και οι αντισυμμετρικές (asym) δονήσεις τάσης (stretching) των ομάδων -OH, H$_2$O, -NH$_2$, -NH, -CH και -CH$_2$ του νουκλεοτιδίου[9,49-53]. Οι παρατηρούμενες ταινίες στα 3546 και 3439 cm^{-1} αποδίδονται στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις τάσης του νερού ενώ οι δονήσεις στα 3315 cm^{-1} και στα 3197 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των ομάδων -NH$_2$ και -NH αντίστοιχα. Συνήθως όμως δεν είναι εύκολο να τις διαχωρίσουμε επειδή υπάρχει επικάλυψη. Οι ταινίες στα 2946 και 2873 cm^{-1} αποδίδονται στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις τάσης της ομάδας -CH$_2$ του μορίου.

Η περιοχή του IR φάσματος μεταξύ 1800 και 500 cm^{-1} είναι περισσότερο χαρακτηριστική για το νουκλεοτίδιο (Σχ.10). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης ή κάμψης των διπλών δεσμών, C=O, C=C και C=N μαζί με τις εντός επιπέδου (in-plane) δονήσεις των ομάδων –NH, -NH$_2$ και οι δονήσεις κάμψης του H$_2$O. Επίσης στο τμήμα του φάσματος από 1200 έως 700 η cm^{-1} εμφανίζονται οι δονήσεις της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας (Πίνακας 6)[3,9,48-54].

Η έντονη ταινία που εμφανίζεται στα 1699 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης της ομάδας του καρβονυλίου νC6=O6. Η δόνηση τάσης του καρβονυλίου είναι πολύ

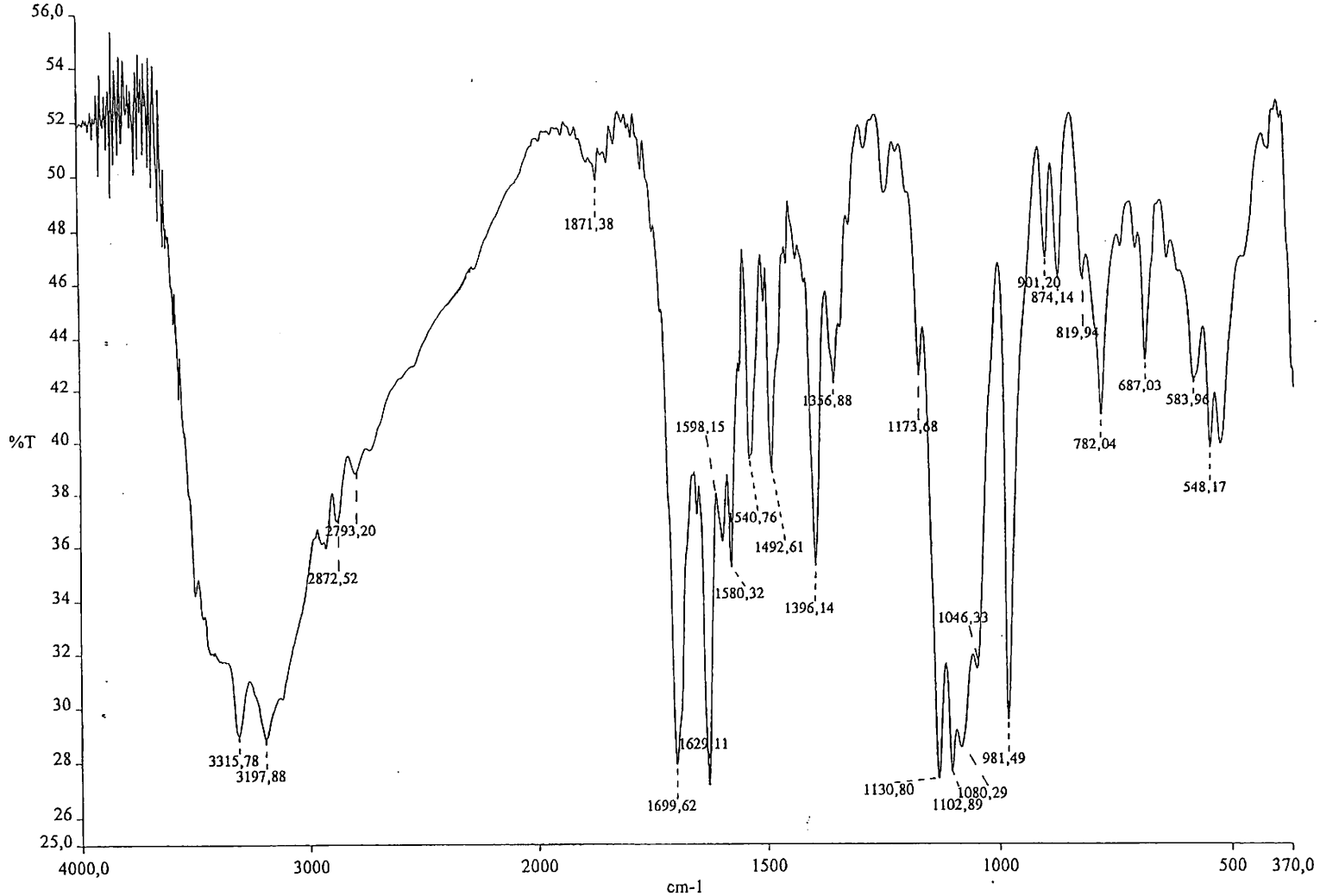
χαρακτηριστική και επειδή είναι αρκετά ευαίσθητη χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη μηχανισμών αντίδρασης, εφόσον η ομάδα αυτή συμμετέχει. Η ταινία στα 1629 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης κρυσταλλικών μορίων ύδατος (δH_2O). Πράγματι, η ταινία αυτή είναι αναμενόμενη αφού το μόριο του νουκλεοτιδίου φέρει 3 μόρια κρυσταλλικά νερά. Η ταινία αυτή συμπεριλαμβάνει και τη δόνηση κάμψης της ομάδας $\delta(-NH_2)$ του μορίου[3,9,48-54].

Η ταινία που εμφανίζεται στα 1598 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης των διπλών δεσμών νC4=C5 ενώ στην ίδια περιοχή απορροφά και η δόνηση τάσης της ομάδας νC4-N3. Η ταινία στα 1580 cm^{-1} αποδίδεται κυρίως στην δόνηση τάσης του δεσμού νC4-N9. Οι δονήσεις κάμψης και τάσης των δεσμών C8-H (δC8-H) και C8=N7 (νC8=N7) εμφανίζονται στα 1492 cm^{-1}. Η δόνηση αυτή, όπως θα δούμε παρακάτω, μεταβάλλεται μετά την αντίδραση με τα μεταλλικά ιόντα. Η ταινία στα 1396 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις του δακτυλίου της πουρίνης. Οι ταινίες στα 1356 και 1243 cm^{-1} αποδίδονται στην δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C8=N7 (νC8=N7). Τέλος η ταινία που εμφανίζεται στα 1174 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού νC8=N7, και στην δόνηση τάσης του γλυκοζιτικού δεσμού που συνδέει τη βάση με το δακτύλιο της ριβόζης (νN9-sugar).

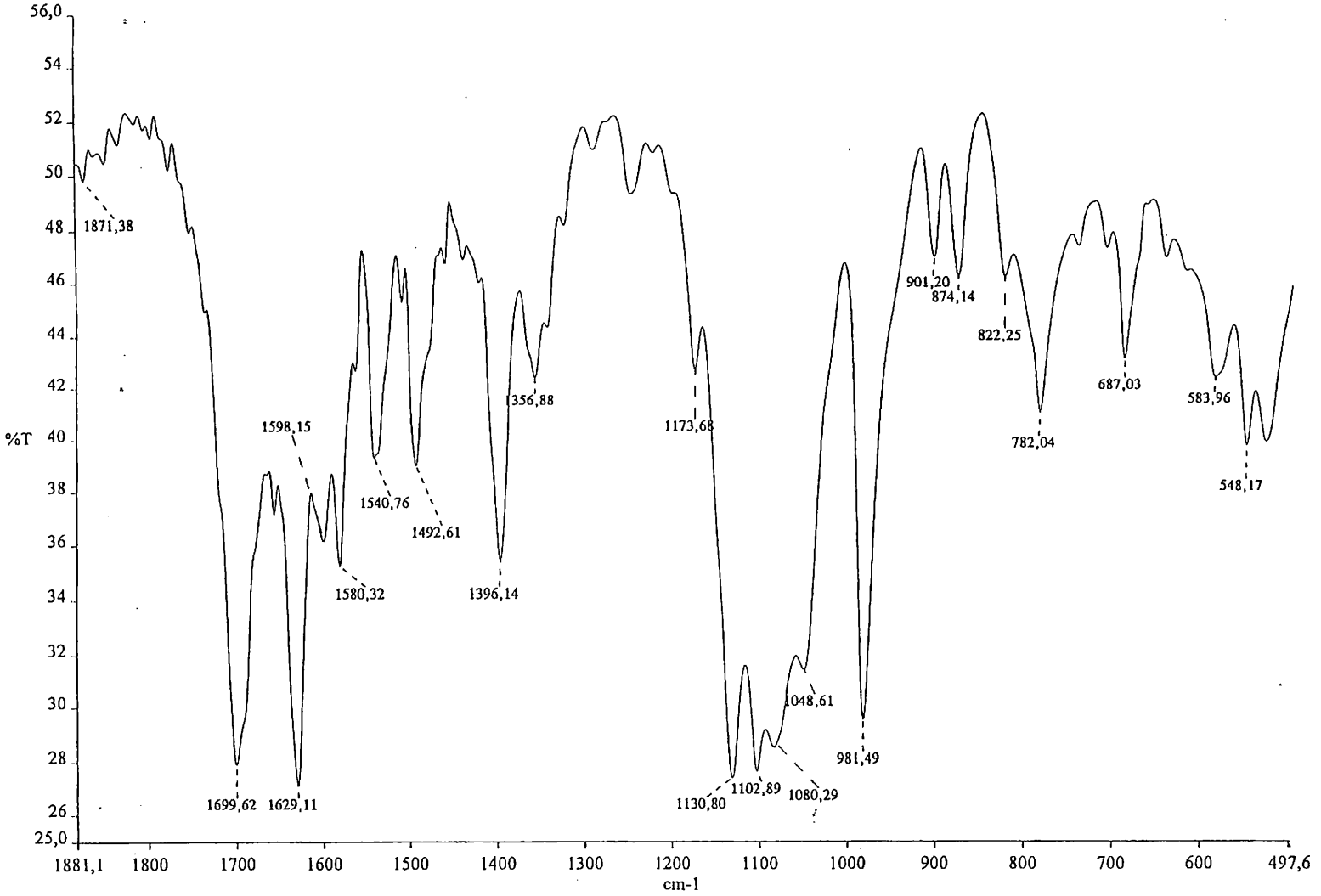
Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει, όπως αναφέρθηκε, η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1200 και 600 cm^{-1} επειδή εμφανίζονται οι δονήσεις της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου. Έτσι η ταινία στα 1130 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-O του δακτυλίου της ριβόζης[3,9,48-54].

Στις ταινίες που εμφανίζονται στα 1103, 1080 και 1048 cm^{-1} απορροφούν οι αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης της φωσφορικής ομάδας νPO_3^{2-}, ενώ στα 981 και 901 cm^{-1} απορροφά η συμμετρική δόνηση τάσης της ίδιας ομάδας[3,9,48-54].

Η ταινία στα 874 cm^{-1} αποδίδεται στην ομάδα $\nu R\text{-}O\text{-}PO_3^{2-}$ της ριβόζης, ενώ η ταινία στα 822 cm^{-1} στην ομάδα νP-O. Η ταινία των 822 cm^{-1} μαζί με την ταινία στα 782 cm^{-1}, που αποδίδεται επίσης στην δόνηση τάσης της ομάδας νP-O (σάκχαρο-φωσφορική) θεωρείται ως «χαρακτηριστική ομάδα» (marker band), γιατί δίνει πληροφορίες για τη διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης[48,55,56].



Σχ.9. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1} του τρις-ενυδατωμένου μετά νατρίου ένυδρου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$)



Σχ.10. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 1800 έως 500 cm^{-1} του τρις-ενυδατωμένου μετά νατρίου ένυδρου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-GMP$Na_2 \cdot 3H_2O$)

Πίνακας 6. FT-IR φάσμα του μετά νατρίου ένυδρου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O)[3,9,48-56].

5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O (cm^{-1})	Assignment
3546	vasym. NH_2
3439	vsym. NH_2
3315	νH_2O
3197	$\nu C_8{=}N_7$
2946	vasym. CH_2
2873	vsym. CH_2
1699	$\nu C_6{=}O_6$
1629	δH_2O, δNH_2
1598	$\nu C_4\text{-}N_3 > \nu C_4{=}C_5 > \nu C_5\text{-}N_7$
1580	$\nu C_4\text{-}N_9 > \nu C_6{=}O > \nu C_2\text{-}N_1$
1492	$\delta C_8\text{-}H > \nu C_8{=}N_7$
1396	Purine ring vlbration
1356	$\nu C_8\text{-}N_9$, $\nu C_8{=}N_7$
1322	Guanine + ribose
1243	$NC_8{=}N_7 > \delta C_8\text{-}H$
1174	$\nu C_8{=}N_7 > \nu N_9$-sugar$> \nu C_4\text{-}N_3$ ή νC΄-C΄sug
1130	vC-O of the sugar ring
1103	vasymPO_3^{-2}
1080	vasymPO_3^{-2}
1048	vasymPO_3^{-2}
981	vsym. PO_3^{-2}
901	vsym. PO_3^{-2}
874	$\nu R\text{-}O\text{-}PO_3^{-2}$
822 800sh	vsym. P-O5΄, C2΄-endo vsym. P-O5΄, C3΄-endo
782	vP-O
687	Guanine ring breathing mode
583	Out of plane H_2O, $-NH_2$, -NH

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, ο πενταμελής δακτύλιος της ριβόζης δεν είναι επίπεδος, αλλά έχει την δυνατότητα να αναδιπλώνεται παίρνοντας χαρακτηριστικές διαμορφώσεις. Στην περίπτωση του μετά νατρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης που φέρει τρία μόρια νερού το νουκλεοτίδιο παίρνει διαμόρφωση *C2΄-endo* όπως προκύπτει από την εμφάνιση ταινίας στα 822 cm^{-1}. Από την παρουσία ενός ώμου στα 800 cm^{-1} καταλήγουμε στο γεγονός ότι στην ένωση θα πρέπει να συνυπάρχει κατά ένα ποσοστό η *C3΄-endo* διαμόρφωση[48,55,56].

Στην περιοχή των 500 cm^{-1} παρατηρούνται οι δονήσεις κάμψης των ομάδων $-NH_2$ και -NH και H_2O όπου το υδρογόνο δονείται εκτός του επιπέδου του δεσμού (out-of-plane)[3,9,48-54].

β) 5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O

Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, το ποσοστό του ύδατος είναι εκείνο που επηρεάζει τη διαμόρφωση του DNA και τη μετατρέπει σε A-, B- ή Z- μορφή. Έτσι προκειμένου να δούμε αν πράγματι η ένταξη περισσοτέρων μορίων νερού ύδατος στο μόριο της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης επηρεάζει τη δομή της, επεκτήναμε τη μελέτη με τη λήψη των FT-IR φασμάτων της 5΄-GMPNa$_2$ με έξι (6) μόρια νερού.

Στο Σχ.11 δίνεται το υπέρυθρο φάσμα του 5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O για την περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1}. Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ των 4000 και 2700 cm^{-1}, όπως αναφέρθηκε, φαίνονται οι συμμετρικές (sym) και αντισυμμετρικές (asym) δονήσεις τάσης (stretching) των ομάδων -OH, H_2O, $-NH_2$, -NH, -CH και $-CH_2$ του νουκλεοτιδίου[9,49-53].

Παρατηρούμε πράγματι ότι η αύξηση του αριθμού των μορίων νερού στο νουκλεοτίδιο κατά τρία μόρια, μεταβάλλει αισθητά τη μορφή του υπέρυθρου φάσματος στην εν λόγω περιοχή. Η περιοχή του φάσματος μεταξύ 3000 και 3500 cm^{-1} συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του 5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O (Σχ. 9), γίνεται πλατειά, επικαλύπτοντας τις ταινίες που αντιστοιχούν στις δονήσεις των ομάδων –NH και $-NH_2$. Η επίδραση των περισσοτέρων μορίων νερού στο υπέρυθρο φάσμα του νουκλεοτιδίου είναι εμφανής και στην περιοχή όπου εμφανίζεται η δόνηση κάμψης του νερού, ήτοι στα 1639 cm^{-1}. Η ταινία αυτή από τα 1629 cm^{-1} που είναι στην 5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O όχι μόνον αλλάζει μορφή αλλά και μετατοπίζεται κατά 10 cm^{-1} προς

μεγαλύτερες ενέργειες.

Στο Σχ.12 φαίνεται λεπτομερέστερα το FT-IR φάσμα του νουκλεοτιδίου για την περιοχή από 1800 μέχρι 500 cm^{-1}. Η έντονη ταινία που εμφανίζεται στα 1673 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης της ομάδας του καρβονυλίου νC6=O6 και είναι μετατοπισμένη κατά 26 cm^{-1}. Η ταινία στα 1629 cm^{-1} εκτός από τις δονήσεις κάμψης των μορίων νερού, συμπεριλαμβάνει και τη δόνηση κάμψης της ομάδας δ(–NH_2) του μορίου.

Η ταινία που εμφανίζεται στα 1574 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης των διπλών δεσμών νC4=C5 και C=N ενώ στην ίδια περιοχή απορροφά και η δόνηση τάσης της ομάδας νC4=N3. Η ταινία στα 1536 cm^{-1} αποδίδεται κυρίως στην δόνηση τάσης του δεσμού νC4-N9. Οι δονήσεις κάμψης δC8-H και τάσης νC8=N7 των δεσμών εμφανίζονται στα 1490 cm^{-1}. Η ταινία στα 1419 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις του δακτυλίου της πουρίνης. Οι ταινίες στα 1363 και 1233 cm^{-1} αποδίδονται στην δόνηση τάσης του διπλού δεσμού νC8=N7. Τέλος η ταινία που εμφανίζεται στα 1179 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού νC8=N7 και συμπεριλαμβάνει τη δόνηση τάσης του γλυκοζιτικού δεσμού, που συνδέει τη βάση με το δακτύλιο της ριβόζης (νN9-sugar). Όλη η περιοχή αυτή του φάσματος, που αποδίδεται στις δονήσεις του δακτυλίου της πουρίνης, έχει επηρεαστεί σημαντικά προφανώς λόγω δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ των συντεταγμένων μορίων νερού της ένωσης και του N7, O6 και των υδρογόνων των ομάδων -NH_2 και –NH.

Η ταινία στα 1130 cm^{-1} που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-O του δακτυλίου της ριβόζης δεν είναι πια διακριτή ενώ παρατηρείται διεύρυνση του φάσματος στην περιοχή που απορροφούν οι ασύμμετρες δονήσεις τάσης της φωσφορικής ομάδας νPO_3^{2-}, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μόνο δύο ταινίες στα 1116 και 1083 cm^{-1}. Στα 978, 935 και 903 cm^{-1} απορροφά επίσης η συμμετρική δόνηση τάσης της ίδιας ομάδας[3,9,48-54]. Πρέπει να τονιστεί ότι η ταινία στα 935 cm^{-1} δεν εμφανίζεται στο φάσμα της 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$. Οι μεταβολές αυτές μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία περισσοτέρων κρυσταλλικών μορίων νερού επιδρά και στη φωσφορική ομάδα.

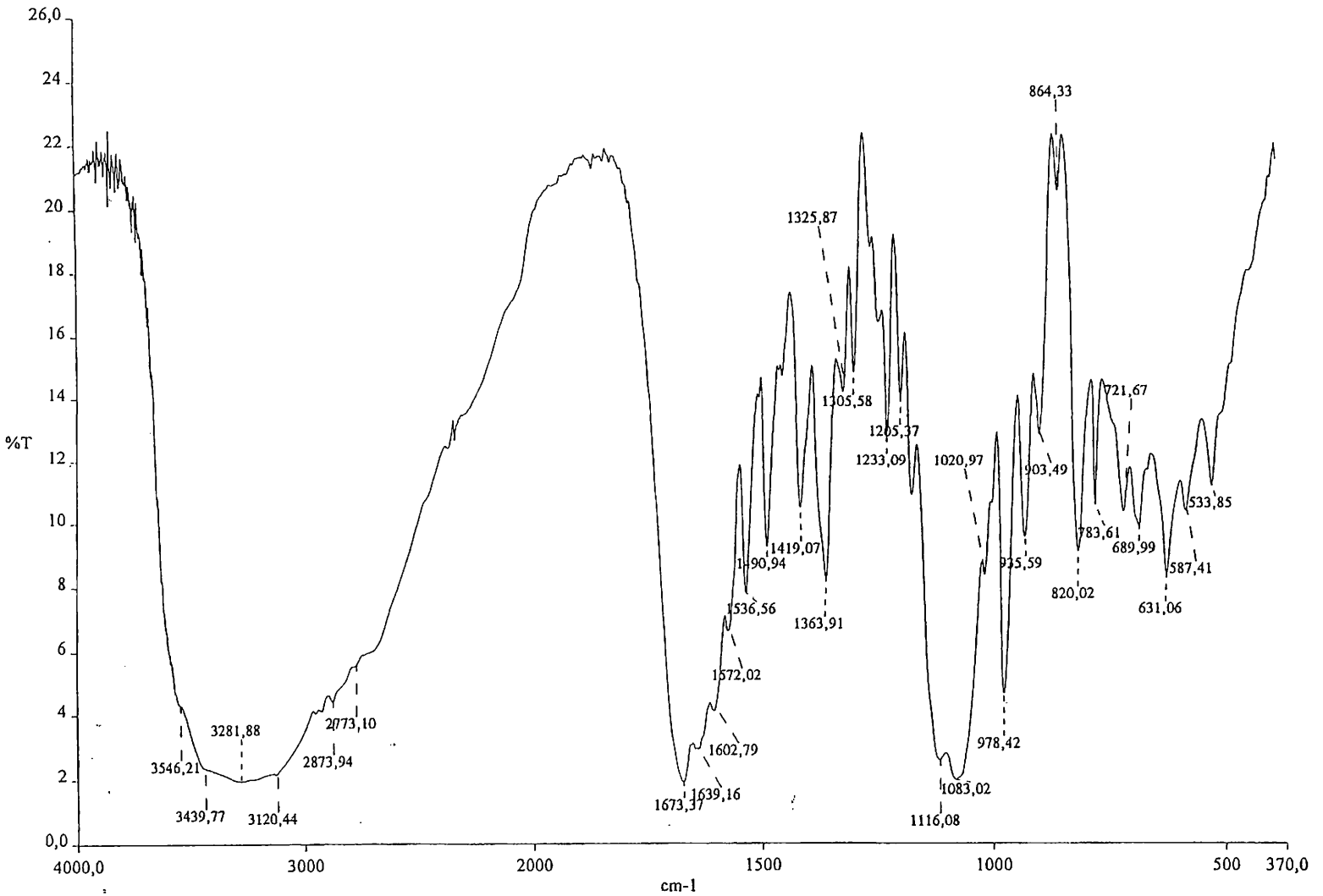
Η ταινία στα 864 cm^{-1} αποδίδεται στην ομάδα νR-O-PO_3^{2-} της ριβόζης ενώ η ταινία στα 820 cm^{-1} μαζί με την ταινία στα 783 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης της ομάδας νP-O (σάκχαρο-φωσφορική)[3,48,55,56]. Παρατηρώντας τα φάσματα

προσεκτικά πρέπει να τονιστεί ότι η ταινία στα 783 cm^{-1} δεν εμφανίζει κανένα ώμο κοντά στα 800 cm^{-1} (Σχ.12) σε αντίθεση με το φάσμα της 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$. Είναι εμφανές ότι από την παρουσία μόνο της ταινίας στα 820 cm^{-1} επικρατεί η *C2΄-endo* διαμόρφωση[55,56]. Φαίνεται δηλαδή καθαρά ότι αύξηση του αριθμού των μορίων του νερού κατά τρία στο μόριο της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης επέφερε μεταβολή της διαμόρφωσης του μορίου, ήτοι επικρατεί μόνο η *C2΄-endo* διαμόρφωση σε αντίθεση με την 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$, όπου συνυπάρχουν οι δύο διαμορφώσεις *C2΄-endo* και *C3΄-endo*. Η παρατήρηση αυτή μας επιτρέπει να πούμε ότι ακόμη και σε απλό νουκλεοτίδιο εμφανίζεται η επίδραση της ενυδάτωσης του μορίου στη διαμόρφωσή του, όπως έχει αναφερθεί και για το DNA. Στον Πίνακα 7 δίνονται οι ταινίες απορρόφησης των ενώσεων 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ και 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$. Από τις μετατοπίσεις των ταινιών φαίνονται οι θέσεις του νουκλεοτιδίου που επηρεάζονται από την αύξηση των μορίων νερού στην ένωση.

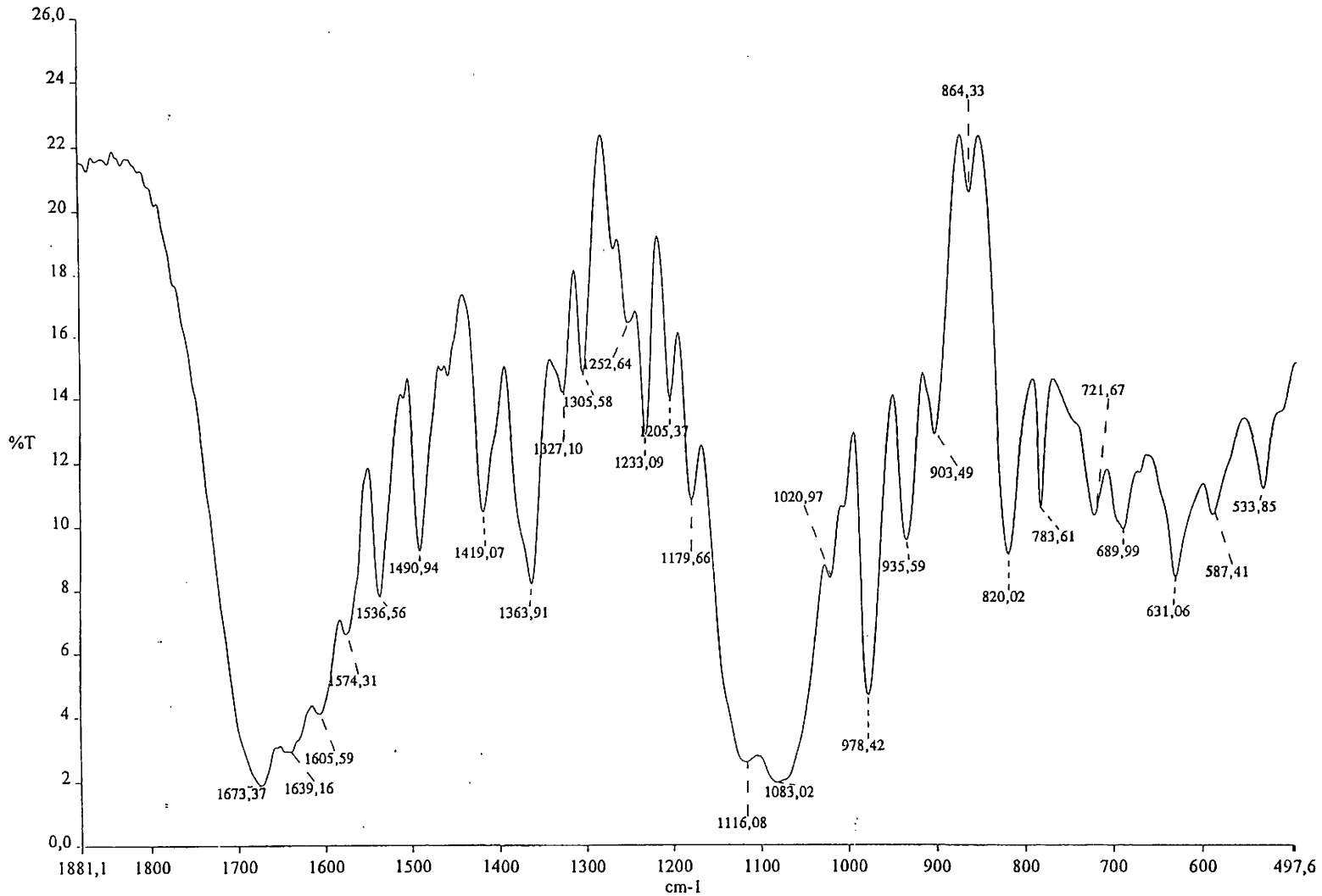
Στην περιοχή των 500 cm^{-1} παρατηρούνται οι δονήσεις κάμψης των ομάδων -NH_2 και -NH και H_2O όπου το υδρογόνο δονείται εκτός του επιπέδου του δεσμού (out-of-plane)[3,9,48-54].

Πίνακας 7. Συγκριτικά δεδομένα FT-IR φασμάτων του μετά νατρίου ένυδρου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-GMPNa$_2$·xH$_2$O) όπου x=3 ή 6 μόρια νερού[3,9,48-56]

5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O (cm^{-1})	5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O (cm^{-1})	Δν (cm^{-1})	Assignment
3546	3546		vasym. NH_2
3439	3439		vsym. NH_2
3315			νH_2O
3197			$\nu C_8{=}N_7$
2946			vasym. CH_2
2873	2873		vsym. CH_2
1699	1673	-26	$\nu C_6{=}O_6$
1629	1639	+10	δH_2O, δNH_2
1598	1605	+7	$\nu C_4\text{-}N_3 > \nu C_4{=}C_5 > \nu C_5\text{-}N_7$
1580	1574	-6	$\nu C_4\text{-}N_9 > \nu C_6{=}O > \nu C_2\text{-}N_1$
1492	1490	-2	$\delta C_8\text{-}H > \nu C_8{=}N_7$
1396	1419	+23	Purine ring vibration
1356	1363	+6	$\nu C_8\text{-}N_9, \nu C_8{=}N_7$
1322	1327	+5	Guanine + ribose
1243	1233	-10	$\nu C_8{=}N_7 > \delta C_8\text{-}H$
1174	1179	+5	$\nu C_8{=}N_7 > \nu N_9$-sugar$> \nu C_4\text{-}N_3$ ή νC΄-C΄sug
1130	1116		νC-O of the sugar ring
1103			vasymPO_3^{-2}
1080	1083	+3	vasymPO_3^{-2}
1048	1020	-28	vasymPO_3^{-2}
981	978	-3	vsym. PO_3^{-2}
901	903	+2	vsym. PO_3^{-2}
874	864	-10	$\nu R\text{-}O\text{-}PO_3^{-2}$
822 800sh	820		vsym. P-O5΄, C2΄-endo vsym. P-O5΄, C3΄-endo
782	783	+1	νP-O
687	690	+3	Guanine ring breathing mode
583	587	+3	Out of plane H_2O, $-NH_2$, -NH

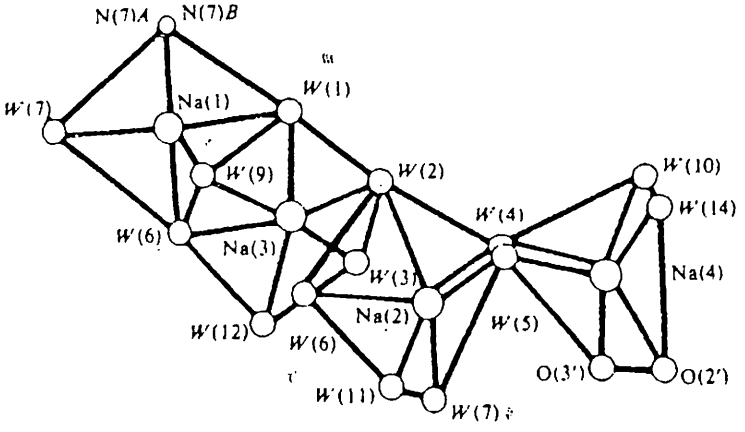


Σχ.11. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1} του μετά νατρίου εξα-ενυδατωμένου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης



Σχ.12. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 1881 έως 500 cm^{-1} του μετά νατρίου εξα-ενυδατωμένου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης

Τα παραπάνω αποτελέσματα που λάβαμε από την υπέρυθρη φασματοσκοπία έρχονται σε συμφωνία και με την κρυσταλλική δομή του μετά νατρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με 7 μόρια νερού (5΄-GMPNa$_2$·7H$_2$O)[57,58]. Όπως φαίνεται στο Σχ. 13, βάσει της δομής αυτής, ο αυξημένος αριθμός μορίων νερού στον κρύσταλλο, σχηματίζει μεγάλο αριθμό δεσμών υδρογόνου με το άτομο αζώτου στη θέση 7, με τις ομάδες -NH$_2$ και -NH καθώς επίσης και με το καρβονυλικό οξυγόνο O6 του πουρινικού δακτυλίου. Από την κρυσταλλική δομή φαίνεται επίσης ότι ένα εκ των τεσσάρων ιόντων Na$^+$, συνδέεται άμεσα με το N7 της βάσης και των δύο νουκλεοτιδίων. Τέλος φαίνεται καθαρά και στην κρυσταλλική δομή όπως δίνεται στο Σχ.13, ότι τα μόρια νερού W1, W2, W3, W4, W5, W6, W7, W8, W11, W12 που περιβάλλουν τα κατιόντα νατρίου σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα οξυγόνα της φωσφορικής ομάδας των δύο νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν την μοναδιαία κυψελίδα[57].



Σχ.13. Κρυσταλλική δομή του άλατος 5΄-GMPNa$_2$·7H$_2$O. Φαίνεται ο τρόπος σύνδεσης των ιόντων Na$^+$ με δύο μόρια 5΄-GMP.[57]

1.2. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου Mg-5΄-GMP·5H$_2$O

Στα Σχ.14 και 15 φαίνονται τα φάσματα IR των ενώσεων του μαγνησίου που παρασκευάστηκαν με αναλογίες M:L=1:1 και 2:1, αντίστοιχα, για την περιοχή από 4000 έως 400 cm^{-1}. Από την ομοιότητα των φασμάτων αυτών γίνεται προφανές ότι και για τις δύο αναλογίες παρασκευής, λαμβάνεται το ίδιο προϊόν (Πίνακας 8), Mg-5΄-GMP·5H$_2$O (αντ. 16).

Η περιοχή των φασμάτων μεταξύ των 4000 και 2700 cm^{-1} αντιστοιχεί, όπως έχει λεχθεί στις συμμετρικές και μη συμμετρικές δονήσεις τάσης (stretching) των ομάδων -OH, H_2O, $-NH_2$, -NH, -CH και $-CH_2$. Σε αντίθεση με το μετά νατρίου άλας του νουκλεοτιδίου, στο σύμπλοκο με τα ιόντα μαγνησίου δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτή την περιοχή γιατί υπερκαλύπτεται από τις δονήσεις των μορίων του νερού που φέρει το σύμπλοκο[9,49-53].

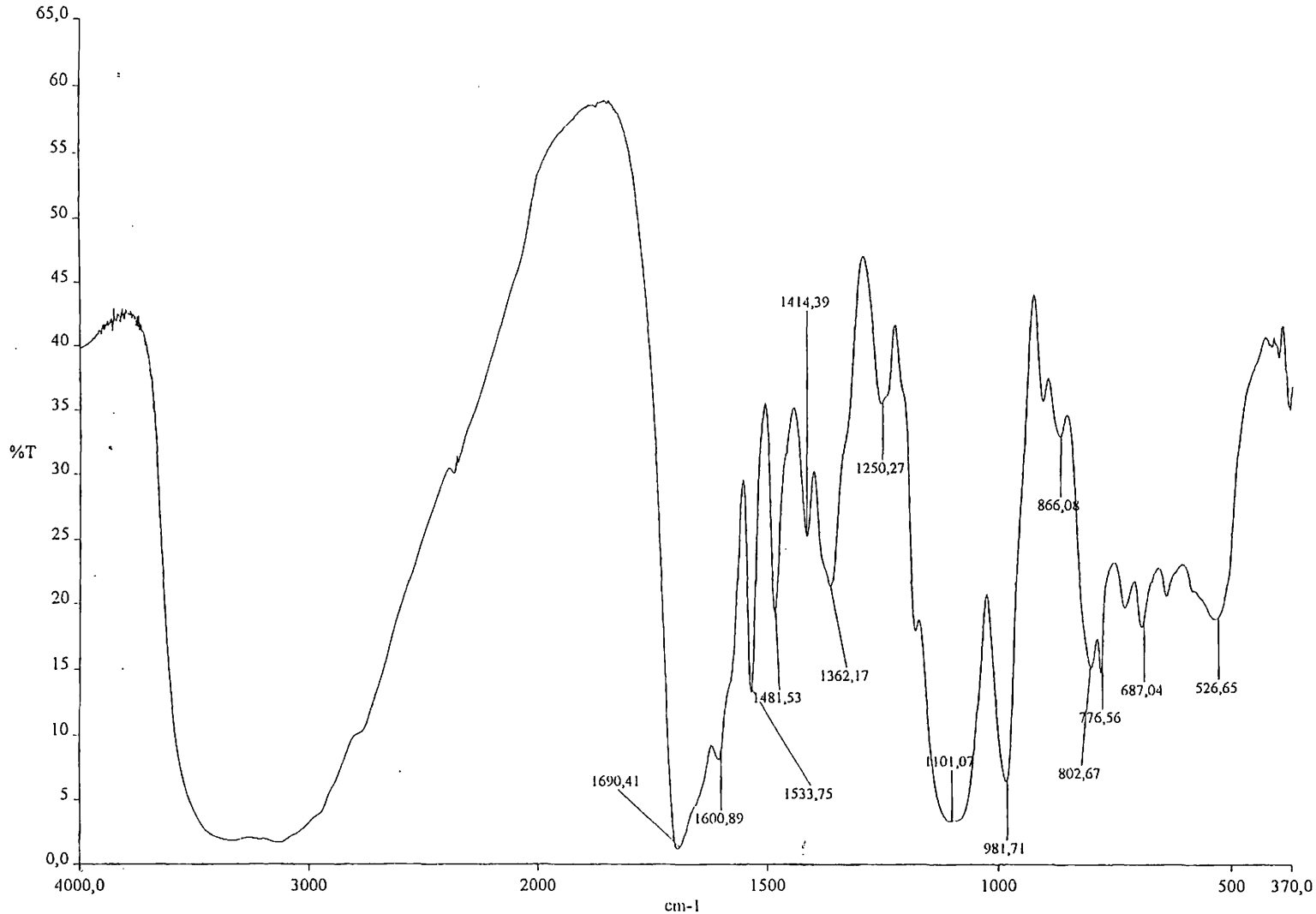
Στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ των 1800 και 600 cm^{-1} μετά την αντίδραση οι αλλαγές είναι εμφανείς. Για καλύτερη κατανόηση των φασμάτων διακρίνουμε την περιοχή από 1800 έως 1000 cm^{-1}, όπου επικρατούν οι δονήσεις των ομάδων της πουρινικής βάσης του νουκλεοτιδίου και την περιοχή 1200-600 cm^{-1} όπου απορροφούν οι ομάδες της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας[3,9,48-54].

Η ταινία στα 1690 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του καρβονυλίου (νC6=O6), παρατηρείται ότι, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του μετά νατρίου άλατος του νουκλεοτιδίου μετατοπίζεται κατά 9 cm^{-1}.

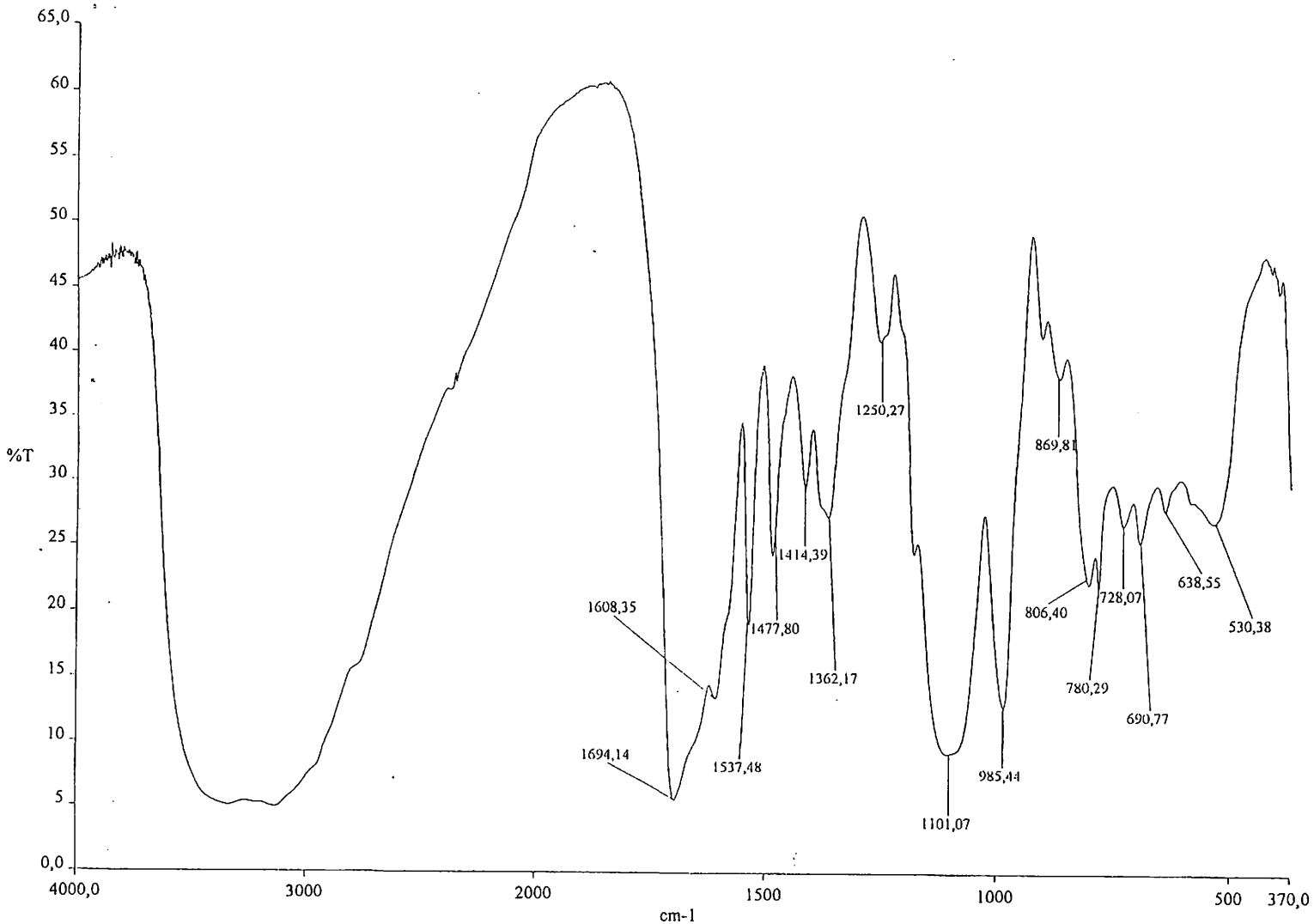
Η ταινία στα 1629 cm^{-1} που αποδόθηκε στη δόνηση κάμψης του νερού, αλλάζει μορφή και εμφανίζεται σαν ώμος στα 1638 cm^{-1}. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεταβολή των μορίων του νερού που εντάσσονται με τα ιόντα Mg^{2+}. Η ταινία απορρόφησης του δεσμού C4=C5 εμφανίζεται μετά την αντίδραση στα 1608 cm^{-1} από τα 1598 cm^{-1} στο μετά νατρίου άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης, δηλαδή μετατοπίζεται κατά 10 cm^{-1}. Η μετατόπιση αυτή έρχεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα[3,9,48-54].

Σημαντική μεταβολή παρατηρείται στην δόνηση τάσης του πενταμελούς δακτυλίου. Έτσι οι δονήσεις τάσης του δεσμού C8=N7 μαζί με τις δονήσεις κάμψης της ομάδας δC8-H, από τα 1492 cm^{-1} που ήταν αρχικά μετατοπίζονται στα 1481 cm^{-1} εμφανίζεται δηλαδή μία μετατόπιση κατά 11 cm^{-1}

Επίσης η ταινία που εμφανίζεται στα 1414 cm^{-1} και που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών νC8=N7 και δC8-H αντίστοιχα, έχει μετατοπιστεί κατά 18 κυματαριθμούς προς μεγαλύτερες συχνότητες. Η μετατόπιση αυτή σε συνδυασμό με εκείνη της ταινίας στα 1481 cm^{-1} δηλώνει σαφώς την επίδραση των ιόντων μαγνησίου στο N7 της βάσης του νουκλεοτιδίου. Από την αλλαγή της μορφής του φάσματος στην περιοχή από τα 1414 έως 1362 cm^{-1} φαίνεται ότι οι δονήσεις των ομάδων νC8=N7 και νC8-N9 καθώς και του δακτυλίου της βάσης επηρεάζονται από την παρουσία του μαγνησίου[3,9,48-54].



Σχ.14. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1} του συμπλόκου των ιόντων μαγνησίου με το μετά νατρίου ένυδρο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης στην αναλογία M:L=1:1



Σχ.15. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1} του συμπλόκου των ιόντων μαγνησίου με το μετά νατρίου ένυδρο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης στην αναλογία M:L=2:1

Πίνακας 8. Παράθεση δεδομένων FT-IR φασμάτων των μετά μαγνησίου και μετά νατρίου αλάτων της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης[3,9,48-54]

5΄-GMPNa$_2$·3H2O (cm^{-1})	Mg-5΄-GMP (cm^{-1})		Δν	Assignment
	M.L=1:1	M:L=2:1		
3546	4000-3000			vasym. NH_2
3439				vsym. NH_2
3315				$\nu C_8{=}N_7$
3197				$\nu(NH_2, NH, OH, H_2O)$
2946	3000-2700			$\nu(CH, CH_2)$
2873				
1699	1690		-9	$\nu C_6{=}O_6$
1629	1638sh		+9	δH_2O, δNH_2
1598	1608		+10	$\nu C_4\text{-}N_3 > \nu C_4\text{-}C_5 > \nu C_5\text{-}N_7$
1534sh	1534		0	$\nu C_4\text{-}N_9 > \nu C_6{=}O > \nu C_4\text{-}N_3$
1492	1481		-11	$\delta C_8\text{-}H > \nu C_8{=}N_7$
1396	1414		+18	purine ring vibration $\delta(CH)+\delta(CH_2$
1356	1362		+6	$NC_8\text{-}N_9, \nu C_8{=}N_7$
1243	1239		-4	$\nu C_8{=}N_7$
1174	1180		+6	$\nu C_8{=}N_7$, νN_9-sugar
1130	1101			νC-O of the sugar ring
1103				νPO_3^{-2}deg
1048				νPO_3^{-2}
981	981		0	vsym. PO_3^{-2}
901	-			vsym. PO_3^{-2}
874	866		-8	$\nu R\text{-}O\text{-}PO_3^{-2}$
822	800		-22	νP-O ribose-phosphate
782	780		-2	νP-O
687	687		0	Ribose
583				Out of plane H_2O, $-NH_2$, -NH

Στον Πίνακα 8, δίνονται οι ταινίες υπερύθρου του συμπλόκου Mg-5΄-GMP·5H_2O, όπως προέκυψε από την αντίδραση των κατιόντων μαγνησίου με το μετά νατρίου ένυδρο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης, στις αναλογίες M:L=1:1 και 2:1, καθώς και οι πιθανές ομάδες στις οποίες οι ταινίες αυτές αποδίδονται. Είναι φανερό από τις παρατηρούμενες μετατοπίσεις ότι τα ιόντα Mg^{2+} πρέπει να συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με τη θέση N7 του νουκλεοτιδίου.

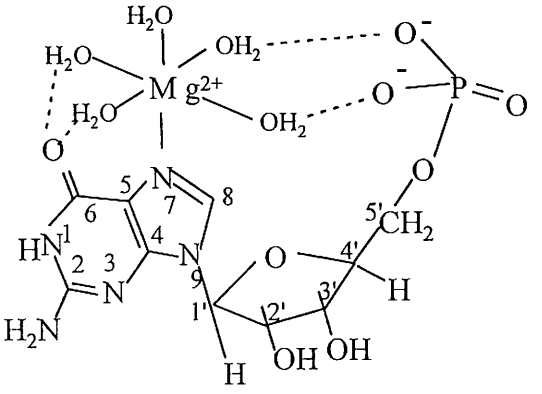
Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του 5΄-GMPNa$_2$ η περιοχή του

φάσματος μεταξύ 1200 και 600 cm^{-1} παρουσιάζει ενδιαφέρον αφού στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι δονήσεις της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου[3,9,48-54]. Παρατηρήθηκε ότι μετά την αντίδραση οι ταινίες του νουκλεοτιδίου στα 1130, 1103 και 1048 cm^{-1} εκφυλίζονται σε μία πλατειά κορυφή δηλώνοντας έτσι την έντονη επίδραση της παρουσίας του μεταλλικού ιόντος στην περιοχή όπου απορροφά η φωσφορική ομάδα και η ριβόζη. Οι δύο επόμενες ταινίες, στα 981 και 901 cm^{-1}, που αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις τάσης της φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου, παρουσιάζουν μεταβολές μετά την αντίδραση. Έτσι μετά την αντίδραση η ταινία στα 981 cm^{-1} του νουκλεοτιδίου μειώνεται σε ένταση, η δε ταινία στα 901 cm^{-1} σχεδόν εξαφανίζεται.

Η ταινία στα 820 cm^{-1} που παρατηρείται στο φάσμα της 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ εξαφανίζεται μετά την αντίδραση με τα ιόντα μαγνησίου, ενώ εμφανίζεται μία νέα ταινία στα 800 cm^{-1}. Όπως αναφέρθηκε, η ταινία αυτή αποτελεί χαρακτηριστική ένδειξη για την διαμόρφωση του σακχάρου[48,55,56]. Έτσι πρέπει να δεχθούμε ότι στην ένωση Mg-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$ επικρατεί η διαμόρφωση *C3΄-endo,anti*.

Αν συγκρίνουμε τα φάσματα των τριών ενώσεων 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$, 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$ και Mg-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$ φαίνεται ότι στη διαμόρφωση του νουκλεοτιδίου δεν παίζει ρόλο μόνο ο αριθμός των μορίων νερού, αλλά και ο τρόπος σύνδεσής τους με το νουκλεοτίδιο. Θα περίμενε κανείς ότι το σύμπλοκο Mg-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$, λόγω του αυξημένου αριθμού μορίων νερού που περιέχει, πρέπει να έχει διαμόρφωση *C2΄-endo*, όπως γίνεται κατά τη μετάβαση του 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ σε 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$. Όμως επικρατεί η διαμόρφωση *C3΄-endo*. Για να ερμηνευτεί το αποτέλεσμα αυτό θα πρέπει να δεχτεί κανείς ότι τα ιόντα μαγνησίου συνδέονται με διαφορετικό τρόπο στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Η προτεινόμενη δομή φαίνεται στο Σχ. 16.

Σύμφωνα με τη δομή αυτή το ιόν Mg^{2+} συνδέεται άμεσα με το N7 του πουρινικού δακτυλίου και έμμεσα με τα οξυγόνα της φωσφορικής ομάδας και του καρβονυλίου του νουκλεοτιδίου.



Σχ.16. Προτεινόμενη δομή του συμπλόκου των ιόντων μαγνησίου με τη 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη Mg(5΄-GMP)·5H₂O[22]

1.3. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου Ba-5΄-GMP·5H₂O

Στο Σχ. 17 δίνεται το IR φάσμα της ένωσης του βαρίου (αναλογία M:L=1:1) για την περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1}. Η περιοχή του φάσματος μεταξύ των 4000 και 2700 cm^{-1} αντιστοιχεί, όπως έχει λεχθεί στις συμμετρικές και μη συμμετρικές δονήσεις τάσης (stretching) των ομάδων -OH, H_2O, $-NH_2$, -NH, -CH και $-CH_2$ των ενώσεων[9,49-53]. Στην περιοχή αυτή φαίνονται οι ταινίες στα 2883 και 2946 cm^{-1} που αντιστοιχούν στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας $-CH_2$, αντίστοιχα. Επίσης διακρίνονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων -NH και $-NH_2$ στα 3121 και 3218 cm^{-1}. Η ταινία στα 3337 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης του νερού σε συνδυασμό με εκείνες της ομάδας $-NH_2$. Σε σύγκριση με το φάσμα του συμπλόκου του μαγνησίου με το νουκλεοτίδιο μπορούμε να πούμε ότι τα φάσματα διαφέρουν στην περιοχή αυτή, ενώ πλησιάζει περισσότερο με το φάσμα του 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$.

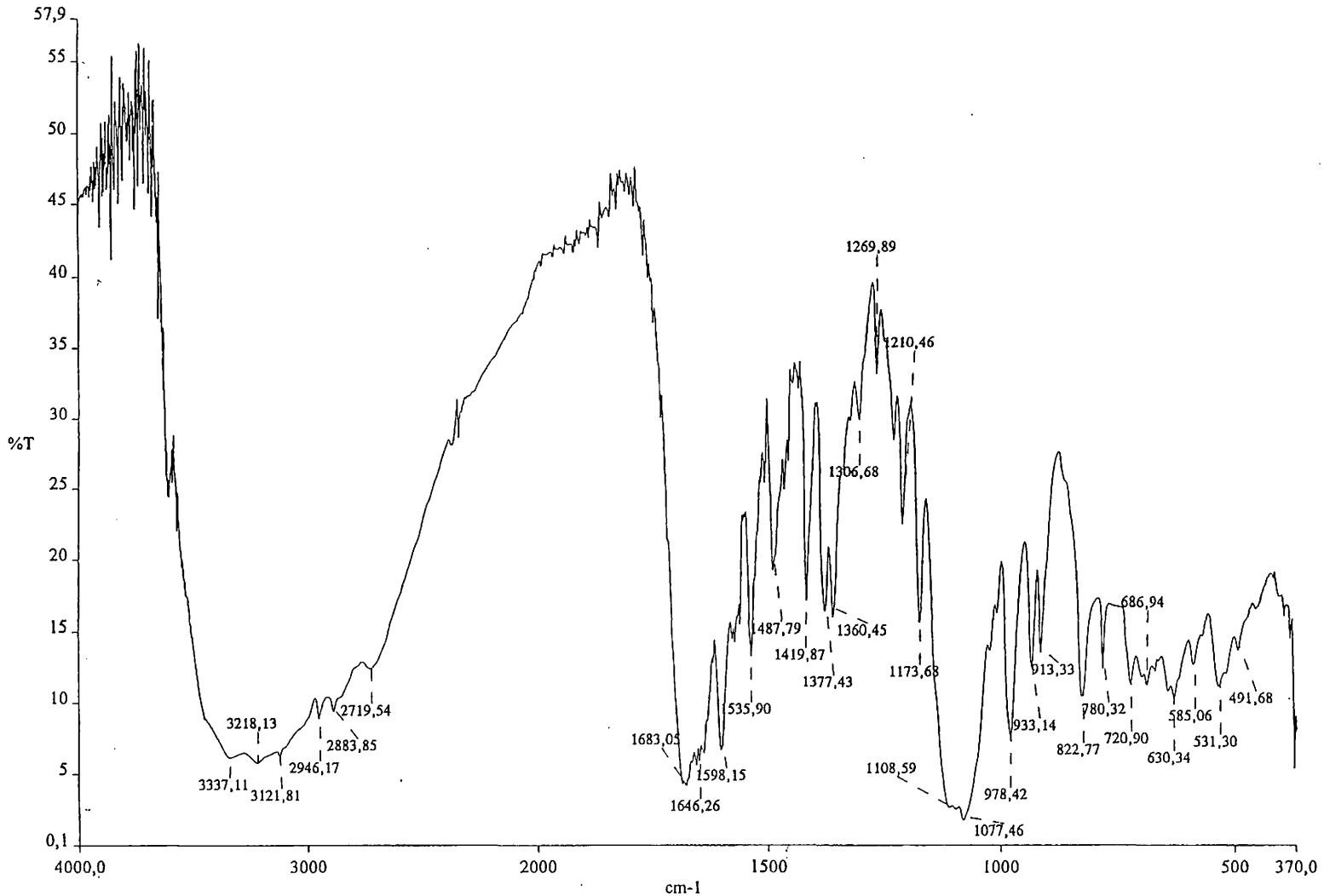
Στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ των 1800 και 600 cm^{-1} οι παρατηρούμενες αλλαγές μετά την αντίδραση είναι περισσότερο αισθητές. Η ταινία στα 1683 cm^{-1}, που όπως αναφέρθηκε αποδίδεται στην δόνηση τάσης του καρβονυλίου (νC6=O6) φαίνεται ότι συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του μετά νατρίου εξα-ενυδατωμένου άλατος της γουανοζίνης μετατοπίζεται κατά 10 cm^{-1}. Η

μεταβολή αυτή πάντως είναι μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη από το τρις-ενυδατωμένο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (16 cm^{-1}). Ο ώμος στα 1638 cm^{-1} ο οποίος αποδίδεται στα κρυσταλλικά μόρια νερού που υπάρχουν στο μόριο παρουσιάζει σαφή ομοιότητα με την αντίστοιχη περιοχή στο φάσμα του 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$[3,9,48-54]. Η ταινία απορρόφησης του δεσμού C4=C5 εμφανίζεται μετά την αντίδραση στα 1601 cm^{-1}, και εμφανίζει μικρή μόνο μετατόπιση (4 cm^{-1}) ως προς το μετά νατρίου άλας του νουκλεοτιδίου. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η ταινία αυτή μπορεί να μετατοπιστεί μέχρι και 10 cm^{-1}. Η ταινία στα 1536 cm^{-1} που αποδίδεται στην δόνηση τάσης του δεσμού νC4-N9 δεν επηρεάζεται από την αντίδραση[3,9,48-54].

Όμοια η ταινία στα 1490 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C8=N7 μαζί με τις δονήσεις κάμψης της ομάδας δC8-H, δεν μεταβάλλεται. Η ταινία που εμφανίζεται στα 1419 cm^{-1} και που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών νC8=N7 και δC8-H αντίστοιχα, επίσης παραμένει αμετάβλητη γεγονός που φανερώνει ότι τόσο στο σύμπλοκο της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με τα ιόντα βαρίου όσο και στο εξα-ενυδατωμένο άλας με τα ιόντα νατρίου, τα μεταλλικά ιόντα θα πρέπει να αλληλεπιδρούν με παρεμφερή τρόπο με το συγκεκριμένο τμήμα του νουκλεοτιδίου. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τις προταθείσες κρυσταλλικές δομές[57,58,59], σύμφωνα με τις οποίες και τα δύο μεταλλικά ιόντα φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το άτομο N7 του δακτυλίου της βάσης με όμοιο τρόπο. Πράγματι, όπως και στην ένωση 5΄-$GMPNa_2 \cdot 7H_2O$, (Σχ.13), έτσι και στον κρύσταλλο των κατιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη, το ένα από τα δύο κατιόντα βαρίου της δομής, δείχνει να αλληλεπιδρά με τα άτομα N7 των δύο υποκαταστατών-νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν την μοναδιαία κυψελίδα[59]. Αυτό είναι εμφανές και από το Σχ. 18 όπου δίνεται ο τρόπος ένταξης των δύο ιόντων βαρίου και των δύο υποκαταστατών στον κρύσταλλο.

Οι ταινίες στα 1362 και 1233 cm^{-1} που αποδίδονται κυρίως στην δόνηση τάσης του δεσμού C8=N7 έχουν μετατοπιστεί στην ένωση του βαρίου ως προς το τρις-ενυδατωμένο μετά νατρίου άλας του νουκλεοτιδίου ενώ παραμένουν αμετάβλητες σε σχέση με το εξα-ενυδατωμένο μετά νατρίου άλας αυτού[3,9,48-54].

Από την ομοιότητα της μορφής του φάσματος στην περιοχή από τα 1419 έως τα 1360 cm^{-1} φαίνεται ότι οι δονήσεις των ομάδων νC8=N7, νC8-N9 καθώς και του



Σχ.17. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1} του συμπλόκου των ιόντων βαρίου με το μετά νατρίου ένυδρο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης στην αναλογία M:L=1:1

δακτυλίου της βάσης επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο από την παρουσία των ιόντων Ba^{2+} και Na^{+} στο άλας όμως που φέρει 6 και όχι 3 μόρια νερού.

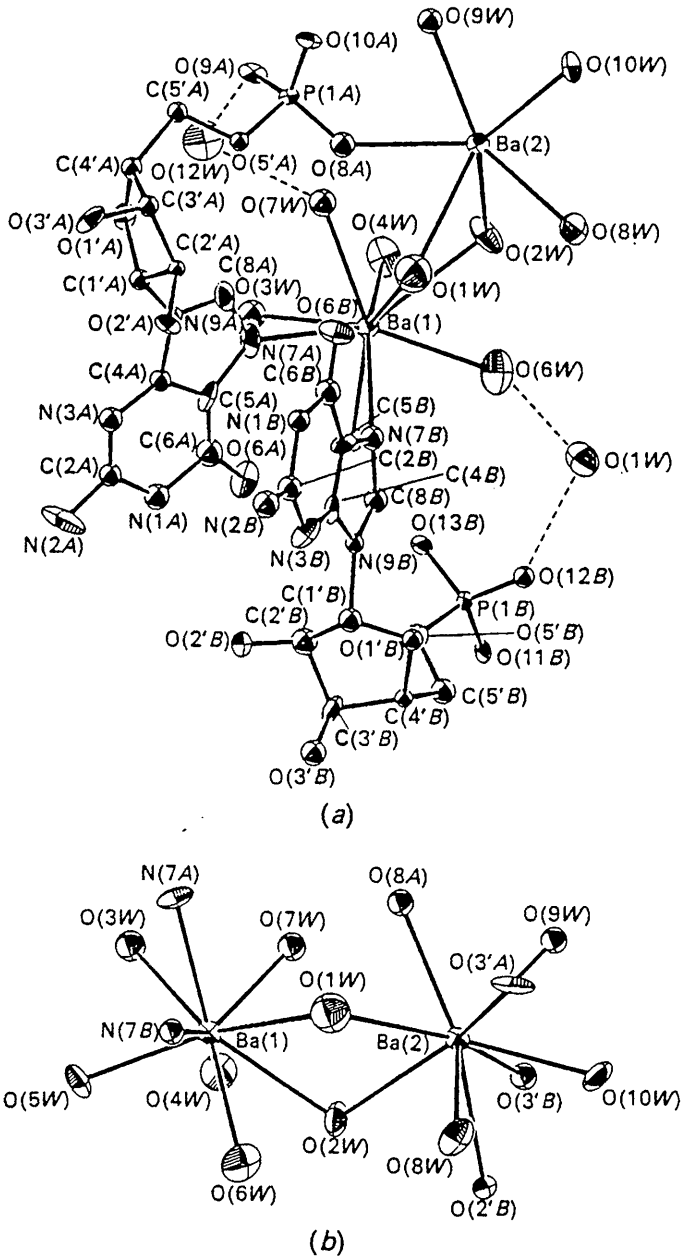
Στον Πίνακα 9 που ακολουθεί δίνονται οι χαρακτηριστικές ταινίες δόνησης του άλατος του ιόντος βαρίου και του μετά νατρίου εξα-ενυδατωμένου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης, καθώς και οι πιθανές ομάδες στις οποίες οι ταινίες αυτές αποδίδονται. Όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση της 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$, η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1200 και 600 cm^{-1} παρουσιάζει ενδιαφέρον αφού στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι δονήσεις της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου[3,9,48-54].

Παρατηρήθηκε ότι μετά την αντίδραση οι ταινίες του 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ στα 1131, 1104 και 1047 cm^{-1} (Σχ.10) εκφυλίζονται σε μία πλατειά κορυφή στα 1108 cm^{-1} (Σχ.17) όπως συμβαίνει και με την ένωση 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$ (Σχ.12). Οι δύο επόμενες ταινίες στα 981 και 900 cm^{-1}, που για την ένωση 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις τάσης της φωσφορικής ομάδας, παρουσιάζουν και αυτές μετά την αντίδραση μεταβολές. Από αυτές, η ταινία στα 981 cm^{-1} μειώνεται σε ένταση ενώ η ταινία στα 900 cm^{-1} φαίνεται να σχάται σε δύο νέες ταινίες στα 934 και 914 cm^{-1}. Η διαφοροποίηση της εικόνας του φάσματος στην περιοχή όπου απορροφά η φωσφορική ομάδα φαίνεται να συμβαδίζει και με τα δεδομένα της κρυσταλλικής δομής σύμφωνα με τα οποία το κατιόν υπ'αριθμόν 2 του βαρίου φαίνεται να αλληλεπιδρά άμεσα με την φωσφορική ομάδα του ενός υποκαταστάτη. Αντίθετα στην κρυσταλλική δομή της ένωσης 5΄-$GMPNa_2 \cdot 7H_2O$ τα κατιόντα νατρίου αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες μόνο μέσω των μορίων ύδατος που τα περιβάλλουν.

Η ταινία του φάσματος της 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$ στα 820 cm^{-1} στην περίπτωση του βαρίου διατηρείται αμετάβλητη. Φαίνεται δηλαδή ότι στην περίπτωση της ένωσης Ba-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$ επικρατεί η *C2΄-endo,anti* διαμόρφωση[3,48,55,56].

Από την ανάλυση επομένως, του FT-IR φάσματος της ένωσης του βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη παρατηρήθηκαν τα εξής:

Από τις μετατοπίσεις των ταινιών της ένωσης του βαρίου σε σχέση με τις αντίστοιχες του μετά νατρίου άλατος του νουκλεοτιδίου, οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης του πουρινικού δακτυλίου, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το κατιόν του βαρίου, μετά την αντίδραση επηρεάζει το άζωτο N7 της πουρίνης.



Σχ.18. (a)Μοριακή διαμόρφωση και αρίθμηση ατόμων στην ένωση Ba-5'-GMP. (b)Τρόπος ένταξης των δύο ιόντων βαρίου στην ένωση[59]

Πίνακας 9. Παράθεση των ταινιών FT-IR φασμάτων των μετά νατρίου και μετά βαρίου αλάτων της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης [3,9,49-54]

5′-GMPNa$_2$·6H$_2$O (cm^{-1})	Ba-5′-GMP (cm^{-1})	Δν	Assignment
3546			vasym NH_2
3439			vsym. NH_2
	3337 3218		ν(NH_2, NH, OH, H_2O) νC_5-N_7
	2946	0	ν(CH, CH_2)
2873	2883	+10	ν(CH, CH_2)
1673	1683	+10	νC_6=O_6
1639	1638sh	0	δH_2O, δNH_2
1605	1601	-4	νC_4-N_3>νC_4-C_5>νC_5-N_7
1536	1536	0	νC_4-N_9>νC_6=O>νC_4-N_3
1490	1490	0	δC_8-H>νC_8=N_7
1419	1419	0	purine ring vibration
1363	1362	-1	νC_8-N_9, νC_8=N_7
1233	1233	0	νC_8=N_7
1179	1174	-5	νN_9-sugar
1116	1108		νC-O of the sugar ring νPO_3^{-2}deg
1083	1083	0	νPO_3^{-2}
978	978	0	νsym. PO_3^{-2}
903	933 913	+30 +10	νsym. PO_3^{-2}
864	-		νR-O-PO_3^{-2}
820	823	+3	νP-O ribose-phosphate
783	781	-2	νP-O
690	688	-2	Ribose
587	585	-2	Out of plane H_2O, -NH_2, -NH

Αυτή η άποψη μπορεί να γίνει δεκτή λόγω του ότι, όπως έχει προαναφερθεί, το συγκεκριμένο ιόν είναι σκληρό οξύ κατά Lewis, ενώ το N7 αποτελεί δότη ζεύγους ηλεκτρονίων, μαλακή βάση κατά Lewis. Επίσης οι μετατοπίσεις που παρατηρούνται στην περιοχή των ταινιών των φασμάτων, που αποδίδονται στην φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου, δηλώνουν την εξουδετέρωση των θετικών ιόντων του βαρίου από τα αρνητικά φορτισμένα άτομα του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας, όπως προκύπτει και από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

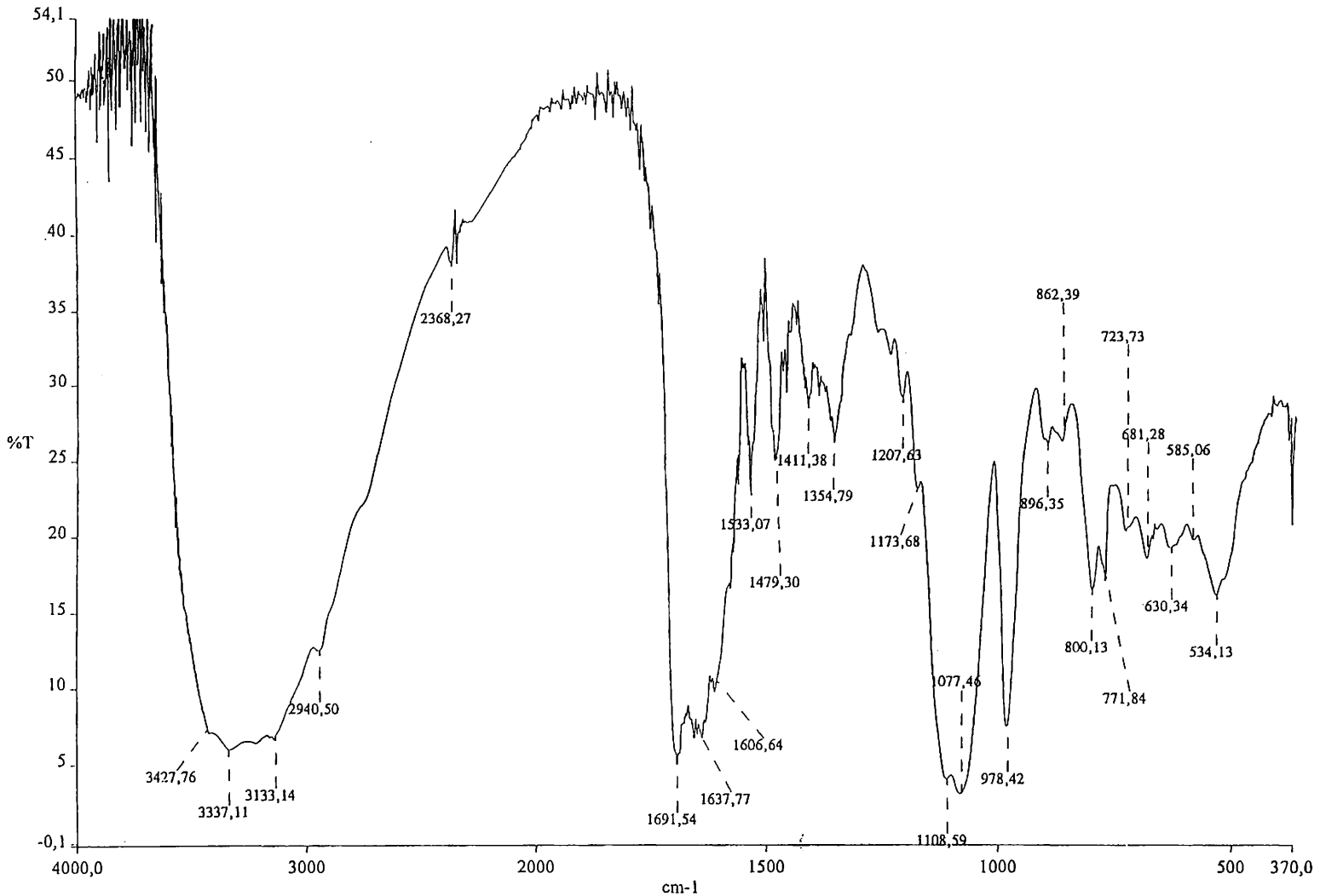
1.4. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου Cd-5΄-GMP·5H_2O

Στο Σχ. 19 δίνεται το IR φάσμα της ένωσης του καδμίου (αναλογία M:L=1:1) για την περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1}. Η περιοχή του φάσματος μεταξύ των 4000 και 2700 cm^{-1} αντιστοιχεί, όπως έχει λεχθεί στις συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης (stretching) των ομάδων -OH, H_2O, -NH_2, -NH, -CH και -CH_2 του νουκλεοτιδίου[9,49-53]. Συγκρίνοντας την περιοχή αυτή του φάσματος με την αντίστοιχη της ένωσης 5΄-GMPNa_2·3H_2O παρατηρούμε ότι οι ταινίες των δονήσεων των μορίων ένταξης του νερού των ιόντων Cd^{2+} στη σχηματιζόμενη ένωση Cd-5΄-GMP (3427 cm^{-1}) παραμένουν διακριτές έχοντας όμως μετατοπιστεί. Οι δονήσεις τάσης (συμ. και αντισυμ.) των ομάδων CH_2 είναι λιγότερο εμφανείς από ότι στην περίπτωση των ιόντων βαρίου.

Στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ των 1800 και 600 cm^{-1} οι παρατηρούμενες αλλαγές μετά την αντίδραση είναι περισσότερο εμφανείς και μπορούν να οδηγήσουν σε περισσότερο ασφαλή συμπεράσματα. Για καλύτερη κατανόηση του φάσματος διακρίνουμε την περιοχή από 1800 έως 1000 cm^{-1}, όπου επικρατούν οι δονήσεις των ομάδων της πουρινικής βάσης του νουκλεοτιδίου και την περιοχή 1200-600 cm^{-1} όπου απορροφούν οι ομάδες της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας.

Η ταινία λοιπόν στα 1691 cm^{-1}, αποδίδεται στην δόνηση τάσης του καρβονυλίου (νC6=O6). Παρατηρείται ότι η ταινία αυτή, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του μετά νατρίου άλατος της γουανοζίνης μετατοπίζεται κατά 8 cm^{-1}.

Η ταινία στα 1638 cm^{-1} που αποδίδεται στα κρυσταλλικά νερά της ένωσης εμφανίζεται σαφώς διευρυμένη σε σχέση με το μετά νατρίου άλας. Η ταινία απορρόφησης του δεσμού C4=C5 εμφανίζεται μετά την αντίδραση στα 1606 cm^{-1} από τα 1598 cm^{-1} που ήταν στο μετά νατρίου άλας του νουκλεοτιδίου. Η μετατόπιση αυτή των 8 κυματαριθμών έρχεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αναφέρεται μία μετατόπιση της τάξεως των 10 cm^{-1}. Η ταινία στα 1533 cm^{-1} που αποδίδεται στην δόνηση τάσης του δεσμού νC4-N9 εμφανίζεται μετατοπισμένη κατά 7 cm^{-1} μετά την αντίδραση.



Σχ.19. FT-IR φάσμα στην περιοχή από 4000 έως 370 cm^{-1} του συμπλόκου των ιόντων καδμίου με το μετά νατρίου ένυδρο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης στην αναλογία M:L=1:1

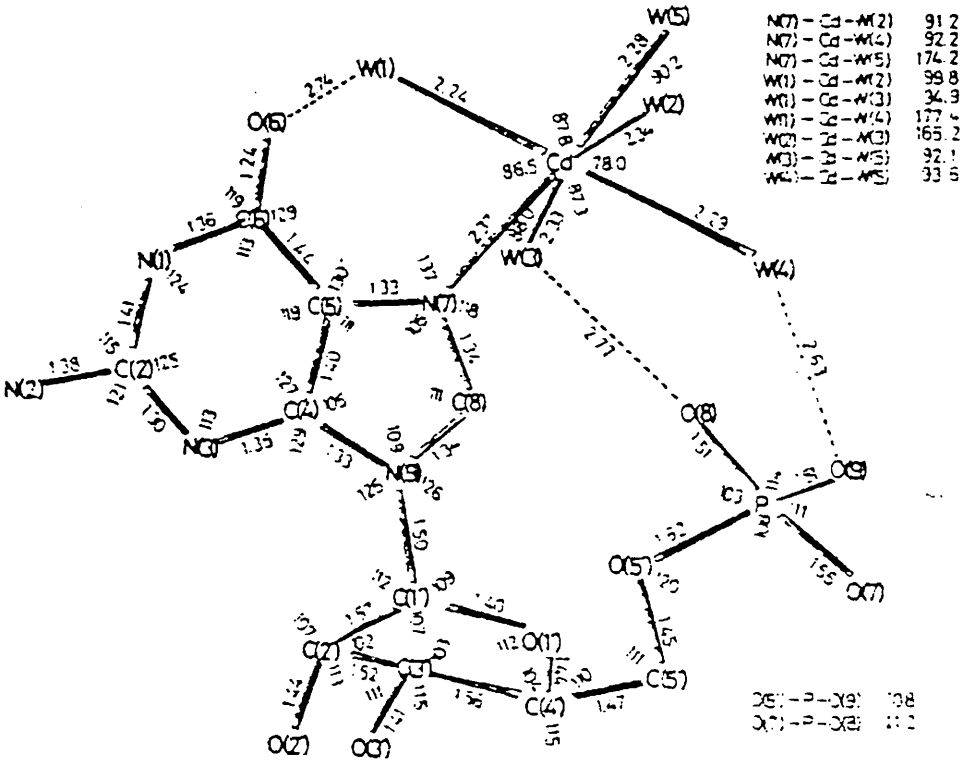
Όμοια η ταινία στα 1482 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C8=N7 μαζί με τις δονήσεις κάμψης της ομάδας δC8-H, εμφανίζεται μετατοπισμένη κατά 10 cm^{-1}. Επίσης, η ταινία που εμφανίζεται στα 1412 cm^{-1} και που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών νC8=N7 και δC8-H αντίστοιχα, έχει μετατοπιστεί κατά 16 κυματαριθμούς περίπου προς μεγαλύτερες συχνότητες. Η μετατόπιση αυτή σε συνδυασμό με εκείνη της ταινίας στα 1482 cm^{-1} δηλώνει σαφώς την επίδραση των ιόντων καδμίου στο N7 της βάσης του νουκλεοτιδίου, γεγονός που άλλωστε έρχεται σε πλήρη συμφωνία και με την υπάρχουσα κρυσταλλική δομή[62] της ένωσης Cd-5΄-GMP·$5H_2O$. Η εν λόγω δομή δείχνει ότι το κατιόν του καδμίου σχηματίζει άμεσο δεσμό με το N7 του πουρινικού δακτυλίου και εντός του επιπέδου όπως φαίνεται στο Σχ. 20. Οι ταινίες στα 1355 και 1234 cm^{-1} στην ένωση του καδμίου που αποδίδονται κυρίως στην δόνηση τάσης του δεσμού C8=N7 έχουν μεταβληθεί ως προς το μετά νατρίου άλας του νουκλεοτιδίου.

Από την αλλαγή της μορφής του φάσματος στην περιοχή από τα 1412 έως τα 1234 cm^{-1} φαίνεται ότι οι δονήσεις των ομάδων νC8=N7, νC8-N9 καθώς και του δακτυλίου της βάσης επηρεάζονται από την παρουσία του Cd^{2+} προς επιβεβαίωση του δεσμού Cd^{2+}-N7 που σχηματίζεται.

Στον Πίνακα 10 που ακολουθεί δίνονται οι χαρακτηριστικές ταινίες δόνησης του συμπλόκου του καδμίου συγκριτικά με το μετά νατρίου ένυδρο άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης, καθώς και οι πιθανές ομάδες στις οποίες οι ταινίες αυτές αποδίδονται[3,9,48-56,60,61].

Παρατηρήθηκε ότι μετά την αντίδραση με τα ιόντα Cd^{2+}, οι ταινίες του 5΄-$GMPNa_2$ στα 1130, 1103 cm^{-1}, που αποδόθηκαν στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης της φωσφορικής ομάδας εκφυλίζονται σε μία πλατειά κορυφή στα 1112 cm^{-1} ενώ η ταινία στα 1080 cm^{-1} δεν υφίσταται μεταβολή. Οι δύο επόμενες ταινίες στα 981 και 901 cm^{-1} που αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις τάσης της φωσφορικής ομάδας παρουσιάζουν και αυτές, μετά την αντίδραση, μεταβολές. Έτσι στην περίπτωση αυτή ενώ η ταινία που εμφανίζεται πριν την αντίδραση στα 981 cm^{-1} μειώνεται σε ένταση αλλά παραμένει, η ταινία στα 901 cm^{-1}, αντίθετα, όχι μόνο μειώνεται σε ένταση, αλλά διευρύνεται και μετατοπίζεται κατά 4 cm^{-1}.

Η ταινία του φάσματος της 5΄-$GMPNa_2$ στα 822 cm^{-1} στην περίπτωση του καδμίου μετατοπίζεται στα 800 cm^{-1} δηλώνοντας ότι η διαμόρφωση του σακχάρου στην περίπτωση του καδμίου μετατρέπεται σε *C3΄-endo,anti* όπως ακριβώς



Σχ.20. (a)Μοριακή διαμόρφωση και αρίθμηση ατόμων στην ένωση Cd-5΄-GMP·5H₂O. (b)Με διακεκομμένες γραμμές σημειώνονται οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου[62].

παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του μαγνησίου.

Από την ανάλυση του FT-IR φάσματος της ένωσης του καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη παρατηρήθηκε ότι το κατιόν του καδμίου, μετά την αντίδραση επηρεάζει έντονα το άζωτο N7 της πουρίνης. Αυτή η άποψη μπορεί να γίνει δεκτή επειδή, όπως έχει προαναφερθεί, το συγκεκριμένο ιόν είναι μαλακό οξύ κατά Lewis, ενώ το N7 αποτελεί δότη ζεύγους ηλεκτρονίων, δηλαδή μαλακή βάση κατά Lewis. Επίσης οι μετατοπίσεις που παρατηρούνται στην περιοχή των ταινιών των φασμάτων, που αποδίδονται στην φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου, δηλώνουν την εξουδετέρωση των αρνητικά φορτισμένα ατόμων του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας από τα θετικά φορτία των ιόντων καδμίου.

Πίνακας 10. Παράθεση δεδομένων FT-IR φασμάτων της μετά νατρίου και μετά καδμίου ένωσης της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης[3,9,48-56,60,61]

5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O (cm^{-1})	Cd-5΄-GMP (cm^{-1})	Δν	Assignment
3546			νNH$_2$ asym.
3439	3428	-11	νNH$_2$ sym.
3315 3197	3337 3218	-22 +21	ν(NH$_2$, NH, OH, H$_2$O) νC$_5$-N$_7$
2946 2873	2940 -	-6 -	ν(CH, CH$_2$)
1699	1691	-8	νC$_6$=O$_6$
1629	1638	+9	δH$_2$O, δNH$_2$
1598	1606	+8	νC$_4$-N$_3$>νC$_4$-C$_5$>νC$_5$-N$_7$
1540	1533	-7	νC$_4$-N$_9$>νC$_6$=O>νC$_4$-N$_3$
1492	1482	-10	δC$_8$-H>νC$_8$=N$_7$
1396	1412	+16	purine ring vibration
1356	1355	-1	νC$_8$-N$_9$, νC$_8$=N$_7$
1243	1234	-9	νC$_8$=N$_7$
1174	1174	0	νC$_8$=N$_7$, νN$_9$-sugar
1130	1112		νC-O of the sugar ring
1103			vasymPO$_3^{-2}$
1080	1080	0	vasymPO$_3^{-2}$
1048	-		vasymPO$_3^{-2}$
981	982	+1	vsym. PO$_3^{-2}$
901	897	-4	vsym. PO$_3^{-2}$
874	874	0	νR-O-PO$_3^{-2}$
822 800sh	 800	-19	vsym. P-O5΄, C2΄-endo vsym. P-O5΄, C3΄-endo
782	772	-10	νP-O
687	683	-4	Ribose
583	585	+2	Out of plane H$_2$O, -NH$_2$, -NH

Στον Πίνακα 11 δίδονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των FT-IR φασμάτων και των τεσσάρων ενώσεων, του νατρίου, μαγνησίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Από τον Πίνακα 11 φαίνεται καθαρά η επίδραση του αριθμού των μορίων νερού καθώς και του τρόπου που κρυσταλλώνονται με το νουκλεοτίδιο.

Πίνακας 11. Παράθεση των ταινιών και των χαρακτηριστικών ομάδων απορρόφησης (FT-IR) των ενώσεων των κατιόντων νατρίου, μαγνησίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη[3,9,48-56,60,61]

5΄-GMPNa$_2$ (3H$_2$O)	5΄-GMPNa$_2$ (6H$_2$O)	Ba-5΄-GMP (5H$_2$O)	Mg-5΄-GMP (5H$_2$O)	Cd-5΄-GMP (5H$_2$O)	Assignment
3546	3546	-		-	vasym. NH$_2$
3439	3439	-		3428	vsym. NH$_2$
3313		3337	4000-3000	3337	v(NH$_2$, NH, OH, H$_2$O)
3197		3218		3218	vC$_5$-N$_7$
2946		2946	3000-2700	2940	v(CH, CH$_2$)
2873	2873	2883		-	
1699	1673	1683	1690	1691	vC$_6$=O$_6$
1629	1639	1638sh	1638sh	1638	δH$_2$O, δNH$_2$
1598	1605	1601	1608	1606	vC$_4$-N$_3$>vC$_4$-C$_5$>vC$_5$-N$_7$
1580	1574	1574	-	1580	vC$_4$-N$_9$>vC$_6$=O>vC$_4$-N$_1$
1534	1536	1536	1534	1533	vC$_4$-N$_9$>vC$_6$=O>vC$_4$-N$_3$
1492	1490	1490	1481	1482	δC$_8$-H>vC$_8$=N$_7$
1396	1419	1419	1414	1412	purine ring vibration
1356	1363	1362	1362	1355	vC$_8$-N$_9$, vC$_8$=N$_7$
1243	1233	1233	1239	1234	vC$_8$=N$_7$
1174	1179	1174	1180	1174	vC$_8$=N$_7$, vN$_9$-sugar
1130	1116				vC-O of the sugar ring
1103		1108	1101	1112	vasym. PO$_3^{-2}$deg
1048	1020				vasym. PO$_3^{-2}$
981	978	978	981	982	vsym. PO$_3^{-2}$
901	903	933	-	897	vsym. PO$_3^{-2}$
		913	-		
874	864	-	866	874	vR-O-PO$_3^{-2}$
822	820	823			vsym. P-O5΄, C2΄-endo
800sh			802	800	vsym. P-O5΄, C3΄-endo
782	783	781	780	772	vP-O
687	690	688	687	683	Ribose
583	587	585	-	585	Out of plane H$_2$O, -NH$_2$, -NH

Στον Πίνακα 12 παραθέτουμε τα δεδομένα για τη διαμόρφωση της ριβόζης όπως αυτά προκύπτουν από την φασματοσκοπία υπερύθρου και τα αντίστοιχα δεδομένα όπως αυτά έχουν διευκρινιστεί από λυμένες κρυσταλλικές δομές.

Πίνακας 12. Σύγκριση φασματοσκοπικών και κρυσταλλογραφικών δεδομένων σχετικά με τη διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης σε ενώσεις μεταλλικών ιόντων με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη

Μεταλλικό Ιόν	Νουκλεοτίδιο	Διαμόρφωση Ριβόζης	
		FT-IR δεδομένα	**Κρυσταλ. Δεδομένα**
Na^{+}	5΄-GMP	*C2΄-endo*	*C2΄-endo*[57,58]
Ba^{2+}	5΄-GMP	*C2΄-endo*	*C2΄-endo*[59]
Mg^{2+}	5΄-GMP	*C3΄-endo*	-
Cd^{2+}	5΄-GMP	*C3΄-endo*	*C3΄-endo*[62]

Από τις ταινίες στα 800 και 820 cm^{-1} που αποδίδονται στις διαμορφώσεις *C2΄-endo,*anti και C3΄*-endo,anti* του σακχάρου αντίστοιχα, επιβεβαιώνονται οι ήδη υπάρχουσες κρυσταλλικές δομές τόσο των ιόντων νατρίου[57,58] όσο και των ιόντων βαρίου[59] και καδμίου[62] με το εν λόγω νουκλεοτίδιο. Ως εκ τούτου θα μπορούσαμε να αποφανθούμε ότι και για το σχηματιζόμενο σύμπλοκο των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη πρέπει να ισχύει η προτεινόμενη C3΄*-endo,anti* διαμόρφωση. Προς το παρόν, δυστυχώς, δεν έχει γίνει δυνατή η παρασκευή κρυστάλλου του συμπλόκου του μαγνησίου ώστε να μπορούμε να έχουμε συγκριτικά αποτελέσματα.

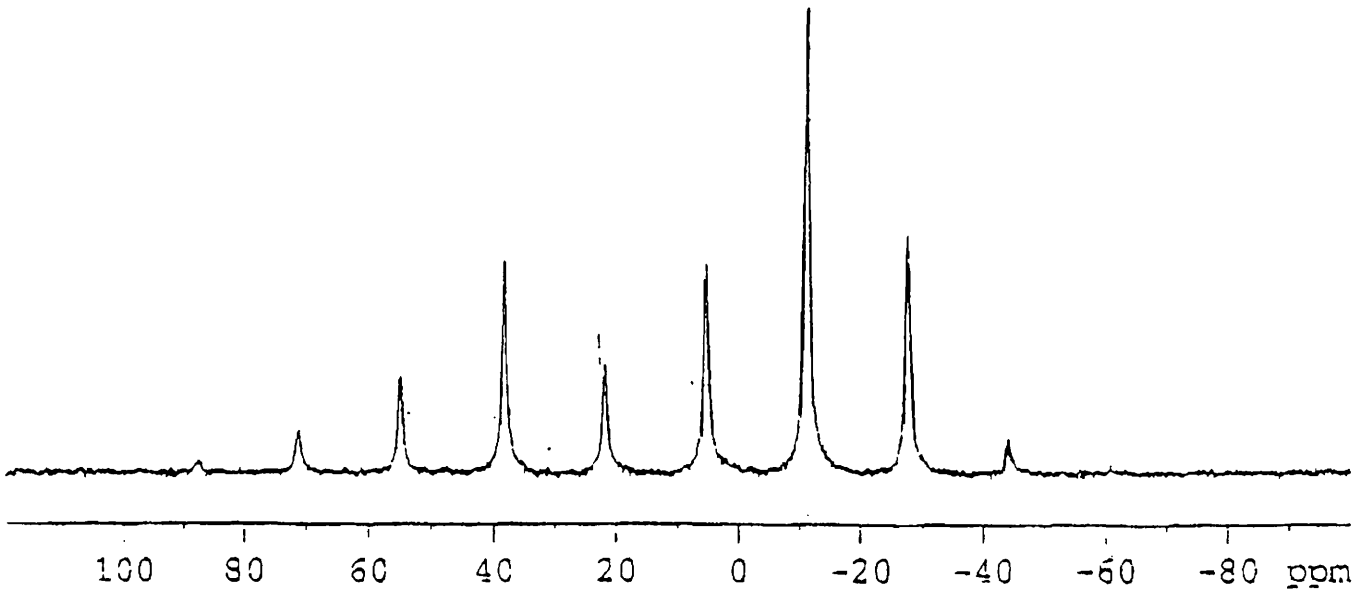
2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^{31}P NMR ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η δομή των παρασκευασθέντων ενώσεων και κυρίως να μελετηθεί η αντίδραση των μεταλλικών ιόντων με τα άτομα του οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας, που φέρουν το αρνητικό φορτίο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φασματοσκοπίας NMR ^{31}P στερεάς κατάστασης.

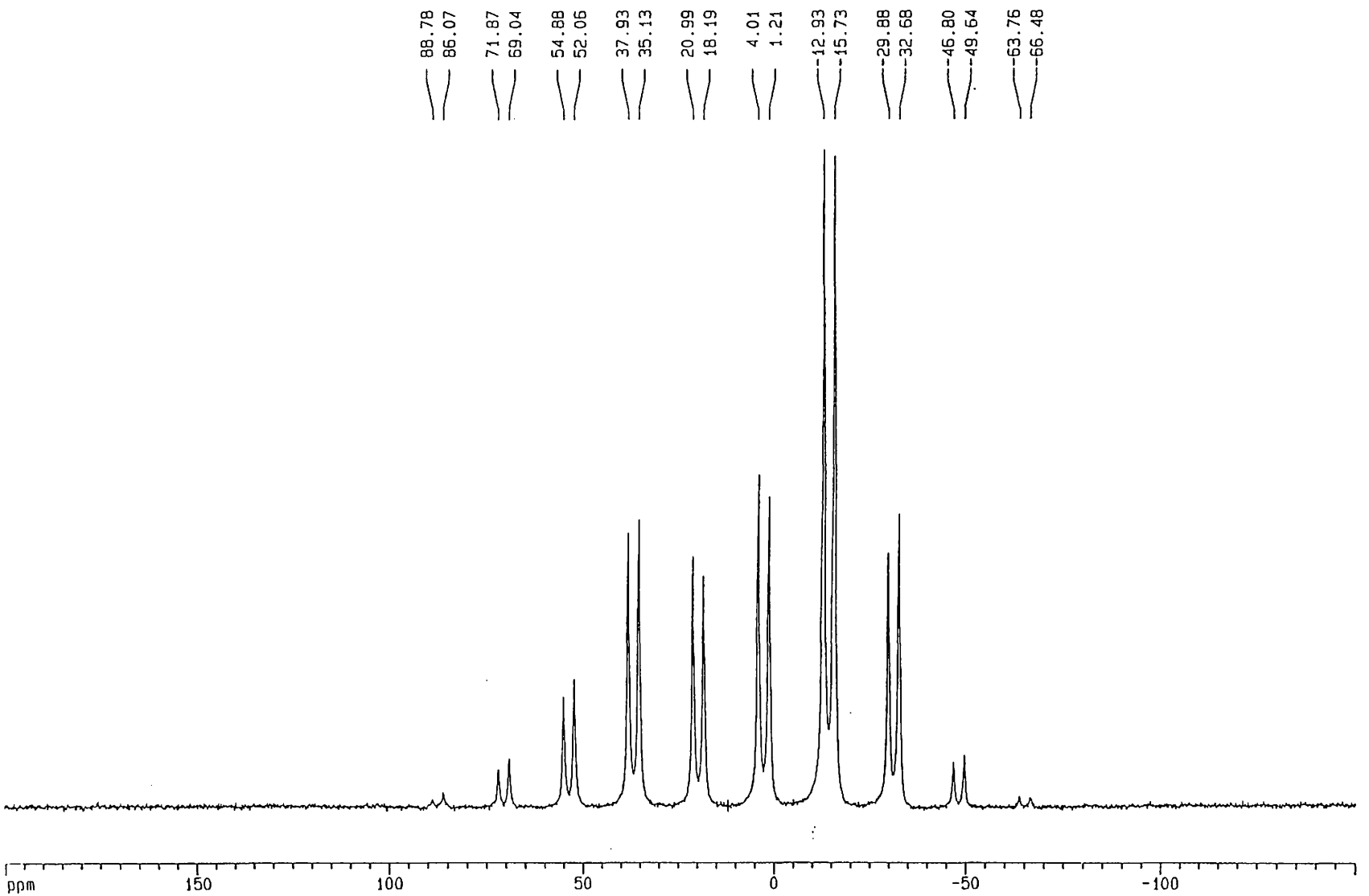
Στα Σχήματα 21, 22, 23 και 24 δίνονται τα φάσματα NMR ^{31}P των ενώσεων νατρίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Στον Πίνακα 13 δίνονται οι τιμές (δ_{iso}, δ_{11}, δ_{22} και δ_{33}) του τανυστή χημικής μετατόπισης καθώς και η παράμετρος ασυμμετρίας (η) του φάσματος ^{31}P των υπό μελέτη ενώσεων, όπως προέκυψαν από την ανάλυση CSA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Herzfeld-Berger και τη σύμβαση του Haeberlen.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα ^{31}P CP MAS όπως προέκυψαν από την ανάλυση CSA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Herzfeld-Berger και τη σύμβαση του Haeberlen.

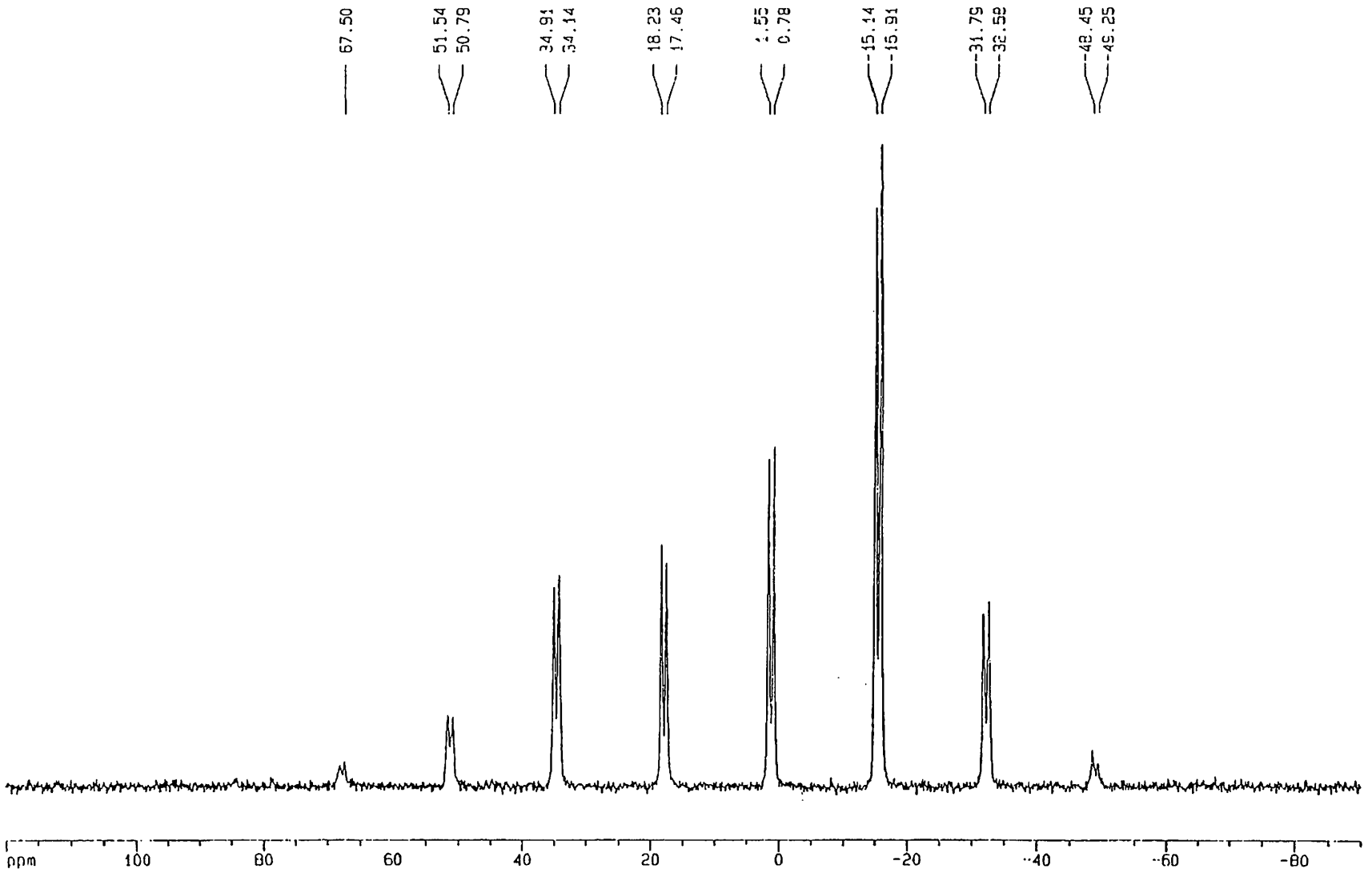
Sample	δ_{iso} (ppm)	δ_{11} (ppm)	δ_{22} (ppm)	δ_{33} (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	η
5'-GMPNa$_2$·3H$_2$O	5,4	-27,5	-27,5	71,4	-98,9	0
5'-GMPNa$_2$·6H$_2$O	4,0	-40,8	-16,0	68,8	-97,2	0,38
	1,2	-43,1	-22,3	69,1	-101,8	0,31
Cd(5'-GMP)·5H$_2$O	4,3	-33,4	-17,4	63,7	-89,1	0,27
Ba(5'-GMP)·5H$_2$O	2,5	-43,4	-13,9	64,8	-93,5	0,47
	1,7	-39,9	-20,1	65,1	-95,1	0,31
Mg(5'-GMP)·5H$_2$O M:L=1:1	2,7	-40,6	-14,2	63,0	-90,5	0,44
Mg(5'-GMP)·5H$_2$O M:L=2:1	2,4	-40,9	-13,2	61,2	-88,3	0,47
Mg(5'-GMP)·5H$_2$O M:L=8:1	2,1	-41,6	-15,5	63,4	-91,9	0,43



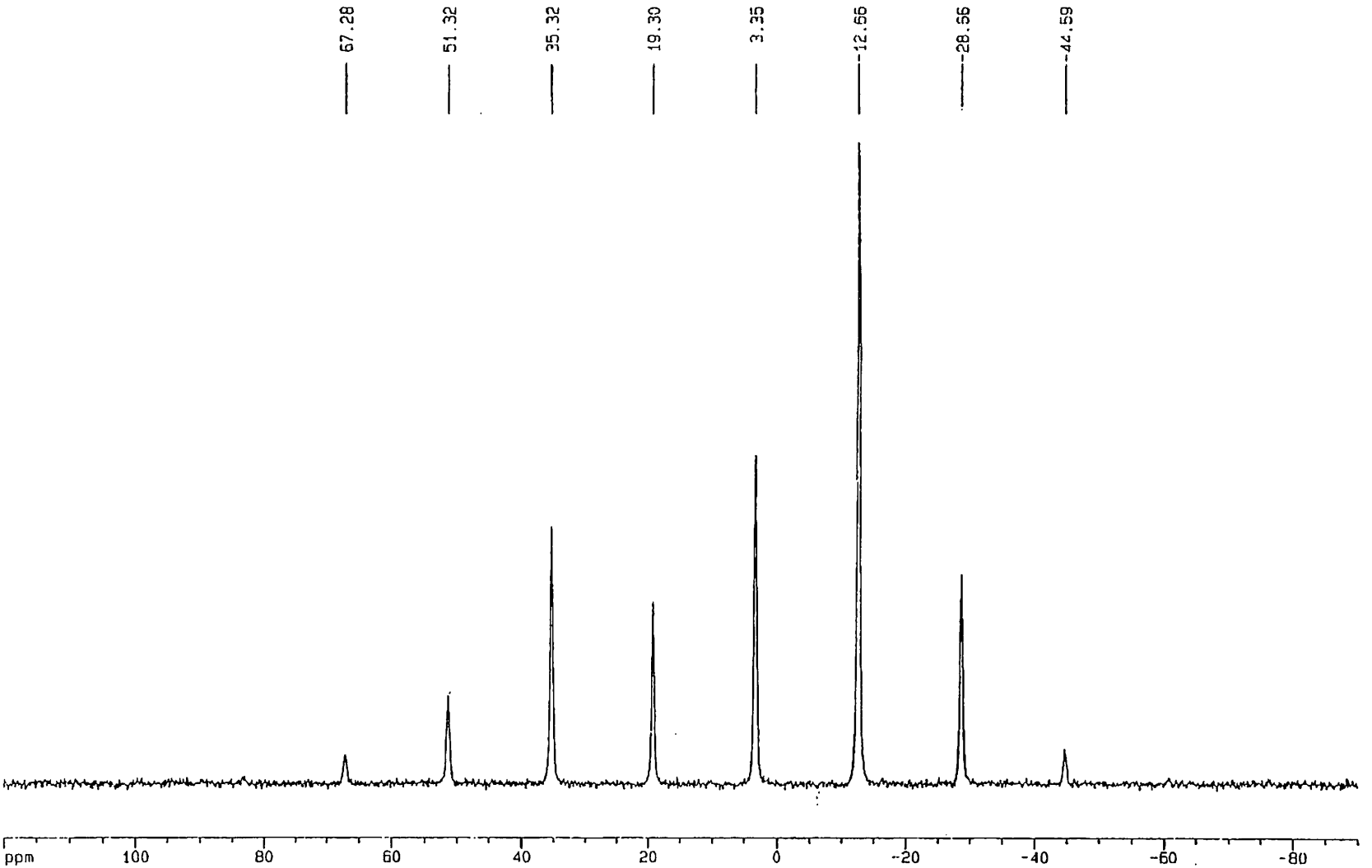
Σχ.21. Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P CP/MAS της τρις-ενυδατωμένης ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Η ισοτροπική χημική μετατόπιση εντοπίζεται στα 5.4 ppm ενώ η συχνότητα περιστροφής του δείγματος υπό μαγική γωνία (MAS) είναι 2 kHz



Σχ.22. Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P CP/MAS της εξα-ενυδατωμένης ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη



Σχ.23. Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P CP/MAS του συμπλόκου των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη.



Σχ.24. Φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P CP/MAS του συμπλόκου των ιόντων καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη.

Γενικά προκειμένου να ερμηνευτεί η ανισοτροπία γύρω από το άτομο του φωσφόρου, αρκεί να αναλύσουμε το δεσμό του με τα άτομα οξυγόνου. Έχει αποδειχθεί[63] ότι όταν τα 2p τροχιακά του O της φωσφορικής ομάδας συμμετέχουν σε δεσμό, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συμμετοχής αυτών στον π δεσμό με τον P. Έτσι μειώνεται ο χαρακτήρας διπλού δεσμού του P-O του ατόμου O που συμμετέχει σε δεσμό με H (υδρογόνο) ή M (μέταλλο), ενώ αυξάνεται ο χαρακτήρας διπλού δεσμού των άλλων ατόμων O της φωσφορικής ομάδας. Έχει παρατηρηθεί ότι η πλέον θετική συνιστώσα του τελεστή χημικής μετατόπισης (δ_{33}) (μετατόπιση σε περιοχή αποπροστασίας ήτοι χαμηλότερης ηλεκτρονιακής πυκνότητας) ορίζει την κατεύθυνση κατά μήκος του εστερικού δεσμού P-O(5΄), ενώ οι άλλες δύο (δ_{11} και δ_{22}) συνιστώσες ορίζουν διευθύνσεις προς τα φωσφορικά O και είναι κάθετες μεταξύ τους και στη διεύθυνση του δ_{33}. Παρατηρούμε ότι σε όλες τις ενώσεις που εξετάσαμε (Na^+, Mg^{2+}, Ba^{2+} και Cd^{2+}) με τη 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη, από τις συνιστώσες του τανυστή χημικής μετατόπισης, η δ_{33} είναι εκείνη που κατευθύνεται προς τον εστερικό δεσμό P-O5΄ (Πίνακας 13), το οποίο είναι σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα[63]. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η συνιστώσα δ_{33} διαφέρει σημαντικά από τις άλλες δύο συνιστώσες, δ_{11} και δ_{22}, ενώ δε μεταβάλλεται σημαντικά στις ενώσεις.

Από τη μελέτη του Πίνακα 13 παρατηρείται ότι οι δύο ενώσεις του μετά νατρίου άλατος της 5'-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης, εμφανίζουν έντονες διαφοροποιήσεις στην ηλεκτρονιακή κατανομή και συμμετρία της φωσφορικής ομάδας. Από τις μεταβολές αυτές φαίνεται καθαρά ότι τα ιόντα του νατρίου λόγω του διαφορετικού αριθμού μορίων νερού, αλληλεπιδρούν με το τμήμα αυτό του νουκλεοτιδίου με διαφορετικό τρόπο. Παρατηρώντας τις συνιστώσες του τανυστή χημικής μετατόπισης της ένωσης που φέρει τρία μόρια νερού βλέπουμε από την ισότητα των συνιστωσών δ_{11} και δ_{22} ότι επικρατεί αξονικά συμμετρική κατανομή των ηλεκτρονίων γύρω από τον πυρήνα του φωσφόρου. Αντίθετα στην περίπτωση του εξα-ενυδατωμένου άλατος, όπου όλοι οι τελεστές χημικής μετατόπισης είναι διαφορετικοί μεταξύ τους δεν παρατηρείται συμμετρία. Πρέπει να τονίσουμε ότι κρυσταλλική δομή του εξα-ενυδατωμένου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης δεν υπάρχει. Η συμφωνία όμως των συμερασμάτων μας με τα στοιχεία που μας παρέχει η δομή με τα εφτά μόρια του νερού μας ώθησε στο να χρησιμοποιήσουμε τα δεδομένα αυτής ως μέτρο σύγκρισης. Θεωρούμε

λοιπόν, ότι η δομή της εξα-ενυδατωμένης ένωσης δεν θα πρέπει να απέχει από την υπάρχουσα κρυσταλλική δομή του επτα-ενυδατωμένου μετά νατρίου άλατος. Έτσι, από το Σχ. 13, όπου δίνεται η κρυσταλλογραφική δομή του άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με εφτά (7) μόρια νερού[57,58], φαίνεται ότι ο κρύσταλλος αποτελείται από δύο μη ισοδύναμα μόρια A και B. Οι αποστάσεις και οι γωνίες των δεσμών, παρατίθενται στον Πίνακα 14. Από τις τιμές των γωνιών O_{11}-P_1-O_{12}, O_{11}-P_1-O13, O12-P_1-O_{13} και O_{11}-P_1-$O_{5'}$ τόσο στο νουκλεοτίδιο A όσο και στο B συνάγεται το συμπέρασμα ότι στον κρύσταλλο δεν υπάρχει συμμετρία, ούτε και τοπικά, δηλαδή στην περιοχή της φωσφορικής ομάδας. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα άτομα οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας πρέπει να σχηματίζουν έναν ή και περισσότερους δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια νερού που τα περιβάλλουν. Τα μήκη των εν λόγω δεσμών υδρογόνου κυμαίνονται, για τη μεν φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου A από 2,67 έως 2,97 Å ενώ για το νουκλεοτίδιο B από 2,71 έως 2,83 Å. Η ανισοτροπία που εμφανίζεται κρυσταλλογραφικά στη δομή της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης που φέρει 7 μόρια νερού (5΄-$GMPNa_2 \cdot 7H_2O$) φαίνεται να οφείλεται στην παρουσία των μορίων H_2O τα οποία λειτουργούν ως γέφυρες μεταξύ των ιόντων Na^+ και των οξυγόνων της φωσφορικής ομάδας καθώς και μεταξύ των ατόμων O2΄ και O3΄ της ριβόζης.

Με βάση τα δεδομένα αυτά μπορούμε να δεχτούμε ότι και στην περίπτωση της 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$ η εμφανιζόμενη έντονη ανισοτροπία οφείλεται στα μόρια νερού που λειτουργούν ως γέφυρες μεταξύ των ιόντων Na^+ και των οξυγόνων της φωσφορικής ομάδας ή των οξυγόνων της ριβόζης. Το γεγονός ότι το τρις-ενυδατωμένο μετά νατρίου άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$), όπως φαίνεται από τα ^{31}P NMR φάσματα, δείχνει μεγαλύτερη τοπική συμμετρία γύρω από το άτομο του φωσφόρου, πρέπει να αποδοθεί στο ότι ο μικρός αριθμός μορίων νερού που υπάρχει στο μόριο δεν επαρκεί για το σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των ιόντων Na^+ και των οξυγόνων της φωσφορικής ομάδας ή και των οξυγόνων της ριβόζης. Αυτό προκύπτει και από την ισότητα των δύο εκ των τριών συνιστωσών του τελεστή χημικής μετατόπισης δ, ($\delta_{11} = \delta_{22} = -27{,}5 \neq \delta_{33}$), όπως αυτές εξάγονται από το ^{31}P NMR φάσμα σε στερεά κατάσταση για την συγκεκριμένη ένωση.

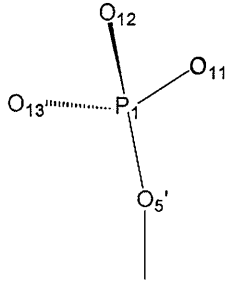
Όπως φαίνεται από το Σχ. 23 και τον Πίνακα 13 το μετά βαρίου άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης εμφανίζει δύο απορροφήσεις ^{31}P και μάλιστα σε

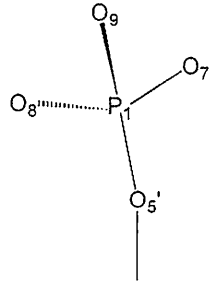
αναλογία 1:1. Αυτό το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με την προταθείσα κρυσταλλική δομή (Σχ.18) στην οποία υπάρχουν δύο ιόντα βαρίου και δύο νουκλεοτίδια A και B τα οποία δεν είναι ισοδύναμα ανά μοναδιαία κυψελίδα[59]. Τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών P-O των δύο φωσφορικών ομάδων της δομής παρατίθενται στον Πίνακα 14. Είναι προφανές, ότι σε σύγκριση με το μετά νατρίου άλας, παρατηρούνται μεγαλύτερες μεταβολές των μηκών των δεσμών P-O και κυρίως στις γωνίες των δεσμών O-P-O, που εμφανίζουν εύρος μεταβολών από 116-111,5° και 115,4-110° για τα νουκλεοτίδια A και B αντίστοιχα. Επίσης διαφέρει έντονα και ο τρόπος αλληλεπίδρασης των δύο κατιόντων με τη φωσφορική ομάδα των δύο υποκαταστατών A και B. Όπως φαίνεται από την κρυσταλλική δομή, το ένα ιόν βαρίου αλληλεπιδρά άμεσα με το ένα άτομο οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου A, ενώ το δεύτερο ιόν βαρίου συνδέεται με την φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου B μέσω γέφυρας δύο μορίων νερού. Η δομή αυτή ερμηνεύει ικανοποιητικά την παρατηρούμενη ηλεκτρονιακή ασυμμετρία γύρω και από τους δύο πυρήνες φωσφόρου της δομής, όπως αποδίδεται από τις διαφορετικές τιμές των τριών συνιστωσών του τανυστή χημικής μετατόπισης (Πίνακας 13). Επίσης η εμφάνιση δύο σαφώς διακεκριμένων απορροφήσεων στο ^{31}P NMR φάσμα είναι δείγμα της παρουσίας δύο πυρήνων με διαφορετικό περιβάλλον.

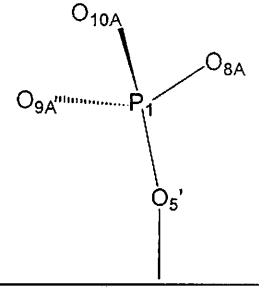
Το σύμπλοκο των ιόντων καδμίου με την 5'-μονοφωσφορική γουανοζίνη αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση συμπλόκου, όπου το κατιόν συνδέεται άμεσα με το N(7) άτομο του πουρινικού δακτυλίου. Το κατιόν του καδμίου αλληλεπιδρά με τη φωσφορική ομάδα μέσω δύο μορίων νερού. Στο Σχ. 20 φαίνεται ο τρόπος σύνδεσης του κατιόντος καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Το σύμπλοκο των ιόντων καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη δίνει χαρακτηριστικό ^{31}P CP/MAS NMR φάσμα, με μία μόνο εξαιρετικά λεπτή απορρόφηση για τον πυρήνα του φωσφόρου. Οι τρεις συνιστώσες του τανυστή χημικής μετατόπισης, όπως υπολογίστηκε, διαφέρουν μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό, σύμφωνα και με τα όσα έχουν λεχθεί προηγούμενα, αποδίδεται στο ότι το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του φωσφόρου πρέπει να είναι ασύμμετρο. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι οι δύο δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων ύδατος που περιβάλουν το Cd^{2+} και των δύο

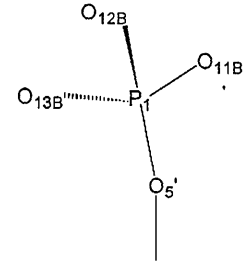
Πίνακας 14. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της φωσφορικής ομάδας του 5'-GMP μετά την αντίδραση με τα ιόντα νατρίου, καδμίου και βαρίου

Μήκη δεσμών (Å)









Na_2-5'-GMP·7H_2O*			Cd-5'-GMP·5H_2O		Ba-5'-GMP·10H_2O			
	5'-GMP A	5'-GMP B			5'-GMP A (D.B.)		5'-GMP B (I.B.)	
P_1 – O11	1,512	1,510	P_1 – O7	1,55	P_1 – O8	1,51	P_1 – O11	1,51
P_1 – O12	1,534	1,539	P_1 – O8	1,51	P_1 – O9	1,52	P_1 – O12	1,49
P_1 – O13	1,511	1,506	P_1 – O9	1,51	P_1 – O10	1,54	P_1 – O13	1,54
P_1 – O5'	1,626	1,617	P_1 – O5'	1,62	P_1 – O5'	1,60	P_1 – O5'	1,62

*Ο μέσος όρος απόκλισης στις αποστάσεις δεσμών P_1–O είναι 0,005 (Å)

Γωνίες δεσμών (^{o})

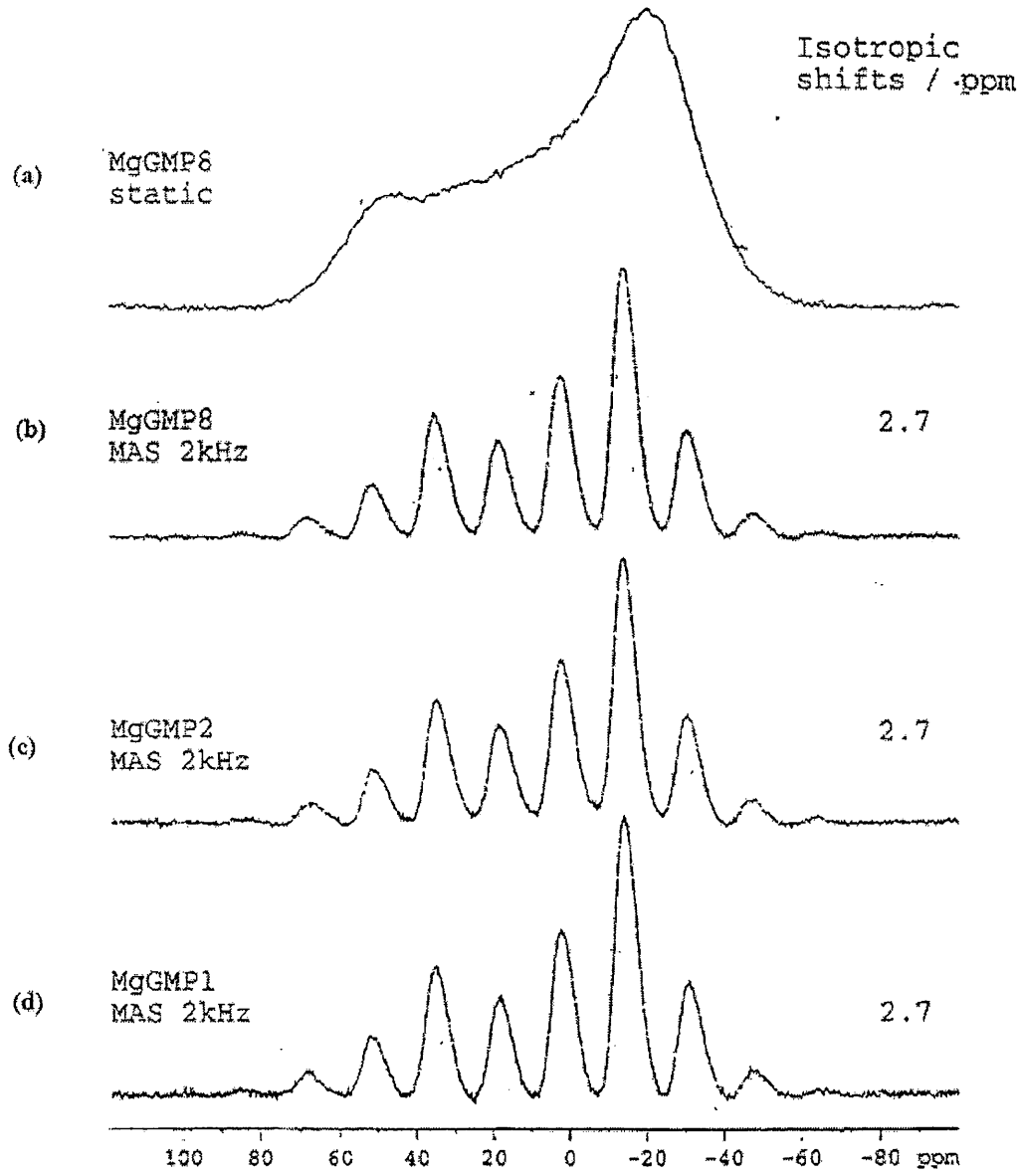
Na_2-5'-GMP·7H_2O *			Cd-5'-GMP·5H_2O		Ba-5'-GMP·10H_2O			
	5'-GMP A	5'-GMP B			5'-GMP A		5'-GMP B	
O11 – P_1 – O12	113,08	113,05	O7 – P_1 – O8	112	O8 – P_1 – O9	111,5	O11 – P_1 – O12	112,3
O11 – P_1 – O13	112,33	112,07	O7 – P_1 – O9	111	O8 – P_1 – O10	116,0	O11 – P_1 – O13	110,0
O12 – P_1 – O13	112,13	113,28	O8 – P_1 – O9	114	O9 – P_1 – O10	112,5	O12 – P_1 – O13	115,4
O11 – P_1 – O5'	107,68	107,20	O7 – P_1 – O5'	108	O8 – P_1 – O5'	103,0	O11 – P_1 – O5'	107,5
O12 – P_1 – O5'	104,05	103,88	O8 – P_1 – O5'	103	O9 – P_1 – O5'	105,0	O12 – P_1 – O5'	107,0
O13 – P_1 – O5'	106,92	106,62	O9 – P_1 – O5'	108	O10 – P_1 – O5'	107,7	O13 – P_1 – O5'	103,5

*Ο μέσος όρος απόκλισης στις γωνίες δεσμών O–P_1–O κυμαίνεται από 0,3 έως 0,6^o

ατόμων οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας έχουν μήκη 2,63 και 2,77 Å ενώ οι γωνίες Cd-(W)H-O(P) που σχηματίζονται είναι 133,9° και 120,4° αντίστοιχα[62].

Στον Πίνακα 14 δίνονται συγκριτικά τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών για τις φωσφορικές ομάδες των ενώσεων των ιόντων νατρίου, καδμίου και βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη όπως προτείνονται πό τις κρυσταλλικές δομές[57-59,62]. Να σημειώσουμε ότι μέχρι τώρα δεν έχει επιλυθεί δομή της ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη που να φέρει τρία μόρια νερού.
Στο Σχ. 25 δίνεται το ^{31}P CP/MAS NMR φάσμα του συμπλόκου του μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Από τις τιμές των συνιστωσών του τανυστή χημικής μετατόπισης, φαίνεται να επικρατεί ασυμμετρία σε τοπικό επίπεδο στη φωσφορική ομάδα του σχηματισθέντος συμπλόκου. Επίσης το εύρος των κορυφών του φάσματος είναι ιδιαίτερα μεγάλο, γεγονός που δείχνει ότι το σχηματισθέν σύμπλοκο δεν πρέπει να είναι μονοκρύσταλλος. Είναι προφανές ότι η διαπλάτυνση των γραμμών είναι εν γένει αναμενόμενη αφού οι ενώσεις που εξετάζουμε είναι υπό μορφή σκόνης και όχι μονοκρυσταλλικές. Επίσης από τα προηγούμενα και σε συνδυασμό με τα υπέρυθρα φάσματα φαίνεται ότι τα ιόντα Mg^{2+} αντιδρούν έμμεσα με τα οξυγόνα της φωσφορικής ομάδας, μέσω δεσμών υδρογόνου με τα μόρια H_2O που τα περιβάλλουν. Όπως αναφέρθηκε, δεν έχει ληφθεί κρύσταλλος του συμπλόκου Mg-5΄-GMP, ώστε να επιβεβαιωθούν οι παρατηρήσεις.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα φασματοσκοπικά δεδομένα από την ^{31}P CP/MAS NMR ανάλυση για τις ενώσεις των ιόντων Na^{+}, Ba^{2+} και Cd^{2+} συμφωνούν με τις κρυσταλλικές δομές. Έτσι μπορούμε να δεχτούμε ότι τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα φασματοσκοπικά δεδομένα σχετικά με τη συμπλοκοποίηση των ιόντων Mg^{2+} με τη φωσφορική ομάδα (Σχ. 16) πρέπει να είναι αληθή.



Σχ.25. Φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P CP/MAS των ενώσεων των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. (a) Στατικό φάσμα της ένωσης του μαγνησίου. (b)-(d) CP/MAS (Magic Angle Spinning) φάσματα της ιδίας ένωσης σε αναλογία Metal:Ligand = 8:1, 2:1 και 1:1.

Είναι σαφές, από τα όσα έχουν λεχθεί, ότι η φασματοσκοπία ^{31}P NMR μπορεί να δώσει αρκετές πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον της φωσφορικής ομάδας των συμπλόκων. Όμως λόγω της πολλαπλότητας των αλληλεπιδράσεων με τα μόρια του ύδατος είναι δύσκολη η εξακρίβωση της αιτίας της παραγόμενης ανισοτροπίας και κατά συνέπεια του τρόπου αλληλεπίδρασης των ατόμων μεταξύ τους, απαιτώντας συνδυασμό με άλλες μεθόδους ανάλυσης της δομής.

3. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^{13}C NMR ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Επειδή η ^{31}P NMR φασματοσκοπία δίνει πληροφορίες μόνο για την περιοχή της φωσφορικής ομάδας του νουκλεοτιδίου, προχωρήσαμε στη χρήση ^{13}C NMR φασματοσκοπίας για λεπτομερέστερη ανάλυση. Η ^{13}C NMR φασματοσκοπία στερεάς κατάστασης αποτελεί μία πολύ χρήσιμη τεχνική στη μελέτη της μοριακής διαμόρφωσης των ενώσεων που μελετάμε με βάση τις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι παρέχει πληροφορίες οι οποίες στην υδατική φάση δεν είναι εμφανείς, επειδή συνήθως σε υδατικά διαλύματα λαμβάνουμε τον μέσο όρο όλων των δυνατών διαμορφωμερών[64-66].

Στον Πίνακα 15 παραθέτουμε τις χημικές μετατοπίσεις ^{13}C του νουκλεοτιδίου και των συμπλόκων του και την αρίθμηση των αντιστοίχων ατόμων άνθρακα του νουκλεοτιδίου στα οποία οι χημικές μετατοπίσεις αποδίδονται. Παράλληλα στον ίδιο Πίνακα δίνουμε για λόγους επιβεβαίωσης, όπου είναι δυνατόν, τα βιβλιογραφικά κρυσταλλογραφικά δεδομένα, που αφορούν τη διαμόρφωση *C2΄-endo-anti* ή *C3΄-endo-anti* της ριβόζης.

Στο Σχ. 26 δίνεται το φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR του τρις-ενυδατωμένου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με νάτριο (5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O). Στο Σχ. 27 δίνεται το φάσμα της ιδίας ένωσης όπου όμως εφαρμόστηκε η τεχνική της εξάλειψης των μη τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα (NQS: Non Quaternary Suppress). Ομοίως στα Σχ. 28 και 29 απεικονίζονται τα αντίστοιχα φάσματα του εξα-ενυδατωμένου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με νάτριο (5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O).

Από τη σύγκριση των φασμάτων των δύο αλάτων φαίνεται καθαρά ότι το φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR της ένωσης που έχει 6 μόρια νερού διαφέρει και πάλι σημαντικά από το αντίστοιχο φάσμα του τρις-ενυδατωμένου μετά νατρίου άλατος. Καταρχήν οι κορυφές σχεδόν όλων των ανθράκων της ένωσης αυτής έχουν υποστεί σχάση. Η σχάση αυτή δηλώνει την παρουσία δύο μη ισοδύναμων νουκλεοτιδίων στη δομή του άλατος. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τα προηγούμενα φάσματα ^{31}P CP/MAS NMR και έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα[57,58] Όπως είδαμε (Σχ.13) ο κρύσταλλος της ένωσης (5΄-GMPNa$_2$·7H$_2$O) απαρτίζεται από τέσσερα κατιόντα νατρίου (Na^+), 14 μόρια νερού και 2 μη ισοδύναμα μόρια υποκαταστάτη (5΄- GMP^{2-}). Αντίθετα στην περίπτωση της ένωσης 5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O

βλέπουμε ότι όλοι οι άνθρακες δίνουν απλές και πολύ λεπτές κορυφές ^{13}C CP/MAS. Αυτό σημαίνει ότι στην ένωση αυτή επικρατεί μόνο μία διαμόρφωση του νουκλεοτιδίου.

Από τα φάσματα ^{13}C CP/MAS NMR του μετά νατρίου άλατος του νοκλεοτιδίου μπορούμε να αποφανθούμε για τη διαμόρφωση που λαμβάνει ο δακτύλιος της ριβόζης, και πως αυτή μετατρέπεται από *C2΄-endo* σε *C3΄-endo*, ανάλογα με τη μεταβολή του βαθμού ενυδάτωσης των μορίων. Πράγματι, για διαμόρφωση *C3΄-endo* του δακτυλίου της ριβόζης όπως ισχύει στο άλας 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων C2΄ και C3΄ είναι 74 και 68 ppm αντίστοιχα. Στην περίπτωση του, με 6 μόρια νερού, άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης, 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$ παρατηρείται μία μετατόπιση των ατόμων C2΄ και C3΄ προς μεγαλύτερες τιμές των χημικών μετατοπίσεων. Οι μετατοπίσεις αυτές για τα C2΄ και C3΄ άτομα ανέρχονται σε 78 και 75 (διπλή) ppm αντίστοιχα. Είναι όμως γνωστό ότι η μετατόπιση δ(^{13}C) του C3΄ ατόμου άνθρακα κατά 5-10 ppm προς υψηλότερες συχνότητες, φανερώνει αλλαγή της διαμόρφωσης της ριβόζης προς *C2΄-endo*[68]. Από τις παρατηρήσεις αυτές γίνεται φανερό ότι η παρουσία στο άλας 5΄-$GMPNa_2$ περισσοτέρων μορίων νερού προκαλεί μετάβαση από την *C3΄-endo* διαμόρφωση στην *C2΄-endo*.

Με βάση τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η ^{13}C CP/MAS NMR φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με μεγαλύτερη ακρίβεια, ως αναλυτική μέθοδος για τη μελέτη της διαμόρφωσης του δακτυλίου της ριβόζης του νουκλεοτιδίου, συγκρινόμενη με την ^{31}P CP/MAS NMR φασματοσκοπία. Φαίνεται δηλαδή, ότι μπορεί να δώσει περισσότερο προσεγγιστικά στη δομή αποτελέσματα. Όπως αναφέραμε και στο θεωρητικό τμήμα, αύξηση και μόνο του βαθμού ενυδάτωσης του DNA έχει ως συνέπεια μετάπτωση από *C3΄-endo* σε *C2΄-endo* διαμόρφωση. Ως εκ τούτου η τεχνική αυτή θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί στο διαχωρισμό μεταξύ της A- και B- μορφής DNA.

Πίνακας 15. Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C των ενώσεων των ιόντων νατρίου, βαρίου, μαγνησίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη σε στερεά κατάσταση

Ένωση	C-6	C-2	C-4	C-8	C-5	C-1΄	C-4΄	C-2΄	C-3΄	C-5΄	Διαμόρφωση ριβόζης	
											NMR	X-Ray (μορ. τύπος)
5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O	160,7	154,5	152,2	134,8	115,7	84,7		74,2	68,2	66,30	C3΄-endo-anti	
5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O	159,4	155,6	151,8[d] 151,2	139,3[d] 137,7	115,7	87,6[d] 86,6		79[d] 78,3	73,6[d] 72,7	66,2[d] 65,6	C2΄-endo-anti	C2΄-endo-anti (5΄-GMPNa$_2$·7H2O)[57,58]
Ba-5΄-GMP·5H$_2$O	158,8	155,5	151,7[d] 149,9	138,3	116,4[d] 115,2	86,6	85,4	77,9	75,2 74,2[d]	65,9[d] 63,9	C2΄-endo-anti	C2΄-endo-anti (Ba$_2$-5΄-GMP$_2$·12H$_2$O)[59]
Mg-5΄-GMP·5H$_2$O	160,2	153,5		136,6	114,3	85,4		75,4		57,9	C3΄-endo-anti[67]	-
Cd-5΄-GMP·5H$_2$O	156,7	150,4		140,4	113,8	91,8	82,8	76,5	67,0	61,9	C3΄-endo-anti	C3΄-endo-anti [Cd-5΄-GMP·(5H$_2$O)]·3H$_2$O[62]

[d]: διπλή

Στα Σχ. 30 και 31 δίνονται τα ^{13}C CP/MAS NMR και ^{13}C CP/MAS NQS NMR φάσματα της ένωσης των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Το γεγονός ότι η σχηματισθείσα ένωση δεν είναι μονοκρυσταλλική, έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη φασμάτων με μεγάλο εύρος κορυφών. Η διεύρυνση αυτή του φάσματος δυσχεραίνει την ταυτοποίηση των ταινιών στην περιοχή όπου εμφανίζονται οι μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα του σακχάρου του νουκλεοτιδίου, δηλαδή μεταξύ 85 και 61 ppm. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με πρόσφατες πειραματικές μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στερεάς κατάστασης, που πραγματοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο σύμπλοκο και οι οποίες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης στην εν λόγω ένωση θα πρέπει να είναι *C3΄-endo*[63]. Με βάση τα δεδομένα αυτά μπορούμε να δεχτούμε ότι ο δακτύλιος του σακχάρου παρουσιάζει διαμόρφωση *C3΄-endo*. Επίσης τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με όσα έχουν παρατηρηθεί από την FT-IR φασματοσκοπία.

Στα Σχ. 32 και 33 δίνονται τα ^{13}C CP/MAS NMR και ^{13}C CP/MAS NQS NMR φάσματα της ένωσης των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Όπως στην περίπτωση του εξα-ενυδατωμένου μετά νατρίου άλατος, παρατηρούμε και εδώ σχάση των κορυφών σχεδόν όλων των ατόμων άνθρακα. Και στην περίπτωση αυτή, η σχάση μας οδηγεί να δεχτούμε την ύπαρξη δύο σαφώς διαφοροποιημένων υποκαταστατών 5΄-GMP^{2-} στο μόριο. Παρατηρούμε και πάλι την πλήρη συμφωνία με την προταθείσα κρυσταλλική δομή[59], όπου δηλαδή υπάρχουν δύο ιόντα βαρίου και δύο νουκλεοτίδια A και B τα οποία δεν είναι ισοδύναμα.

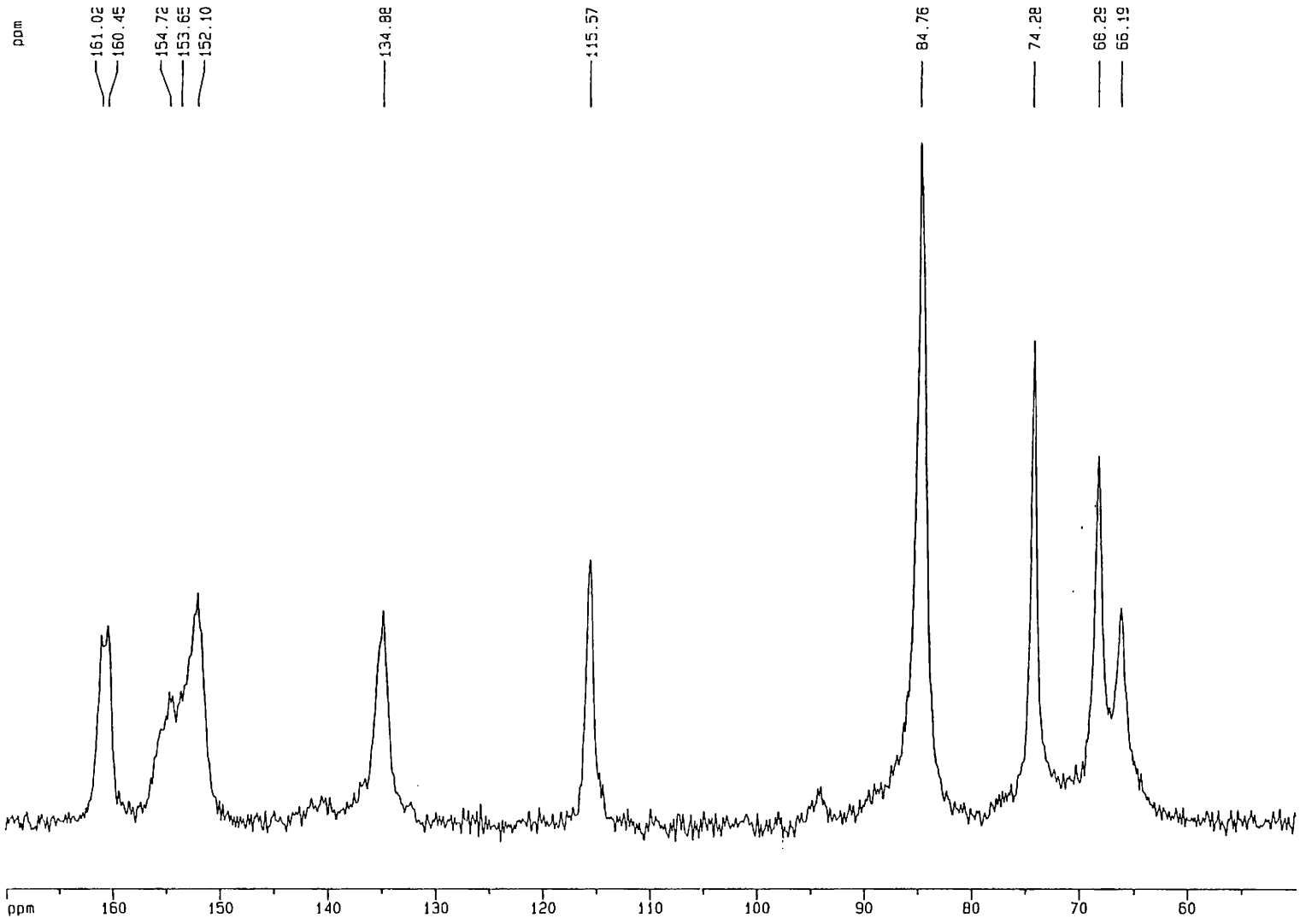
Όσον αφορά τη διαμόρφωση του σακχάρου βλέπουμε (Πίνακας 15 και Σχ. 32), βάσει των όσων είπαμε αναλύοντας την περίπτωση των αλάτων του νατρίου, ότι επικρατεί η *C2΄-endo* διαμόρφωση δεδομένου ότι οι μετατοπίσεις των C2΄ και C3΄ ατόμων άνθρακα εμφανίζονται στα 78 και 75 (διπλή) ppm αντίστοιχα. Η σχάση της κορυφής που αποδίδεται στον άνθρακα C3΄, τόσο στην περίπτωση της ένωσης των ιόντων βαρίου όσο και στην περίπτωση της εξα-ενυδατωμένης ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη, υποδηλώνει ενδεχομένως δύο διαφορετικές διευθετήσεις του δακτυλίου της ριβόζης πάντα όμως μέσα στα όρια που καθορίζει η διαμόρφωση *C2΄-endo*. Στη διαμόρφωση αυτή το C2΄ άτομο άνθρακα του πενταμελούς δακτυλίου θα πρέπει να βρίσκεται εκτός του επιπέδου που ορίζουν τα υπόλοιπα τέσσερα άτομα, περίπου 0,5 Å και μάλιστα προς την πλευρά

του ατόμου του άνθρακα C5′ (βλ. Σχ. 5). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματά μας σχετικά με την διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης έρχονται σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα[59] όπου οι δύο δακτύλιοι (A και B) σακχάρου εμφανίζουν διαμόρφωση *C2′-endo*, παρότι δεν είναι ισοδύναμοι μεταξύ τους.

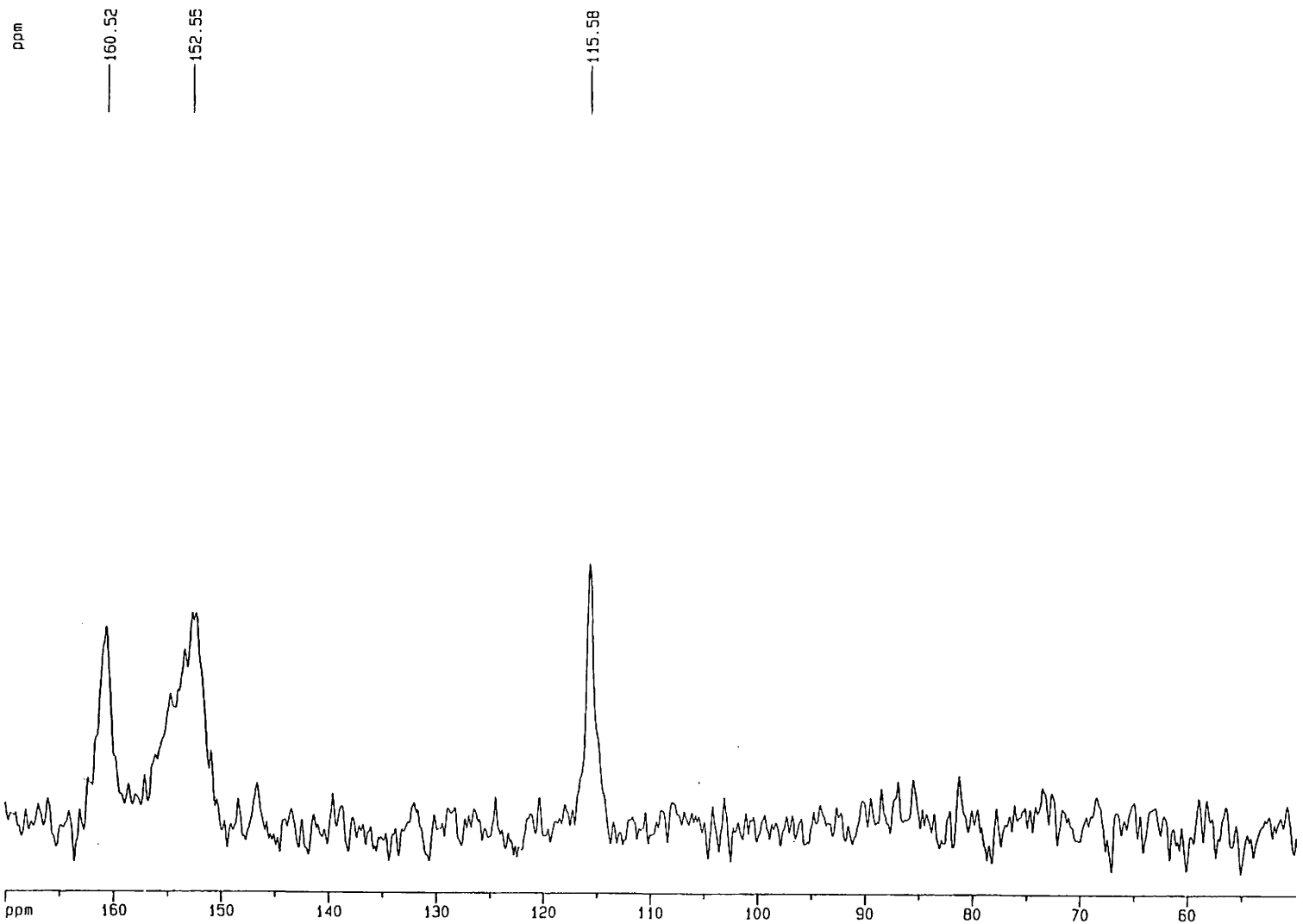
Τέλος ας εξετάσουμε και το φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR της ένωσης των ιόντων καδμίου με την 5′-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Στα Σχ. 34 και 35 παραθέτουμε τα σχετικά φάσματα (^{13}C CP/MAS και NQS αντίστοιχα). Όπως προκύπτει από τις πολύ λεπτές απορροφήσεις των ατόμων του άνθρακα του φάσματος, συμπεραίνουμε πως πρόκειται για μία ένωση με εξαιρετική μικροκρυσταλλική ομοιογένεια. Το γεγονός ότι καμία κορυφή δεν σχάζεται μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μόνο ενας τρόπος διευθέτησης των ατόμων άνθρακα του υποκαταστάτη.

Σχετικά με τη διαμόρφωση της ριβόζης του υποκαταστάτη είναι προφανές από την χαμηλή τιμή της χημικής μετατόπισης του C3′ στα 67 ppm (Πίνακας 15 και Σχ. 34) ότι επικρατεί καθαρά η *C3′-endo* διαμόρφωση, γεγονός το οποίο είναι σε συμφωνία και με την προταθείσα κρυσταλλική δομή[62].

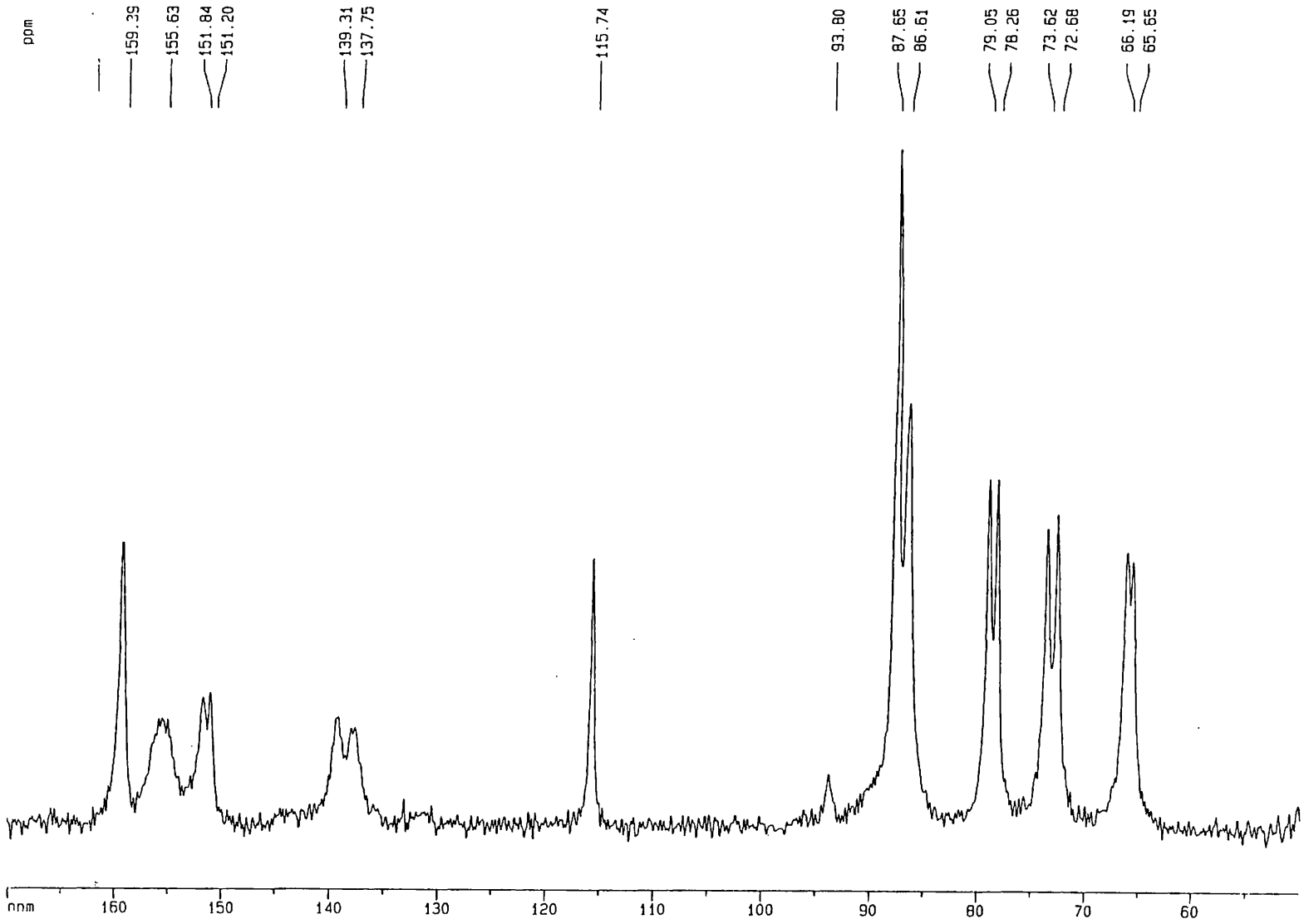
Πριν ολοκληρώσουμε την ανάλυση των φασμάτων NMR ^{13}C CP/MAS αξίζει να αναφερθούμε στην δυνατότητα πιστοποίησης του *anti* προσανατολισμού της ριβόζης ως προς τον δακτύλιο του σακχάρου. Από μελέτες που έχουν γίνει σε αντίστοιχες περιπτώσεις σε διάλυμα[34], έχει βρεθεί ότι η παράμετρος εκείνη που δύναται να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με την διαμόρφωση *syn* ή *anti* του μορίου που μελετάμε, είναι η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των ατόμων άνθρακα C2′ και C3′ της ριβόζης, Δ[δ(C2′)-δ(C3′)]. Αναφέρεται ότι όταν αυτή η διαφορά είναι μικρότερη από 0,5 ppm, επικρατεί η *syn* διαμόρφωση περί τον γλυκοζιτικό δεσμό. Διαφορετικά όταν η εν λόγω διαφορά είναι μεγαλύτερη από 2,8 ppm, τότε αυτό είναι ένδειξη *anti* διαμόρφωσης. Στον Πίνακα 16 παρουσιάζουμε τις τιμές της συγκεκριμένης παραμέτρου στις ενώσεις που μελετάμε.



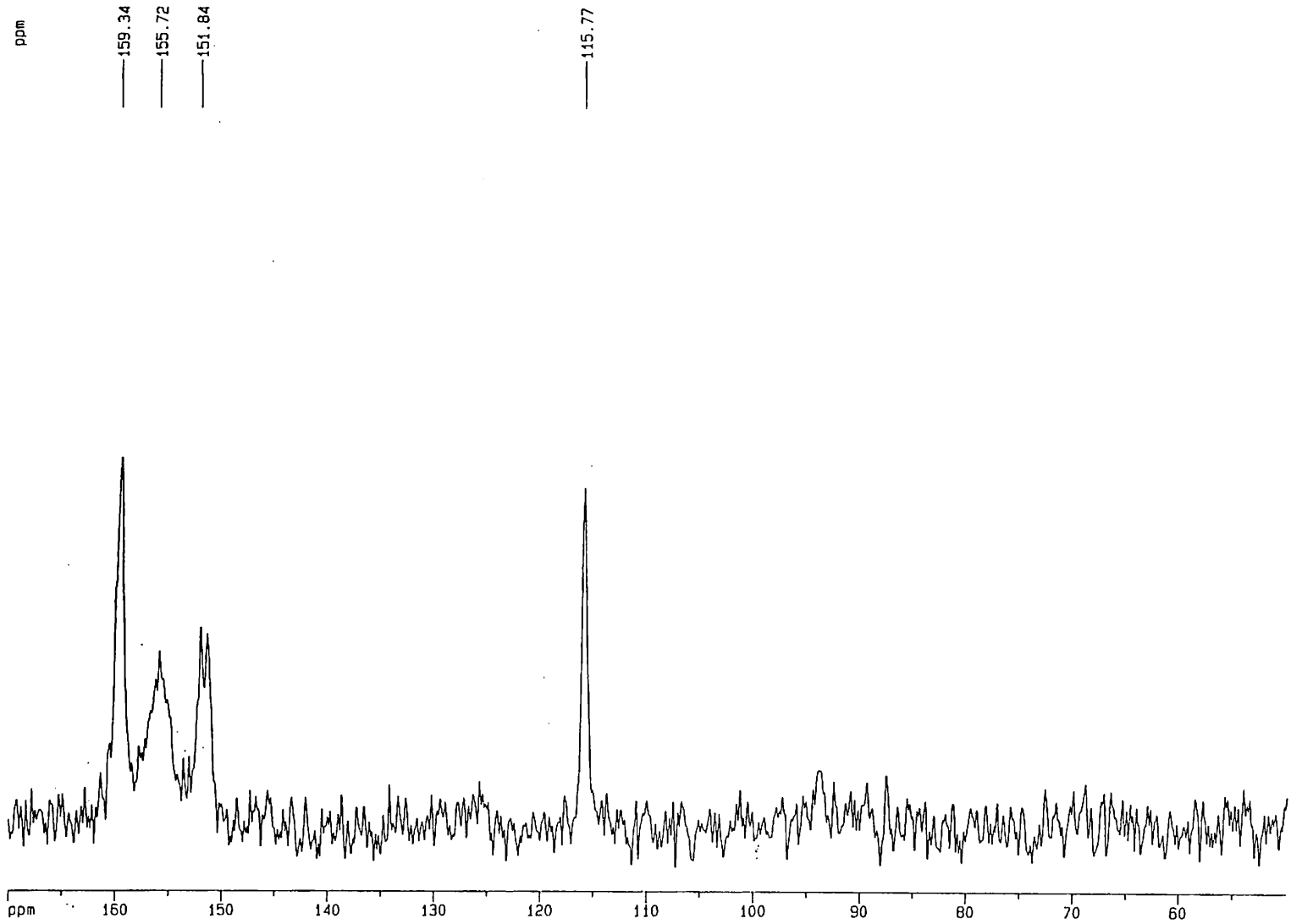
Σχ.26. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR της ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (5΄-GMP$Na_2 \cdot 3H_2O$)



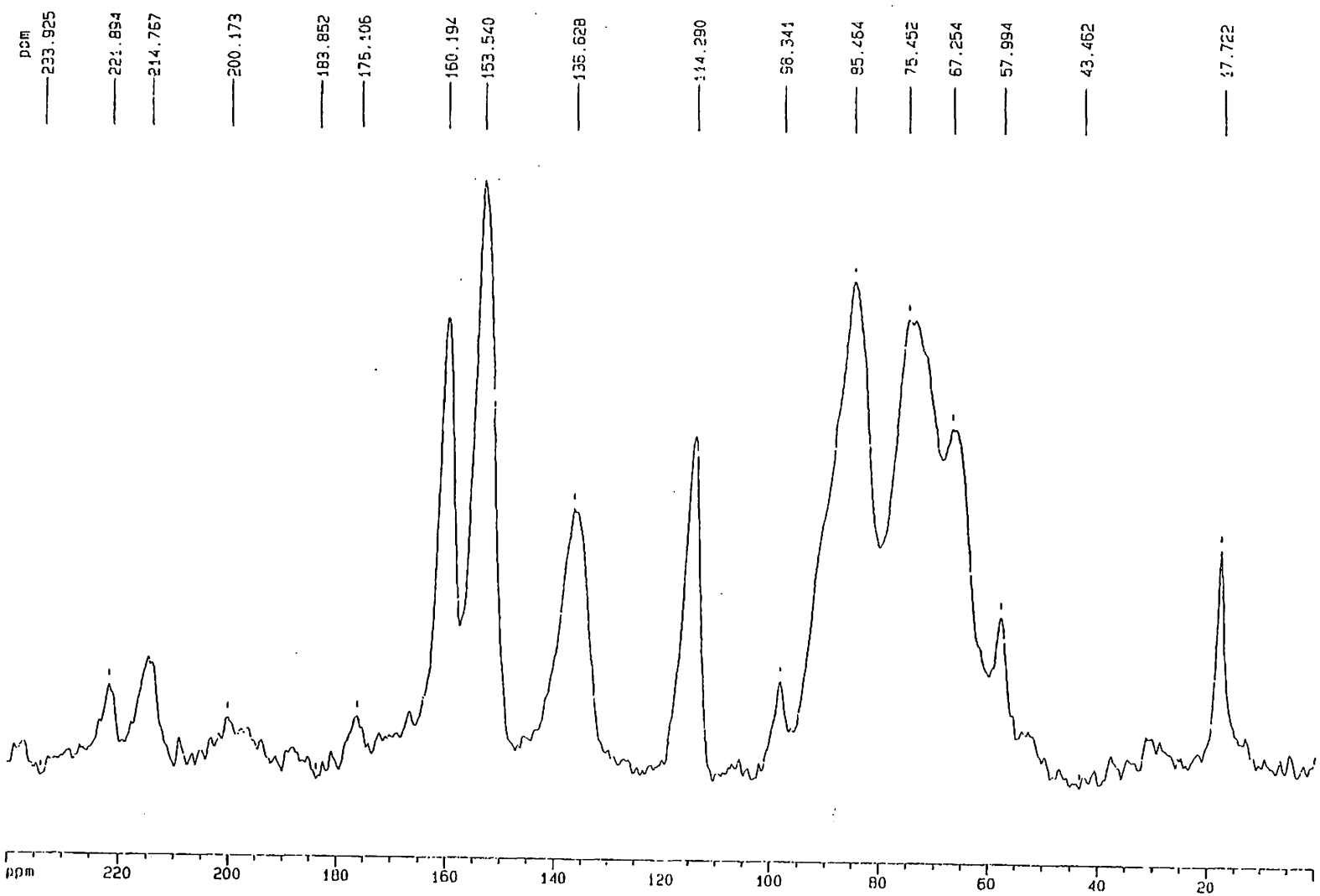
Σχ.27. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NQS NMR της ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (5΄-GMP$Na_2 \cdot 3H_2O$)



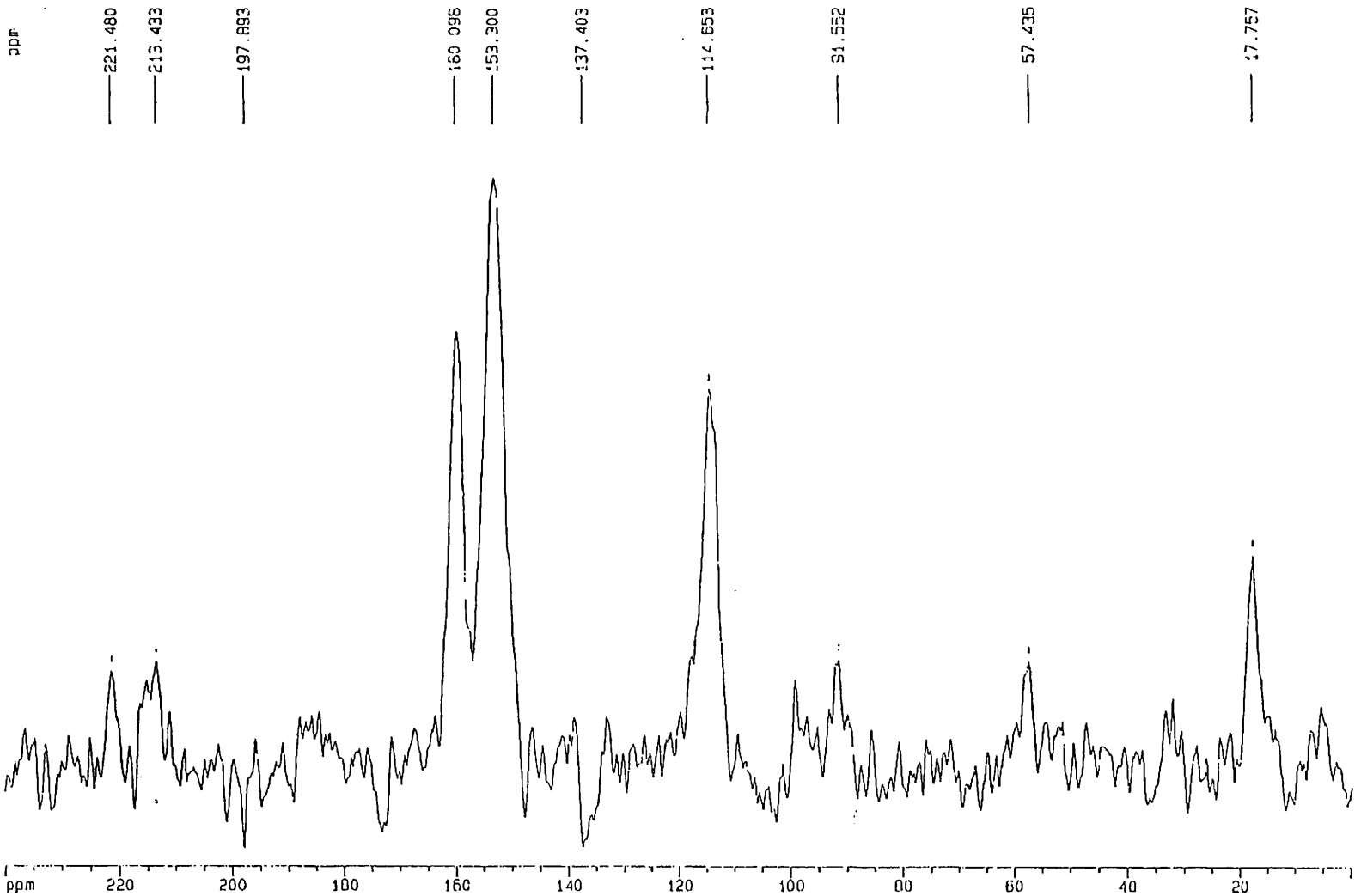
Σχ.28. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR της ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O)



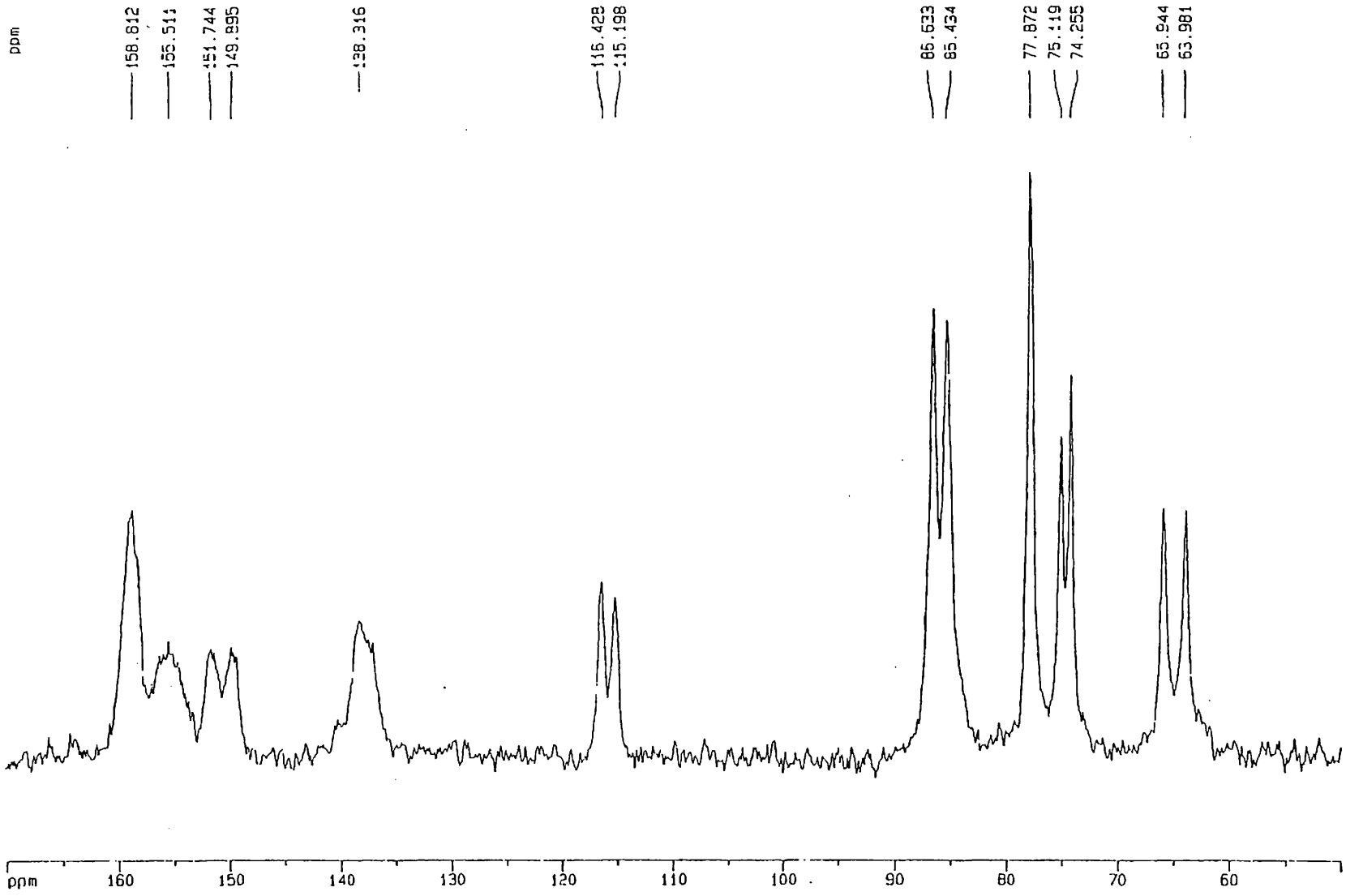
Σχ.29. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NQS NMR της ένωσης των ιόντων νατρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O)



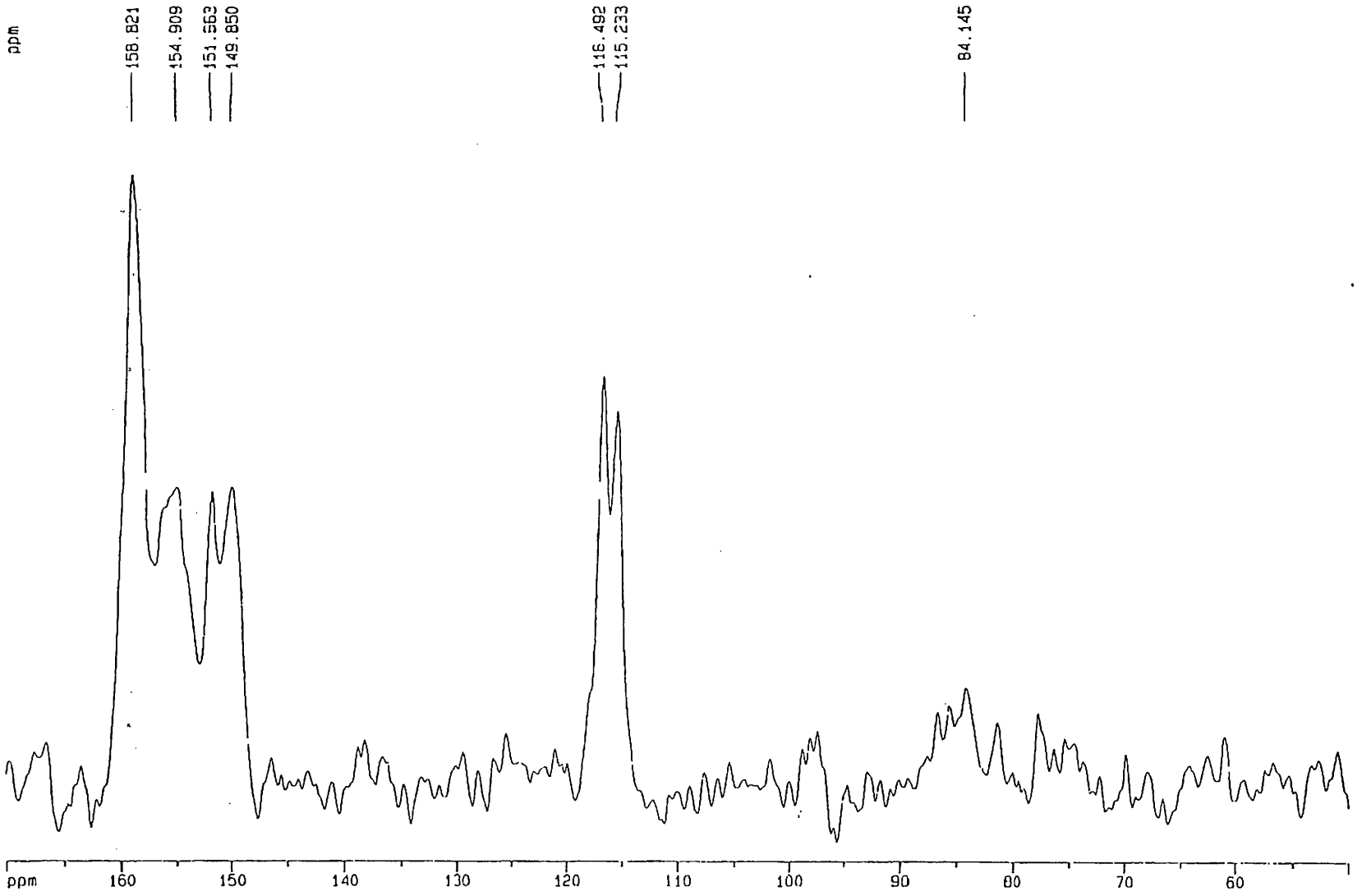
Σχ.30. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR του συμπλόκου των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (Mg-5΄-GMP·5H_2O)



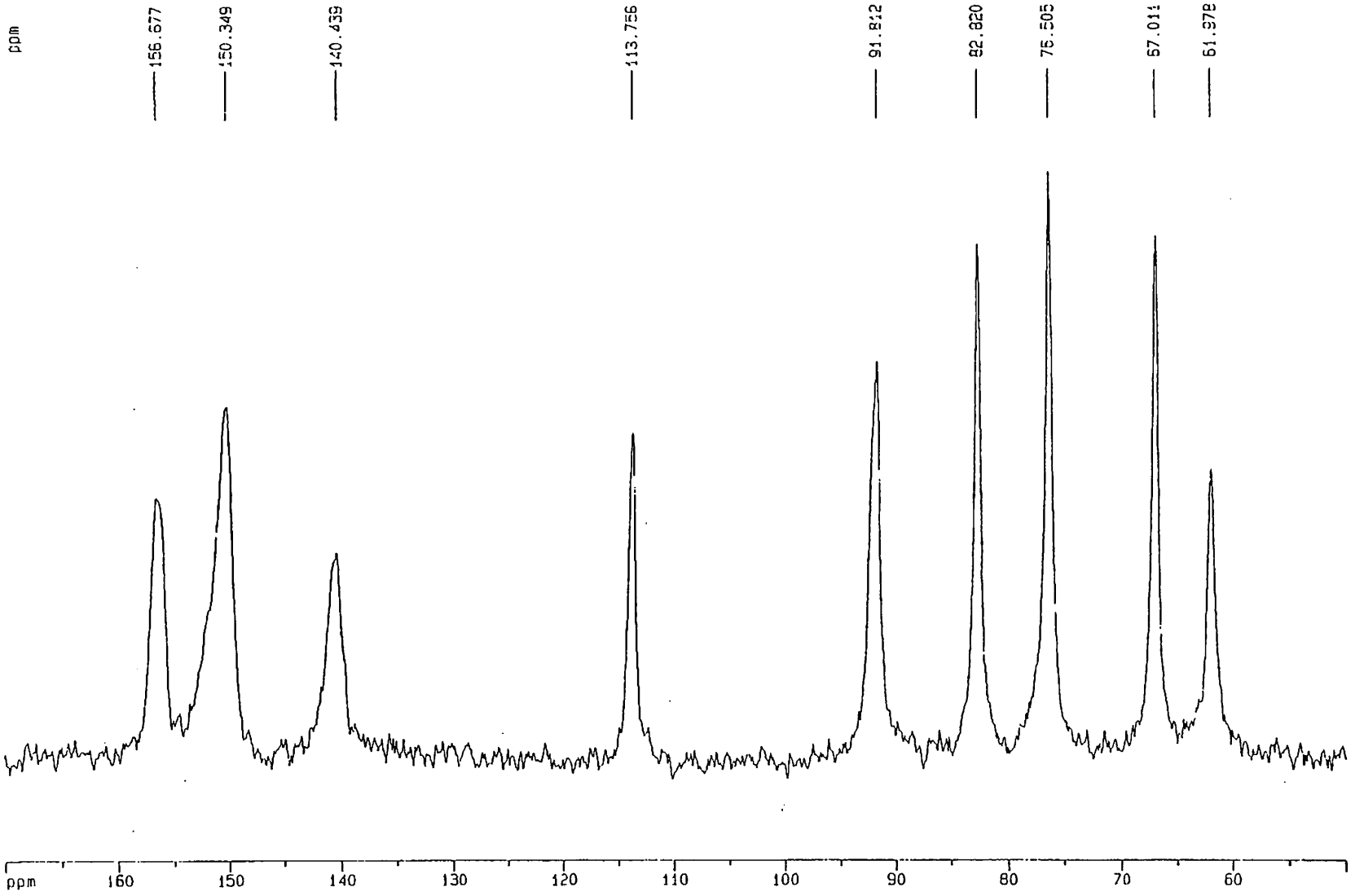
Σχ.31. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NQS NMR του συμπλόκου των ιόντων μαγνησίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (Mg-5΄-GMP·5H_2O)



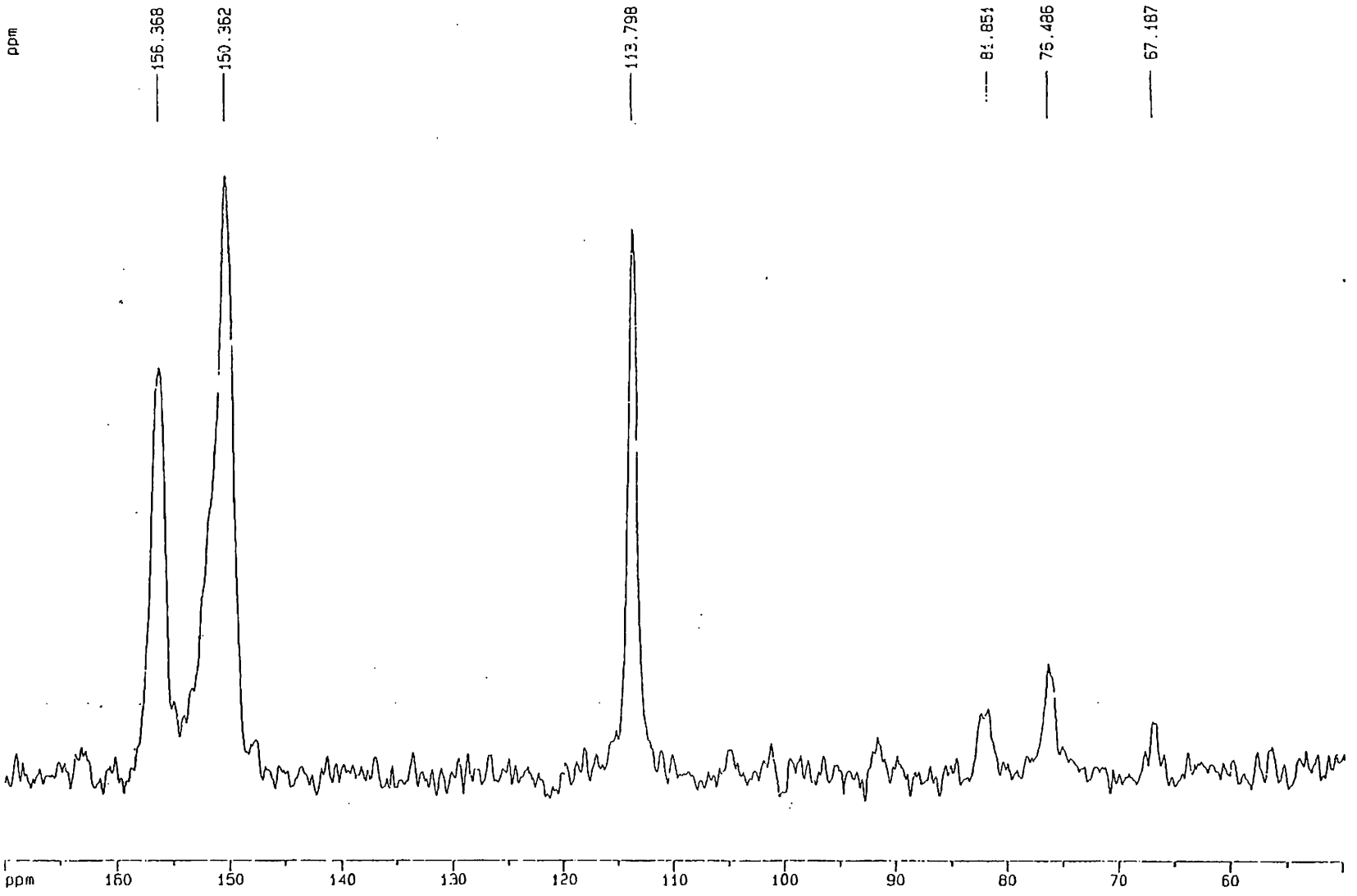
Σχ.32. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR του συμπλόκου των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (Ba-5΄-GMP·5H_2O)



Σχ.33. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NQS NMR του συμπλόκου των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (Ba-5΄-GMP·5H_2O)



Σχ.34. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NMR του συμπλόκου των ιόντων καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (Cd-5΄-GMP·5H_2O)



Σχ.35. Φάσμα ^{13}C CP/MAS NQS NMR του συμπλόκου των ιόντων καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (Cd-5΄-GMP·5H_2O)

Πίνακας 16. Μεταβολή της παραμέτρου Δ[δ(C2΄)-δ(C3΄)] ως συνάρτηση της syn/anti διαμόρφωσης της γουανίνης ως προς το δακτύλιο του σακχάρου, των ενώσεων των ιόντων νατρίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη.

Ένωση	**Δ[δ(C2΄)-δ(C3΄)] (ppm)**	**syn/anti προσανατολισμός**	
		NMR δεδομένα	**X-ray δεδομένα**
5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O	6,0	anti	-
5΄-GMPNa$_2$·6H$_2$O	5,4 5,6	anti	anti[57,58]
Ba-5΄-GMP·5H$_2$O	2,7 3,7	anti	anti[59]
Cd-5΄-GMP·5H$_2$O	9,5	anti	anti[62]

Βλέπουμε δηλαδή από τις τιμές της παραμέτρου Δ[δ(C2΄)-δ(C3΄)], όπως αυτές προκύπτουν με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR ^{13}C CP/MAS σε στερεά κατάσταση, ότι σε όλες τις ενώσεις που εξετάσαμε επικρατεί ο *anti* προσανατολισμός της ριβόζης περί τον γλυκοζιτικό δεσμό. Τα αποτελέσματα αυτά, τα οποία έρχονται σε συμφωνία και με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, αποδεικνύουν ότι και στην περίπτωση αυτή η NMR φασματοσκοπία στερεάς κατάστασης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της διαμόρφωσης αυτών των συμπλόκων. Τα αποτελέσματα της NMR φασματοσκοπίας σε στερεά κατάσταση μάλιστα, γίνονται περισσότερο συγκρίσιμα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα όταν τα σύμπλοκα λαμβάνονται σε κρυσταλλική μορφή.

4. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ^{15}N ΣΤΕΡΕΑΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

Όπως αναφέραμε και στο θεωρητικό μέρος, μία από τις θέσεις όπου μπορεί να συνδεθεί ένα μεταλλικό ιόν με ένα νουκλεοτίδιο είναι το άτομο του αζώτου στη θέση N7 του πουρινικού δακτυλίου. Η θέση αυτή παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον και απασχολεί πολλούς ερευνητές[69]. Ωστόσο η έλλειψη επαρκών κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τη μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων, οδηγεί τους ερευνητές στην επέκταση των NMR μελετών με τη διερεύνηση και άλλων πυρήνων.

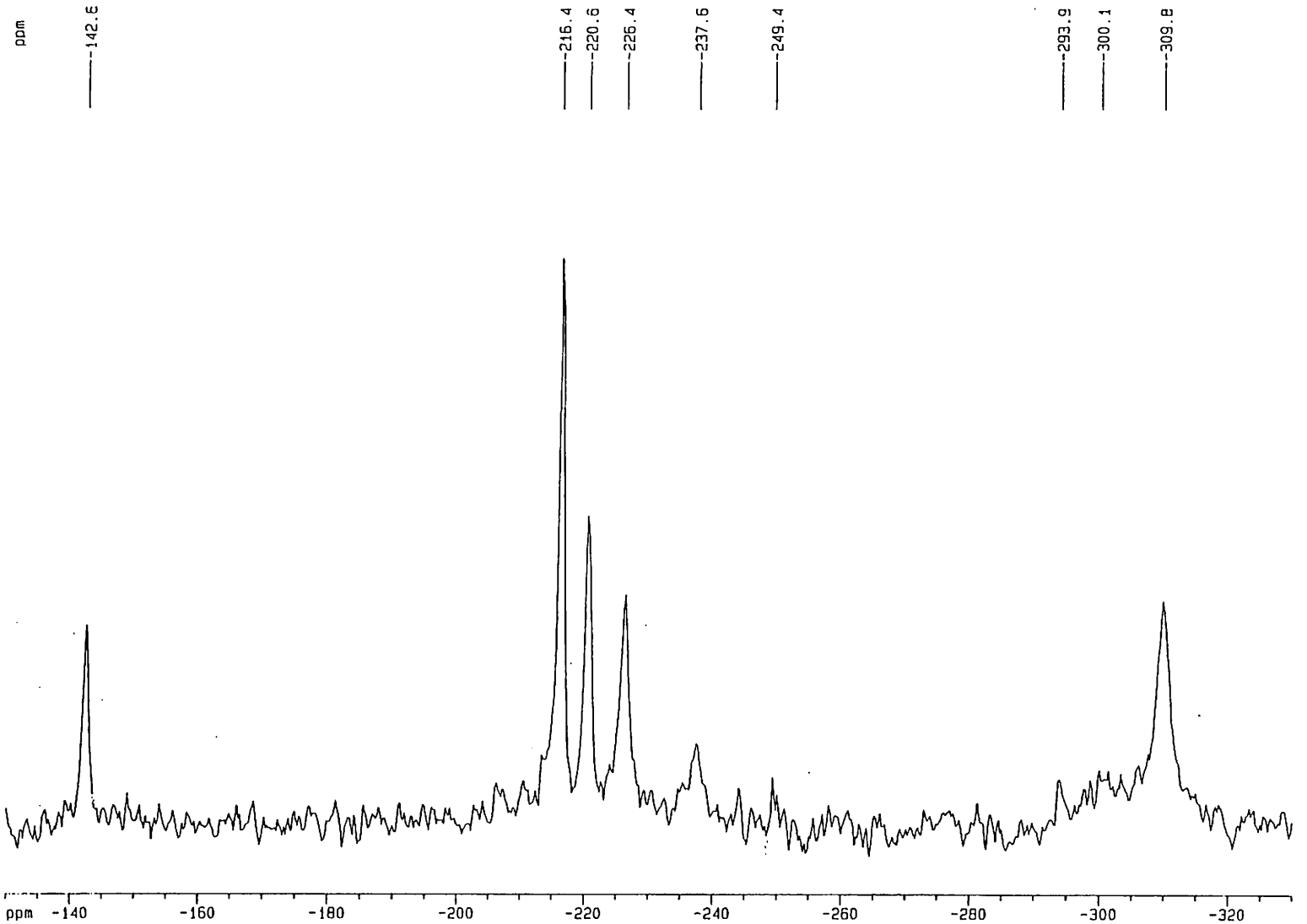
Για να προσεγγίσουμε περισσότερο τη θέση N7 του νουκλεοτιδίου και να διαπιστώσουμε αν συμμετέχει ή όχι σε αντιδράσεις με μεταλλικά ιόντα εφαρμόσαμε την ^{15}N CP/MAS NMR φασματοσκοπία η οποία έχει τη δυνατότητα να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των ατόμων αζώτου του μορίου της ένωσης που μελετάται.

Στο Σχ.36 απεικονίζεται το ^{15}N NMR CP/MAS φάσμα του μετά νατρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης με τρία (3) μόρια νερού (5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$) ενώ στο Σχ. 37 παρατίθεται το αντίστοιχο φάσμα της εξα-ενυδατωμένης ένωσης των ιόντων νατρίου (5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$). Στο πρώτο από τα δύο φάσματα φαίνεται καθαρά ότι σε κάθε ένα από τα πέντε άτομα N της ένωσης, αντιστοιχεί μία πολύ λεπτή κορυφή. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι το άτομο N7 της ένωσης απορροφά στα –142,6 ppm. Οι Markowski, Sullivan και Roberts προκειμένου να ταυτοποίσουν τις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων αζώτου, μελέτησαν μια σειρά νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματά τους βασίστηκαν τόσο στις τιμές της σταθεράς σύξευξης αζώτου-πρωτονίου, $J(^{15}N,^{1}H)$, των πρωτονιωμένων ατόμων αζώτου των πουρινικών ή πυριμιδινικών δακτυλίων, όσο και σε προϋπάρχουσες NMR μελέτες ^{15}N παρεμφερών ενώσεων[70]. Όλες οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των ατόμων αζώτου, των ενώσεων που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία, παρατίθενται στον Πίνακα 18 που ακολουθεί.

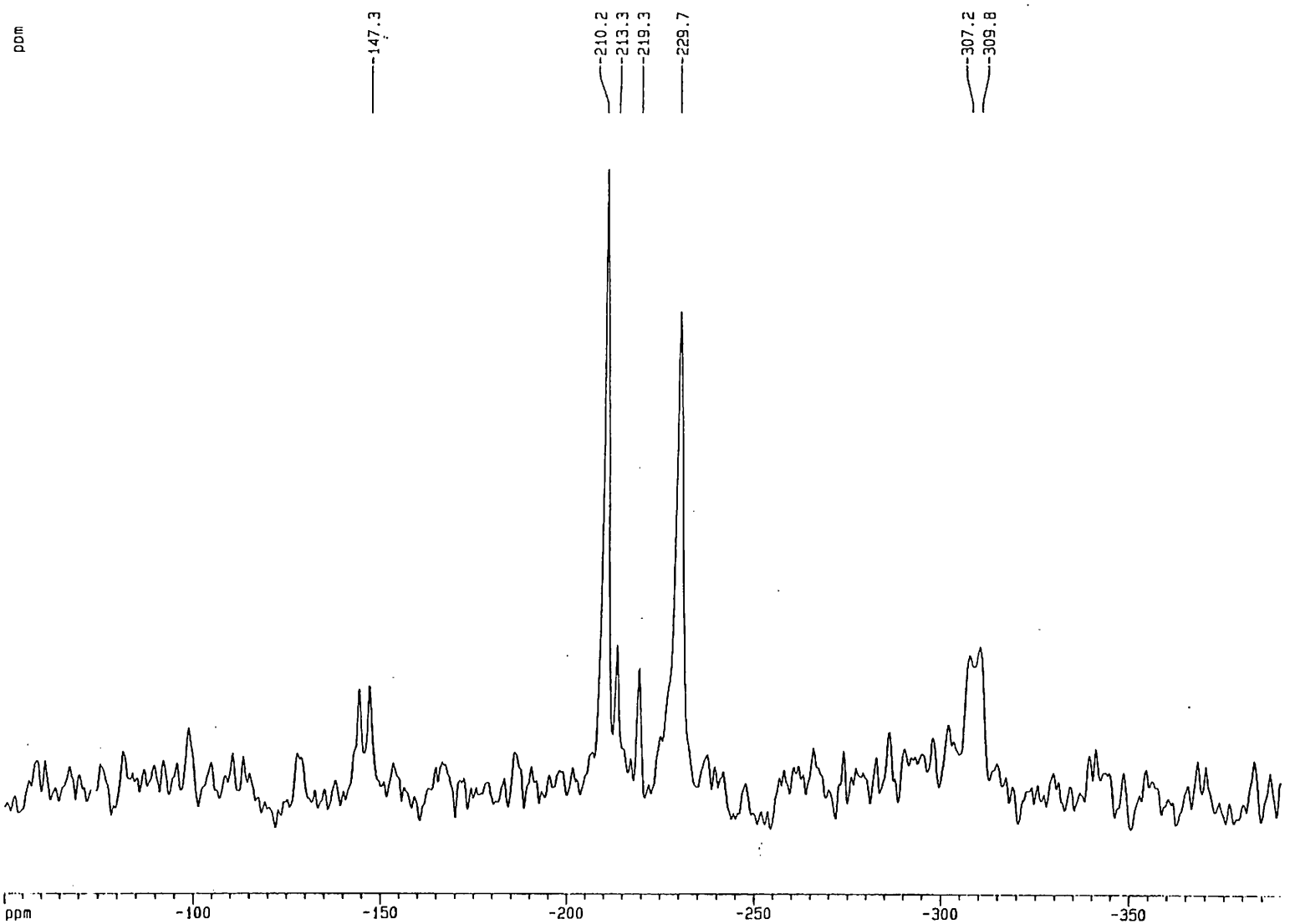
Η ενυδατωμένη ένωση 5΄-$GMPNa_2$ με 6 μόρια νερού, (5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$) δίνει φάσμα του οποίου οι κορυφές υφίστανται σχάση. Οι κορυφές αυτές στα –147,3 (διπλή), -213,3 (-219,3) και –307,2 (-309,8) ppm αποδίδονται στους πυρήνες αζώτου N7, N3 και $-NH_2$ αντίστοιχα. Αυτό υποδηλώνει ότι η αλλαγή του βαθμού ενυδάτωσης επηρεάζει τις μετατοπίσεις των ατόμων αζώτου της ένωσης.

Τα αποτελέσματα αυτά, όπως και στην περίπτωση της φασματοσκοπίας ^{13}C NMR που προηγήθηκε, έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης (5΄-GMPNa$_2$·7H$_2$O)[57,58]. Φαίνεται δηλαδή ότι η ένωση αποτελείται από δύο μη ισοδύναμα νουκλεοτίδια (A, B) (Σχ. 13). Το ιόν του νατρίου υπ'αριθμόν 1 [Na(1)], το οποίο περιβάλλεται από τέσσερα μόρια νερού, γεφυρώνει δύο *cis*-προσανατολισμένα μόρια υποκαταστάτη (5΄-GMP^{2-}) (A και B) μέσω των ατόμων N7(A) και N7(B) της βάσης, με αποστάσεις M-N7 ίσες με 2,419 και 2,611 Å αντίστοιχα (Πίνακας 18).

Στο Σχ.38 απεικονίζεται το φάσμα ^{15}N CP/MAS NMR της ένωσης των ιόντων βαρίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη Ba(5΄-GMP). Παρατηρούμε ότι το N7 δίνει μία απλή κορυφή στα –141 ppm εμφανιζόμενο και σε αυτή την περίπτωση πιο αποπροστατευμένο από ότι το αντίστοιχο άτομο αζώτου του απλού νουκλεοζίτη. Αντίθετα οι κορυφές στα –210,5 (-213,5), -216,1 (-221,1) και –229,6 (-231,1) ppm που αποδίδονται στους πυρήνες N9, N3 και N1 αντίστοιχα, εμφανίζονται ως διπλές εξαιτίας της παρουσίας δύο μη ισοδύναμων μορίων Ba(5΄-GMP) στην ένωση. Τα δεδομένα, όπως προκύπτουν από τη φασματοσκοπία NMR σε στερεά κατάσταση, έρχονται σε συμφωνία με την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Ba(5΄-GMP)[59], στην οποία είναι φανερή η παρουσία δύο νουκλεοτιδίων και δύο κατιόντων βαρίου Ba^{2+} στη μοναδιαία κυψελίδα (Σχ. 18). Το κατιόν του βαρίου υπ'αριθμόν 1 [Ba(1)] της προταθείσας δομής, το οποίο εμφανίζεται έντονα ενυδατωμένο με επτά (7) μόρια νερού στη σφαίρα ένταξής του, φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα N7(A) και N7(B) άτομα αζώτου και των δύο υποκαταστατών (A και B) με αποστάσεις M-N7 ίσες με 2,85 και 3,08 Å αντίστοιχα (Πίνακας 17).



Σχ.36. Φάσμα ^{15}N CP/MAS NMR του τρις-ενυδατωμένου μετά νατρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-GMPNa$_2$·3H$_2$O)



Σχ.37. Φάσμα ^{15}N CP/MAS NMR του εξα-ενυδατωμένου μετά νατρίου άλατος της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης (5΄-GMP$Na_2 \cdot 6H_2O$)

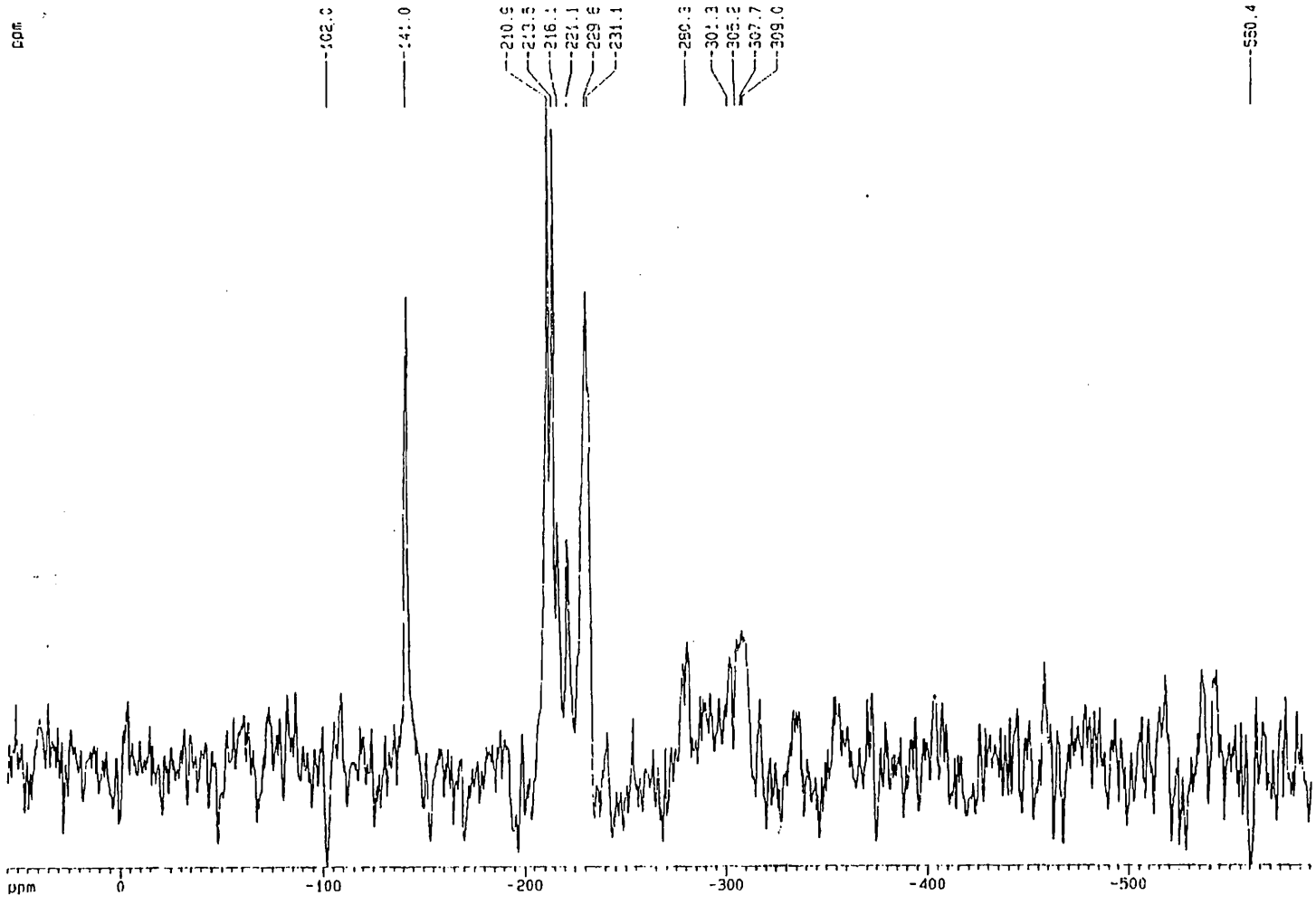
Πίνακας 17. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα που δείχνουν τον τρόπο ένταξης των μεταλλικών ιόντων νατρίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη (5΄-GMP^{2-})

Metal Ion M. I.	Nucleotide	No of M.I.[a]	No of Nucl.[b]	Coord. Numb.	Coordinated Ligands	M-N7 (Å)	M-O(W) (Å)	M-O(P) (Å)	M-O(2΄) (Å)	M-O(3΄) (Å)	M displ. (Å)[c]	Αναφ.
Na^+	5΄-GMP	4	2(A and B)	6	**Na(1)**: 4W, N7(A), N7(B)	2,419/2,611	2,365-2,495				·	
				6	**Na(2)**: Only water O atoms, 6W		2,403-2,758					57
				6	**Na(3)**: Only water O atoms, 6W		2,341-2,618					
				6	**Na(4)**: 4W, O(2')B, O(3')B		**2,271-2,828**		2,471	2.314		
Na^+	5΄-GMP	4	2(A and B)	6	**Na(1)**: N7(A), N7(B), 4W	2,415/2,613	2,346-2,491				0.94(A),	
				6	**Na(2)**: Only water O atoms, 6W		2,382-2,746				0.67(B)	58
				6	**Na(3)**: Only water O atoms, 6W		2,328-2,611					
				6	**Na(4)**: O(2')B, O(3')B, 4W		**2,281-2,803**		2,492	2.305		
Ba^{2+}	5΄-GMP	2	2(A and B)	9	**Ba(1)**: 7W(2 water O atoms bind also with Ba(2)), N7(A), N7(B)	2,85/3,08	**2,69-3,08** 2,78-2,97	2,84	3,01		-	59
				9	**Ba(2)**: 3W, O (phosph.A), O(2')A, O(2')B, O(3')B					2.79,2.77		
Cd^{2+}	5΄-GMP	1	1	6	**Cd(1)**: Five (5) water O atoms and N7 of the guanine ring	2,37	2,24-2,34				0.02	62

[a]Αριθμός μεταλλικών ιόντων (M. I.) ανά μοναδιαία κυψελίδα

[b]Αριθμός νουκλεοτιδίων ανά μοναδιαία κυψελίδα

[c]Απόκλιση του μεταλλικού ιόντος από το επίπεδο της γουανίνης



Σχ.38. Φάσμα ^{15}N CP/MAS NMR του μετά βαρίου συμπλόκου της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης Ba(5΄-GMP)·5H_2O

Στο φάσμα ^{15}N CP/MAS NMR της ένωσης Cd(5΄-GMP), το οποίο δίνεται στο Σχ.39, παρατηρούμε ότι και τα πέντε άτομα αζώτου του συμπλόκου δίνουν πολύ οξείες απλές κορυφές. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα[62] τα οποία δείχνουν μόνον ένα τρόπο ένταξης του μετάλλου στον υποκαταστάτη (Σχ. 20). Αυτός μάλιστα ο τρόπος ένταξης είναι χαρακτηριστικός των συμπλόκων των μεταβατικών και βαρέων μετάλλων με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη, με το γενικό τύπο $[M(5'\text{-GMP})(H_2O)_5]\cdot nH_2O$[1,55]. Τα κοινά χαρακτηριστικά της δομής αυτού του τύπου είναι: (α) Η άμεση ένταξη του μεταλλικού ιόντος στο άτομο N7 της βάσης και (β) η ύπαρξη τριών ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου οι οποίοι σταθεροποιούν τη δομή (ένας μεταξύ ενός μορίου ύδατος της σφαίρας ένταξης του κατιόντος και του O(6) και δύο μεταξύ δύο μορίων ύδατος της σφαίρας ένταξης του κατιόντος και δύο ατόμων O της φωσφορικής ομάδας.

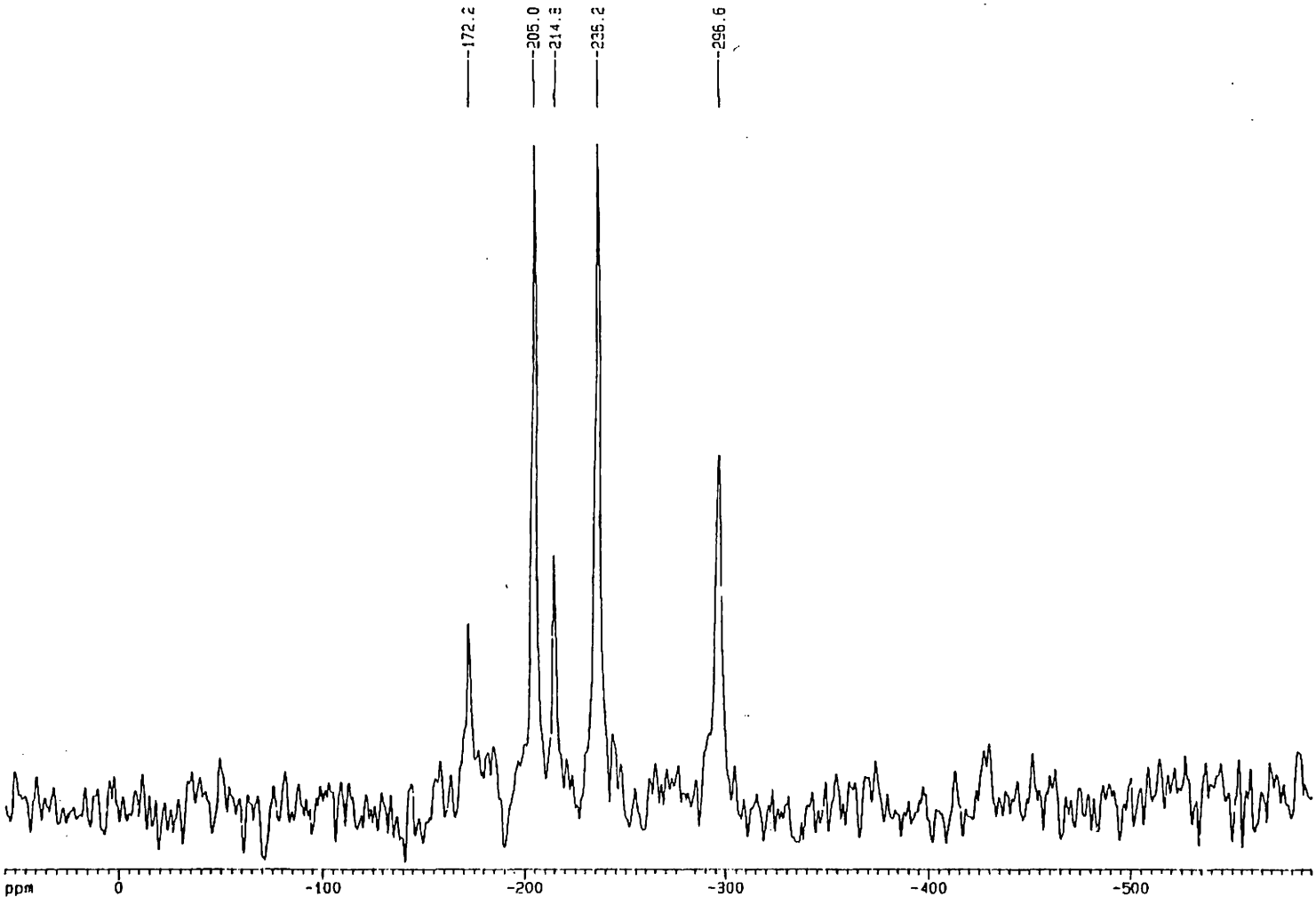
Στη συγκεκριμένη περίπτωση του συμπλόκου του κατιόντος καδμίου ο πυρήνας του ατόμου N7 της γουανίνης εμφανίζεται ισχυρά προστατευμένος κατά 29,6 και 31,9 ppm σε σχέση με τις χημικές μετατοπίσεις του ατόμου N7, των ενώσεων των ιόντων νατρίου και βαρίου αντίστοιχα. Με τον όρο «ισχυρά προστατευμένος» για τον συγκεκριμένο πυρήνα N7 εννοούμε ότι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον εν λόγω πυρήνα είναι σαφώς μεγαλύτερη από ότι τις περιπτώσεις των ενώσεων νατρίου και βαρίου γεγονός που ενισχύει την απευθείας και εντός επιπέδου αλληλεπίδραση του N7 με το κατιόν του καδμίου. Η σημαντική μεταβολή της χημικής μετατόπισης του ατόμου N7 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο τρόπος ένταξης του καθενός από τα εξεταζόμενα κατιόντα στη θέση αυτή του δακτυλίου της βάσης σαφώς διαφοροποιείται. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε αντιπαράθεση με τα συμπεράσματα της κρυσταλλογραφίας. Σε όλες τις προτεινόμενες κρυσταλλικές δομές των ιόντων νατρίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη τα κατιόντα (Na^+, Ba^{2+} και Cd^{2+}) φαίνεται να αντιδρούν άμεσα (direct) και να σχηματίζουν δεσμό με το άτομο του αζώτου στη θέση εφτά (7) του πουρινικού δακτυλίου[57-59,62].

Προκειμένου να εξηγήσουμε την κατάσταση αυτή, εξετάσαμε προσεκτικά όλα τα δεδομένα των προτεινόμενων κρυσταλλικών δομών και προσπαθήσαμε να τα συσχετίσουμε με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας ^{15}N NMR σε στερεά κατάσταση. Καταλήξαμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μία πολύ σημαντική

παράμετρος που έχει καθοριστικό ρόλο στην ισχύ του δεσμού που ενδεχομένως σχηματίζεται μεταξύ του εκάστοτε μεταλλικού ιόντος και του N7. Πρόκειται για την απόκλιση του μεταλλικού ιόντος από το επίπεδο του δακτυλίου της γουανίνης και συνεπώς από την κατεύθυνση του ελεύθερου ζεύγους ηλεκτρονίων που διαθέτει το N7 και το οποίο βρίσκεται επί (in plane) του πουρινικού επιπέδου. Για να γίνει αυτό κατανοητό, αναφέρουμε συγκριτικά δύο χαρακτηριστικές περιπτώσεις, αυτές των ιόντων νατρίου και καδμίου, που όπως φαίνεται αλληλεπιδρούν με το N7 με τελείως διαφορετικό τρόπο.

Το υπ'αριθμόν (1) κατιόν νατρίου [Na(1)] στο μετά νατρίου άλας της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης [Na_2(5΄-GMP)·7H_2O] φαίνεται να σχηματίζει δεσμό με το άτομο N7 μήκους 2,419 Å (Σχ. 13). Η απόσταση αυτή είναι συγκρίσιμη με αυτή του δεσμού που σχηματίζει το κατιόν του καδμίου με το συγκεκριμένο του νουκλεοτίδιο (Cd^{2+}-N(7) = 2,37 Å) (Σχ. 20). Επομένως παραμένει το ερώτημα, γιατί υπάρχει τόσο σημαντική χημική μετατόπιση του πυρήνα του N7 στο σύμπλοκο του καδμίου σε σχέση με το μετά νατρίου άλας [Na_2(5΄-GMP)·6H_2O]. Αν εξετάσουμε προσεκτικά και τις άλλες παραμέτρους της δομής θα δούμε ότι στην περίπτωση της ένωσης του νατρίου, το Na(1) αποκλίνει έντονα από τα επίπεδα των δύο πουρινικών δακτυλίων (A και B) (0,94 Å (22,90^o) and 0,67 Å (14,86^o) αντίστοιχα). Αντίθετα στο σύμπλοκο του καδμίου, το κατιόν φαίνεται να αποκλίνει μόνο 0,01 Å από το επίπεδο της βάσης (Πίνακας 17). Αυτό σημαίνει ότι το ιόν του καδμίου βρίσκεται τοποθετημένο στην προέκταση του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του N7, θέση που του παρέχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με αυτό καλύτερα.

Πρόσφατες μελέτες ^{15}N CP/MAS NMR σε στερεά κατάσταση, πραγματοποιήθηκαν σε σύμπλοκα φέροντα δακτυλίους ιμιδαζολίου[71]. Τα σύμπλοκα αυτά, όπου παρατηρείται άμεση και εντός του επιπέδου ένταξη του μεταλλικού ιόντος (Zn^{2+}) με άτομο αζώτου του ιμιδαζολίου (μήκος δεσμού M-N7 = 2 Å), δείχνουν χημική μετατόπιση για το δεσμευμένο N της τάξεως των –43,3 ppm σε σχέση με τη χημική μετατόπιση του ελεύθερου υποκαταστάτη. Βλέπουμε ότι η διαφορά αυτή των χημικών μετατοπίσεων προσεγγίζει τη διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των συμπλόκων των ιόντων καδμίου και νατρίου (-29,6 ppm).



Σχ.39. ^{15}N *CP/MAS NMR του μετά καδμίου συμπλόκου της 5΄-μονοφωσφορικής γουανοζίνης* $Cd(5'\text{-}GMP)\cdot 5H_2O$

Πίνακας 20. Χημικές μετατοπίσεις (ppm)[a] ^{15}N CP/MAS NMR των ενώσεων των ιόντων νατρίου, βαρίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη σε στερεά κατάσταση[70].

Ένωση	N7	N9	N3	N1	$-NH_2$
$Na_2(5'\text{-}GMP)\cdot 3H_2O$	-142,6	-216,3	-220,5	-226,2	-309,6
$Na_2(5'\text{-}GMP)\cdot 6H_2O$	-147,3	-210,2	-213,3 -219,3	-229,7	-307,2 -309,8
$Ba(5'\text{-}GMP)\cdot 5H_2O$	-141,0	-210,5 -213,5	-216,1 -221,1	-229,6 -231,1	-307,7 -309,0
$Cd(5'\text{-}GMP)\cdot 5H_2O$	-172,2	-205,0	-214,8	-236,2	-296,6

[a] Οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^{15}N υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας, ως εξωτερική ένωση αναφοράς, υγρό νιτρομεθάνιο

Στην περίπτωση του συμπλόκου των ιόντων Mg^{2+} με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη, είδαμε τόσο από τη φασματοσκοπία NMR ^{31}P όσο και από τη φασματοσκοπία NMR ^{13}C σε στερεά κατάσταση, ότι δίνει φάσματα με σημαντική διεύρυνση των κορυφών. Αυτό οφείλεται όπως προαναφέραμε στο γεγονός ότι το σύμπλοκό μας δεν έχει κρυσταλλική δομή. Εξαιτίας, λοιπόν, της μη κρυσταλλικότητας του συμπλόκου δεν ήταν δυνατή η λήψη φασμάτων ^{15}N NMR σε στερεά κατάσταση.

Γίνεται φανερό, ότι το μέγεθος των αλλαγών των χημικών μετατοπίσεων, τουλάχιστον σε μία πρώτη προσέγγιση, μπορεί να συσχετιστεί με την ισχύ του δεσμού του αζώτου με το εκάστοτε μεταλλικό ιόν και η οποία συνδέεται άμεσα όπως είδαμε με την απόκλιση του μεταλλικού ιόντος από το επίπεδο του δακτυλίου της βάσης του υποκαταστάτη. Αυτή μάλιστα η συσχέτιση θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδειχτεί ιδιαίτερα σημαντική σε περιπτώσεις όπου γίνεται προσπάθεια διερεύνησης του τρόπου αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων θέσεων τμημάτων του DNA και RNA με μεταλλικά ιόντα.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο τρόπος αλληλεπίδρασης των μεταλλικών ιόντων νατρίου, βαρίου, μαγνησίου και καδμίου με την 5΄-μονοφωσφορική γουανοζίνη. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπικές μέθοδοι υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και πολυπυρηνικού (^{31}P, ^{13}C και ^{15}N) μαγνητικού συντονισμού στερεάς κατάστασης. Η σύγκριση έγινε επίσης με υπάρχουσες κρυσταλλικές δομές προκειμένου να διαπιστωθεί η σύμπτωση πληροφοριών που προέρχονται από τις εφαρμοσθείσες μεθόδους μελέτης της δομής. Αυτό κρίθηκε σημαντικό καθώς δεν είναι πάντα εφικτό να παραλαμβάνουμε κρυστάλλους των προς μελέτη συμπλόκων όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του συμπλόκου του μαγνησίου.

Από τη φασματοσκοπία υπερύθρου απορρόφησης με μετασχηματισμό Fourier προέκυψε ότι τα ιόντα Na^+ και Ba^{2+} δίνουν διαμορφώσεις της ριβόζης *C2΄-endo,anti*. Αντίθετα τα ιόντα Mg^{2+} και Cd^{2+} δίνουν διαμορφώσεις της ριβόζης *C3΄-endo,anti*. Στην περίπτωση της ένωσης 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$ διαπιστώθηκε ότι συνυπάρχουν οι δύο διαμορφώσεις με επικρατέστερη την *C2΄-endo,anti*. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι τα ιόντα Mg^{2+} και Cd^{2+} συνδέονται άμεσα με το N7 του νουκλεοτιδίου. Τα ιόντα Na^+ και Ba^{2+} φαίνεται ότι δίνουν δύο τύπους σύνδεσης με το N7, άμεσο και έμμεσο, όπως φαίνεται και από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

Από τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{31}P στερεάς κατάστασης φαίνονται οι μεταβολές που προκαλούν τα μεταλλικά ιόντα στο ηλεκρονιακό περιβάλλον της φωσφορικής ομάδας. Σε όλες της περιπτώσεις, εκτός αυτής του 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$, είδαμε την ύπαρξη πλήρους ασυμμετρίας όπως προέκυψε από τις διαφορετικές τιμές των τριών συνιστωσών του τελεστή χημικής μετατόπισης. Η ασυμμετρία αυτή οφείλεται στον τρόπο αλληλεπίδρασης των μεταλλικών ιόντων με τα οξυγόνα της φωσφορικής ομάδας μέσω μορίων ύδατος. Από την εμφάνιση σαφώς διακεκριμένων απορροφήσεων ^{31}P στα φάσματα των συμπλόκων φαίνεται ότι συνυπάρχουν διαφορετικές διατάξεις της φωσφορικής ομάδας. Τα αποτελέσματα είναι σε πλήρη συμφωνία τόσο με υπάρχουσες

κρυσταλλικές δομές όσο και με τις σχετικές μεταβολές, της περιοχής όπου εμφανίζονται οι δονήσεις της φωσφορικής ομάδας, στα φάσματα υπερύθρου. Το σύμπλοκο του μαγνησίου έδωσε φάσματα με μεγάλη διεύρυνση των κορυφών, γεγονός που οφείλεται στη μη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου.

Από τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{13}C στερεάς κατάστασης, λόγω των ευκρινών φασμάτων, προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με τη διαμόρφωση της ριβόζης των συμπλόκων και τον προσανατολισμό *syn/anti* της βάσης ως προς το δακτύλιο του σακχάρου του νουκλεοτιδίου. Έτσι παρατηρήθηκε ότι η διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης των ενώσεων 5΄-$GMPNa_2 \cdot 3H_2O$, Mg-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$ και Cd-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$ είναι *C3΄-endo*, ενώ αντίθετα για τις ενώσεις 5΄-$GMPNa_2 \cdot 6H_2O$ και Ba-5΄-$GMP \cdot 5H_2O$ είδαμε ότι επικρατεί η *C2΄-endo* διαμόρφωση. Επιβεβαιώνεται επίσης η επίδραση του αριθμού των συντεταγμένων μορίων νερού στις ενώσεις M(5΄-GMP)$\cdot xH_2O$. Η τεχνική αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της επίδρασης του βαθμού ενυδάτωσης σε συστήματα όπως αυτά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ή και πιο πολύπλοκων ακόμα κάνοντας λόγο για τη μελέτη μικρών τμημάτων DNA ή RNA. Από τη διαφορά Δ[δ(C2΄)-δ(C3΄)] είδαμε ότι σε όλες τις ενώσεις μας ο προσανατολισμός της βάσης περί τον β-N γλυκοζιτικό δεσμό είναι *anti*.

Τέλος από τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{15}N στερεάς κατάστασης φαίνεται για μια ακόμη φορά η επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης επί των μετατοπίσεων του αζώτου. Επίσης διαπιστώθηκε ότι στην περίπτωση του συμπλόκου του κατιόντος καδμίου ο πυρήνας του ατόμου N7 της γουανίνης εμφανίζεται ισχυρά προστατευμένος κατά 29,6 και 31,9 ppm σε σχέση με τις χημικές μετατοπίσεις του ατόμου N7, των ενώσεων των ιόντων νατρίου και βαρίου αντίστοιχα. Η διαπίστωση αυτή ερμηνεύεται αν ληφθεί υπόψη ότι τα ιόντα νατρίου και βαρίου (Na^+, και Ba^{2+}) αποκλίνουν από το επίπεδο του πουρινικού δακτυλίου, ενώ το ιόν του καδμίου (Cd^{2+}) βρίσκεται εντός του επιπέδου της βάσης του νουκλεοτιδίου, γεγονός που του επιτρέπει να αλληλεπιδράσει με το N7 του δακτυλίου πιο ισχυρά. Φαίνεται ότι οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^{15}N σε στερεά κατάσταση μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για τον καθορισμό της έντασης του δεσμού ενός μεταλλικού ιόντος με μόρια βιολογικής σημασίας όπως είναι τα νουκλεοτίδια. Είναι δυνατόν κατ' επέκταση οι φασματοσκοπικές μέθοδοι να μας δώσουν ασφαλείς πληροφορίες για τη διαμόρφωση των DNA και RNA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. R. W. Gellert and R. W. Bau in "*Metal Ions in Biological Systems*" (1979), eds. A. Sigel and H. Sigel, **Vol. 8**, pp. 1-54
2. J. Anastassopoulou, T. Theophanides in "*Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. D. P. Kessissoglou, Kluwer Academic Publishers, pp. 209-218
3. Κ. Μπαρμπαρόσου, «*Φασματοσκοπική Μελέτη Συμπλόκων Ιόντων Μαγνησίου και Μαγγανίου με 5΄-Μονοφωσφορική Γουανοζίνη*», Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Χημικών Μηχανικών (1997), και οι αναφορές εντός αυτής
4. T. Theophanides in "*Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Molecules*" (1979), ed. Theo M. Theophanides, pp. 187-204
5. L.G. Margilli, T.J. Kistenmacher, G.L. Eichhorn in "*Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*" ed. T.G. Spiro, eh. 5, pp. 179-250
6. W. Saenger in "*Principles of Nucleic Acid structure*" (1984), C.R Cantor ed., Springer-Verlag, New York Inc
7. A. Aoki in "*Metal Ions in Biological Systems*" (1996), eds. A. Sigel, H. Sigel, **Vol. 32**, Marcel Dekker, New York, pp. 91-134
8. T. Theophanides in "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, Marcel Dekker, Inc., New York, **Vol. 2**, pp. 1019-1023
9. T. Theophanides in "*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*" (1984), ed., T. Theophanides, D. Reidel Publishing Company, pp. 105-124
10. M. Calvin, "*Carcinogenesis*" (1974), **19**, 9, 683-698
11. C. Klevickis, C. M. Grisham in "*Metal Ions in Biological Systems*", (1996), **Vol. 32**, eds. A. Sigel and H. Sigel, pp. 1-26

12. P.C. Wilkins, R.G. Wilkins in "*Inorganic Chemistry in Biology*" (1997), Oxford Chemlstry Primers, Oxford University Press, pp. 29-37
13. J.J.R. Frausto Da Silva, R.J.P Williams in "*The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*" (1994), Clarendon Press, Oxford p. 484
14. D.M.L. Goodgame, I. Jeeves, C.D.Reynolds, A.C.Skapski, *Nucleic Acids Research* (1975), **2**, 8, 1375-1379
15. L. Stryer, "*Biochemistry*" (1988), ελληνική έκδοση (1995), τόμος 2ος, κεφ. 27, σελ. 707-714
16. T. Theophanides and J. Anastassopoulou, in "*Equilibri in soluzione, Aspeti teorici, sperimentali ed applicaviti*" (1988) eds. C. La Mesa, A. Napoli, N.Russo & M. Toscano, Mara Editore, Italy, pp. 122-140
17. *Handbook of Chemistry and Physics*, 62nd ed. (1981-1982), CRC PRESS Inc., eds. R.C. Weast, M.J. Astle, E-65-E-66
18. M. Gulumian, R.D. Hancock, H.B. Röllin in "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, **Vol. I**, Part 1, Chapt. 4, Sect. A, pp. 93-107
19. L.J. Anghileri, P. Collery, P. Coudoux, J. Durlach, *Magnesium-Bulletin* (1981), **1**, 1-5
20. T. Theophanides, M. Polissiou, *Inorganica Chimica Acta* (1981), **56**, L1-L3
21. J. Durlach, M. Bara, A. Guiet-Bara, P. Collery, *Anticancer Research* (1986), **6**, 1353-1362
22. T. Theophanides, M. Polissiou, *Magnesium* (1986), **5**, 221-233
23. T. Theophanides, *Intern. J. of Quantum Chem.* (1984), **XXVI**, 933-941
24. T. Theophanides, *Can. J. Spectrosc.* (1981), **26(3)**, 165-179
25. M A Geday, G De Munno, M Medaglia, J Anastasopoulou & T Theophanides, *Angewante Chemie, Int. Ed. Engl.* (1997), **36**, 511
26. J. Anastassopoulou, A.G. Andreopoulos, T. Theophanides in "*Current Research in Magnesium*" (1996), eds. M.J. Halpern, J. Durlach, John Libbey & Company Ltd./7th International Magnesium Symposium, pp. 137-140
27. *Handbook of Chemistry and Physics*, 62nd ed. (1981-1982), CRC PRESS Inc., eds. R.C. Weast, M.J. Astle, F-175

28. R. B. Martin in "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, **Vol. I**, Part 1, Chapt. 3, Sect. A, pp. 33-41
29. D. Beyersmann in "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, **Vol. II**, Part 4, Chapt. 2, Sect. A, p. 813
30. J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter in "*Inorganic Chemistry, Principles of Structure and Reactivity*" (1993), 4th edition, HarprerCollins College Publishers, pp. 344-358
31. R.B. Martin, "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, **Vol. II**, Part 4, Chapt. 2, Sect. B, pp. 827-833
32. E.A. Conner, B.A. Fowler in "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, **Vol. II**, Part 4, Chapt. 2, Sect. C, 834-837
33. a). J. Bariyanga and T. Theophanides, *Inorganica Chimica Acta* (1985), 133-140, b). T. Theophanides, J. Anastassopoulou in "*Spectroscopy of Biological Molecules. New Advances*" (1988), eds. E.D. Schmid, F.W. Schneider, F. Siebert, Wiley Chichester, pp. 433-438
34. V. Nair and D.A. Young, *Magn. Res. Chem.* (1987), **25**, 937-940
35. N. Yathindra, M. Sundaralingam, *Biopolymers* (1973), **12**, 2075-2082
36. R. B. Martin in "*Metal Ions in Biological Systems*" (1996), **Vol. 32**, eds. A. Sigel and H. Sigel, pp. 61-89
37. W. Saenger, *Ang.Chem.Int.Ed. in English* (1973), **12**, 8, 591-682
38. S. Yano, M. Otsuka in *Metal ions in biological systems* (1996), **32**, eds. Astrid Sigel and Helmut Sigel, 27-60
39. Θ. Θεοφανίδης, Ι. Αναστασοπούλου, «*Φασματοσκοπία Δονήσεων-Συμμετρία*», (1997), Αθήνα
40. Χ. Καλοδήμος, «*Σύνθεση και Φασματοσκοπική Μελέτη με τη Χρήση Πολυπυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Αιμοπρωτεϊνών και Προτύπων Ενώσεων του Ενεργού τους Κέντρου σε Διάλυμα και σε Στερεά Κατάσταση*», Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (1999)

41. C. A. Fyfe in "*Solid State NMR for Chemists*" (1983), C.F.C. Press, Guelph, Ontario
42. R. K. Harris in "*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*" (1994), Longman Scientific & Technical, N.Y., p. 153
43. M. Mehring, "*High Resolution NMR Spectroscopy in Solids*" (1983), Springer Verlag, Berlin
44. H. Günther in "*NMR SPECTROSCOPY, Basic principles, concepts and applications in chemistry*" (1998), 2nd ed. by John Wiley & Sons Ltd.
45. I.P.Gerothanassis, P.J.Barrie, B. Birdsall, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* (1994) **226**, 211-218
46. A. Pines, M.G.Gibby, I.S.Waugh, *J. Chem. Phys.* (1973), 59, 569-577
47. U. Haeberlen, *Adv. Magn. Reson.* (1976), 1-190
48. H. A. Tajmir-Riahi, T. Theophanides in "*Structure & Motion: Membranes, Nucleic Acids & Proteins*" (1985), eds. E. Clementi, G. Corongiu, M. H. Sarma & R. H. Sarma, pp. 521-530
49. T. Theophanides, H. A. Tajmir-Riahi in "*Spectroscopy of Biological Molecules*" (1984), eds. C. Sandorfy, T. Theophanides, Reidel Publishing Company, pp. 137-152
50. H. A. Tajmir-Riahi, T. Theophanides, *Can. J. Chem.* (1984), **62**, 266-272
51. H. A. Tajmir-Riahi, T. Theophanides, *Inorganica Chimica Acta* (1983), **80**, 223-230
52. H. A. Tajmir-Riahi, T. Theophanides, *Can. J. Chem.* (1983), **61**, 1813-1822
53. H. A. Tajmir-Riahi, T. Theophanides, *Can. J. Chem.* (1985), **63**, 2065
54. H. A. Tajmir-Riahi, *Biopolymers*, (1991), **31**, 101-108
55. T. Theophanides, J. Anastassopoulou in "*Spectroscopy of Biological Molecules. New Advances*" (1988), eds. E.D. Schmid, F.W. Schneider, F. Siebert, Wiley Chichester, pp. 433-438
56. T. Theophanides in "*Spectroscopy of Inorganic Bioactivators. Theory and Applications-Chemistry, Physics, Biology, and Medicine*" (1989), ed. T. Theophanides, Kluwer Academic Publishers, pp. 265-272
57. S. K. Katti, T. P. Seshadri and M. A. Viswamitra, *Acta Cryst.* (1981), **B37**, 1825-1831
58. C. L. Barnes and S. W. Hawkinson, *Acta Cryst.* (1982), **B38**, 812-817

59. M.E.A. Churchill, R.G.Prichard, M. Helliwell, *Acta Cryst.* (1992), **C48**, 1223-1227

60. M. De la Fuente, R. Navarro, A. Hernanz, T. Theophanides in "*Metal Ions in Biology and Medicine*" (1992), eds. J. Anastassopoulou, Ph. Collery, J.C. Etienne, T. Theophanides, John Libbey Eurotext, Paris, **2**, pp. 111-112

61. S. Alex, P. Dupuis, *Inorganica Chimica Acta*, (1989), **157**, 271-281

62. K. Aoki, *Acta Cryst.* (1976), **B32**, 1454-1459

63. S. J. Kohler, J. D. Ellett Jr., M. P. Klein, *J. Chem. Phys.* (1976), **64**, 11

64. M. Ebrahimi, C. Rogers, and G.S. Harbison, in "*Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends*" (1997), eds. P. Carmona et al., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 209-212

65. S. Cheatham *Concepts in Biochemistry* (1989) **66**, 2, 111-117

66. C-j. Chang, *J. Org. Chem.* (1982), **47**, 5318-5321

67. M. de la Fuente Rubio, in "*Interacciones metal-nucleotidos. Estudio por espectroscopia vibracional y de NMR*" (2000), Thesis Doctoral, Universidad Nacional de Educacion a Distancia Facultad de Ciencias, Madrid

68. R.A. Santos, P. Tang and G.S. Harbison, *Biochemistry* (1989), **28**, 9372-9378

69. T. Theophanides in "*Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids, Bioinorganic Chemistry*" (1995), ed. G. Berthon, Marcel Dekker, Inc., New York, **Vol. 2**, pp. 1019-1023

70. V. Markowski, G.R. Sullivan, J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* (1977), **99**, 714-718

71. N. Lalioti, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, A.E. Aliev, S.P. Perlepes, I.P. Gerothanassis and E. Manessi-Zoupa, *Chem. Commun.* (1998), 1513-1514