



Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Ανάλυση λιπιδίων και βιοδραστικών συστατικών του  
γάλακτος με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού  
συντονισμού (NMR) και χρήση αντιδραστηρίου μετατόπισης  
λανθανιδίου»**

**Νίκη Παπανικολάου**

**Χημικός**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024**





Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Ανάλυση λιπιδίων και βιοδραστικών συστατικών του  
γάλακτος με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού  
συντονισμού (NMR) και χρήση αντιδραστηρίου μετατόπισης  
λανθανιδίου»**

**Νίκη Παπανικολάου**

**Χημικός**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024**





Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 18/12/2023

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Κωνσταντίνος Τσιαφούλης, Μέλος ΕΔΙΠ

Μέλη:

Αχιλλέας Γαρούφης, Καθηγητής

Αναστασία Μπαδέκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Θέμα: «Ανάλυση λιπιδίων και βιοδραστικών συστατικών του γάλακτος με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και χρήση αντιδραστηρίου μετατόπισης λανθανιδίου »

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 08-07-2024

Ο πρόεδρος του Τμήματος Χημείας,  
Χημείας

Πλακατούρας Ιωάννης, Καθηγητής

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ξανθή Τουτουτζόγλου



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων , υπό την επίβλεψη της τριμελούς επιτροπής που ορίστηκε για την αξιολόγηση και έγκριση της εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Τσιαφούλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του θέματος, για την καθοδήγηση καθώς και για την υποστήριξή του κατά τη διεξαγωγή της έρευνας, τη συγγραφή της διπλωματικής αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ακόμα, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Αχιλλέα Γαρούφη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου προσέφερε, αλλά και την κα Αναστασία Μπαδέκα ,Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμμετοχή της στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου, τις φίλες και τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξη, που μου προσέφεραν και συνεχίζουν να μου προσφέρουν σε κάθε μου βήμα.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	13
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	17
1. 1. Γενικά για το γάλα .....	18
1.1.2 . Υδατοδιαλυτό προφίλ .....	19
1.1.1. Σύσταση του γάλακτος .....	19
1.1.3. Λιπίδια στο γάλα .....	20
1.1.4. Ακόρεστα λιπαρά οξέα (Unsaturated Fatty Acids, UFA) .....	21
1.1.5. Οι κυριότερες ενώσεις λιπαρών οξέων .....	26
1.1.6. Επιλεγμένες δομές ενδιαφέροντος .....	28
1.1.7. Απαραίτητα λιπαρά οξέα .....	29
1.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR .....	34
1.2.1. Αρχή Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Συντονισμού .....	34
1.2.2. Χημικές επιδράσεις(παράμετροι) στη φασματοσκοπία NMR .....	34
1.2.3 .Η έννοια της χημικής μετατόπισης .....	34
1.2.4 .Σταθερά σύζευξης και πολλαπλότητα κορυφών συντονισμού .....	35
1.2.5 .Πολλαπλότητα σήματος –ο κανόνας( n+1) .....	35
1.2.6 .Φασματοσκοπία NMR πρωτονίου, άνθρακα .....	36
1.2.6.1. Φασματοσκοπία $^1\text{H}$ NMR .....	36
1.2.6.2 Φασματοσκοπία $^{13}\text{C}$ NMR .....	38
1.2.7 Μέθοδος Μέτρησης του Χρόνου Χαλάρωσης Spin-Lattice ( $T_1$ ) στη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) Μηδενικού Σημείο.....	40

1.2.8 DOSY.....	40
1.3 2D Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (2D NMR).....	41
1.4 Αντιδραστήρια χημικής μετατόπισης .....	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	
2.Μελέτη γάλακτος με φασματοσκοπία NMR .....	46
2.1. Ολεφινικά πρωτόνια.....	47
2.2. Ολεφινικά πρωτόνια σε συζευγμένους διπλούς δεσμούς.....	48
2.3 .Πρωτόνια γλυκερίνης.....	49
2.4.Δι-αλλυλικά Πρωτόνια.....	49
2.5.Πρωτόνια α-CH <sub>2</sub> , Αλλυλικά CH <sub>2</sub> -CH=CH και (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> .....	50
2.6.Τερματικά πρωτόνια CH <sub>3</sub> .....	50
2.7. NMR για επιλεγμένους αναλύτες.....	51
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	52
3.1. Πειραματική Πορεία.....	52
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
4.1 .Μελέτη λιπιδικού προφίλ του γάλακτος με την ακολουθούμενη κατεργασία δείγματος .....	56
4.2.1. Επίδραση LSR.....	60
4.2.1.1. Συγκριτική αξιολόγηση <sup>1</sup> H φασμάτων για δυο επίπεδα συγκέντρωσης της λιπιδικής φάσης.....	62
4.2.2.2 . Συγκριτική αξιολόγηση <sup>1</sup> H φασμάτων για δύο επίπεδα συγκέντρωσης της λιπιδικής φάσης κατά την προσθήκη (10 και 5 μL ) 1,4 και 0,53 mM LSR για τα LM25-10(0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) αντίστοιχα.....	68

4.2.Πρωτονιακά φάσματα κατά την διαδοχική προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντιδραστηρίου .....	78
4.2.2. Επίδραση LSR στον χρόνο αποδιέγερσης spin-πλέγματος ( $T_1$ ) .....	120
4.2.3.Μελέτη επίδρασης του LSR στη σταθερά διάχυσης, $D$ .....	124
4.2.3.1.Επίδραση της συγκέντρωσης. ....	127
4.2.3.2.Επίδραση της προσθήκης LSR.....	127

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

5.Επίδραση έντασης μαγνητικού πεδίου στην διάκριση των Λιπαρών Οξέων (Λ.Ο.)(Πεδίο 250 και 500 MHz).....	130
5.1.Επίδραση της προσθήκης αντιδραστηρίου μετατόπισης.....	135
5.2.Σύγκριση $^1\text{H}$ NMR φασμάτων σε μαγνητικά πεδία έντασης 9.4 και 11.7 T (Πεδίο 400 και 500 MHz).....	141

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

6.Μελέτη της φασματικής περιοχής στα 0,9 ppm που εμπεριέχει τις μεθυλομάδες των $\omega$ -3 ΛΟ.....	149
6.1 Αλληλεπίδραση συριγκαλδεΐδης ως πρότυπη ένωση με δείγμα γάλακτος παρουσία αντιδραστηρίου LSR.....	158

<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	164
---------------------------	-----

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	171
---------------------------	-----





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, αποτελεί βασικό διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο. Η αυξημένη κατανάλωσή του επιβάλλει στους παραγωγούς την ανάγκη για αξιόπιστες μεθόδους ελέγχου της ποιότητας και αυθεντικότητας.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε την μέθοδο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) που είναι μια μη καταστροφική μέθοδος ,δηλαδή τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν χωρίς να αλλοιωθεί η σύνθεση ή οι ιδιότητες τους.

Η εργασία εξετάζει επίσης την αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου μετατόπισης Europium [tris(3-trifluoromethyl-hydroxymethylene)-(+)-camphorate] (LSR) με τα λιπίδια στο γάλα.

Η χρήση LSR μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση λιπιδικών συστατικών, ξεπερνώντας περιορισμούς της ανάλυσης σε χαμηλής έντασης μαγνητικά πεδία. Η προσθήκη LSR επηρεάζει επίσης τη χημική μετατόπιση, τον χρόνο χαλάρωσης T1 και τον συντελεστή διάχυσης D των λιπαρών οξέων, βελτιώνοντας την ανάλυση επικαλυπτόμενων κορυφών και την ακριβή εκτίμηση των συγκεντρώσεων των συστατικών.

Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών τύπων λιπιδίων και άλλων ενώσεων, όπως η 2-βουτανόνη.



## **ABSTRACT**

Milk, rich in nutrients, is a basic nutritional element for humans. Its increased consumption imposes on producers the need for reliable methods of quality control and authenticity.

In the present work we applied the nuclear magnetic resonance (NMR) method which is a non-destructive method, i.e. the samples can be analyzed without altering their composition or properties.

The paper also examines the interaction of Europium shift reagent [tris(3-trifluoromethyl-hydroxymethylene)-(+)-camphorate] (LSR) with lipids in milk.

The use of LSR can help distinguish lipid components, overcoming limitations of resolution in low-intensity magnetic fields. The addition of LSR also affects the chemical shift, relaxation time  $T_1$ , and diffusion coefficient  $D$  of fatty acids, improving the resolution of overlapping peaks and accurate estimation of component concentrations.

This technique allows the distinction between different types of lipids and other compounds, such as 2-butanone.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα είναι ένα μοναδικό προϊόν που περιλαμβάνει σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών όπως ασβέστιο, πρωτεΐνες και βιταμίνες. Μπορεί να θεωρηθεί ως το «μαγικό υγρό» λόγω της πλούσιας και ποικίλης σύνθεσής του και των επιβεβαιωμένων οφελών του στα νεογνά.(Soyler et al., 2021).Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι από τις βασικότερες τροφές του ανθρώπου λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας. Η αυξημένη κατανάλωσή τους έχει συμβάλει στην ανάγκη των γαλακτοβιομηχανιών να εφαρμόζουν ελέγχους για τον προσδιορισμό της σύστασης των προϊόντων αυτών ώστε να διασφαλίζεται η ασφάλεια και η ποιότητά τους. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διάκριση των προϊόντων που προέρχονται από διαφορετικά συστήματα εκτροφής, ζώα ή στρατηγικές διατροφής, προέλευσης κ.λπ. . Οι παραδοσιακές μέθοδοι όπως οι χρωματογραφικές τεχνικές ή οι αισθητηριακές αναλύσεις ενδέχεται να απαιτούν χειριστές υψηλής εξειδίκευσης και δεν θα μπορούσαν εύκολα να προσαρμοστούν στην ηλεκτρονική παρακολούθηση. Επιπλέον, μπορεί να είναι χρονοβόρες και ακριβές. Οι μέθοδοι εύκολης, γρήγορης χρήσης, ελάχιστης απαίτησης χημικών αντιδραστηρίων ήταν πάντα προς το συμφέρον των κατασκευαστών για τη διασφάλιση της ποιότητας και της αυθεντικότητας. (Αλεξοπούλου ,2021)

Υπάρχουν αρκετές φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό έλεγχο των γαλακτοκομικών προϊόντων. Στην παρούσα εργασία, αναφερόμαστε στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη διέγερση των πυρήνων του δείγματος από το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, οι οποίοι διεγείρονται απορροφώντας ακτινοβολία και την επανεκπέμπουν .Το αποτέλεσμα αυτής της της αλληλεπίδρασης είναι χαρακτηριστικό για κάθε πυρήνα που μελετάται. Εστιάζοντας στην φασματοσκοπία NMR πρωτονίου ( $^1\text{H}$ ) και άνθρακα ( $^{13}\text{C}$ ) αναλύονται οι αρχές στις οποίες στηρίζεται η τεχνική για κάθε πυρήνα καθώς και οι απαραίτητες ρυθμίσεις που θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε ορισμένες κρίσιμες πειραματικές παραμέτρους ώστε να λαμβάνονται φάσματα υψηλής ποιότητας και να βελτιστοποιούνται τα τελικά ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα .(Soyler et al., 2021)

Στην εργασία αυτή ,μελετάται επίσης η αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου μετατόπισης Europium [tris(3-trifluoromethyl-hydroxymethylene) –(+ ) camphorate] με τα λιπίδια και εφαρμόζεται στην ανάλυση των λιπιδικών συστατικών στο γάλα. Το NMR είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική ,που σημαίνει ότι το δείγμα μπορεί να αναλυθεί χωρίς να αλλοιωθεί η σύνθεση ή οι ιδιότητες του. Τα ιόντα λανθανίδης,

όπως το  $\text{Eu}^{3+}$  είναι χρήσιμα αντιδραστήρια για τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) επειδή έχουν μεγάλη μαγνητική ανισοτροπία .

Η παρουσία του ιόντος λανθανίδης ,τροποποιεί το φάσμα NMR των κοντινών πυρήνων .Αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων ,καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη δυναμική αυτών των μορίων σε ένα διάλυμα .(Kobayashi & Matsumura, 2011).Τα αντιδραστήρια μετατόπισης λανθανίδης (LSR) κατά την αλληλεπίδραση τους με διάφορες ομάδες ,όπως το καρβονυλικό οξυγόνο προκαλούν μια χημική μετατόπιση στο φάσμα. Είναι ενδιαφέρον ότι το LSR επηρεάζει τα μόρια λιπιδίων που αλληλεπιδρούν μαζί του και μετά από αυτή την αλληλεπίδραση επηρεάζονται (σε διαφορετικό βαθμό) και οι συχνότητες συντονισμού των τμημάτων των μορίων που συνδέονται με τα μόρια λιπιδίων.(Alexandri et al., 2017) Τα παραπάνω μπορεί επίσης να οδηγήσουν στη διαφοροποίηση των ενώσεων που συνδέονται με τα μόρια των λιπιδίων της γλυκερίνης ,όπως οι τριακυλογλυκερόλες (TAG) ,σε σύγκριση με ενώσεις που βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους. Η παραπάνω αλληλεπίδραση των λιπιδικών «τμημάτων» αποκαλύπτει επίσης επικαλυπτόμενες ενώσεις, δηλαδή ενώσεις των οποίων οι συχνότητες συντονισμού αλληλεπικαλύπτονται .(Boccia et al., 2020), (Alexandri et al., 2017)

Μετά τα παραπάνω ,η χρήση του προτεινόμενου αντιδραστηρίου χημικής μετατόπισης , θα μπορούσε να γίνει εργαλείο για τη μελέτη επικαλυπτόμενων ενώσεων στην ανάλυση λιπιδίων ,ξεπερνώντας έτσι την ανάγκη για υψηλότερο μαγνητικό πεδίο ή πολύπλοκα και παρατεταμένα πειράματα. Επιπλέον βιοβιογραφικά έχει αναφερθεί η χρήση τους στην ανάλυση λιπιδίων σε χαμηλότερης έντασης μαγνητικά πεδία. (Alexandri et al., 2017)

## **1. 1 Γενικά για το γάλα**

Το γάλα αποτελεί μια πολυπλοκή βιολογική ουσία που παράγεται από θηλαστικά για τη διατροφή των νεογνών τους και θεωρείται μια από τις πλουσιότερες τροφές στη φύση. Η υψηλή του διατροφική αξία οφείλεται κυρίως στις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες, τις βιταμίνες και τα ανόργανα στοιχεία που περιέχει (National Research Council, 1988),( Miller et al., 2004). Πρόσφατα, όμως, η επιστημονική κοινότητα επικεντρώθηκε στη μελέτη του λίπους του γάλακτος, καθώς περιέχει συστατικά όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, που θεωρούνται ευεργετικά για την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού (National Research Council, 1996). Ωστόσο, το λίπος του γάλακτος περιλαμβάνει και υψηλά ποσοστά κορεσμένων λιπαρών οξέων, τα οποία έχουν συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία. Επιπλέον, το λίπος του γάλακτος είναι ευαίσθητο στις διατροφικές συνήθειες των ζώων, επηρεάζοντας τη συγκέντρωσή του στο γάλα και τη σύστασή του σε λιπαρά οξέα (Bauman et al., 2006). Χρησιμεύει ως πρώτη ύλη όχι μόνο σαν υγρό γάλα αλλά και ως

αρωματισμένο γάλα, παγωτό, τυρί, βούτυρο, γιαούρτι, καζεΐνη σε σκόνη και πολλά άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. (Foroutan et al., 2019)

### **1.1.1 Σύσταση του γάλακτος**

Κύρια συστατικά του γάλακτος είναι πρωτεΐνες, το λίπος, η λακτόζη και ορισμένα άλατα, προσδιορίζοντας κατά κύριο λόγο τη διατροφική και εμπορική του αξία. Ακόμη, περιέχει εκατοντάδες άλλα συστατικά σε μικρότερες ποσότητες όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, ένζυμα, διαλυμένα αέρια, διάφορα λιποειδή όπου καθορίζουν τις τεχνολογικές και βιολογικές του ιδιότητες (Ανυφαντάκης, Καλαντζόπουλος, 1993).

Τα λιπίδια περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μορίων, με τα τριγλυκερίδια (επίσης γνωστά ως τριακυλογλυκερόλες) να είναι τα κύρια στα λιπίδια του γάλακτος. Τα λιπίδια του γάλακτος συνήθως συμβάλλουν στο 8-10% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης στις δυτικές δίαιτες. (O'Brien & O'Connor, 2011), (O'Brien & O'Connor, 2016)

### **1.1.2 Υδατοδιαλυτό προφίλ**

Στο υδατικό κλάσμα του γάλακτος περιέχονται οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, ανόργανες ενώσεις και οι βιταμίνες. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις καζεΐνες, τις λακταλβουμίνες και τις λακτογλοβουλίνες. Η ολική πρωτεΐνη, η καζεΐνη και οι οροπρωτεΐνες του γάλακτος απαρτίζονται από αμινοξέα, με τα κυριότερα αυτών τα εξής: αλανίνη, αργινίνη, γλουταμινικό οξύ, λευκίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, βαλίνη και άλλα. (H.-D. Belitz et al, 2009)

Οι καζεΐνες είναι οι πιο ενδιαφέρουσες πρωτεΐνες στο γάλα και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό. Στα μόρια τους περιέχουν φωσφορικό οξύ, ασβέστιο και μικρή ποσότητα υδατανθράκων (Βουδούρης, Κοντομηνάς, 1983).

Από τους υδατάνθρακες, το κυριότερο σάκχαρο του γάλακτος είναι η λακτόζη, που αποτελείται από γαλακτόζη και γλυκόζη. Απαντάται σε δύο ισομερείς μορφές, την  $\alpha$ -λακτόζη, που είναι και η σταθερότερη, και τη  $\beta$ -λακτόζη. Άλλα σάκχαρα που περιέχονται στο γάλα είναι η 1-φωσφορική γαλακτόζη, η γαλακτόζη και η φουκόζη (Scano et al., 2019).

Από τα οργανικά οξέα, το κυριότερο στο γάλα είναι το κιτρικό οξύ, που κατά την αποθήκευση εξαφανίζεται γρήγορα λόγω της δράσης βακτηρίων, ενώ παράλληλα απαντώνται το γαλακτικό, το οξικό και το βουτυρικό. (H.-D. Belitz et al, 2009) Τα ανόργανα συστατικά του γάλακτος είναι άλατα φωσφορικού, χλωρίου, κιτρικά καθώς και άλατα καλίου, νατρίου, ασβεστίου και μαγνησίου (Βουδούρης,

Κοντομηνάς, 1983). Όσον αφορά τις βιταμίνες του υδατικού κλάσματος στο γάλα, μερικές από αυτές είναι οι βιταμίνες Β1(θειαμίνη), Β2(ριβοφλαβίνη), Β6(πυριδοξίνη), Β12 καθώς και η βιταμίνη C. (H.-D. Belitz et al, 2009)

### 1.1.3 Λιπίδια στο γάλα

Τα λιπίδια είναι ένα από τα βασικότερα συστατικά του γάλακτος, από άποψη κόστους και θρεπτικότητας, ενώ επίσης συμβάλλουν στα φυσικά και γευστικά χαρακτηριστικά των γαλακτοκομικών προϊόντων (Park et al., 2007). Στην λιπαρή φάση του γάλακτος, διακρίνονται τρεις κύριες κατηγορίες ενώσεων: τα ουδέτερα λίπη (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια), τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια) και τα ασαπωνοποιητά συστατικά (στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, καρροτενοειδή) .(Ανυφαντάκης, 2004)

Αναλυτικότερα, το λίπος του γάλακτος αποτελεί ένα μίγμα που περιλαμβάνει κυρίως τριγλυκερίδια σε ποσοστό 97-98%, με μικρές ποσότητες διγλυκεριδίων, μονογλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων, χοληστερίνης, λιποειδών και ελεύθερων λιπαρών οξέων. (Ανυφαντάκης ,2004) Όσον αφορά τα λιπαρά οξέα, έχουν βρεθεί περίπου 400 στο λίπος του γάλακτος, και προέρχονται από τη σύνθεσή τους στους μαστικούς αδένες των ζώων αλλά και από την τροφή. Κατηγοριοποιούνται σε κορεσμένα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (ευθύγραμμη), κορεσμένα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (διακλαδισμένη) και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα τριγλυκερίδια είναι εστέρες της γλυκερόλης με τρία συνήθως διαφορετικά λιπαρά οξέα. Οι διακυλογλυκερόλες και οι μονοακυλογλυκερόλες απαντώνται σε μικρό ποσοστό στο λίπος γάλακτος καθώς προέρχονται πιθανόν από τη βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών και όχι από τη διαδικασία της λιπόλυσης. Από τις διακυλογλυκερόλες κυρίως οι sn-1,2-διακυλογλυκερόλες υπάρχουν στο γάλα. (Fox, 2006)

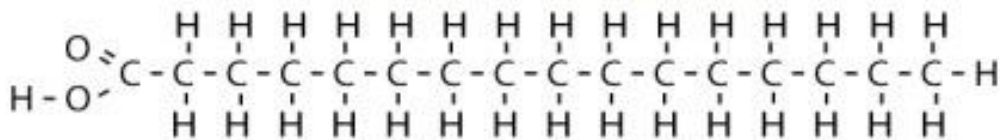
Επιπλέον, το 2% του λίπους του γάλακτος αποτελείται από φωσφολιπίδια (~0,6% των συνολικών λιπιδίων), διαφορετικές μορφές γλυκεριδίων όπως δι-γλυκερίδια και μονο-γλυκερίδια, καθώς και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Τα φωσφολιπίδια, αν και υπάρχουν σε μικρό ποσοστό, παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους. Τα κυριότερα που απαντώνται στο λίπος του γάλακτος είναι η φωσφατιδυλο-χολίνη, η φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη και η σφιγγομυελίνη. Τέλος, λιγότερο από το 1% του λίπους αποτελείται από μη-σαπωνοποιήσιμα συστατικά όπως στερόλες, κυρίως χοληστερόλη, λιποδιαλυτές βιταμίνες και άλλα λιπίδια όπως τα καρροτενοειδή, που είναι πρόδρομοι της βιταμίνης Α και υπεύθυνα για το κίτρινο χρώμα του λίπους του γάλακτος (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).



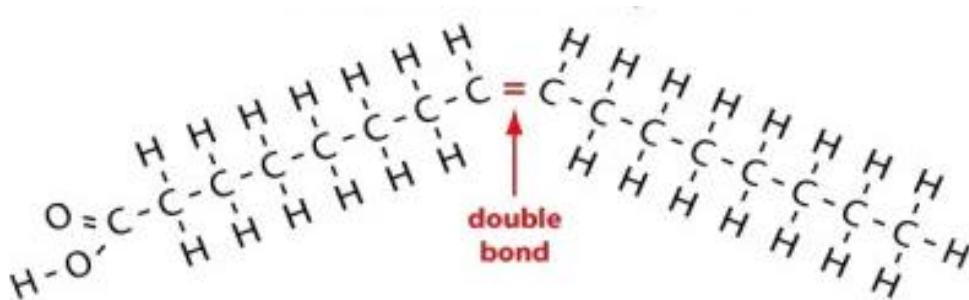
#### 1.1.4 Ακόρεστα λιπαρά οξέα (Unsaturated Fatty Acids, UFA)

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (UFA), είναι παρόμοιας μορφής, εκτός από το ότι μια ή περισσότερες αλκενυλικές λειτουργικές ομάδες, υπάρχουν κατά μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, με το κάθε αλκένιο να αντικαθιστά τον απλό δεσμό του

«-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-» με διπλό δεσμό σε «-CH=CH-» (δηλαδή ένας άνθρακας διπλά συνδεδεμένος με έναν άλλο άνθρακα). Έτσι, η διαφορά των ακόρεστων από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, είναι ότι περιέχουν τουλάχιστον 1 διπλό δεσμό ή τριπλό δεσμό στο μόριό τους, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1 (Ruiz-Rodrigueza et al 2009).



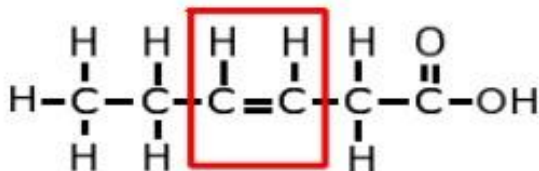
Εικόνα 1.1 Κορεσμένο λιπαρό οξύ(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)



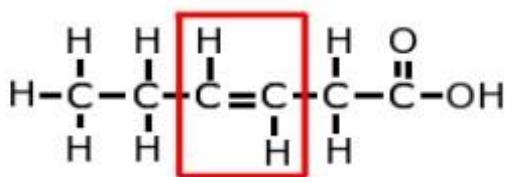
Εικόνα 1.2: Ακόρεστο λιπαρό οξύ(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Στα ακόρεστα λίπη, η παρουσία διπλού δεσμού C=C, δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας γεωμετρικών ισομερών, με διαφορετικούς προσανατολισμούς ομάδων, σε σχέση με το διπλό δεσμό. Έτσι, προκύπτουν τα cis- και trans- γεωμετρικά ισομερή, όπου τα πρώτα αναφέρονται στα λιπαρά, όπου τα άτομα του υδρογόνου βρίσκονται από την ίδια πλευρά του διπλού δεσμού, ενώ στα trans βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές (Εικόνα 6). Συνήθως, τα περισσότερα διατροφικά λιπαρά οξέα, βρίσκονται σε cis- γεωμετρική ισομέρεια. (Lunn and Theobald, 2006). Η

διαμόρφωση trans, μπορεί ακόμη να προκύψει και από διάφορες επεξεργασίες που υφίστανται τα λίπη (πχ υδρογόνωση).



Εικόνα 1.3 Cis-λιπαρά οξέα (ανακτήθηκε από <https://www.researchgate.net/>)



Εικόνα 1.4 Trans λιπαρά οξέα(ανακτήθηκε από <https://www.researchgate.net/>)

Τα λιπίδια, προέρχονται σχεδόν ισοδύναμα από δυο πηγές, την τροφή και τη μικροβιακή δραστηριότητα στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών και βρίσκονται στο γάλα, με τη μορφή σφαιρικών σωματιδίων, δημιουργώντας γαλάκτωμα (προσδίδοντας το όνομα και το χρώμα στο γάλα) (Mansson, 2008). Τα σωματίδια αυτά, ονομάζονται λιποσφαίρια και περιβάλλονται από μεμβράνη (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009). Τα λιποσφαίρια στο πρόβειο και στο αίγιο γάλα, είναι χαρακτηριστικά άφθονα, με μέγεθος μικρότερο από 3,5μm, ενώ το μέγεθος των λιποσφαιρίων του αγελαδινού γάλακτος είναι 4,55 μm. Η δομή και η σύνθεση, των μεμβρανών των λιποσφαιρίων των τριών ζωικών ειδών λίπους γάλακτος, είναι παρόμοια και αντιπροσωπεύει περίπου το 1%, του συνολικού όγκου του λίπους του γάλακτος (Park et al., 2007).

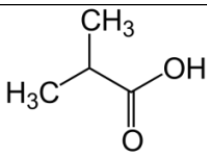
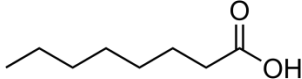
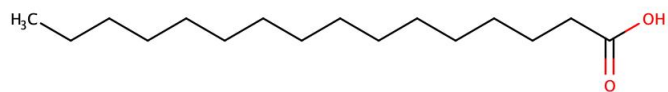
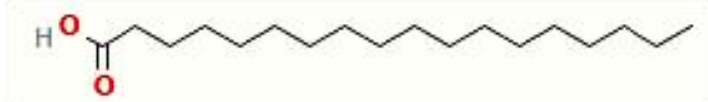
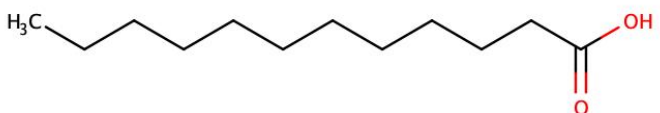
Τα χαρακτηριστικά του λίπους του γάλακτος είναι ότι μεγάλη ποικιλία των λιπαρών οξέων (>250 είδη), τα περισσότερα από τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Κυριαρχούν αυτά, με αριθμό ατόμων άνθρακα 4-18 .

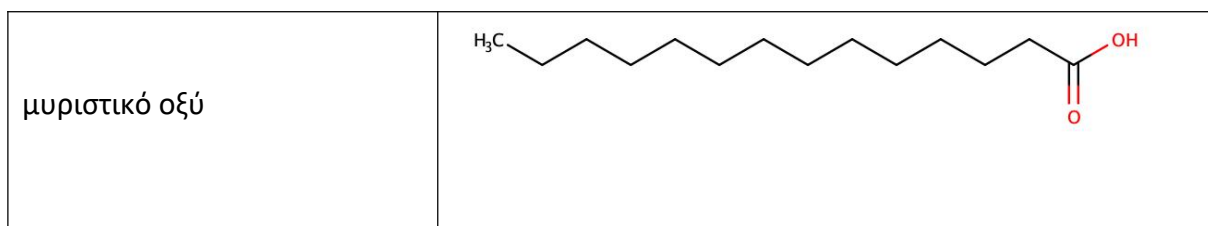
Χαρακτηριστικό του λίπους των μηρυκαστικών, είναι η μεγάλη περιεκτικότητα σε μικρού μοριακού βάρους (M.B.) λιπαρά οξέα (14-18% του λίπους). Ιδιαίτερα, το βουτυρικό οξύ, είναι χαρακτηριστικό του γάλακτος των μηρυκαστικών και δεν υπάρχει σε άλλο φυσικό λίπος. Έτσι ο αριθμός σαπωνοποιήσεως του λίπους του γάλακτος είναι μεγάλος. - Η αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι υψηλή. Περίπου 63% του λίπους του γάλακτος, αποτελείται από κορεσμένα λιπαρά οξέα. - Το ελαϊκό οξύ, είναι το 70% των ακόρεστων λιπαρών οξέων του γάλακτος. Τα άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα, διαφέρουν ως προς τον αριθμό ατόμων C, τη θέση και τη

διαμόρφωση των διπλών δεσμών (περίπου 5% όλων των δ.δ. είναι trans). (Park et al., 2007)

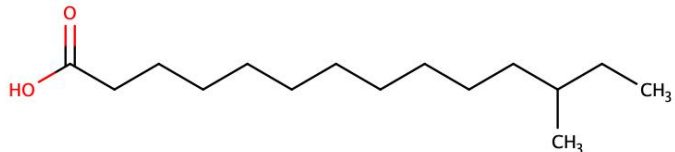
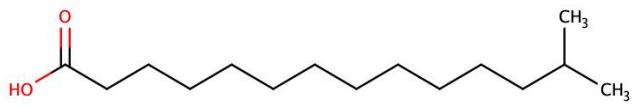
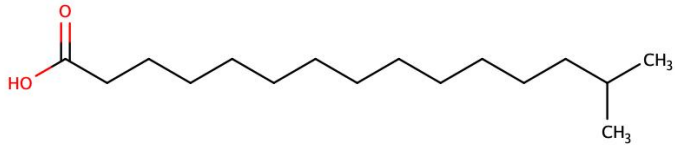
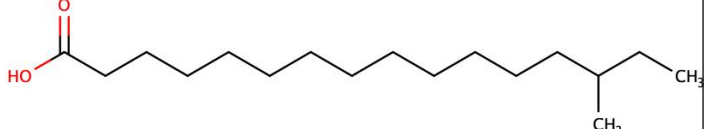
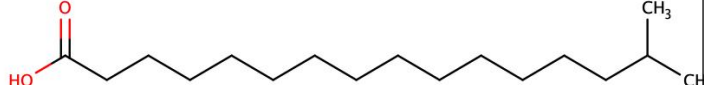
Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι γενικές κατηγορίες με βάση την ανθρακική αλυσίδα και τον βαθμό κορεσμού λιπαρών οξέων και ενδεικτικά ΛΟ.

**Πίνακας 1.1 Α: Κορεσμένα μακράς αλυσίδας**

<i>Κορεσμένα μακράς αλυσίδας</i>	
<b>Κοινή Ονομασία</b>	<b>Χημική Δομή</b>
βουτυρικό οξύ	
καπρυλικό οξύ	
παλμιτικό οξύ	
στεατικό οξύ	
λαουρικό οξύ	



Πίνακας 1.1 Β: Κορεσμένα βραχείας αλυσίδας

<i>Κορεσμένα βραχείας αλυσίδας</i>	
Κοινή Ονομασία	Χημική Δομή
12-μέθυλο-δεκατετρανοϊκό οξύ	
13- μέθυλο-δεκατετρανοϊκό οξύ	
14-μέθυλο-δεκαπεντανοϊκό οξύ	
14-μέθυλο-δεκαεξανοϊκό οξύ	
15- μέθυλο-δεκαεξανοϊκό οξύ	

Πίνακας 1.1 Γ:Ακόρεστα

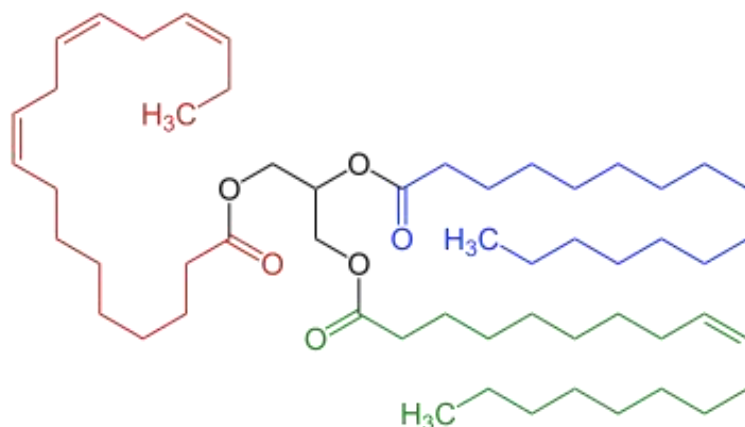
Ακόρεστα	
Κοινή Ονομασία	Χημική Δομή
λινελαϊκό οξύ	
λινολενικό οξύ	
9-δεκανοϊκό οξύ	
ελαϊκό οξύ	

### 1.1.5 Οι κυριότερες ενώσεις λιπαρών οξέων

Τα λιπίδια στο γάλα παίζουν αρκετούς ουσιαστικούς ρόλους και αποτελούνται από διάφορους τύπους μορίων. Ακολουθούν ορισμένα από τα βασικά λιπίδια στο γάλα:

#### Τριγλυκερίδια:

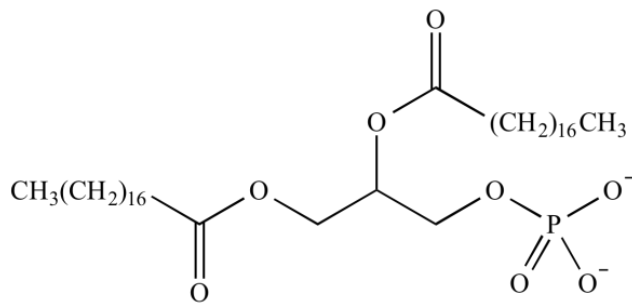
Τα τριγλυκερίδια (εικόνα 1.5) είναι τα κυρίαρχα λιπίδια στο γάλα, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 98% των συνολικών λιπιδίων. Αποτελούνται από γλυκερίνη και τρία λιπαρά οξέα. Τα τριγλυκερίδια χρησιμεύουν ως συμπυκνωμένη πηγή ενέργειας και συμβάλλουν στην κρεμώδη υφή του γάλακτος(Ανυφαντάκης ,2004).



Εικόνα 1.5 :Χημική δομή τριγλυκεριδίου(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

#### Φωσφολιπίδια:

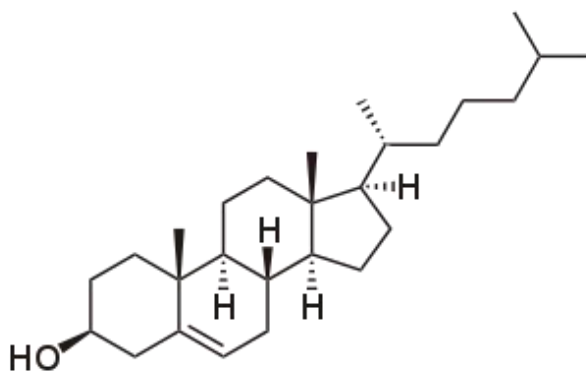
Τα φωσφολιπίδια (εικόνα 1.6) υπάρχουν στο γάλα και παίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό των κυτταρικών μεμβρανών και συμβάλλουν στη γαλακτωματοποίηση των σφαιριδίων του λίπους, βοηθώντας στην πέψη και την απορρόφηση των λιπιδίων(Fox ,2006).



Εικόνα 1.6 : Χημική δομή φωσφολιπιδίων(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### Χοληστερόλη:

Το γάλα περιέχει χοληστερόλη (εικόνα 1.7), η οποία είναι ένα είδος στερόλης. Ενώ η περιεκτικότητα σε χοληστερόλη στο γάλα είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με ορισμένα άλλα ζωικά προϊόντα, εξακολουθεί να αποτελεί πηγή αυτού του απαραίτητου λιπιδίου. Η χοληστερόλη είναι σημαντική για τη σύνθεση των ορμονών και της βιταμίνης D στο σώμα(Park et al,2007).



Εικόνα 1.7 :Χημική δομή χοληστερόλης(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### Ελεύθερα λιπαρά οξέα:

Από την ενζυμική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων του λίπους του γάλακτος απελευθερώνονται ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στο γάλα και μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Όταν στα ελεύθερα λιπαρά οξέα κυριαρχούν τα μικρού μοριακού βάρους, κυρίως το βουτυρικό και το καπρονικό, δημιουργούνται δυσάρεστες ταγκές γεύσεις. (Ανυφαντάκης,2004)

### Λιποδιαλυτές βιταμίνες:

Οι βιταμίνες A, D, E και K είναι λιποδιαλυτές βιταμίνες που υπάρχουν στο γάλα. Αυτές οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες,

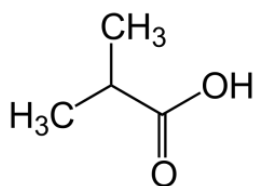
συμπεριλαμβανομένης της όρασης, της υγείας των οστών, της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και της πήξης του αίματος.(Μοάτσου Γκ.,2009)

Το λίπος του γάλακτος είναι πολύ σημαντικό συστατικό, καθώς,ο πρωταρχικός του ρόλος είναι να αποτελεί πηγή ενέργειας και βασικών δομικών υλών, για τις κυτταρικές μεμβράνες των νεογέννητων όλων των θηλαστικών. (Stevens, 2021) Επίσης είναι πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων, που δεν μπορούν να συντεθούν από τα ανώτερα ζώα (π.χ. λινελαϊκό οξύ, C18:2) και λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E, K) και διαμορφώνει τα ρεολογικά και τα γευστικά χαρακτηριστικά των γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς είναι το πιο εύγευστο φυσικό λίπος.

Τέλος έχει οικονομική σημασία, αφού είναι ένα από τα κύρια συστατικά του γάλακτος και η περιεκτικότητά σ' αυτό, καθορίζει την τιμή του γάλακτος (Μοάτσου, Γκ., 2009), (Stevens, 2021).

### 1.1.6 Επιλεγμένες δομές ενδιαφέροντος

#### Βουτυρικό οξύ

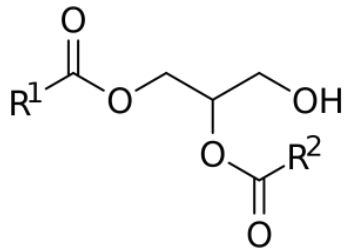


Εικόνα1.8 :Χημική δομή βουτυρικού οξέος(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Η φασματοσκοπία NMR είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε βουτυρικό οξύ στο γάλα, το οποίο μπορεί να είναι σημαντικό για την αξιολόγηση της ποιότητας του γάλακτος και τον προσδιορισμό της καταλληλότητας του για διάφορες εφαρμογές. Το βουτυρικό οξύ που υπάρχει στο γάλα μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (Chin et al.,1992) .Η κορυφή του βουτυρικού οξέος στο φάσμα NMR του γάλακτος παρατηρείται τυπικά σε περίπου 0,9-1,3 ppm στην κλίμακα χημικής μετατόπισης, η οποία είναι χαρακτηριστική της παρουσίας μιας μεθυλικής ομάδας (-CH<sub>3</sub>) στο μόριο. Η ένταση της κορυφής μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συγκέντρωση βουτυρικού οξέος στο δείγμα(Visioli et al ,2000).

#### 1,2 Διακυλογλυκερόλη(1,2 DAG)





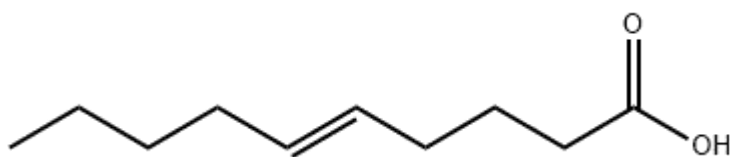
Εικόνα 1.9 : Χημική δομή 1,2 διακυλογλυκερόλης(ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Οι διακυλογλυκερόλες είναι ενώσεις που αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερίνης εστεροποιημένο με δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων.

Συγκεκριμένα, η 1,2-DAG αναφέρεται σε μια διακυλογλυκερόλη όπου οι αλυσίδες λιπαρών οξέων συνδέονται με την πρώτη και τη δεύτερη θέση του σκελετού της γλυκερίνης. (Ανυφαντάκης, 2004)

Η 1,2-DAG είναι ένα από τα πολυάριθμα λιπίδια που υπάρχουν το γάλα. Τα λιπίδια είναι απαραίτητα συστατικά του γάλακτος και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατροφική του σύνθεση. Η ακριβής σύνθεση των λιπιδίων στο γάλα, συμπεριλαμβανομένων των ειδικών τύπων και αναλογιών διακυλογλυκερολών, μπορεί να ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών ειδών και ακόμη και μεταξύ μεμονωμένων ζώων. Η έρευνα και η ανάλυση του 1,2-DAG στο γάλα διεξάγονται συχνά για την κατανόηση του λιπιδικού προφίλ του γάλακτος, καθώς αυτά τα μόρια μπορούν να επηρεάσουν τις αισθητηριακές ιδιότητες και τη θρεπτική ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. (Bennett & Harjinder, 2002)

### Καπρολεϊκό οξύ



Εικόνα 1.10 :Χημική δομή καπρολεϊκού οξέος (ανακτήθηκε από: <https://www.sciencedirect.com/>)

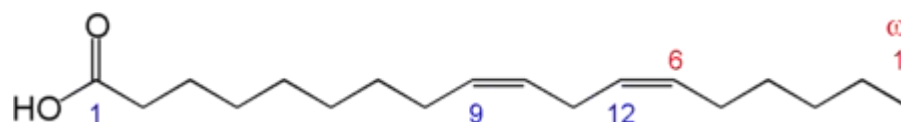
Το καπρολεϊκό οξύ(εικόνα 1.10) είναι ένας τύπος λιπαρού οξέος που βρίσκεται συνήθως στο γάλακαι είναι γνωστό και ως 6-δεκενοϊκό οξύ. Στο φάσμα NMR του γάλακτος, φαίνεται ως διακριτή κορυφή λόγω της μοναδικής χημικής δομής και των μαγνητικών του ιδιοτήτων. Εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή περίπου στα 5,5-6,5 ppm λόγω της παρουσίας των ολεφινικών πρωτονίων του (-CH=CH-) ή (-CH-CH<sub>2</sub>-)(Bennett & Harjinder, 2002).

### 1.1.7 Απαραίτητα λιπαρά οξέα

Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFA) ονομάστηκαν έτσι διότι απαιτούνται για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού. Οι άνθρωποι και τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ, γιατί δεν διαθέτουν τα ένζυμα για να εισάγουν διπλό δεσμό μετά τον άνθρακα C-9 στην λιπαρή ανθρακική αλυσίδα. Γι' αυτό το λόγο, πρέπει να προσλαμβάνονται από την τροφή. Τα α-λινολενικό (αLA, ω-3) και λινελαϊκό (LA, ω-6) οξέα θεωρούνται τα μόνα EFA, διότι στους ανώτερους οργανισμούς, όλα τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα μπορούν να βιοσυντεθούν από αυτά τα δύο πρόδρομα λιπαρά οξέα. Τα πιο σημαντικά από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό (18:2 ω-6), λινολενικό (18:3 ω-3) και αραχιδονικό (20:4 ω-6). (Baro et al., 2003)

Οι πιο σημαντικές κατηγορίες για την επίδραση που έχουν στην ανθρώπινη υγεία και διατροφή είναι τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα, εξαιτίας του λινελαϊκού (LA) και α-λινολενικού οξέος (ALA) αντίστοιχα. (Carrero et al., 2004)

#### Λινελαϊκό οξύ



Εικόνα 1.11 :Χημική δομή λινελαϊκού οξέος (ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

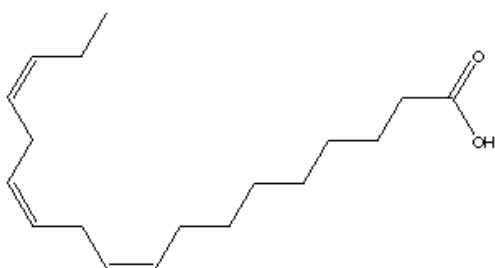
Το φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων ( $^1\text{H}$  NMR) του λινελαϊκού οξέος, ενός πολυακόρεστου λιπαρού οξέος ωμέγα-6 με δύο διπλούς δεσμούς, αποκαλύπτει διακριτές κορυφές που αντιστοιχούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα πρωτονίων στο μόριο. Οι αναμενόμενες κορυφές  $^1\text{H}$ NMR για το λινελαϊκό οξύ είναι οι εξής:

Κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια μεθυλενίου ( $\text{CH}_2$ ) δίπλα σε διπλούς δεσμούς, που παρατηρείται στην περιοχή από 2,0 - 2,5 ppm, κορυφή που οφείλεται στα αλλυλικά ( $\text{CH}_2$ ) πρωτόνια δίπλα σε διπλούς δεσμούς, περίπου στα 2,8 - 3,0 ppm, κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια μεθυλίου ( $\text{CH}_3$ ), περίπου στα 0,9 - 1,3 ppm.

Τέλος κορυφές που οφείλονται στα πρωτόνια διπλού δεσμού. Τα πρωτόνια στα άτομα άνθρακα εντός των διπλών δεσμών συμβάλλουν σε διακριτικά σήματα. Τυπικά παρατηρούνται στην περιοχή 5,3 - 5,6 ppm. Ο αριθμός και η θέση αυτών των κορυφών παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη θέση και τον αριθμό των διπλών δεσμών.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι πραγματικές χημικές μετατοπίσεις μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με παράγοντες όπως ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, η συγκέντρωση και οι ειδικές συνθήκες του πειράματος NMR. (Carrero et al., 2004)

### Λινολενικό οξύ



Εικόνα 1.12: Χημική δομή λινολενικού οξέος (ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Το λινολενικό οξύ, ένα ωμέγα-3 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με τρεις διπλούς δεσμούς. Οι αναμενόμενες κορυφές  $^1\text{H}$ NMR για το λινολενικό οξύ είναι οι εξής:

Κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια μεθυλενίου ( $-\text{CH}_2-$ ) δίπλα σε διπλούς δεσμούς που παρατηρείται στην περιοχή από 2,0 - 2,5 ppm.

Ο αριθμός των κορυφών και η ολοκλήρωσή τους παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των ομάδων μεθυλενίου που γειτνιάζουν με τους διπλούς δεσμούς.

Κορυφή που οφείλεται στα αλλυλικά ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια δίπλα σε διπλούς δεσμούς: Αναμένεται περίπου 2,8 - 3,0 ppm. (Park et al, 2007)

Πρωτόνια μεθυλίου ( $\text{CH}_3$ ):

Οι ομάδες μεθυλίου μπορεί να εμφανίζονται ως απλές, περίπου 0,9 - 1,3 ppm.

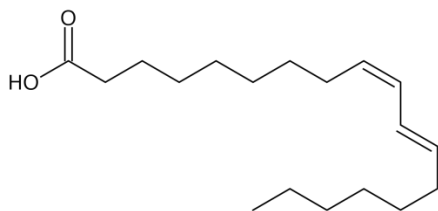
Ο αριθμός των κορυφών παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των μεθυλομάδων στο μόριο.

Πρωτόνια διπλού δεσμού:

Τα πρωτόνια στα άτομα άνθρακα εντός των διπλών δεσμών συμβάλλουν σε διακριτικά σήματα. Τυπικά παρατηρείται στην περιοχή 5,3 - 5,6 ppm.

Ο αριθμός και η θέση αυτών των κορυφών παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη θέση και τον αριθμό των διπλών δεσμών. Δεδομένου ότι το λινολενικό οξύ έχει τρεις διπλούς δεσμούς, το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR θα εμφανίσει επιπλέον κορυφές σε σύγκριση με το λινελαϊκό οξύ, το οποίο έχει δύο διπλούς δεσμούς. Η πολυπλοκότητα του φάσματος αυξάνεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών και την προκύπτουσα εγγύτητα διαφορετικών περιβαλλόντων πρωτονίων. (Carrero et al., 2004)

### Συζυγή λινελαϊκά οξέα (Conjugated Linoleic Acids, CLA)



Εικόνα 1.13 Χημική δομή συζυγούς λινελαϊκού οξέος (ανακτήθηκε από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Τα πιο σημαντικά συζυγή λιπαρά οξέα, είναι αυτά του λινελαϊκού οξέος (CLA). Τα CLA είναι λιπαρά οξέα, τα οποία ανευρίσκονται μέσα στα προϊόντα των μηρυκαστικών ζώων. (Chinetal, 1992)

Οι ζωικές πηγές, είναι πλουσιότερες σε CLA σε σχέση με τις φυτικές. (Kumar et al., 2009). Η μεγαλύτερη πηγή CLA για τους ανθρώπους, είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, που προερχόμενα από μηρυκαστικά ζώα (Kumar et al., 2009).

Το CLA που ανευρίσκεται στο γάλα και στο κρέας μηρυκαστικών, προέρχεται από δύο πηγές. Μία πηγή σχηματισμού του CLA, είναι στη μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών, από αναερόβια βακτήρια, ως ενδιάμεσο προϊόν της βιοϋδρογόνωσης του λινελαϊκού οξέος. Η δεύτερη πηγή σχηματισμού του CLA, είναι στους ιστούς των μηρυκαστικών ζώων, από το *trans*-11 C18:1, (το οποίο είναι ένα άλλο ενδιάμεσο προϊόν από την βιοϋδρογόνωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων) και την επίδραση σε αυτό της Δ9-αφυδρογονάσης. (Pradinietal, 2001)

Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά του φάσματος NMR του γάλακτος είναι η παρουσία των CLAs. Τα ισομερή CLA ανιχνεύονται τυπικά στο φάσμα NMR του γάλακτος ως διακριτές κορυφές. Οι ακριβείς χημικές μετατοπίσεις και οι εντάσεις αυτών των κορυφών μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με παράγοντες όπως ο τύπος

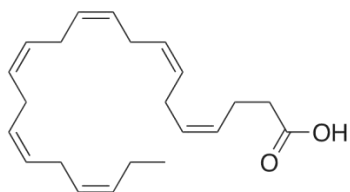
του γάλακτος, η διατροφή της αγελάδας και η επεξεργασία του γάλακτος. Ωστόσο, οι κορυφές CLA παρατηρούνται τυπικά στην περιοχή 0,5-2,5 ppm στο φάσμα NMR πρωτονίων του γάλακτος. (Kumar et al., 2009)

Τα ισομερή CLA έχουν μελετηθεί για τα πιθανά οφέλη τους για την υγεία, όπως η μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου και καρδιακών παθήσεων, και τη δυνατότητά τους να βελτιώσουν τη σύσταση του σώματος. Ως εκ τούτου, η μέτρηση των CLA στο γάλα παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τους ερευνητές και τη γαλακτοβιομηχανία. (Chinetal, 1992)

Στο φάσμα NMR του γάλακτος, υπάρχουν δύο κύριες κορυφές που αντιστοιχούν στις *cis* και *trans* μορφές του CLA. Η *cis* μορφή του CLA εμφανίζεται ως κορυφή περίπου στα 5,15 ppm, ενώ η *trans* μορφή εμφανίζεται ως κορυφή στα 5,75 ppm περίπου.

Οι σχετικές εντάσεις αυτών των κορυφών μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση του δείγματος γάλακτος. Για παράδειγμα, εάν η κορυφή των *trans* CLA είναι σχετικά υψηλή, μπορεί να υποδηλώνει ότι το γάλα προήλθε από αγελάδες που τρέφονταν με δίαιτα υψηλή σε ακόρεστα λίπη. (Pradinietal, 2001)

### **Δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA)**



Εικόνα 1.14: Χημική δομή δοκοσαεξανοϊκού οξέος (ανακτήθηκε από: <https://lktlabs.com/>)

Το λινελαϊκό οξύ (Linoleic Acid )(LA) και το λινολενικό οξύ ( $\alpha$ -Linolenic acid )(ALA), μέσω των αντιδράσεων επιμήκυνσης μετατρέπονται σε μακρύτερα και πιο ακόρεστα πολυακόρεστα, όπως το αραχιδονικό οξύ (AA), το εικοσαπεντανοϊκό οξύ EPA) ή το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA). Αυτά τα πολυακόρεστα ΛΟ, είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, των κυττάρων του αίματος (ερυθρών, λευκών, κλπ) και του δέρματος. Εξίσου σημαντικά  $\omega$ -3 αποτελούν και το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5 $\omega$ -3), το εικοσιδυοπεντανοϊκό οξύ (DPA, 22:5 $\omega$ -3) και το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA, 22:6 $\omega$ -3). (Engler MM et al. 2006).

Το (DHA) είναι ένα  $\omega$ -3 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ με έξι διπλούς δεσμούς. Στο φάσμα  $^1\text{H}$ NMR του, διάφορα περιβάλλοντα πρωτονίων καταλήγουν σε χαρακτηριστικές κορυφές.:

Πρωτόνια μεθυλενίου (-CH<sub>2</sub>-) δίπλα σε διπλούς δεσμούς: Τυπικά παρατηρείται στην περιοχή από 2,0 - 2,5 ppm.

Αλληλικά (-CH<sub>2</sub>-) πρωτόνια δίπλα σε διπλούς δεσμούς: Αναμένεται περίπου 2,8 - 3,0 ppm.

Πρωτόνια μεθυλίου (-CH<sub>3</sub>):

Οι ομάδες μεθυλίου μπορεί να εμφανίζονται ως απλές.

Αναμένεται περίπου 0,9 - 1,3 ppm.

Πρωτόνια διπλού δεσμού:

Τα πρωτόνια στα άτομα άνθρακα εντός των έξι διπλών δεσμών συμβάλλουν σε διακριτικά σήματα.

Τυπικά παρατηρείται στην περιοχή 5,3 - 5,6 ppm. (Carrero et al., 2004)

## **1.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)**

### **1.2.1 Αρχή Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Συντονισμού**

Η μέθοδος NMR βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με συγκεκριμένες τιμές ιδιοστροφορμής (spin). Πιο συγκεκριμένα, πυρήνες με μη μηδενικές τιμές spin είναι κατάλληλοι για μελέτη με τη μέθοδο NMR, ενώ πυρήνες με μηδενικές τιμές spin δεν μπορούν να ανιχνευτούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Η ομοιογένεια και η σταθερότητα του πεδίου αποτελούν επίσης βασικούς παράγοντες για την επιτυχή λήψη των φασμάτων και εξετάζεται με εκπομπή και λήψη μιας δεδομένης συχνότητας αναφοράς. Ο συντονισμός στον οποίο βασίζεται η μέθοδος NMR αποτελεί την ταυτόχρονη διέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος που μελετάται και επιτυγχάνεται στο τμήμα του φασματογράφου που ονομάζεται υποδοχέας (probe). (Field et al, 2017)

### **1.2.2 Χημικές επιδράσεις (παράμετροι) στη φασματοσκοπία NMR**

Η φασματοσκοπία NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση ανίχνευση συγκεκριμένων πυρήνων (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P) και επίσης για την ποσοτική εκτίμηση αυτών. Η πραγματική χρησιμότητα όμως της φασματοσκοπίας NMR στη χημεία οφείλεται σε δευτερογενή φαινόμενα όπως η χημική μετατόπιση και η σύζευξη spin-spin και σε μικρότερο βαθμό σε φαινόμενα που σχετίζονται με την κλίμακα χρόνου ενός πειράματος NMR. Και η χημική μετατόπιση και η σύζευξη spin-spin αντικατοπτρίζουν το χημικό περιβάλλον των πυρηνικών spin και μπορούν να θεωρηθούν ως χημικές επιδράσεις στη φασματοσκοπία NMR. (Kein, 2015)

### **1.2.3 Η έννοια της χημικής μετατόπισης**

Χημική μετατόπιση:

Ένα φάσμα NMR είναι ένα γράφημα της συχνότητας συντονισμού (χημική μετατόπιση) προς την ένταση της απορρόφησης της ακτινοβολίας Rf από το δείγμα.

Αν και ο οριζόντιος άξονας του φάσματος είναι μια κλίμακα συχνότητας ,συνήθως βαθμονομείται με αδιάστατες μονάδες(ppm) .Οι μονάδες συχνότητας μετατρέπονται σε ppm ώστε η κλίμακα να έχει τις ίδιες τιμές ανεξάρτητα από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου στο οποίο γίνεται η μέτρηση. Η κλίμακα σε ppm που γράφεται ως κλίμακα  $\delta$  βαθμονομείται συνήθως με βάση τον συντονισμό μιας πρότυπης ένωσης η συχνότητα της οποίας επιλέγεται να είναι 0,0 ppm. Η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού ενός πυρήνα με τη συχνότητα συντονισμού της ένωσης αναφοράς καλείται χημική μετατόπιση. (Field et al ,2017), (Bharti &Roy ,2012)

Το τετραμεθυλοσιλάνιο ( $\text{CH}_3$ )<sub>4</sub>Si ή TMS είναι η πιο συνηθισμένη ένωση αναφοράς σε οργανικούς διαλύτες και για το <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C NMR και συνήθως προστίθεται κατευθείαν στο διάλυμα της εξεταζόμενης ένωσης.

Οι χημικές μετατοπίσεις μπορούν να μετρηθούν σε Hz αλλά συνήθως εκφράζονται σε ppm .

$$\delta = (\nu_i / \nu^* * 10^6), \quad (1)$$

Χημική μετατόπιση ( $\delta$ ) σε ppm = χημική μετατόπιση από TMS σε Hz/συχνότητα φασματομέτρου σε MHz(Kein ,2015)

#### 1.2.4 Σταθερά σύζευξης και πολλαπλότητα κορυφών συντονισμού

Σύζευξη Spin-Spin:

Η σύζευξη spin-spin προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ μαγνητικών πυρήνων σε γειτνίαση. Έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των σημάτων NMR σε πολλαπλάσια, παρέχοντας πληροφορίες για τον αριθμό και τον τύπο των γειτονικών πυρήνων. (Kein ,2015)

Φάσματα NMR:

Σταθερά σύζευξης

Η **σταθερά σύζευξης** περιγράφεται με το σύμβολο  $J$  και μετριέται σε Hz. Είναι ουσιαστικά η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών κορυφών του σήματος που σχάζεται. Τα γειτονικά πρωτόνια πάντα σχάζονται μεταξύ τους με ισοδύναμες τιμές  $J$ . Για παράδειγμα ας θεωρήσουμε τα δύο είδη πρωτονίων στην αίθυλο ομάδα. Το σήμα που οφείλεται στο πρωτόνιο  $H_a$  σχάζεται σε τετραπλή κορυφή λόγω της επίδρασης των τριών γειτονικών πρωτονίων  $H_b$ , ενώ το σήμα που οφείλεται στο πρωτόνιο  $H_b$ , σχάζεται σε τριπλή κορυφή λόγω της επίδρασης των δύο γειτονικών πρωτονίων  $H_a$ . Τα πρωτόνια  $H_a$  και  $H_b$  λέγεται ότι είναι συζευγμένα μεταξύ τους. Η σταθερά σύζευξης  $J_{ab}$  είναι ίδια και στα δύο σήματα. Οι τιμές  $J$  μπορεί να

κυμαίνονται μεταξύ 0 και 20 Hz ,ανάλογα με τα είδη των πρωτονίων που εμπλέκονται στη σύζευξη και είναι ανεξάρτητες από τη λειτουργική συχνότητα του φασματομέτρου .Το  $J$  εξαρτάται μόνο από τον αριθμό , τον τύπο και τη χωροδιάταξη των δεσμών που χωρίζουν τους δύο πηρήνες ,αποτελεί ιδιότητα του μορίου και είναι ανεξάρτητο από το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Το μέγεθος του  $J$  ή έστω η απλή παρουσία ανιχνεύσιμων αλληλεπιδράσεων, αποτελεί πολύτιμη δομική πληροφορία. (Field et al ,2017)

### 1.2.5 Πολλαπλότητα σήματος –ο κανόνας( n+1)

Το σήμα NMR ενός πυρήνα που συζευγνύεται με n ισοδύναμα υδρογόνα θα υποστεί σχάση προς μια πολλαπλή με (n+1) γραμμές .Για απλούς τύπους πολλαπλών, η απόσταση μεταξύ γραμμών (σε Hz) αποτελεί τη σταθερά σύζευξης.

**Πίνακας 1.2 : Σχετικές εντάσεις γραμμών για απλούς τύπους πολλαπλών**

(Field etc, 2017,σελ.48)

n	πολλαπλότητα n+1	σχετικές εντάσεις γραμμών	ονομασία πολλαπλής
0	1	1	απλή
1	2	1 :1	διπλή
2	3	1:2:1	τριπλή
3	4	1:3:3:1	τετραπλή
4	5	1:4:6:4:1	πενταπλή
5	6	1:5:10:10:5:1	εξαπλή
6	7	1:6:15:20:15:6:1	επταπλή
7	8	1:7:21:35:35:21:7:1	οκταπλή
8	9	1:8:28:56:70:56:28:8:1	εννεαπλή

### 1.2.6 Φασματοσκοπία NMR πρωτονίου, άνθρακα

#### 1.2.6.1 Φασματοσκοπία $^1\text{H}$ NMR



### Ανάλυση φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Ανάλυση δομής μιας χημικής ένωσης

Για να εξάγουμε χρήσιμες δομικές πληροφορίες από τα φάσματα NMR θα πρέπει να λύσουμε δύο ξεχωριστά προβλήματα. Πρώτα θα πρέπει να αναλύσουμε το φάσμα ώστε να καταγράψουμε τις παραμέτρους NMR (χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης). Στη συνέχεια πρέπει να ερμηνεύσουμε τις τιμές των σταθερών σύζευξης βάσει γνωστών σχέσεων μεταξύ των παραμέτρων και της δομής.

**Πίνακας 1.3 : Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων  $^1\text{H}$  για επιλεγμένες οργανικές ενώσεις (Field etc, 2017 ,σελ.39)**

Ένωση	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm από TMS)
$\text{CH}_4$	0,23
$\text{CH}_3\text{Cl}$	3,05
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	5,33
$\text{CHCl}_3$	7,27
$\text{CH}_3\text{CH}_3$	0,86
$\text{CH}_2=\text{CH}_2$	5,25
Βενζόλιο	7,26
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$	1,06(- $\text{CH}_3$ ),1,81(- $\text{CH}_2$ -),3,47(- $\text{CH}_2\text{-Cl}$ )
$\text{CH}_3\text{CHO}$	2,20(- $\text{CH}_3$ ),9,80(- $\text{CHO}$ )

**Πίνακας 1.4 : Χαρακτηριστικές περιοχές χημικών μετατοπίσεων  $^1\text{H}$  οργανικές ενώσεις**

( Field et al ,2017,σελ.40)

Ομάδα	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm από TMS)
Τετραμεθυλοσιλάνιο	0,0
Μέθυλο ομάδες συνδεδεμένες με $\text{sp}^3$ υβριδισμένα άτομα άνθρακα	0,8-1,2
Μεθυλένο ομάδες συνδεδεμένες με $\text{sp}^3$ υβριδισμένα άτομα άνθρακα	1,0-1,5
Ομάδες μεθινίου συνδεδεμένες με $\text{sp}^3$ υβριδισμένα άτομα άνθρακα	1,2-1,8
Ακετυλениκά πρωτόνια	2-3,5

Ολεφινικά πρωτόνια	5-8
Αρωματικά και ετεροκυκλικά πρωτόνια	6-9
Αλδεϋδικά πρωτόνια	9-10

### 1.2.6.2 Φασματοσκοπία $^{13}\text{C}$ NMR

#### Σύζευξη και αποσύζευξη στα φάσματα $^{13}\text{C}$ NMR

Επειδή ο πυρήνας  $^{13}\text{C}$  είναι ισοτοπικά σπάνιος, είναι εξαιρετικά δύσκολο δύο συνδεδεμένα άτομα άνθρακα σε ένα μόριο να είναι αμφότερα  $^{13}\text{C}$ . Κατά συνέπεια στα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR δεν παρατηρούνται συζεύξεις  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  επομένως δεν υπάρχει πολλαπλότητα σημάτων ή σχάση σε ένα φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR λόγω συζεύξεων  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Η ακτινοβόληση των πυρήνων  $^1\text{H}$  κατά τη διάρκεια λήψης φασμάτων  $^{13}\text{C}$  αποτελεί μια συνήθη πρακτική που επιτρέπει όλοι οι πυρήνες  $^1\text{H}$  να είναι πλήρως αποσυζευγμένοι από τους πυρήνες  $^{13}\text{C}$  (συνήθως καλείται αποσύζευξη ευρείας ζώνης (broad band decoupling) ή αποσύζευξη θορύβου). Τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  έχουν συνήθως τη μορφή μιας σειράς απλών σημάτων και κάθε διακριτό περιβάλλον  $^{13}\text{C}$  στο μόριο οδηγεί σε ένα διαφορετικό σήμα. Εάν οι πυρήνες  $^1\text{H}$  δεν είναι αποσυζευγμένοι από τους πυρήνες  $^{13}\text{C}$  τα σήματα στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  εμφανίζονται ως πολλαπλές όπου οι κύριες σχάσεις οφείλονται σε συζεύξεις  $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ . (Field et al, 2017)

#### Αποσύζευξη spin

Από ένα σήμα πρωτονίου το οποίο είναι πολλαπλό λόγω της σύζευξης spin-spin, είναι δυνατόν να απομακρύνουμε τις επιδράσεις της σχάσης ακτινοβολώντας το δείγμα με μια επιπρόσθετη πηγή Rf στην ίδια ακριβώς συχνότητα με αυτή που συντονίζεται το πρωτόνιο που προκαλεί αυτή τη σχάση. Η επιπλέον ραδιοσυχνότητα προκαλεί ταχύτατη αναστροφή των ακτινοβολούμενων πυρήνων με αποτέλεσμα οι συζευγμένοι πυρήνες να μην τους «αισθάνονται» καθώς δεν θα βρίσκονται αρκετά στην  $\alpha$  ή  $\beta$  κατάσταση ώστε να προκληθεί η σχάση. Λέμε ότι οι ακτινοβολούμενοι πυρήνες έχουν υποστεί αποσύζευξη από τους υπόλοιπους πυρήνες του συστήματος spin. Η αποσύζευξη απλοποιεί τη μορφή πολύπλοκων πολλαπλών απομακρύνοντας κάποιες από τις συζεύξεις (Field et al, 2017).

**Πίνακας 1. 5 : Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων <sup>13</sup> C για επιλεγμένες οργανικές ενώσεις ( Field et al,2017,σελ.68)**

Ένωση	δ <sup>13</sup> C (ppm από TMS)
CH <sub>4</sub>	-2,1
CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	7,3
CH <sub>3</sub> OH	50,2
CH <sub>3</sub> Cl	25,6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	52,9
CHCl <sub>3</sub>	77,3
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	11,5(CH <sub>3</sub> ), 26,5(-CH <sub>2</sub> -),46,7(-CH <sub>2</sub> -Cl)
CH <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub>	123,3
CH <sub>2</sub> =C= CH <sub>2</sub>	208,5(=C=),73,9(= CH <sub>2</sub> )
CH <sub>3</sub> CHO	31,2(-CH <sub>3</sub> )
CH <sub>3</sub> COOH	20,6(-CH <sub>3</sub> ),178,1(-COOH)
CH <sub>3</sub> CO CH <sub>3</sub>	30,7(-CH <sub>3</sub> ).206,7(-CO-)
Βενζόλιο	128,5

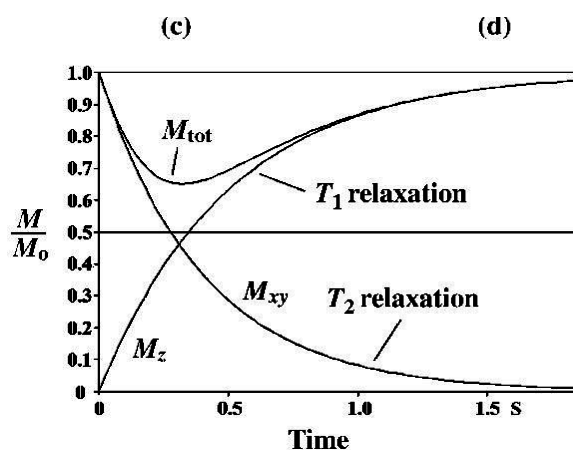
**Πίνακας 1. 6 : Χαρακτηριστικές περιοχές χημικών μετατοπίσεων <sup>13</sup> C σε οργανικές ενώσεις ( Field et al,2017 ,σελ.69)**

Ομάδα	δ <sup>13</sup> C (ppm από TMS)
TMS	0.0
-CH <sub>3</sub> (με μόνο -H ή -R στουςC <sub>α</sub> και C <sub>β</sub> )	0-30
-CH <sub>2</sub> (με μόνο -H ή -R στουςC <sub>α</sub> και C <sub>β</sub> )	20-45
-CH(με μόνο -H ή -R στουςC <sub>α</sub> και C <sub>β</sub> )	30-60
Τεταρτοταγείς(με μόνο -H ή -R στουςC <sub>α</sub> και C <sub>β</sub> )	30-50
O-CH <sub>3</sub>	50-60
N-CH <sub>3</sub>	15-45
C≡C	70-95
C= C	105-160
C(αρωματικοί)	110-155

C(ετεροαρωματικοί)	105-165
-C≡N	115-125
C=O(οξέα, άκυλο αλογονίδια, εστέρες, αμίδια)	155-185
C= O( αλδεϋδες, κετόνες)	185-225

### 1.2.7 Μέθοδος Μέτρησης του Χρόνου Χαλάρωσης Spin-Lattice ( $T_1$ ) στη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) Μηδενικού Σημείου

Η μέθοδος μέτρησης του χρόνου χαλάρωσης spin-lattice ( $T_1$ ) στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) μηδενικού σημείου αποτελεί μια σημαντική διαδικασία για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τη δυναμική συμπεριφορά των πυρηνικών σπιν και την αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλον πλέγματος. Η παράμετρος  $T_1$  περιγράφει το χρόνο που απαιτείται για να επιστρέψει η πυρηνική μαγνήτιση στην κατάσταση ισορροπίας της, έπειτα από την απομάκρυνση από την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. (Ooms et al., 2017). Στην Εικόνα παρουσιάζεται η επαναφορά στην αρχική κατανομή Boltzmann των καταστάσεων των spin συναρτήσει των χρόνων αποκατάστασης spin-spin ( $T_2$ ) και spin-πλέγματος ( $T_1$ ).



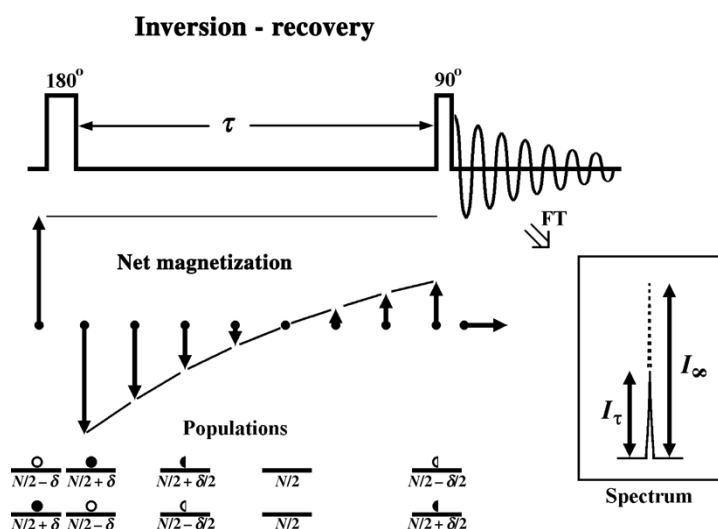
Εικόνα 1.15: Η επαναφορά στην κατανομή Boltzmann μεταξύ των καταστάσεων των spin σε συνάρτηση με τους χρόνους  $T_1$  και  $T_2$ . (Figure 5.7 p. 164. Jacobsen.)

Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τη μεταβολή της πυρηνικής μαγνήτισης σε διάφορα χρονικά σημεία μετά την εφαρμογή μιας ακολουθίας παλμών που προκαλεί την αποκλίνοσα μαγνήτιση από την ισορροπία. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μέτρησης, εφαρμόζονται ακολουθίες παλμών που επιτρέπουν τη μέτρηση της επιστρεφόμενης πυρηνικής μαγνήτισης κατά διαφορετικούς χρόνους.

Από την ανάλυση της καμπύλης αποκατάστασης μαγνήτισης σε σχέση με το χρόνο, μπορεί να προσδιοριστεί ο χρόνος χαλάρωσης  $T_1$ . (Piechnik & Jerosch-Herold, 2018)

Η μέθοδος μέτρησης του  $T_1$  στο NMR με την τεχνική του «μηδενικού σημείου» αποτελεί ένα καθοριστικό εργαλείο για την κατανόηση των διαδικασιών χαλάρωσης των πυρηνικών σπιν και την ανάλυση των ιδιοτήτων τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Επιπλέον, αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την προσαρμογή μοντέλων και την ανάπτυξη νέων μεθόδων ανάλυσης στον τομέα της φασματοσκοπίας NMR. (Ooms et al., 2017).

Η παλμική ακολουθία αντιστροφής – ανάκτησης (inversion-recovery) που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του χρόνου  $T_1$  παρουσιάζεται στην εικόνα 1.16. Στην ίδια εικόνα παρουσιάζεται και η συνολική μαγνήτιση καθώς και η κατανομή των πληθυσμών των spin στις δύο ενεργειακές καταστάσεις ( $\alpha$  και  $\beta$ ).



Εικόνα 1.16: Πείραμα inversion-recover για την μέτρηση του χρόνου  $T_1$ . (Jacobsen, p.176).

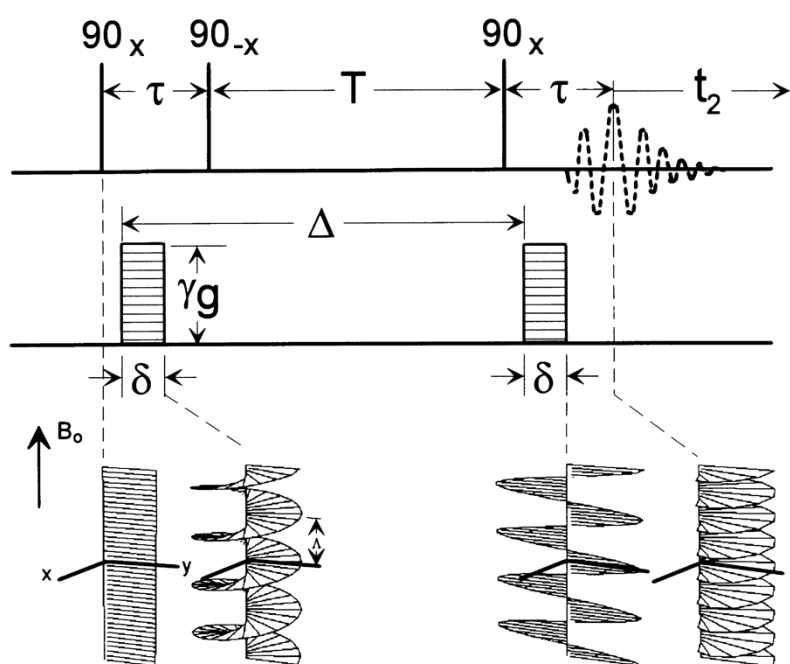
### 1.2.8 Φασματοσκοπία με βάση τη Διάχυση (Diffusion-Ordered Spectroscopy, DOSY)

Το πείραμα DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy) είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο πείραμα στον τομέα της φασματοσκοπίας NMR, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης των μορίων σε ένα διάλυμα. Αυτό το πείραμα βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα διάχυσης των μορίων στο διάλυμα, η οποία επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο τα πυρηνικά σπιν προσανατολίζονται από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Το φάσμα διάχυσης παρουσιάζεται σε δύο διαστάσεις. Στον κάθετο άξονα παριστάνονται οι τιμές του συντελεστή αυτοδιάχυσης, ενώ στο οριζόντιο παρουσιάζεται το κανονικό φάσμα 1D του δείγματος. Στο φάσμα τα προσδεμένα ή συμπλοκοποιημένα μόρια έχουν

διαφορετικό συντελεστή διάχυσης από ότι τα μη προσδεμένα ή μη συμπλοκοποιημένα.(Johnson, 1999)

Κατά την εκτέλεση του πειράματος DOSY, εφαρμόζονται ακολουθίες παλμών που διαφοροποιούνται στη διάρκειά τους κατά τρόπο που να επιτρέπει τον διαχωρισμό των σημάτων ανάλογα με την ταχύτητα διάχυσης των μορίων. Έτσι, μπορούν να αποκτηθούν φάσματα όπου τα σήματα αντιστοιχούν σε διαφορετικά μοριακά είδη ή ομάδες μορίων, ανάλογα με το πόσο γρήγορα διαχέονται στο διάλυμα.(Johnson, 1999).

Στο Σχήμα παρουσιάζεται το βασικό πείραμα για τον προσδιορισμό του συντελεστή διάχυσης με εφαρμογή παλμού  $90^\circ$ , εφαρμογή βαθμίδωσης πεδίου μέσω παλμών, διατήρηση της μαγνήτισης με περιστροφή των στοιχείων του  $\gamma$ - άξονα στην κατεύθυνση  $\pm z$  με εφαρμογή του δεύτερου παλμού  $90^\circ$  και επιστροφή τους στον  $\pm y$  άξονα με τον τρίτο παλμό  $90^\circ$ . Ακολουθεί η δεύτερη εφαρμογή βαθμίδωσης πεδίου μέσω παλμών και η καταγραφή του σήματος.



Εικόνα 1.17: Η παλμική ακολουθία Hahn Stimulated Echo (STE) με βαθμίδωση πεδίου μέσω παλμών (pulsed field gradient).

Γενικά ο συντελεστής διάχυσης ενός μορίου εξαρτάται από το μέγεθος ,τη μοριακή μάζα και το σχήμα του μορίου ,τη θερμοκρασία και το ιξώδες του διαλύματος.Η σύνδεση με τις δομικές ιδιότητες προκύπτει επειδή οι συντελεστές διάχυσης (D) εξαρτώνται από τους παράγοντες τριβής και οι ηλεκτροφορητικές κινητικότητες (m)

εξαρτώνται τόσο από τους παράγοντες τριβής όσο και από τα ενεργά φορτία. Σύμφωνα με τη θεωρία Debye–Einstein (Εξίσωση 2):

$$D=K_B T/f_T \quad (2)$$

όπου  $K_B$  είναι η σταθερά Boltzmann,  $T$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία και  $f_T$  είναι ο συντελεστής τριβής. Για την ειδική περίπτωση ενός σφαιρικού σωματιδίου υδροδυναμικής ακτίνας  $r_H$  σε διαλύτη ιξώδους  $\eta$ , ο συντελεστής τριβής δίνεται από  $f_T = 6\pi\eta r_H$ . (Johnson, 1999)

Λόγω της ικανότητας διαχωρισμού των προσδεμένων ή συμπλοκοποιημένων μορίων από τα μη προσδεμένα και ή με συμπλοκοποιημένα μόρια, η φασματοσκοπία DOSY ονομάζεται και χρωματογραφία NMR (Γεροθανάσης, 2018).

Το πείραμα DOSY παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος και το σχήμα των μορίων, καθώς και την παρουσία πιθανών αλληλεπιδράσεων στο εσωτερικό του διαλύματος. Αυτή η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά πεδία και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον προσδιορισμό δομικών ιδιοτήτων των μορίων ή την παρακολούθηση διεργασιών διάχυσης σε πολυμερή ή βιολογικά συστήματα (Ooms et al., 2017)

### 1.3 2D Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (2D NMR):

Η δισδιάστατη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (2DNMR) αναδεικνύεται ως μια εξελιγμένη και ισχυρή αναλυτική τεχνική, επιτρέποντας μια ολοκληρωμένη εξέταση των μοριακών δομών με αυξημένη ακρίβεια. Με το χειρισμό δύο ανεξάρτητων συχνοτήτων κατά τη διάρκεια του πειράματος, λαμβάνεται ένα δισδιάστατο φάσμα που διευκολύνει τη συσχέτιση σημάτων από διαφορετικούς πυρήνες μέσα σε ένα μόριο. Η πρώτη διάσταση συχνότητας παρέχει παραδοσιακές πληροφορίες χημικής μετατόπισης, ενώ η δεύτερη διάσταση εισάγει συσχετισμούς μεταξύ διαφορετικών πυρηνικών περιστροφών, αποκαλύπτοντας πληροφορίες συνδεσιμότητας και χωρικής εγγύτητας. (Wu & Drive, 2011)

Τα φάσματα NMR δύο διαστάσεων (2D) έχουν ένταση σήματος ως συνάρτηση δύο συχνοτήτων. Στο απλούστερο πείραμα 2D, η συλλογή των φασμάτων περιλαμβάνει τη χρήση δύο παλμών ραδιοσυχνοτήτων ( $Rf$ ), οι οποίοι διαχωρίζονται από ένα χρονικό διάστημα  $t_1$  που μεσολαβεί ανάμεσα στους παλμούς. Ξεχωρίζουμε τέσσερα διακριτά στάδια (Jacobsen, p.354):

Προετοιμασία: διέγερση του πυρήνα A,

Ανάπτυξη: Μέτρηση της χημικής μετατόπισης του πυρήνα A

Ανάμιξη: Μεταφορά της μαγνήτισης από τον πυρήνα A στον πυρήνα B (μέσω σύζευξης  $J$  ή μέσω χώρου NOE)

Ανίχνευση: Μέτρηση της χημικής μετατόπισης του πυρήνα B.

Έτσι, ο πρώτος παλμός Rf διεγείρει τους πυρήνες στο δείγμα, οι οποίοι μπορεί κατά τη διάρκεια του χρόνου  $t_1$  να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Μετά την εφαρμογή του δεύτερου παλμού, η ελεύθερη απόσβεση επαγωγής (FID) συλλέγεται, και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να πραγματοποιηθεί η συλλογή μιας νέας FID. Συλλέγονται ξεχωριστές FID για κάθε τιμή του  $t_1$ , οδηγώντας σε μια σειρά από FID, καθεμία από τις οποίες καταγράφηκε για διαφορετική τιμή  $t_1$ . (Piersanti et al., 2021)

Τα βασικά στοιχεία της δισδιάστατης φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού περιλαμβάνουν:

#### 1. Διακύμανση συχνότητας:

Η χρήση δύο διαφορετικών συχνοτήτων κατά τη διάρκεια του πειράματος οδηγεί στην απόκτηση ενός δισδιάστατου φάσματος. Η πρώτη διάσταση αντιστοιχεί σε παραδοσιακές πληροφορίες χημικής μετατόπισης, ενώ η δεύτερη αποκαλύπτει συσχετισμούς μεταξύ διαφορετικών πυρηνικών περιστροφών.

#### 2. Αλληλουχία παλμών:

Τα πειράματα 2D NMR συνήθως χρησιμοποιούν περισσότερους από δύο παλμούς. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, υπάρχουν τέσσερις σημαντικές περιόδους στην ακολουθία παλμών, συμπεριλαμβανομένης της αλληλουχίας προετοιμασίας και ανάμειξης. Τα περισσότερα πειράματα 2D NMR χρησιμοποιούν περισσότερους από δύο παλμούς. Οι σημαντικότερες περιόδους στην ακολουθία παλμών περιλαμβάνουν την προετοιμασία διέγερσης πυρήνων, την περίοδο ανάμειξης που παράγει τη μαγνήτιση κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης και την περίοδο αντιστροφής της μαγνήτισης. Με αυτά τα πειράματα, όπως το COSY (COrrrelation SpectroscopY) για την αναγνώριση συζεύξεων πρωτονίου-πρωτονίου και το NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) για την εξερεύνηση αλληλεπιδράσεων στο χώρο, μπορούμε να αποκτήσουμε πληροφορίες για τη χωρική εγγύτητα και τη μοριακή δομή με αυξημένη ανάλυση. Ενώ, στη θεωρία υπάρχει ένας απεριόριστος αριθμός πειραμάτων 2DNMR που μπορούν να επινοηθούν, στην πράξη, μόνο λίγες πολύ συγκεκριμένες ακολουθίες προετοιμασίας και ανάμειξης έχουν αναδειχθεί ως ουσιαστικά πειράματα 2DNMR. (Piersanti et al., 2021)

Τα πιο σημαντικά πειράματα 2D NMR για την επίλυση των προβλημάτων προσδιορισμού δομής είναι το COSY (COrrrelation SpectroscopY), το NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY), το HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) ή HMBC (Hetero nuclear Multiple Bond Correlation), το TOCSY (TOtal



Correlation Spectroscopy ) και το INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment).(Piersanti et al., 2021)

Βασικές εφαρμογές διαφορετικών τεχνικών 2D NMR:

Φασματοσκοπία συσχέτισης (CORrelation Spectroscopy, (COSY)):

Η τεχνική COSY αναδεικνύει τις συζεύξεις μεταξύ πρωτονίων-πρωτονίων στο ίδιο μόριο. Αυτή η ανάλυση αποκαλύπτει τη συνδεσιμότητα μεταξύ συζευγμένων πρωτονίων, βοηθώντας έτσι στον προσδιορισμό των μοριακών θραυσμάτων.(Wu&Drive ,2011)

Φασματοσκοπία βασισμένη στην αλληλεπίδραση πυρήνων με το φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, (NOESY)):

Η τεχνική NOESY παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη χωρική εγγύτητα και τις αλληλεπιδράσεις στο χώρο μεταξύ πυρήνων. Βοηθάει στον προσδιορισμό των τρισδιάστατων μοριακών δομών και στη διερεύνηση των μοριακών διαμορφώσεων ανιχνεύοντας αλληλεπιδράσεις στο χώρο.(Wu&Drive ,2011)

Φασματοσκοπία συνολικής συσχέτισης (Total Correlation Spectroscopy, (TOCSY)):

Η τεχνική αυτή αναδεικνύει τις συσχετίσεις όλων πρωτονίων που βρίσκονται σε σύζευξη.Χρησιμοποιείται λοιπόν για την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ όλων των πρωτονίων που συζεύγονται μεταξύ τους σε ένα μόριο, βοηθώντας έτσι στην ανάλυση των μοριακών δομών και την αναγνώριση των διαφόρων συνδυασμών πρωτονίων.(Wu&Drive ,2011)

Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης μετάπτωσης απλού κβάντου (Hetero nuclear Single Quantum Correlation,HSQC):

Η τεχνική HSQC συσχετίζει τις χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων με ετεροπυρήνες, όπως  $^{13}\text{C}$  και  $^{15}\text{N}$ . Χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων, για την ανάλυση των «συνδέσεων» στο μόριο και την πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής.(Emwasetal., 2015)

Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης πολλαπλών δεσμών (Hetero nuclear Multiple Bond Correlation, HMBC):

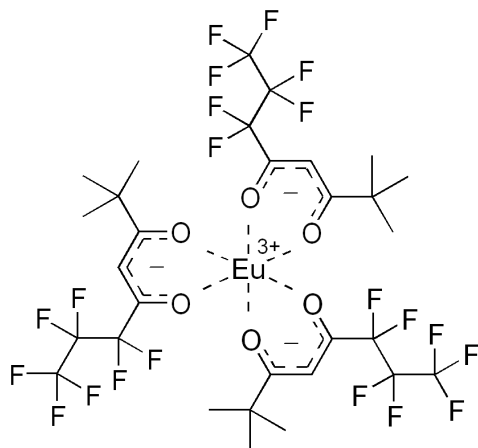
Αναδεικνύει τις συσχετίσεις $^2J$ μέχρι  $^4J$  συνηθέστερα,αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτονίου και ετεροπυρήνων, λχμεταξύ ατόμων  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .

Χρησιμοποιείται για την ανάδειξη των συνδέσεων μεταξύ διαφορετικών μοριακών ομάδων, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για τη δομή του μορίου.(Emwas et al., 2015)

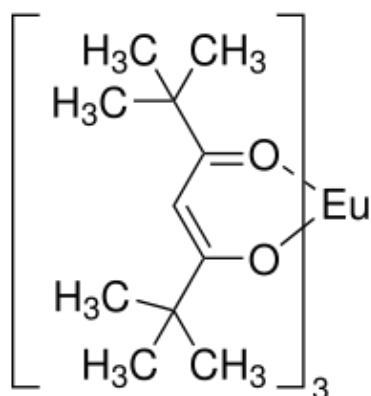
Οι παραπάνω τεχνικές αντιπροσωπεύουν σημαντικά εργαλεία στον τομέα της χημείας και της βιοχημείας, παρέχοντας πλούσιες πληροφορίες για τη δομή και τις διαδικασίες αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων.

#### 1.4 Αντιδραστήρια χημικής μετατόπισης

Τα αντιδραστήρια χημικής μετατόπισης είναι οργανικά σύμπλοκα παραμαγνητικών μετάλλων σπάνιων γαιών από τη σειρά λανθανιδών. Από τις λανθανίδες, το ευρώπιο είναι ίσως το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέταλλο. Δύο από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα σύμπλοκά του είναι το τρις (διπαρολομεθανο)ευρώπιο και το τρις-(6,6,7,7,8,8-επταφθορο-2,2-διμεθυλ-3,5-ατανεδινατο)ευρώπιο που συχνά συντομεύεται  $\text{Eu}(\text{dpm})_3$  και  $\text{Eu}(\text{fod})_3$  αντίστοιχα.(Lam et al.,2020)



Εικόνα 1.18 : Χημική δομή  $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (ανακτήθηκε από <https://www.chemicalbook.com/>)



Εικόνα1.19 : Χημική δομή  $\text{Eu}(\text{dm})_3$ (ανακτήθηκε από <https://www.chemicalbook.com/>)

Όταν τέτοια μεταλλικά σύμπλοκα προστίθενται στην ένωση της οποίας το φάσμα προσδιορίζεται, υπάρχουν μετατοπίσεις στις διάφορες ομάδες πρωτονίων. Η

κατεύθυνση της μετατόπισης (upfield ή downfield) εξαρτάται κυρίως από το μέταλλο που χρησιμοποιείται. (Lam et al.,2020)

Τα σύμπλοκα ευρωπίου, ερβίου, θουλίου και υπερβίου μετατοπίζουν τα αντιδραστήρια σε χαμηλότερο πεδίο, ενώ τα σύμπλοκα δημητρίου, πρασεοδυμίου, νεοδυμίου, σαμαρίου, τερβίου και ολμίου μετατοπίζουν γενικά τους συντονισμούς σε υψηλότερο πεδίο. Η χρήση αντιδραστήριου μετατόπισης ευρωπίου στην ανάλυση γάλατος με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια μέθοδος που έχει εφαρμοστεί για τη βελτίωση της ευαισθησίας και της ανίχνευσης συγκεκριμένων συστατικών στο γάλα. Τα αντιδραστήρια μετατόπισης ευρωπίου προκαλούν μετατοπίσεις στα πυρηνικά μαγνητικά σήματα των πρωτεϊνών και των λιπών στο γάλα, βοηθώντας έτσι στη διαχωριστική ανάλυση και την ποσοτική προσδιορισμό τους. Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η σύσταση του γάλακτος και να ανιχνευθούν πιθανές αλλαγές ή προσμίξεις. (Lam et al.,2020)

#### Αλληλεπίδραση αντιδραστηρίων χημικής μετατόπισης:

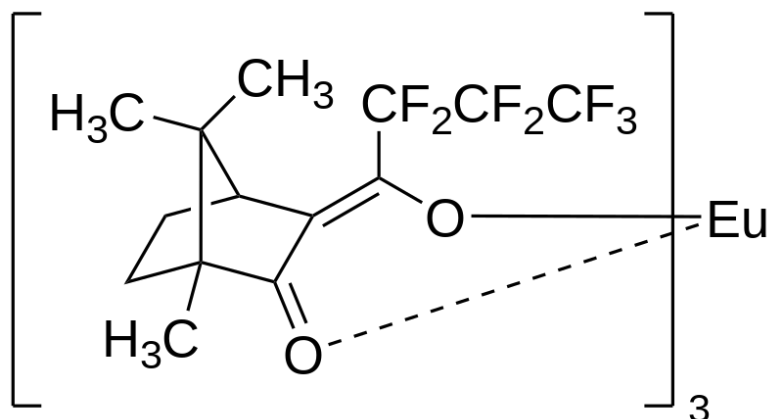
Αυτά τα σύμπλοκα λανθανιδών αλληλεπιδρούν με ένα σχετικά βασικό ζεύγος ηλεκτρονίων (ένα κοινό ζεύγος) το οποίο μπορεί να συντονιστεί με το  $\text{Eu}^{3+}$ . Τυπικά αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, θριάλες, αιθέρες και αμίνες αλληλεπιδρούν. (Moreau et al., 2004)

Τα ιόντα λανθανίδης όπως τα  $\text{Eu}^{3+}$  είναι χρήσιμα αντιδραστήρια για τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) επειδή έχουν μεγάλη μαγνητική ανισοτροπία. Αυτό σημαίνει ότι έχουν ισχυρό μαγνητικό πεδίο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλεκτική ενίσχυση των σημάτων NMR συγκεκριμένων πυρήνων σε ένα μόριο. Τα αντιδραστήρια μετατόπισης λανθανίδης (LSR) κατά την αλληλεπίδραση τους με διάφορα τμήματα όπως το καρβονυλικό οξυγόνο, προκαλούν μια χημική μετατόπιση στο φάσμα. (Moreau et al., 2004)

Επίσης, η παρουσία του ιόντος λανθανίδης τροποποιεί το φάσμα NMR των κοντινών πυρήνων. Αυτή η τεχνική μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων, καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη δυναμική αυτών των μορίων σε διάλυμα. Αυτά τα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται συχνά για την ενίσχυση της ανάλυσης των φασμάτων NMR με διαφοροποίηση μεταξύ χημικά ισοδύναμων πυρήνων. Για παράδειγμα, εάν δύο πρωτόνια σε ένα μόριο έχουν την ίδια χημική μετατόπιση, θα εμφανιστούν ως μια μοναδική κορυφή στο φάσμα NMR. Ωστόσο, εάν ένα αντιδραστήριο μετατόπισης λανθανίδης προστεθεί στο δείγμα, οι χημικές μετατοπίσεις των δύο πρωτονίων μπορεί να μετατοπιστούν διαφορετικά, με αποτέλεσμα δύο ξεχωριστές κορυφές στο φάσμα.

Το μέγεθος της μετατόπισης που βιώνει μια δεδομένη ομάδα πρωτονίων εξαρτάται από τα παρακάτω:

- Την απόσταση που χωρίζει το μέταλλο ( $\text{Eu}^{3+}$ ) και εκείνη την ομάδα πρωτονίων και
- Την συγκέντρωση του αντιδραστηρίου μετατόπισης στο διάλυμα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να συμπεριληφθεί ο αριθμός των γραμμομοριακών ισοδυνάμων των αντιδραστηρίων μετατόπισης που χρησιμοποιούνται ή η μοριακή συγκέντρωση του κατά την επαναφορά ενός μετατοπισμένου φάσματος λανθανίδης



Εικόνα 1.20 :Χημική δομή  $\text{Eu}(\text{hfc})_3$  (ανακτήθηκε από <https://www.chemicalbook.com/>)

Τα αντιδραστήρια μετατόπισης λανθανίδης είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη μελέτη μεγάλων βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, καθώς μπορούν να βοηθήσουν στη διαφοροποίηση μεταξύ σημάτων από διαφορετικές περιοχές του μορίου. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αντιδραστήρια μετατόπισης λανθανίδης μπορούν επίσης να προκαλέσουν διεύρυνση γραμμής και να μειώσουν την ένταση του σήματος, επομένως η χρήση τους πρέπει να βελτιστοποιείται προσεκτικά για κάθε συγκεκριμένο πείραμα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.Μελέτη γάλακτος με φασματοσκοπία NMR

Ο πυρήνας  $^1\text{H}$  με κβαντικό αριθμό σπιν  $I = 1/2$ , υψηλή γυρομαγνητική αναλογία ( $26,75 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) και φυσική αφθονία 99,985% είναι ο πιο ευαίσθητος στην ανίχνευση με NMR και, επομένως, κατάλληλος για τη διερεύνηση ακόμη και μικρών ακόρεστων λιπιδίων σε σύντομο πειραματικό χρόνο. Οι πυρήνες  $^1\text{H}$  μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά σήματα NMR όταν τα πρωτόνια βρίσκονται σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα. Ως εκ τούτου, οι κορυφές σε μια συγκεκριμένη φασματική περιοχή μπορούν να αποδοθούν σε ορισμένα δομικά στοιχεία και η ποσότητα των διαφορετικών ομάδων στα λιπίδια μπορεί να προσδιοριστεί. (Alexandri et al., 2017)

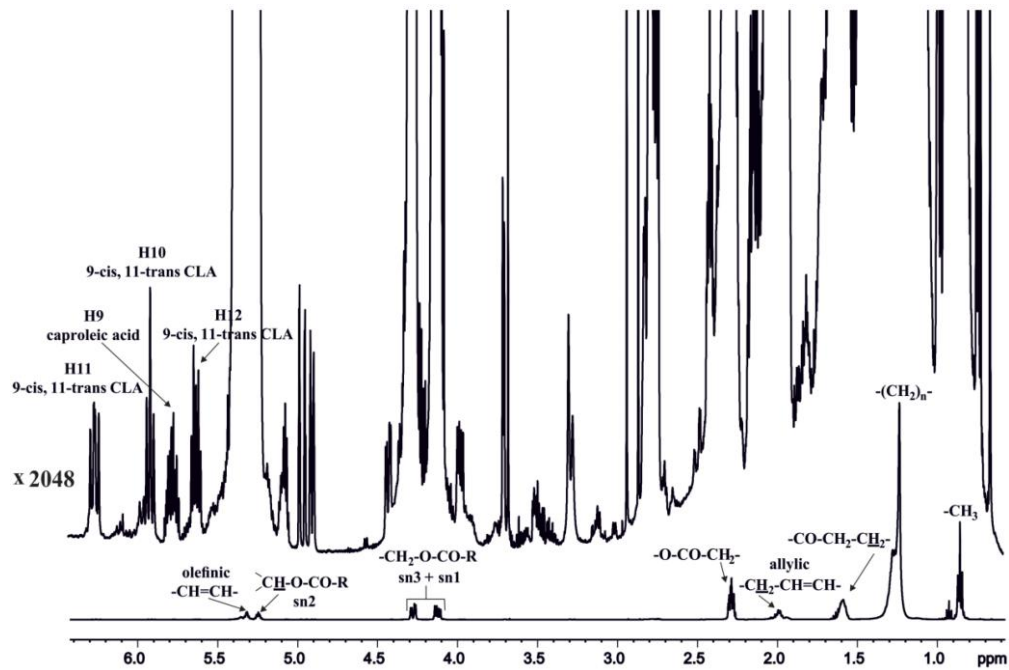
Ένα τυπικό φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του λιπιδικού κλάσματος ενός δείγματος γάλακτος απεικονίζεται στην εικόνα 2.1.

Οι χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H-NMR}$ (εικόνα 2.1) μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πολλές ευρέως καθορισμένες περιοχές: τα ολεφινικά πρωτόνια των απομονωμένων διπλών δεσμών στην περιοχή των 6,2–5,30 ppm, τα ολεφινικά πρωτόνια των συζευγμένων διπλών δεσμών στην περιοχή 6,40–5,20 ppm, τα πρωτόνια του τμήματος γλυκερόλης 5,10–3,70 ppm, τα αλλυλικά πρωτόνια 3,05–2,60 ppm, τα πρωτόνια  $\alpha\text{-CH}_2$  2,50–2,30 ppm, τα πρωτόνια  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$   $\sim$ 2,0 ppm και τα  $(\text{CH}_2)_n$  και  $\text{CH}_3$  πρωτόνια στις περιοχές 1,60-1,2 ppm και 0,98-0,86 ppm, αντίστοιχα. Μπορούν επίσης να παρατηρηθούν συντονισμοί στην περιοχή των 10,5-8 ppm που μπορεί να αποδοθούν στην αυτοοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων και, στη συνέχεια, στη σχάση της αλυσίδας και το σχηματισμό κορεσμένων και ακόρεστων αλδεΐδων μικρότερης αλυσίδας.(Alexandri et al., 2017)

## 2.1 Ολεφινικά πρωτόνια

Τα ολεφινικά πρωτόνια,  $\text{-CH=CH-}$ , των ακόρεστων λιπαρών οξέων εμφανίζονται κυρίως στην περιοχή των 5,2–5,5 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις διαφέρουν ανάλογα με τον αριθμό των μεθυλενικών ομάδων ( $\text{-CH}_2\text{-}$ ) που παρεμβάλλονται από την καρβοξυλική ομάδα ( $\text{-COOH}$ ). Όμως όταν υπάρχουν πάνω από 4 τέτοιες ομάδες είναι δύσκολο να γίνει αξιόπιστη διάκριση της θέσης και της διαμόρφωσης (*cis/trans*) των διπλών δεσμών. Ο γεωμετρικός ισομερισμός του διπλού δεσμού θα μπορούσε να προσδιοριστεί από τη σταθερά σύζευξης των πρωτονίων του μεθυλενίου, η οποία είναι μεγαλύτερη για το *trans* ( $3J \approx 15$  Hz) από αυτή των δεσμών *cis* ( $3J \approx 10$  Hz). Ωστόσο, στην πράξη, αυτό είναι πολύ δύσκολο επειδή οι διαφορές χημικής μετατόπισης του πρωτονίου μεθυλενίου είναι πολύ μικρές. Οι μικρές αυτές διαφορές προκαλούν ένα περίπλοκο μοτίβο σύζευξης των σπιν, γνωστό ως δεύτερης τάξης σύστημα που δυσκολεύει περαιτέρω την ανάλυση.(Alexandri et al., 2017).

Επομένως, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο προσδιορισμός της στερεοχημείας *cis/trans* των διπλών δεσμών λιπιδίων με τη χρήση  $^1\text{H-NMR}$  των ολεφινικών πρωτονίων είναι προβληματικός στη λιπιδική ανάλυση και, σε αυτό το στάδιο, αυτά τα δεδομένα περιορίζονται κυρίως σε ταυτοποίηση στερεοϊσομερών από περιορισμένο αριθμό προτύπων.



Εικόνα 2.1: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  500 MHz του λιπιδικού εκχυλίσματος δείγματος γάλακτος σε  $\text{CDCl}_3$  (298 K, χρόνος απόκτησης(AQ) = 4,0 s, καθυστέρηση χαλάρωσης (RD) = 3,6 s, συνολική πειραματική = 1 ώρα 5 λεπτά). Το ένθετο δείχνει μεγέθυνση 2048× του φάσματος προκειμένου να εμφανιστούν ορισμένοι συντονισμοί των δευτερευόντων ειδών 9-cis, 11-trans, 18:2 CLA και καπρολεϊκού οξέος.

## 2.2 Ολεφινικά πρωτόνια σε συζευγμένους διπλούς δεσμούς

Τα συζυγή λινολεϊκά οξέα (CLAs) έχουν διερευνηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας  $^1\text{H-NMR}$  (Πίνακας 2.1) συμπεριλαμβανομένου του ισομερούς (*cis*-9, *trans*-12) 18:2, το οποίο είναι το κυρίαρχο είδος στα γαλακτοκομικά προϊόντα, και πολλά άλλα ισομερή θέσης και γεωμετρικά που μπορεί να έχουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. (Alexandri et al., 2017)

Η εικόνα 2.1 δείχνει ότι το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  των CLA στο λιπιδικό κλάσμα του γάλακτος εμφανίζει διακριτούς συντονισμούς στην περιοχή των 6,35 έως 5,50 ppm λόγω των πρωτονίων  $-\text{CH}=\text{}$  των συζευγμένων διπλών δεσμών. Ορισμένοι από αυτούς τους συντονισμούς μετατοπίζονται σαφώς σε υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με πρωτόνια απομονωμένων διπλών δεσμών, γεγονός που δείχνει την αυξημένη αλληλεπίδραση μεταξύ των συζευγμένων δεσμών. Τα «εσωτερικά» ολεφινικά πρωτόνια των C10 και C11 διαφέρουν από τα ολεφινικά πρωτόνια των C9 και C12. (Alexandri et al., 2017)

Περαιτέρω, στα μικτά ισομερή *cis/trans* τα σήματα των δεσμών *cis* διαφέρουν σε σχέση με αυτά των δεσμών *trans*. Στην περίπτωση της ίδιας διαμόρφωσης δεσμού, τα σήματα των δύο «εσωτερικών» πρωτονίων επικαλύπτονται καθώς και τα δύο σήματα των «εξωτερικών» πρωτονίων.

Γενικά η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υψηλής ανάλυσης (NMR) έχει γίνει μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος στην ανάλυση λιπιδίων.

Επιτρέπει την αποσαφήνιση της δομής και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μορίων λιπιδίων ακόμη και σε πολύπλοκα μείγματα.

Σε σύγκριση με την κοινή χρωματογραφική ανάλυση (π.χ. GC και HPLC), η φασματοσκοπία NMR έχει πολλά πλεονεκτήματα. Το NMR είναι μια μη καταστροφική μέθοδος και, για ποσοτικοποίηση, δεν απαιτούνται συγκεκριμένα πρότυπα. Ωστόσο, οι τεχνικές NMR έχουν μόνο χαμηλή έως μέτρια ευαισθησία, σε σύγκριση με την MS. (Alexandri et al., 2017)

Επιπλέον, οι βασισμένες σε NMR αναλυτικές και δομικές μέθοδοι λιπιδίων συνήθως περιορίζονται από επικαλυπτόμενα σήματα στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  και τη χαμηλή φυσική αφθονία του  $^{13}\text{C}$ . Ωστόσο, με την αυξανόμενη διαθεσιμότητα οργάνων υψηλού πεδίου, η υψηλή ευαισθησία

Οι κρυογενικοί ανιχνευτές και η τεχνολογία μικροπηνίων, η προηγμένη επεξεργασία δεδομένων και η μεγάλη ποικιλία πολυπυρηνικών τεχνικών 1D και 2DNMR, η φασματοσκοπία NMR υψηλής ανάλυσης έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλής στη μελέτη των λιπιδίων. (Alexandri et al., 2017)

### **2.3 .Πρωτόνια γλυκερίνης**

Η γλυκερίνη ,συνδέεται με λιπαρά οξέα σε συγκεκριμένες θέσεις (sn-1, sn-2, sn-3). Η  $^1\text{H-NMR}$  μπορεί να δώσει πληροφορίες για την κατανομή αυτών των λιπαρών οξέων στα τριγλυκερίδια (TAGs) και τα φωσφολιπίδια.

Το σήμα στα 5,26 ppm αποδίδεται στο H2 της γλυκερίνης, ενώ τα H1 και H3 εμφανίζονται στα 4,15 και 4,30 ppm.Τα μονοακυλογλυκερίδια (MAG) και διακυλογλυκερίδια (DAG) μπορούν επίσης να ταυτοποιηθούν βάσει των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων τους.

### **2.4.Δι-αλλυλικά Πρωτόνια**

Αυτά τα πρωτόνια βρίσκονται σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και εμφανίζονται στην περιοχή 2,60-2,85 ppm.Οι χημικές μετατοπίσεις εξαρτώνται από τον αριθμό και τη γεωμετρική διαμόρφωση των διπλών δεσμών. Για παράδειγμα, τα δι-αλλυλικά πρωτόνια του DHA εμφανίζονται στα 2,85 ppm, ενώ του α-λινολενικού οξέος στα 2,82 ppm και του λινολεϊκού οξέος στα 2,78 ppm.

### **2.5.Πρωτόνια α-CH<sub>2</sub>, Αλλυλικά CH<sub>2</sub>-CH=CH και (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>**

Το DHA έχει ένα σύνθετο σήμα στα 2,46 ppm λόγω της ομάδας COOH και του διπλού δεσμού ω-3.Όλα τα λιπαρά οξέα έχουν σήμα στα 2,33 ppm. Η διαμόρφωση του διπλού δεσμού επηρεάζει τη χημική μετατόπιση των πρωτονίων -CH<sub>2</sub>-CH=CH- των ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFA).

## 2.6. Τερματικά πρωτόνια CH<sub>3</sub>:

Η ομάδα CH<sub>3</sub> του α-λινολενικού οξέος εμφανίζεται στα 0,98 ppm. Η ομάδα CH<sub>3</sub> του βουτυρικού οξέος στα 0,94 ppm., ενώ οι τερματικές ομάδες CH<sub>3</sub> των άλλων λιπαρών οξέων κυμαίνονται από 0,885 έως 0,87 ppm. Τα ω-3 λιπαρά οξέα μπορούν να αναγνωριστούν από τα άλλα λιπίδια με βάση τις χημικές μετατοπίσεις της τερματικής ομάδας CH<sub>3</sub>. Οι διπλοί δεσμοί επηρεάζουν τις χημικές μετατοπίσεις των τερματικών ομάδων CH<sub>3</sub>.

**Πίνακας 2.1 : Αντιστοιχίσεις συχνοτήτων συντονισμού <sup>1</sup>H NMR των ολεφινικών πρωτονίων των λιγνελαικών οξέων (CLAs) σε CDCl<sub>3</sub> (Alexandri et al., 2017)**

Ένωση	Άτομο	Λειτουργική Ομάδα	δ(ppm)	Πολλαπλότητα(Hz)
(10-cis ,12-cis)-CLA	H11, H12	-CH=	6,85	m
(7-trans ,9-cis)-CLA	H8	-CH=	6,3	dd
(9-trans ,11-cis)-CLA	H10	-CH=	6,29	t
(9-trans ,11-cis)-CLA	H11	-CH=	6,28	dd
(9-cis ,11-cis)-CLA	H10,H11	-CH=	6,22	m
(10-trans,12-cis)-CLA	H11	-CH=	6,22	m
(10-cis ,12-cis)-CLA	H10.H13	-CH=	6,13	m
(10-trans ,12-trans)-CLA	H11,H12	-CH=	5,99	m
(9-trans ,11-trans)-CLA	H10,H11	-CH=	5,96	t
(9-cis ,11-trans)-CLA	H10	-CH=	5,93	dd
(9-trans ,11-cis)-CLA	H9	-CH=	5,93	t
(7-trans ,9-cis)-CLA	H9	-CH=	5,93	t
(10-trans ,12-cis)-CLA	H12	-CH=	5,87	m



<b>CLA</b>				
<b>(9-trans ,11-cis)-CLA</b>	H11	-CH=	5,66	m
<b>(9-cis ,11-trans)-CLA</b>	H12	-CH=	5,65	m
<b>(7-trans ,9-cis)-CLA</b>	H7	-CH=	5,64	m
<b>(10-trans ,12-cis)-CLA</b>	H10	-CH=	5,58	m
<b>(10-trans ,12-cis)-CLA</b>	H10,H13	-CH=	5,56	m
<b>(9-trans ,11-trans)-CLA</b>	H9,H12	-CH=	5,54	m
<b>(9-cis ,11-cis)-CLA</b>	H9,H12	-CH=	5,40	m
<b>(9-cis ,11-trans)-CLA</b>	H9	-CH=	5,33	m
<b>(7-trans ,9-cis)-CLA</b>	H10	-CH=	5,31	m
<b>(9-trans ,11-cis)-CLA</b>	H12	-CH=	5,30	m
<b>(10-trans,12-cis)-CLA</b>	H13	-CH=	5,23	m

## 2.7. NMR για επιλεγμένους αναλύτες

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης γάλακτος. Το NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της σύνθεσης του γάλακτος και των συστατικών του, συμπεριλαμβανομένου του νερού, της λακτόζης, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων.

Μία από τις κύριες χρήσεις του NMR στην ανάλυση γάλακτος είναι για την ανίχνευση νοθείας γάλακτος. Για παράδειγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της προσθήκης νερού, ορού γάλακτος ή άλλων στερεών γάλακτος σε νωπό γάλα ή επεξεργασμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το NMR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της σύνθεσης του γάλακτος από διαφορετικά ζωικά είδη, όπως αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα. (Alexandri et al., 2017)

Το NMR είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική, που σημαίνει ότι το δείγμα μπορεί να αναλυθεί χωρίς να αλλοιωθεί η σύνθεση ή οι ιδιότητές του. Αυτό το καθιστά πολύτιμο εργαλείο για τη γαλακτοβιομηχανία, καθώς επιτρέπει την ανάλυση του

γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα ή η διάρκεια ζωής τους.(Alexandri et al., 2017)

Το γάλα είναι ένα σύνθετο μείγμα οργανικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και μικρών μορίων όπως βιταμίνες και μέταλλα. Ως αποτέλεσμα, το φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) του γάλακτος είναι αρκετά περίπλοκο, με πολλές χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν σε διαφορετικά χημικά τμήματα.(Alexandri et al., 2017)

Εδώ είναι μερικές από τις κύριες χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα NMR του γάλακτος σε υδατικό διάλυμα :

Λακτόζη: Ο δισακχαρίτης λακτόζη είναι ο πιο άφθονος υδατάνθρακας στο γάλα. Τα ανωμερή πρωτόνια του (H-1) εμφανίζονται συνήθως ως διπλή κορυφή στα ~ 5,2 ppm, ενώ τα πρωτόνια (H-3) εμφανίζονται ως τριπλή κορυφή στα ~ 3,5 ppm.(Alexandri et al., 2017)

Πρωτεΐνες: Το γάλα περιέχει μια ποικιλία πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών καζεΐνης και ορού γάλακτος. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν πολλές χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα NMR, αντανακλώντας τα διαφορετικά υπολείμματα αμινοξέων και τις χημικές ομάδες που υπάρχουν. Μερικές από τις κύριες κορυφές περιλαμβάνουν τα αμιδικά πρωτόνια (-NH) της πεπτιδικής «ραχοκοκαλιάς», τα οποία εμφανίζονται ως ευρεία κορυφή γύρω στα 7-8 ppm, και τα πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας ορισμένων αμινοξέων, όπως η ιστιδίνη και η τρυπτοφάνη.(Alexandri et al., 2017)

Λιπίδια: Το γάλα περιέχει επίσης μια σειρά από λιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων. Τα πρωτόνια των αλυσίδων λιπαρών οξέων εμφανίζονται τυπικά ως ένα σύνολο αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών γύρω στα 0,8-2,3 ppm, ενώ τα πρωτόνια της του γλυκερινικού «σκελετού» εμφανίζονται ως κορυφή γύρω στα 4,2 ppm.

Μικρού μοριακού βάρους μόρια: Το γάλα περιέχει μια ποικιλία μικρών μορίων, συμπεριλαμβανομένων βιταμινών και μετάλλων. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις, όπως το γαλακτικό οξύ, έχουν χαρακτηριστικές κορυφές NMR, ενώ άλλες μπορεί να μην είναι καλά διαλυμένες στο φάσμα λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής τους.(Alexandri et al., 2017)

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ακριβές φάσμα  $^1\text{H}$ NMR του γάλακτος μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες όπως η φυλή της αγελάδας, η διατροφή του ζώου και η επεξεργασία του γάλακτος. Ωστόσο, οι παραπάνω κορυφές είναι γενικά αντιπροσωπευτικές των κύριων συστατικών που υπάρχουν στο γάλα.(Alexandri et al., 2017)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1. Πειραματική Πορεία

Η πειραματική πορεία για την παραλαβή της λιπιδικής φάσης από τα δείγματα γάλακτος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην εργασία των Boccia et al. (Boccia et al., 2020), και ακολουθήθηκε με κάποιες τροποποιήσεις.

#### Παραλαβή λιπιδικής φάσης από δείγματα γάλακτος

Για να διαχωριστεί το κλάσμα λίπους, σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου falcon προστέθηκαν από 10 ml γάλακτος και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 4.000 στροφές (rpm). Στην συνέχεια το περιεχόμενο των falcon μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και το κάθε κλάσμα λίπους συλλέχθηκε σε σωληνάρια τύπου Errendorf με κουμπωτό πώμα.

**Δείγμα LM25-10.** Στη λιπιδική φάση που συλλέχθηκε σε σωληνάριο τύπου errendorf, προστέθηκε 1ml  $\text{CDCl}_3$  για τη διαλυτοποίηση και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές για απομάκρυνση τυχόν αδιάλυτων σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό (δηλαδή η λιπιδική φάση) φυλάχθηκε στην κατάψυξη ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) μέχρι την ανάλυση. Η συγκέντρωση της λιπιδικής φάσης στο δείγμα ήταν 0,136 g/mL.

**Δείγμα LM-2211.** Στη λιπιδική φάση που συλλέχθηκε σε τρία σωληνάρια errendorf, προστέθηκε 1 ml  $\text{CDCl}_3$  με διαδοχική μεταφορά για τη διαλυτοποίηση και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές για απομάκρυνση τυχόν αδιάλυτων σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό (δηλαδή η λιπιδική φάση) φυλάχθηκε στην κατάψυξη ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) μέχρι την ανάλυση. Η συγκέντρωση της λιπιδικής φάσης στο δείγμα ήταν 0,398g/mL.

**Δείγμα LD1.** Στη λιπιδική φάση που συλλέχθηκε στο σωληνάριο τύπου errendorf, προστέθηκε 1ml  $\text{CDCl}_3$  για τη διαλυτοποίηση και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές για απομάκρυνση τυχόν αδιάλυτων σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό (δηλαδή η λιπιδική φάση) φυλάχθηκε στην κατάψυξη ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) μέχρι την ανάλυση. Η συγκέντρωση της λιπιδικής φάσης στο δείγμα ήταν 0,207g /mL.

**Δείγμα LC1.** Στη λιπιδική φάση που συλλέχθηκε σε τρία σωληνάρια errendorf, προστέθηκε 1ml  $\text{CDCl}_3$  με διαδοχική μεταφορά για τη διαλυτοποίηση και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 8.000 στροφές για απομάκρυνση τυχόν αδιάλυτων σωματιδίων. Το υπερκείμενο υγρό (δηλαδή η λιπιδική φάση) φυλάχθηκε στην κατάψυξη ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) μέχρι την ανάλυση. Η συγκέντρωση της λιπιδικής φάσης στο δείγμα ήταν 0,684 g/mL.

### **Φασματοσκοπική NMR Ανάλυση.**

Αφού κάθε δείγμα ήρθε σε θερμοκρασία δωματίου έγινε παραλαβή όγκου 600 μLτης λιπιδικής φάσης (σε  $\text{CDCl}_3$ ), και μεταφορά σε σωληνάριο NMR (δείγματα LM-2510 και LM-2211) και λήφθηκαν τα φάσματα  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DOSY, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC.

### **Διάλυμα παρακαταθήκης αντιδραστηρίου LSR.**

Διάλυμα συγκέντρωσης  $101 \text{ mg mL}^{-1}$ :

Ποσότητα 50,5 mg LSR διαλυτοποιήθηκαν σε 0,5 mL  $\text{CDCl}_3$ . Το διάλυμα διατηρήθηκε στους  $-20^\circ\text{C}$ .

Διάλυμα συγκέντρωσης  $30,4 \text{ mg mL}^{-1}$ :

Ποσότητα 15,2mg LSR διαλυτοποιήθηκαν σε 0,5 mL  $\text{CDCl}_3$ . Το διάλυμα διατηρήθηκε στους  $-20^\circ\text{C}$ .

### **Πειράματα επίδρασης αντιδραστηρίου LSR.**

Δείγμα LM-2510:

Για την επίδραση του LSR αρχικά προστέθηκαν διαδοχικά 10 μL διαλύματος παρακαταθήκης αντιδραστηρίου LSR συγκέντρωσης  $101 \text{ mg mL}^{-1}$ . Πριν και μετά την κάθε προσθήκη ακολουθούσε η λήψη του κατάλληλου φάσματος NMR.

Δείγμα LM-2211:

Για την επίδραση του LSR αρχικά προστέθηκαν διαδοχικά 5 μL διαλύματος παρακαταθήκης αντιδραστηρίου LSR συγκέντρωσης  $101 \text{ mg mL}^{-1}$ . Πριν και μετά την κάθε προσθήκη ακολουθούσε η λήψη του κατάλληλου φάσματος NMR.

Δείγμα LD1.

Προστέθηκαν διαδοχικά, από διάλυμα παρακαταθήκης LSR συγκέντρωσης 0,025 M, 5 μL LSR (1<sup>η</sup> προσθήκη), 5 μL LSR (2<sup>η</sup> προσθήκη), 5 μL LSR (3<sup>η</sup> προσθήκη), 10 μL LSR (4<sup>η</sup> προσθήκη), 10 μL LSR (5<sup>η</sup> προσθήκη), 10 μL LSR (6<sup>η</sup> προσθήκη), 10 μL LSR (7<sup>η</sup> προσθήκη) και 10 μL LSR (8<sup>η</sup> προσθήκη) που αντιστοιχούν σε 0,207 mM, 0,412 mM, 0,615 mM, 1,015 mM, 1,409 mM, 1,797 mM, 2,179 mM, 2,555 mM στο σωληνάριο NMR, αντίστοιχα.

Δείγμα LC1.

Προστέθηκαν διαδοχικά, από διάλυμα παρακαταθήκης LSR συγκέντρωσης 0,025 M, 5 μL LSR (1<sup>η</sup> προσθήκη), 5 μL LSR (2<sup>η</sup> προσθήκη), 5 μL LSR (3<sup>η</sup> προσθήκη), 10 μL LSR

(4<sup>η</sup>προσθήκη), 10μL LSR (5<sup>η</sup>προσθήκη), 10 μL LSR (6<sup>η</sup>προσθήκη), 10 μL LSR (7<sup>η</sup>προσθήκη) ,10 μL LSR (8<sup>η</sup>προσθήκη) και 20 μL LSR (9<sup>η</sup>προσθήκη) που αντιστοιχούν σε 0,207 mM , 0,412 mM , 0,615 mM , 1,015 mM , 1,409 mM , 1,797 mM ,2,179 mM , 2,555mM και 3,285 mM στο σωληνάριο NMR,αντίστοιχα.

**Φασματοσκοπική NMR μελέτη της επίδραση του αντιδραστηρίου LSR.**

*Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR*

**Δείγμα LM-2510 και LM-2211.** Μετά την 1<sup>η</sup>προσθήκη αντιδραστηρίου LSR λήφθηκαν τα φάσματα <sup>1</sup>H , <sup>13</sup>C και HSQC. Μετά τη 2<sup>η</sup> προσθήκη αντιδραστηρίου LSR λήφθηκαν τα <sup>1</sup>H , TOCSY, HSQC και HMBC φάσματα. Τέλος ,μετά την 3<sup>η</sup> προσθήκη αντιδραστηρίου LSR λήφθηκαν επιπρόσθετα και φάσματα 1D TOCSY.

**Δείγμα LD1 και LC1.** Πριν και μετά κάθε διαδοχική προσθήκη έγινε η λήψη <sup>1</sup>H NMRφάσματος.

*Αλληλεπίδραση αντιδραστηρίου LSR με τη λιπιδική φάση*

Για την μελέτη της αλληλεπίδραση του LSR με τα συστατικά της λιπιδικής φάσης του γάλακτος, πέραν των πειραμάτων που μελετήθηκε η μεταβολή στη χημική μετατόπιση, μελετήθηκαν

1. Η επίδρασή της παρουσίας και αλληλεπίδρασης του αντιδραστηρίου LSR στο χρόνο αποδιέγερσης σπιν-πλέγματος ( $T_1$ ) των συστατικών της λιπιδικής φάσης
2. Η επίδραση της παρουσίας και αλληλεπίδρασης του αντιδραστηρίου LSR στο συντελεστή διάχυσης των συστατικών της λιπιδικής φάσης

**Ένταση Μαγνητικού Πεδίου και επίδραση παρουσίας LSR.**

Έγινε μελέτη της επίδρασης της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στη διαχωριστική ικανότητα για χαρακτηριστικές ομάδες και συστατικά της λιπιδικής φάσης. Μελετήθηκε η επίδραση της έντασης του πεδίου έντασης 5,8 T, 9,4 T, 11,7 T ή 250 MHz, 400,13MHz και 500,13 MHz, αντίστοιχα.

Η μελέτη έγινε σε δείγματα τόσο χωρίς όσο και με την παρουσία αντιδραστηρίου LSR.

**Β.Παράμετροι και οργανολογία που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα**

Τα φάσματα NMR λήφθηκαν σε φασματογράφο Bruker AVII 500 MHz ένταση πεδίου 500,13 MHz εξοπλισμένο είτε με υποδοχέα τριπλού συντονισμού αντίστροφης γεωμετρίας (triple resonance inverse, (TXI)(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N)) με δυνατότητα βαθμίδωσης πεδίου και σε φασματογράφο Bruker NEO με κρυοανιχνευτή (NEO-TCPI) (Bruker Biospin, Γερμανία). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους 298°K. Η

επεξεργασία των φασμάτων υλοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Topspin 4.2. Το «κλείδωμα» του πεδίου, η ομογενοποίηση, ο συντονισμός και ο συγχρονισμός του υποδοχέα στο κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν αυτόματα για κάθε πείραμα.

Όλα τα φάσματα 1D  $^1\text{H}$  NMR συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας γωνία παλμού  $30^\circ$ , φασματικό πλάτος 20 ppm, περίοδο αναμονής 5 δευτερολέπτων και χρονολήψης φάσματος 3,27 s.

Συλλέχθηκαν 64 K χρονικά σημεία και στα λαμβανόμενα φάσματα FID έγινε μετασχηματισμός Fourier χρησιμοποιώντας εκθετική συνάρτηση με παράμετρο διεύρυνσης γραμμής ίση με 0,3 Hz.

Η προσαρμογή της φάσης και η διόρθωση της γραμμής βάσης πραγματοποιήθηκαν χειροκίνητα χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin έκδοση 4.2., ενώ η ανάλυση των σημάτων συντονισμού (κορυφές, πολλαπλότητα, ολοκλήρωση) πραγματοποιήθηκαν χειροκίνητα.

Για τα πειράματα 2D NMR  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC χρησιμοποιήθηκαν οι συνήθεις παράμετροι με βάση την βιβλιοθήκη πειραμάτων της Bruker με την βελτιστοποίηση των κρίσιμων πειραματικών παραμέτρων. Στα ετεροπυρηνικά πειράματα HSQC και HMBC, οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν για σταθερές σύζευξης 145,0 and και 8,0 Hz, αντίστοιχα.

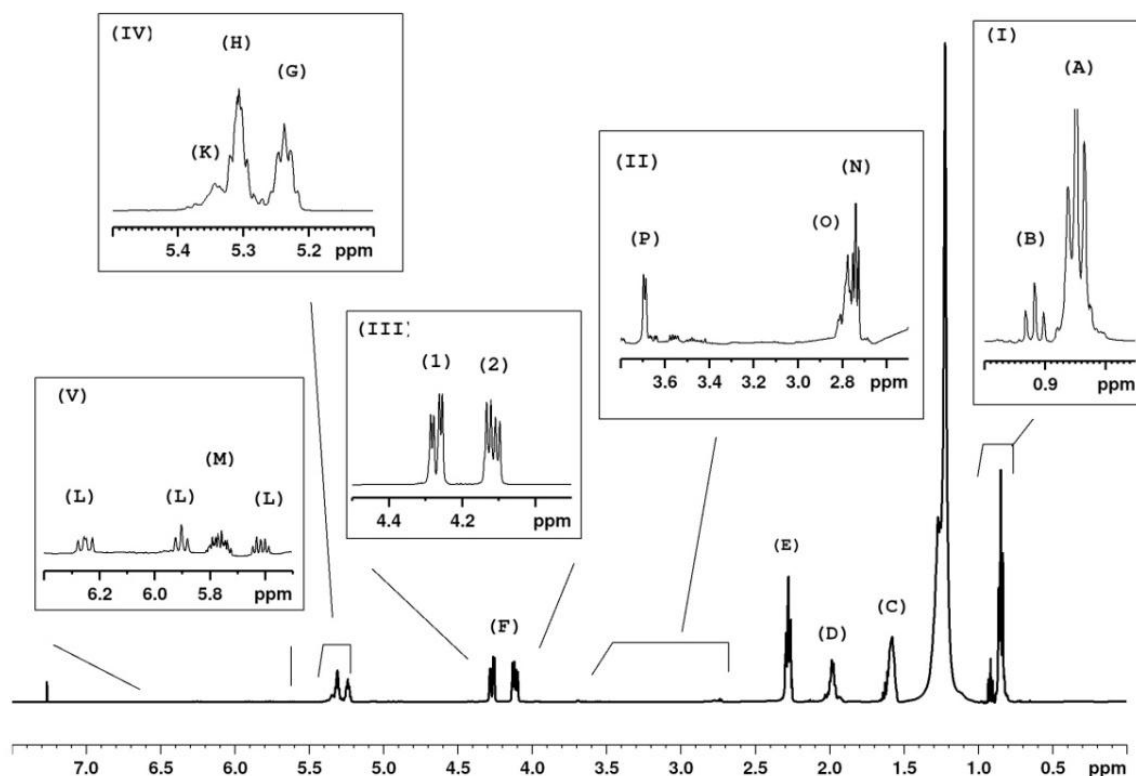
Για τα πειράματα DOSY, αυτά πραγματοποιήθηκαν με χρήση της ακολουθίας LED με χρήση δίπολης βαθμίθωσης πεδίου (longitudinal-eddy-current-delay (LED) using bipolar gradients). Οι παράμετροι  $\Delta$  (Bigdelta ( $\Delta$ )) και  $\delta$  (littledelta ( $\delta$ )) βελτιστοποιήθηκαν και βρέθηκαν 0.20 s και 2.4 ms για  $\Delta$  and  $\delta$ , αντίστοιχα. 16 πειράματα συλλέχθηκαν με γραμμική αύξηση της έντασης του βαθμωτού μαγνητικού πεδίου από 2 στο 95 % της μέγιστης τιμής (δηλαδή από 1 έως 74 G/cm).

Το λογισμικό MarvinSketch (Chemaxon LTD) χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των χημικών δομών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1 Μελέτη λιπιδικού προφίλ του γάλακτος με την ακολουθούμενη κατεργασία δείγματος



Σχήμα 4.1 : Πρωτοϊακό φάσμα του δείγματος LM2211 (0,398 g/mL)

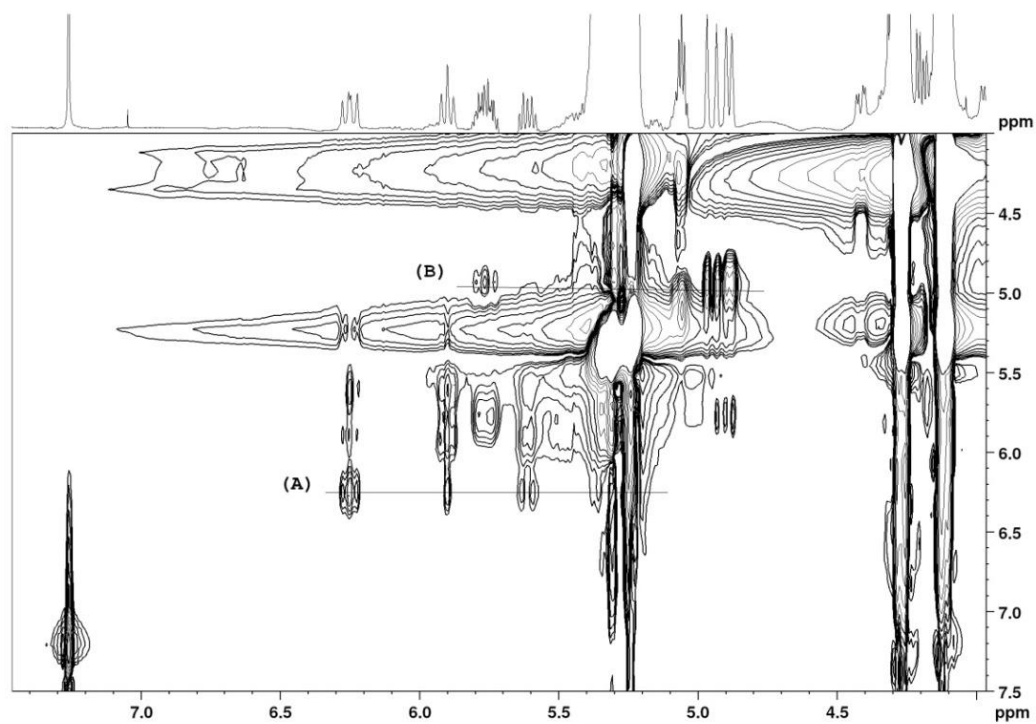
Το Σχήμα 4.1 απεικονίζει το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του λιπιδικού κλάσματος που λαμβάνεται από τα 1,60 g δείγματος λιπιδίου γάλακτος LFC. Στην εικόνα (I) τα A αντιπροσωπεύουν τα πρωτόνια των ακυλικών τμημάτων όλων των λιπιδίων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα B αντιπροσωπεύουν τα μεθυλικά- $\text{CH}_3$  πρωτόνια του βουτυρικού οξέος και των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων, μεταξύ των οποίων και το λινολενικό οξύ. Το C αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  των ΛΟ και το E τα πρωτόνια  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  των λιπαρών οξέων. Το D στα 1,98 ppm αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$  των cis UFA. Στην εικόνα (II) τα N στα 2,74 ppm αντιπροσωπεύουν τα  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$  του λινολεϊκού οξέος, τα O στα 2,81 ppm τα πρωτόνια  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$  του DHA, τα P στα 3,7 ppm τα  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$  των 1,2 DAG. Στην εικόνα (III) το F αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια sn-3 και sn-1- $\text{CH}_2$  των τμημάτων τριακυλογλυκερόλης (TAG). Στην εικόνα (IV), το G στα 5,23 ppm

αντιπροσωπεύει τα –CH–OOC– της τριακυκογλυκερόλης , το H στα 5,30 ppm τα –CH=CH–των *cis* UFA ,ενώ το K στα 5,34 ppm τα –CH=CH– των *trans* UFA .Τέλος στην εικόνα (V) , το M αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια του καπρολεϊκού οξέος ,ενώ το Lδείχνει τα CLA.Πιο συγκεκριμένα στα 6,25 ppm έχουμε τα H-11 (12-*cis*,10-*trans*) 18:2 CLA,στα 5,90 ppm έχουμε τα H-10 (9-*cis*,12-*trans*) 18:2 CLA και στα 5,61 ppm έχουμε τα H-12 (9-*cis*,11-*trans*) 18:2 CLA.

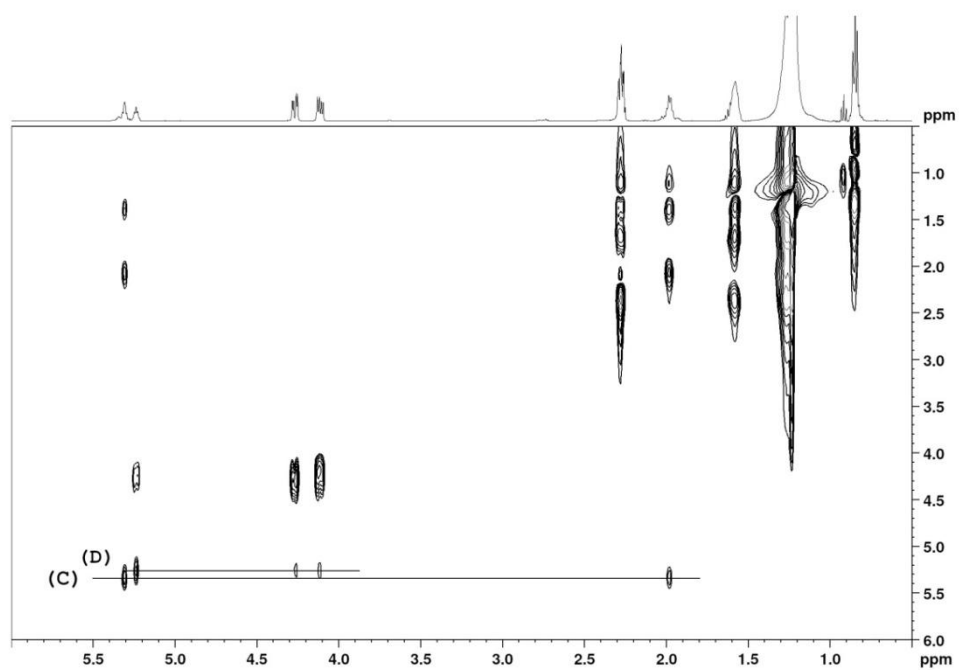
**Πίνακας 4.1. Εκχωρήσεις κορυφής για <sup>1</sup>H φάσμα λιπιδικού κλάσματος που λαμβάνεται από τα 1,60 g δείγματος λιπιδίου γάλακτος LFC**

Ένωση	Χαρακτηριστική ομάδα	δ <sup>1</sup> H ppm
All FA	-CH <sub>3</sub>	0,89
All n-3 FA & Butyric FA	-CH <sub>3</sub>	0,98
Cis UFA& Butyric FA	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	2,1
All FA	-OOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	2,3
Linoleic FA	-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2,74
Linolenic FA	-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2,77
DHA	-CH <sub>2</sub> -CH=CH-	2,81
Glycerol in TAG	-CH <sub>2</sub>	4,11 H3
Glycerol in TAG	-CH <sub>2</sub>	4,27 H1
Glycerol in TAG	-CH	5,24 H2
(9- <i>cis</i> ,11- <i>trans</i> )18:2 CLA	-CH	5,25 (αλληλεπικάλυψη από τα 5,24 ppm)
Cis UFA	=CH-	5,31
Trans UFA	=CH-	5,34
(9- <i>cis</i> ,11- <i>trans</i> )18:2 CLA	-CH	5,61 H12
Caproleic FA	=CH-	5,76
(9- <i>cis</i> ,12- <i>trans</i> ) 18:2 CLA	-CH	5,90 H10
(11- <i>cis</i> ,9- <i>trans</i> )18:2 CLA	-CH	6,25 H11





Σχήμα 4.2 :Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D TOCSY του δείγματος LM2211 (0,398 g/mL) για το ισομερές (9- *cis* ,11-*trans*) 18:2 CLA ,H-10 H-11 H-12 H-9 (A) και για το καπρολεϊκό οξύ H-9 H-10α & H-10β (B)

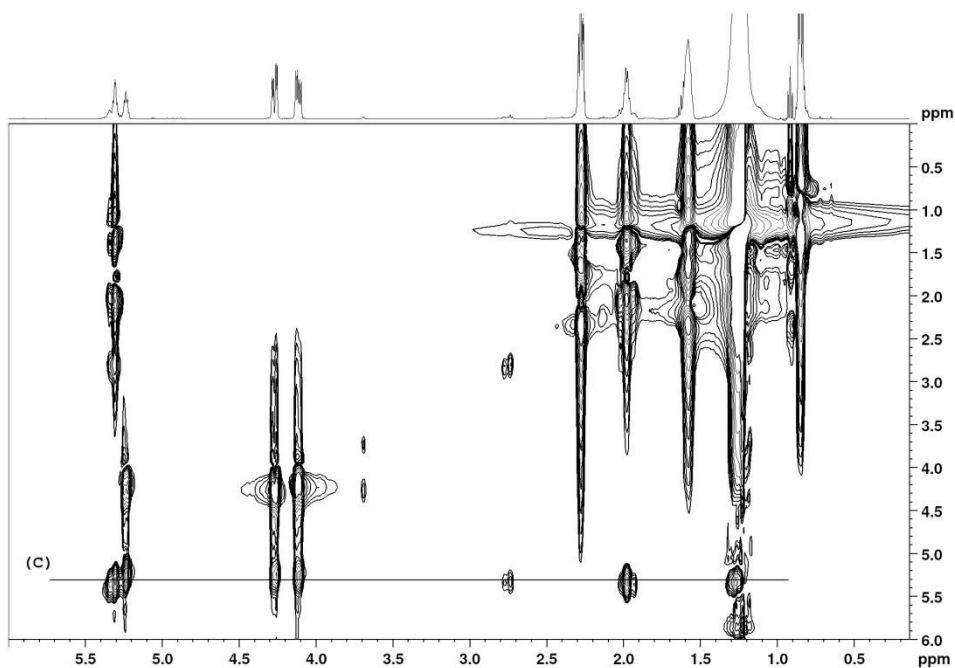


Σχήμα 4.3 :Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος 2D TOCSY του δείγματος LM 2211 (0 ,398 g/mL) για το *cis* UFA (c) κα glycerol in TAG (D)

Τα  $-CH-COO-$  των TAG στα 5,23 ppm (σχήμα σελ 52) συζευγνύονται με τα πρωτόνια sn-3 και sn-1 των TAG στα  $\sim 4,27$  και 4,11 ppm ,όπως φαίνονται αντίστοιχα στο Σχήμα 4.2 και στον Πίνακα 4.1 (γραμμή D) .

Στο σχήμα 4.3 παρουσιάζεται το φάσμα 2DΤOCSYμε επισήμανση (γραμμές Cκαι D) των ολεφινικών πρωτονίων των UFA(  $\sim 5,3$  ppm) και των  $-CH_2-CH=CH-$  (βλ. σχήμα 4.2σελ 52 ) στα 1,98ppm (γραμμή C) .

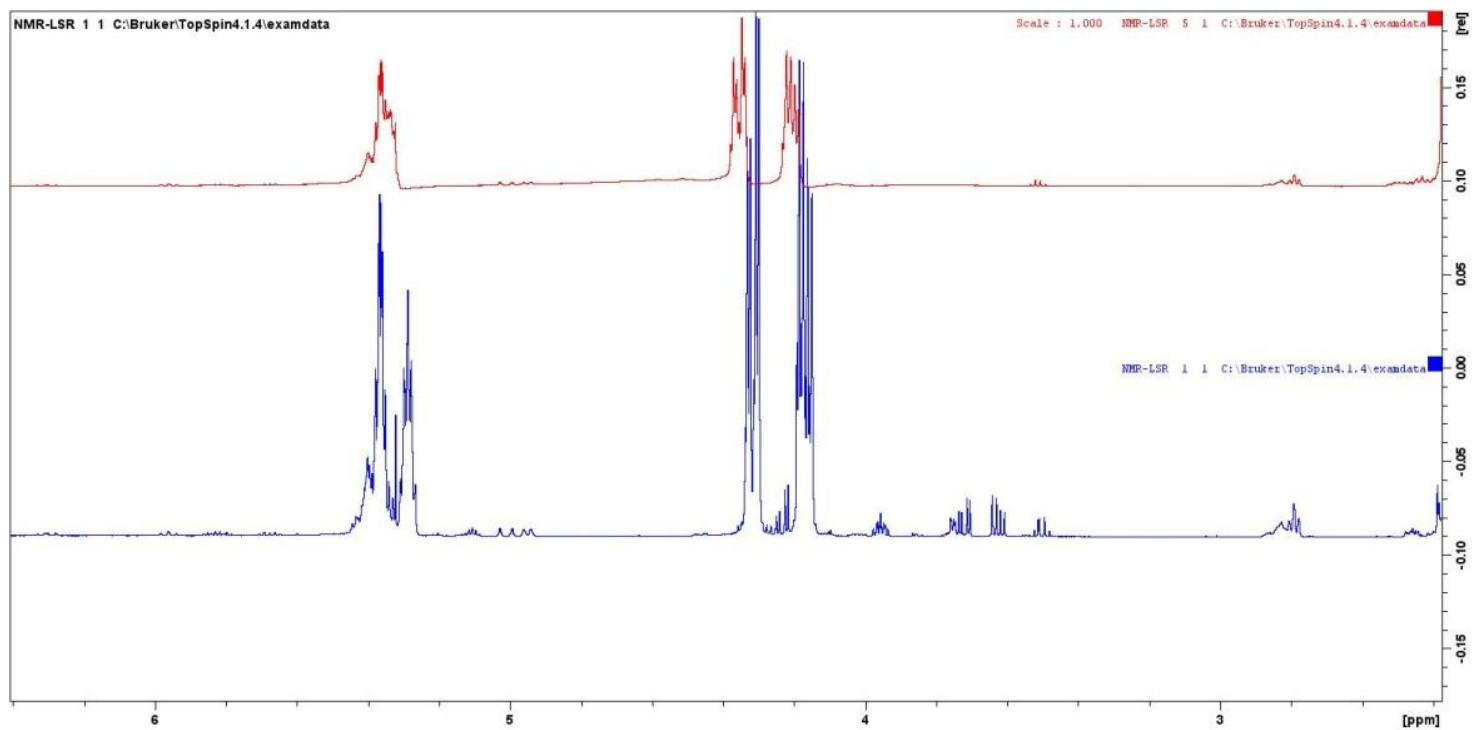
Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η παραπάνω αναφερόμενη επιλεγμένη περιοχή του Σχήματος 4.3 (C).



Σχήμα 4.4 :Μεγέθυνση όπου φαίνεται και η κορυφή διασταύρωσης λινολενικού λιπελαϊκού

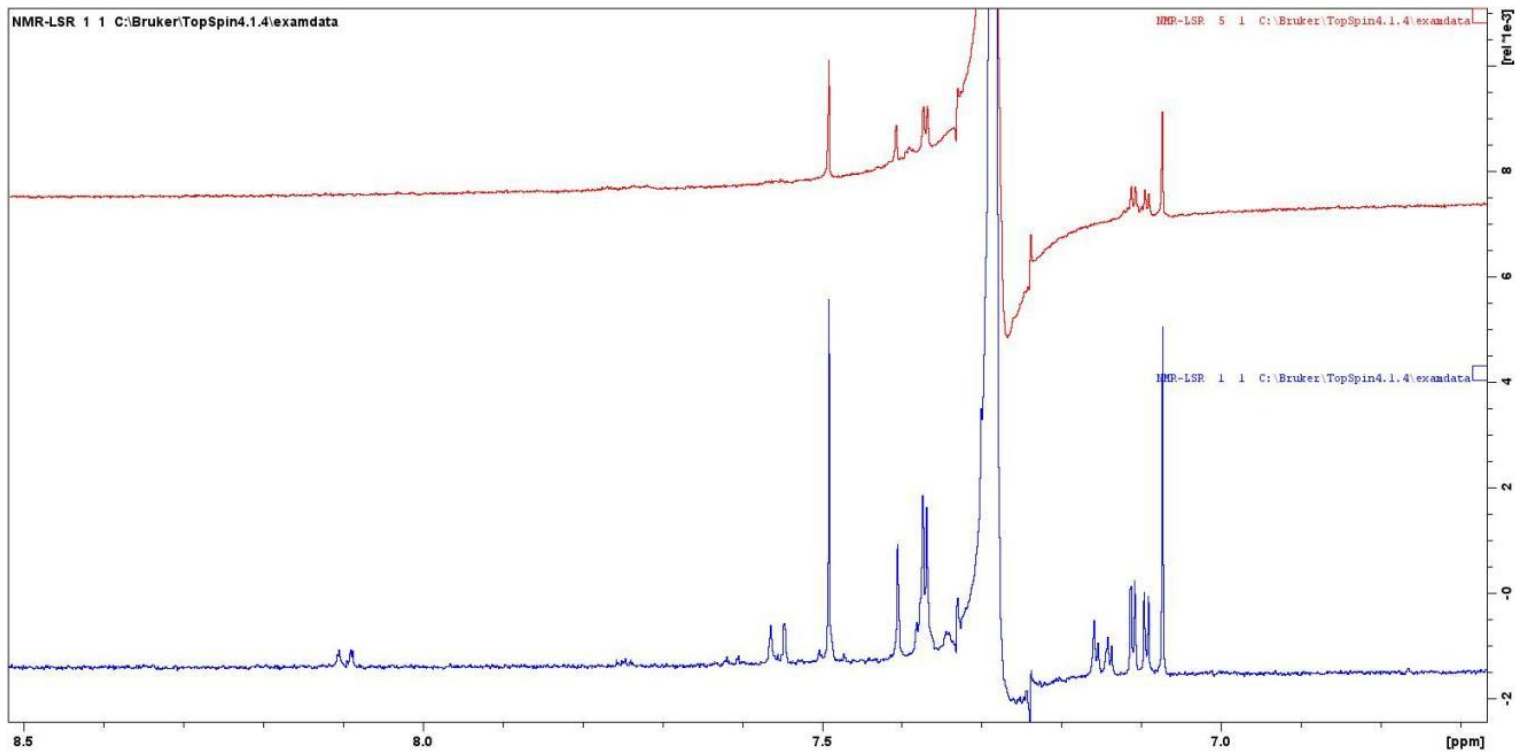
## 4.2.1 Επίδραση LSR

Παρακάτω βλέπουμε τις χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται μετά την προσθήκη 10  $\mu$ L LSR στο δείγμα LM25-10 (πρώτη προσθήκη)



Εικόνα 4.1: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM 25-10 (0,136 g/mL). Βλέπουμε τις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών μετά την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM ) LSR για την περιοχή από 0-7 ppm ( Το φάσμα με το μπλε χρώμα είναι χωρίς την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης).

Στην εικόνα 4.1 βλέπουμε τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM25-10 (0,136 g/mL) που δείχνουν τις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών μετά την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  LSR για την περιοχή από 0-7 ppm. Το φάσμα με το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει το δείγμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών, υποδεικνύοντας αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιδραστηρίου και των πρωτονίων σε αυτή την περιοχή.

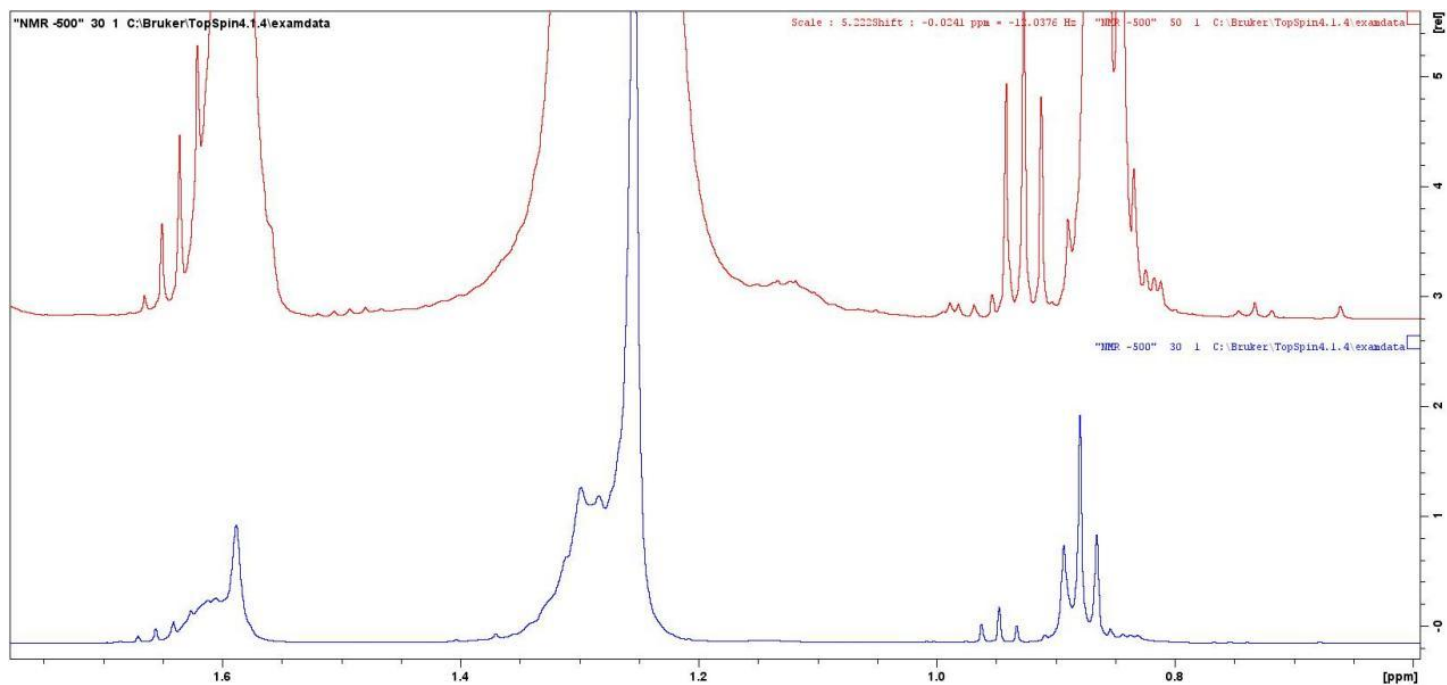


Εικόνα 4.2: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM 25-10(0,136 g/mL).Βλέπουμε τις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών μετά την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM ) LSR για την περιοχή από 7-8,5 ppm .

Στην εικόνα 4.2 βλέπουμε τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM25-10 (0,136 g/mL) που δείχνουν τις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών μετά την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  LSR για την περιοχή από 7-8,5 ppm. Το φάσμα με το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει το δείγμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών, υποδεικνύοντας αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιδραστηρίου και των πρωτονίων σε αυτή την περιοχή.

#### **4.2.1.1 Συγκριτική αξιολόγηση $^1\text{H}$ φασμάτων για δυο επίπεδα συγκέντρωσης της λιπιδικής φάσης**

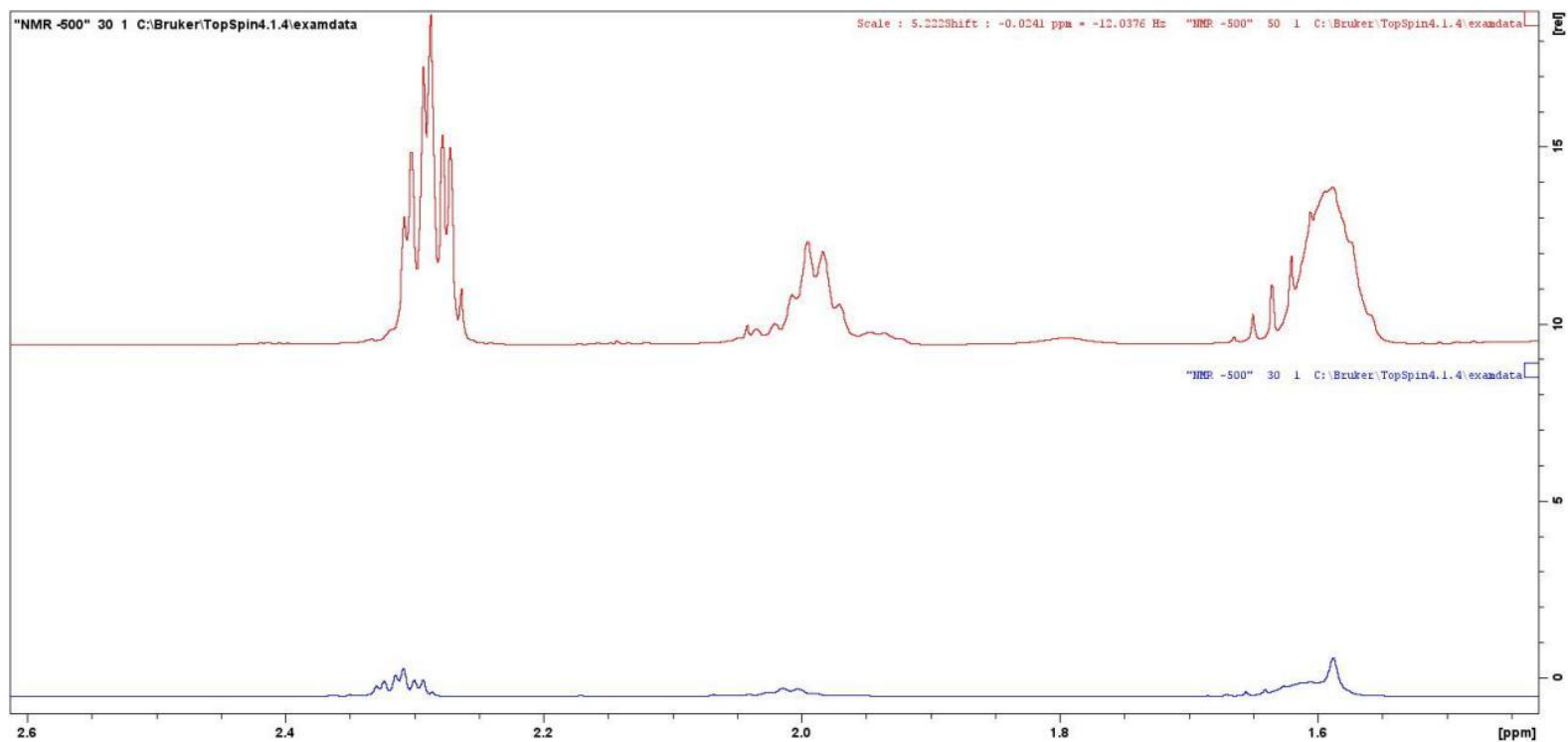
Παρακάτω βλέπουμε τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR, LM 25-10(0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) (1<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων) πριν και μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης.



Εικόνα 4.3 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11(0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 0-1,6 ppm

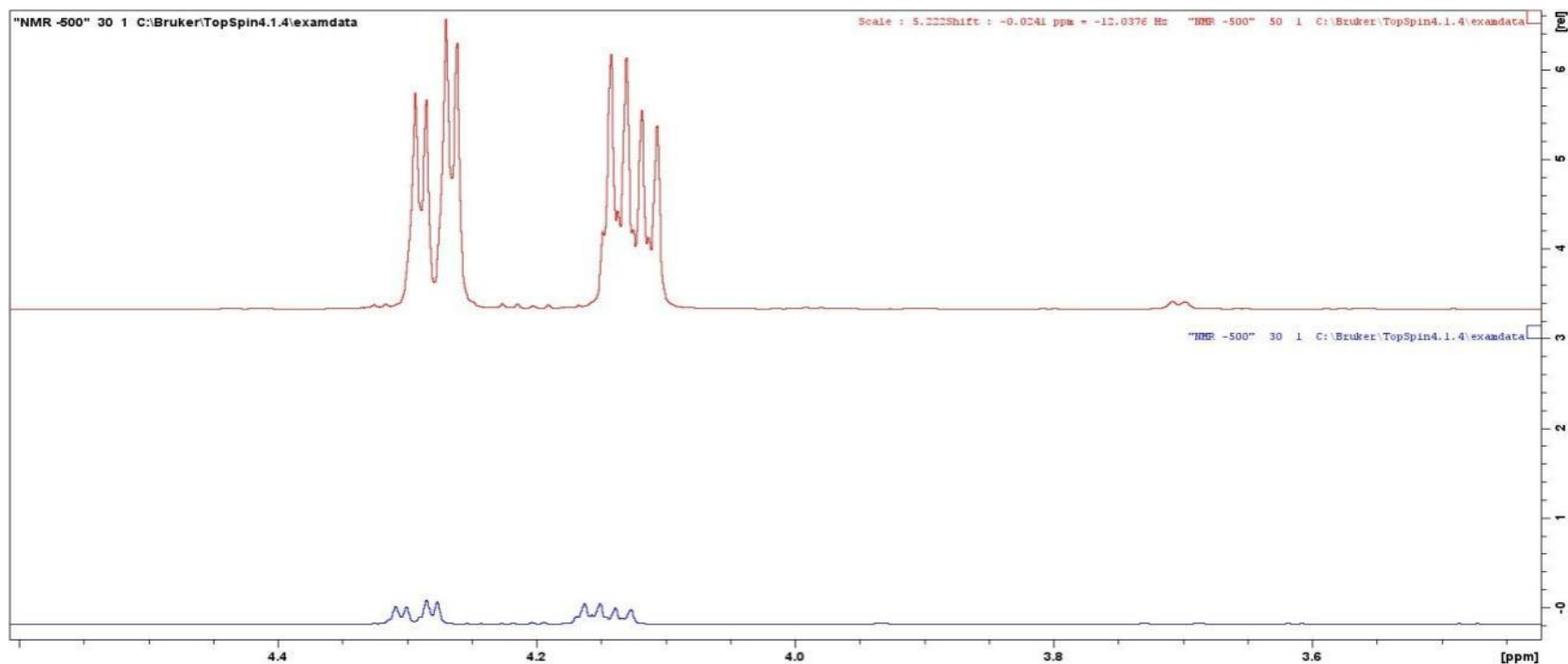
Στην εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η περιοχή των  $-\text{CH}_3$  πρωτονίων των Λ.Ο . Στα 0,89 και 0,98 ppm καθώς και των  $\text{CH}_2$  ομάδων των cis UFA στα 2,1 ppm

Η αυξημένη συγκέντρωση δεν επηρεάζει την διακριτική ικανότητα για τις παραπάνω χαρακτηριστικές ομάδες.



Εικόνα 4.4 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11(0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 1,6-2,6 ppm

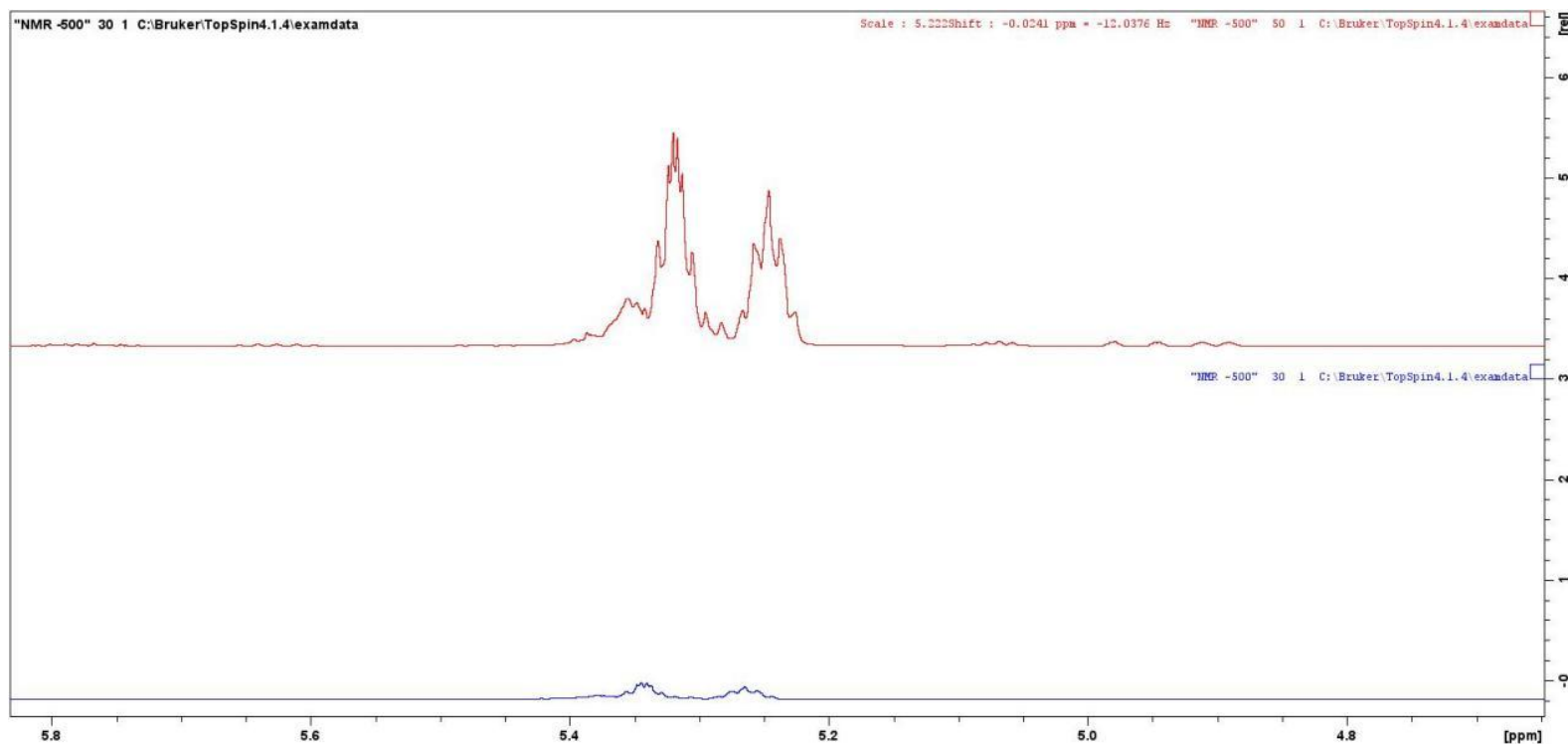
Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζεται (επιπλέον αυτών που αναφέρονται στην προηγούμενη εικόνα ) η περιοχή των  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  πρωτονίων στα 2,3 ppm. Η αυξημένη συγκέντρωση δεν επηρεάζει την διακριτική ικανότητα για τις παραπάνω χαρακτηριστικές ομάδες. Η υψηλότερη συγκέντρωση μάλιστα είναι αναγκαία για την αύξηση του σήματος, αυξάνοντας έτσι την τιμή σήμα- προς -θόρυβο (S/N).



Εικόνα 4.5 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11(0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 2,6-5 ppm

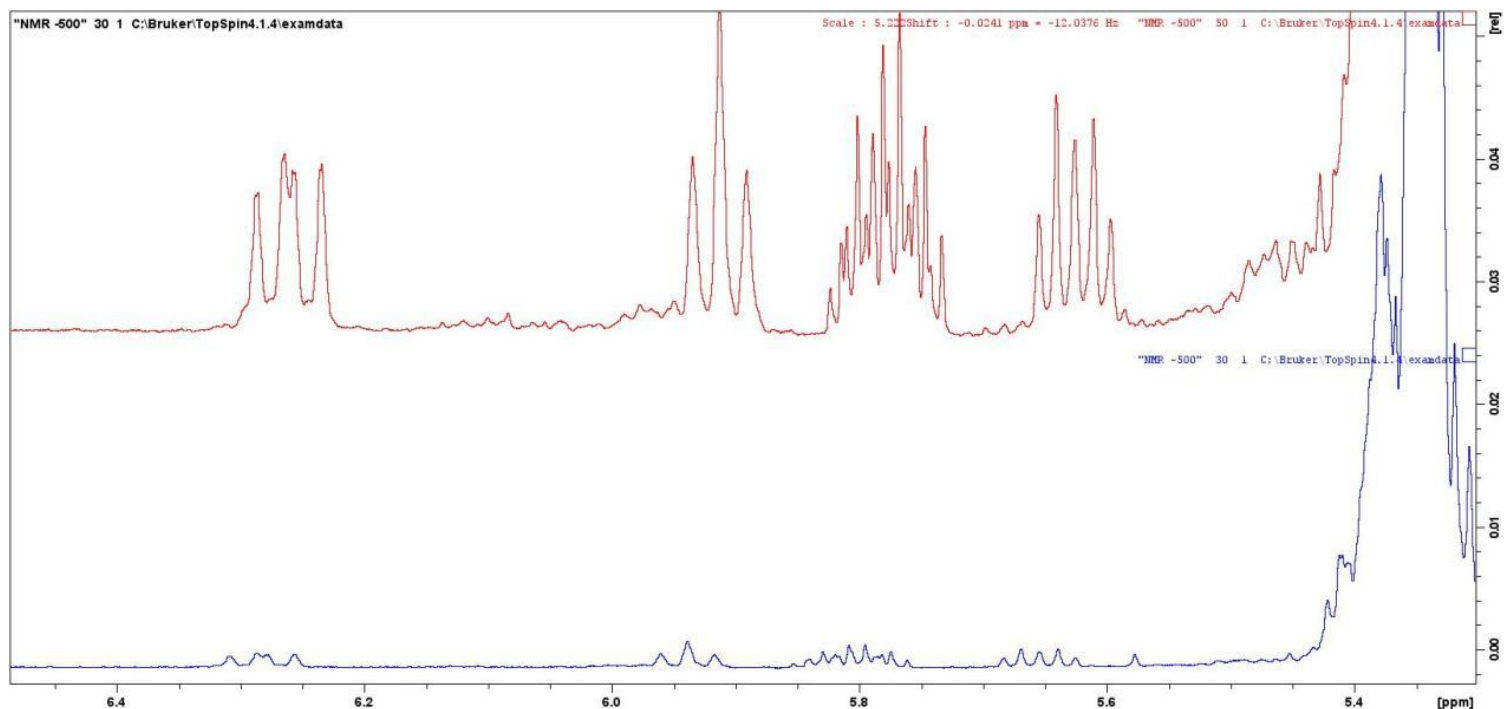
Στην εικόνα 4.5 παρουσιάζεται η περιοχή των  $-\text{CH}_2$  πρωτονίων της Glycerol in TAG ,τα H3 στα 4,11 και τα H1 στα 4,27 ppm. Η αυξημένη συγκέντρωση δεν επηρεάζει την διακριτική ικανότητα για τις παραπάνω χαρακτηριστικές ομάδες. Η υψηλότερη συγκέντρωση μάλιστα είναι αναγκαία για την αύξηση του σήματος, αυξάνοντας έτσι την τιμή σήμα- προς -θόρυβο (S/N).





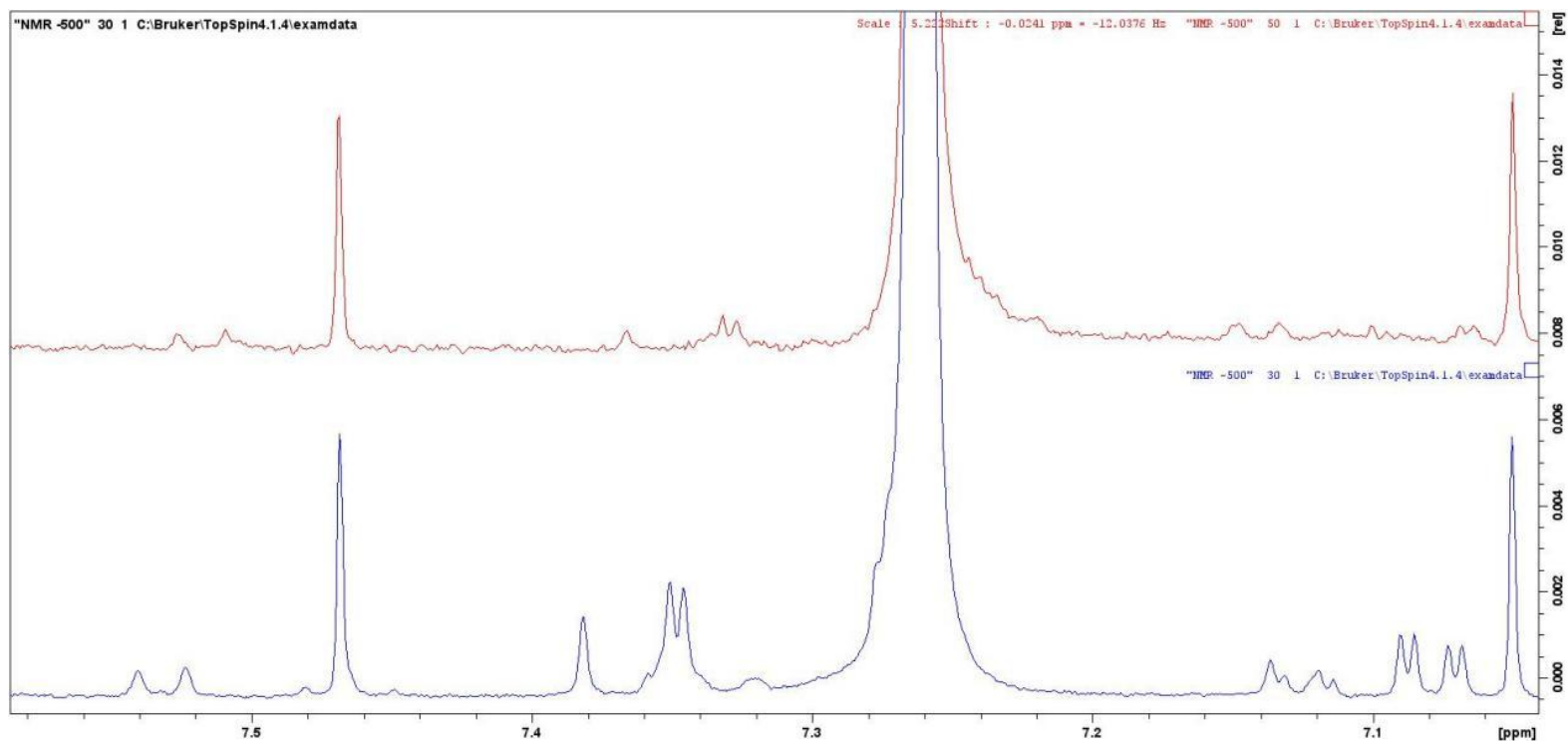
Εικόνα 4.6 : Φάσματα <sup>1</sup>H NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11(0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 5-5,8 ppm

Στην εικόνα 4.6 παρουσιάζεται η περιοχή των -CH πρωτονίων των 9- trans -11 cis CLA στα 5,25 καθώς η περιοχή των =CH- πρωτονίων των Cis και Trans UFA στα 5,31 και 5,34 ppm αντίστοιχα. Η αυξημένη συγκέντρωση έχει σαν αποτέλεσμα την καλύτερη διακριτική ικανότητα για τις παραπάνω χαρακτηριστικές ομάδες. Η υψηλότερη συγκέντρωση μάλιστα είναι αναγκαία για την αύξηση του σήματος, αυξάνοντας έτσι την τιμή σήμα- προς -θόρυβο (S/N).



Εικόνα 4.7 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11(0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 5-6,5 ppm

Στην εικόνα 4.7 παρουσιάζεται η περιοχή των -CH πρωτονίων (H12) των 9- trans -11 cis CLA στα 5,61 ppm , των -CH πρωτονίων (H10) των 9- trans -11 cis CLA στα 5,90 ppm , των -CH πρωτονίων (H11) των 9- trans -11 cis CLA στα 6,25 ppm καθώς και η περιοχή των =CH- πρωτονίων του Carroleic FA στα 5,76 ppm .Η αυξημένη συγκέντρωση έχει σαν αποτέλεσμα την καλύτερη διακριτική ικανότητα για τις παραπάνω χαρακτηριστικές ομάδες. Η υψηλότερη συγκέντρωση μάλιστα είναι αναγκαία για την αύξηση του σήματος, αυξάνοντας έτσι την τιμή σήμα- προς -θόρυβο (S/N).

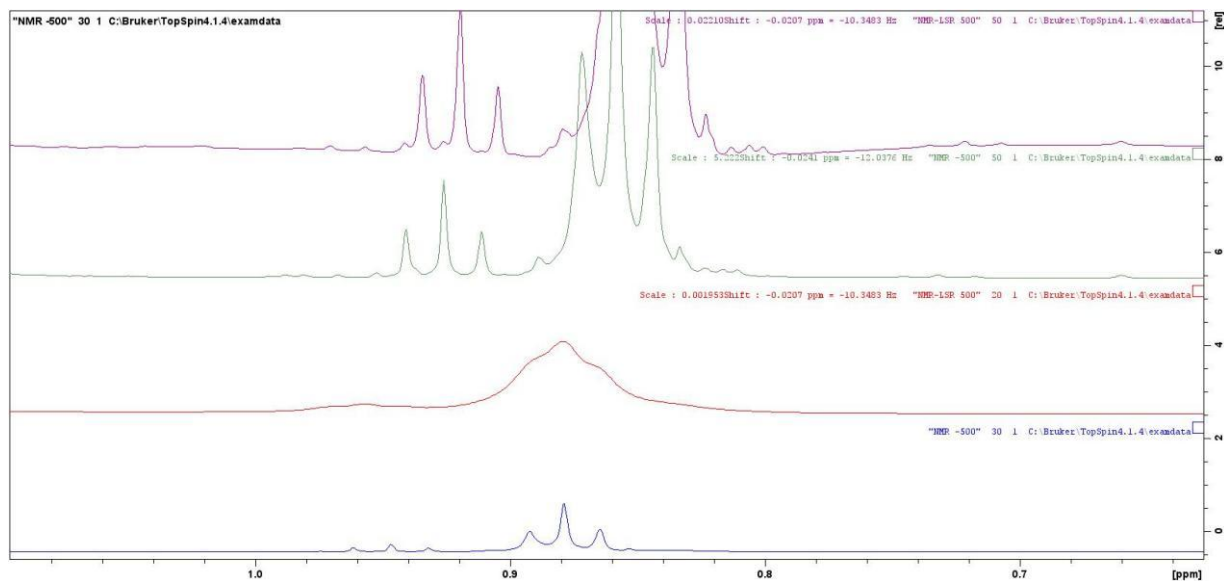


Εικόνα 4.8 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11(0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 6-8 ppm

Στην Εικόνα 4.8 παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για τα δείγματα LM25-10 (0,136 g/mL) (κάτω φάσμα) και LM22-11 (0,398 g/mL) (πάνω φάσμα) πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 6-8 ppm. Παρατηρούμε ότι η υψηλή συγκέντρωση λιπιδικής φάσης στο διάλυμα δεν ευνοεί την παραλαβή λιγότερο πολικών ενώσεων. Η αυξημένη συγκέντρωση του δείγματος LM22-11, αν και βοηθά στη βελτίωση της διακριτικής ικανότητας και του σήματος, δεν επιτρέπει την καλύτερη καταγραφή λιγότερο πολικών ενώσεων, επηρεάζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της ανάλυσης στη συγκεκριμένη περιοχή χημικής μετατόπισης.

#### 4.2.2.2 Συγκριτική αξιολόγηση $^1\text{H}$ φασμάτων για δύο επίπεδα συγκέντρωσης της λιπιδικής φάσης κατα την προσθήκη (10 και 5 $\mu\text{L}$ ) 1,4 και 0,53 mM LSR για τα LM25-10(0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) αντίστοιχα

Σύγκριση των φασμάτων των δειγμάτων LM 25-10 & LM22-11 (1<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων )

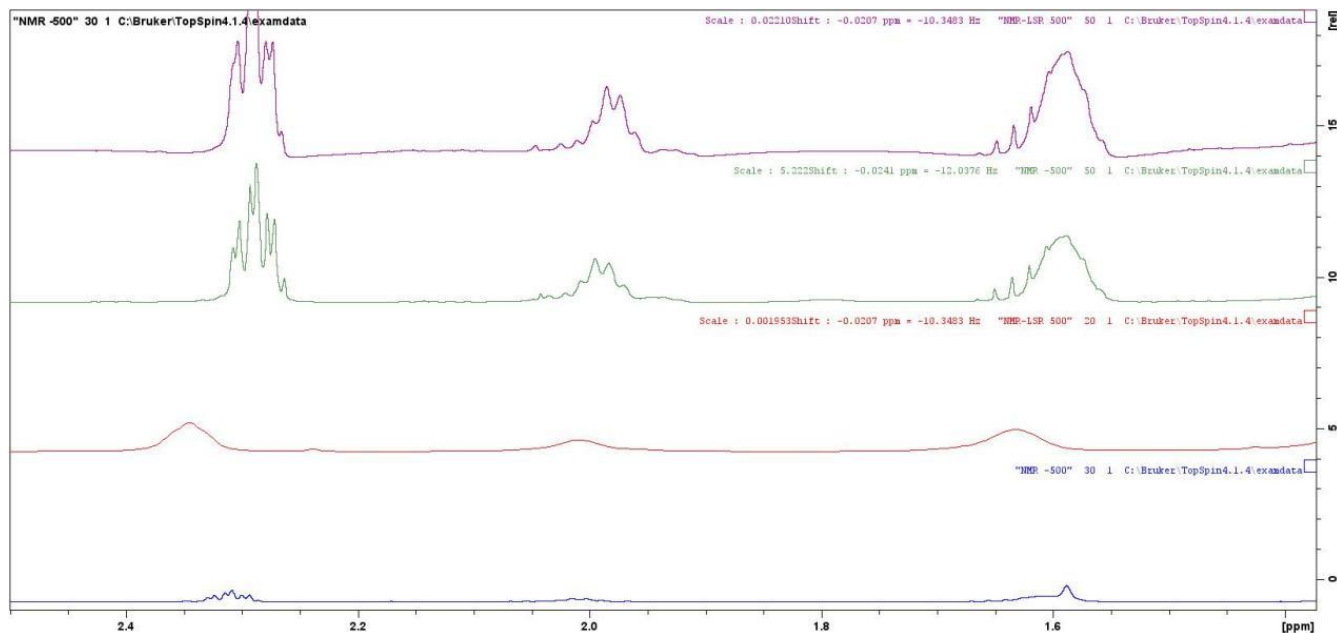


Εικόνα 4.9 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) πριν και μετά την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή από 0-1,5 ppm.

Με την σειρά από κάτω προς τα πάνω έχουμε : Φάσμα LM 25-10 χωρίς LSR, φάσμα LM 25-10 με LSR (1,4mM) , φάσμα LM 22-11 χωρίς LSR , φάσμα LM 22-11 με LSR(0,53 mM)

Στην εικόνα 4.9 παρουσιάζεται η περιοχή των  $-\text{CH}_3$  πρωτονίων των Λ.Ο. Στα 0,89 και 0,98 ppm για τα δυο δείγματα (0,136g/mL, 1<sup>ο</sup> και 0,398 g/mL ,3<sup>ο</sup> φάσμα) μετά από την προσθήκη ποσότητας 10  $\mu\text{L}$  και 5  $\mu\text{L}$  αντιδραστήριου LSR αντίστοιχα. Στο αραιότερο δείγμα υπάρχει διεύρυνση των κορυφών που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_3$  πρωτόνια καθώς ο λόγος αντιδραστήριο προς ποσότητα λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερος σε σχέση

με το δείγμα LM22-11. Στο δείγμα LM22-11(0,398 g/mL) η προσθήκη αντιδραστηρίου δεν επηρεάζει την διακριτική ικανότητα και επιπλέον έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων κορυφών στην περιοχή των ~ 0,9 ppm.



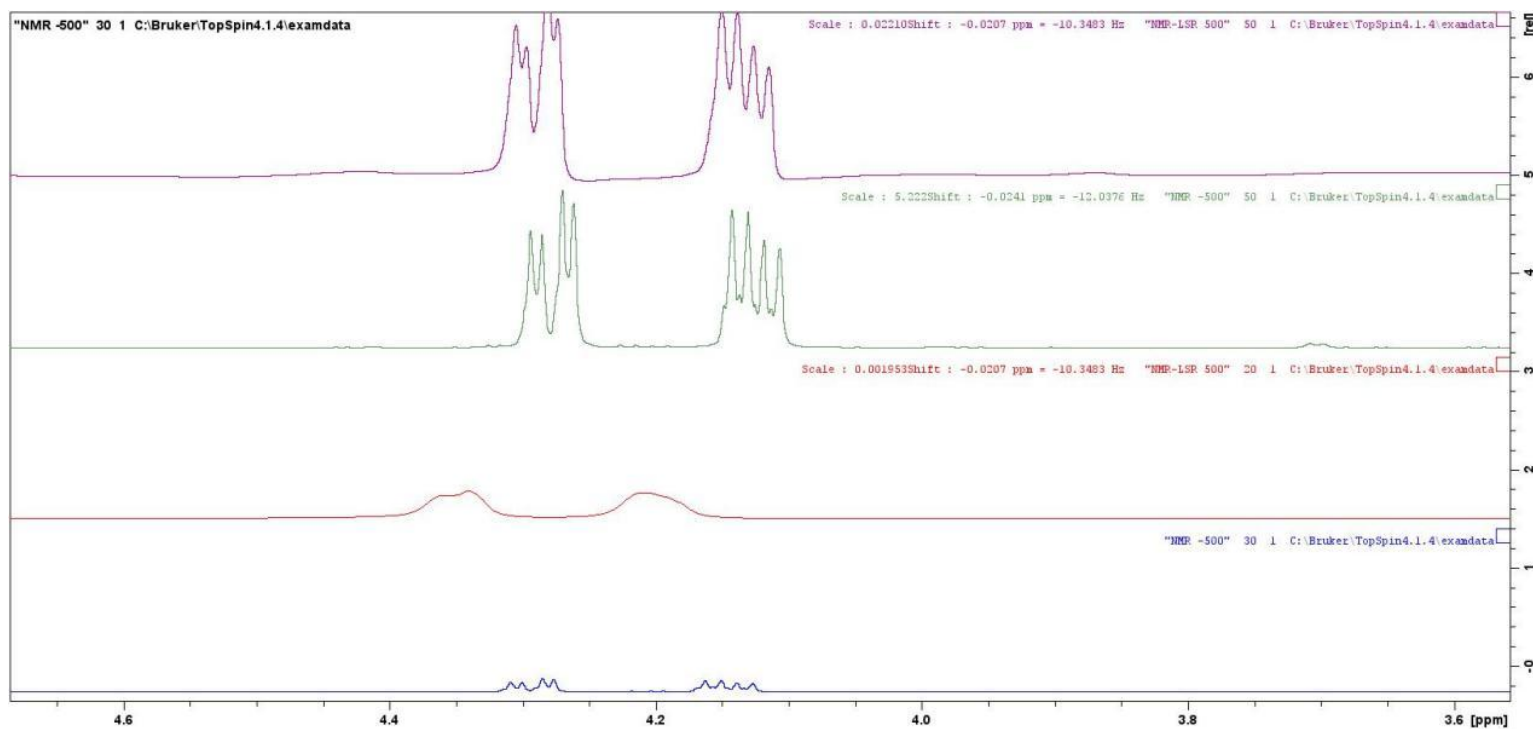
Εικόνα 4.10 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) πριν και μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 1,5-2,5 ppm.

Με την σειρά από κάτω προς τα πάνω έχουμε : Φάσμα LM 25-10 χωρίς LSR, φάσμα LM 25-10 με LSR , φάσμα LM 22-11 χωρίς LSR , φάσμα LM 22-11 με LSR

Στην εικόνα 4.10 παρουσιάζεται η περιοχή των  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  πρωτονίων στα 2,3 ppm , των  $\text{CH}_2$  ομάδων των cis UFA στα 2,1 ppm και των πρωτονίων  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  των Λ.Ο στα 1,6 ppm για τα δυο δείγματα (0,136 g/mL, 1<sup>ο</sup> και 0,398 g/mL, 3<sup>ο</sup> φάσμα) μετά από την προσθήκη ποσότητας 10  $\mu\text{L}$ (1,4mM) και 5  $\mu\text{L}$ (0,53mM) αντιδραστηρίου LSR αντίστοιχα. Στο αραιότερο δείγμα υπάρχει διεύρυνση όλων των παραπάνω κορυφών καθώς ο λόγος αντιδραστήριο προς ποσότητα λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το δείγμα LM22-11. Επιπλέον υπάρχει και

μετατόπιση και μετατόπιση σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων για τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στις  $-OOC-CH_2-CH_2-$  και  $-OOC-CH_2-CH_2-$  ομάδες στα 2,3 και 1,6 ppm ,αντίστοιχα.

Στο δείγμα LM22-11 (0,398 g/mL) η προσθήκη αντιδραστηρίου έχει σαν αποτέλεσμα την διεύρυνση των πρωτονίων που αντιστοιχούν στις  $-OOC-CH_2-CH_2-$  ομάδες στα 2,3 ppm .Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς τα παραπάνω πρωτόνια είναι πιο κοντά στο κέντρο πρόσδεσης με το αντιδραστήριο μετατόπισης.

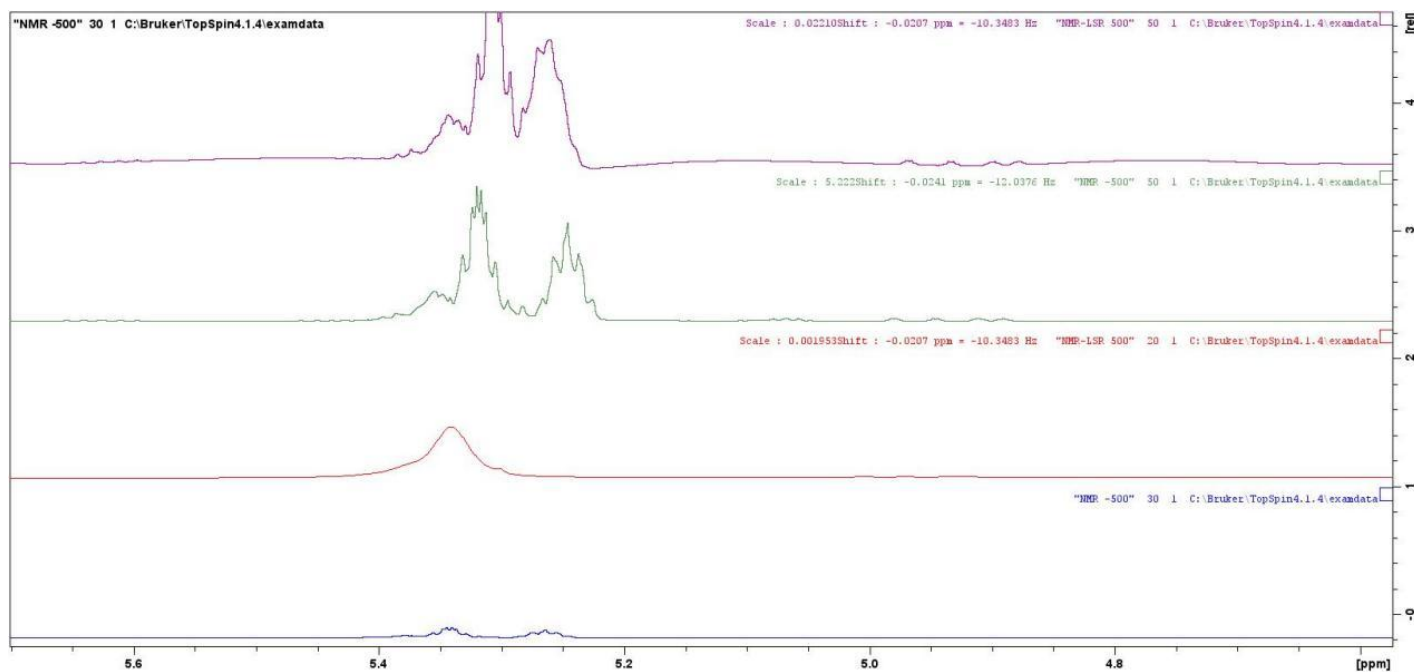


Εικόνα 4.11 : Φάσματα  $^1H$  NMR ,LM 25-10 (0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) πριν και μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 3,6-4,6 ppm.

Με την σειρά από κάτω προς τα πάνω έχουμε : Φάσμα LM 25-10 χωρίς LSR, φάσμα LM 25-10 με LSR , φάσμα LM 22-11 χωρίς LSR , φάσμα LM 22-11 με LSR

Στην εικόνα 4.11 παρουσιάζεται η περιοχή των των -CH<sub>2</sub> πρωτονίων της γλυκερόλης ως TAG ,τα H3 στα 4,11 και τα H1 στα 4,27 ppm για τα δυο δείγματα (0,136 g/mL, 1<sup>ο</sup> και 0,398 g/mL ,3<sup>ο</sup> φάσμα) μετά από την προσθήκη ποσότητας 10 μL (1,4 mM) και 5 μL (0,53 mM) αντιδραστηρίου LSR αντίστοιχα.

Στο αραιότερο δείγμα(0,136 g/mL) υπάρχει διεύρυνση όλων των παραπάνω κορυφών καθώς ο λόγος αντιδραστήριο προς ποσότητα λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το δείγμα LM22-11(0,398 g/mL).Επιπλέον υπάρχει και μετατόπιση σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων για τα H3 στα 4,11 και τα H1 στα 4,27 ppm πρωτόνια .Στο δείγμα LM22-11 η προσθήκη αντιδραστηρίου έχει σαν αποτέλεσμα την μερική διεύρυνση των παραπάνω πρωτονίων .



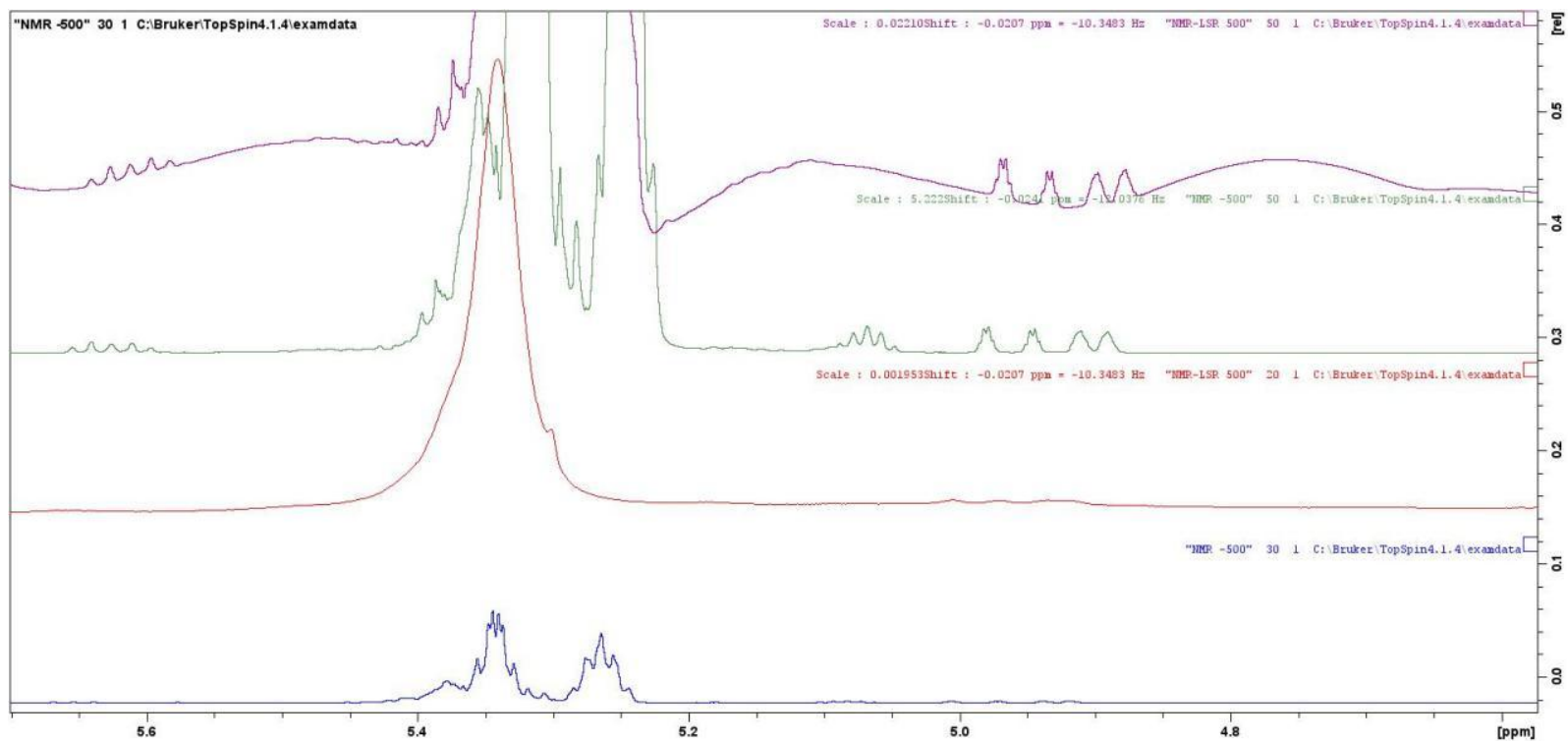
Εικόνα 4.12 : Φάσματα <sup>1</sup>H NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) και LM22-11 (0,398 g/mL) πριν και μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 4,6-5,6 ppm.

Με την σειρά από κάτω προς τα πάνω έχουμε : Φάσμα LM 25-10 χωρίς LSR, φάσμα LM 25-10 με LSR , φάσμα LM 22-11 χωρίς LSR , φάσμα LM 22-11 με LSR

Στην εικόνα 4.12 (όπως και στην παρακάτω εικόνα που παρουσιάζεται σε μεγαλύτερη κλίμακα ) παρουσιάζεται η περιοχή των -CH πρωτονίων των H2 πρωτονίων της TAG που αλληλεπικαλύπτουν και το H12 πρωτόνιο του (9- *trans* ,11 -*cis*) 18:2 CLA στα 5,25 καθώς η περιοχή των =CH- πρωτονίων των *cis* και *trans*UFA στα 5,31 και 5,34 ppm ,αντίστοιχα, για τα δυο δείγματα (0,136 g/mL, 1° και 0,398 g/mL ,3° φάσμα) μετά από την προσθήκη ποσότητας 10 μL και 5 μL αντιδραστηρίου LSR αντίστοιχα. Στο αραιότερο δείγμα υπάρχει μετατόπιση σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων για τα H2 πρωτόνια και διεύρυνση των κορυφών .

Στο δείγμα LM22-11(0,398 g/mL)η προσθήκη αντιδραστηρίου έχει σαν αποτέλεσμα την μερική διεύρυνση των παραπάνω πρωτονίων καθώς και μετατόπιση των H2 σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων.





Εικόνα 4.13: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ,LM 25-10(0,136 g/mL) και LM22-11(0,398 g/mL) πριν και μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή από 4,6-5,6 ppm(η εικόνα 4.12 σε μεγέθυνση) .Με την σειρά από κάτω προς τα πάνω έχουμε : Φάσμα LM 25-10 χωρίς LSR,φάσμα LM 25-10 με LSR , φάσμα LM 22-11 χωρίς LSR , φάσμα LM 22-11 με LSR.

Με βάση τα παραπάνω πειράματα και την επεξεργασία των  $^1\text{H}$ -NMRφασμάτων που λήφθηκαν προέκυψαν οι παρακάτω πίνακες που περιλαμβάνουν τις χημικές μετατοπίσεις των επιλεγμένων κορυφών συντονισμού των συστατικών του λιπιδικού κλάσματος και την μεταβολή τους, ως Δδ, κατά τις διαδοχικές προσθήκες LSR .

Πίνακας 4.2 :Χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων του λιπιδικού κλάσματος και μεταβολή κατά την προσθήκη LSR(ΔείγμαLM 2510)

	Προστιθέμενη συγκέντρωση LSR (mM)	0	1,4		1,37	
<sup>1</sup> H	Ένωση	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ <sub>1</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ <sub>2</sub> (ppm)
-CH=CH-	Trans UFA	5.34	5.34	0	5.37	0,03
-CH –OOC-	9- <i>cis</i> , 11- <i>trans</i> ) 18:2 CLA	5.27	5.27	0	5.34	0,07
-CH <sub>2</sub> –OOC-	Glycerol in TAG	4.30	4.33	0,03	4.38	0,08
-CH <sub>2</sub> –OOC-	Glycerol in TAG	4.14	4.18	0,04	4,18	0,04
-CH <sub>2</sub> -O-CO-R ( <i>sn</i> -1)	1,2 DAG	3.71	3,71	0	3,71	0
=CH-CH <sub>2</sub> -CH=	Linolenic FA	2.76	2.76	0	2.76	0
-CH <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub>	Cis UFA	2.00	2.00	0	2.00	0
-OOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	All FA	1.61	1.62	0,01	1.64	0,03
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	All FA	1.25	1.25	0	1.25	0
-CH <sub>3</sub>	All n-3 FA	0.95	0.96	0,01	0.96	0,01

\* $\Delta\delta$  είναι η διαφορά σε σχέση με το  $\delta_{\alphaρχ}$

**Πίνακας 4.3: Χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων του λιπιδικού κλάσματος και μεταβολή κατά την προσθήκη LSR(Δείγμα LM 2211)**

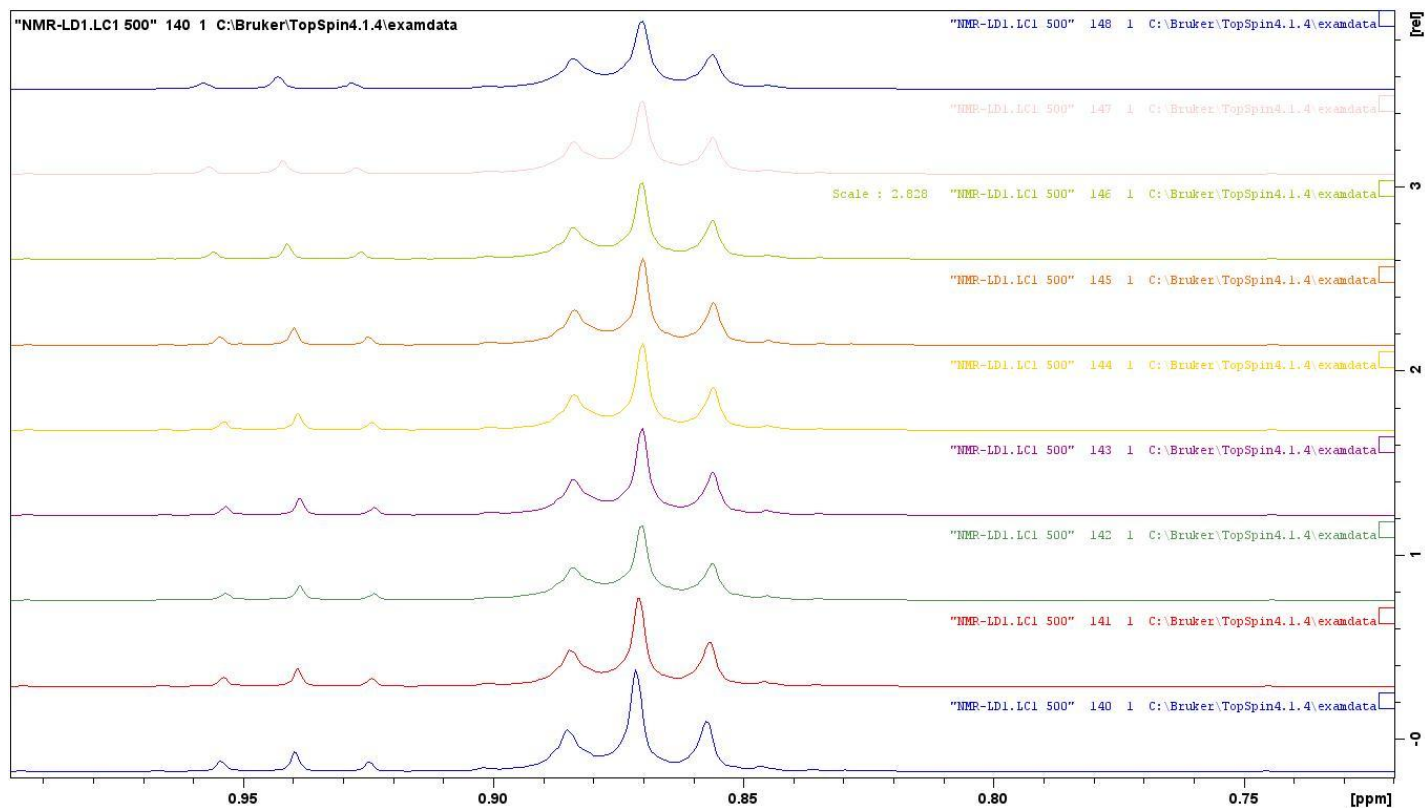
	Προστιθέμενη συγκέντρωση (mM)	0	0,53		0,52		0,52	
$^1\text{H}$	Ένωση	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\Delta\delta_1$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\Delta\delta_2$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\Delta\delta_3$ (ppm)
-CH=CH-	Cis UFA	5.31	5.30	0,01	5,30	0	5.37	0,07
-CH –OOC-	(9- <i>cis</i> , 11- <i>trans</i> ) 18:2 CLA	5.24	5.26	0,02	5,26	0	5.30	0,04
-CH <sub>2</sub> –OOC-	Glycerol in TAG	4.27	4.29	0,02	4.33	0,04	4.38	0,05
-CH <sub>2</sub> –OOC-	Glycerol in TAG	4.11	4.13	0,02	4.17	0,04	4.21	0,04
=CH-CH <sub>2</sub> - CH=	Linolenic FA	2.74	2.73	0,01	2.73	0	2.73	0
-COO-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub>	All FA	2.28	2.29	0,01	2.31	0,02	2.34	0,03

-CH <sub>2</sub> - CH=CH-	cis UFA	1.98	1.98	0	1.98	0	1.98	0
-OOC-CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub>	All FA	1.58	1.58	0	1.60	0,02	1.62	0,02
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	All FA	1.22	1.21	0,01	1.21	0	1.21	0
-CH <sub>3</sub>	Butyric FA	0.91	0.91	0	0.92	0,01	0.93	0,01
-CH <sub>3</sub>	FA	0.85	0.84	0,01	0.84	0	0.84	0

\*Δδ είναι η διαφορά σε σχέση με το δ<sub>αρ</sub>

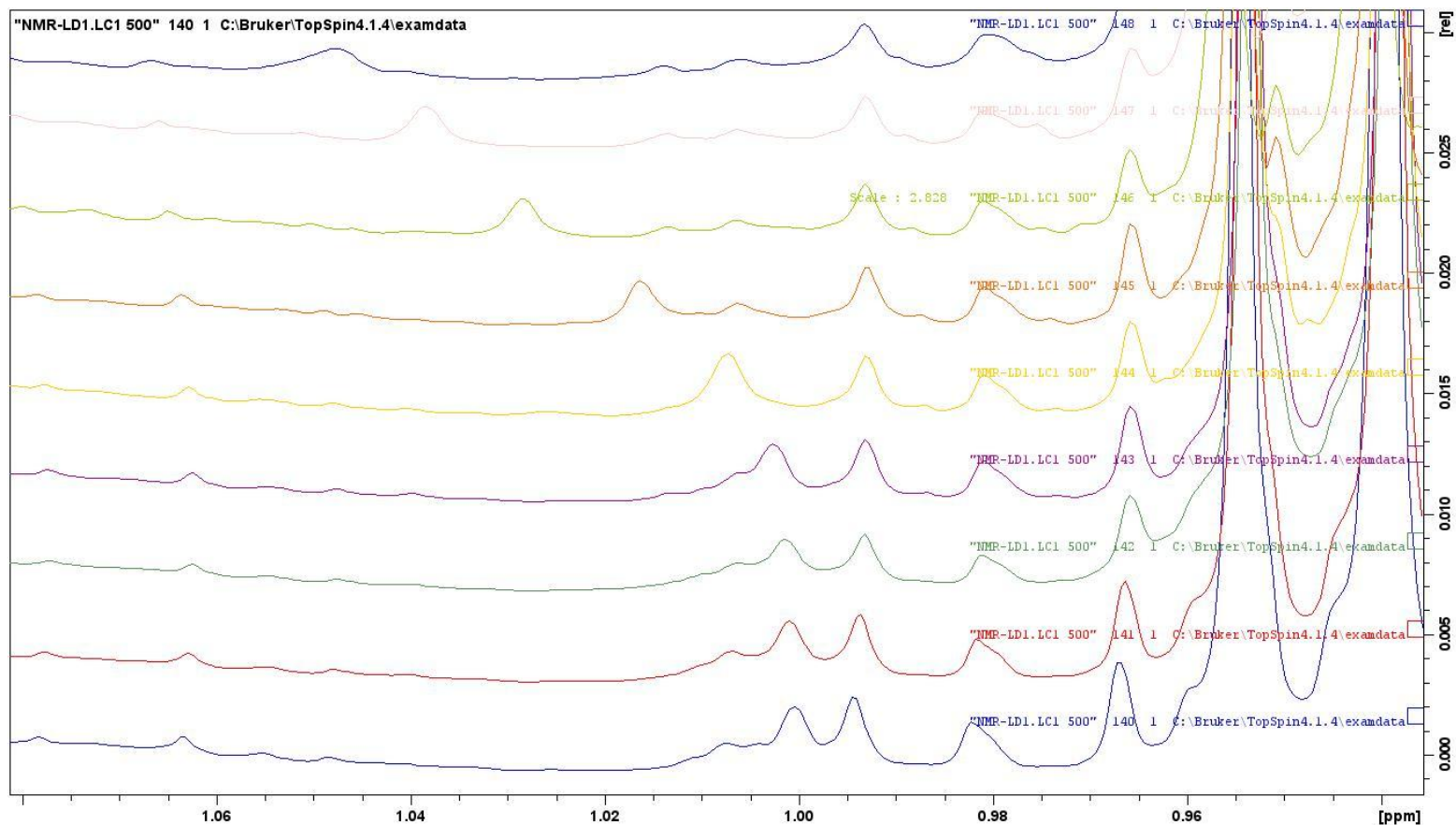
## 4.2 ΠΡΩΤΟΝΙΑΚΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Για το δείγμα LD1 κατά την προσθήκη αντιδραστηρίου λήφθηκαν τα παρακάτω φάσματα



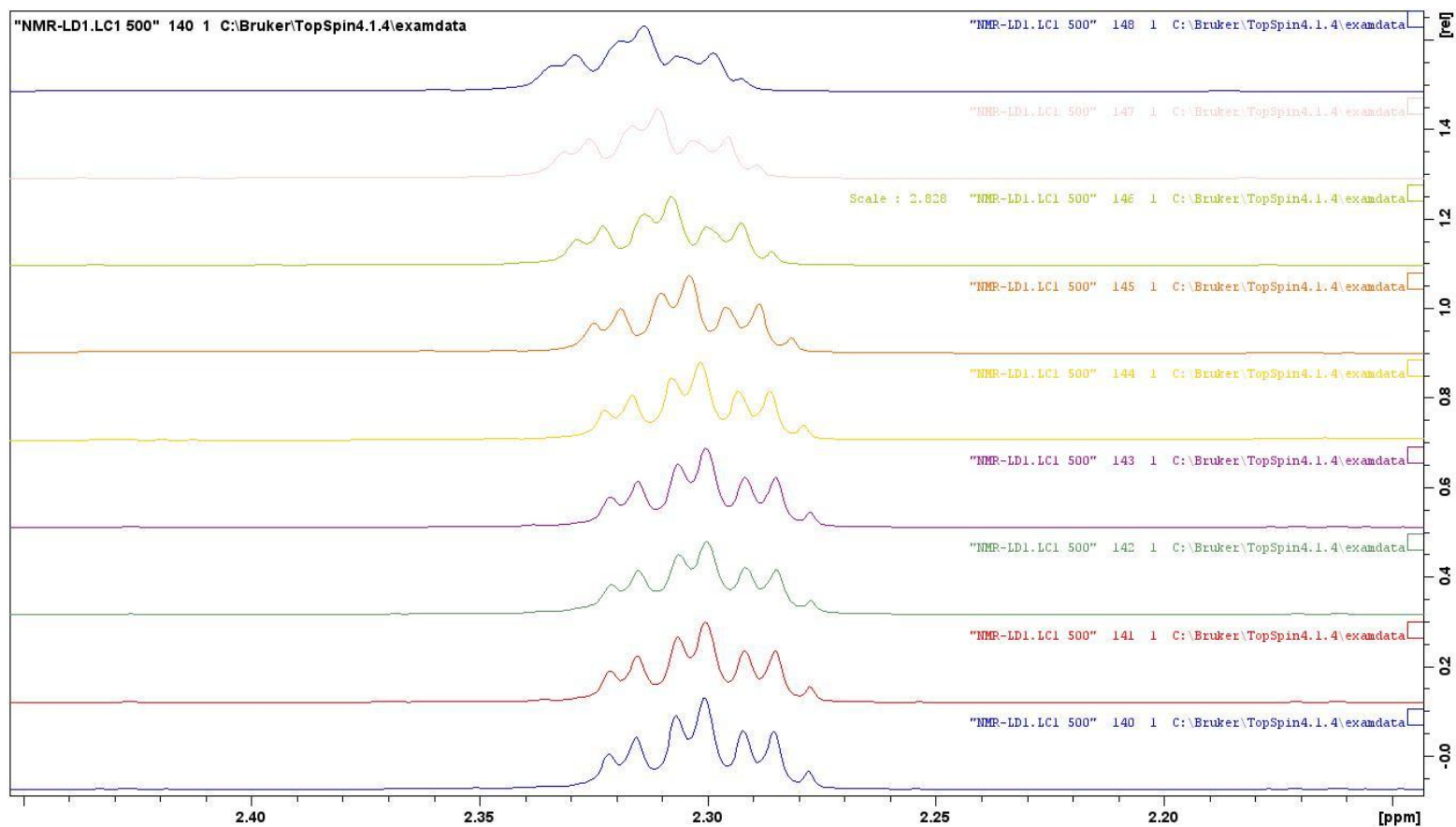
Εικόνα 4.14 : Φάσματα <sup>1</sup>H NMR για το δείγμα LD1(0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 0,87 ppm.)(Πρώτη προσθήκη 0,207mM ,δεύτερη ,0,412 mM ,τρίτη 0,615 mM ,τέταρτη 1,015 mM ,πέμπτη 1,409 mM ,έκτη 1,797 mM ,έβδομη 2,179 mM ,όγδοη 2,555 mM)

Η Εικόνα 4.14 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 0,87 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης δεν προκαλούν κάποια φανερή μετατόπιση των κορυφών στα 0,87 ppm που αντιπροσωπεύουν τις  $-\text{CH}_3$  ομάδες των λιπαρών οξέων συμπεριλαμβανομένου του λινελαϊκού οξέος ( $\omega$ -6).



Εικόνα 4.15 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LD1 (0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 0,98 ppm.

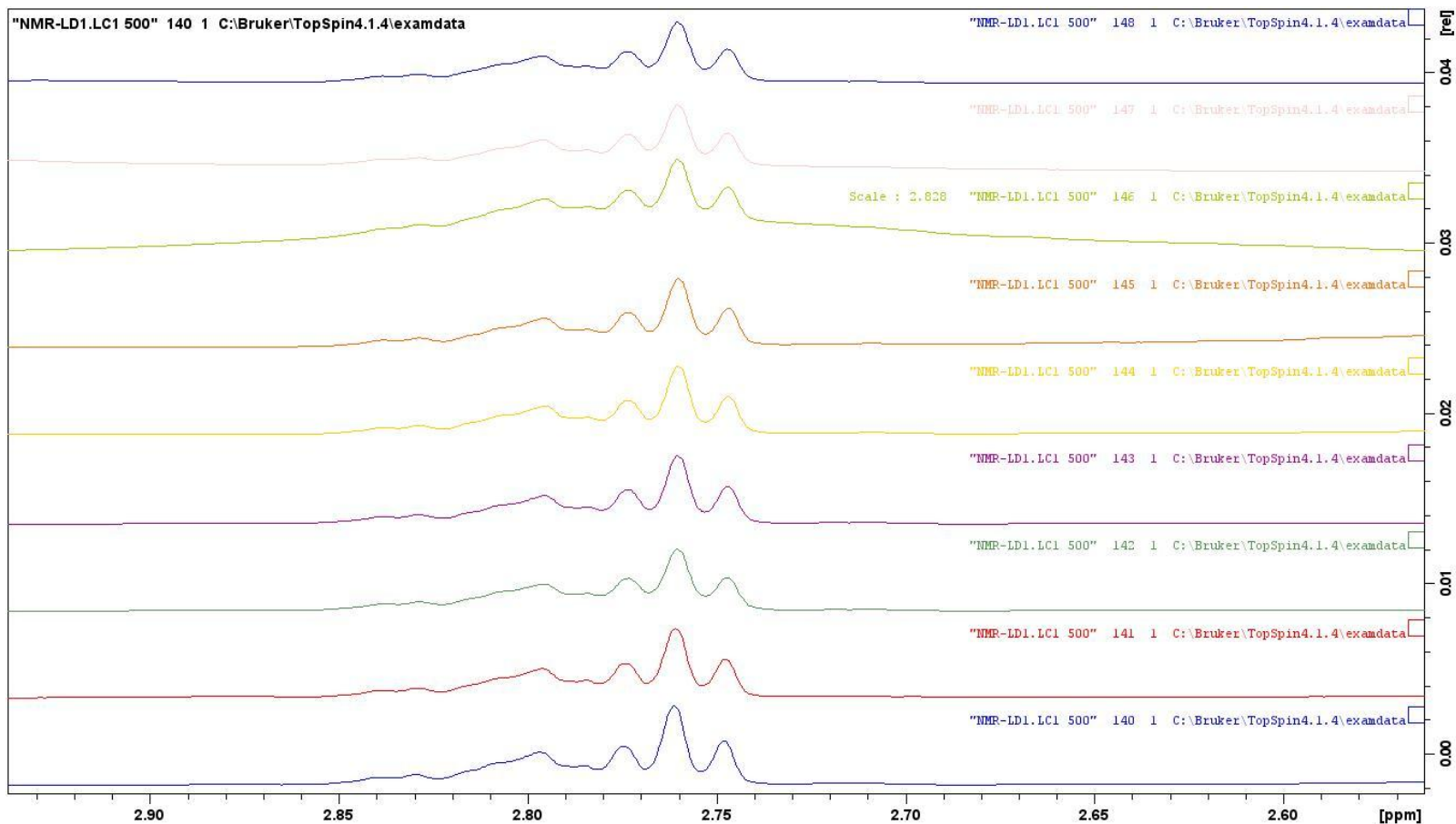
Στην Εικόνα 4.15, παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 0,98 ppm που αντιπροσωπεύει τις  $-\text{CH}_3$  ομάδες των λιπαρών οξέων (ως δορυφορική κορυφή της κεντρικής κορυφής στα 0,87 ppm). Το κάτω φάσμα δείχνει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης προκαλούν προοδευτική μετατόπιση των κορυφών, καταδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου με τα συγκεκριμένα πρωτόνια της περιοχής αυτής ξεχωρίζοντας τα αλληλεπικαλυπτόμενα πρωτόνια στα 1,00 ppm. Στη συγκεκριμένη περιοχή συχνοτήτων, η αλληλεπικαλυπτόμενη κορυφή στα 0,99 ppm στο αρχικό πρωτονιακό φάσμα αναμένεται να είναι εστερικού τύπου ΛΟ. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα ΛΟ εστερικού τύπου που έχουν αναφερθεί στο γάλα όπως η 2-βουτανόνη σε περιεκτικότητα  $32,55 \text{ ng mL}^{-1}$ , 2-επτανόνη σε περιεκτικότητα  $22,19 \text{ ng mL}^{-1}$ , και ακετόνη σε περιεκτικότητα  $32,55 \text{ ng mL}^{-1}$ , αναμένεται η 2-βουτανόνη να είναι η εν λόγω ένωση. Η μεθυλομάδα της ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ ) αναμένεται σε συχνότητα συντονισμού 1,06 ppm πολύ κοντά στην τιμή χημικής μετατόπισης που δίνεται στα 0,99 ppm. Περαιτέρω έρευνα είναι σε εξέλιξη για την ταυτοποίησή της, ωστόσο, η χρήση του LSR οδηγεί στην δυνατότητα διάκρισής της από τις αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές. (Yue et al., 2015)



Εικόνα 4.16: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LD1(0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 2,29 ppm.

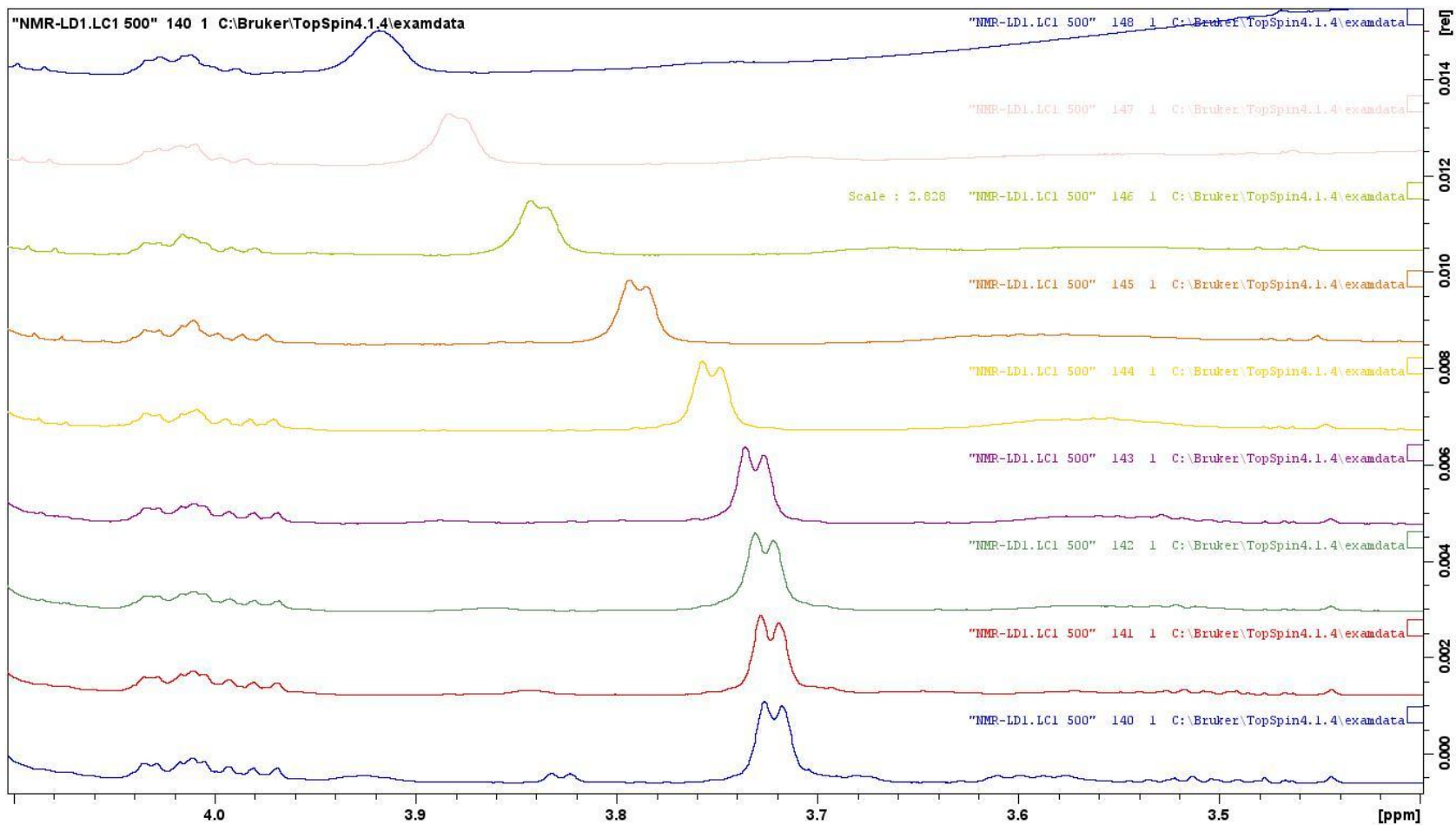
Η Εικόνα 4.16 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 2,29 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης, ενώ οι διαδοχικές προσθήκες οδηγούν σε μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-$  πρωτόνια που είναι σε  $\alpha$ - θέση ως προς το εστερικό καρβοξύλιο, επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των πρωτονίων με το αντιδραστήριο.





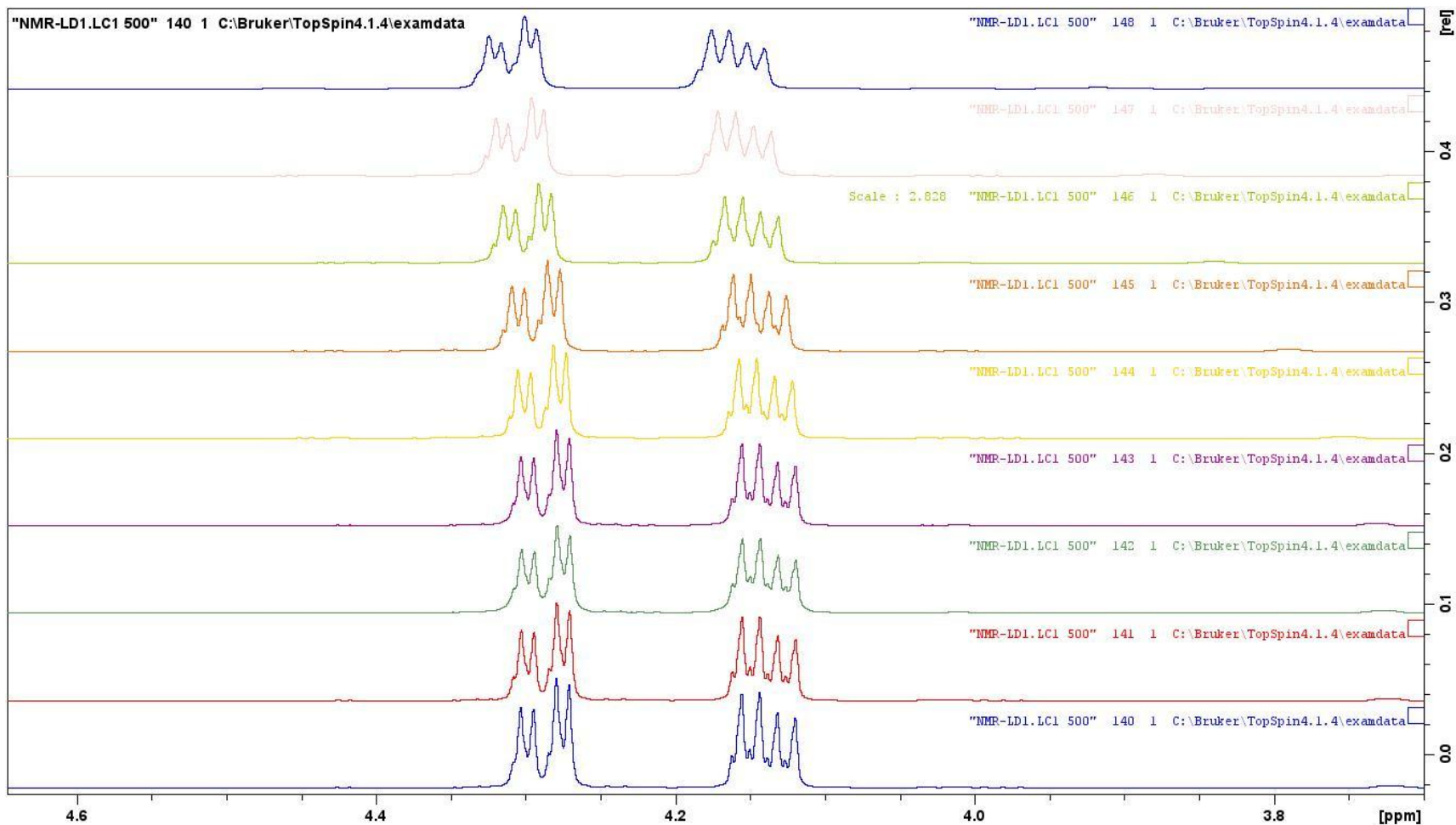
Εικόνα 4.17 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LD1 (0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 2,7 ppm.

Στην Εικόνα 4.17, τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 παρουσιάζονται στην περιοχή των 2,7 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης. Μετά από διαδοχικές προσθήκες, οι κορυφές που παρουσιάζονται παραπάνω που είναι οι συντονισμοί των πρωτονίων στα 2.74 ppm, που αντιστοιχούν στα τέσσερα ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινολενικού οξέος στις θέσεις 5 και 8, στα 2.77 ppm που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινελαϊκού οξέος στη θέση 8, στα 2.77 ppm καθώς και στα 2,81 ppm που αντιστοιχούν στα έξι ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια (bis-allylic) του DHA(docosahexaenoic acid) 22:6 ( $\omega$ -3) δεν φαίνεται να μετατοπίζονται.



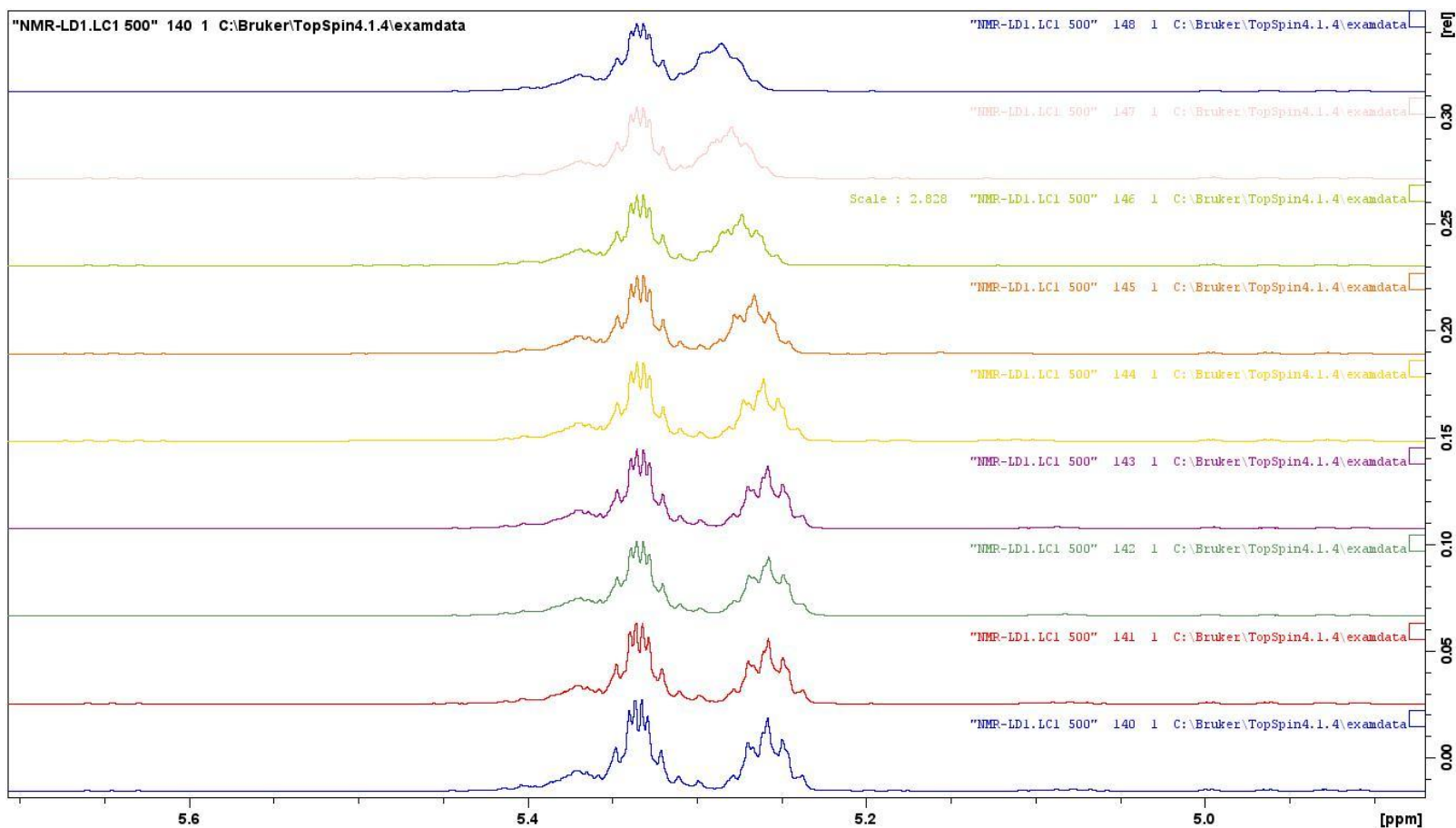
Εικόνα 4.18 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LD1(0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 3,7ραρ.

Η Εικόνα 4.18 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 3,7 παρ. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης, ενώ οι διαδοχικές προσθήκες οδηγούν σε μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$  (*sn*-1) πρωτόνια της 1,2 DAG, επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των πρωτονίων με το αντιδραστήριο.



Εικόνα 4.19 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LD1(0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 4,2 ppm

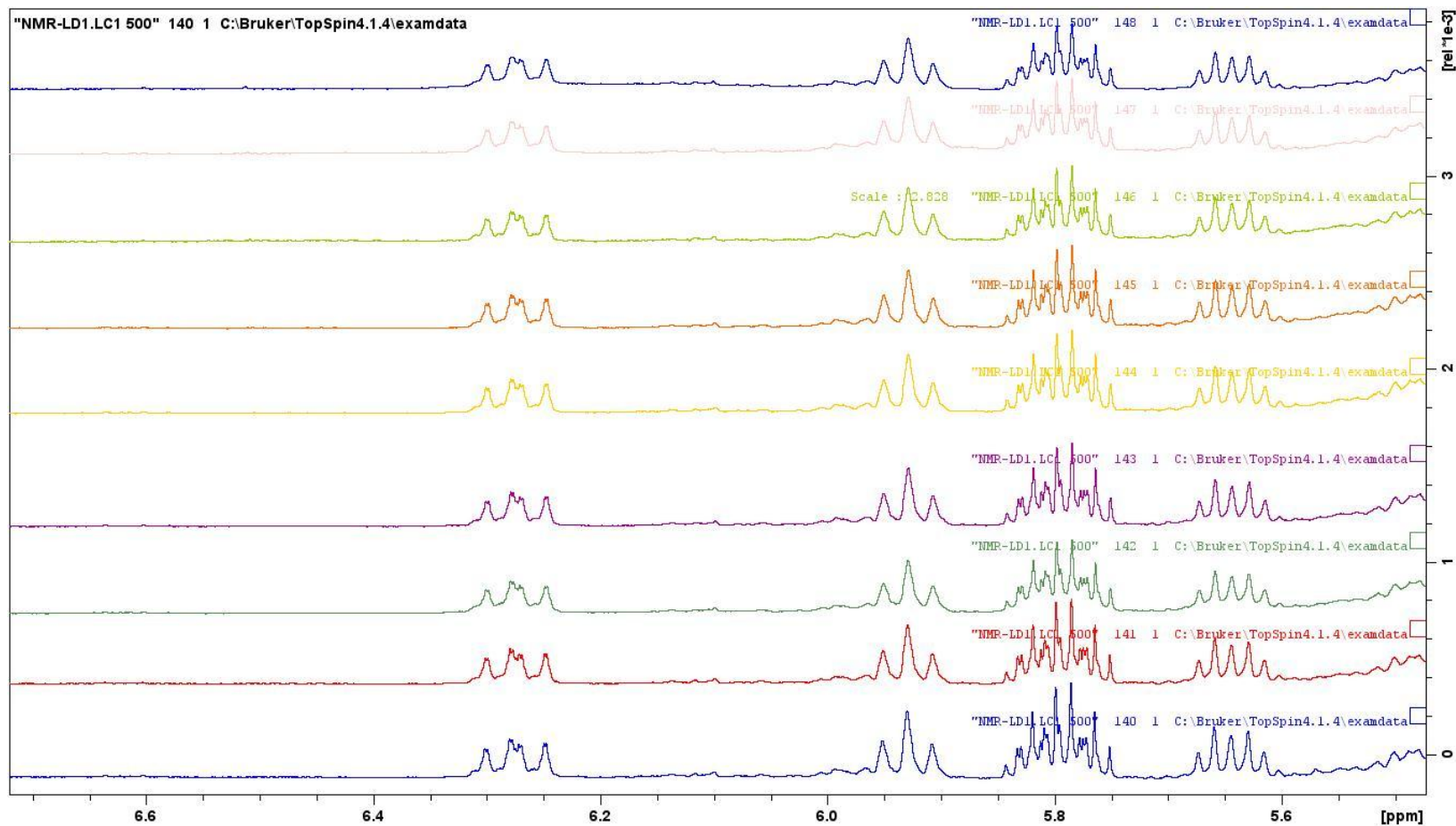
Στην Εικόνα 4.19, το κάτω φάσμα είναι πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι προσθήκες του αντιδραστηρίου προκαλούν μια μικρή μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-\text{OOC}-$  πρωτόνια της γλυκερόλης στην TAG στα 4,11 και 4,27 ppm, αποδεικνύοντας την επίδραση του αντιδραστηρίου στις περιοχές αυτές.



Εικόνα 4.20: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LD1(0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 5,25 ppm.

Η Εικόνα 4.20 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 5,25 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης ενώ παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 5.24 ppm που μετατοπίζονται μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου, που αντιστοιχούν στο (–CH–) πρωτόνιο στη θέση 2 των TAG, των πρωτονίων στα 5.25 ppm που αντιστοιχούν στο (–CH–) πρωτόνιο του (9-*trans*, 11-*cis*) 18:2 CLA σε  $\alpha$ - θέση ως προς την καρβοξυλομάδα, των πρωτονίων στα 5.31 ppm, που αντιστοιχούν στα (=CH–) ολεφινικά πρωτόνια των *cis*- UFA και των πρωτονίων στα 5.34 ppm, που αντιστοιχούν στα (=CH–) ολεφινικά πρωτόνια

των *trans*- UFA. Οι διαδοχικές προσθήκες δεν οδηγούν σε μετατόπιση των κορυφών επομένως δεν υπάρχει αλληλεπίδραση των πρωτονίων με το αντιδραστήριο.

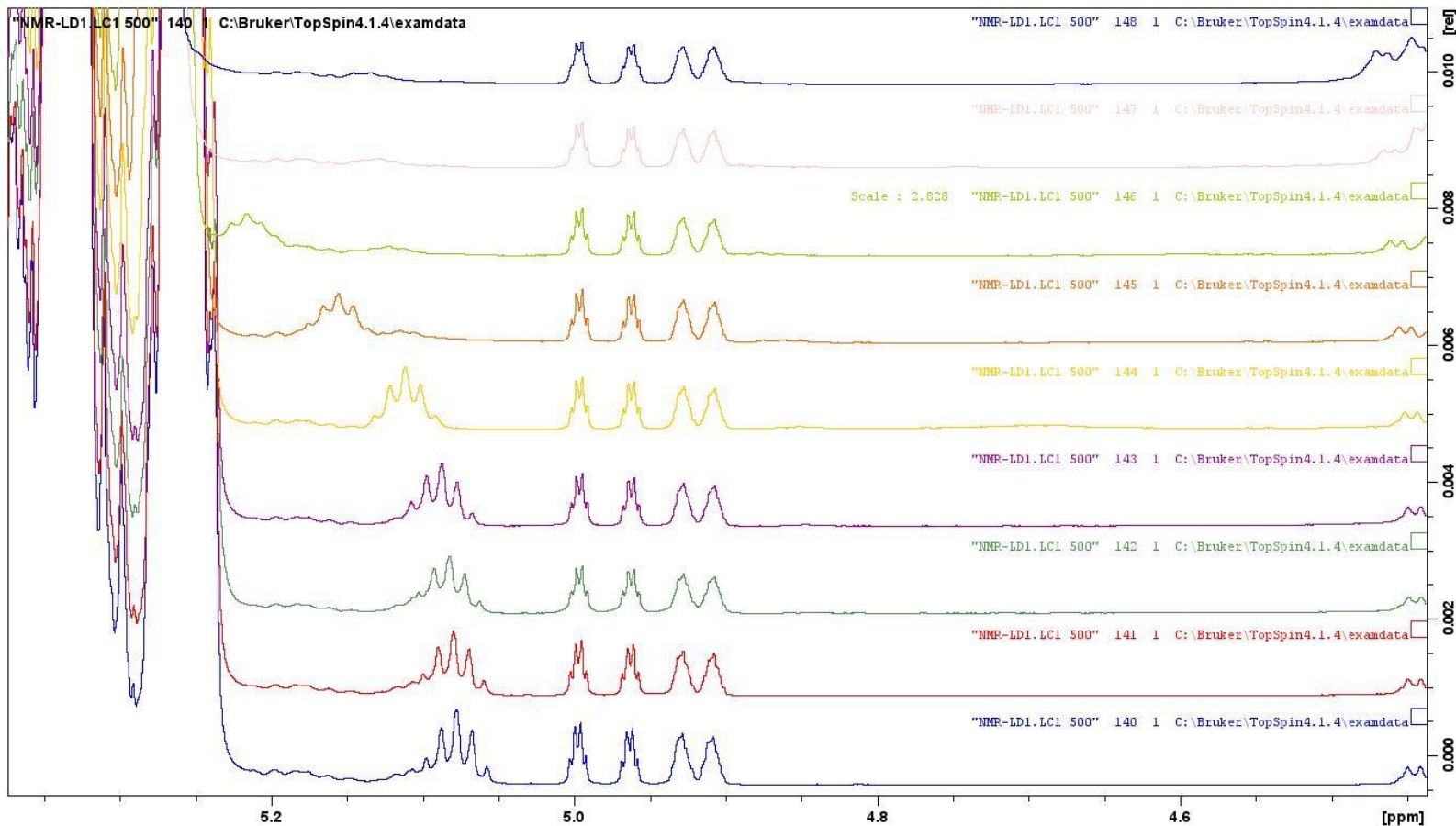


Εικόνα 4.21 : Φάσματα <sup>1</sup>H NMR για το δείγμα LD1 (0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 5,5-6,5 ppm

Στην Εικόνα 4.21, παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 6.25 ppm, που αντιστοιχούν στο H11 πρωτόνιο (–CH–) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.90 ppm που αντιστοιχούν H10 (–CH–) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των



πρωτονίων στα 5.76 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο Η8 πρωτόνια (=CH<sub>2</sub>) του καπρολεϊκού οξέος και στα 5.61 ppm που αντιστοιχούν στο Η12 πρωτόνιο (-CH-) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA. Το κάτω φάσμα δείχνει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου δεν φαίνεται να προκαλούν μετατόπιση των κορυφών.



Εικόνα 4.22: Φάσματα <sup>1</sup>H NMR για το δείγμα LD1(0,207 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 5,07 ppm.

Στην Εικόνα 4.22 παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>1</sup>H NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 5,07 ppm, που αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια -CH- της 1,2 DAG. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου, παρατηρείται προοδευτική μετατόπιση των κορυφών. Αυτή η μετατόπιση δείχνει την αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου με τα συγκεκριμένα πρωτόνια της περιοχής αυτής.

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων με την προσθήκη LSR για το δείγμα LD1 (0,207g/mL)

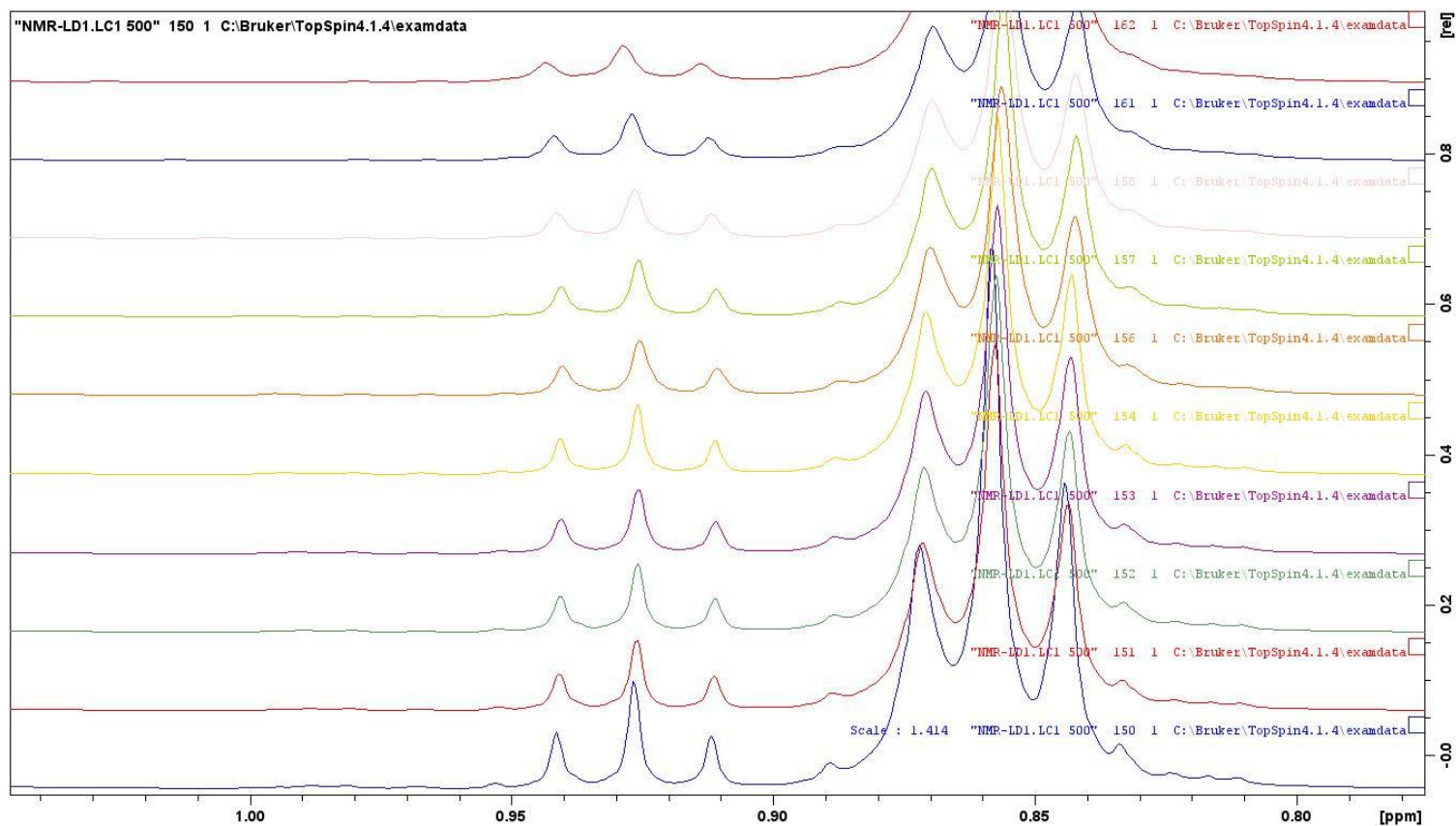
**Πίνακας 4.4 :Χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων του λιπιδικού κλάσματος και μεταβολή κατά την προσθήκη LSR(Δείγμα LD1)**

	Προστιθέ μενη συγκέντρ ωση LSR (mM)	0	0,207		0,412		0,61 5		1,015		1,409		1,797		2,179		2,555	
<sup>1</sup> H	Ένωση	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (ppm)	Δδ / Hz
- CH=CH-	trans UFA	5.33	st		st		st		st		st		st		st		st	
-CH – OOC-	(9- <i>cis</i> , 11- <i>trans</i> ) 18:2 CLA	5.26	st		st		st		st		st		st		st		st	
-CH <sub>2</sub> – OOC-	Glycerol in TAG	4.28	4.28		4.28		4.28		4.2800 2	1.05	4.29	5	4.3	5	4.306	2.79	4.31	10

-CH <sub>2</sub> – OOC-	glycerol in TAG	4.13	4.13		4.13		4.13		4.14		4.144	1.86	4.15		4.154	2.2	4.16	2.49
-CH <sub>2</sub> -O- CO-R (sn1)	1.2 DAG	3.72	3.7200 2	1.06	3.72004	1.2	3.73	4.98 1294 8	3.75	10.0 026	3.79	20.0 052	3.84	25.006 5	3.88	20.0 052	3.92	20.005 2
=CH- CH <sub>2</sub> - CH=	Linolenic FA	2.76	st		st		st		st		st		st		st		st	
-OOC- CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	all FA	2.30	2.30		2.30		2.30		2.301	0.5	2.303	1.12	2.307	2	2.309	1.25	2.311	1.25
-CH <sub>2</sub> - CH=CH	cis UFA	2.00	st		st		st		st		st		st		st		st	
-OOC- CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	All FA	1.60	st		st		st		st		st		st		st		st	
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	All FA	1,24																
-CH <sub>3</sub>	All n-3 FA	0.94	0.939	-0.28	0.9387	- 0.1 7	0.93 9		0.939	0.14	0.94	0.45	0.941	0.66	0.942	0.45	0.943	0.52
-CH <sub>3</sub>	FA	0.87	st		st		st		st		st		st		st		st	

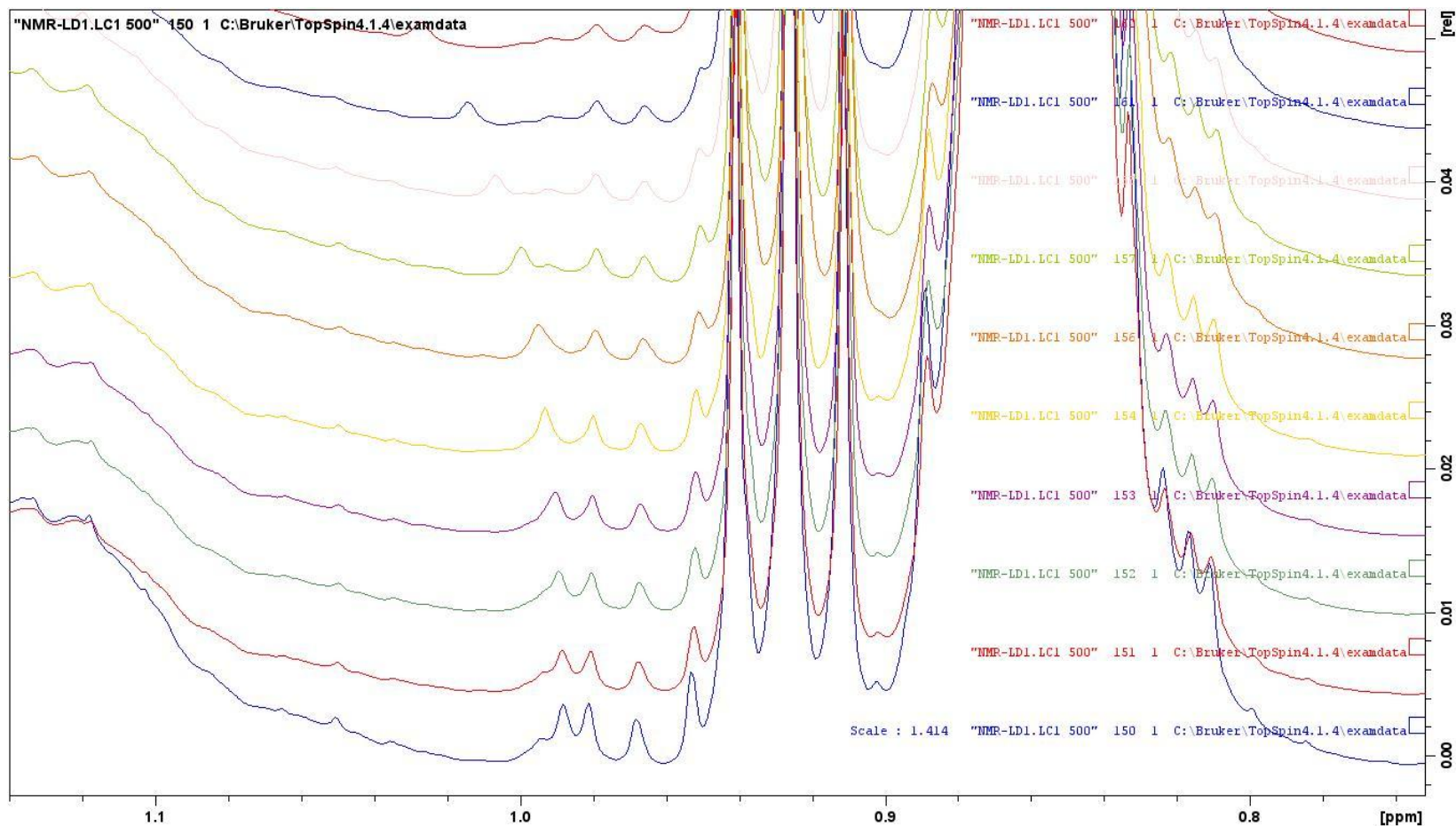


Για το δείγμα LC1 κατά την προσθήκη αντιδραστηρίου λήφθηκαν τα παρακάτω φάσματα



Εικόνα 4.23: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 0,9 ppm. (Πρώτη προσθήκη 0,207mM ,δεύτερη ,0,412 mM ,τρίτη 0,615 mM ,τέταρτη 1,015 mM ,πέμπτη 1,409 mM ,έκτη 1,797 mM ,έβδομη 2,179 mM ,όγδοη 2,555 mM,ένατη 3,285 mM)

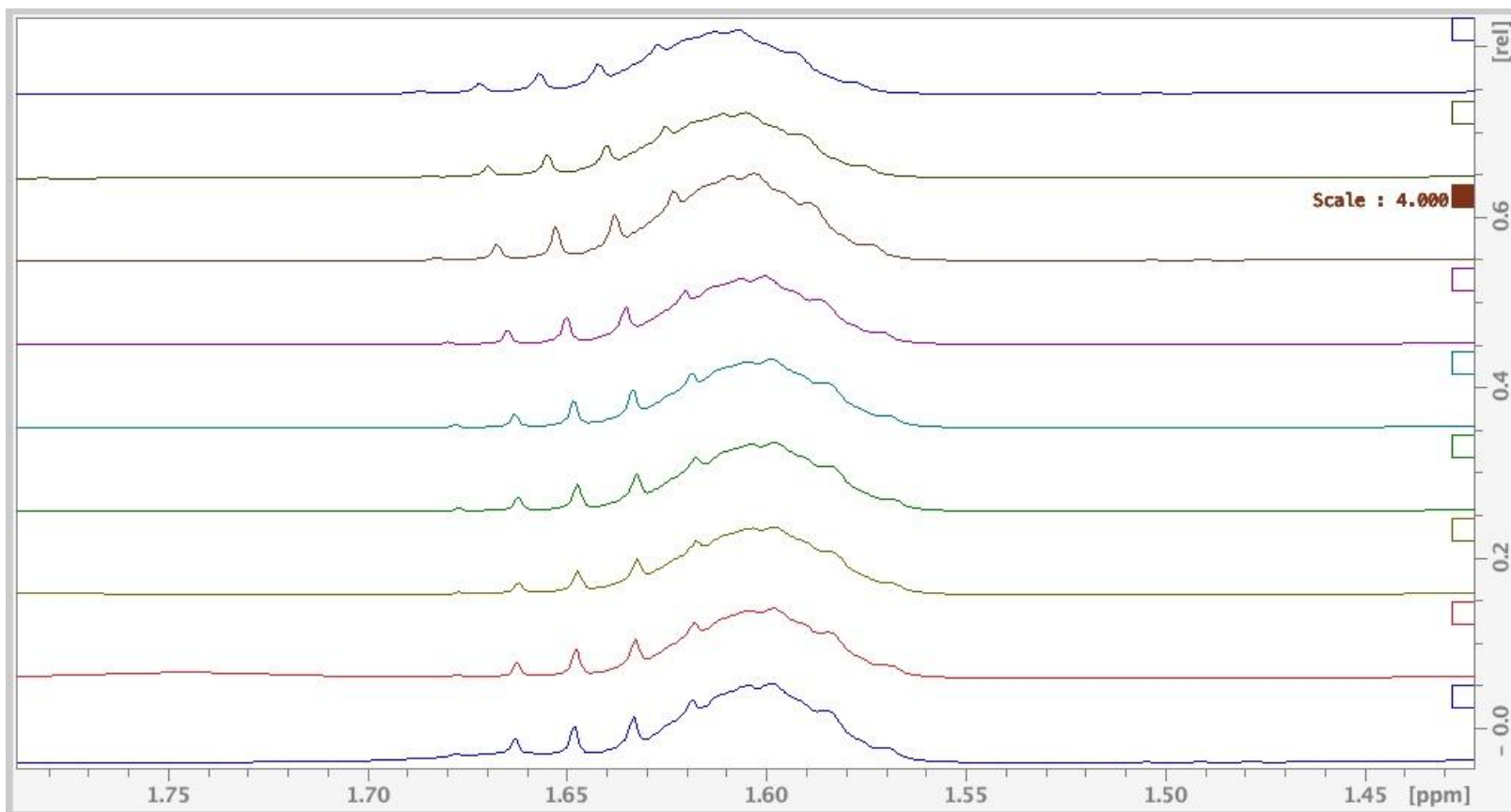
Η Εικόνα 4.23 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LC1 στην περιοχή των 0,87 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης. Οι διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης δεν προκαλούν κάποια φανερή μετατόπιση των κορυφών στα 0,87 ppm που αντιπροσωπεύουν τις  $-\text{CH}_3$  ομάδες των λιπαρών οξέων συμπεριλαμβανομένου του λινελαϊκού οξέος ( $\omega 6$ )



Εικόνα 4.24 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 0,98 ppm.

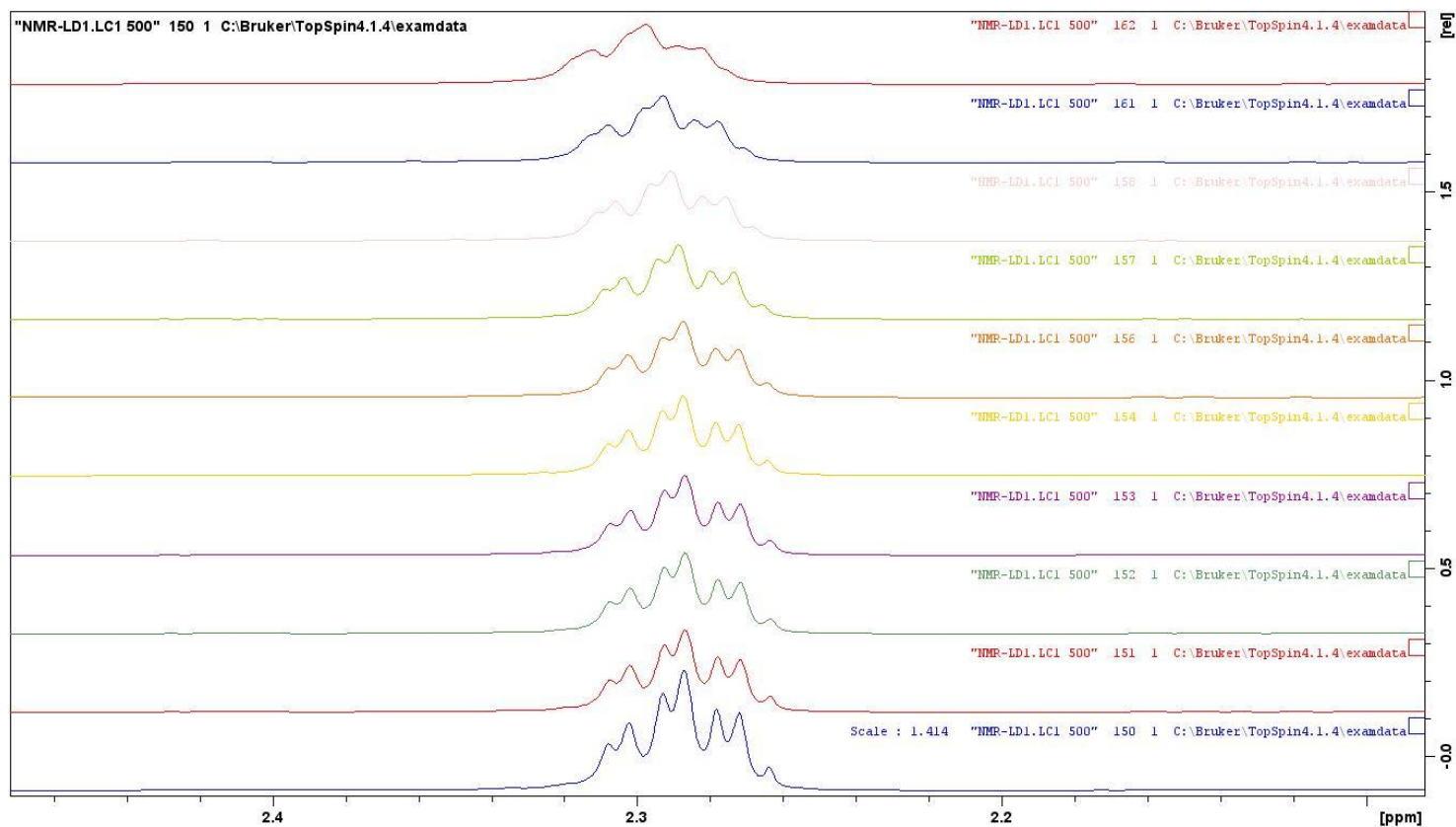
Στην Εικόνα 4.24, παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LC1 στην περιοχή των 0,98 ppm που αντιπροσωπεύει τις  $-\text{CH}_3$  ομάδες των ω-3. Το κάτω φάσμα δείχνει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης προκαλούν προοδευτική μετατόπιση των κορυφών, επομένως υπάρχει αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου με τα συγκεκριμένα πρωτόνια της περιοχής αυτής.

Στη συγκεκριμένη περιοχή συχνοτήτων, η αλληλεπικαλυπτόμενη κορυφή στα 0,99 ppm στο αρχικό πρωτονιακό φάσμα (στο κάτω μέρος της εικόνας 4.24) που παρουσιάζει μετατόπιση προς μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων κατά την προσθήκη αντιδραστηρίου «φτάνοντας» στα 1,2 ppm (τελευταίο πρωτονιακό φάσμα - πάνω μέρος της εικόνας 4.24) αναμένεται να είναι εστερικού τύπου ΛΟ. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα ΛΟ εστερικού τύπου που έχουν αναφερθεί στο γάλα όπως η 2-βουτανόνη σε περιεκτικότητα  $32,55 \text{ ng mL}^{-1}$ , 2-επτανόνη σε περιεκτικότητα  $22,19 \text{ ng mL}^{-1}$ , και ακετόνη σε περιεκτικότητα  $32,55 \text{ ng mL}^{-1}$ , αναμένεται η 2-βουτανόνη να είναι η εν λόγω ένωση. Η μεθυλομάδα της ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ ) αναμένεται σε συχνότητα συντονισμού 1,06 ppm πολύ κοντά στην τιμή χημικής μετατόπισης που δίνεται στα 0,99 ppm. Περαιτέρω έρευνα είναι σε εξέλιξη για την ταυτοποίησή της, ωστόσο, η χρήση του LSR οδηγεί στην δυνατότητα διάκρισής της από τις αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές. (Yue et al., 2015)



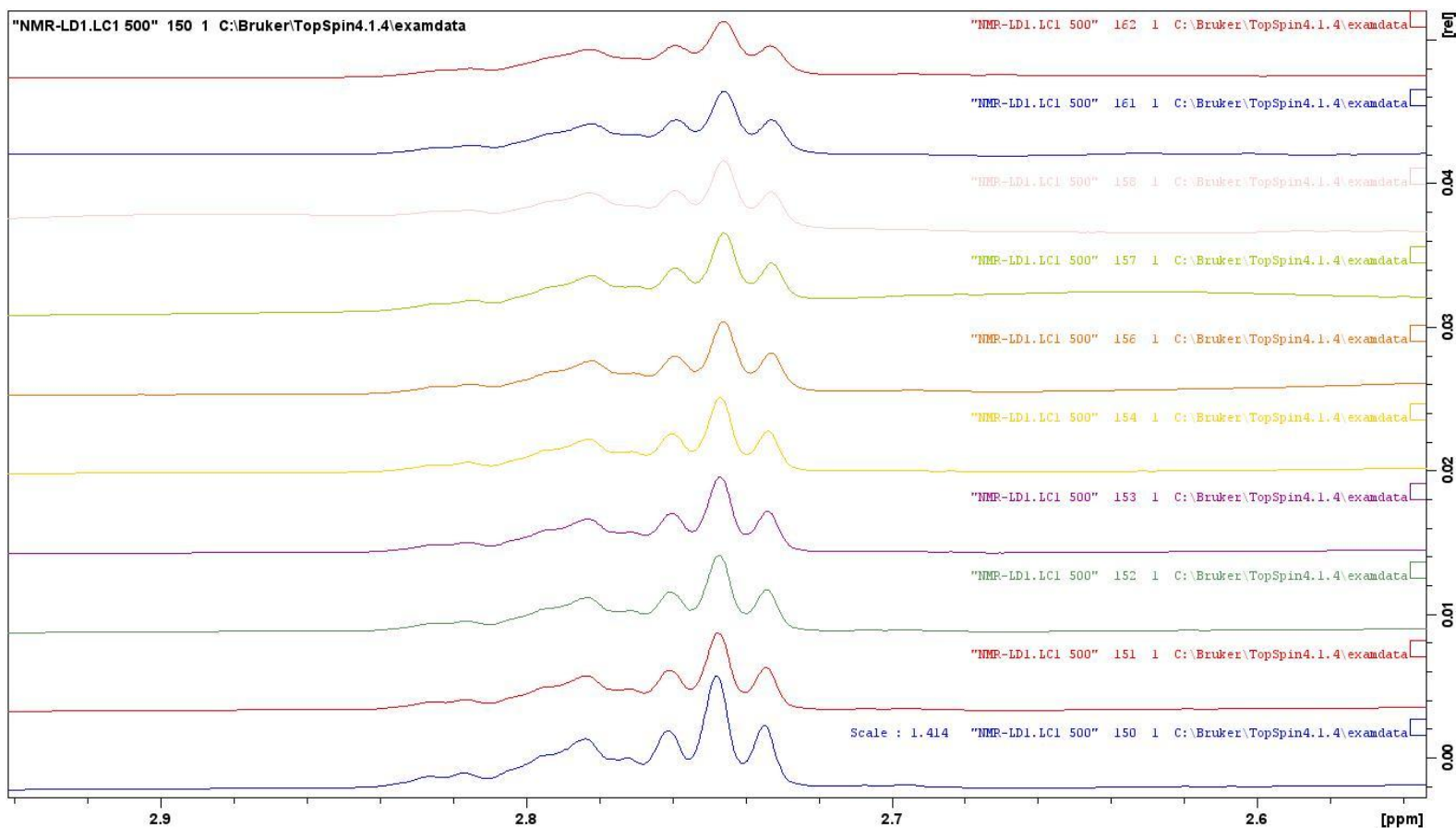
Εικόνα 4.25 : Φάσματα <sup>1</sup>H NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 1,6 ppm.

Στην Εικόνα 4.25, παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>1</sup>H NMR του δείγματος LC1 στην περιοχή των 1,6 ppm που αντιπροσωπεύει τις -OOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> ομάδες όλων των λιπαρών οξέων. Το κάτω φάσμα δείχνει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης προκαλούν μικρή μετατόπιση των κορυφών, επομένως υπάρχει αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου με τα συγκεκριμένα πρωτόνια της περιοχής αυτής.



Εικόνα 4.26: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 2,29 ppm.

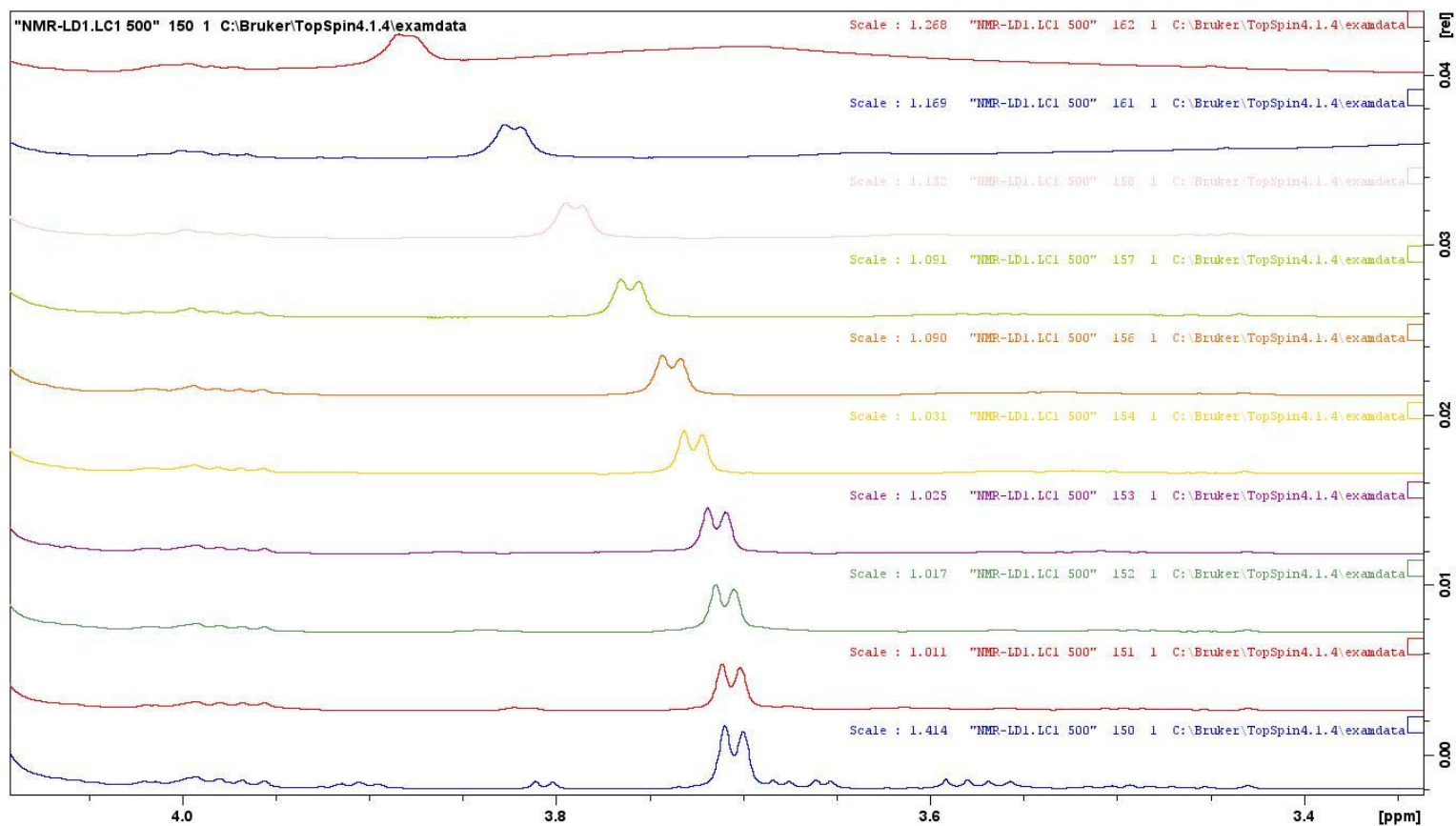
Η Εικόνα 4.26 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LC1 στην περιοχή των 2,29 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης, ενώ οι διαδοχικές προσθήκες οδηγούν σε μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-$  πρωτόνια που είναι σε  $\alpha$ -θέση ως προς το εστερικό καρβοξύλιο, επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των πρωτονίων με το αντιδραστήριο.



Εικόνα 4.27: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 2,7 ppm.

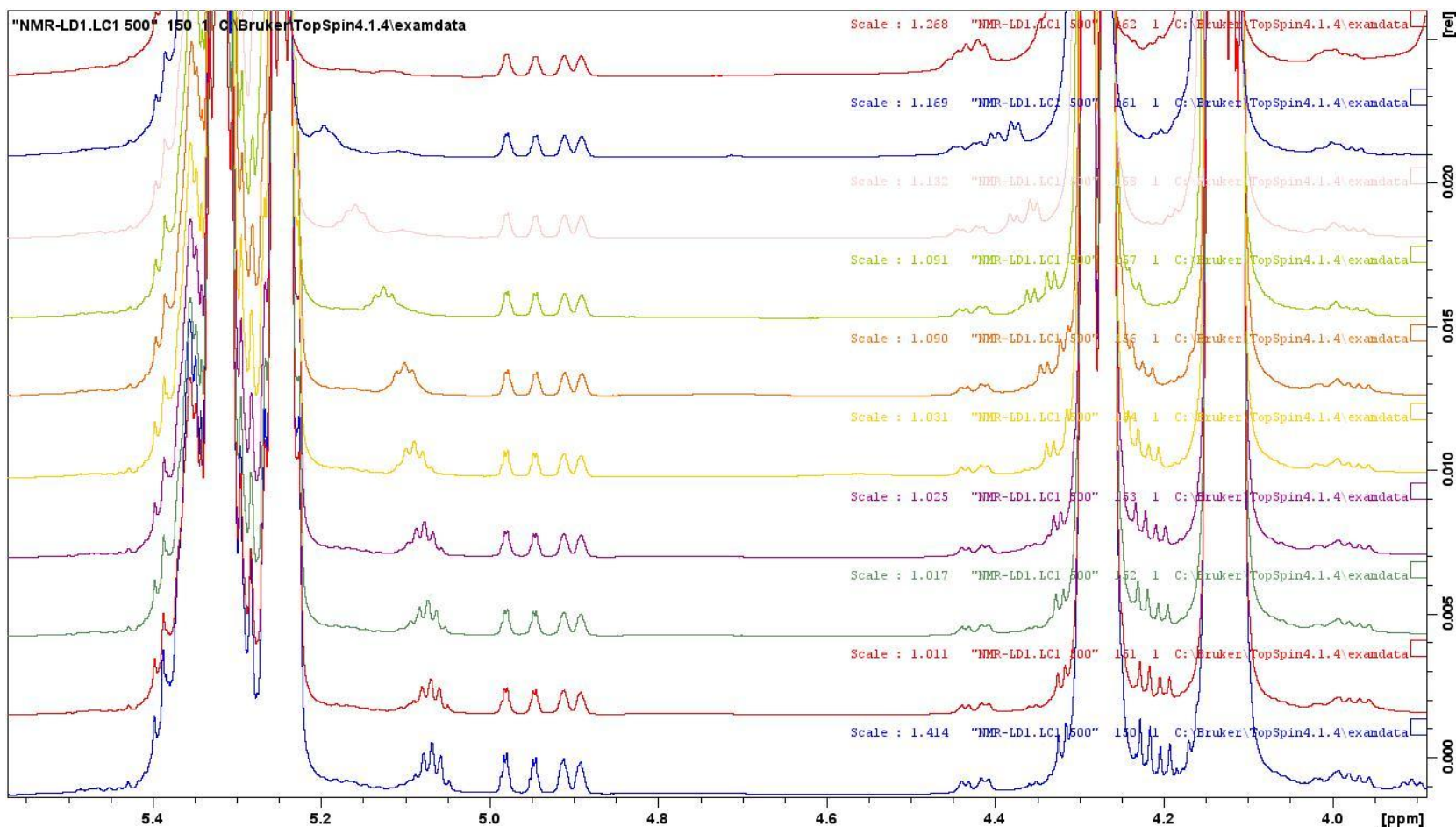
Στην Εικόνα 4.27, τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LC1 παρουσιάζονται στην περιοχή των 2,7 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Μετά από διαδοχικές προσθήκες, οι κορυφές που παρουσιάζονται παραπάνω που είναι οι συντονισμοί των πρωτονίων στα 2.74 ppm, που αντιστοιχούν στα τέσσερα ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινολενικού οξέος στις θέσεις 5 και 8, στα 2.77 ppm που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινελαϊκού οξέος στη θέση 8, στα 2.77 ppm καθώς και στα 2,81 ppm που αντιστοιχούν στα έξι ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια (bis-allylic) του DHA (docosahexaenoic acid) 22:6 ( $\omega$ -3) δεν φαίνεται να μετατοπίζονται.





Εικόνα 4.28: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 3,7 ppm.

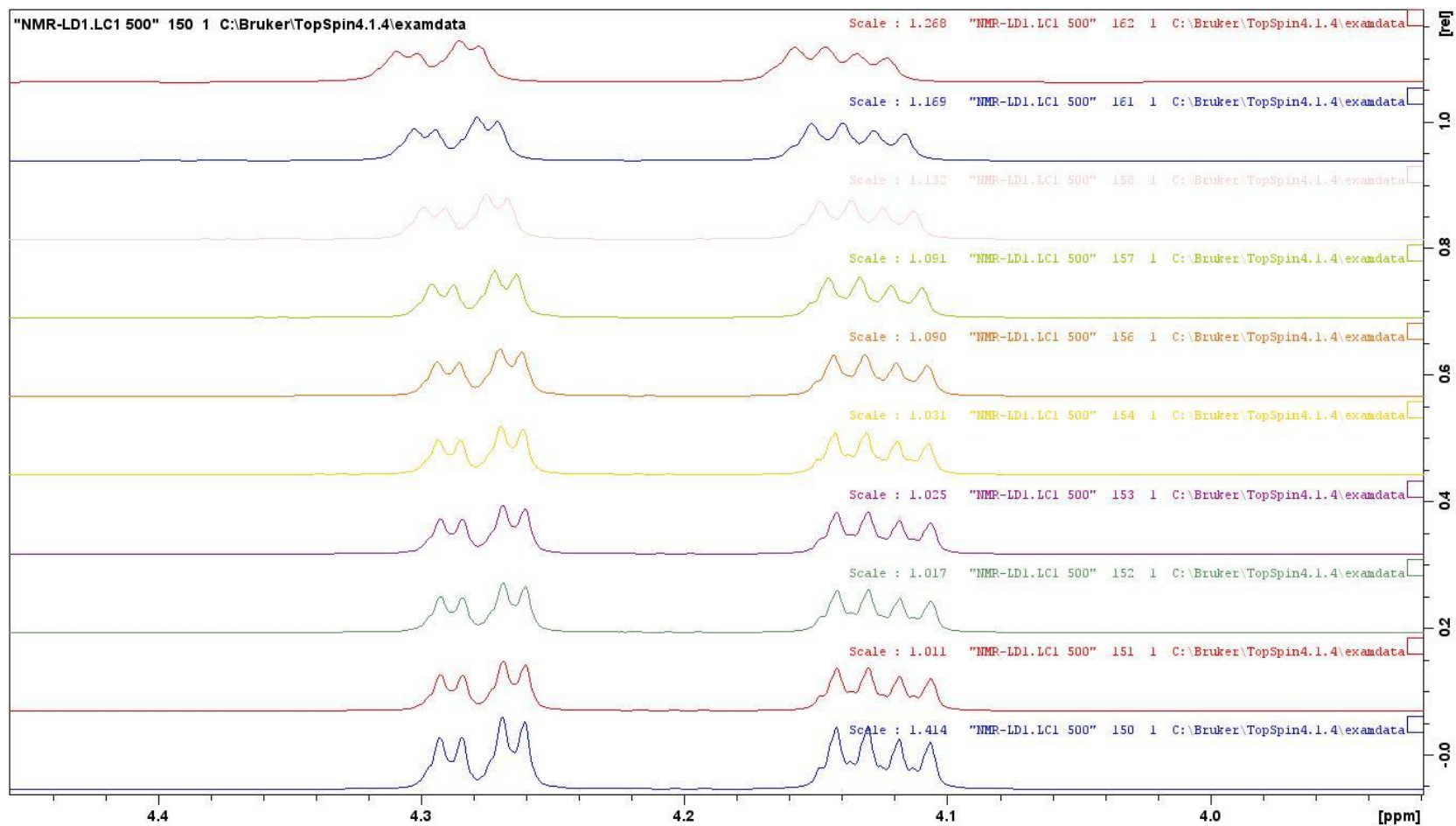
Η Εικόνα 4.28 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 3,7 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης, ενώ οι διαδοχικές προσθήκες οδηγούν σε μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$  (*sn-1*) πρωτόνια της 1,2 DAG, επιβεβαιώνοντας την αλληλεπίδραση των πρωτονίων με το αντιδραστήριο.



Εικόνα 4.29 : Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 5,07 ppm

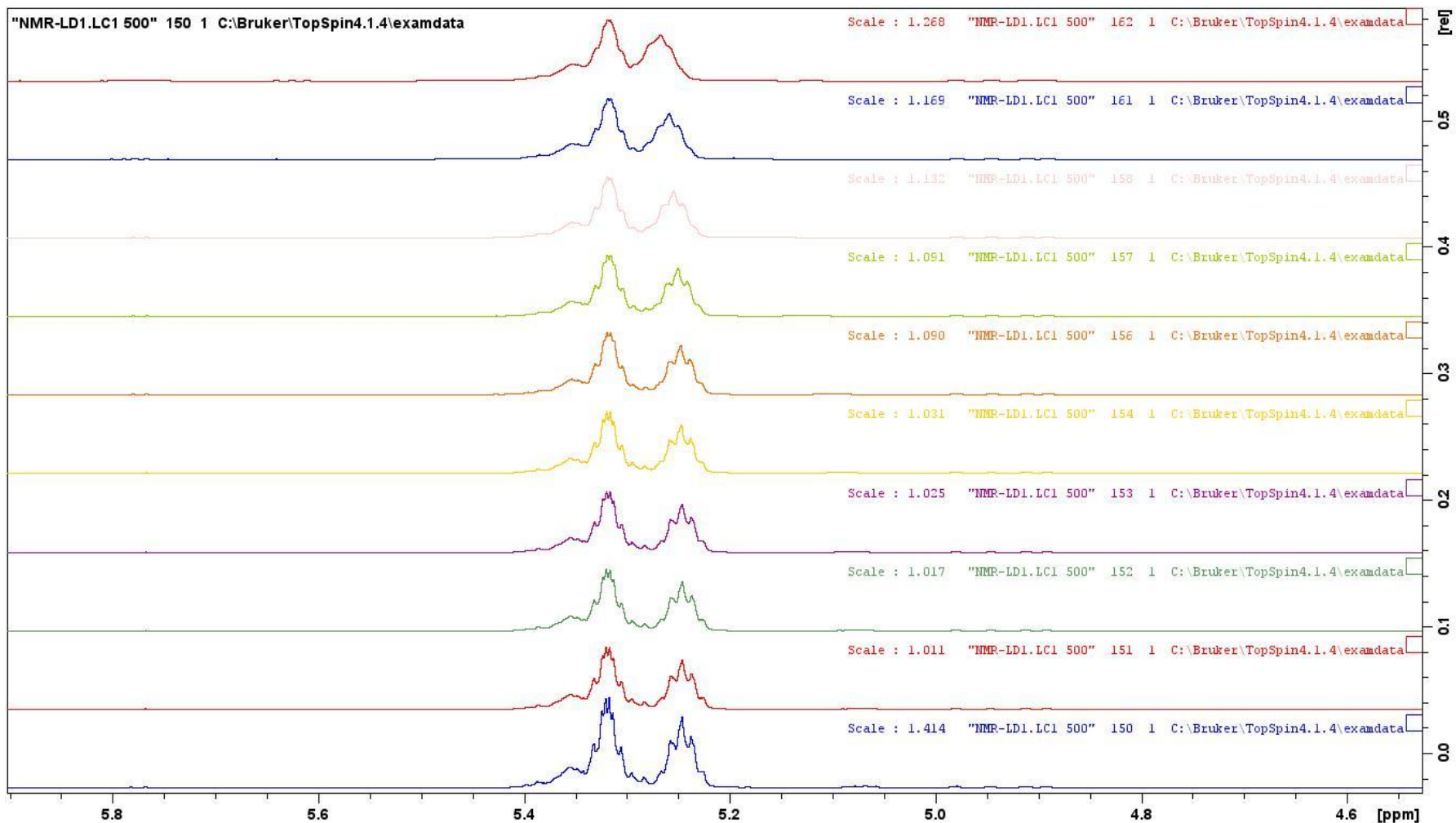
Στην Εικόνα 4.29 παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LD1 στην περιοχή των 5,07 ppm, που αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια -CH- της 1,2 DAG. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου, παρατηρείται προοδευτική μετατόπιση των κορυφών. Αυτή η μετατόπιση δείχνει την αλληλεπίδραση του αντιδραστηρίου με τα συγκεκριμένα πρωτόνια της περιοχής αυτής.





Εικόνα 4.30 : Φάσματα <sup>1</sup>H NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 4,28 ppm.

Στην Εικόνα 4.30 το κάτω φάσμα είναι πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι προσθήκες του αντιδραστηρίου προκαλούν μια μικρή μετατόπιση των κορυφών ου αντιστοιχούν στα  $-CH_2 -OOC-$  πρωτόνια της γλυκερόλης στην TAG στα 4,11 και 4,27 ppm, αποδεικνύοντας την επίδραση του αντιδραστηρίου στις περιοχές αυτές.

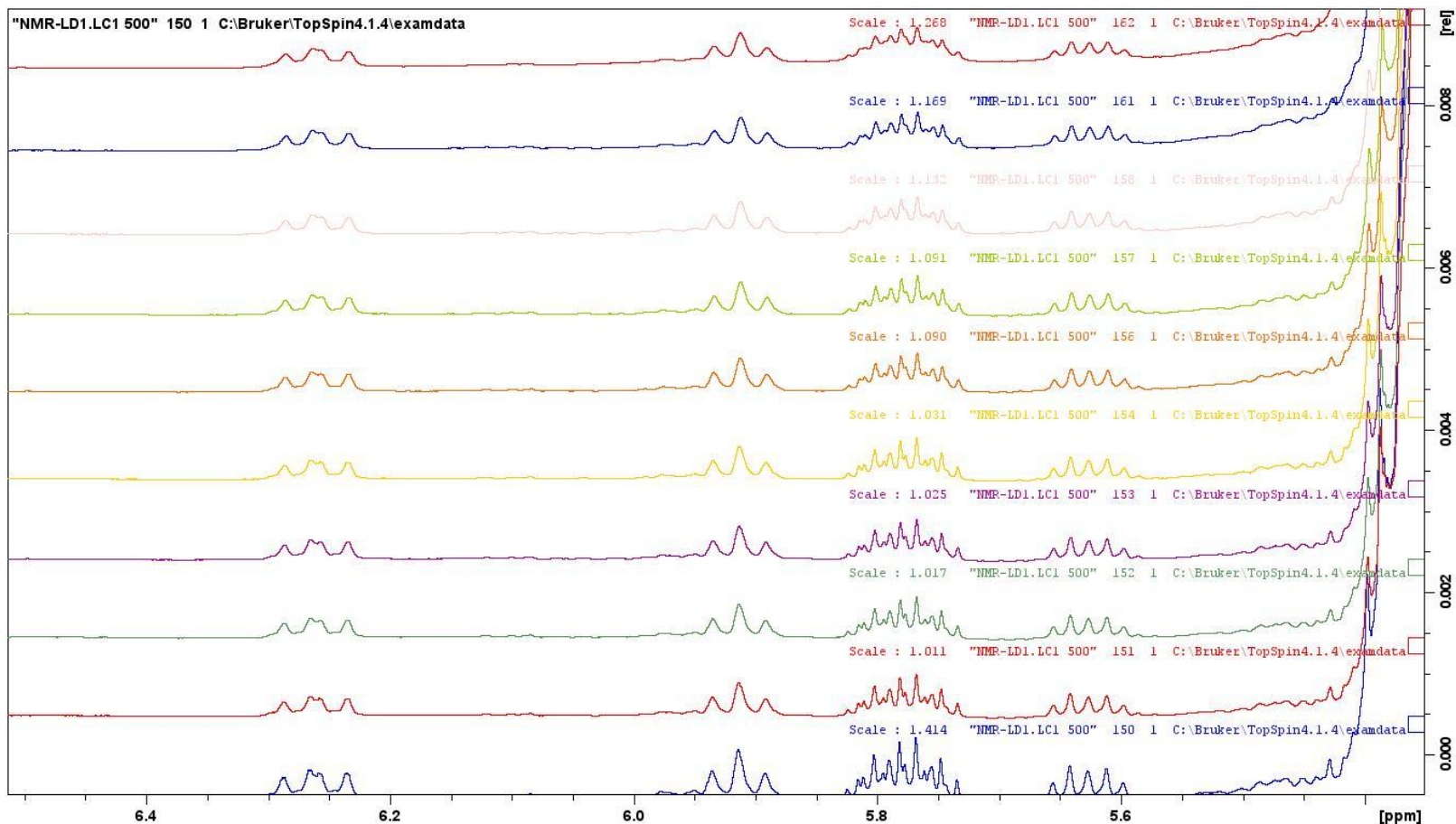


Εικόνα 4.31: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 5,25 ppm.

Η Εικόνα 4.31 παρουσιάζει τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του δείγματος LC1 στην περιοχή των 5,25 ppm. Το κάτω φάσμα απεικονίζει το φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης ενώ παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 5.24 ppm, που μετατοπίζονται

μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου, που αντιστοιχούν στο (–CH–) πρωτόνιο στη θέση 2 των TAG, των πρωτονίων στα 5.25 ppm που αντιστοιχούν στο (–CH–) πρωτόνιο του (9-*trans*, 11-*cis*) 18:2 CLA σε α- θέση ως προς την καρβοξυλομάδα, των πρωτονίων στα 5.31 ppm, που αντιστοιχούν στα (=CH–) ολεφινικά πρωτόνια των *cis*- UFA και των πρωτονίων στα 5.34 ppm, που αντιστοιχούν στα (=CH–) ολεφινικά πρωτόνια των *trans*- UFA.

Οι διαδοχικές προσθήκες δεν οδηγούν σε μετατόπιση των κορυφών επομένως δεν υπάρχει αλληλεπίδραση των πρωτονίων με το αντιδραστήριο.



Εικόνα 4.32: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LC1 (0,684 g/mL) πριν (κάτω φάσμα) και μετά από διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 5,5- 6,5 ppm.

Στην Εικόνα 4.34 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 6.25 ppm, που αντιστοιχούν στο H11 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.90 ppm που αντιστοιχούν H10 ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.76 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο H8 πρωτόνια ( $=\text{CH}_2$ ) του καπρολεϊκού οξέος και στα 5.61 ppm που αντιστοιχούν στο H12 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA. Το κάτω φάσμα δείχνει το αρχικό φάσμα πριν την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης. Οι διαδοχικές προσθήκες του αντιδραστηρίου δεν φαίνεται να προκαλούν μετατόπιση των κορυφών

### **Δείγμα LC1 (0,684 g/mL)**

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων με την προσθήκη LSR για το δείγμα LC1 (0,684g/mL).

**Πίνακας 4.5 :Χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων του λιπιδικού κλάσματος και μεταβολή κατά την προσθήκη LSR(Δείγμα LD1)**

	Προστιθέμενη συγκέντρωση LSR (mM)	0	0,207		0,412		0,615		1,015		1,409		1,797		2,179		2,555		3,285	
<sup>1</sup> H	Ένωση	δ <sub>H</sub> (pap)	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz	δ <sub>H</sub> (pap)	Δδ / Hz
-CH=CH-	Cis UFA	5.32	st		st		st		st		st		st		st		st		st	
-CH - OOC-	<b>9- trans -11 cis CLA</b>	5.25	5.25		5.25		5.25		5.25	0.54	5.25	1.26	5.26	2.34	5.26	2.16	5.27		4.13	
-CH <sub>2</sub> - OOC-	<b>Glycerol in TAG</b>	4.28	4.28		4.28		4.28		4.28		4.28	1.12	4.28	1.83	4.29	2	4.3		3.45	
-CH <sub>2</sub> - OOC-	<b>GLYcerol in TAG</b>	4.13	4.13		4.13		4.13		4.13		4.13	1	4.13	1.81	4.13	1.69	4.14		3.21	
-CH <sub>2</sub> -O-CO-R (sn1)	<b>1,2 DAG</b>	3.7	3.702	0.82	3.705	1.65	3.715	2.26	3.73		3.74		3.76		3.79		3.82		3.89	
=CH-CH <sub>2</sub> -	Linolenic FA	2.75	st		st		st		st		st		st		st		st		st	

CH=																			
-OOC- CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub>	<b>all FA</b>	2.29	2.29		2.29		2.29		2.29		2.29		2.29	1.56	2.29	1.56	2.3	2.34	
-CH <sub>2</sub> - CH=CH	Cis UFA	1.99	st		st		st		st		st		st		st		st		
-OOC- CH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub>	All FA	1.60	st		st		st		st		st		st		st		st		
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	All FA	1.23	st		st		st		st		st		st		st		st		
-CH <sub>3</sub>	<b>All n-3 FA</b>	0.93	0.929	- 0.29	0.929		0.929		0.929		0.929		0.93	0.35	0.93	0.41	0.93	0.87	
-CH <sub>3</sub>	FA	0.85	st		st		st		st		st		st		st		st		

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων κατά την διαδοχική προσθήκη (titration) LSR .

**Πίνακας 4.6: Χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων κατά την διαδοχική προσθήκη (titration) LSR στο διάλυμα LD1 (0,207 g/mL)**

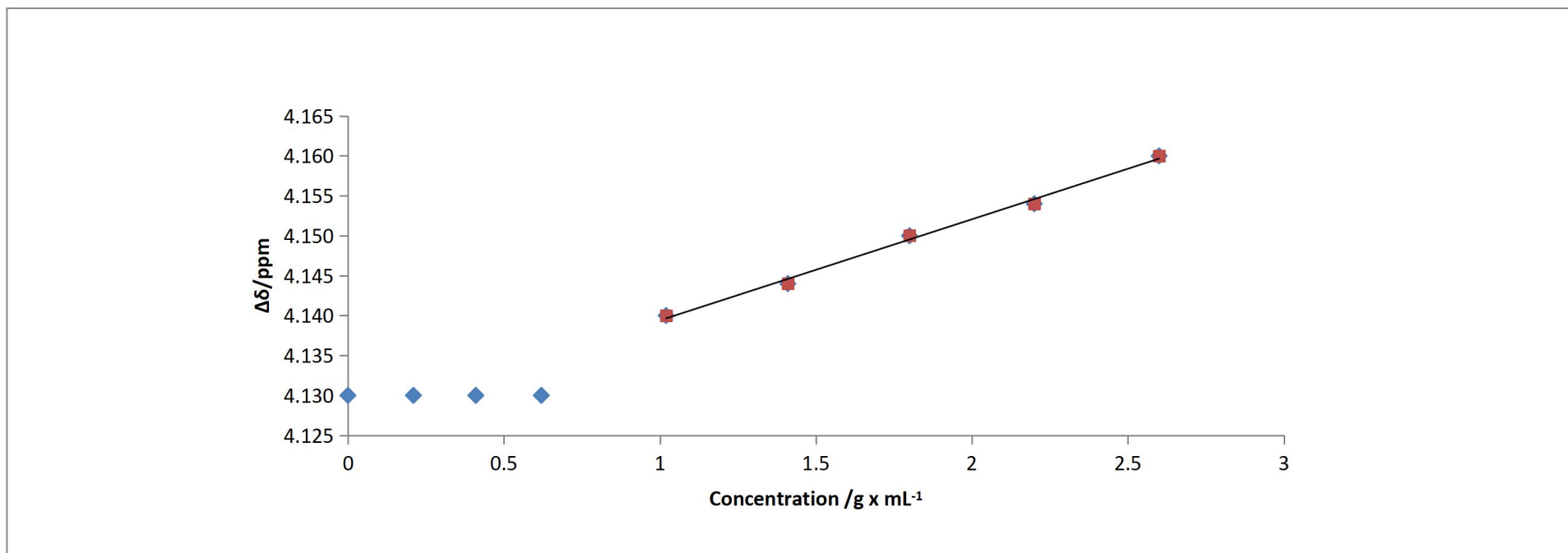


<b>LD1 (0,207 g/mL)</b>		DAG (sn-3)	glycerol (sn-1)	glycerol in tag (sn-3)	All FA	All n-3 FA and b.a.
V added(μL)	Concentration(g/mL)	Δδ / ppm				
0	0	3,72	4,28	4,13	2,30	0,940
5	0,207	3,72	4,28	4,13	2,30	0,939
10	0,412	3,72	4,28	4,13	2,30	0,939
15	0,615	3,73	4,28	4,13	2,30	0,939
25	1,015	3,75	4,28	4,14	2,30	0,939
35	1,409	3,79	4,29	4,14	2,30	0,940
45	1,797	3,84	4,30	4,15	2,31	0,941
55	2,179	3,88	4,31	4,15	2,31	0,942
65	2,555	3,92	4,31	4,16	2,31	0,943

**Πίνακας 4.7: Χημικές μετατοπίσεις επιλεγμένων ενώσεων κατά την διαδοχική προσθήκη (titration) LSR στο διάλυμα LC1 (0,684 g/mL)**

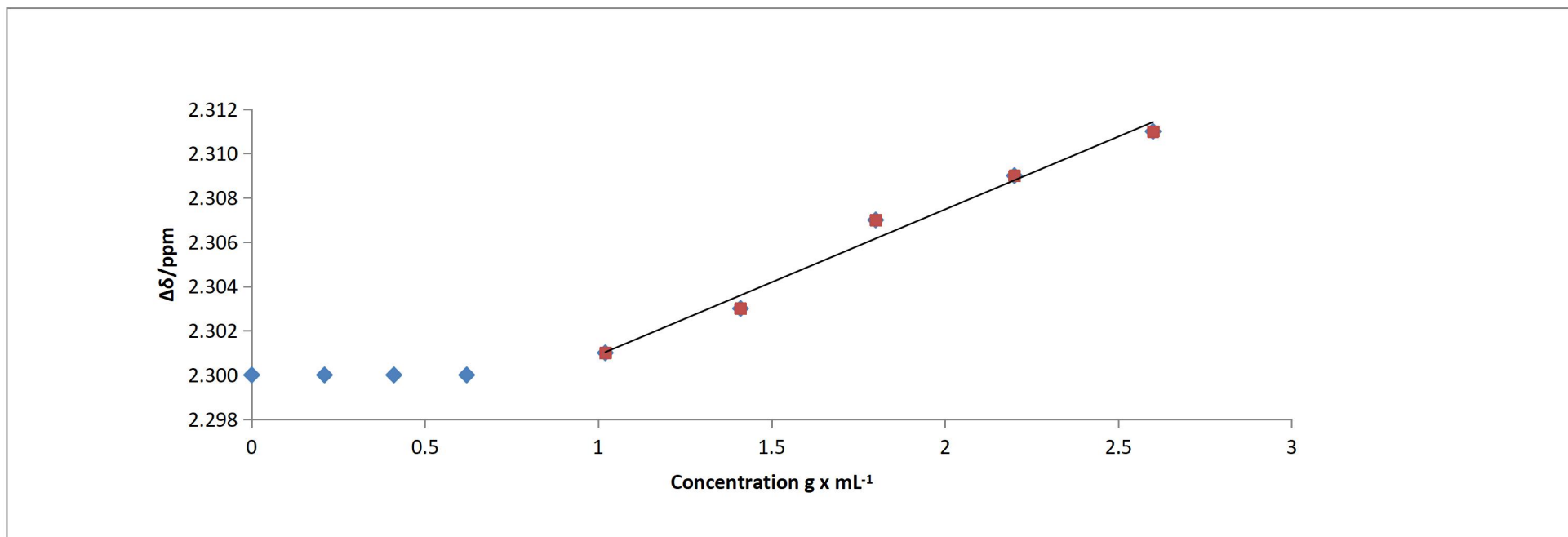
LC1 (0,684 g/mL)		9- trans -11 cis CLA	Glycerol in tag	Glycerol in TAG	1,2 DAG	All FA	All n-3 FAand b.a.
V added(μL)	Concentration(g/mL)	Δδ / ppm					
0	0	5,25	4,28	4,13	3,70	2,29	0,930
5	0,207	5,25	4,28	4,13	3,70	2,29	0,929
10	0,412	5,25	4,28	4,13	3,71	2,29	0,929
15	0,615	5,25	4,28	4,13	3,71	2,29	0,929
25	1,015	5,25	4,28	4,13	3,73	2,29	0,929
35	1,409	5,25	4,28	4,13	3,74	2,29	0,929
45	1,797	5,25	4,28	4,13	3,76	2,29	0,929
55	2,179	5,26	4,29	4,14	3,79	2,29	0,930
65	2,555	5,26	4,29	4,14	3,82	2,30	0,931
85	3,385	5,27	4,30	4,15	3,89	2,30	0,933

Από τις επιλεγμένες ενώσεις των πινάκων C και D , που είναι οι ενώσεις που μεταβάλλονται κατά την διαδοχική προσθήκη του LSR ,προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα



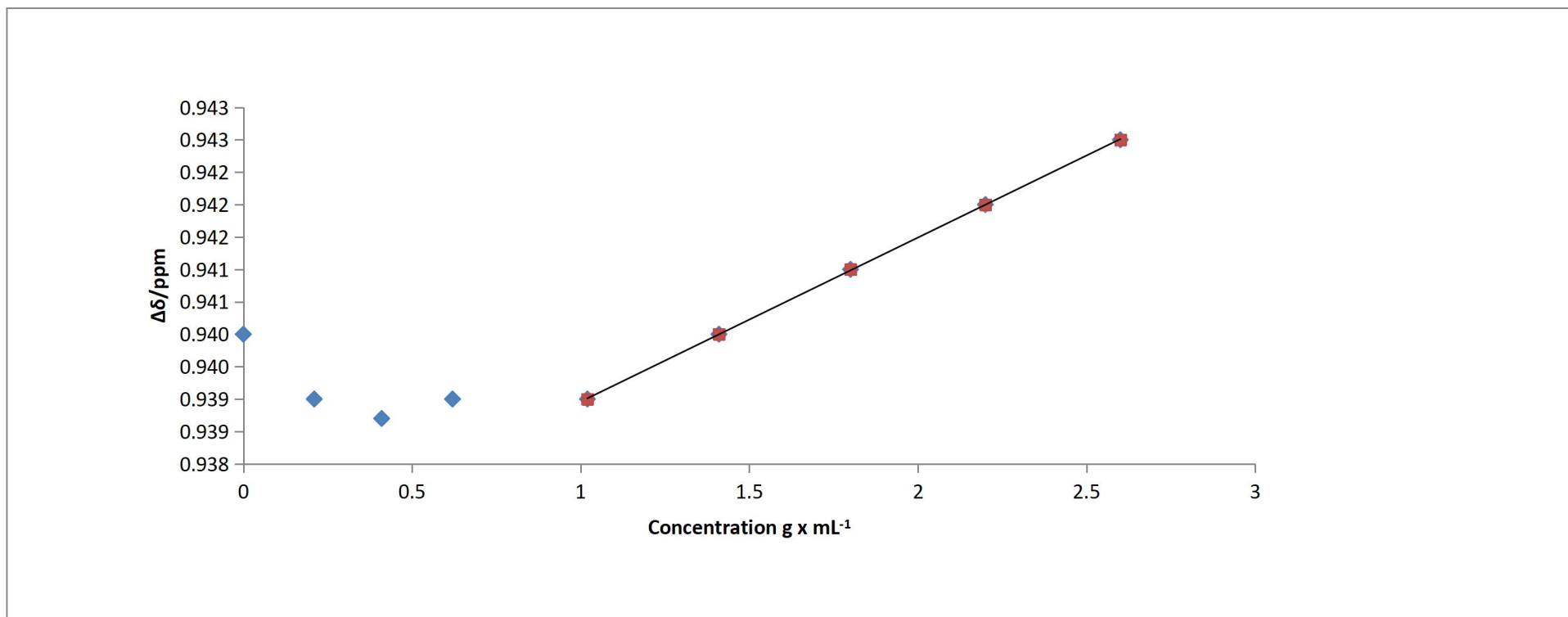
Σχήμα 4.5 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των sn-3 πρωτονίων της TAG στα 4,13 ppm για το δείγμα LD1 (0,207g/mL) .

Στο σχήμα 4.5 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των πρωτονίων sn-3 της TAG στα 4,13 ppm,σύμφωνα και με τον πίνακα 4.6 Στην εικόνα 4.19 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων.Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,0012x +4,126$  με συντελεστή  $R^2=0,995$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1.015 έως 2,555 g/mL.



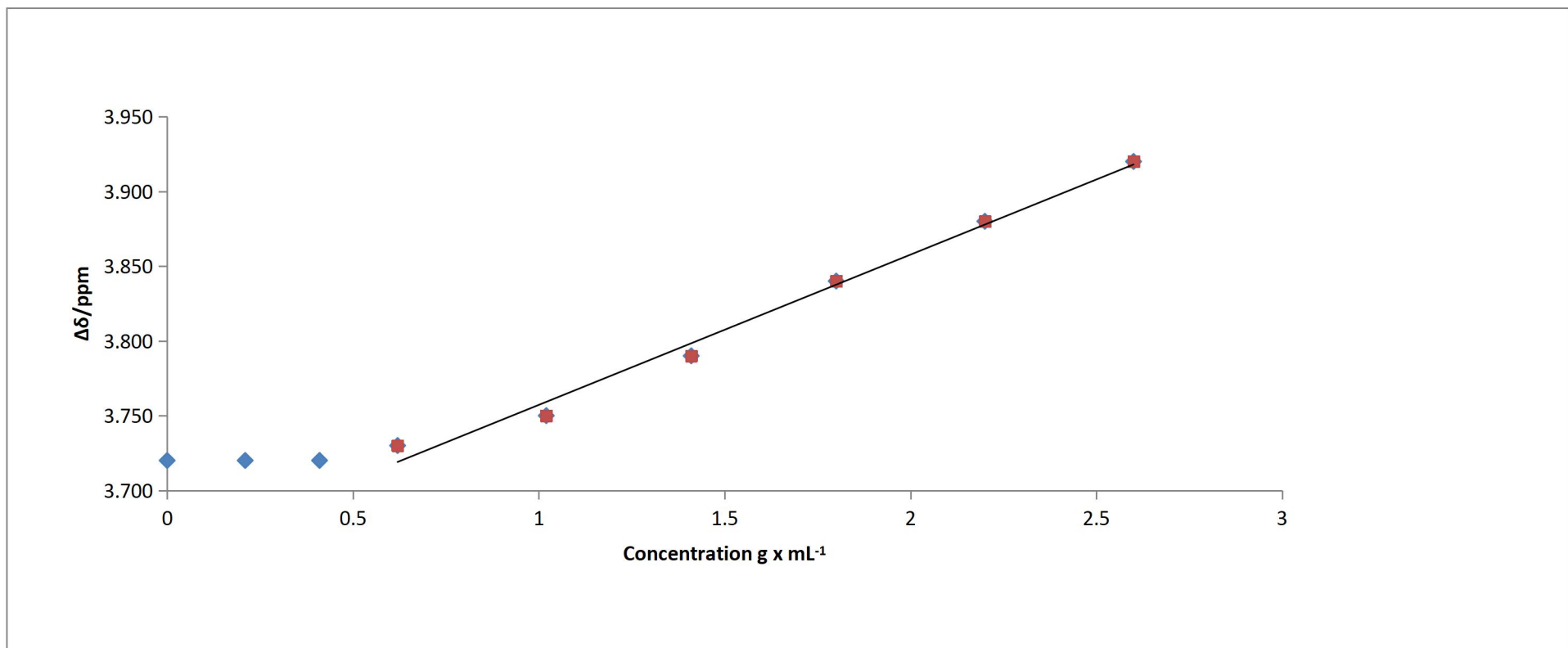
Σχήμα 4.6 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων  $-OOC-CH_2-CH_2$  των συνολικών λιπαρών οξέων (All FA) στα 2,3 ppm για το δείγμα LD1 (0,207g/mL) .

Στο σχήμα 4.6 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των πρωτονίων  $-OOC-CH_2-CH_2$  των συνολικών λιπαρών οξέων (All FA) στα 2,3 ppm, σύμφωνα και με τον πίνακα 4.6 .Επίσης στην εικόνα 4.16 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων .Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,006x+2,294$  με συντελεστή  $R^2=0,981$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1.015 έως 2,555 g/mL.



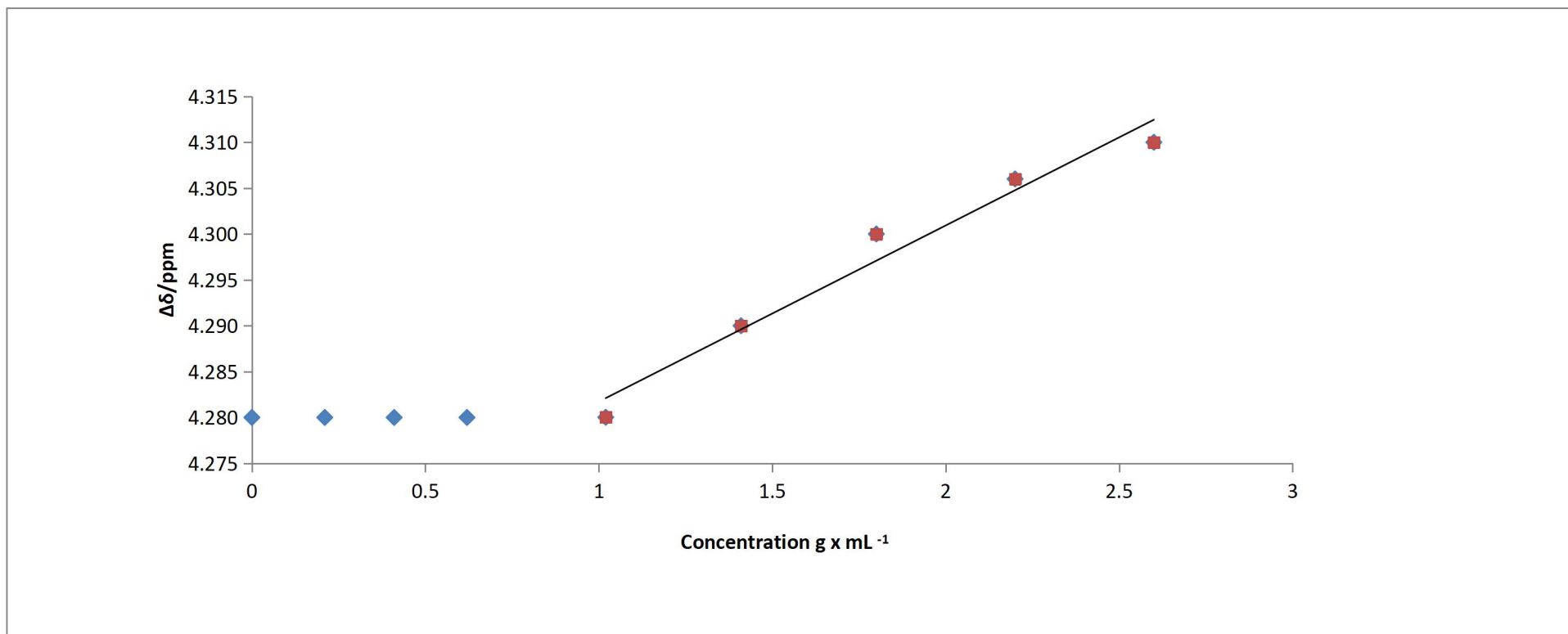
Σχήμα 4.7 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των συνολικών n-3 πρωτονίων των λιπαρών οξέων και των πρωτονίων του βουτυρικού οξέως (All n-3 FA και b.a) στα 0,94 ppm για το δείγμα LD1 (0,207g/mL) .

Στο σχήμα 4.7 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των συνολικών n-3 πρωτονίων των λιπαρών οξέων και των πρωτονίων του βουτυρικού οξέως (All n-3 FA και b.a) στα 0,94 ppm ,σύμφωνα και με τον πίνακα 4.6 .Επίσης στην εικόνα 4.14 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων .Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,002x +0,936$  με συντελεστή  $R^2=1$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1.015 έως 2,555 g/mL.



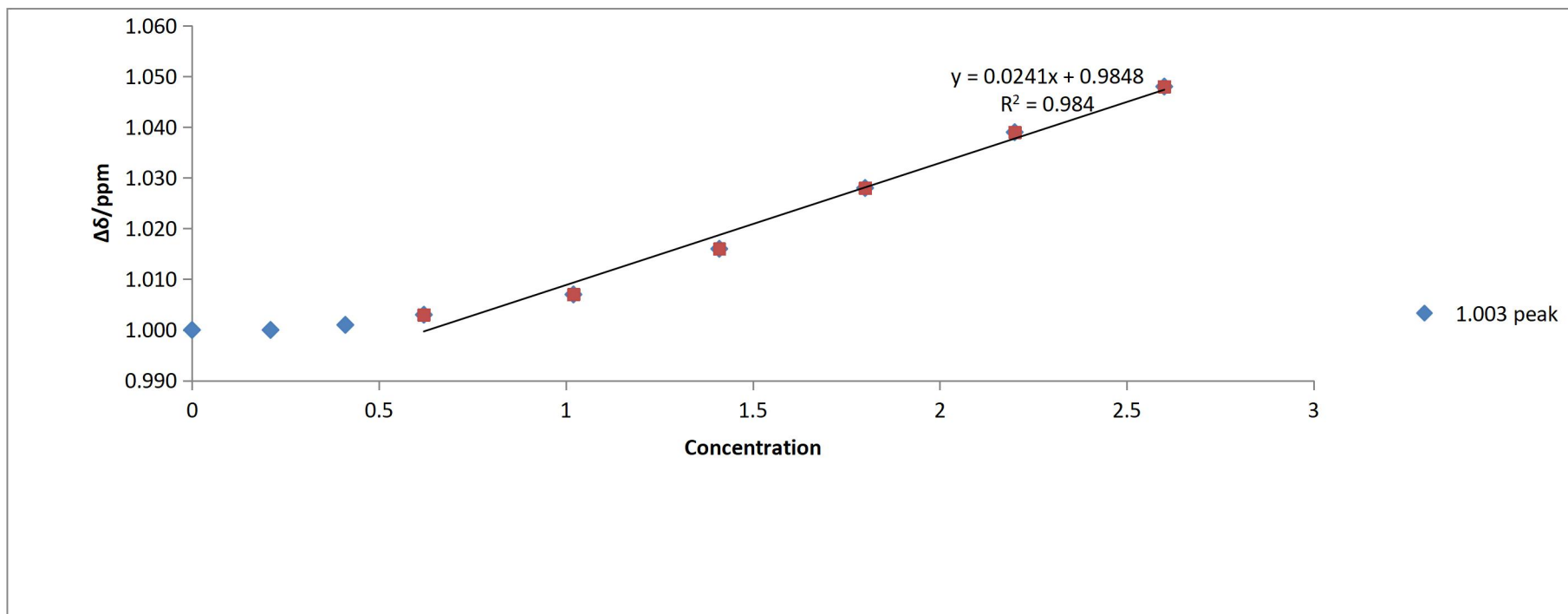
Σχήμα 4.8 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των sn-3 πρωτονίων της 1,2 DAG στα 3,72 ppm για το δείγμα LD1 (0,207g/mL) .

Στο σχήμα 4.8 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης, η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των sn-3 πρωτονίων της 1,2 DAG στα 3,72 ppm, σύμφωνα και με τον πίνακα 4.6 .Επίσης στην εικόνα 4.18 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων .Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,100x +3,656$  με συντελεστή  $R^2=0,989$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1.015 έως 2,555 g/mL.



Σχήμα 4.9 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των sn-1 πρωτονίων της TAG στα 4,28 ppm για το δείγμα LD1 (0,207g/mL) .

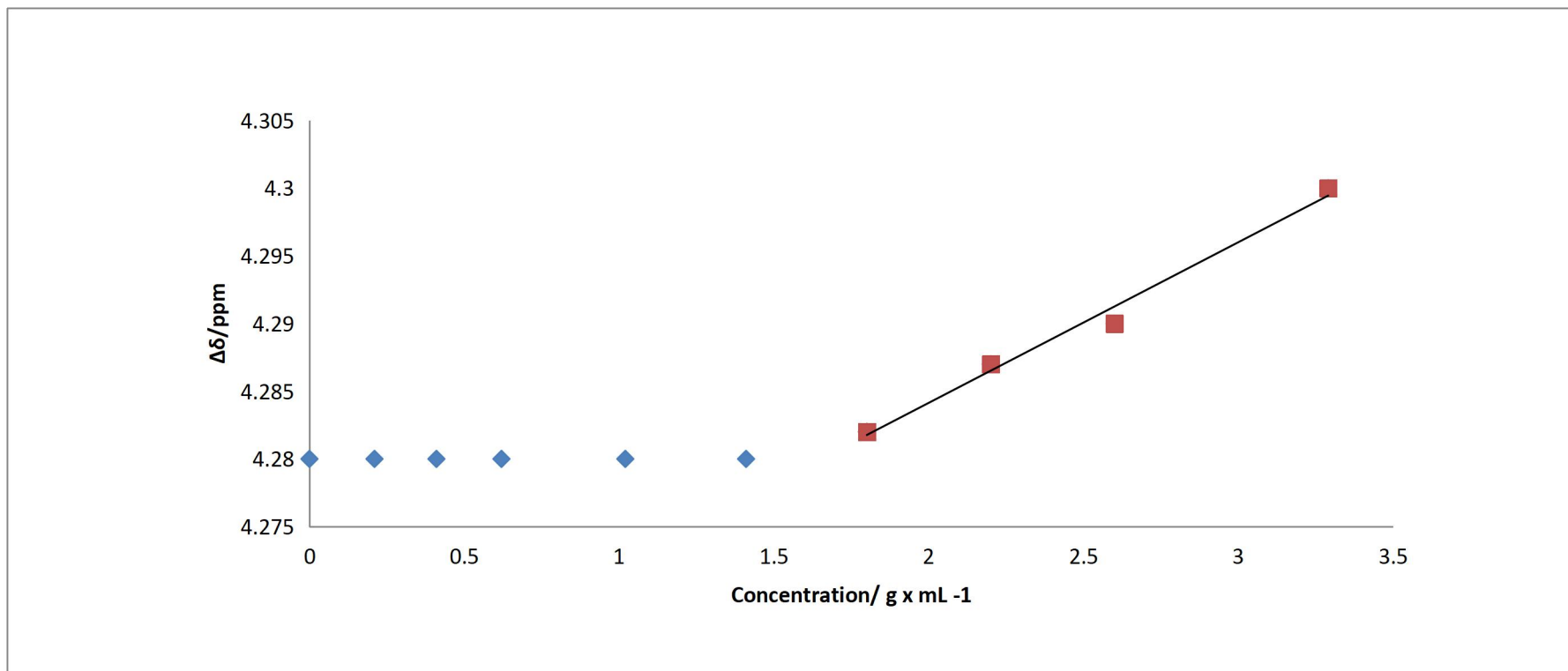
Στο σχήμα 4.9 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των πρωτονίων sn-1 της TAG στα 4,28 ppm,σύμφωνα και με τον πίνακα 4.6 Στην εικόνα 4.19 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων. Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,0019x +4,262$  με συντελεστή  $R^2=0,965$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1.015 έως 2,555 g/mL.



Σχήμα 4.10: Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων στα 1,003 ppm της για το δείγμα LD1 (0,207g/mL) .

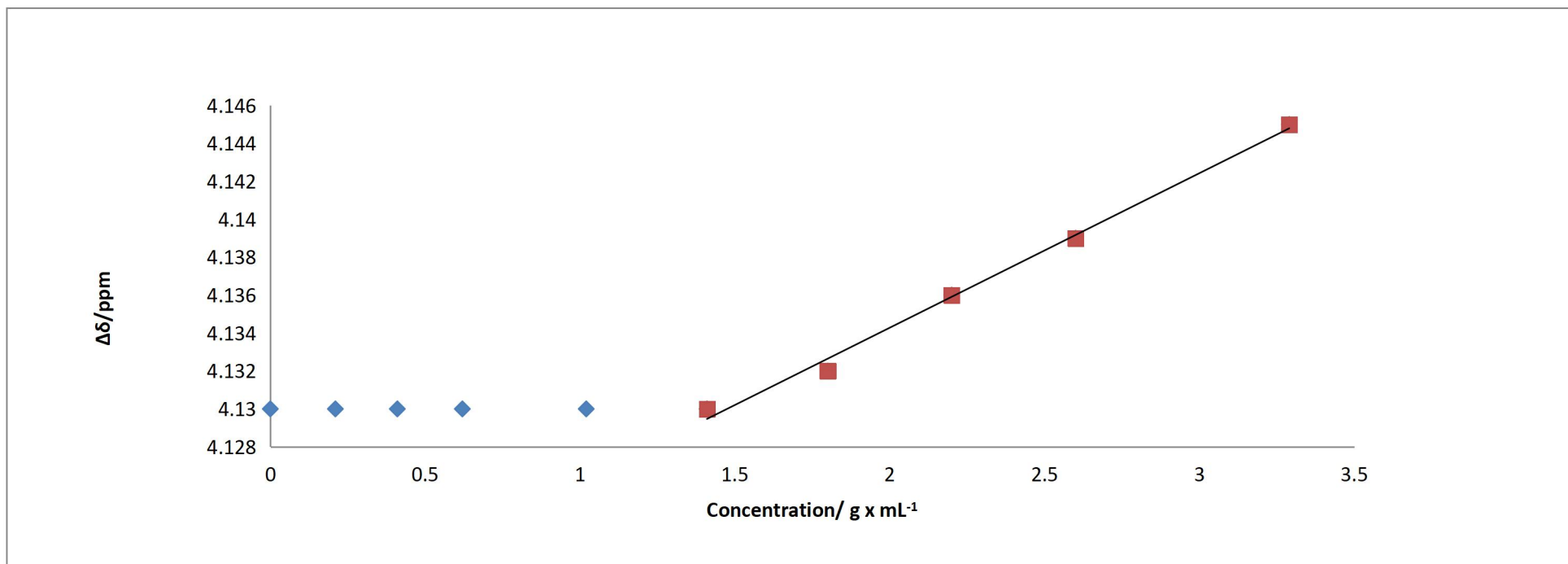
Στο σχήμα 4.10 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης, η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στα 1,003 ppm, που αντιστοιχεί σε μια νέα κορυφή η οποία αναμένεται να είναι εστερικού τύπου ΛΟ. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα ΛΟ εστερικού τύπου που έχουν αναφερθεί στο γάλα όπως η 2-βουτανόνη σε περιεκτικότητα  $32,55 \text{ ng mL}^{-1}$ , 2-επτανόνη σε περιεκτικότητα  $22,19 \text{ ng mL}^{-1}$ , και ακετόνη σε περιεκτικότητα  $32,55 \text{ ng mL}^{-1}$ , αναμένεται η 2-βουτανόνη να είναι η εν λόγω ένωση. Η μεθυλομάδα της ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ ) αναμένεται σε συχνότητα συντονισμού 1,06 ppm πολύ κοντά στην τιμή χημικής μετατόπισης που δίνεται στα 0,99 ppm σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7. Επίσης στην εικόνα 4.16 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων. Η εξίσωση είναι της μορφής  $y = 0,006x + 2,294$  με συντελεστή  $R^2 = 0,981$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1.015 έως 2,555 g/mL. (Yue et al., 2015)





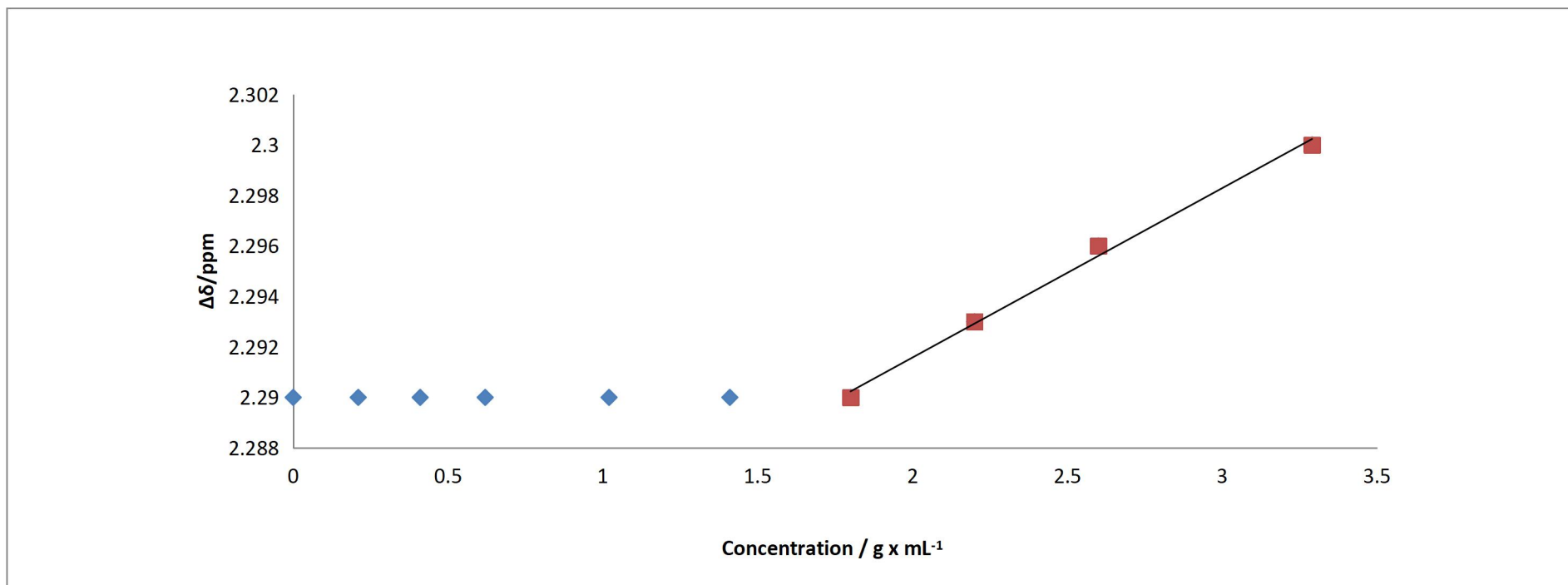
Σχήμα 4.11: Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των sn-1 πρωτονίων της TAG στα 4,28 ppm για το δείγμα LC1 (0,684g/mL) .

Στο σχήμα 4.11 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των πρωτονίων sn-1 της TAG στα 4,28 ppm, σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7 Στην εικόνα 4.31 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων. Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,011x+4,260$  με συντελεστή  $R^2=0,987$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1,409 έως 3,385 g/mL.



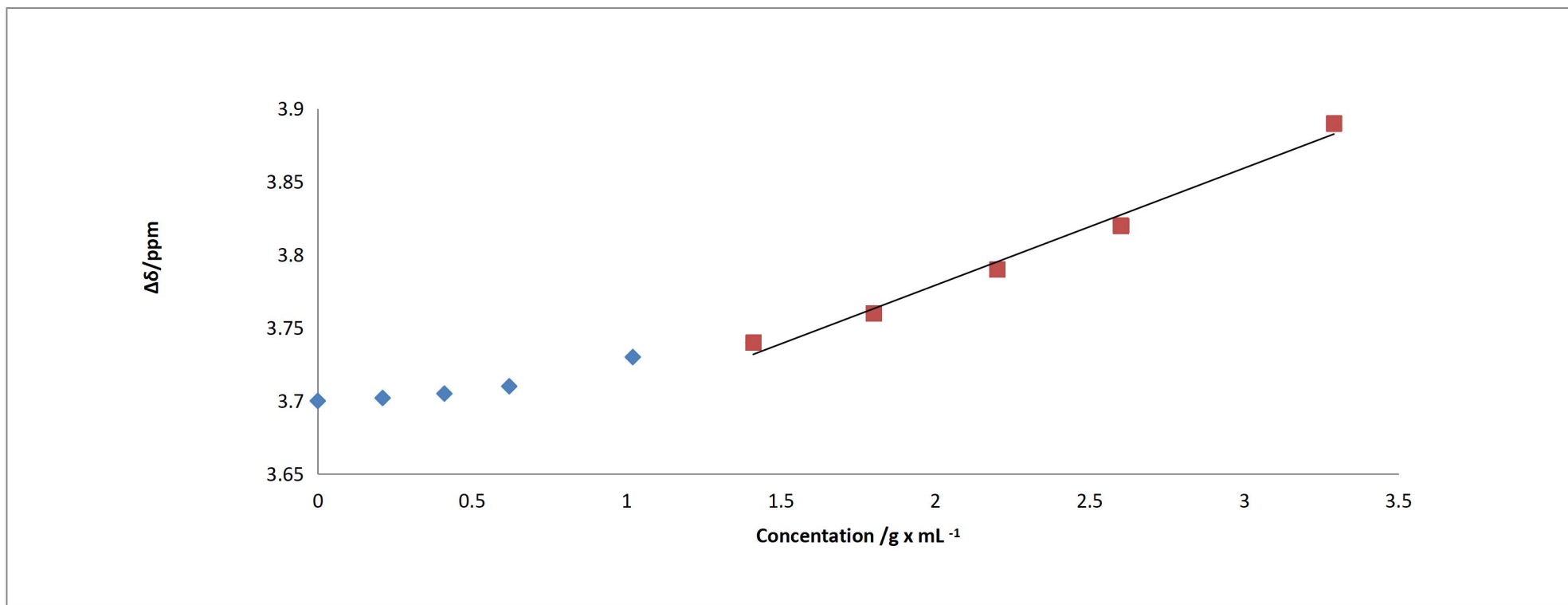
Σχήμα 4.12 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των sn-3 πρωτονίων της TAG στα 4,13 ppm για το δείγμα LC1 (0,684g/mL) .

Στο σχήμα 4.12 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των πρωτονίων sn-3 της TAG στα 4,13 ppm,σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7.Στην εικόνα 4.29 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων.Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,008x +4,118$  με συντελεστή  $R^2 =0,994$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1,409 έως 3,385 g/mL.



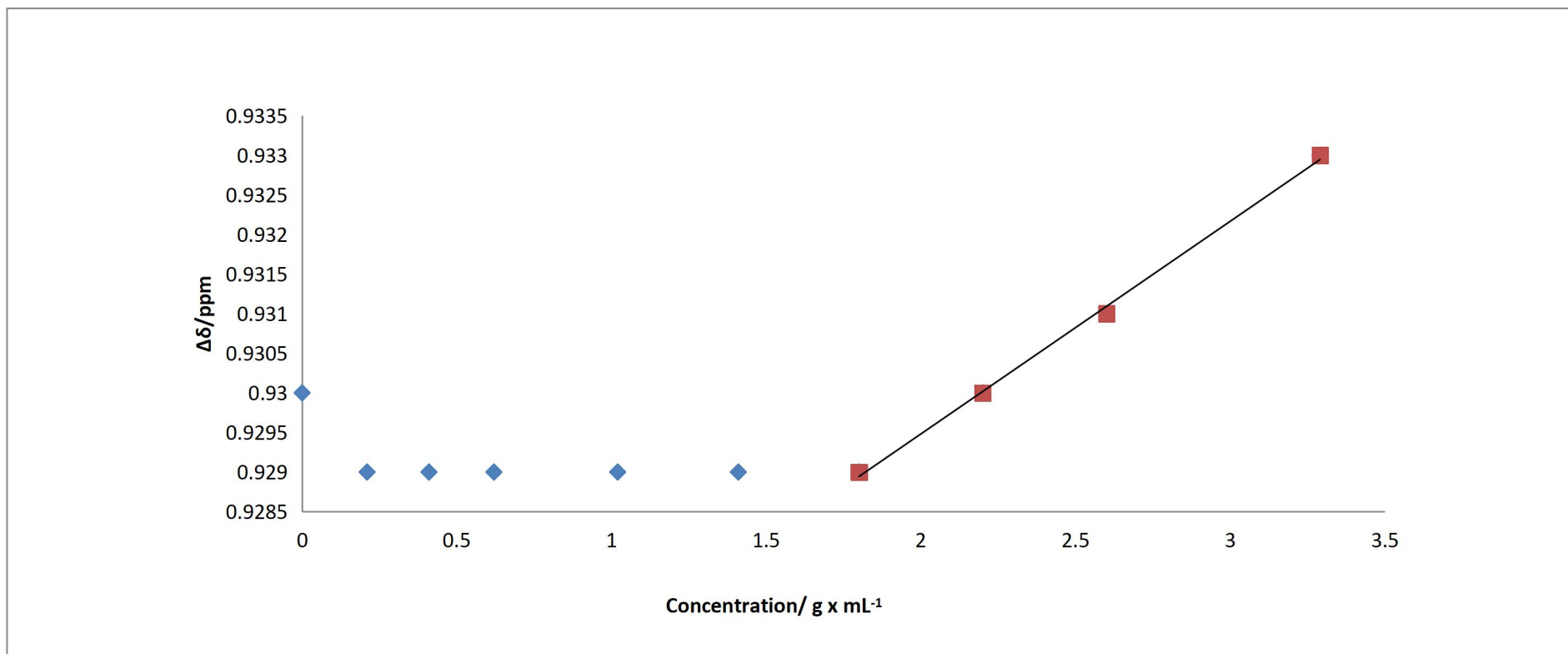
Σχήμα 4.13 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων  $-OOC-CH_2-CH_2$  των συνολικών λιπαρών οξέων (All FA) στα 2,29 ppm για το δείγμα LC1 (0,684g/mL).

Στο σχήμα 4.13 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των πρωτονίων  $-OOC-CH_2-CH_2$  των συνολικών λιπαρών οξέων (All FA) στα 2,29 ppm, σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7 .Επίσης στην εικόνα 4.26 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων .Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,0067x + 2,2782$  με συντελεστή  $R^2=0,995$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1,409 έως 3,385g/mL.



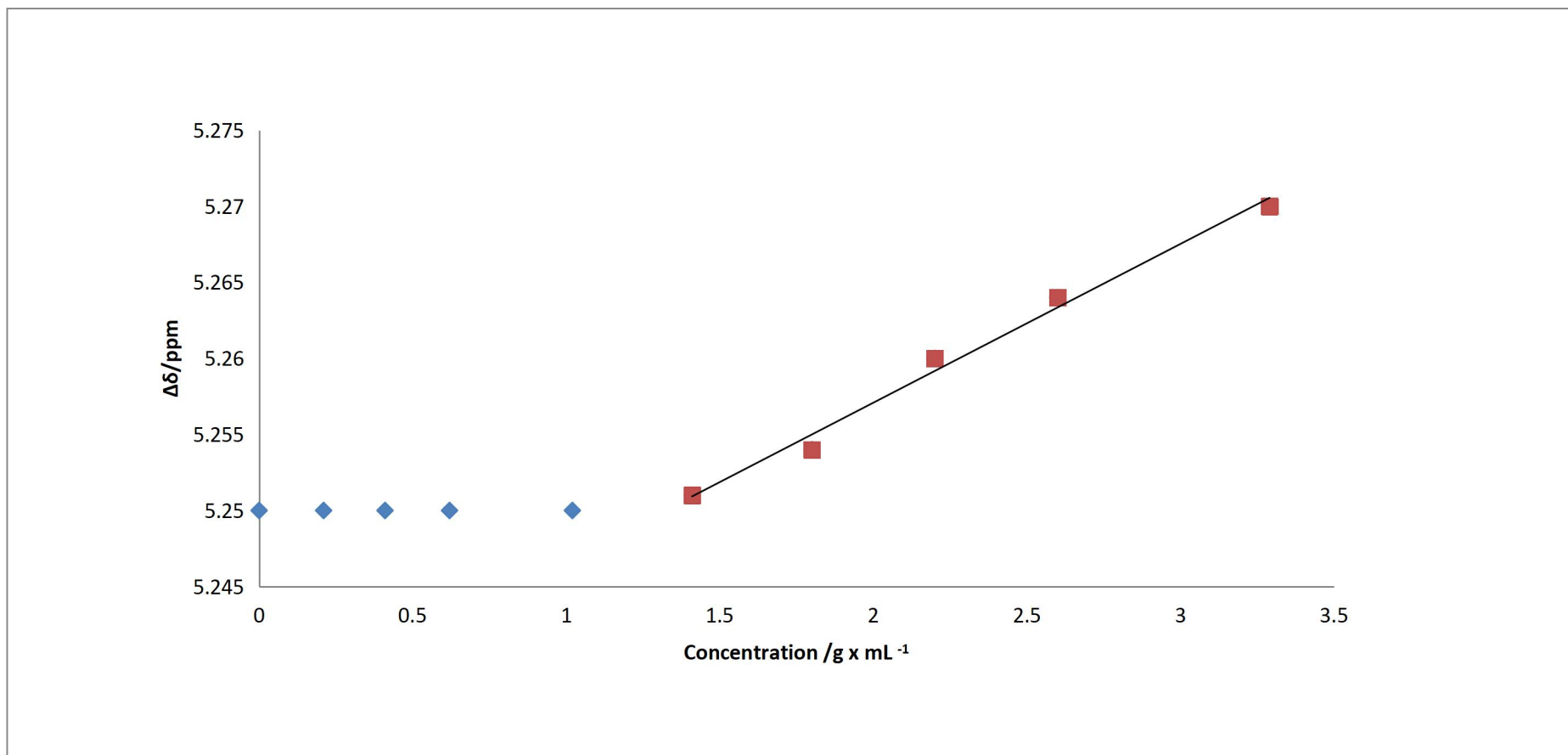
Σχήμα 4.14 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των sn-3 πρωτονίων της 1,2 DAG στα 3,70 ppm για το δείγμα LC1 (0,684g/mL) .

Στο σχήμα 4.14 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των sn-3 πρωτονίων της 1,2 DAG στα 3,70 ppm, σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7.Επίσης στην εικόνα 4.28 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων .Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,080x +3,618$  με συντελεστή  $R^2 =0,984$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1,409 έως 3,385 g/mL.



Σχήμα 4.15 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των συνολικών n-3 πρωτονίων των λιπαρών οξέων και των πρωτονίων του βουτυρικού οξέως (All n-3 FA και b.a) στα 0,94 ppm για το δείγμα LC1 (0,684g/mL) .

Στο σχήμα 4.15 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των συνολικών n-3 πρωτονίων των λιπαρών οξέων και των πρωτονίων του βουτυρικού οξέως (All n-3 FA και b.a) στα 0,93 ppm ,σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7 .Επίσης στην εικόνα 4.24 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων .Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,002x +0,924$  με συντελεστή  $R^2=0,998$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1,409 έως 3,385 g/mL.



Σχήμα 4.16 :Επίδραση διαδοχικής προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στη χημική μετατόπιση των 9-trans-11- cis CLA στα 5,25ppm για το δείγμα LC1 (0,684g/mL) .

Στο σχήμα 4.16 παρουσιάζεται σε μορφή γραφικής παράστασης ,η επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου LSR στην χημική μετατόπιση των 9-trans-11- cis CLA στα 5,25ppm ,σύμφωνα και με τον πίνακα 4.7.Επίσης στην εικόνα 4.32 παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα φάσματα πρωτονίων.Η εξίσωση είναι της μορφής  $y=0,010x +5,236$  με συντελεστή  $R^2=0,989$  για συγκέντρωση αντιδραστηρίου από 1,409 έως 3,385 g/mL.

Με βάση τα διαγράμματα προκύπτουν οι παρακάτω πίνακες (Πίνακες 4.8 και 4.9) στους οποίους βλέπουμε την επίδραση που έχει η προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης LSR ,στα λιπίδια.Πιο συγκεκριμένα όσο πιο μεγάλη είναι η κλίση της ευθείας τόσο μεγαλύτερη επίδραση έχουμε ,ενώ όσο πιο μικρή είναι η κλίση ,τόσο πιο μικρή είναι και η επίδραση του αντιδραστήριου μετατόπισης στο εκάστοτε λιπίδιο.Παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη επίδραση παρουσιάζεται στα πρωτόνια sn-3 OH-CH<sub>2</sub>-CH έχουν οι 1,2 DAG με κλίσεις 0,1 Δδ/mM και 0,08 Δδ /mM αντίστοιχα στο αραιό(LC1 , 0,207 g/mL) και το πυκνό(LD1 , 0,684 g/mL) διάλυμα .Επίσης βλέπουμε ότι στο πιο πυκνό διάλυμα η παράμετρος Δδ /mM άρα και η επίδραση του αντιδραστήριου μετατόπισης στα επιλεγμένα λιπίδια ,είναι μικρότερες σε σχέση με το αραιότερο(0,207 g/mL) διάλυμα. Επομένως η συγκέντρωση των λιπιδίων στο διάλυμα είναι επίσης ένας παράγοντας που επηρεάζει την επίδραση του αντιδραστήριου μετατόπισης.

Ωστόσο ,η «αποτελεσματική συγκέντρωση» έτσι όπως ορίστηκε παραπάνω ,είναι μικρότερη στο πυκνότερο διάλυμα έχοντας όμως μικρότερη επίδραση στην παράμετρο Δδ/mM. Συνεπώς ,οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το επιλεγμένο LSR ,αλληλεπιδρούν ανεξάρτητα από την παρουσία στο διάλυμα ενώσεων που δεν αλληλεπιδρούν. Αντίθετα ,μεγάλη συνολική συγκέντρωση ευνοεί μερικώς την αλληλεπίδραση των ενώσεων του πίνακα χ με το LSR .

**Νέα ένωση.** Για πρώτη φορά μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασης με το αντιδραστήριου LSRεντοπίζεται και προτείνεται μια νέα ένωση, η **2-βουτανόνη**της οποίας η φυτική σημασία είναι σημαντική καθώς, μεταξύ άλλων, συμμετέχει στο προφίλ των πτητικών εστερικού τύπου ενώσεων του γάλακτος που προσδίδουν μεταξύ άλλων και το άρωμα στο γάλα.

**Πίνακας 4.8:Επίδραση της συγκέντρωσης LSRσυναρτήσει της συγκέντρωσης για το δείγμα LD1**

Συκέντρωση λιπιδικού διαλύματος g / mL	Lipid	Δδ / mM	LSR in tube / mM <sup>1</sup>	"Effective" Ratio (mM LSR / (g / mL) <sup>2</sup>
0,207	1,2 DAG	0.100	0.62	2.99
	TAG (H-1)	0.013	1.02	4.93
	TAG (H-3)	0.019	1.02	4.93
	All FA	0.007	1.02	4.93
	n-3 & ba	0.003	1.02	4.93

	?			
--	---	--	--	--

1. Η απαιτούμενη συγκέντρωση LSR για την επίδρασή του στην επιλεγμένη ένωση

2. Η αναλογία συγκεντρώσεων για την επίδραση

**Πίνακας 4.9: Επίδραση της συγκέντρωσης LSR συναρτήσει της συγκέντρωσης για το δείγμα LC1**

g / mL	Lipid	Δδ / mM	LSR in tube / mM <sup>1</sup>	"Effective" Ratio (mM LSR / (g / mL) <sup>2</sup> )
0,684	1,2 DAG	0.080	1.41	2.06
	TAG (H-1)	0.008	1.41	2.63
	TAG (H-3)	0.012	1.80	2.06
	All FA	0.007	1.80	2.63
	n-3 & ba	0.003	1.80	2.63
	?	0.01	1.41	2.06

1. Η απαιτούμενη συγκέντρωση LSR για την επίδρασή του στην επιλεγμένη ένωση

2. Η αναλογία συγκεντρώσεων για την επίδραση

**4.2.2 Επίδραση LSR στον χρόνο αποδιέγερσης spin-πλέγματος (T<sub>1</sub>)**

Παρακάτω βλέπουμε τα φάσματα <sup>1</sup>H για το πείραμα t1ir1d που έχουν ληφθεί για χρόνους αναμονής d7 ίσους με 0,08s ,d7:0,6s ,d7:1s,d7:1,5s ,d7:2s, αντίστοιχα (από κάτω προς τα πάνω στα σχήματα )

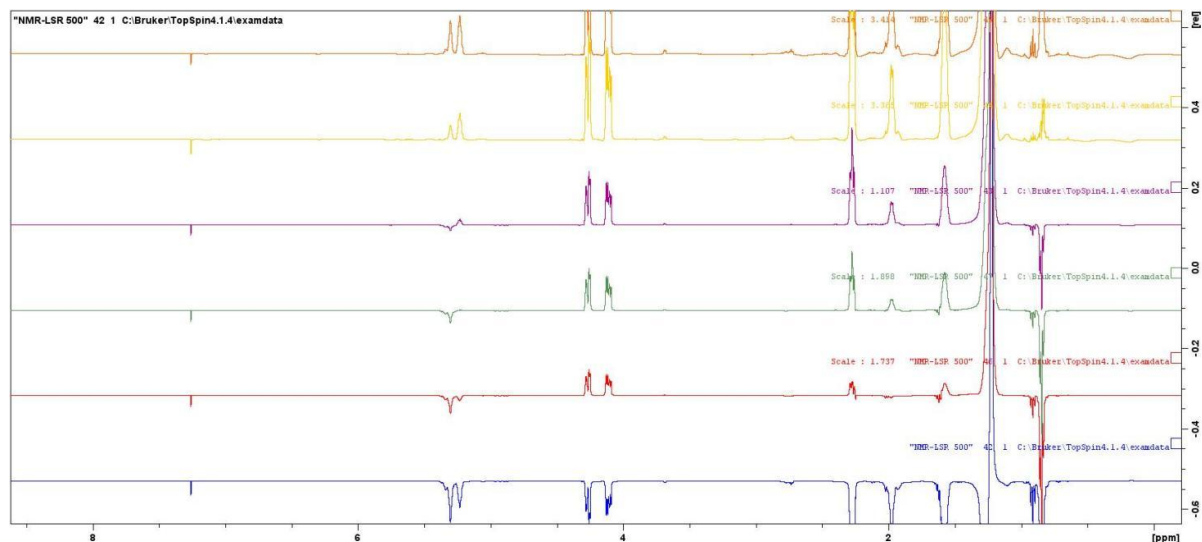
Στον πίνακα 4.10 βλέπουμε την επίδραση του LSR στις επιλεγμένες ενώσεις.

Με βάση τα παραπάνω, παρατηρούμε τα εξής :

Τα trans UFA και FA(0,85ppm) έχουν χρόνους d7 αναστροφής της μαγνήτισης μεταξύ 1-1,5 s , ενώ τα Glycerol in TAG

(4,11 ppm ) ,All FA(1,58 ppm) και Cholesterol έχουν d7 αναστροφής της μαγνήτισης μεταξύ 0,08 και 0,6 s.





Εικόνα 4.3:Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το πείραμα t1ir1d που έχουν ληφθεί για χρόνους αναμονής d7 ίσους με 0,08s ,d7:0,6s ,d7:1s,d7:1,5s ,d7:2s, αντίστοιχα (από κάτω προς τα πάνω )

Με βάση τη θεωρία, (Jacobsen, 2007) η ένταση του σήματος μιας κορυφής είναι ίση με

$$I(\tau) = I_{inf}(1 - 2e^{-\tau/T_1})$$

όπου  $\tau$ , ο χρόνος d7,  $I_{inf}$  η ένταση του σήματος σε μεγάλες τιμές  $\tau$  όπου έχουμε πλήρη αποδιέγερση του συγκεκριμένου πυρήνα και η μαγνήτιση  $M_z$  είναι η  $M_0$ ,

Έτσι για  $\tau=\tau_0$ , και  $I(\tau_0)= 0$  θα είναι  $T_1=\tau_0/\ln 2 = \tau_0/0,693$

Έτσι λοιπόν, ο χρόνος  $T_1$  θα είναι ο χρόνος «μηδενικού σημείου» διαιρούμενος με την παράμετρο  $\ln(2)$ .

Στον παραπάνω πίνακα (πίνακας 4.10) ,παρουσιάζονται οι τιμές  $T_1$  όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο nullpoint (μηδενικού σημείου) πριν και μετά την προσθήκη αντιδραστηρίου LSR.

Στον ίδιο πίνακα 4.10 δίνεται και η παράμετρος d7 με βάση την οποία γίνεται ο υπολογισμός του  $T_1$  .

Σε όποιες τιμές παρουσιάζεται εύρος στο σημείο T<sub>1</sub>, αφορά προσεγγιστική τιμή του χρόνου T<sub>1</sub> λαμβάνοντας υπόψη τον χρόνο «εναλλαγής» πρόσημου των πρωτονίων της ένωσης που αναφέρεται κατά τη λήψη του φάσματος με το πείραμα t1ρ1d.

**Πίνακας 4.10: Επίδραση του αντιδραστήριου μετατόπισης στο χρόνο T<sub>1</sub>**

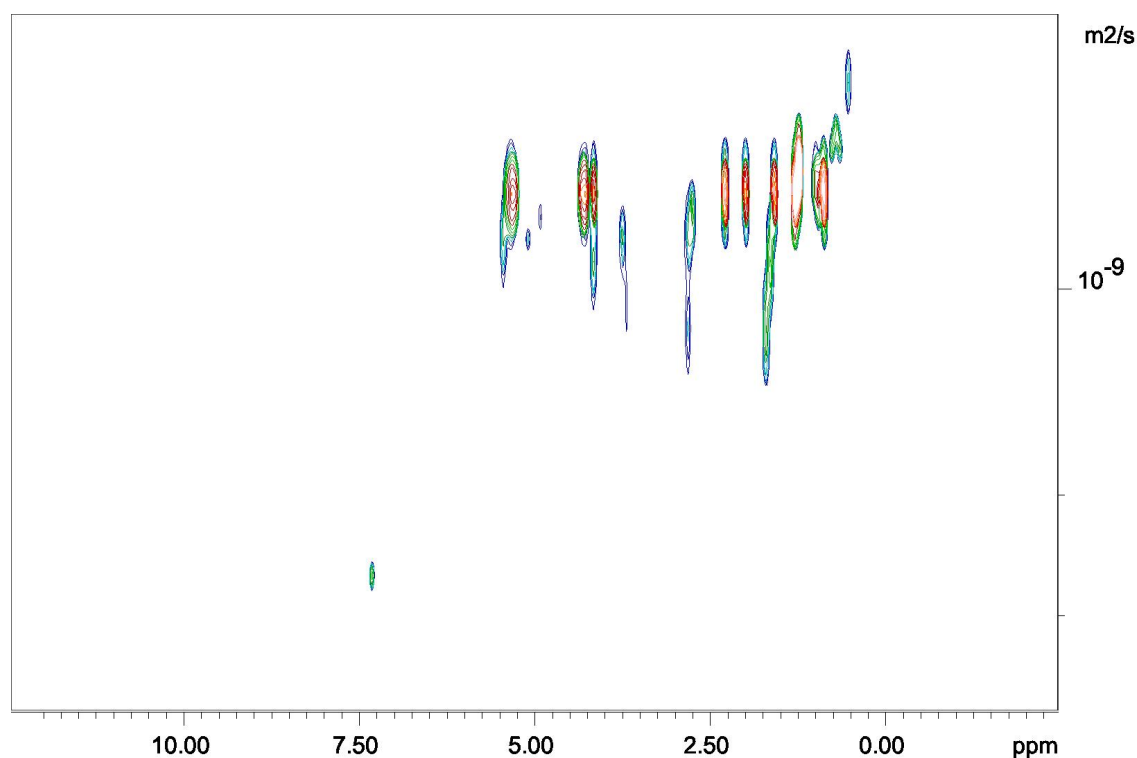
<sup>1</sup> H	Ένωση	δ/ppm	T <sub>1</sub> /s Χωρίς αντιδραστήριο μετατόπισης (LSR)	T <sub>1</sub> /sΜε αντιδραστήριο μετατόπισης (LSR)
H-10	(9- <i>cis</i> , 12- <i>trans</i> ) 18:2 CLA	5,90	1,16	1,4
H-9	Caproic FA	5,76	2,9	>2,9
	trans UFA	5,34	1,4-2,2	1,4-2,2
	cis UFA	5,30	1,16	1,4-2,2
	Glycerol in TAG	4,31	0,9	0,9
	Glycerol in TAG	4,27	0,1	0,1
	1,2 DAG	3,7	0,9	0,9
	linolenic FA	2,74	1,16	1,16
	DHA	2,40	0,9	0,9
	All FA	2,28	0,9	0,9
	cis UFA	1,98	0,9	0,9
	All FA	1,62	2,2	2,2
	butyric	0,91	2,2	2,2

Με βάση τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε τα εξής:

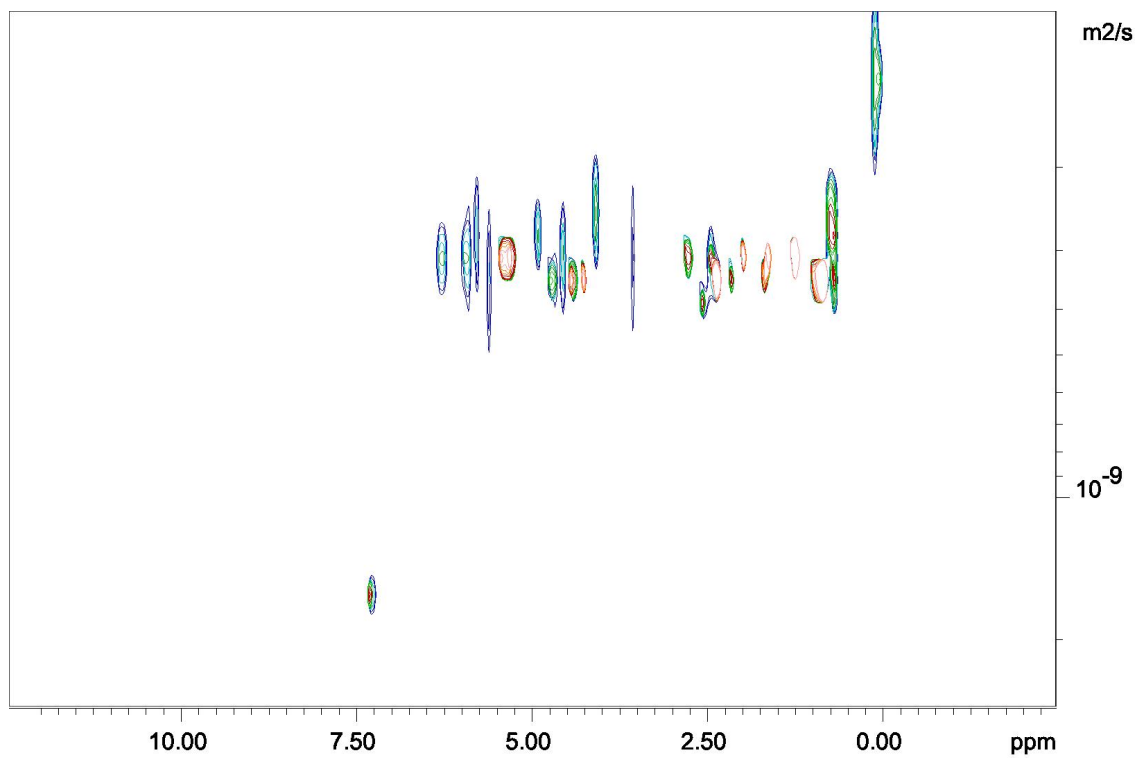
Για το (9-*cis*, 12- *trans*) 18:2 CLA παρουσιάζεται μικρή αύξηση στον  $T_1$  από 1,16 σε 1,4. Στο λινολενικό διατηρείται σταθερός ο χρόνος χαλάρωσης ,μετά την προσθήκη LSR ,που σημαίνει ότι η ένωση δεν επηρεάζεται σημαντικά από το αντιδραστήριο μετατόπισης. Στην γλυκερόλη των TAG ,δεν παρουσιάζεται επίσης κάποια διαφοροποίηση στο  $T_1$  .Το καπρολεϊκό οξύ παρουσιάζει επίσης αύξηση .Για τα *cis* UFA βλέπουμε επίσης αύξηση του  $T_1$

Επομένως η προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης LSR επηρεάζει τον χρόνο χαλάρωσης  $T_1$  των (9-*cis*, 12- *trans*) 18:2 CLA , των *cis* UFA και του καπρολεϊκού ,δείχνοντας αλληλεπίδραση με το αντιδραστήριο LSR.

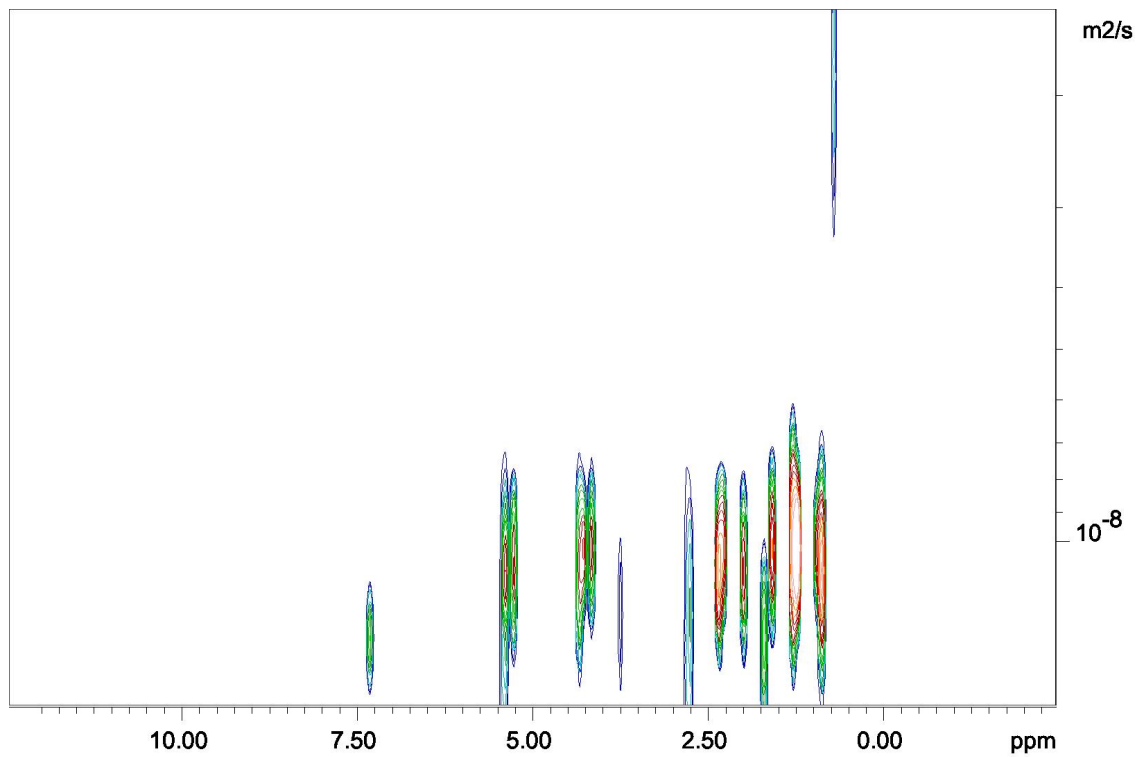
#### 4.2.3Μελέτη της επίδρασης του LSR στον συντελεστή διάχυσης ,D



Εικόνα 4.5:Φάσμα DOSY του δείγματος LC1



Εικόνα 4.6: Φάσμα DOSY του δείγματος LM2211



Εικόνα 4.7 Φάσμα DOSY του δείγματος LD

Με βάση τα φάσματα DOSY υπολογίστηκαν οι συντελεστές διάχυσης για τις επιλεγμένες ενώσεις των ΛΟ. Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.11.

**Πίνακας 4.11: Συντελεστής διάχυσης για τα μελετούμενα διαλύματα**

Ένωση	Είδος πρωτονίου	δ (ppm)	D ( $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )		
			LD1	LC1	LMLRS
<i>trans</i> -FA		5,39	12,4	0,73	
<i>cis</i> -FA		5,36	11,0	0,72	0,32
TAG	<i>sn</i> -2	5,25	9,8	0,73	0,32
TAG	<i>sn</i> -1,3	4,32	11,0	0,72	0,33
	<i>sn</i> -1,3	4,29	10,2		
	<i>sn</i> -1,3	4,17	10,6	0,74	0,24
	<i>sn</i> -1,3	4,15	10,2		
1,2 DAG	<i>sn</i> -3	3,79	12,6	1,10	0,32
All - FA	-(CH <sub>2</sub> )-	0,88	10,2	0,72	0,33
Cholesterol		0,69	19,1	0,51	0,35
CHCl <sub>3</sub>		7,28	13,6	3,7	2,6

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 1 υπολογίστηκε ο λόγος των συντελεστών διάχυσης κάθε δείγματος. Ο παράγοντας R που προτείνεται και αφορά τον λόγο μεταξύ των συντελεστών διάχυσης δυο δειγμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.12

**Πίνακας 4.12: Παράγοντας R για τη μεταβολή του συντελεστή διάχυσης για τα μελετούμενα διαλύματα**

Ένωση	Είδος πρωτονίου	$\delta$ (ppm)	R*	
			R (LD/LC)	R (LM/LC)
<i>trans</i> -FA		5,39	16,9	
<i>cis</i> -FA		5,36	15,2	2,3
TAG	<i>sn</i> -2	5,25		2,3
TAG	<i>sn</i> -1,3	4,32		2,2
	<i>sn</i> -1,3	4,29		
	<i>sn</i> -1,3	4,17		3,1
	<i>sn</i> -1,3	4,15		
1,2 DAG	<i>sn</i> -3	3,79		3,4
All - FA	-(CH <sub>2</sub> )-	0,88	14,1	2,2
Cholesterol		0,69	37	1,5
CHCl <sub>3</sub>		7,28	3,7	1,4

\*Ratio of D

#### **Επίδραση της συγκέντρωσης.**

Συγκρίνοντας τις τιμές των συντελεστών διάχυσης τα δύο διαλύματα υψηλής και χαμηλότερης συγκέντρωσης λιπαρών οξέων, παρατηρείται ελάττωση του συντελεστή διάχυσης στο πυκνότερο διάλυμα. Αυτό αναμένεται καθώς ο συντελεστής διάχυσης που υπολογίζεται με την φασματοσκοπία DOSY, εξαρτάται από το ιξώδες του διαλύματος, όπως αναφέρεται και στη σελ 30.

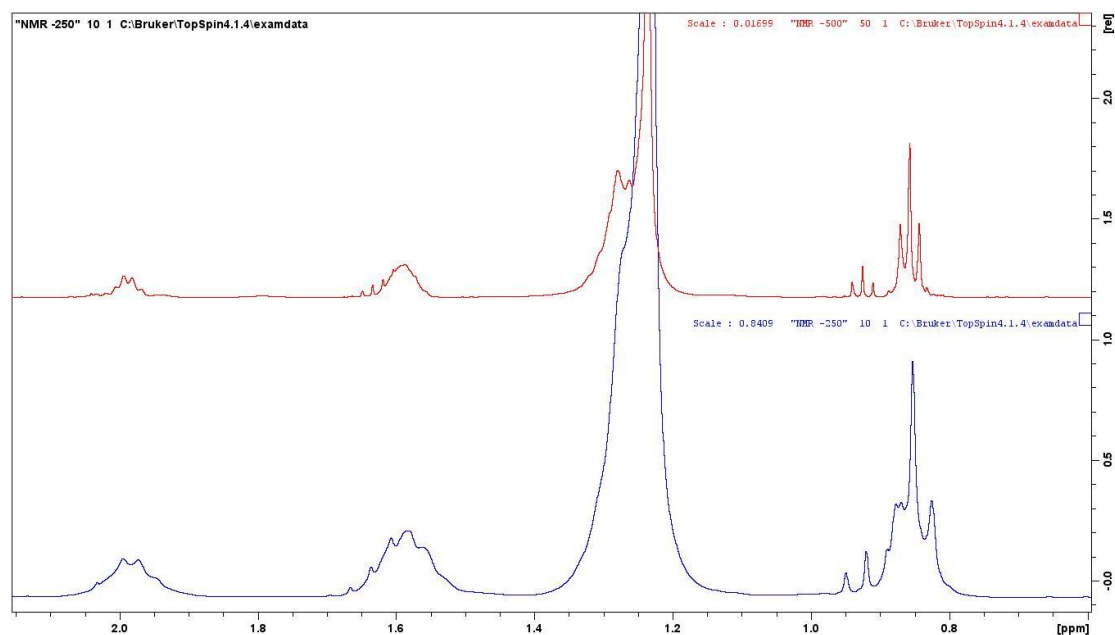
Ωστόσο παρατηρείται ότι ο βαθμός ελάττωσης είναι μεγαλύτερος στα λιπαρά οξέα συγκριτικά με τον βαθμό ελάττωσης στο διαλύτη και μάλιστα είναι περίπου 4-5 φορές μεγαλύτερος για τα λιπαρά οξέα. Φαινόμενα τυχόν συσσωμάτωσης των λιπαρών οξέων μπορεί να συνεισφέρουν επιπρόσθετα σε αυτή τη μεταβολή.

### **Επίδραση της προσθήκης LSR**

Η προσθήκη του αντιδραστηρίου LSR έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του συντελεστή διάχυσης,  $D$ . Στο διαλύτη ( $\text{CHCl}_3$ ) η σταθερά διάχυσης μειώνεται κατά 1,4 φορές ( $R= 1,4$ ). Ωστόσο, στα λιπαρά οξέα του δείγματος, η μείωση είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι στο διαλύτη. Επιπλέον, η μείωση στην 1,2 DAG είναι μεγαλύτερη από εκείνη των υπόλοιπων TAG. Η παρουσία του LSR στο διάλυμα αλλάζει όπως αναμένεται το συντελεστή διάχυσης του διαλύτη καθώς επιδρά στο ιξώδες του διαλύματος. Ωστόσο, η συμπλοκοποίηση του αντιδραστηρίου με τις ελεύθερες υδροξυλικές (ή τυχόν καρβοξυλικές) ομάδες των λιπαρών οξέων έχει ως επιπρόσθετο αποτέλεσμα την ελάττωση κατά τον παράγοντα  $R$  που δίνεται στον Πίνακα 12.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### 5.Επίδραση έντασης μαγνητικού πεδίου στην διάκριση των Λιπαρών Οξέων (Λ.Ο.)(Πεδίο 250 και 500 MHz)

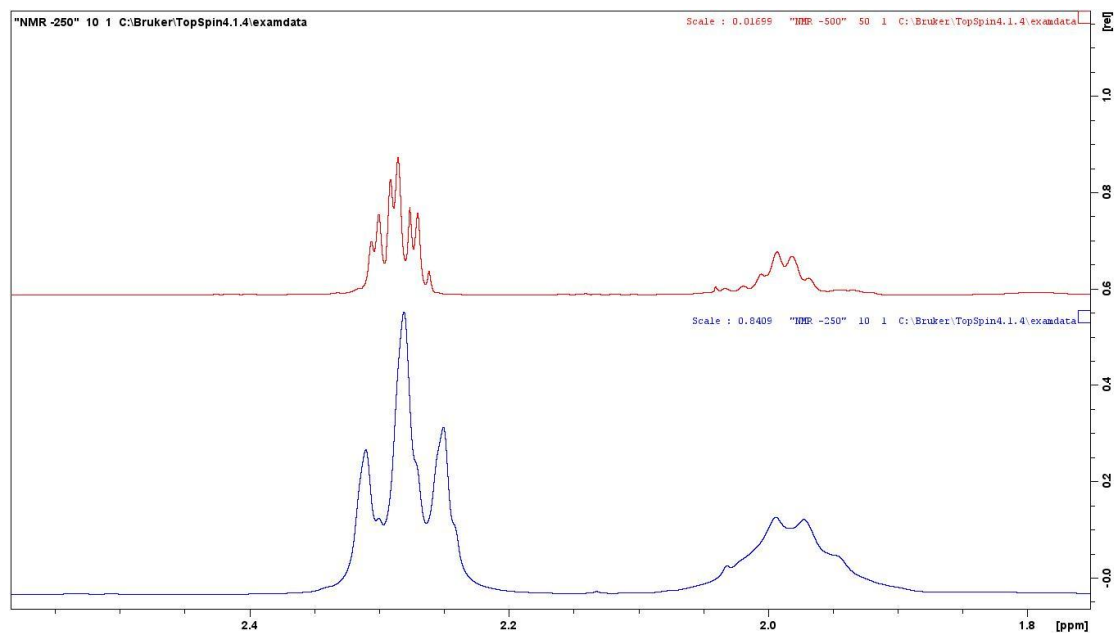


Εικόνα 5.1 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2211 πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 0,8-2,1 ppm

Στην εικόνα 5.1 παρουσιάζεται η επίδραση της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στο φασματικό προφίλ των λιπιδικών ενώσεων.

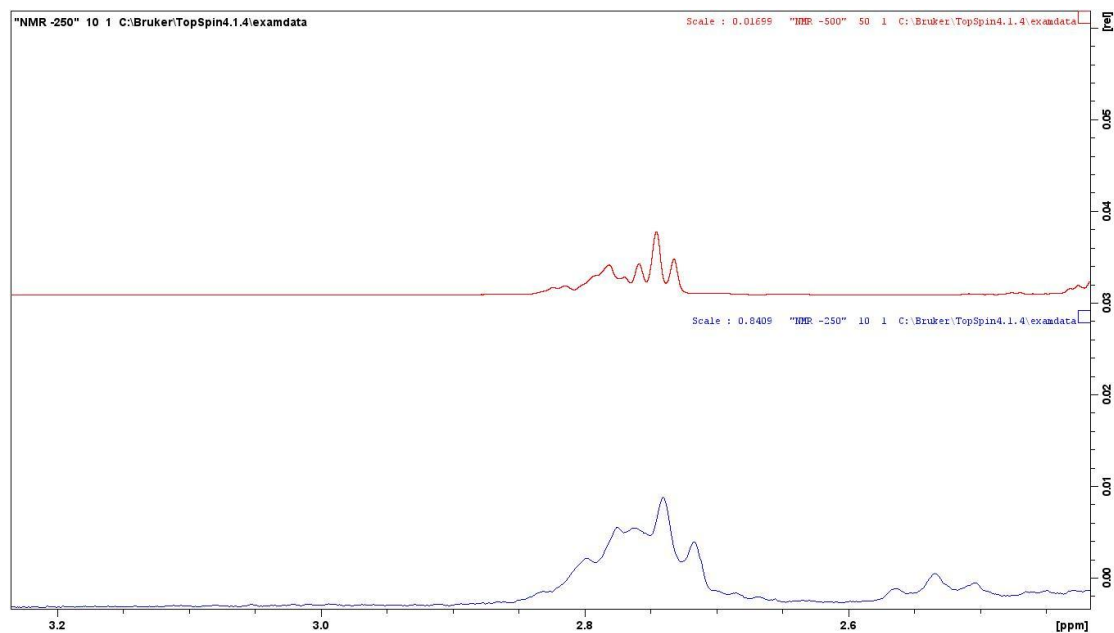
Όπως φαίνεται στην εικόνα ,στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο (250 MHz ,κάτω μέρος της εικόνας) η κορυφή που αντιστοιχεί στις (-CH<sub>3</sub>) ομάδες των ω-3 και βουτυρικού οξέος στα 0,98 ppm αλληλεπικαλύπτεται με την κορυφή που αντιστοιχεί στις (-CH<sub>3</sub>) ομάδες των λιπιδίων στα 0,89 ppm και καθίσταται δύσκολη η διάκρισή τους και ο προσδιορισμός τους. Αντίστοιχα η κορυφή που αντιστοιχεί στα -CH<sub>2</sub>- σε β-θέση ως προς την καρβonyλομάδα ,αλληλεπικαλύπτονται ενώ στο πεδίο των 500 MHz(πάνω μέρος της εικόνας) υπάρχει σαφώς καλύτερος διαχωρισμός κορυφών. Αυτό παρουσιάζεται και σε μικρότερη κλίμακα ,στην εικόνα 5.2





**Εικόνα 5.2 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2211 πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 1,8-2,4 ppm**

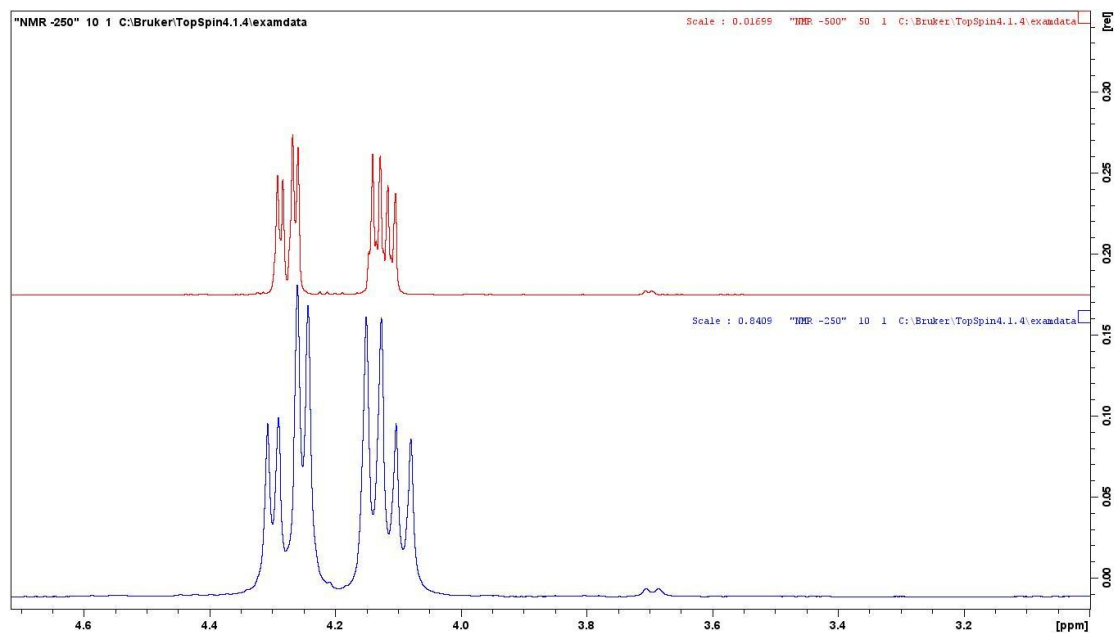
Στην εικόνα 5.2 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 2,3 ppm που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-$  πρωτόνια που είναι σε  $\alpha$ - θέση ως προς το εστερικό καρβοξύλιο. Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού, όπως αναμένεται άλλωστε. Το ίδιο ισχύει και για την κορυφή στα  $\sim 2,1$  ppm που αντιστοιχεί στα *cis*- UFA πρωτόνια και στα πρωτόνια του βουτυρικού οξέος.



**Εικόνα 5.3 :** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2211 πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 2,4-3,2 ppm

Στην εικόνα 5.3 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 2,74 ppm, που αντιστοιχούν στα τέσσερα ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινολενικού οξέος στις θέσεις 5 και 8, στα 2,77 ppm που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινελαϊκού οξέος στη θέση 8, στα 2,77 ppm καθώς και στα 2,81 ppm που αντιστοιχούν στα έξι ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια (bis-allylic) του DHA (docosahexaenoic acid) 22:6 ( $\omega$ -3).

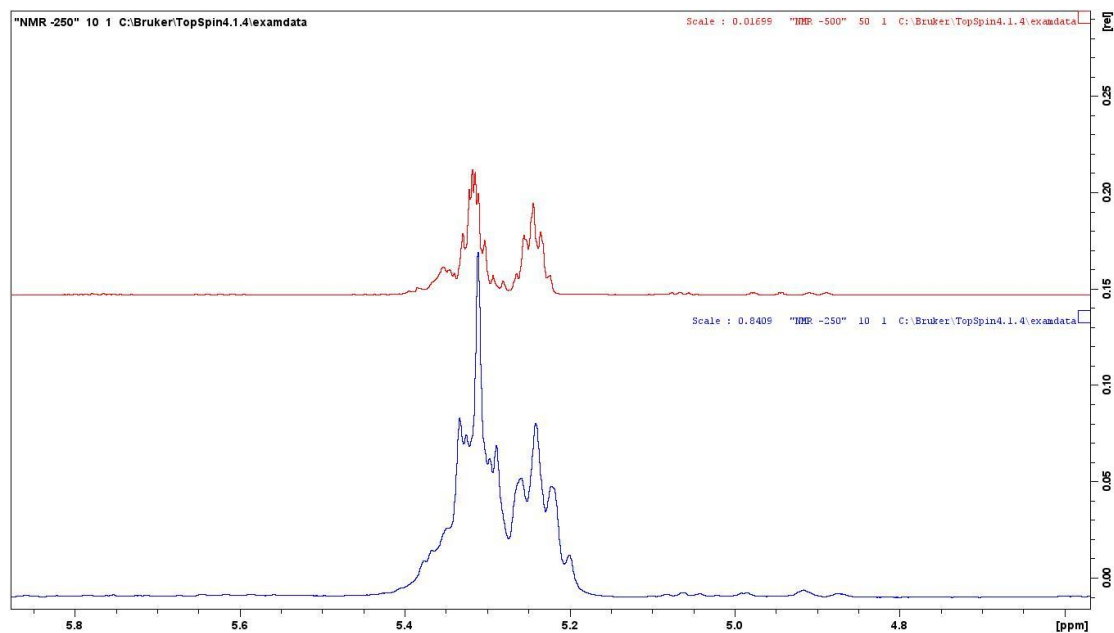
Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού, όπως αναμένεται άλλωστε.



**Εικόνα 5.4 :** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2211 πριν από την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 3,2-4,6 ppm

Στην εικόνα 5.4 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 4,27 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια στη θέση 1 των TAG, και των πρωτονίων στα 4,11 ppm που αντιστοιχούν δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια στη θέση 3 των TAG.

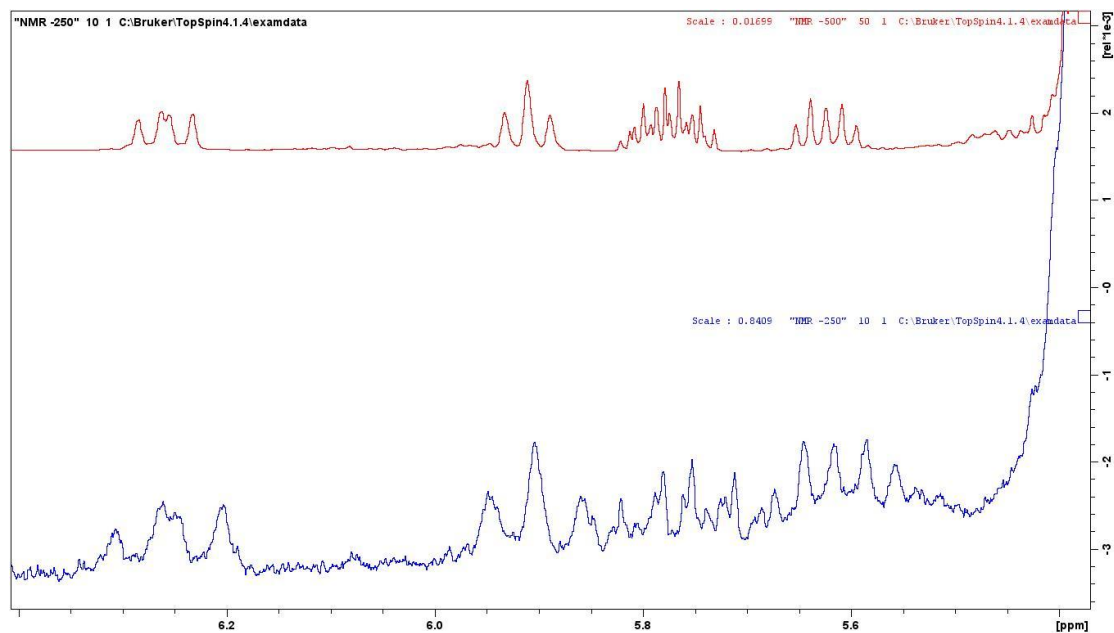
Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των H1 και H3 πρωτονίων των TAG.



Εικόνα 5.5 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2211 πριν από την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 4,5-5,8 ppm

Στην εικόνα 5.5 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 5,24 ppm, που αντιστοιχούν στο (–CH–) πρωτόνιο στη θέση 2 των TAG, των πρωτονίων στα 5,25 ppm που αντιστοιχούν στο (–CH–) πρωτόνιο του (9-*trans*, 11-*cis*) 18:2 CLA σε α- θέση ως προς την καρβοξυλομάδα, των πρωτονίων στα 5,31 ppm, που αντιστοιχούν στα (=CH–) ολεφινικά πρωτόνια των *cis*- UFA και των πρωτονίων στα 5,34 ppm, που αντιστοιχούν στα (=CH–) ολεφινικά πρωτόνια των *trans*- UFA.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των H2 πρωτονίων των TAG ωστόσο δεν υπάρχει εύκολη διάκριση των *cis*- και *trans*-UFA.



**Εικόνα 5.6 :** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2211 πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 5,6-6,3 ppm

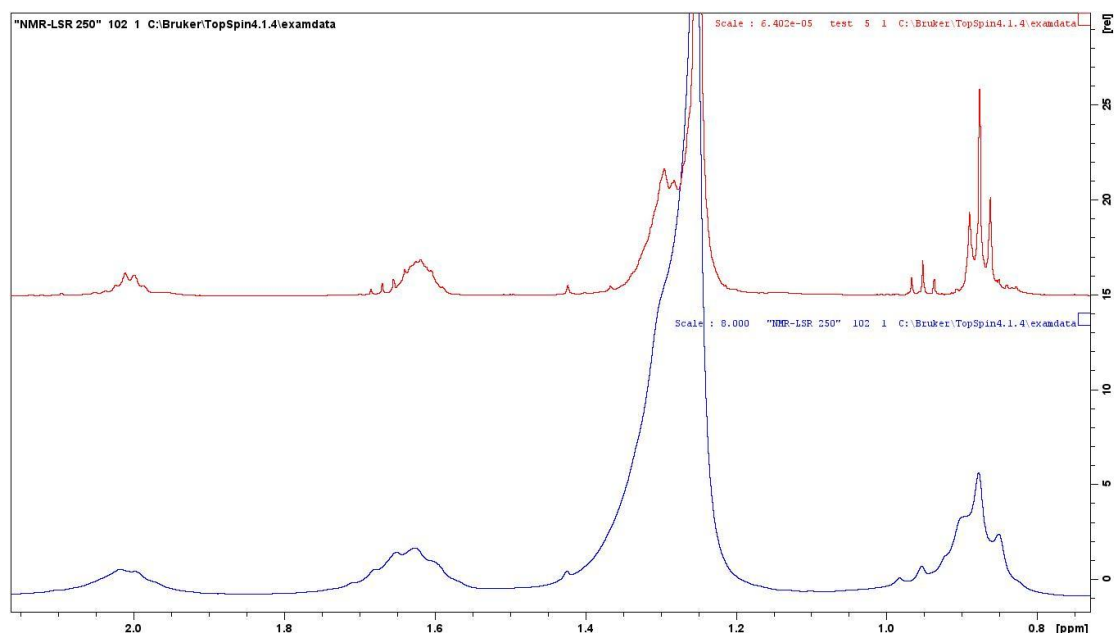
Στην εικόνα 5.6 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 6.25 ppm, που αντιστοιχούν στο H11 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.90 ppm που αντιστοιχούν H10 ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.76 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο H8 πρωτόνια ( $=\text{CH}_2$ ) του καπρολεϊκού οξέος και στα 5.61 ppm που αντιστοιχούν στο H12 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, υπάρχει δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των H11 και H12 πρωτονίων του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, καθώς και του H8 του καπρολεϊκού, ενδεχομένως με διόρθωση γραμμής βάσης του φάσματος και ενδεχομένως εργαλείων ανάλυσης μερικώς επικαλυπτόμενων κορυφών. Πιο συγκεκριμένα με το H12 του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA.

Συμπερασματικά, σε μικρής έντασης μαγνητικό πεδίο δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός των  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 πρωτονίων στις περιοχές των 0,9 ppm και 2,7 ppm. Επίσης, τα *cis*- και *trans*- UFA στην περιοχή των 5,4 ppm, αλληλεπικαλύπτονται.

Ωστόσο, μπορεί να γίνει διάκριση τόσο των H1, H2 και H3 πρωτονίων των TAG καθώς και μελέτη των H11 και H12 πρωτονίων του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, και του H8 του καπρολεϊκού. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η διόρθωση γραμμής βάσης του φάσματος και η χρήση εργαλείων ανάλυσης μερικώς επικαλυπτόμενων κορυφών (deconvolution) μπορεί να συνεισφέρει στην παραπάνω διάκριση.

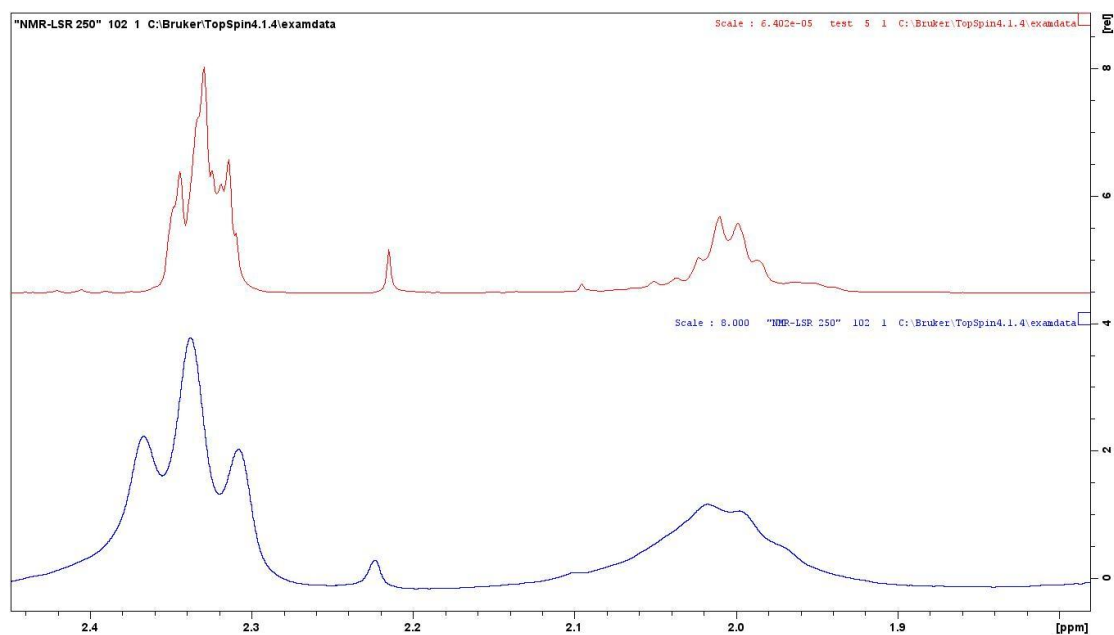
## 5.1. Επίδραση της προσθήκης αντιδραστηρίου μετατόπισης



Εικόνα 5.7: Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα <sup>1</sup>H NMR για το δείγμα LM-2510 μετά από την προσθήκη 10  $\mu$ L (1,4mM LSR in tube) του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 0,8-2,1 ppm

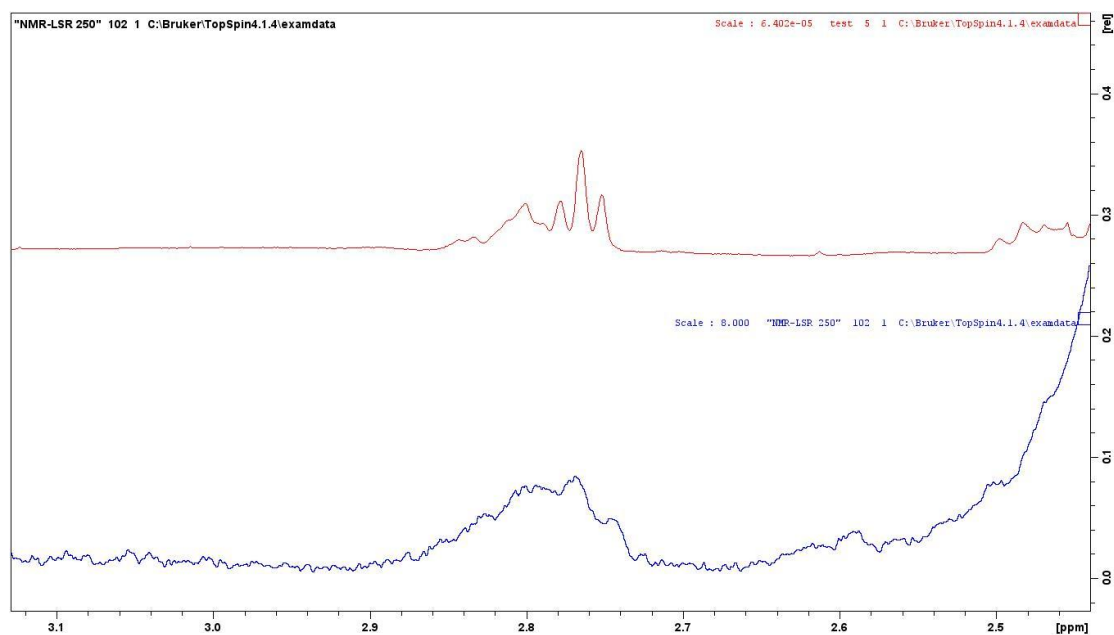
Στην εικόνα 5.7 παρουσιάζεται η επίδραση της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στο φασματικό προφίλ των λιπιδικών ενώσεων παρουσία 1,4 mM LSR.

Όπως φαίνεται στην εικόνα ,στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο (250 MHz ,κάτω μέρος της εικόνας) η προσθήκη αντιδραστηρίου σε αυτή την συγκέντρωση, δεν βοηθά στην διάκριση των σημάτων συντονισμού. Η κορυφή που αντιστοιχεί στις (-CH<sub>3</sub>) ομάδες των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων και του βουτυρικού οξέος στα 0,98 ppm αλληλεπικαλύπτεται με την κορυφή που αντιστοιχεί στις (-CH<sub>3</sub>) ομάδες των νουκλειικών λιπιδίων στα 0,89 ppm ,παρόμοια με το σχήμα 5.1 .Ωστόσο στο όργανο των 500MHz υπάρχει διαχωρισμός και διάκριση αντίστοιχων κορυφών συντονισμού .



**Εικόνα 5.8:** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 μετά από την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM LSR in tube) του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 1,8-2,4 ppm

Στην εικόνα 5.8 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 2,3 ppm που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-$  πρωτόνια που είναι σε  $\alpha$ - θέση ως το εστερικό καρβοξύλιο. Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, με την προσθήκη αντιδραστηρίου συνεχίζει να υπάρχει αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού. Το ίδιο ισχύει και για την κορυφή στα  $\sim 2,1$  ppm που αντιστοιχεί στα *cis*- UFA πρωτόνια και στα πρωτόνια του βουτυρικού οξέος. Επιπλέον στην περιοχή αυτή παρουσιάζεται διεύρυνση των κορυφών.

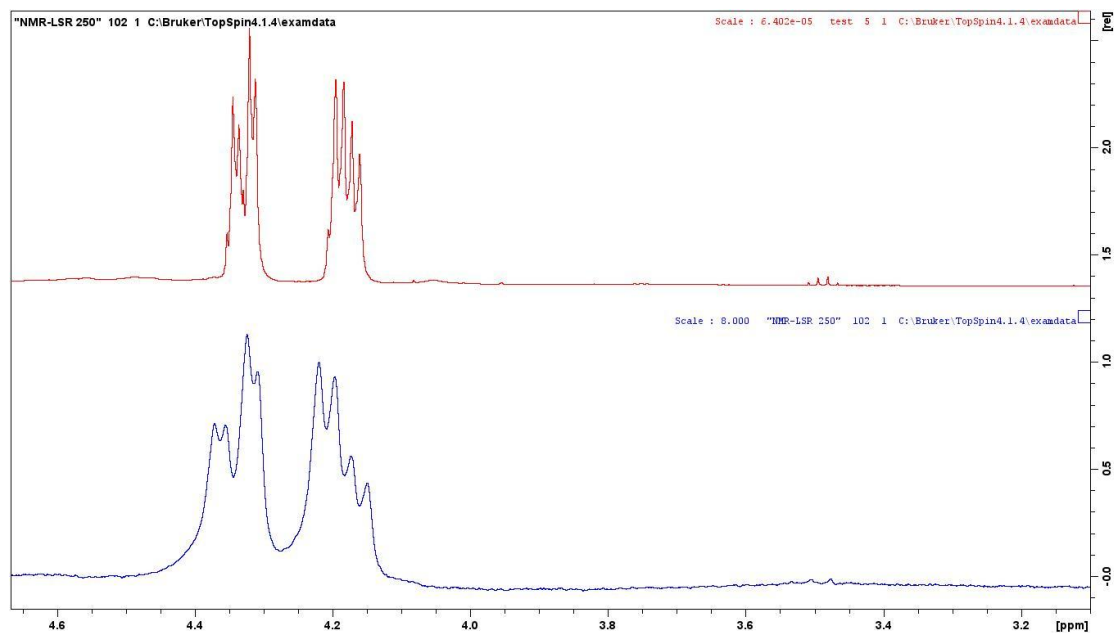


**Εικόνα 5.9 :** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 μετά από την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM LSR in tube) του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 2,4-3,2 ppm

Στην εικόνα 5.9 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 2,74 ppm, που αντιστοιχούν στα τέσσερα ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινολενικού οξέος στις θέσεις 5 και 8, στα 2,77 ppm που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινελαϊκού οξέος στη θέση 8, στα 2,77 ppm καθώς και στα 2,81 ppm που αντιστοιχούν στα έξι ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια (bis-allylic) του DHA (docosahexaenoic acid) 22:6 ( $\omega$ -3).

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, η προσθήκη αντιδραστηρίου LSR στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, δεν συνεισφέρει σε πιθανό διαχωρισμό καθώς συνεχίζει να υπάρχει η αλληλεπικάλυψη των κορυφών συντονισμού κι επιπλέον υπάρχει και διεύρυνση των σημάτων συντονισμού των εν λόγω πρωτονίων. Ωστόσο, στο όργανο των 500 MHz υπάρχει διάκρισή τους.

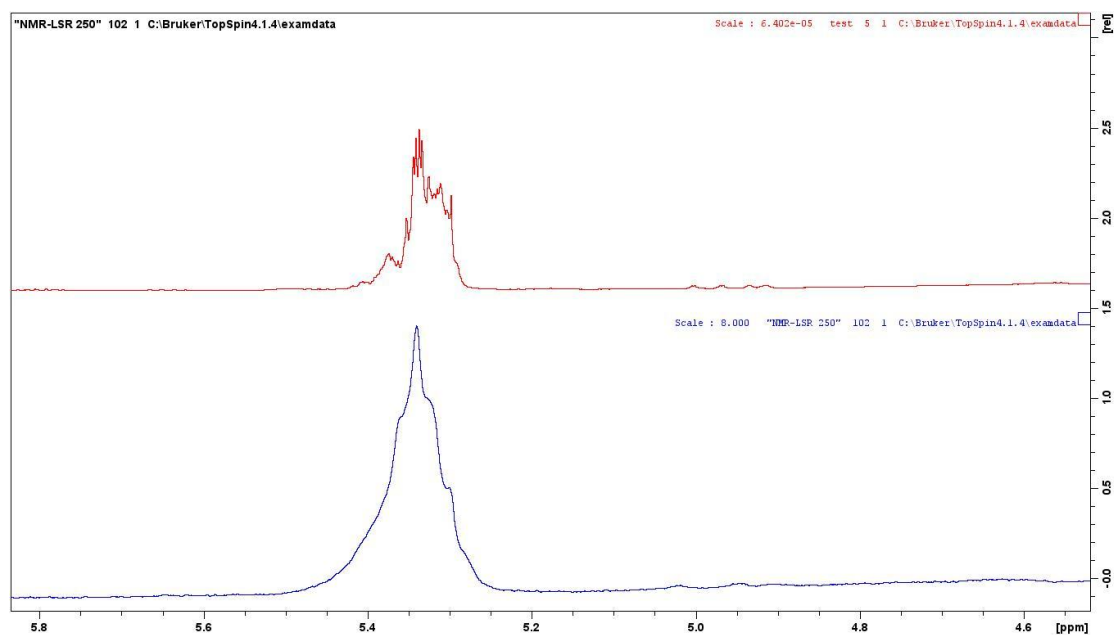




**Εικόνα 5.10 :** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 μετά από την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM LSR in tube) του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 3,2-4,6 ppm

Στην εικόνα 5.10 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 4.27 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια στη θέση 1 των TAG, και των πρωτονίων στα 4,11 ppm που αντιστοιχούν δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια στη θέση 3 των TAG.

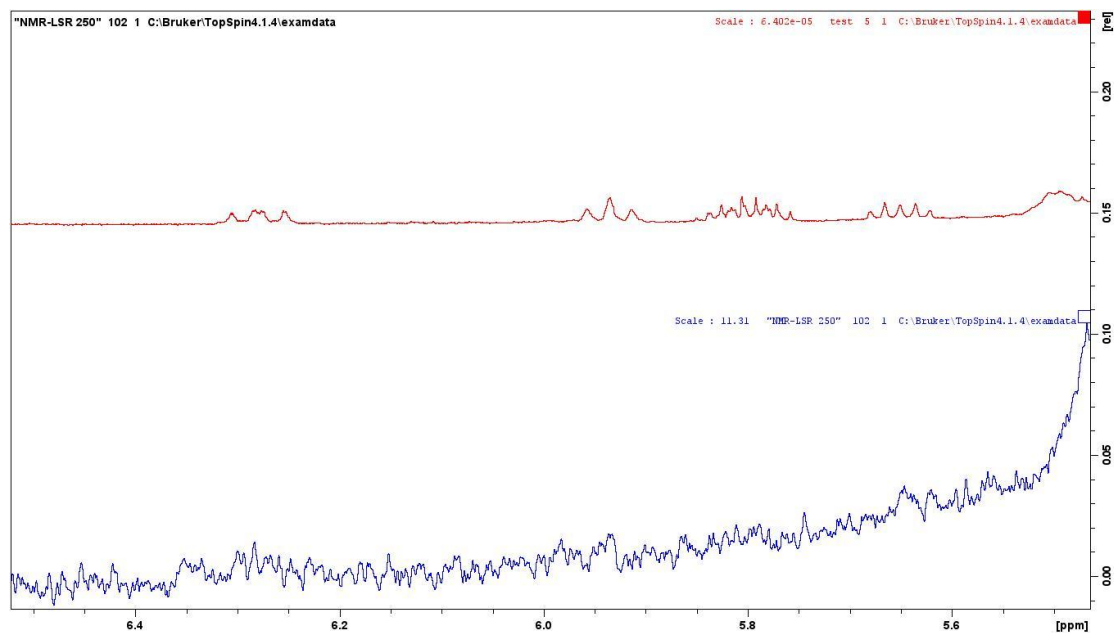
Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο, παρουσία αντιδραστηρίου, με την προσθήκη αντιδραστηρίου LSR συνεχίζει να υπάρχει η δυνατότητα διάκρισής τους – με διεύρυνση ωστόσο των κορυφών συντονισμού των εν λόγω πρωτονίων- δείχνοντας τη δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των H1 και H3 πρωτονίων των TAG.



Εικόνα 5.11 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 μετά από την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM LSR in tube) του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 4,5-5,8 ppm

Στην εικόνα 5.11 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 5,24 ppm, που αντιστοιχούν στο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο στη θέση 2 των TAG, αλληλεπικαλυπτόμενου με το σήμα συντονισμού του πρωτονίου H-9 του (9-*trans*, 11-*cis*) 18:2 CLA στα 5,25 ppm, των πρωτονίων στα 5.31 ppm, που αντιστοιχούν στα ( $=\text{CH}-$ ) ολεφινικά πρωτόνια των *cis*- UFA και των πρωτονίων στα 5.34 ppm, που αντιστοιχούν στα ( $=\text{CH}-$ ) ολεφινικά πρωτόνια των *trans*- UFA.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, με χρήση αντιδραστηρίου μετατόπισης τόσο στο χαμηλής όσο και στο υψηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει αλληλεπικάλυψη των  $\text{H}_2$  πρωτονίων των TAG ωστόσο στο υψηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο υπάρχει δυνατότητα διάκρισης των *cis*- και *trans*-UFA.



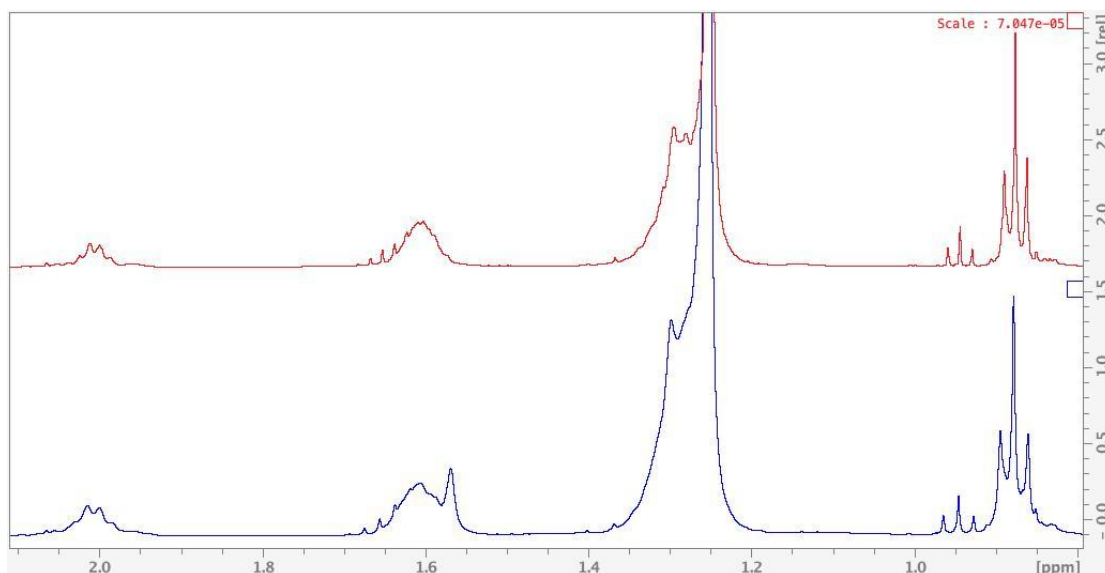
Εικόνα 5.12: Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 250 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 μετά από την προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  (1,4mM LSR in tube) του αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 5,6-6,3 ppm

Στην εικόνα 5.12 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 6,25 ppm, που αντιστοιχούν στο H11 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.90 ppm που αντιστοιχούν H10 ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.76 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο H8 πρωτόνια ( $=\text{CH}_2$ ) του καπρολεϊκού οξέος και στα 5.61 ppm που αντιστοιχούν στο H12 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλής έντασης μαγνητικό πεδίο υπάρχει διεύρυνση των παραπάνω κορυφών με την προσθήκη αντιδραστηρίου. Ωστόσο στο υψηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο υπάρχει δυνατότητα διάκρισης.

## 5.2. Σύγκριση $^1\text{H}$ NMR φασμάτων σε μαγνητικά πεδία έντασης 9.4 και 11.7 T (Πεδίο 400 και 500 MHz)

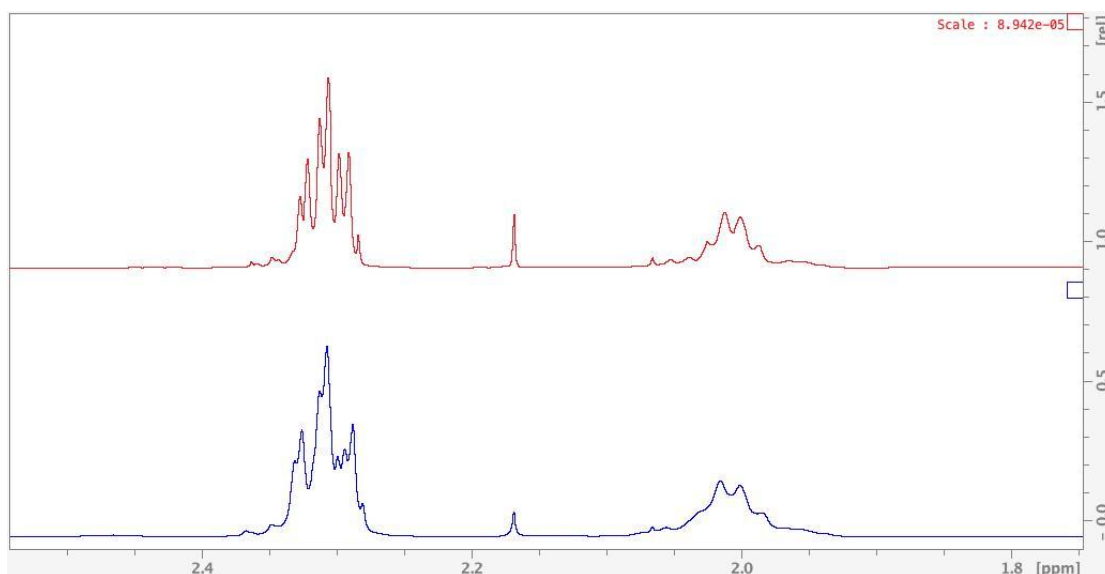
Μελετήθηκε η επίδραση της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στη δυνατότητα διάκρισης των χαρακτηριστικών ομάδων.



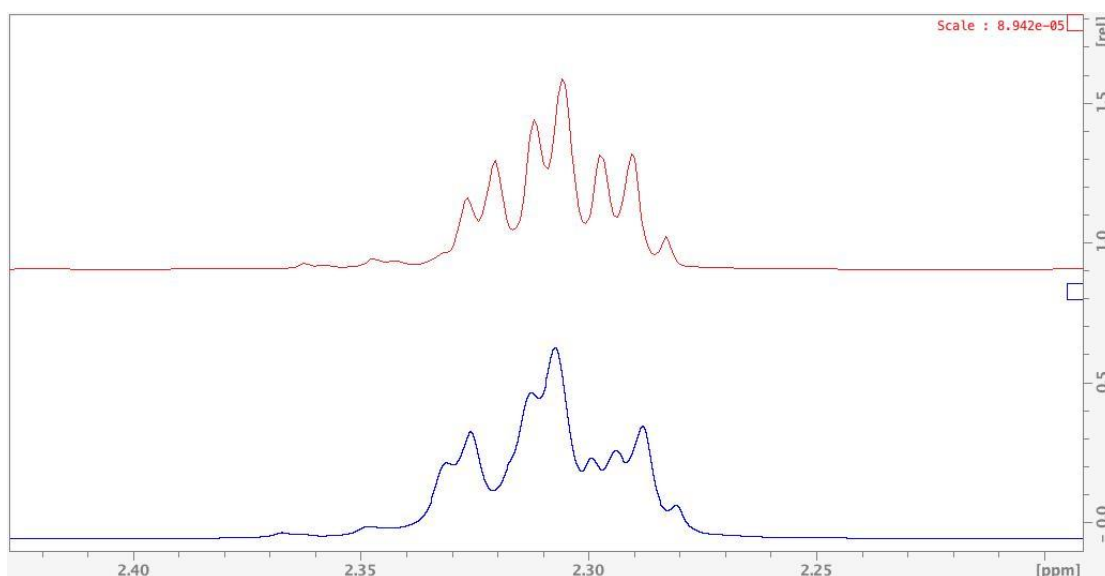
Εικόνα 5.13 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 για την περιοχή 0,8-2,1 ppm

Στην εικόνα 5.13 παρουσιάζεται η επίδραση της έντασης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (400 MHz) στο φασματικό προφίλ των (-CH<sub>3</sub>) ομάδων όλων των οξέων στα 0,89 ppm καθώς και των μεθυλομάδων των ω-3 ΛΟ και τουβουτυρικού οξέος στα 0,98 ppm.

Όπως φαίνεται στην εικόνα ,στο χαμηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο (400 MHz,κάτω μέρος της εικόνας) υπάρχει η δυνατότητα διάκρισής τους.

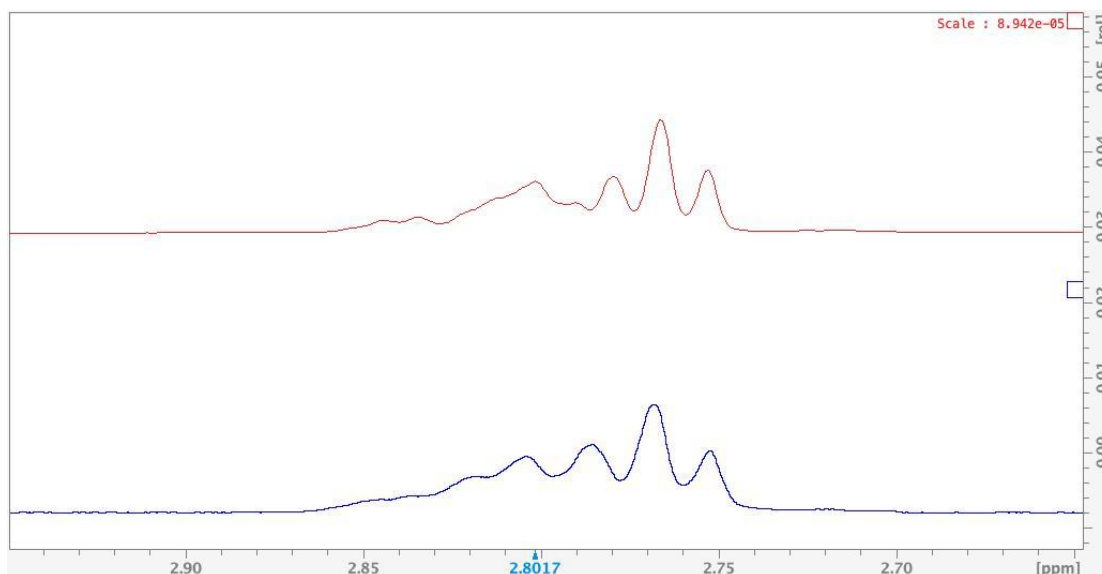


Εικόνα 5.14<sup>α</sup>: Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 για την περιοχή 1,8-2,4 ppm



Εικόνα 5.14<sup>β</sup> : Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 για την περιοχή 2,2-2,4 ppm

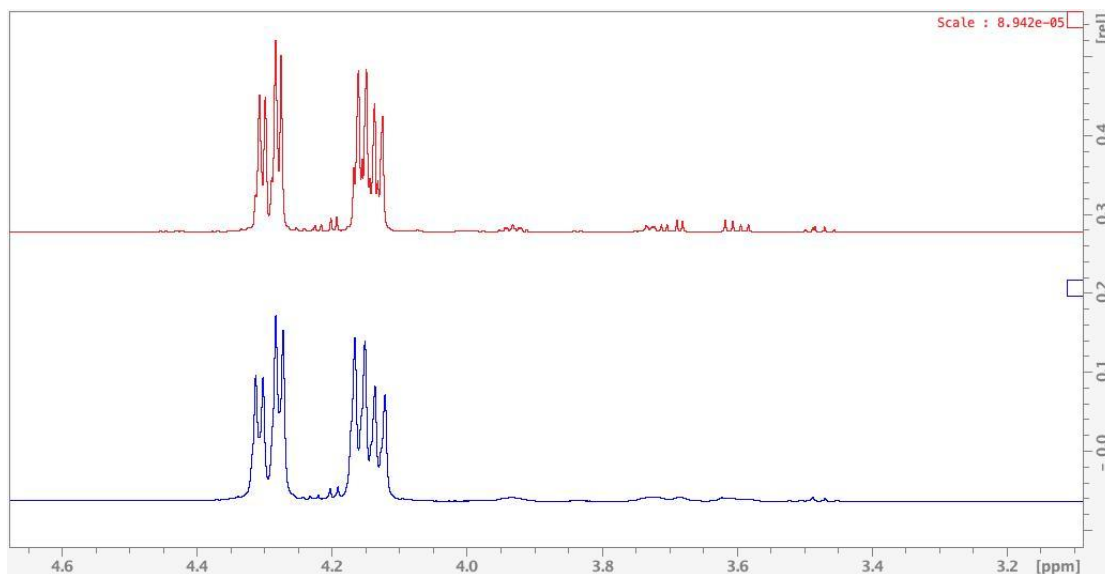
Στις εικόνες 5.14α και 5.14β παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 2.3 ppm που αντιστοιχούν στα  $-\text{CH}_2-$  πρωτόνια που είναι σε  $\alpha$ - θέση ως το εστερικό καρβοξύλιο (στην εικόνα 5.14 β παρουσιάζεται με μικρότερο φασματικό εύρος, από 2,2 -2,4 ppm, τα φάσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 5.14α). Με βάση τις εικόνες 5.14α και 5.14β, στο χαμηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει μερική αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού των εν λόγω πρωτονίων.



Εικόνα 5.15 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 πριν από την προσθήκη αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 2,7-2,9 ppm

Στην εικόνα 5.15 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 2,74 ppm, που αντιστοιχούν στα τέσσερα ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινολενικού οξέος στις θέσεις 5 και 8, στα 2,77 ppm που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια του λινελαϊκού οξέος στη θέση 8, στα 2,77 ppm καθώς και στα 2,81 ppm που αντιστοιχούν στα έξι ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια (bis-allylic) του DHA (docosahexaenoic acid) 22:6 ( $\omega$ -3).

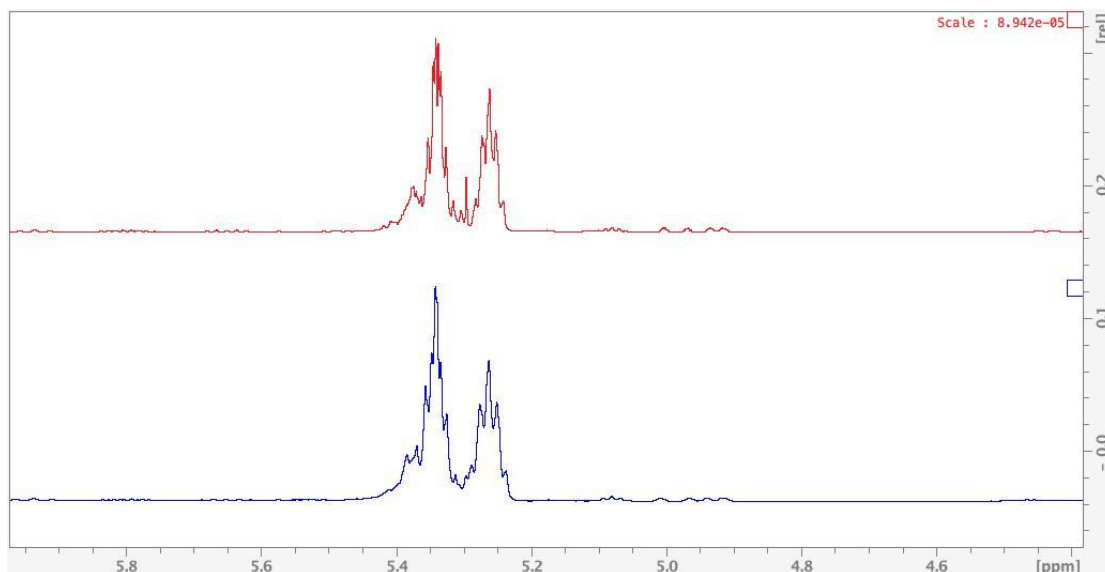
Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, στο χαμηλότερης έντασης μαγνητικό πεδίο, υπάρχει μια μικρή αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού.



**Εικόνα 5.16:** Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 πριν από την προσθήκη αντιδραστηρίου μετατόπισης για την περιοχή 3,2-4,6 ppm

Στην εικόνα 5.16 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 4,27 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια στη θέση 1 των TAG, και των πρωτονίων στα 4,11 ppm που αντιστοιχούν δύο ( $-\text{CH}_2-$ ) πρωτόνια στη θέση 3 των TAG.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, υπάρχει δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των H1 και H3 πρωτονίων των TAG.

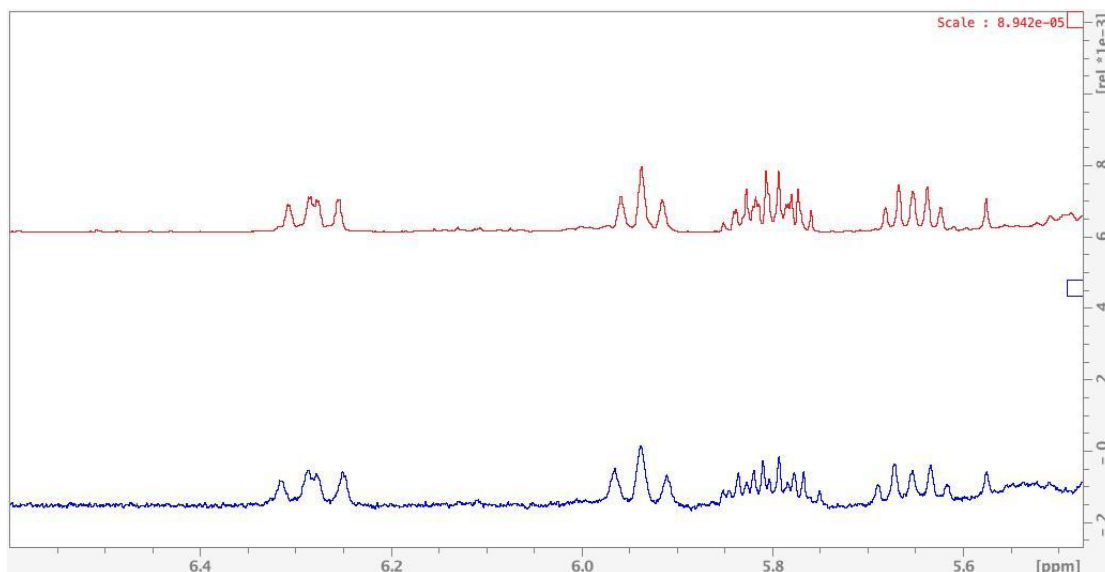


Εικόνα 5.17 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 πριν από την προσθήκη αντιδραστήριου μετατόπισης για την περιοχή 4,6-5,8 ppm

Στην εικόνα 5.17 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 5,24 ppm, που αντιστοιχούν στο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο στη θέση 2 των TAG, αλληλεπικαλυπτόμενου με το σήμα συντονισμού του πρωτονίου H-9 του (9-*trans*, 11-*cis*) 18:2 CLA στα 5,25 ppm, των πρωτονίων στα 5.31 ppm, που αντιστοιχούν στα ( $=\text{CH}-$ ) ολεφινικά πρωτόνια των *cis*- UFA και των πρωτονίων στα 5.34 ppm, που αντιστοιχούν στα ( $=\text{CH}-$ ) ολεφινικά πρωτόνια των *trans*- UFA.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται υπάρχει δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των  $\text{H}_2$  πρωτονίων των TAG κι επίσης υπάρχει δυνατότητα διάκρισης των *cis*- και *trans*-UFA.





Εικόνα 5.18 :Επίδραση πεδίου (κάτω φάσμα AV 400 ,πάνω φάσμα AV 500) για τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR για το δείγμα LM-2510 πριν από την προσθήκη αντιδραστήριου μετατόπισηςγια την περιοχή 5,6-6,5 ppm

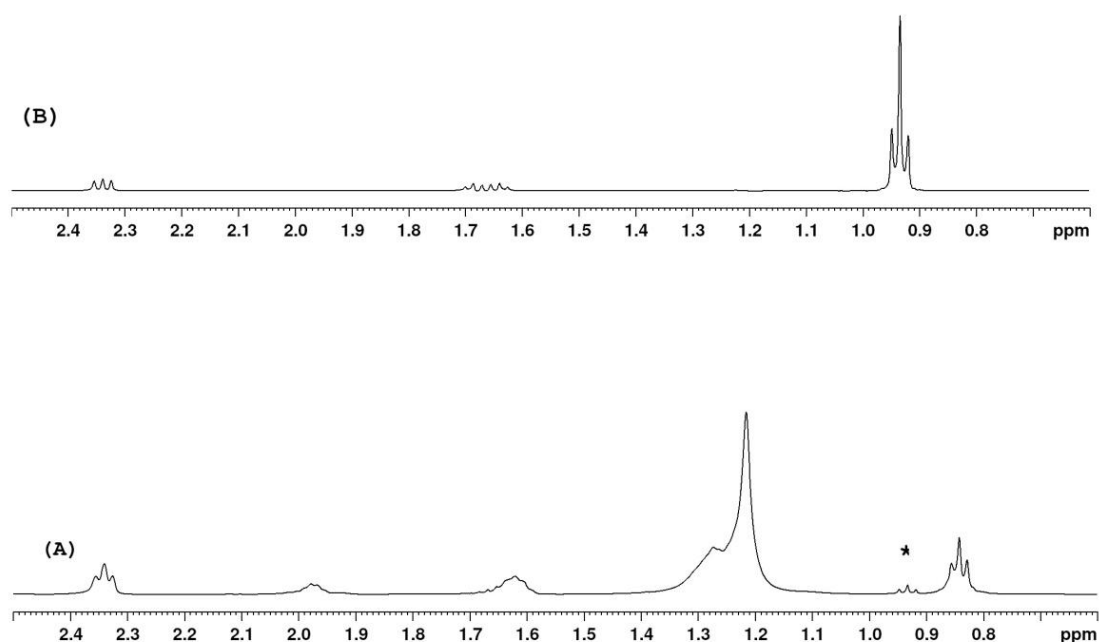
Στην εικόνα 5.18 παρουσιάζονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων στα 6.25 ppm, που αντιστοιχούν στο H11 πρωτόνιο ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, των πρωτονίων στα 5.90 ppm που αντιστοιχούν H10 ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA , των πρωτονίων στα 5.76 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο H8 πρωτόνια ( $=\text{CH}_2$ ) του καπρολεϊκού οξέος και στα 5,61 ppm που αντιστοιχούν στο H12 ( $-\text{CH}-$ ) πρωτόνιο του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA.

Με βάση την εικόνα που παρουσιάζεται, υπάρχει δυνατότητα χρήσης και χαμηλότερης έντασης μαγνητικού πεδίου για την μελέτη των H11 και H12 πρωτονίων του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, καθώς και του H8 του καπρολεϊκού.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

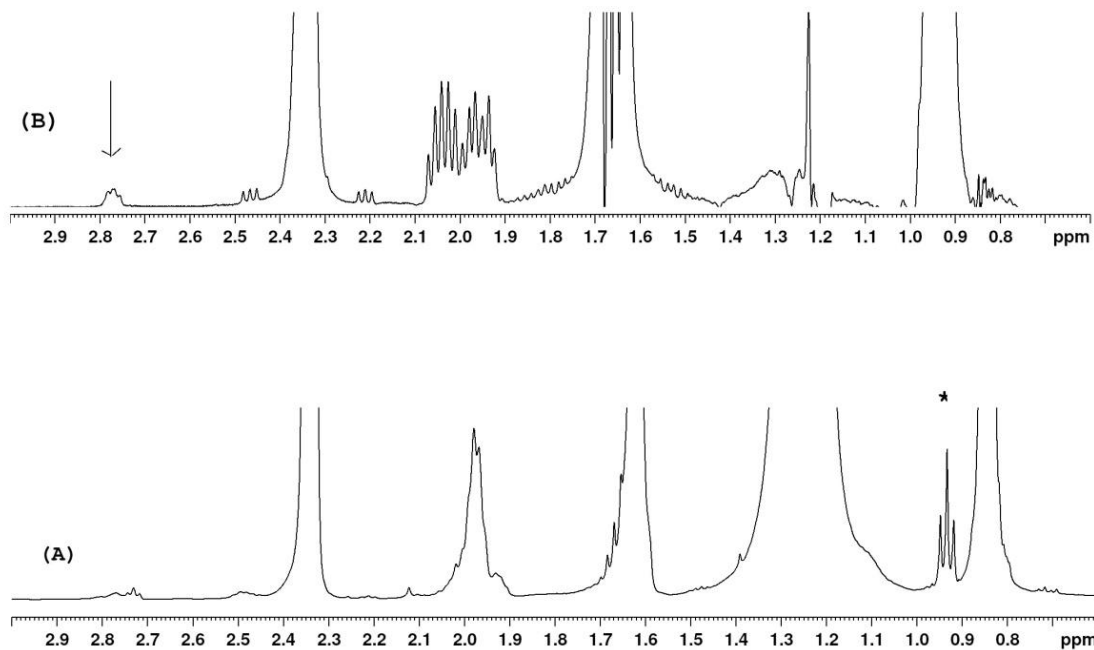
### 6.Μελέτη της φασματικής περιοχής στα 0,9 ppm που εμπεριέχει τις μεθυλομάδες των $\omega$ -3 ΛΟ

Στα 0,9 ppm εμπεριέχονται οι μεθυλομάδες των  $\omega$ -3 ΛΟ, του βουτυρικού οξέος και ενδεχομένως άλλων παρόμοιου τύπου ΛΟ. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα  $1D^1H$  NMR,  $1D^1TOCSY$  και ετεροπυρηνικά φάσματα έχοντας ως στόχο την μελέτη της των παραπάνω μορίων και εστιάζοντας στην περιοχή των 0,9 ppm του πρωτονιακού φάσματος.



Σχήμα 6.1 : Πρωτονιακό φάσμα (A), για το δείγμα LM22-11 (0,398 g/mL) και  $1D^1TOCSY$  φάσμα (B) (επιλεγμένη περιοχή 1-2,5 ppm). Με \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 0,9 ppm.

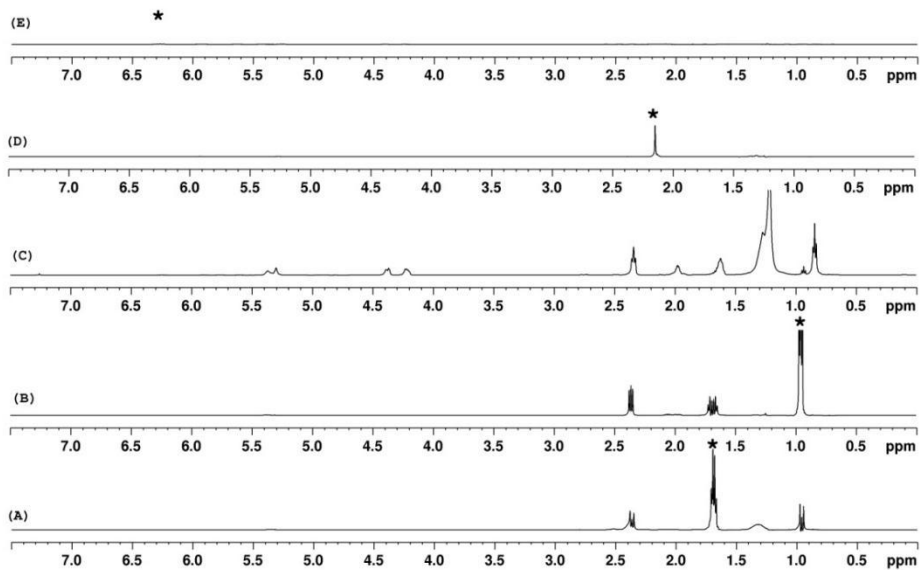
Στο Σχήμα 6.1A παρουσιάζεται το πρωτονιακό φάσμα εστιάζοντας στην περιοχή των 0,6 έως 2,5 ppm. Στο 6.1B, παρουσιάζεται το  $1D^1TOCSY$  φάσμα με συχνότητα διέγερσης την κορυφή στα 0,9 ppm (επισημαίνεται με αστερίσκο στο Σχήμα 6.1B), που αντιστοιχεί στην  $-CH_3$  μεθυλομάδα των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων, μεταξύ των οποίων και το λινολενικό οξύ, καθώς η μεθυλομάδα του βουτυρικού οξέος.



Σχήμα 6.2 :Μεγέθυνση του σχήματος 6.1 . Στο (B) με βέλος επισημαίνεται η συχνότητα συντονισμού στα 2,78 ppm

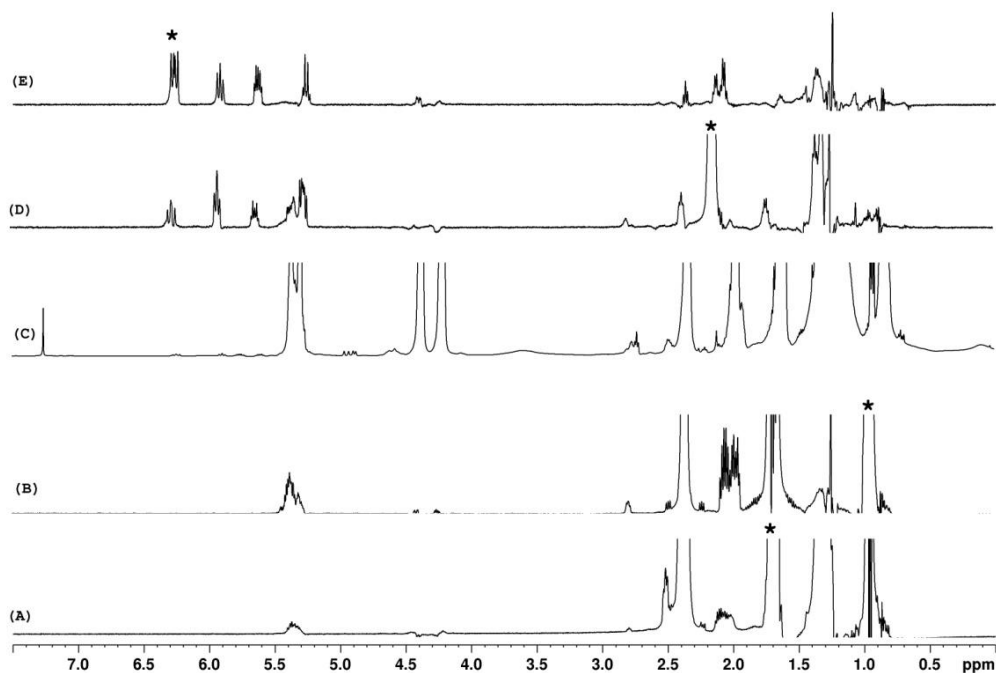
Στο σχήμα 6.2 παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η φασματική περιοχή του σχήματος 6.1

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας 1D TOCSY (Σχήμα 6.2B), πέραν της διάκριση των β –CH<sub>2</sub>- πρωτονίων ως προς την καρβοξυλομάδα στα ~1,6 ppm και των bis-allylic –CH<sub>2</sub>- πρωτονίων στα 2,77ppm, αποκαλύπτεται και διακρίνεται η αλληλουχία των κορυφών συντονισμού των αλληλικών πρωτονίων του ω-3 λινολενικού οξέος στα 1,95 και 2,1



ppm.

Σχήμα 6.3Α: Πρωτονιακό φάσμα, δείγμα LM22-11 (0,398 g/mL) (C) και 1D TOCSY φάσματα για επιλεγμένες περιοχές, για το δείγμα LM22-11 (0,398 g/mL) μετά την προσθήκη 15 μL αντιδραστηρίου μετατόπισης LSR (προστιθέμενη συνολική συγκέντρωση στο σωληνάριο NMR 1,57 mM). (A) 1 D TOCSY φάσμα (Με \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 1,70 ppm), (B) 1 D TOCSY φάσμα (Με \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 0,96 ppm), (D) 1 D TOCSY φάσμα (Με \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 2,15 ppm), (E) 1 D TOCSY φάσμα (Με \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 6,27 ppm).

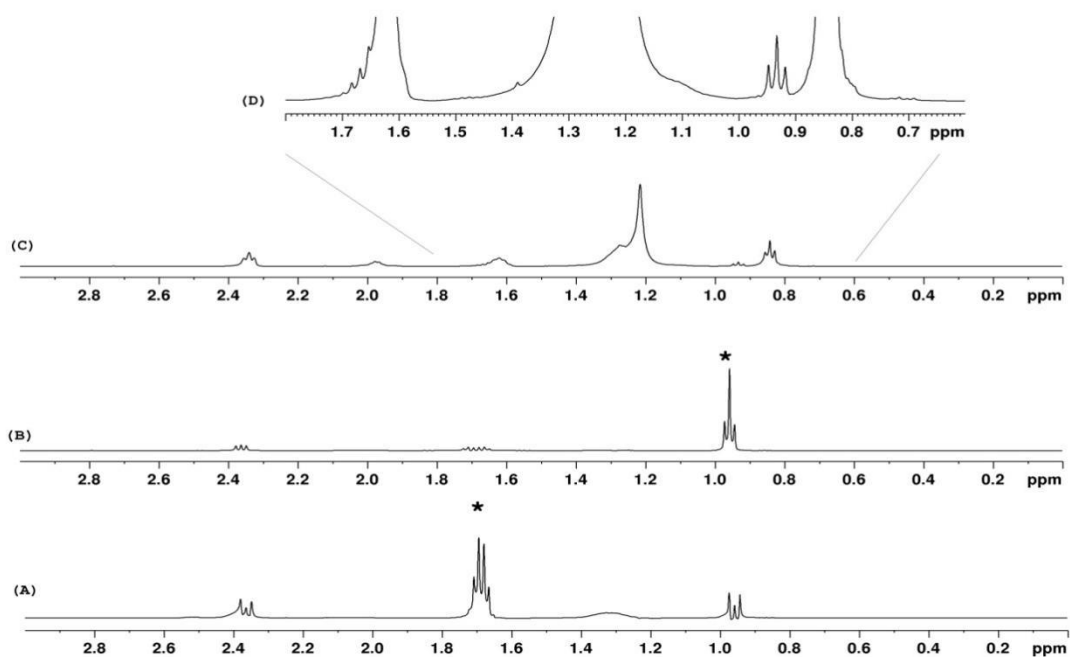


Σχήμα 6.3B : Το σχήμα 6.3 σε μεγέθυνση. Πρωτονικό φάσμα (C) και 1D TOCSY φάσματα για επιλεγμένες περιοχές ,για το δείγμα LM22-11 ((0,398 g/mL) μετά την προσθήκη 15  $\mu$ L αντιδραστηρίου μετατόπισης LSR .(A) 1 D TOCSY φάσμα (Me \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 1,70 ppm) ,(B) 1 D TOCSY φάσμα (Me \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 0,96 ppm) ,(D) 1 D TOCSY φάσμα (Me \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 2,15 ppm, (E) 1 D TOCSY φάσμα (Me \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 6,27 ppm).

Στο σχήμα 6.3Α παρουσιάζεται με (C) Το πρωτονιακό φάσμα ,με (A) το φάσμα 1D TOCSY, όπου με αστερίσκο δείχνεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης κατά τη λήψη του φάσματος 1D TOCSY της κορυφής στα 1,7 ppm, στην οποία συντονίζονται όλα τα  $-OOC-CH_2-CH_2-$  πρωτόνια των ΛΟ, με (B) το φάσμα 1D TOCSY, όπου με αστερίσκο η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης της κορυφής στα 0,96 ppm που αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια των μεθυλομάδων των  $\omega$ -3 λιπαρών οξέων και του βουτυρικού οξέος που υπάρχουν στο δείγμα, με (D) το φάσμα 1D TOCSY, όπου με αστερίσκο δείχνεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης κατά τη λήψη του φάσματος της κορυφής συντονισμού στα 2,15 ppm που αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στις κορυφές H8 και H13 του (9-*cis*,11-*trans*)18:2 CLA και με (E), το φάσμα 1D TOCSY, όπου με αστερίσκο δείχνεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης κατά τη λήψη του φάσματος της κορυφής συντονισμού στα 6,27 ppm που αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια H-11(12-*cis* ,10 *trans*)18:2 CLA και τα H11 του (9-*cis*,11-*trans*)18:2.

Στο Σχήμα 6.3B παρουσιάζονται σε μεγέθυνση οι παραπάνω αναφερόμενες περιοχές του Σχήματος 6.3<sup>A</sup>.

**Στα (D) και (E) διακρίνονται οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων του (9-*cis*,11-*trans*)18:2 CLA.**



Σχήμα 6.4: Πρωτονιακό φάσμα (C) και 1D TOCSY φάσματα για επιλεγμένες περιοχές ,για το δείγμα LM22-11 (0,398 g/mL) μετά την προσθήκη 15  $\mu$ L αντιδραστήριου μετατόπισης LSR .(A) 1 D TOCSY φάσμα (Me \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 1,70 ppm) ,(B) 1 D TOCSY φάσμα (Me \* παρουσιάζεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης στα 0,96 ppm) .(D) Το πρωτονιακό φάσμα σε μεγέθυνση(x8) ,εστιάζουμε στην περιοχή συχνοτήτων του βουτυρικού οξέος.

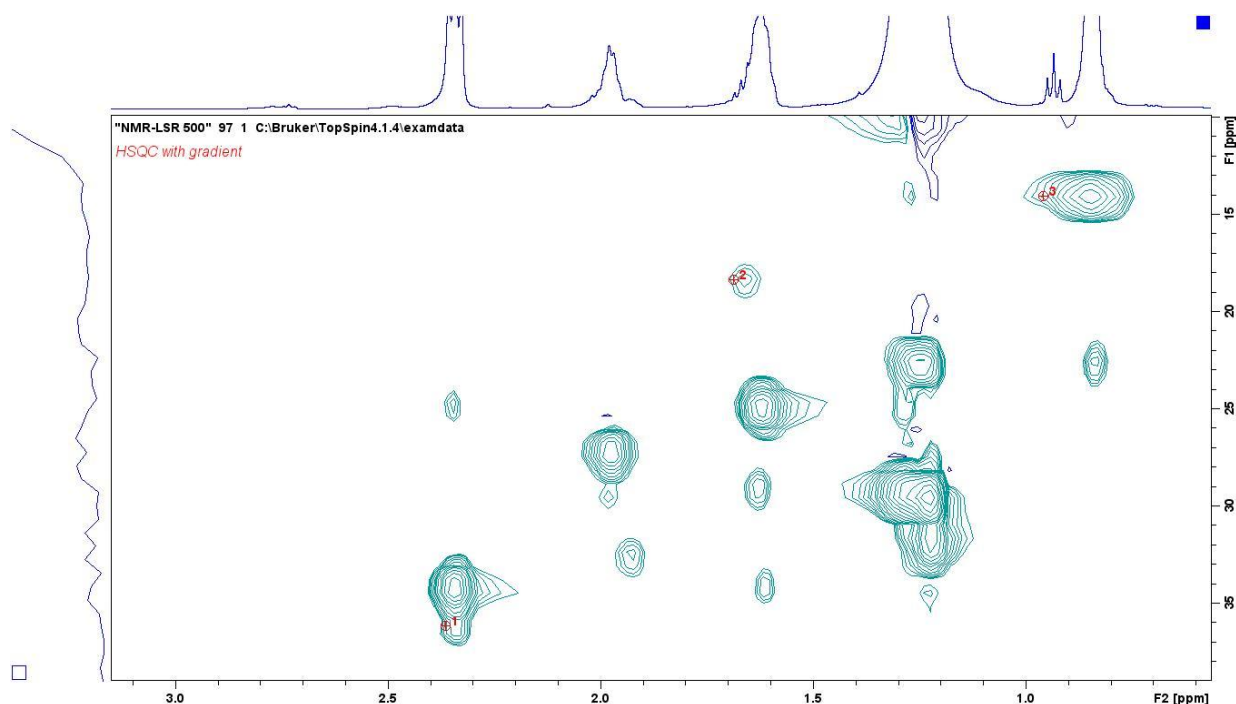
Στο σχήμα 6.4 παρουσιάζεται η φασματική περιοχή των 0 έως 3 ppm για τα παρακάτω φάσματα : (C) Το πρωτονιακό φάσμα , (A) το φάσμα 1D TOCSY, όπου με αστερίσκο δείχνεται η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης κατά τη λήψη του φάσματος κορυφής στα 1,7 ppm που αντιπροσωπεύει τα  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  πρωτόνια του βουτυρικού οξέος αλληλεπικαλυπτόμενα με τα  $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  πρωτόνια όλων των ΛΟ ,με (B) η επιλεγμένη συχνότητα διέγερσης κατά τη λήψη του φάσματος 1D TOCSY της κορυφής συντονισμού στα 0,96 ppm, που αντιπροσωπεύει τα πρωτόνια των μεθυλομάδων των  $\omega$ -3 ΛΟ που υπάρχουν στο δείγμα καθώς και του βουτυρικού οξέος .Τέλος με (D) παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η περιοχή συχνοτήτων 0,6-0,8 ppm του 6.4 (C) που αντιστοιχεί στο πρωτονιακό φάσμα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.4A, η λήψη του φάσματος 1D TOCSY οδηγεί στην διάκριση των πρωτονίων του σκελετού του βουτυρικού οξέος. Έτσι, στα 0,93 ppm είναι τα πρωτόνια της μεθυλομάδας του βουτυρικού οξέος, στα 1,66 ppm τα μεθυλενικά πρωτόνια σε  $\beta$ -θέση ως προς την καρβοξυλομάδα και στα 2,37 ppm τα μεθυλενικά πρωτόνια σε  $\beta$ -θέση ως προς την καρβοξυλομάδα. Με βάση τη βιβλιογραφία τα τελευταία αναμένονται στην περιοχή των 2,25 ppm. Η παραπάνω μετατόπιση προς μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων οφείλεται στην αντίδραση της καρβοξυλομάδας με το αντιδραστήριο LSR. Η ενδεχόμενη εστεροποίηση του

βουτυρικού οξέος με TAGενδέχεται να συνεισφέρει επίσης στην εν λόγω μετατόπιση.

Προκειμένου να βρεθούν και οι αντίστοιχοι άνθρακες του βουτυρικού οξέος στο δείγμα, έγινε λήψη δισδιάστατων φασμάτων, πιο συγκεκριμένα  $2D^1H-^{13}C$  HSQC φασμάτων.

Στην Εικόνα 6.1 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1H-^{13}CHSQC$  με επιλεγμένη περιοχή από 0-2,6 για το πρωτόνιο και από 0-42 ppm για τον άνθρακα.

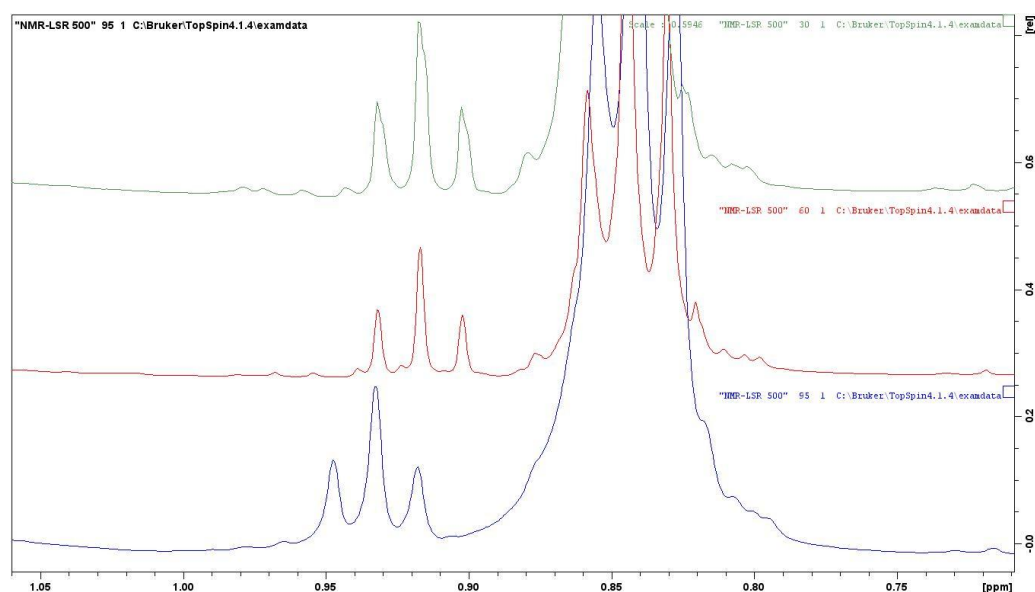


Εικόνα 6.1: Φάσμα δύο διαστάσεων  $2D^1H-^{13}CHSQC$  15  $\mu$ LSR

Με βάση το παραπάνω φάσμα, η  $-CH_3$  του βουτυρικού οξέος στα 0,959 ppm έχει κορυφή διασταύρωσης με τον άνθρακα στα 14 ppm, η  $-CH_2-$  στα 1,688 με τον άνθρακα στα 18,3 ppm και η  $-CH_2-COOH$  στα 2,37 με τον άνθρακα στα 36,1 ppm

**Πίνακας 6.1. Ταυτοποίηση του βουτυρικού οξέος στο δείγμα μετά την προσθήκη LSR**

Αρίθμηση	Χαρακτηριστική Ομάδα	$\delta_H$ (ppm)	$\delta_C$ (ppm)
1	$-CH_2-COOH$	2,37	36,1
2	$-CH_2-$	1,69	18,3
3	$-CH_3$	0,96	14,0



Εικόνα 6.2: Πρωτονικά φάσματα αρχικό (πάνω φάσμα) και μετά τις 2 διαδοχικές προσθήκες αντιδραστηρίου. Επιλεγμένη περιοχή από 0,5-1,1 ppm

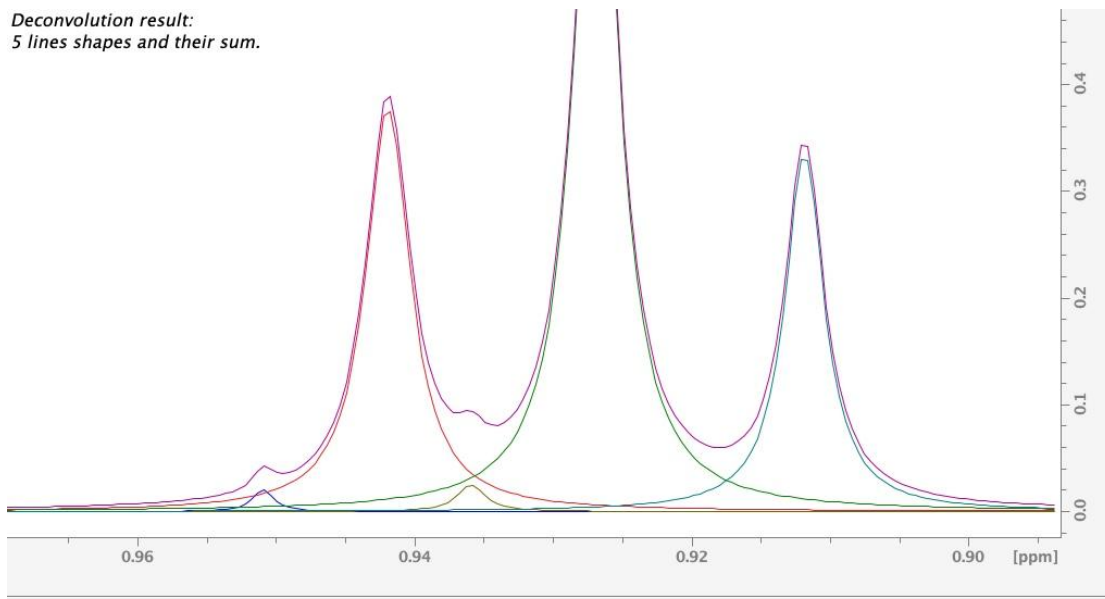
Όπως φαίνεται στο μεσαίο φάσμα στα 0,924 ppm υπάρχει διάκριση της κορυφής με τις αλληλεπικαλυπτόμενες των  $\omega_3$  στα 0,918 ppm. Η σταθερά σύζευξης της κορυφής στα 0,924 είναι 7,2 Hz και των  $\omega_3$ , 7,45 Hz. Επίσης η τετραπλή κορυφή (μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενη) στα 1,637 ppm με σταθερά σύζευξης 7,1 Hz έχει μετατοπιστεί κατά 0,01 ppm (2,75 Hz), παρόμοια με την διαφορά  $\Delta\delta$  στα 0,924 ppm.

Με βάση τα παραπάνω η εν λόγω κορυφή αφορά την κορυφή του βουτυρικού οξέος το οποίο βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή (χωρίς να είναι εστεροποιημένη η καρβοξυλομάδα του). Ωστόσο με βάση την αναμενόμενη συγκέντρωση του η οποία αναμένεται να είναι υψηλή και με βάση προηγούμενες μελέτες (Lam et al., 2020) (μέρος του βουτυρικού οξέος αναμένεται να είναι δεσμευμένο και στα τριγλυκερίδια).

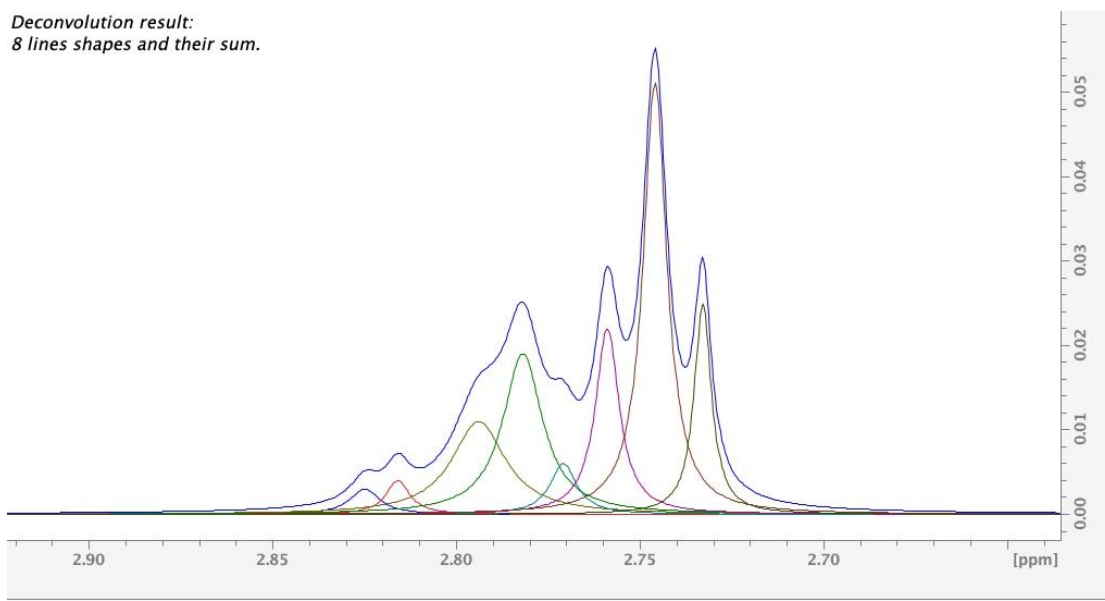
Η δυνατότητα που παρέχει η προτεινόμενη μεθοδολογία για τον διαχωρισμό ελεύθερων και συζευγμένων λιπαρών οξέων.

Το παραπάνω είναι υπό μελέτη.





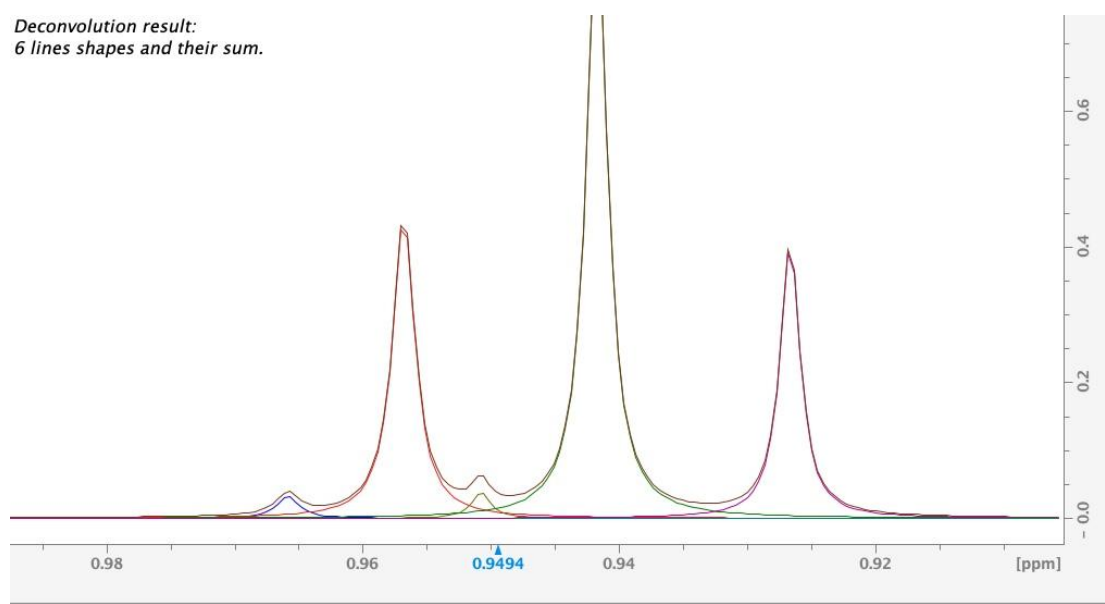
Εικόνα 6.7 : Διαχωρισμός αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών στις επιμέρους (deconvolution) για το δείγμα Ic1 στην περιοχή των 0,93 ppm



Εικόνα 4.8 : Διαχωρισμός αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών στις επιμέρους (deconvolution) για το δείγμα Ic1 στην περιοχή των 2,75 ppm

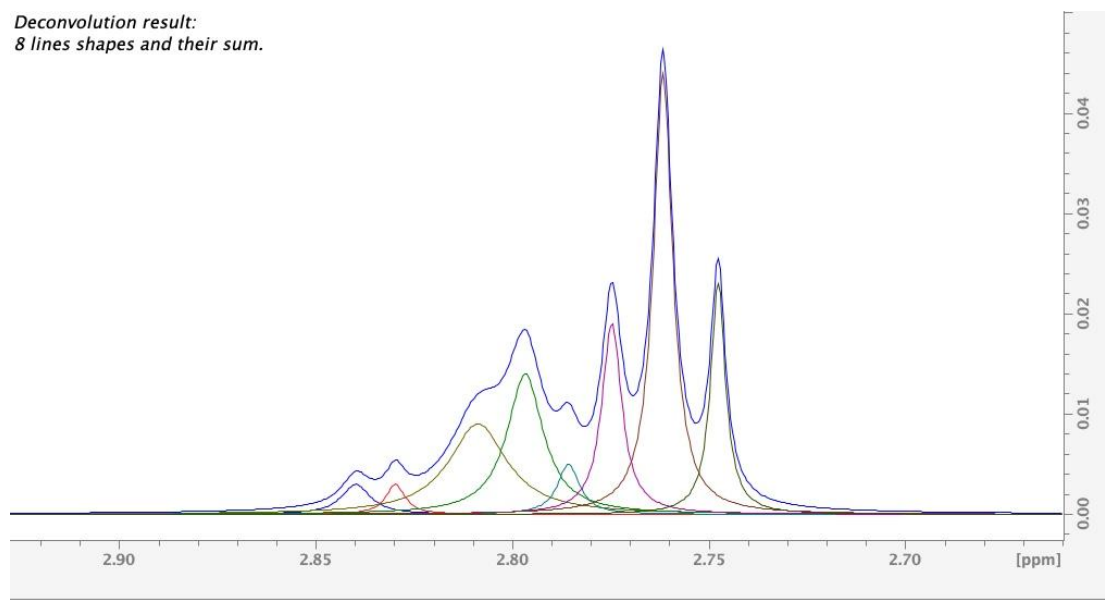
**Πίνακας 6.2: Πίνακας ολοκληρωμάτων με διαχωρισμό αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών για το δείγμα LC1**

Ένωση	$\delta$ (ppm)	Χαρακτηριστική ομάδα	ολοκλήρωμα	$^1\text{H}$
FA	0,89	-CH <sub>3</sub>	1	3
butyric FA	0,9	-CH <sub>3</sub>	0,095	3
linoleic n6	2,75	-CH <sub>2</sub> -	0,0132	2
linolenic n3	2,77	-CH <sub>2</sub> -	0,0084	4
all FA	2.30	-CH <sub>2</sub> -	0,740	2



**Εικόνα 6.9: Διαχωρισμός αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών στις επιμέρους (deconvolution) για το δείγμα Id1 στην περιοχή τω0,95 ppm**

Deconvolution result:  
8 lines shapes and their sum.



Εικόνα 6.10 : Διαχωρισμός αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών στις επιμέρους (deconvolution) για το δείγμα ld1 στην περιοχή των 2,8 ppm

Πίνακας 6.3 : Πίνακας ολοκληρωμάτων με διαχωρισμό αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών για το δείγμα LD1 (Παρουσία LSR)

Ένωση	$\delta$ (ppm)	Χαρακτηριστική ομάδα	ολοκλήρωμα	$^1\text{H}$
FA	0,89	-CH <sub>3</sub>	1	3
butyric FA	0,9	-CH <sub>3</sub>	0,0872	3
linoleic FA (n6)	2,75	-CH <sub>2</sub> -	0,0118	2
linolenicFA( n3)	2,77	-CH <sub>2</sub> -	0,0070	4

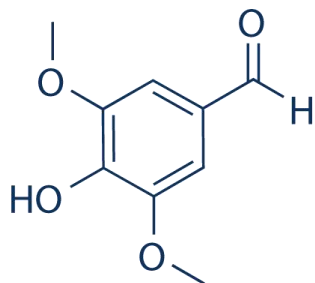
DHA			0,0016	
allFA	2.30	-CH <sub>2</sub> -	0,7357	2

**Πίνακας 6.4 Σύνοψη των συγκεντρώσεων από τις επιλεγμένες ενώσεις**

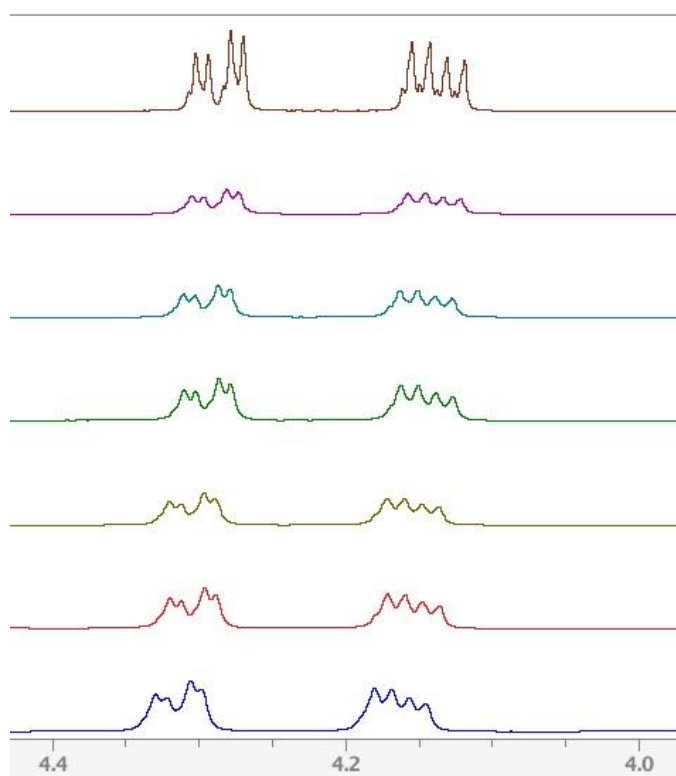
	LD1	
	LSR	no LSR
b.a	6,7%	8,0%
n3	0,8%	0,6%
unknown	0,4%	no data

### 6.1 Αλληλεπίδραση συριγκαλδεΐδης ως πρότυπη ένωση με δείγμα γάλακτος παρουσία αντιδραστηρίου LSR

Φτιάξαμε διάλυμα με 5,9 mg syringaldehyde και 1 ml CDCl<sub>3</sub>

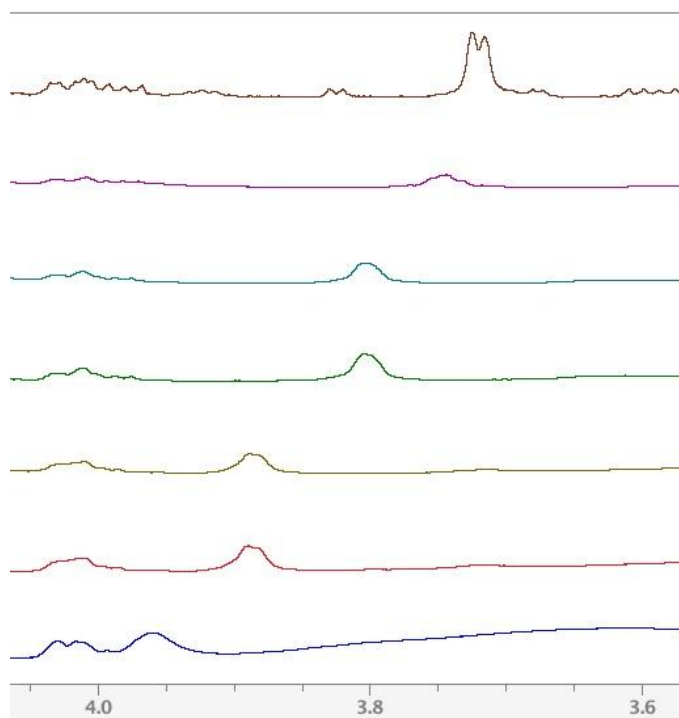


Εικόνα :6.11 Χημική δομή της συριγκαλδεΐδης (SA)



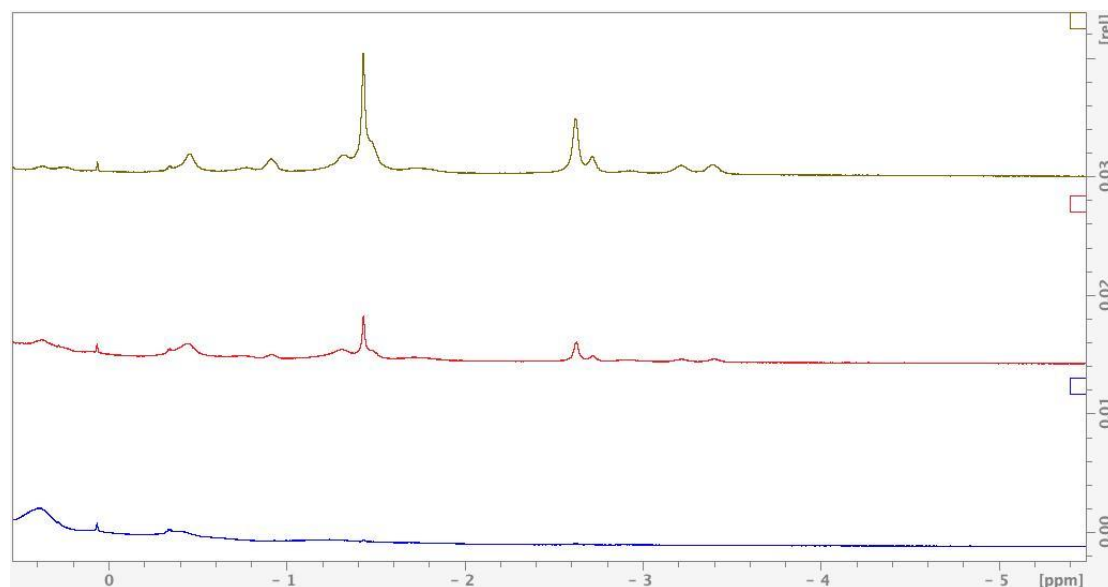
Εικόνα: 6.12. <sup>1</sup>H NMR φάσματα δείγματος γάλακτος-LSR κατά τη διαδοχική προσθήκη SA. Περιοχή συχνοτήτων 4,0 έως 4,4 ppm.

Στην εικόνα 6.12 παρουσιάζεται η επίδραση της SA στο δείγμα γάλακτος – LSR. Κατά τη διαδοχική προσθήκη SA (φάσματα από κάτω προς τα πάνω) φαίνεται η συνεχής μετατόπιση των H<sub>1</sub> και H<sub>3</sub> πρωτονίων των TAG σε μικρότερες τιμές συχνοτήτων.



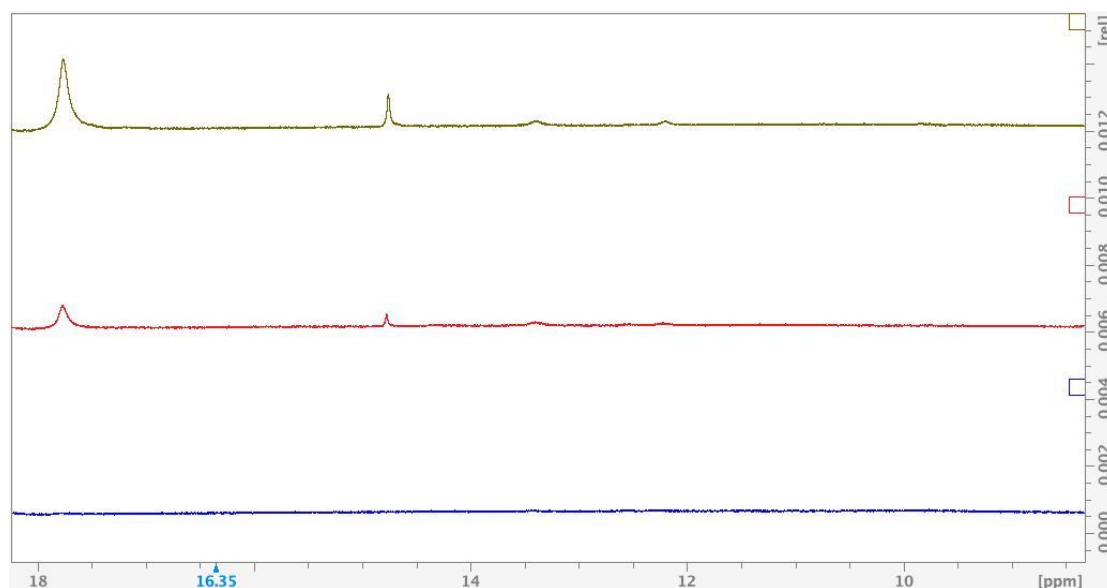
Εικόνα:6.11.  $^1\text{H}$  NMR φάσματα δείγματος γάλακτος-LSR κατά τη διαδοχική προσθήκη SA. Περιοχή συχνοτήτων 3,6 έως 4,1ppm.

Στην εικόνα 6.14 παρουσιάζεται η επίδραση της SA στο δείγμα γάλακτος – LSR. Κατά τη διαδοχική προσθήκη SA (φάσματα από κάτω προς τα πάνω) φαίνεται η συνεχής μετατόπιση των H1 πρωτονίων της 1,2 DAG σε μικρότερες τιμές συχνοτήτων.



Εικόνα 6.13  $^1\text{H}$  NMR φάσματα δείγματος γάλακτος-LSR κατά τη διαδοχική προσθήκη SA. Περιοχή συχνοτήτων -5 έως 0,1ppm.

Στην εικόνα 6.13 παρουσιάζεται η επίδραση της SA στο δείγμα γάλακτος – LSR. Κατά τη διαδοχική προσθήκη SA (φάσματα από κάτω προς τα πάνω) φαίνεται η εμφάνιση νέων κορυφών σε μικρές τιμές συχνοτήτων.



Εικόνα 6.14 :  $^1\text{H}$  NMR φάσματα δείγματος γάλακτος-LSR κατά τη διαδοχική προσθήκη SA. Περιοχή συχνοτήτων 10 έως 18ppm.

Στην εικόνα 6.14 παρουσιάζεται η επίδραση της SA στο δείγμα γάλακτος – LSR. Κατά τη διαδοχική προσθήκη SA (φάσματα από κάτω προς τα πάνω) φαίνεται η εμφάνιση νέων κορυφών σε μεγάλες τιμές συχνοτήτων (αλδεϋδική περιοχή, περιοχή οξέων).

Με βάση τα παραπάνω, η SA φαίνεται να έχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα αντίδρασης με το LSR καθώς το δεσμεύει οδηγώντας μάλιστα σε «άρση» της προηγούμενης αλληλεπίδρασής τους με τα ΛΟ.

Λόγω του παραπάνω, η χρήση του SA ως πρότυπη ένωση για το εν λόγω διάλυμα χρήζει μελέτης πριν την εφαρμογή του.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Επίδραση έντασης μαγνητικού πεδίου:

Σε μικρή ένταση μαγνητικό πεδίο δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός των  $\omega$ -3 και  $\omega$ -6 πρωτονίων στις περιοχές των 0,9 ppm και 2,7 ppm. Επίσης, τα *cis*- και *trans*-UFA στην περιοχή των 5,4 ppm, αλληλεπικαλύπτονται.

Ωστόσο, μπορεί να γίνει διάκριση τόσο των H1, H2 και H3 πρωτονίων των TAG καθώς και μελέτη των H11 και H12 πρωτονίων του (9-*cis*, 12-*trans*) 18:2 CLA, και του H8 του καπρολεϊκού. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η διόρθωση γραμμής βάσης

του φάσματος και η χρήση εργαλείων ανάλυσης μερικώς επικαλυπτόμενων κορυφών (deconvolution) μπορεί να συνεισφέρει στην παραπάνω διάκριση.

#### Επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου στον T<sub>1</sub>

Επομένως η προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης LSR επηρεάζει τον χρόνο χαλάρωσης T<sub>1</sub> των λιπαρών οξέων και άλλων ενώσεων. Αυτές οι μεταβολές μπορούν να βοηθήσουν στην καλύτερη διάκριση των φασματικών κορυφών και στην ακριβέστερη εκτίμηση των συγκεντρώσεων των συστατικών στο δείγμα. Ειδικά για ενώσεις με αλληλεπικάλυψη κορυφών, οι διαφοροποιήσεις στον χρόνο χαλάρωσης αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση και διαχωρισμό τους.

#### Επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου στον D

Η προσθήκη του αντιδραστηρίου LSR έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του συντελεστή διάχυσης, D. Στο διαλύτη (CHCl<sub>3</sub>) η σταθερά διάχυσης μειώνεται κατά 1,4 φορές (R= 1,4). Ωστόσο, στα λιπαρά οξέα του δείγματος, η μείωση είναι μεγαλύτερη απ' ότι στο διαλύτη. Επιπλέον, η μείωση στην 1,2 DAG είναι μεγαλύτερη από εκείνη των υπόλοιπων TAG. Η παρουσία του LSR στο διάλυμα αλλάζει όπως αναμένεται το συντελεστή διάχυσης του διαλύτη καθώς επιδρά στο ιζώδες του διαλύματος. Ωστόσο, η συμπλοκοποίηση του αντιδραστηρίου με τις ελεύθερες υδροξυλικές (ή τυχόν καρβοξυλικές) ομάδες των λιπαρών οξέων έχει ως επιπρόσθετο αποτέλεσμα την ελάττωση κατά τον παράγοντα R.

#### Επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου στην διάκριση της νέας ένωσης 2-βουτανόνη

Για πρώτη φορά στην εν λόγω μελέτη μελετήθηκαν εκτενώς τα παραπάνω. Επίσης, για πρώτη φορά μπορούμε και διακρίνουμε σε πεδίο ενδιάμεσης έντασης το βουτυρικό από το λινολινικό και άλλα ω-3.

Η προσθήκη αντιδραστηρίου οδήγησε στην ανάδειξη μιας ένωσης που παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία σε φάσμα <sup>1</sup>H NMR και αφορά την 2-βουτανόνη.

#### Επίδραση της συγκέντρωσης.

Συγκρίνοντας τις τιμές των συντελεστών διάχυσης τα δύο διαλύματα υψηλής και χαμηλότερης συγκέντρωσης λιπαρών οξέων, παρατηρείται ελάττωση του συντελεστή διάχυσης στο πυκνότερο διάλυμα. Αυτό αναμένεται καθώς ο συντελεστής διάχυσης που υπολογίζεται με την φασματοσκοπία DOSY, εξαρτάται από το ιζώδες του διαλύματος, όπως αναφέρεται και στη σελ 30.



Ωστόσο παρατηρείται ότι ο βαθμός ελάττωσης είναι μεγαλύτερος στα λιπαρά οξέα συγκριτικά με τον βαθμό ελάττωσης στο διαλύτη και μάλιστα είναι περίπου 4-5 φορές μεγαλύτερος για τα λιπαρά οξέα. Φαινόμενα τυχόν συσσωμάτωσης των λιπαρών οξέων μπορεί να συνεισφέρουν επιπρόσθετα σε αυτή τη μεταβολή.

#### Επίδραση Αντιδραστηρίου στις Κλίσεις των Γραμμικών Διαγραμμάτων

Όσο πιο μεγάλη είναι η κλίση της ευθείας τόσο μεγαλύτερη επίδραση έχουμε ,ενώ όσο πιο μικρή είναι η κλίση ,τόσο πιο μικρή είναι και η επίδραση του αντιδραστηρίου μετατόπισης στο εκάστοτε λιπίδιο. Παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη επίδραση παρουσιάζεται στα πρωτόνια  $sn-3$   $OH-CH_2-CH$  έχουν οι 1,2 DAG με κλίσεις 0,1 Δδ/mM και 0,08 Δδ /mM αντίστοιχα στο αραιό(LC1 , 0,207 g/mL) και το πυκνό(LD1 , 0,684 g/mL) διάλυμα .Επίσης βλέπουμε ότι στο πιο πυκνό διάλυμα η παράμετρος Δδ /mM άρα και η επίδραση του αντιδραστηρίου μετατόπισης στα επιλεγμένα λιπίδια ,είναι μικρότερες σε σχέση με το αραιότερο(0,207 g/mL) διάλυμα. Επομένως η συγκέντρωση των λιπιδίων στο διάλυμα είναι επίσης ένας παράγοντας που επηρεάζει την επίδραση του αντιδραστηρίου μετατόπισης.

Ωστόσο ,η «αποτελεσματική συγκέντρωση» έτσι όπως ορίστηκε παραπάνω ,είναι μικρότερη στο πυκνότερο διάλυμα έχοντας όμως μικρότερη επίδραση στην παράμετρο Δδ/mM. Συνεπώς ,οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το επιλεγμένο LSR ,αλληλεπιδρούν ανεξάρτητα από την παρουσία στο διάλυμα ενώσεων που δεν αλληλεπιδρούν. Αντίθετα ,μεγάλη συνολική συγκέντρωση ευνοεί μερικώς την αλληλεπίδραση των ενώσεων του πίνακα χ με το LSR .

#### Επίδραση προσθήκης αντιδραστηρίου στον υπολογισμό της συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος- $\omega-3$ λινολενικού και άλλης αλληλεπικαλυπτόμενης κορυφής

Με την προσθήκη αντιδραστηρίου LSR και χρήση μεθόδων διάκρισης ολοκληρωμάτων κορυφών είναι δυνατή η εύρεση της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος.

Επίσης για πρώτη φορά διακρίνεται η 2-βουτανόνη σε δείγμα γάλακτος με  $^1H$  NMR

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alexandri, E., Ahmed, R., Siddiqui, H., Choudhary, M., Tsiafoulis, C., & Gerothanassis,

I. (2017). High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical

Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules*, 22(10), 1663.

<https://doi.org/10.3390/molecules22101663>

Baro, L., J. Foolla, J. L. Pena, A. Martinez-Ferez, A. Lucena, J. Jimenez, J. J. Boza, and E.

Lopez- Huertas. 2003.  *$\omega$ -3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin*

*supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol,*

*homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy*

*humans*. Clin. Nutr. 22:175- 182.

Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall and A. L. Lock, (2006) *Major Advances*

*Associated with the Biosynthesis of Milk*. J. Dairy Sci., 89:1235–1243.

Bennett R. & Harjinder S. (2002): *Milk and Milk Processing* (Dairy Microbiology

Handbook, R.K. Robinson).

Boccia, A. C., Cusano, E., Scano, P., & Consonni, R. (2020). NMR Lipid Profile of Milk

from Alpine Goats with Supplemented Hempseed and Linseed Diets.

*Molecules*, 25(7), 1491. <https://doi.org/10.3390/molecules25071491>

Carrero, J. J., L. Baro, J. Fonolla, M. Gonzalez-Santiago, A. Martinez-Ferez, R. Castillo,

J. Jimenez, J. J. Boza, and E. Lopez-Huertas. 2004. *Cardiovascular effects of*

*milk enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids, oleic acid, folic acid, and*

*vitamins E and B6 in volunteers with mild hyperlipidemia*. Nutrition 20:521-

527.

Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L., and Pariza, M. W. 1992.

*Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly*

*recognized class of anticarcinogens*. Journal of food Composition and Analysis,

5, 185-197.

Emwas, A.-H. M., Merzaban, J. S., & Serrai, H. (2015). Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. In Atta-ur-Rahman & M. Iqbal Choudhary (Eds.), *Applications of NMR Spectroscopy* (pp. 93–130).

BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS.

<https://doi.org/10.2174/9781608059621115010005>

Engler, Marguerite M. PhD, FAHA; Engler, Mary B. PhD, FAHA. 2006 *Omega-3 Fatty Acids Role in Cardiovascular Health and Disease*. The Journal of Cardiovascular Nursing

Field L.D., Kalman J.R. , Li H.L., Magill A.M., Sternhell S.(2017)

*Προσδιορισμός της Δομής Οργανικών Ενώσεων με Φασματοσκοπικές Μεθόδους* ,(Κόκοτος Γ.μεταφρ) Αθήνα :Υτορία (το πρωτότυπο έργο εκδόθηκε το 2015)

Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L., Zheng, J., Badran, H., Budinski, Z., Mandal, R., Ametaj, B. N., & Wishart, D. S. (2019). Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(17), 4897–4914. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00204>

Fox, P. F. (Ed.). (2006). *Advanced dairy chemistry. 2: Lipids* (3. ed). Springer.

H.-D. Belitz et al. (2009). *Food Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg.

<https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>

Jacobsen, N. E. (2007). *NMR spectroscopy explained: Simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*. Wiley-Interscience.

Johnson, C. S. (1999). Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: Principles and applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance*

*Spectroscopy*, 34(3–4), 203–256. [https://doi.org/10.1016/S0079-6565\(99\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6565(99)00003-5)

Klein D. (2015). *Οργανική Χημεία Τόμος II* (Κόκοτος Γ. μεταφρ)

Αθήνα :Υτορία (το πρωτότυπο έργο εκδόθηκε το 2012)

Kobayashi, T., & Matsumura, S. (2011). Enzymatic synthesis and properties of novel biodegradable and biobased thermoplastic elastomers. *Polymer Degradation and Stability*, 96(12), 2071–2079.

<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.10.002>

Kumar R, Bhatia A, Arora D (2009). *Health benefits of conjugated linoleic acid : A review.*

Lam, S.-H., Hung, H.-Y., Kuo, P.-C., Kuo, D.-H., Chen, F.-A., & Wu, T.-S. (2020).

Application of Lanthanide Shift Reagent to the <sup>1</sup>H-NMR Assignments of Acridone Alkaloids. *Molecules*, 25(22), 5383.

<https://doi.org/10.3390/molecules25225383>

Lunn, J., and H. E. Theobald. 2006. *The health effects of dietary unsaturated fatty acids.* Nutr. Bull. 31:178–224

Mansson ,H.(2008) *Fatty acids in bovine milk fat* . Swedish Dairy Association, Lund, Sweden

Miller G.D, Jarvis J.K, Mc Bean L.D (2004). *Handbook of dairy foods and nutrition (Second edition)* CRC Press, New York 423 pp.

Moreau, J., Guillon, E., Pierrard, J., Rimbault, J., Port, M., & Aplincourt, M. (2004).

Complexing Mechanism of the Lanthanide Cations Eu<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, and Tb<sup>3+</sup> with 1,4,7,10-Tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (dota)—Characterization of Three Successive Complexing Phases: Study of the

Thermodynamic and Structural Properties of the Complexes by Potentiometry, Luminescence Spectroscopy, and EXAFS. *Chemistry – A European Journal*, 10(20), 5218–5232.

<https://doi.org/10.1002/chem.200400006>

National Research Council (1996). *Carcinogens and Ant carcinogens in the human diet*. National academy press, Washington, D.C 417

National Research Council (1988). *Designing foods: Animal product options in the marketplace*. National academy press, Washington, D.C.,376

*Nutritional Significance* N M O'Brien and T P O'Connor, University College, Cork, Ireland<sup>a</sup> 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved. (n.d.).

O'Brien, N., & O'Connor, T. P. (2016). Milk Lipids: Nutritional Significance. In Reference Module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00927-6>

Ooms, K. J., Feindel, K. W., Genuis, K., & Gritter, K. (2017). 3.27 Imaging and Diagnosis of Biological Markers ☆. In *Comprehensive Biomaterials II* (pp. 579–605). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09826-X>

Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. (2007), *Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk*, *Small Ruminant Research* 68, p. 88–113

Piechnik, S. K., & Jerosch-Herold, M. (2018). Myocardial T1 mapping and extracellular volume quantification: An overview of technical and biological confounders. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, 34(1), 3–14.

<https://doi.org/10.1007/s10554-017-1235-7>

- Piersanti, E., Campredon, M., Yemloul, M., Torrèsani, B., Farjon, J., Bouguet-Bonnet, S., Duval, L., Nuzillard, J. M., Chimiques (Marseille), E. D. S., Marseille (ISM2), I. des sciences moléculaires de, & others. (2021). *Application and Development of NMR Methods and Signal Processing for the Analysis of Small Molecule Mixtures*. [https://books.google.gr/books?id=i\\_Qj0AEACAAJ](https://books.google.gr/books?id=i_Qj0AEACAAJ)
- Pradini, A., Geromin, D., Conti, F., Masoero, F., Piva, A., and Piva, G. 2001. *Survey on the level of conjugated linoleic acid in dairy products*. Italian Journal of Food Science, 13, 243-253.
- Raynal-Ljutovac, K., G. Lagriffoul, et al. (2008). *Composition of goat and sheep milk products: An update*. Small Ruminant Research 79(1): p. 57-72.
- Ruiz-Rodrigueza Alejandro et al, (2009) *Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids*. Review: May
- Scano, P., Cusano, E., Caboni, P., & Consonni, R. (2019). NMR metabolite profiles of dairy: A review. *International Dairy Journal*, 90, 56–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.11.004>
- Soyler, A., Cikrikci, S., Cavdaroglu, C., Bouillaud, D., Farjon, J., Giraudeau, P., & Oztop, M. H. (2021). Multi-scale benchtop 1H NMR spectroscopy for milk analysis. *LWT*, 139, 110557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110557>
- Stevens, S. (2021). Fat-Soluble Vitamins. *Nursing Clinics of North America*, 56, 33–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.10.003>
- Visioli, F., P. Rise, E. Plasmati, F. Pazzucconi, C. R. Sirtoni, and C. Galli. 2000. *Very low intakes of omega-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerol and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects*. *Pharmacol Ther.* 41:571-576.

- Wu, D. S., & Drive, P. (2011). *1D and 2D NMR Experiment Methods*.
- Yue, J., Zheng, Y., Liu, Z., Deng, Y., Jing, Y., Luo, Y., Yu, W., & Zhao, Y. (2015). Characterization of Volatile Compounds in Microfiltered Pasteurized Milk Using Solid-Phase Microextraction and GC×GC-TOFMS. *International Journal of Food Properties*, 18(10), 2193–2212.  
<https://doi.org/10.1080/10942912.2014.9663>
- Αλεξοπούλου, Α. (2021), *Σύγχρονες φασματοσκοπικές μέθοδοι ανάλυσης τροφίμων με έμφαση στα γαλακτοκομικά προϊόντα*. , Διπλωματική Εργασία . Πάτρα
- Ανυφαντάκης Ε. (2004): *Τυροκομία* (Εκδόσεις Σταμούλης).
- Ανυφαντάκης, Ε., Καλαντζόπουλος, Γ. (1993) , *Γαλακτοκομία*. Τόμος Πρώτος. Εκδόσεις Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς.
- Βουδούρης, Ε. , Κοντομηνάς , Μ. (1983), *Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων*  
Εκδόσεις : Φωτογιούνικα, Ιωάννινα
- Γεροθανάσης Ι., Κολοκούρης Α. , Ματσούκας Ι., Μαυρομούστακος Θ., Μικρός Ε., Παπακωνσταντίνου Κ., Σπυρούλιας Γ. , Τζάκος Α. (2018), *Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός* . Αθήνα: Εκδόσεις συμμετρία
- Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου, Γ. (2009), *Γαλακτοκομία*. Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο.
- Μοάτσου, Γκ., *Γεωργικές Βιομηχανίες-Γαλακτοκομία*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 2009.

