ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ H_2O ΚΑΙ ΤΟΥ *DMSO* ΜΕ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΟΝΤΕΛΑ, ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥΣ

ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ Γ. ΤΑΚΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αναστάσιος Τρογκάνης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων)

Ιωάννης Γεροθανάσης, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Βασίλειος Μελισσάς, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αναστάσιος Τρογκάνης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων)

Ιωάννης Γεροθανάσης, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Βασίλειος Μελισσάς, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεώργιος Πηλίδης, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννης Δεληγιαννάκης, Καθηγητής του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας

Στυλιανός Φούλιας, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Φυσικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δημήτριος Παπαγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

[1] Panteleimon G. Takis, Vasilios S. Melissas, Anastassios N. Troganis: Exploring Three Biomolecule Groups Hydration: New Insights for Oligopeptides Hydration Studies by NMR spectroscopy, *Submitted (December 2011)*.

[2] Panteleimon G. Takis, Vasilios S. Melissas, Anastassios N. Troganis: Elucidation of Oligopeptides Hydration: The case of Dipeptides, *Under Preparation*.

[3] Panteleimon G. Takis, Vasilios S. Melissas, Anastassios N. Troganis: Exploring DMSO interactions with peptides through model compounds by NMR spectroscopy and Theoretical Studies, *Under Preparation*.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

[1] Panteleimon G. Takis, Vasilios S. Melissas, Anastassios N. Troganis: New Horizons in Biomolecular Hydration Through NMR spectroscopy (**Poster**), **21° Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας 2011 (Θεσσαλονίκη) – 1° Βραβείο Poster** (50 συμμετοχές) στον τομέα «Φυσικής & Θεωρητικής Χημείας».

Αφιερωμένο στην Τζατζούφω…

Αντί Προλόγου

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας Βιολογικών Συστημάτων του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Π. Ι.). Το αντικείμενο της έρευνας υποδείχθηκε από τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος, Δρ. **Αναστάσιο Τρογκάνη**, στον οποίο εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για την υπόδειξη του θέματος, τη συνεχή επίβλεψη και συμπαράσταση, καθώς και το αστείρευτο ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Θεωρητικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Π. Ι., Δρ. **Βασίλειο Μελισσά** που ήταν συνεχώς παρών, σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε και για την πολύτιμη βοήθειά του και συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Π. Ι. Δρ. **Ιωάννη Γεροθανάση** για την συμβολή του και πολύτιμες συμβουλές του στην συγγραφή και αποπεράτωση της διατριβής.

Ευχαριστίες απευθύνονται στα υπόλοιπα τέσσερα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να συμμετάσχουν σε αυτήν, στον Δρ. **Ιωάννη Δεληγιαννάκη** Καθηγητή του τμήματος Διαχ. Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Π. Δ. Ελλάδος, στον Δρ. **Γεώργιο Πηλίδη** Καθηγητή του Τμήματος Βιολ. Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Π. Ι., στον Δρ. **Σπύρο Φούλια** Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Φυσικής του Π. Ι., στον Δρ. **Δημήτριο Παπαγιάννη** Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Π. Ι καθώς και στον Δρ. **Σωτήριο Λουκά**, Καθηγητή Στατιστικής του τμήματος Μαθηματικών του Π. Ι. για την πολύτιμη βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Θερμά ευχαριστώ τους συνεργάτες και φίλους από το εργαστήριο Φυσικοχημείας Βιολ. Συστημάτων και Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιολ. Εφαρμογών και Τεχνολογιών και ειδικά τον Δρ. **Θωμά Γιαννόπουλο**, τον **Δημήτριο Μπασαγιάννη**, Msc, την Δρ. **Βασιλική Εξάρχου** και τον Δρ. **Κων/νο Τσιαφούλη** του κέντρου NMR, τον Δρ. **Μιχάλη Μάντζαρη**, τον κ. **Δημήτρη Ντρίβα**, τον κ. **Δόση Βασίλειο**, τον κ. **Ιωάννη Καραγιάννη** και τον κ. **Ιωάννη Σκαρμούτσο** για την συναδελφικότητα και την συνεχή ηθική τους υποστήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου **Γιώργο** και **Κατερίνα** και στις αδερφές μου **Μαρία** και **Βάσια**, για την υλική και ψυχολογική υποστήριξή τους σε κάθε στάδιο της ζωής μου, στους οποίους επίσης αφιερώνω την παρούσα εργασία, με την ελπίδα να αποτελεί μια μικρή ανταμοιβή όλων όσων έχουν προσφέρει σε μένα μέχρι σήμερα.

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε η μελέτη ενυδάτωσης τεσσάρων σημαντικών βιομοριακών ομάδων: των αμινοξέων, των ακετυλο-αμινοξέων, των βεταϊνών και των διπεπτιδίων, με χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε συνδυασμό με υπολογισμούς των συναρτησιοειδών ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT) και η αναλυτική μελέτη (NMR και *ab initio* υπολογισμοί) του συνόλου των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ ενώσεων-μοντέλων μιμητών των πεπτιδίων με τα μόρια του διαλύτη διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO).

Συγκεκριμένα, η μελέτη ενυδάτωσης πραγματοποιήθηκε μέσω της πυρηνικής αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ όλων των παραπάνω βιομορίων και των πυρήνων ^{14}N των ακετυλο-αμινοξέων και βεταϊνών σε υδατικά διαλύματα όξινου και ουδέτερου pH (εκτός των διπεπτιδίων που μελετήθηκαν μόνο σε ουδέτερο pH). Παράλληλα, αποπειράθηκε η σύγκριση / επαλήθευση των φασματοσκοπικών δεδομένων με την θεωρητική μελέτη ενυδάτωσης, μέσω της μεθόδου DFT, της αλανίνης, ακετυλο-αλανίνης, βεταΐνης της αλανίνης και του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη. Έτσι διαπιστώθηκε πως ο βαθμός ενυδάτωσης των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων αποτελείται από τον ίδιο αριθμό μορίων νερού, ενώ η πρωτονιομένη ιοντική κατάσταση των αμινοξέων / ακετυλο-αμινοξέων αλληλεπιδρά με ένα επιπλέον μόριο νερού σε σχέση με αυτή του ουδέτερου pH. Επιπλέον, απεδείχθη ότι ο βαθμός ενυδάτωσης των βεταϊνών παραμένει σταθερός ανεξαρτήτως της ιοντικής τους κατάστασης, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε ότι τα μόρια των βεταϊνών ενυδατώνονται κατά 1-2 και 2-3 μόρια νερού λιγότερο από την ουδέτερου και όξινου pH ιοντική κατάσταση των αμινοξέων / ακετυλο-αμινοξέων αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, η μελέτη ενυδάτωσης των βεταϊνών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η επιπλέον ενυδάτωση των πρωτονιομένων αμινοξέων / ακετυλο-αμινοξέων «ελέγχεται» από την αμινομάδα τους. Όσον αφορά τα διπεπτίδια, εξακριβώθηκε ότι η διπολικού ιόντος κατάστασή τους αλληλεπιδρά με 1-2 μόρια νερού περισσότερο απ' ότι η αντίστοιχη των αμινοξέων. Όλα τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι σε συμφωνία με την αντίστοιχη θεωρητική μελέτη ενυδάτωσης της αλανίνης και των παραγώγων της, ενώ διαπιστώθηκε (και με την χρήση επιπλέον βιβλιογραφικών δεδομένων) πως ο μέσος όρος των άμεσα αλληλεπιδρώντων μορίων

νερού της ουδέτερου pH κατάστασης των αμινοξέων / ακετυλο-αμινοξέων είναι 6 και των βεταϊνών 4.

Η αντίστοιχη μελέτη αλληλεπίδρασης των μορίων DMSO με τα πεπτίδια επικεντρώθηκε στις ομάδες –COOH και –NH των πεπτιδίων και πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενώσεων-μοντέλων που προσομοιάζουν τα πεπτιδικά μόρια. Έτσι, διαπιστώθηκε πως ο διαλύτης DMSO αλληλεπιδρά με πολύ ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου (ενέργειας ~8-9 kcal/mol) με τις συγκεκριμένες ομάδες, ενώ παράλληλα απεδείχθη ότι η συμπλοκοποίηση των μορίων DMSO με τις εν λόγω ομάδες καθοδηγείται εντροπικώς.

Abstract

In this doctorate thesis four biomolecule groups' hydration numbers: the amino acids', the acetyl-amino acids', the betaines' and dipeptides' were investigated by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) in conjunction with density functional theory (DFT) calculations. Furthermore, all interactions between peptides and dimethyl-sulfoxide's molecules were identified in detail (by NMR spectroscopy and *ab initio* calculations).

In particular, hydration studies were based on the $^{13}C_{\alpha}$ nuclei dipolar relaxation of all under study biomolecules and on the ^{14}N nuclei quadrupolar relaxation of acetyl-amino acids and betaines only, in acid and neutral pH (except for dipeptides' hydration studies, which focused on their zwitterionic form, neutral pH). In addition, spectroscopic results were compared / validated with / by DFT calculations for the identification of the first hydration shell of certain prototype molecules namely, Alanine, acetyl-Alanine, Alanine betaine and Alanine-Alanine dipeptide. Spectroscopic results of amino acids and acetyl-amino acids showed that their hydration degree consists of the same number of interacting water molecules, while their protonated form (acid pH) is more hydrated by one water molecule in comparison with the neutral pH form. Betaines' hydration degree remains constant and independent of their ionization state, while betaines interact with 1-2 or 2-3 less water molecules than neutral pH and protonated forms of amino acids / acetyl-amino acids. The above betaines' hydration results revealed that amino group "controls" amino acids and acetyl-amino acids extra hydration in their protonated forms. All spectroscopic results came into perfect agreement with DFT calculations of Alanine's and their derivatives' hydration studies and they revealed (taking into consideration recent hydration studies of glycine betaine) that neural pH forms of amino acids / acetyl-amino acids and betaines directly interact with an average of 6 and 4 water molecules, respectively.

The study of peptides' interactions with DMSO molecules focused on –COOH and -NH groups of peptides (model compounds were used) and revealed that DMSO molecules form very strong hydrogen bonds (their energy ranged between 8 to 9 kcal/mol) with the above study peptide's groups, while the thermodynamic study of the above intermolecular interactions (-COOH···DMSO and -NH···DMSO) revealed that they are entropically favored.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ **7**
ΠΕΡΙΛΗΨΗ **9**
ABSTRACT **11**
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ **15**
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ **25**
ΕΙΣΑΓΩΓΗ **29**
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **31**
1.1 Η ΕΠΙΔΙΑΛΥΤΩΣΗ 31
1.2 ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ 34
1.2.1 Το «χθες» και το «σήμερα» της ενυδάτωσης των αμινοξέων και παραγώγων τους – Πειραματικές και Θεωρητικές προσεγγίσεις *37*
1.3 Ο ΔΙΑΛΥΤΗΣ DMSO (DIMETHYL SULFOXIDE) 39
1.4 Ο ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (NMR) 41
1.4.1 Πυρηνική Μαγνήτιση *41*
1.4.2 Πυρηνική Μετάπτωση *42*
1.4.3 Πυρηνικά Ενεργειακά Επίπεδα εντός Μαγνητικού πεδίου *42*
1.4.4 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) *44*
1.4.5 Πυρηνική Αποκατάσταση (Nuclear Relaxation) *45*
1.4.6 Η χημική μετατόπιση (NMR Chemical Shift) *50*
1.5 ΘΕΩΡΙΑ ΚΒΑΝΤΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ – Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΑΡΤΗΣΙΟΕΙΔΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (DFT) ΚΑΙ ΘΕΩΡΙΑ ΔΙΑΤΑΡΑΞΕΩΣ ΠΟΛΛΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ (MP*N*) 57
1.5.1 Η προσέγγιση Born-Oppenheimer και η αρχή της αντισυμμετρικότητας *61*
1.5.2 Η αρχή των μεταβολών (variational principle) *63*
1.5.3 Η προσέγγιση Hartree-Fock *66*
1.5.4. Αυτοσυνεπές πεδίο (Self Consistent Field) SCF *71*
1.5.5 Ηλεκτρονιακή πυκνότητα και DFT *72*
1.5.6 Συναρτησιοειδή τοπικής πυκνότητας (local density approximation) LDA και spin-τοπικής πυκνότητας (local spin density approximation) LSDA *82*
1.5.7 Συναρτησιοειδή γενικευμένης κλίσης παραγώγου (generalized gradient approximation) GGA *84*
1.5.8 Υβριδικά συναρτησιοειδή *86*
1.5.9 Βασικός μηχανισμός των υπολογισμών DFT *87*
1.5.10 Σύνολα βάσης *91*
1.5.11 Υπολογισμός δονητικών συχνοτήτων *94*
1.5.12 Θεωρία διαταράξεως πολλών σωματιδίων, Møller-Plesset (MPn) *96*
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **99**
2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ 99
2.1.1 Υλικά *99*
2.1.2 Απομάκρυνση παραμαγνητικών ουσιών από τα υδατικά διαλύματα *100*
2.1.3 Παρασκευή N-τριμεθυλο-αμινοξέων (βεταϊνών) *101*
2.1.4 Οργανολογία *102*

2.1.5 Μετρήσεις χρόνων αποκατάστασης των πυρήνων ^{13}C *102*
2.1.6 Μετρήσεις NMR-^{14}N *106*
2.1.7 Στατιστική Ανάλυση *107*
2.1.8 Μέθοδοι κβαντομηχανικής – θεωρητικής προσέγγισης της ενυδάτωσης *107*
2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΛΥΤΗ DMSO 109
2.2.1 Υλικά - Οργανολογία *109*
2.2.2 Μετρήσεις NMR-^{1}H *110*
2.2.3 Μέθοδοι κβαντομηχανικής – θεωρητικής προσέγγισης των αλληλεπιδράσεων του DMSO με τις ομάδες -COOH *111*
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 113
3.1 ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ 113
3.1.1 Αποτελέσματα Μετρήσεων Χρόνων Αποκατάστασης NMR-$^{13}C_{\alpha}$ *113*
3.1.1.1 Αμινοξέα *115*
3.1.1.2 Ακετυλο-αμινοξέα *117*
3.1.1.3 Βεταΐνες *119*
3.1.1.4 Διπεπτίδια *121*
3.1.2 Αποτελέσματα Μετρήσεων NMR-^{14}N *124*
3.1.3 Επεξεργασία – Ανάλυση αποτελεσμάτων NMR-$^{13}C_{\alpha}$ και NMR-^{14}N *129*
3.1.4 Αποτελέσματα Θεωρητικής Προσέγγισης της Ενυδάτωσης *148*
3.1.5 Συσχέτιση Φασματοσκοπικών και Κβαντομηχανικών Αποτελεσμάτων *160*
3.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ –COOH ΚΑΙ –NH ΜΕ ΤΟΝ ΔΙΑΛΥΤΗ DMSO 163
3.2.1 Αποτελέσματα NMR-^{1}H για την ομάδα -COOH *163*
3.2.2 Αποτελέσματα NMR-^{1}H για την ομάδα -NH *170*
3.2.3 Αποτελέσματα Θεωρητικής Προσέγγισης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της –COOH ομάδας με τα μόρια του διαλύτη DMSO *175*
3.2.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων NMR-^{1}H και κβαντομηχανικής προσέγγισης *180*
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι 185
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ NQCC (χ) ΤΩΝ ΠΥΡΗΝΩΝ ^{14}N ΚΑΙ ^{17}O 185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ 189
% ΠΡΩΤΟΝΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ 189
% ΠΡΩΤΟΝΙΩΣΗ ΤΩΝ ΒΕΤΑΪΝΩΝ 190
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ 191
ΔΟΜΕΣ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ – ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ (Ε) 191
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV 217
ΔΟΜΕΣ ΠΡΩΤΟΝΙΟΜΕΝΩΝ ΙΣΟΜΕΡΩΝ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ ΑΛΑΝΙΝΗΣ 217
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V 219
ΔΟΜΕΣ ΟΞΕΩΝ – DMSO 219
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 225

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1	Αλληλεπίδραση μορίων νερού στις διεπιφάνειες συμπλέγματος DNA-πρωτεϊνών.[14*b*]	**34**
Εικόνα 1.2	Το νερό διατηρεί την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Υψηλής Ανάλυσης X-ray κρυσταλλική δομή της κεφαλής της πρωτεΐνης villin σε pH 5.1 (*πορτοκαλί*, 1.55 ˚A ανάλυση) και pH 7.0 (*γκρι*, 0.95 ˚A ανάλυση).[2] Τα μόρια νερού που μεσολαβούν στις διεπιφάνειες της τεταρτοταγούς δμής της πρωτεΐνης (λεπτές γραμμές) απεικονίζονται ως μεγάλες σφαίρες, δείχνοντας ότι τα νερό αποτελεί κομμάτι της πρωτεϊνικής δομής.	**35**
Εικόνα 1.3	Η δομή του πεπτιδικού δεσμού. Η ομάδα –NH αλληλεπιδρά άμεσα μέσω δεσμών υδρογόνου με ένα μόριο του διαλύτη DMSO.	**40**
Εικόνα 1.4	Η γεωμετρία του πιο επικρατούς διμερούς NMF-DMSO. Η γωνία του δεσμού υδρογόνου (N-H···O) ισούται με 170.6^{o}, η απόσταση H···O ισούται με 1.57 Å. Τα συγκεκριμένα γεωμετρικά στοιχεία υποδηλώνουν έναν πολύ ισχυρό δεσμό υδρογόνου.[7]	**40**
Εικόνα 1.5	Ανύσματα μαγνητικής ροπής και στροφορμής	**41**
Εικόνα 1.6	Η συχνότητα Larmor κατά την μετάπτωση του πυρήνα σε ένα στατικό μαγνητικό πεδίο έντασης B_0..	**42**
Εικόνα 1.7	Προσανατολισμός των πυρήνων με I = 1/2 σε μαγνητικό πεδίο εντάσεως B_0. Αριστερά: οι ενεργειακές τους στάθμες. Δεξιά: οι πληθυσμοί των spin.[62]	**43**

Εικόνα 1.8	Η εφαρμογή πεδίου εντάσεως B_1 σε πυρήνα κατά την μετάπτωσή του στην ίδια διεύθυνση του στατικού μαγνητικού πεδίου B_0.	**45**
Εικόνα 1.9	Περιγραφή του σήματος NMR ($\Delta\nu_{1/2}$ είναι το εύρος στο μισό του ύψους του σήματος).	**45**
Εικόνα 1.10	Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 και T_2 σε σχέση με την περιστροφή των μορίων σε ένα διάλυμα (δηλαδή τον χρόνο τ_C), άρα και με το ιξώδες των διαλυμάτων.[109]	**48**
Εικόνα 2.1	Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 (sec) των ^{13}C του φαινυλεθυνίου σε διάλυμα ακετόνης. Στις παρενθέσεις περιγράφονται οι χρόνοι χωρίς την απομάκρυνση του παραμαγνητικού μοριακού οξυγόνου από το διάλυμα.[116]	**101**
Εικόνα 2.2	Η παλμική ακολουθία Inverssion-Recovery.	**103**
Εικόνα 2.3	Η ευρεία ζώνη αποσύζευξης του πρωτονίου (^1H) από τον πυρήνα ^{13}C.	**103**
Εικόνα 2.4	(A) Αναπαράσταση των μαγνητίσεων M και του σήματος ^{13}C NMR της ένωσης $^{13}CHCL_3$ κατά την παλμική ακολουθία Inversion-Recovery. (B) Τα σήματα $^{13}C_\alpha$ NMR για διάφορους χρόνους τ στο ίδιο πείραμα για το αμινοξύ Βαλίνη σε υδατικό διάλυμα pH = 6.0.	**104**
Εικόνα 2.5	Σχηματική περιγραφή δράσης του μοντέλου πολωμένου συνεχούς μέσου IEF-PCM στην πλευρική αλυσίδα της Τυροσίνης. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η κοιλότητα που σχηματίζεται στον υδατικό διαλύτη.	**108**

Εικόνα 2.6	(Α) Η δομή του βενζοϊκού οξέος (Β) Η δομή του οξικού οξέος (Γ) Η δομή του αιθυλεστέρα της Ν-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης.	**110**
Εικόνα 3.1	Η διπολικού ιόντος (επάνω) και πρωτονιομένη (κάτω) κατάσταση των αμινοξέων με τα αντίστοιχα φορτία τους.	**116**
Εικόνα 3.2	Η ουδέτερου pH (πάνω) και πρωτονιομένη (κάτω) κατάσταση των ακετυλο-αμινοξέων με τα αντίστοιχα φορτία τους.	**118**
Εικόνα 3.3	Η διπολικού ιόντος και πρωτονιομένη κατάσταση των βεταϊνών με τα αντίστοιχα φορτία τους.	**120**
Εικόνα 3.4	Το φάσμα ^{13}C-NMR του διπεπτιδίου της Αλανίνης σε υδατικό διάλυμα, pH = 6.0 (κατάσταση διπολικού ιόντος) και T = 298 K και οι αντίστοιχοι χρόνοι αποκατάστασης που μετρήθηκαν για τους α-άνθρακες του διπεπτιδίου. Είναι εμφανές ότι οι κορυφές των χημικών μετατοπίσεων των α-ανθράκων δεν αλληλεπικαλύπτονται, με αποτέλεσμα την εύκολη μελέτη της διπολικής αποκατάστασής τους.	**122**
Εικόνα 3.5	Η διπολικού ιόντος κατάσταση των διπεπτιδίων (μηδενικό συνολικό φορτίο).	**122**
Εικόνα 3.6	Τα φάσματα των πυρήνων ^{14}N της αμινομάδας της ακετυλο-γλυκίνης και βεταΐνης της γλυκίνης σε υδατικό διάλυμα με pH = 6.0. Διακρίνεται η τεράστια διαφορά του εύρους στο μισό του ύψους των κορυφών μεταξύ των δύο μορίων και αναδεικνύεται η σημαντικότητα της συμμετρίας γύρω από τους τετραπολικούς πυρήνες ^{14}N, όσον αφορά την αποκατάστασή τους.	**127**

Εικόνα 3.7	Οι καμπύλες που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.	**131**
Εικόνα 3.8	Οι καμπύλες που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα ακετυλο-αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.	**133**
Εικόνα 3.9	(A) Σύγκριση των καμπυλών που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα αμινοξέα (▬) και ακετυλο-αμινοξέα (▬) των υδατικών τους διαλυμάτων σε pH = 6.0. (B) Σύγκριση των καμπυλών που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα αμινοξέα (▬) και ακετυλο-αμινοξέα (▬) των υδατικών τους διαλυμάτων σε όξινο pH. Είναι προφανές ότι οι καμπύλες συμπίπτουν για κάθε pH (οι τιμές $1/NT_1$ σε Hz), υποδηλώνοντας τον ίδιο βαθμό ενυδάτωσης σε κάθε περίπτωση.	**135**
Εικόνα 3.10	Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων για τα αμινοξέα και ακετυλο-αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το όξινο pH και (■) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*). Οι διακεκομμένες ευθείες περιγράφουν την διαφορά μοριακού βάρους για μία ίδια τιμή $1/NT_1$ μεταξύ των δύο pH. Φαίνεται ότι ο βαθμός ενυδάτωσης των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων στο όξινο υδατικό περιβάλλον περιλαμβάνει ένα επιπλέον μόριο νερού σε σχέση με το ουδέτερο.	**136**

Εικόνα 3.11	(A) Οι καμπύλες που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τις βεταΐνες στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων. (B) Η καμπύλη που προκύπτει από την ομαδοποίηση των δεδομένων των βεταϊνών από τις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.	**138**
Εικόνα 3.12	Το σύνολο των καμπυλών που προκύπτουν για τα αμινοξέα, ακετυλο-αμινοξέα και βεταΐνες στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων και οι διαφορές του βαθμού ενυδάτωσής τους.	**139**
Εικόνα 3.13	Η καμπύλη που προκύπτει από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα διπεπτίδια στην τιμή pH = 6.0 των υδατικών τους διαλυμάτων: (♦) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*).	**140**
Εικόνα 3.14	Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων για τα αμινοξέα/ακετυλο-αμινοξέα και διπεπτίδια σε pH = 6.0 των υδατικών τους διαλυμάτων: (♦) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για τα διπεπτίδια και (■) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για τα αμινοξέα/ακετυλο-αμινοξέα ως προς το μοριακό τους βάρος (Mw). Οι διακεκομμένες ευθείες περιγράφουν την διαφορά μοριακού βάρους για μία ίδια τιμή $1/NT_1$ μεταξύ των δύο υπό μελέτη βιομοριακών ομάδων. Φαίνεται ότι ο βαθμός ενυδάτωσης των διπεπτιδίων περιλαμβάνει 1-2 επιπλέον μόρια νερού σε σχέση με των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων, για pH = 6.0.	**141**

Εικόνα 3.15	Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων $\Delta\nu_{1/2}$ για τα ακετυλο-αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το όξινο pH και (■) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*). Οι διακεκομμένες ευθείες περιγράφουν την διαφορά μοριακού βάρους για μία ίδια τιμή $\Delta\nu_{1/2}$ μεταξύ των δύο pH. Διακρίνεται ότι ο βαθμός ενυδάτωσης ακετυλο-αμινοξέων στο όξινο υδατικό περιβάλλον περιλαμβάνει 1 επιπλέον μόριο νερού (λιγότερα από 2) σε σχέση με το ουδέτερο.	**145**
Εικόνα 3.16	Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων $\Delta\nu_{1/2}$ για τις βεταΐνες στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το όξινο pH και (■) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (Mw).	**146**
Εικόνα 3.17	Η δομή της κατάστασης διπολικού ιόντος της αλανίνης σε υδατικό διάλυμα.	**149**
Εικόνα 3.18	Οι πιθανές δομές της πρωτονιομένης κατάστασης του αμινοξέος αλανίνη. Η δομή Α εμφανίζεται με την χαμηλότερη ενέργεια (Παράρτημα ΙΙΙ), με αποτέλεσμα την επικράτησή της στο υδατικό διάλυμα όξινου pH.	**151**
Εικόνα 3.19	(Α) Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της κατάστασης διπολικού ιόντος της αλανίνης (6 μόρια νερού), με το σχηματισμό της δομής γέφυρας. (Β) Η αντίστοιχη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης της πρωτονιομένης κατάστασης της αλανίνης (7 μόρια νερού), όπου παύει να σχηματίζεται η δομή γέφυρας.	**152**

Εικόνα 3.20	(A) Η δομή του μορίου της ακετυλο-αλανίνης σε υδατικό διάλυμα με pH = 6.0. (B) Η αντίστοιχη δομή της πρωτονιομένης κατάστασης της ακετυλο-αλανίνης.	**153**
Εικόνα 3.21	(A) Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της ακετυλο-αλανίνης σε υδατικό διάλυμα ουδέτερου pH (6 μόρια νερού), με το σχηματισμό της δομής γέφυρας (B) Η αντίστοιχη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης της πρωτονιομένης κατάστασης της ακετυλο-αλανίνης (7 μόρια νερού), όπου παύει να σχηματίζεται η δομή γέφυρας.	**155**
Εικόνα 3.22	(A) Η δομή της κατάστασης διπολικού ιόντος της βεταΐνης της αλανίνης σε υδατικό διάλυμα (B) Η αντίστοιχη δομή της πρωτονιομένης κατάστασης του μορίου της βεταΐνης της αλανίνης.	**157**
Εικόνα 3.23	(A) Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της βεταΐνης της αλανίνης στη κατάσταση διπολικού ιόντος (4 μόρια νερού) (B) Η αντίστοιχη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης της πρωτονιομένης κατάστασης της βεταΐνης της αλανίνης (4 μόρια νερού).	**158**
Εικόνα 3.24	Η δομή της κατάστασης διπολικού ιόντος του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη σε υδατικό διάλυμα.	**159**

Εικόνα 3.25	Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη στη κατάσταση διπολικού ιόντος (7 μόρια νερού). Όπως απεικονίζεται εμφανίζονται 3 δομές γέφυρας με τη συμμετοχή 3 μορίου νερού (2 στο αμινοτελικό άκρο και 1 στην ιμινο ομάδα) και η δομή των τεσσάρων αλληλεπιδρώντων μορίων νερού με το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει η ίδια με τα αμινοξέα, αετυλο-αμινοξέα και βεταΐνες.	**160**
Εικόνα 3.26	Παρατηρείται ότι 4 μόρια νερού αλληλεπιδρούν παρόμοια με την καρβοξυλομάδα της αλανίνης, της ακετυλο-αλανίνης και της βεταΐνης της αλανίνης ανεξαρτήτως της ιοντικής κατάστασής των. Αυτό αναδεικνύει το ρόλο της αμινο και ιμινο ομάδας στην επιπλέον ενυδάτωση της πρωτονιομένης κατάστασης της αλανίνης και ακετυλο-αλανίνης.	**162**
Εικόνα 3.27	Οι ισορροπίες που συμβαίνουν μεταξύ των μορίων ενός καρβοξυλικού οξέος με τα μόρια του διαλύτη DMSO σε διάλυμα άνυδρου DMSO: (1) Ο σχηματισμός διμερούς, K_1 η σταθερά σχηματισμού του και (2) Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ ενός μορίου καρβοξυλικού οξέος με ένα μόριο DMSO, K_2 η σταθερά σχηματισμού του υδρογονικού δεσμού.	**163**
Εικόνα 3.28	(Επάνω) Διακρίνεται η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του βενζοϊκού δακτυλίου κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του βενζοϊκού οξέος σε DMSO (25 ^{0}C). (Κάτω) Παρόμοια παρατηρείται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του DMSO κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του βενζοϊκού οξέος (25 ^{0}C).	**167**

Εικόνα 3.29	(Επάνω) Διακρίνεται η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων της μεθυλομάδας του οξικού οξέος κατά την αύξηση της συγκέντρωσής του σε DMSO (25 ^{0}C). (Κάτω) Παρόμοια παρατηρείται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του DMSO κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος (25 ^{0}C).	**168**
Εικόνα 3.30	Η ισορροπία που πραγματοποιείται μεταξύ των μορίων μίας ένωσης που περιλαμβάνει έναν πεπτιδικό δεσμό με τα μόρια του διαλύτη DMSO σε διάλυμα άνυδρου DMSO. Παρατηρείται ο δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του ιμιδικού υδρογόνου της ομάδας -NH με ένα μόριο DMSO, K_1 η σταθερά σχηματισμού του υδρογονικού δεσμού.	**170**
Εικόνα 3.31	(Επάνω) Διακρίνεται η διαφορά των ^{1}H-NMR χημικών μετατοπίσεων της –NH ομάδας της υπό μελέτη ένωσης κατά την αύξηση της συγκέντρωσής της σε DMSO (25 ^{0}C). (Κάτω) Παρόμοια παρατηρείται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του DMSO κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της υπό μελέτη ένωσης (25 ^{0}C).	**173**
Εικόνα 3.32	(Α), (Β) Η δομή του οξικού οξέος σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα. (Γ), (Δ) Η δομή του DMSO σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι οι δομές υπολογίστηκαν με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO).	**176**

Εικόνα 3.33	(A), (B) Η βέλτιστη δομή του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO).	**177**
Εικόνα 3.34	(A), (B) Η βέλτιστη δομή του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO) και σταθερή την τιμή της απόστασης του δεσμού υδρογόνου και της δίεδρης γωνίας O_t - H_t - $O_{t'}$ – $S_{t'}$.	**178**
Εικόνα 1.Π1	Παραδείγματα από το εύρος στο μισό του ύψους των κορυφών NMR-^{14}N ($W_{1/2}$), των χρόνων αποκατάστασης (T_q) και των τιμών χ των πυρήνων ^{14}N σε κάθε περίπτωση.	**186-187**
Εικόνα 1.Π4	Το σύνολο των πιθανών διαμορφώσεων της πρωτονιομένης ακετυλο-αλανίνης. Ο μπλε διακεκομμένος κύκλος δείχνει την προτιμητέα (χαμηλότερη ενεργειακά) δομή της πρωτονιομένης ακετυλο-αλανίνης.	**217**
Εικόνα 2.Π4	Το σύνολο των πιθανών διαμορφώσεων της πρωτονιομένης βεταΐνης της αλανίνης. Ο μπλε διακεκομμένος κύκλος δείχνει την προτιμητέα (χαμηλότερη ενεργειακά) δομή της πρωτονιομένης βεταΐνης της αλανίνης.	**218**

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1	Ατομικές Μονάδες	**61**
Πίνακας 2.1	Οι βεταΐνες που συντέθηκαν και η απόδοση της σύνθεσής τους	**102**
Πίνακας 3.1	Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των αμινοξέων σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων(± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.	**117**
Πίνακας 3.2	Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των ακετυλο-αμινοξέων σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων(± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.	**119**
Πίνακας 3.3	Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των βεταϊνών σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων(± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.	**121**
Πίνακας 3.4	Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των διπεπτιδίων σε υδατικά διαλύματα με pH = 6.0 (± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.	**123**

Πίνακας 3.5	Το εύρος στο μισό του ύψους ($\Delta\nu_{1/2}$) των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των ακετυλο-αμινοξέων σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων, σε θερμοκρασία T = 308 K.	**126**
Πίνακας 3.6	Τιτλοδότηση της βεταΐνης της γλυκίνης στους 308 K.	**128**
Πίνακας 3.7	Το εύρος στο μισό του ύψους ($\Delta\nu_{1/2}$) των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των βεταϊνών σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων, σε θερμοκρασία T = 308 K.	**128**
Πίνακας 3.8	Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στα αμινοξέα για δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.	**132**
Πίνακας 3.9	Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στα ακετυλο-αμινοξέα για δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.	**133**
Πίνακας 3.10	Η στατιστική ανάλυση *F-test* για τις καμπύλες των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων για κάθε pH. Η τιμές F και P υποδηλώνουν ξεκάθαρα την σύμπτωση των καμπυλών. Επιπλέον δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών που προκύπτουν μετά την ομαδοποίηση των δεδομένων των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων ανά pH.	**134**

Πίνακας 3.11	Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στις βεταΐνες για δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.	**137**
Πίνακας 3.12	Η στατιστική ανάλυση *F-test* για τις καμπύλες των βεταϊνών για κάθε pH. Η τιμές *F* και *P* υποδηλώνουν ξεκάθαρα την σύμπτωση των καμπυλών. Επιπλέον δίνεται η εξίσωση της καμπύλης που προκύπτει μετά την ομαδοποίηση των δεδομένων των βεταϊνών.	**137**
Πίνακας 3.13	Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στα διπεπτίδια για την τιμή pH = 6.0 των υδατικών τους διαλυμάτων.	**141**
Πίνακας 3.14	Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.15) για τις τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των ακετυλο-αμινοξέων για τις τιμές pH = 6.0 και pH = 1.8 των υδατικών τους διαλυμάτων.	**144**
Πίνακας 3.15	Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.15) για τις τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των βεταϊνών για τις τιμές pH = 6.0 και pH = 1.3 των υδατικών τους διαλυμάτων.	**146**
Πίνακας 3.16	Η στατιστική ανάλυση *F-test* για τις καμπύλες των βεταϊνών για κάθε pH. Η τιμές *F* και *P* υποδηλώνουν ξεκάθαρα την σύμπτωση των καμπυλών.	**147**

Πίνακας 3.17	Οι σταθερές K_1 και K_2 σε 5 θερμοκρασίες για το βενζοϊκό και οξικό οξύ σε DMSO	**168**
Πίνακας 3.18	Η θερμοδυναμική ανάλυση των συμπλόκων που σχηματίζονται σε διαλύματα βενζοϊκού και οξικού οξέος σε DMSO	**169**
Πίνακας 3.19	Η σταθερά K σε 5 θερμοκρασίες για τον αιθυλεστέρα της N-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης σε DMSO μέσω των χημικών μετατοπίσεων ^{1}H-NMR του DMSO και της –NH ομάδας.	**174**
Πίνακας 3.20	Η θερμοδυναμική ανάλυση του συμπλόκου NH···DMSO για τον αιθυλεστέρα της N-ακετυλο-2-κυανιο-Γλυκίνης σε διάλυμα DMSO.	**174**
Πίνακας 3.21	Θεωρητική προσέγγιση των ενεργειών του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται.	**179**

Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποδειχθεί ποικιλοτρόπως και είναι πλέον δεδομένο ότι η λειτουργικότητα όλων των βιομορίων εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή τους. Οι τομείς της μοριακής βιοφυσικής, θεωρητικής χημείας και φυσικοχημείας αποσκοπούν στην μελέτη των βιομοριακών δομών και τις αιτίες που οδηγούν στη διαμόρφωσή τους. Η κατάληξη όλων των δομικών μελετών έως σήμερα, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το σύνολο των βιομοριακών δομών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον διαλύτη στον οποίο δραστηριοποιούνται τα βιομόρια (αμινοξέα, πρωτεΐνες κλπ.). Οι κύριοι βιομοριακοί διαλύτες είναι κυρίως το νερό (βιολογικός διαλύτης), ενώ παράλληλα το διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) αποτελεί έναν ακόμη διαλύτη που χρησιμοποιείται για την δομική και λειτουργική μελέτη ορισμένων βιομορίων, όπως τα ένζυμα και άλλα πεπτίδια.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει **σκοπό** τη συστηματική πειραματική και θεωρητική μελέτη της ενυδάτωσης των δομικών λίθων των πρωτεϊνών, των αμινοξέων, καθώς και άλλων παραγώγων τους όπως των ακετυλο-αμινοξέων, των βεταϊνών και των ολιγοπεπτιδίων με απώτερο στόχο την κατανόηση και διαλεύκανση της πολύπλοκης δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών και των περαιτέρω αλληλεπιδράσεων τους με άλλα βιομόρια. Παράλληλα, η χρήση διαφορετικών πειραματικών τεχνικών και από «πρώτες αρχές» θεωρητικών προσεγγίσεων οδήγησε στην θερμοδυναμική ανάλυση όλων των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των πεπτιδίων και των μορίων του διαλύτη DMSO.

Συγκεκριμένα, το θεωρητικό μέρος της διατριβής περιλαμβάνει την εννοιολογική προσέγγιση του όρου της επιδιαλύτωσης των μορίων σε ένα διάλυμα, καθώς και όλων των ειδών των αλληλεπιδράσεων που υφίστανται τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας με τα μόρια του εκάστοτε διαλύτη. Επιπλέον, γίνεται μια ιστορική αναδρομή των έως τώρα πειραματικών και θεωρητικών προσεγγίσεων του φαινομένου της ενυδάτωσης των βιομορίων και πιο συγκεκριμένα των αμινοξέων και κάποιων παραγώγων τους, και των αντίστοιχων αλληλεπιδράσεών τους με τα μόρια του διαλύτη DMSO, ενώ διευκρινίζονται λεπτομερώς οι φασματοσκοπικές και κβαντομηχανικές τεχνικές προσέγγισης των παραπάνω φαινομένων που ακολουθήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Στη συνέχεια ακολουθεί το πειραματικό μέρος που χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος αναφέρονται λεπτομερώς οι μέθοδοι φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού

συντονισμού και θεωρίας συναρτησιακού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT) που χρησιμοποιήθηκαν στην προσέγγιση της ενυδάτωσης των αμινοξέων, των ακετυλο-αμινοξέων, των βεταϊνών και των διπεπτιδίων.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η φασματοσκοπική προσέγγιση και οι ενεργειακοί θεωρητικοί υπολογισμοί μεγάλης ακρίβειας των αλληλεπιδράσεων και των σχηματιζόμενων συμπλόκων μεταξύ ενώσεων-μοντέλων των πεπτιδίων με τα μόρια του διαλύτη DMSO.

Τέλος, στο τρίτο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής αναφέρονται όλες οι φασματοσκοπικές και θεωρητικές μετρήσεις και ακολουθεί η επεξεργασία τους. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, είναι η ανάδειξη της πρώτης σφαίρας ενυδάτωσης των αμινοξέων και των προαναφερθέντων παραγώγων τους, ενώ παράλληλα εισάγεται μια νέα, λεπτομερειακή μέθοδος, μέσω του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, για την μελέτη της ενυδάτωσης των αμινοξέων και ολιγοπεπτιδίων στις διάφορες ιοντικές τους καταστάσεις. Παράλληλα, αποσαφηνίζεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων με τα μόρια του διαλύτη DMSO και απαντάται ένα καίριο ερώτημα: οι δομικές μελέτες πεπτιδίων σε διαλύτη DMSO είναι ικανές να εξάγουν αληθή συμπεράσματα για την πραγματική δομή των και λειτουργίας των;.

1 Θεωρητικό Μέρος

1.1 Η επιδιαλύτωση

Η μελέτη της επιδιαλύτωσης των μορίων μιας ουσίας σε κάποιο διαλύτη αποτελεί μια ενδελεχή, διαχρονική έρευνα της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας. Το γεγονός αυτό δεν περιγράφεται από «τυχαιότητα» αλλά από «αναγκαιότητα». Η βαθιά κατανόηση του φαινομένου της επιδιαλύτωσης δεν επάγεται μόνο από την ενδιαφέρουσα και άξια έρευνας πολυπλοκότητάς του, αλλά και από την ουμανιστική προσφορά του, αφού όλες οι βιοχημικές αντιδράσεις των οργανισμών γίνονται σε υδατικά διαλύματα,[1, 2] η λειτουργικότητα όλων των βιομορίων (αμινοξέα, πρωτεΐνες, DNA, RNA)[3-5] και οι δράσεις των φαρμάκων[6] εξαρτώνται από την επιδιαλύτωσή τους, οι χημικές αντιδράσεις παραγωγής πολυμερών καθώς και το σύνολο των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιούνται σε υποστρώματα διαφόρων διαλυτών.[7]

Αρχικά, επιβάλλεται η επεξήγηση του φαινομένου της επιδιαλύτωσης καθώς και ο διαχωρισμός του από δύο άλλες συγκεχυμένες έννοιες με αυτό, την διάλυση και τη διαλυτότητα. **Επιδιαλύτωση**, κατά *IUPAC*,[8] είναι η αλληλεπίδραση των μορίων μιας διαλυμένης ουσίας με τα μόρια του διαλύτη, οδηγώντας στην σταθεροποίηση της διαλυμένης ουσίας στο διάλυμα. Η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται με την αύξηση της εντροπίας του συστήματος, κάνοντας τη διαλυμένη ουσία θερμοδυναμικά πιο σταθερή απ' όταν βρίσκεται εκτός αυτού. Για παράδειγμα, η επιδιαλυτωμένη κατάσταση μιας ουσίας, περιγράφει την συμπλοκοποίηση ενός ιόντος της, των πολικών ή μη πολικών ομάδων της γενικότερα, στο διάλυμα με τα αντίστοιχα μόρια του εκάστοτε διαλύτη. Η έννοια της αλληλεπίδρασης αυτής, μπορεί επίσης να αφορά και μη διαλυτές ουσίες, όπως για παράδειγμα την επιδιαλύτωση των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια μιας ρητίνης, όπου επικρατεί η ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των πόρων της ρητίνης και του διαλύτη.[9] Γενικότερα, η λέξη «κλειδί» για την κατανόηση της επιδιαλύτωσης είναι η **αλληλεπίδραση**.

Όσον αφορά το φαινόμενο της **διάλυσης**, χαρακτηρίζεται από τη διαδικασία σχηματισμού ενός ομογενούς διαλύματος από μια στερεή, υγρή ή αέρια ουσία με έναν συνήθως υγρό διαλύτη και περιγράφεται από την ταχύτητα κινητικής της διεργασίας

αυτής. Ασφαλώς, η διαδικασία της διάλυσης διέπεται από τους νόμους της θερμοδυναμικής.

Διαλυτότητα ορίζεται η αναλυτική σύνθεση ενός κορεσμένου διαλύματος και εκφράζεται ως το ποσοστό μιας συγκεκριμένης διαλυμένης ουσίας σε ένα καθορισμένο διαλύτη.[8] Η διαλυτότητα μπορεί να εκφραστεί σε μονάδες συγκέντρωσης, αναλογία γραμμομορίων, γραμμομοριακό κλάσμα και άλλες μονάδες και προκύπτει από τις ταυτόχρονες διαδικασίες της διάλυσης και του σχηματισμού φάσεων στο διάλυμα (π.χ. η καθίζηση των στερεών), καθώς αυτές πραγματοποιούνται με σταθερό ρυθμό. Συχνά ορίζεται ως διαλυτότητα, η ικανότητα διάλυσης μιας ουσίας σε μια άλλη.

Έχοντας λοιπόν ξεκαθαρίσει την έννοια της επιδιαλύτωσης, κρίνεται αναγκαίο να προσδιοριστούν οι αλληλεπιδράσεις που υφίστανται τα μόρια του διαλύτη με τα μόρια της διαλυμένης ουσίας σε αυτόν. Οι αλληλεπιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα την άμεση εξάρτηση της επιδιαλύτωσης από τη φύση του διαλύτη και της επιδιαλυτωμένης ουσίας.

Είναι γνωστό, ότι οι διαλύτες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την πολικότητά τους, που καθορίζεται από τη διηλεκτρική σταθερά του κάθε διαλύτη, σε πολικούς (πρωτικούς, νερό, και απρωτικούς, DMSO, κλπ) και μη πολικούς (εξάνιο, χλωροφόρμιο κλπ).[10] Η μοριακή δομή των πολικών διαλυτών, που στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετώνται δύο από αυτούς, χαρακτηρίζεται από την παρουσία διπόλων στα μόριά τους. Τα πολικά μόρια αυτών των διαλυτών μπορούν να επιδιαλυτώσουν ιόντα, έχοντας την ικανότητα του προσανατολισμού ενός ποσοστού των φορτισμένων μορίων τους σε σχέση με το υπό διάλυση ιόν, λόγω της ηλεκτροστατικής τους έλξης. Το γεγονός αυτό προάγει τη σταθερότητα του συστήματος (δ/της – δ/νη ουσία), δημιουργώντας την λεγόμενη σφαίρα επιδιαλύτωσης, η οποία, αναλόγως με το πόσο άμεσα αλληλεπιδρούν τα μόρια του διαλύτη με τη διαλυμένη ουσία, προσδιορίζεται ως πρώτη (first solvation shell), δεύτερη κτλ.

Οι αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της επιδιαλύτωσης μιας ουσίας σε ένα διαλύτη ποικίλλουν. Οι δεσμοί υδρογόνου, οι ιόντος – διπόλου και διπόλου – διπόλου αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν κυρίως σε πολικούς διαλύτες. Παράλληλα, εμφανίζονται και άλλου είδους αλληλεπιδράσεις, όπως οι van der Waals λόγω των ελκτικών δυνάμεων διασποράς μεταξύ στιγμιαίων διπόλων – επαγόμενων διπόλων (London dispersion forces) και λόγω των απωστικών δυνάμεων ανταλλαγής από την αλληλοεπικάλυψη ηλεκτρονιακών νεφών ατόμων που έρχονται σε πολύ κοντινή

απόσταση και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μέσω της παρουσίας μη πολικών ομάδων στο νερό.[11]

Ο **δεσμός υδρογόνου** αποτελεί την κύρια αλληλεπίδραση ενός ατόμου υδρογόνου με ένα άλλο ηλεκτραρνητικό άτομο, που συνήθως είναι ένα άτομο αζώτου, οξυγόνου ή φθορίου και προέρχεται από ένα άλλο μόριο ή μια άλλη χημική ομάδα στο ίδιο μόριο με το υδρογόνο. Το άτομο του υδρογόνου πρέπει να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα άλλο ηλεκτραρνητικό άτομο. Τον Ιούλιο του 2011, οι *E. Arunan et al.*,[12] μέσω μιας σειράς πειραματικών και θεωρητικών προσεγγίσεων, πρότειναν έναν νέο ορισμό για τον δεσμό υδρογόνου: «Ο δεσμός υδρογόνου είναι μια ελκτική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός ατόμου υδρογόνου (που ανήκει σε ένα μόριο ή ένα μοριακό "κομμάτι" X-H, στο οποίο το άτομο X είναι πιο ηλεκτραρνητικό από το H) και ενός ατόμου ή μιας ομάδας ατόμων στο ίδιο ή σε διαφορετικό μόριο, όπου υπάρχει απόδειξη σχηματισμού ενός δεσμού», και τα **κριτήρια** που πρέπει να ισχύουν για τον σχηματισμό και την ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου (για παράδειγμα μεταξύ X-H···Y-Z) είναι τα εξής:

1. Ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου περιλαμβάνει την συμμετοχή δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως, δυνάμεων που προέρχονται από τη μεταφορά φορτίου (ηλεκτρονίων) μεταξύ του δότη και του δέκτη οδηγώντας σε έναν αμιγώς ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ των ατόμων H και Y και των δυνάμεων που πηγάζουν από φαινόμενα διασποράς.

2. Τα άτομα X και H είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα μεταξύ τους και ο δεσμός X-H πρέπει να είναι πολωμένος. Η ισχύς του υδρογονικού δεσμού H···Y αυξάνει με την αύξηση της ηλεκτραρνητικότητας του ατόμου X.

3. Η γωνία του δεσμού X-H···Y είναι συνήθως γραμμική (180°) και μεγαλύτερη από τις 110°. Όσο πλησιάζει την γραμμικότητα τόσο πιο ισχυρός γίνεται ο δεσμός υδρογόνου.

4. Το μήκος του δεσμού X-H αυξάνεται κατά το σχηματισμό του δεσμού υδρογόνου, με αποτέλεσμα όσο μεγαλύτερη επιμήκυνση υφίσταται ο δεσμός X-H, τόσο πιο ισχυρός είναι ο δεσμός υδρογόνου X-H···Y.

5. Ο δεσμός υδρογόνου (X-H···Y) οδηγεί στην αποπροστασία του πυρήνα H στο δίπολο X-H, μέσω της spin-spin σύζευξης[1] μεταξύ των X και Y πυρήνων με αποτέλεσμα τον άμεσο εντοπισμό του με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR.

6. Τέλος, η ελεύθερη ενέργεια Gibbs του σχηματισμού του δεσμού υδρογόνου, πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη θερμική ενέργεια του συστήματος πυρήνων που συμμετέχει στην δημιουργία του δεσμού.

Οι αλληλεπιδράσεις που μελετώνται στην παρούσα διατριβή αναφέρονται στα μόρια των διαλυτών νερό και DMSO με ορισμένες ομάδες βιομορίων και εντοπίζονται κυρίως στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Για τον λόγο αυτό προηγήθηκε η εκτενής ανάλυση μόνο για τους δεσμούς υδρογόνου και όχι για όλες τις αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται κατά την επιδιαλύτωση των μορίων. Παρακάτω ακολουθούν η επεξήγηση και προσφορά του τρόπου αλληλεπίδρασης των μορίων του νερού και DMSO με ορισμένες κατηγορίες βιομορίων, καθώς και οι μεθοδολογίες προσέγγισης αυτών των αλληλεπιδράσεων.

1.2 Ενυδάτωση Βιομορίων

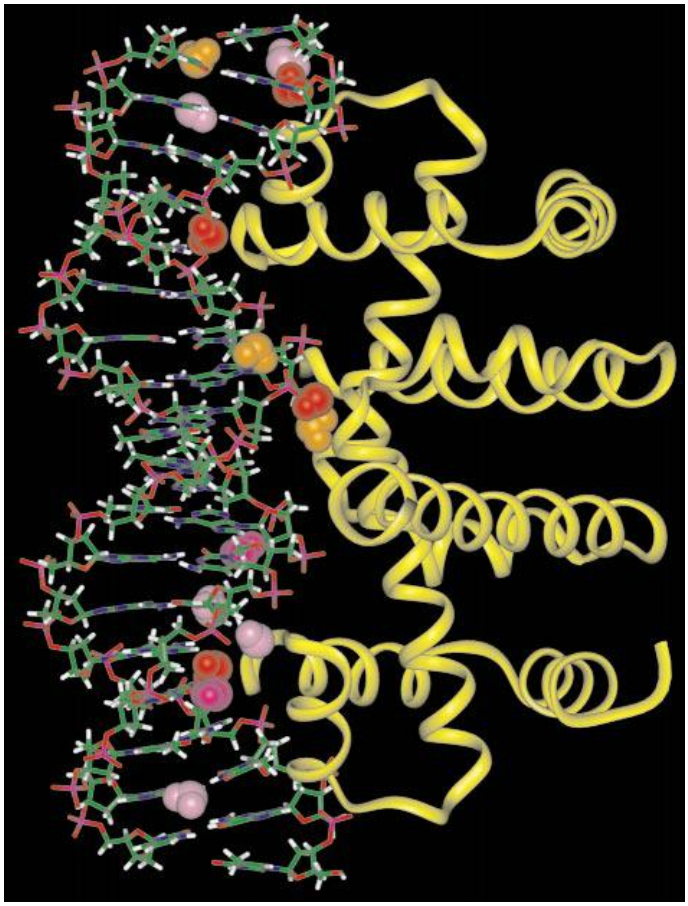
Ένα μεγάλο ποσοστό σύγχρονων ερευνών της μοριακής βιολογίας, της βιολογικής χημείας και της φυσικοχημείας έχει στραφεί σε μελέτες «κοινωνιολογικού» χαρακτήρα σε μοριακό επίπεδο, μελετώντας τις σχέσεις-αλληλεπιδράσεις των βιομορίων μεταξύ των και με το κυτταρικό περιβάλλον γενικότερα, με σκοπό την πλήρη κατανόηση της λειτουργίας των κυττάρων. Τα ένζυμα - πρωτεΐνες έχουν το ρόλο του ενορχηστρωτή της ροής της πληροφορίας, ενέργειας και «υλικών» στο κύτταρο και τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA, RNA) κατέχουν το ρόλο του προγραμματιστή των κυτταρικών λειτουργιών. Το περιβάλλον στο οποίο τα παραπάνω βιομόρια εκτελούν τα «καθήκοντά» τους, αποτελείται από νερό και κάποια μικρά μόρια όπως ιόντα, κτλ. και θεωρείται ως ο «καμβάς» της κυτταρικής λειτουργίας και του φαινομένου της ζωής. Το μέσο λοιπόν, μέσα στο οποίο εκτυλίσσονται οι απαραίτητες διεργασίες για την ύπαρξη ζωής, αποτελείται κυρίως από νερό. Επομένως, η διερεύνηση της προσφοράς του μέσου για την ορθή λειτουργία των βιομορίων είναι

[1] Spin-spin σύζευξη καλείται η σύζευξη δύο πυρηνικών spin που γειτνιάζουν λόγω της επίδρασης των ηλεκτρονιακών νεφών τους στο μαγνητικό πεδίο στο οποίο βρίσκονται.

αναπόφευκτη, αποσκοπώντας στην περαιτέρω κατανόηση των κυτταρικών διεργασιών, γι' αυτό τον λόγο άλλωστε και το νερό έχει το προσωνύμιο «ο διαλύτης της ζωής».[2]

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα μόρια νερού ασκούν προστασία στις βάσεις του RNA[5] και DNA,[13] ενώ παράλληλα σηματοδοτούν την πρόσδεση και αλληλεπίδραση πρωτεϊνών μαζί τους(Εικόνα 1.1).[2, 14-17]

Επιπλέον στις μέρες μας είναι ευρέως γνωστό ότι η σταθερότητα, δομή και λειτουργικότητα του μεγαλύτερου μέρους των πρωτεϊνών ρυθμίζεται από την ενυδάτωσή τους. Κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, το νερό μεσολαβεί για την διατήρηση μιας ενεργειακής ισορροπίας και συμμετέχει στη μοριακή αναγνώριση μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων συνεισφέροντας στη ενθαλπική ή εντροπική σταθεροποίηση (Εικόνα 1.2).

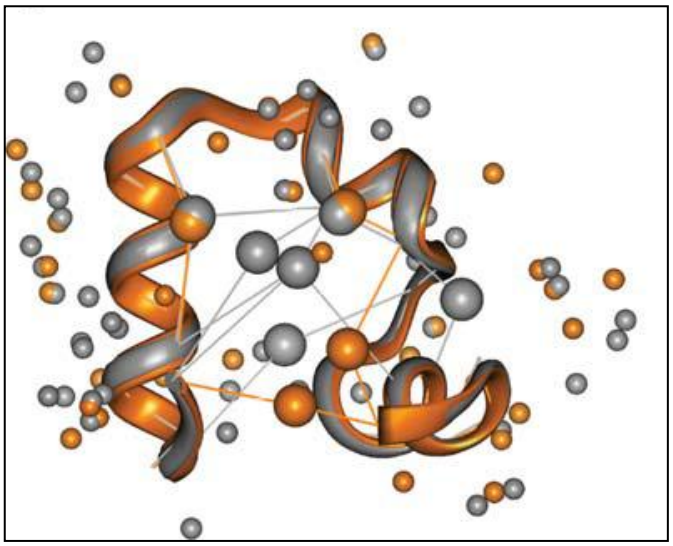


Εικόνα 1.1 Αλληλεπίδραση μορίων νερού στις διεπιφάνειες συμπλέγματος DNA-πρωτεϊνών.[14*b*]

Έρευνες έχουν δείξει ότι η πυκνότητα του νερού στην πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης των πρωτεϊνών είναι 10-20 % υψηλότερη απ' ότι στο υπόλοιπο του διαλύματος.[18, 19]

Πράγματι, τα μόρια νερού της πρώτης σφαίρας ενυδάτωσης έχουν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων καθώς κάποια από αυτά συνδέονται σε συγκεκριμένες θέσεις συμπληρώνοντας χάσματα ή κοιλότητες, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται κρυσταλλογραφικά ως κομμάτια των πρωτεϊνών.[20-24] Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι η γενική θεώρηση που αναφέρει το νερό ως ένα «βιομόριο», ή το 21° αμινοξύ, αποδεικνύεται να είναι αληθής.

Η συνέργια των πρωτεϊνών για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες είναι απαραίτητη και αναπόφευκτη. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από την τοπολογία των πρωτεϊνικών επιφανειών και στη σηματοδότησή τους. Σε αυτήν την περίπτωση για άλλη μια φορά το νερό αναλαμβάνει να προσελκύσει, να σηματοδοτήσει καθώς και να σταθεροποιήσει αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Η έλξη πριν την αλληλεπίδραση δύο πρωτεϊνών σηματοδοτείται με την αποδέσμευση μορίων νερού από την υποψήφια διεπιφάνεια της επερχόμενης αλληλεπίδρασης, επιτρέποντας την προσέγγιση των πολικών ομάδων μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων. Επιπλέον, τα μόρια του νερού μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου προσθέτουν μια ευελιξία και μια επιπλέον σταθερότητα στο σχηματισμό των πρωτεϊνικών συμπλόκων, γεφυρώνοντας χάσματα που τυχόν δημιουργούνται στις διεπιφάνειες.[25]



Εικόνα 1.2 Το νερό διατηρεί την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Υψηλής Ανάλυσης X-ray κρυσταλλική δομή της κεφαλής της πρωτεΐνης villin σε pH 5.1 (*πορτοκαλί*, 1.55 ˚A ανάλυση) και pH 7.0 (*γκρι*, 0.95 ˚A ανάλυση).[2] Τα μόρια νερού που μεσολαβούν στις διεπιφάνειες της τεταρτοταγούς δμής της πρωτεΐνης (λεπτές γραμμές) απεικονίζονται ως μεγάλες σφαίρες, δείχνοντας ότι τα νερό αποτελεί κομμάτι της πρωτεϊνικής δομής.

Έχοντας αναδείξει την μοναδικότητα του νερού ως διαλύτη και τη σημαντική συνεισφορά του στα βιομόρια και κυρίως στις πρωτεΐνες, θα ήταν εύλογο το ερώτημα:

ποιος ο βαθμός ενυδάτωσης των δομικών λίθων των πρωτεϊνών; Η απάντηση αυτού του ερωτήματος θα μπορούσε να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της ενυδάτωσης των πρωτεϊνών, ιδιαίτερα των πεπτιδίων. Δεν είναι τυχαία άλλωστε η έντονη επιστημονική δραστηριότητα (περαιτέρω ανάλυση ακολουθεί στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο) των τελευταίων δύο δεκαετιών πάνω στη μελέτη ενυδάτωσης των αμινοξέων και παραγώγων τους.

1.2.1 Το «χθες» και το «σήμερα» της ενυδάτωσης των αμινοξέων και παραγώγων τους – Πειραματικές και Θεωρητικές προσεγγίσεις

Τα αμινοξέα, ακετυλο-αμινοξέα, βεταΐνες και διπεπτίδια είναι οι τέσσερις ομάδες βιομορίων των οποίων μελετάται η ενυδάτωση στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τα αμινοξέα αποτελούν το κύριο συστατικό των πρωτεϊνών γι' αυτό και η συμπεριφορά τους στα υδατικά διαλύματα καθώς και ο βαθμός ενυδάτωσής τους, βρίσκονται στο ερευνητικό προσκήνιο εδώ και πολλές δεκαετίες και έχουν μελετηθεί μέσω πληθώρας φυσικοχημικών τεχνικών.[26-31] Παλιότερες έρευνες για την ενυδάτωση των αμινοξέων στηρίζονταν στο ότι η καρβοξυλομάδα τους είναι αυτή που αλληλεπιδρά με τα μόρια του νερού, αγνοώντας την ύπαρξη της αμινομάδας ως συμμετέχοντα στην ενυδάτωση. Έτσι, οι Tritt-Goc και Fiat κατέληξαν μέσω μετρήσεων NMR-^{17}O, ότι περίπου τέσσερα μόρια νερού είναι αρκετά για την επιδιαλύτωση των αμινοξέων.[32] Παράλληλες έρευνες απέδειξαν ότι οι μοριακοί όγκοι των αμινοξέων στα υδατικά διαλύματα αυξανόταν υποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση των μορίων νερού με αυτά.[33-37] Στην πορεία, πολλές ερευνητικές ομάδες θέλησαν να δείξουν αν υπάρχουν διαφορές στον βαθμό ενυδάτωσης των αμινοξέων σε κάποιες από τις ιονισμένες καταστάσεις τους καταλήγοντας σε διαφορές ενός έως τρία μόρια νερού περισσότερα για την πρωτονιομένη από τη διπολικού ιόντος (zwitterionic) κατάστασή τους.[31, 38] Επιπλέον, για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων αμινοξέων με τα μόρια νερού διεξήχθη πληθώρα πειραμάτων σε αέρια φάση μέσω φασματομετρίας μάζας, όπου και διαπιστώθηκαν αλληλεπιδράσεις μορίων νερού και με την αμινομάδα των αμινοξέων.[28, 39-44]

Με την βελτιστοποίηση των λογισμικών μοντελοποίησης και προσομοίωσης μορίων καθώς και των υδατικών διαλυμάτων, γεννήθηκε μια νέα εποχή στην διερεύνηση της

επιδιαλύτωσης και ενυδάτωσης των βιομορίων. Αυτό αποδεικνύεται με τον μεγάλο αριθμό θεωρητικών μελετών που έρχονται να επιβεβαιώσουν ή/και να αντικαταστήσουν τις πειραματικές μελέτες.[45-49] Έτσι οι Ghomi et al με διαδοχική σειρά μελετών, χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) σε συνδυασμό με θεωρητικές μελέτες, μπόρεσαν να εξερευνήσουν την ενυδάτωση των αμινοξέων ανάλογα με την πολικότητα της πλευρικής τους ομάδας.[50-52] Η κατάληξη των πειραμάτων ήταν τα αμινοξέα με υδροφοβικές πλευρικές αλυσίδες αλληλεπιδρούν με πέντε μόρια νερού.[51] Οι Bowers et al έδειξαν πως η καρβοξυλομάδα και αμινομάδα των πρωτονιομένων καταστάσεων τριών αρωματικών αμινοξέων (θρυπτοφάνης, φαινυλαλανίνης και τυροσίνης) σε αέρια φάση μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με ένα μόριο νερού της ίδιας ενέργειας (13 kcal/mol), ενώ τα μόρια νερού της δεύτερης σφαίρας ενυδάτωσής τους συνδέονται στην αμινομάδα με δεσμούς υδρογόνου ενέργειας 7-8 kcal/mol.[53]

Παράλληλα, ελάχιστες και πολύ πρόσφατες έρευνες έχουν διεξαχθεί για τη διαλεύκανση του βαθμού ενυδάτωσης των βεταϊνών.[47, 54] Έρευνες έχουν δείξει πως τα μόρια των βεταϊνών διαθέτουν έναν οσμοπροστατευτικό χαρακτήρα στα βακτηριακά και φυτικά κύτταρα.[55] Δηλαδή, σε καταστάσεις υψηλής οσμωτικής πίεσης παρατηρείται η συσσώρευσή τους στις κυτταρικές μεμβράνες των παραπάνω κυττάρων και χωρίς ακόμη να έχει γίνει γνωστό με ποιο τρόπο, παρέχουν ένα στρώμα προστασίας. Επίσης, νέες έρευνες καταδεικνύουν την προσφορά τους στην σταθεροποίηση της επιδιαλύτωσης σφαιρικών πεπτιδίων και πρωτεϊνών μέσω αλλαγής της πυκνότητας του υδατικού διαλύματος που βρίσκεται κοντά στα εν λόγω πεπτιδικά μόρια.[54, 56, 57] Θεωρητικά πειράματα μοριακής δυναμικής έδειξαν ότι οι αλλαγές της πυκνότητας του νερού επιτυγχάνονται λόγω της έντονης αντίθεσης της πολικότητας και υδροφοβικότητας που παρουσιάζουν τα μόρια των βεταϊνών, μέσω δυνάμεων διασποράς και αλληλεπιδράσεων τύπου Van der Waals.

Αν και άκρως απαραίτητα για την λειτουργία των οργανισμών βιομόρια, τα ακετυλο-αμινοξέα έχουν προς το παρόν «ξεχαστεί» από τον ερευνητικό φακό της επιστημονικής κοινότητας, με ελάχιστες μελέτες προσδιορισμού των μορίων νερού που πλαισιώνουν την πρώτη σφαίρα ενυδάτωσής τους.[58, 59] Τα μόρια των ακετυλο-αμινοξέων παρουσιάζουν τεράστιο ενδιαφέρον από βιολογικής πλευράς, αφού εμφανίζονται να παίζουν έναν δυναμικό ρόλο στις περιοχές σύνδεσης μετάλλων στις μεταλλοπρωτεΐνες (ειδικότερα η N-ακετυλο-L-ιστιδίνη), ενώ κρίνονται απαραίτητα στο κεντρικό νευρικό

σύστημα των οργανισμών (ειδικότερα στον εγκέφαλο).[60] Αναλυτικά, το ακετυλο-αμινοξύ N-ακετυλο-L-ασπαρτικό οξύ, συντίθεται στα νευρικά κύτταρα, όπου αποθηκεύεται χωρίς να υδρολύεται και συνεχώς παρεμβάλλεται στις συνάψεις των νευρώνων και στα διαμερίσματα των δενδριτικών νευρικών κυττάρων. Συνεπώς η κατανόηση της λειτουργίας των ακετυλο-αμινοξέων άρα και η εξακρίβωση του βαθμού ενυδάτωσής των, μπορούν να συνεισφέρουν στην επιπλέον γνώση του τρόπου αλληλεπίδρασής τους με τα υπόλοιπα βιομόρια.

Πρόσφατες έρευνες με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), και συγκεκριμένα της αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N της αμινομάδων των αμινοξέων, αποκάλυψαν ότι ο βαθμός ενυδάτωσης των αμινοξέων στην πρωτονιομένη τους κατάσταση αποτελείται από 2-3 μόρια νερού περισσότερα απ' ότι η διπολικού ιόντος.[38] Τα αποτελέσματα ^{14}N ήρθαν να επιβεβαιώσουν παλαιότερα αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών της αποκατάστασης των πυρήνων ^{17}O της καρβοξυλομάδας των αμινοξέων, όπου έδειξαν ότι η διαφορά ενυδάτωσης ήταν 1-3 μόρια νερού.[31] Οι δύο παραπάνω έρευνες οδήγησαν στην προσπάθεια εύρεσης του βαθμού ενυδάτωσης μέσω της μελέτης της αποκατάστασης των πυρήνων α-άνθρακα ($^{13}C_{\alpha}$) των αμινοξέων καθώς και τριών ακόμη παραγώγων τους: των ακετυλο-αμινοξέων, των βεταϊνών και των διπεπτιδίων. Παράλληλα, ο βαθμός ενυδάτωσης των ακετυλο-αμινοξέων και των βεταϊνών μελετήθηκε μέσω της αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N της αμινομάδας των.

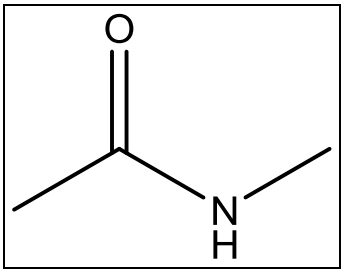
1.3 Ο διαλύτης DMSO (dimethyl sulfoxide)

Οι ιδιότητες του διαλύτη DMSO μελετούνται από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα εδώ και πολλές δεκαετίες για διαφόρους λόγους. Ως απρωτικός πολικός διαλύτης αποκτά την ικανότητα να διαλύει μόρια που διαθέτουν μεγάλη υδροφοβικότητα, καθώς και μόρια που χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό πολικότητας.[95, 96] Η ευρεία χρήση του-στην ιατρική ως φάρμακο για διάφορες παθήσεις,[97, 98] στην συνθετική και ενζυμική χημεία ως υπόστρωμα για την διεξαγωγή αντιδράσεων,[99-101] στην βιολογία ως κρυοπροστατευτικό υλικό για την φύλαξη κυττάρων κλπ.[102]-υποδηλώνει την υψηλή σημαντικότητά του.

Πολλές δομικές μελέτες πεπτιδίων,[103-106] κυρίως αυτών που εμφανίζονται αδιάλυτα στο νερό και δρουν είτε διαμεμβρανικά της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων ή είναι

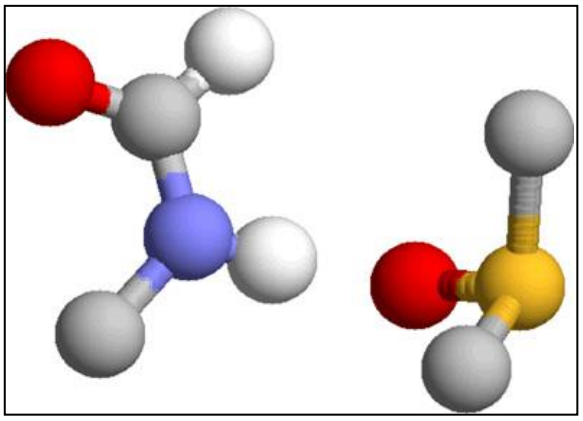
θραύσματα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, διεξάγονται σε διαλύτη DMSO ή σε μίγματα DMSO με νερό. Αυτό συμβαίνει διότι ο διαλύτης DMSO θεωρείται κατάλληλος για την προσομοίωση του υδροφοβικού μη πολικού περιβάλλοντος των κυτταρικών μεμβρανών.

Έως σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες με σκοπό την διαλεύκανση του τρόπου αλληλεπίδρασης των μορίων του διαλύτη DMSO με τον πεπτιδικό δεσμό.[7, 107] Η δομή του πεπτιδικού δεσμού (Εικόνα 1.3), συγκεκριμένα το ιμιδικό υδρογόνο (-NH) αυτής, επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδρασή της με τον διαλύτη DMSO μέσω δεσμών υδρογόνου.



Εικόνα 1.3 Η δομή του πεπτιδικού δεσμού. Η ομάδα –NH αλληλεπιδρά άμεσα μέσω δεσμών υδρογόνου με ένα μόριο του διαλύτη DMSO.

Πολύ πρόσφατες μελέτες[7] μέσω κρυσταλλογραφίας (X-ray) και θεωρητικών προσεγγίσεων μέσω πειραμάτων μοριακής δυναμικής απέδειξαν, ότι στην ένωση του N-μεθυλο-φορμαμιδίου (NMF, Εικόνα 1.4), η οποία προσομοιάζει τον πεπτιδικό δεσμό, το ιμιδικό υδρογόνου του πεπτιδικού δεσμού σχηματίζει έναν πολύ ισχυρό δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο DMSO.



Εικόνα 1.4 Η γεωμετρία του πιο επικρατούς διμερούς NMF-DMSO. Η γωνία του δεσμού υδρογόνου (N-H···O) ισούται με 170.6^{o}, η απόσταση H···O ισούται με 1.57 Å. Τα συγκεκριμένα γεωμετρικά στοιχεία υποδηλώνουν έναν πολύ ισχυρό δεσμό υδρογόνου.[7]

Παράλληλα, έχοντας πάντα υπόψη την δομή των πεπτιδίων και των εκάστοτε δομικών τους λίθων (αμινοξέα) και παραγώγων τους, είναι προφανές ότι και το υδροξύλιο της καρβοξυλικής τους ομάδας μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα μόριο DMSO με τον ίδιο τρόπο όπως με το ιμιδικό υδρογόνο του πεπτιδικού δεσμού. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση έχει περιγραφεί από πρόσφατες έρευνες[108] με ^{17}O-NMR της καρβοξυλομάδας ενός πεπτιδικού μοντέλου, όπου διαπιστώθηκε η αργή ανταλλαγή των πρωτονίων της –OH ομάδος στο καρβοξυ-τελικό του άκρο. Το φαινόμενο αυτό μεταφράστηκε στο σχηματισμό ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων DMSO και της εν λόγω ομάδας του υπό μελέτη πεπτιδίου.

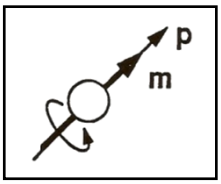
Γενικότερα, όλες οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την μελέτη των προαναφερθέντων αλληλεπιδράσεων του διαλύτη DMSO με τα βιομόρια περιλαμβάνουν ενώσεις μοντέλα που προσομοιάζουν τον πεπτιδικό δεσμό και τα καρβοξυ-τελικά και πλευρικά άκρα των υπό μελέτη βιομορίων. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η γνώση της δράσης του διαλύτη DMSO στα πεπτιδικά μόρια συνήθως έχει προσεγγιστεί με θεωρητικές μελέτες, χωρίς να έχει εξηγηθεί πλήρως, παρά την εκτεταμένη χρήση του σε δομικές μελέτες πεπτιδίων.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο (κυρίως μέσω την μελέτη των χημικών μετατοπίσεων ορισμένων πυρήνων) για τη μελέτη των προαναφερθέντων αλληλεπιδράσεων, γεγονός που αποδεικνύεται με την ανάλυση ορισμένων παραμέτρων του που ακολουθεί.

1.4 Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)

1.4.1 Πυρηνική Μαγνήτιση

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητισμού[61] προσδιορίζεται από το γεγονός ότι τα πρωτόνια και νετρόνια ενός πυρήνα εμφανίζουν στροφορμή από αυτοστροφή (spin) και δημιουργούν ένα μικρό μαγνητικό δίπολο με μαγνητική ροπή ***m***, ίδιας διεύθυνσης με το άνυσμα της στροφορμής ***p*** (Εικόνα 1.5). Το πυρηνικό spin είναι η



Εικόνα 1.5

συνιστώσα των spin των πρωτονίων και νετρονίων, μετριέται σε πολλαπλάσια του ħ (h/2π, όπου h η σταθερά του Plank) και χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin I (I = 0, 1/2, 1, 3/2,….). Κατά την κβαντομηχανική, η στροφορμή ενός πυρήνα σχετίζεται με το πυρηνικό spin μέσω της σχέσης:

$$\mathbf{P} = \{\mathbf{I}(\mathbf{I} + 1)\}^{1/2} h/2\pi \qquad (1.1)$$

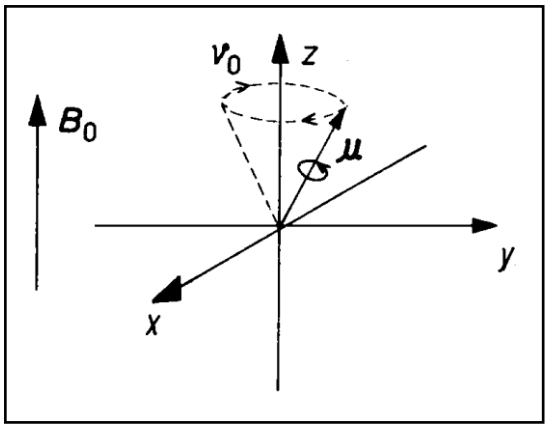
όπως και η πυρηνική μαγνητική ροπή:

$$\boldsymbol{\mu}_z = \gamma(h/2\pi)\mathbf{I}\ , \qquad (1.2)$$

όπου το **γ** καλείται το μαγνητογυρικό πηλίκο και είναι χαρακτηριστικό κάθε πυρήνα. Το γ ισούται με $g_N e/2mc$, όπου e και m το φορτίο και η μάζα αντίστοιχα, c η ταχύτητα του φωτός και g_N σταθερά καλούμενη πυρηνικός παράγοντας g.

1.4.2 Πυρηνική Μετάπτωση

Εντός μαγνητικού πεδίου $\boldsymbol{B_o}$, κάθε πυρήνας (με spin $\neq 0$) συμπεριφέρεται όπως ένα γυροσκόπιο στο βαρυτικό πεδίο. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1.6, ο άξονας περιστροφής των spin, που συμπίπτει με αυτόν της μαγνητικής ροπής $\boldsymbol{\mu}$, είναι αυτός που στην διεύθυνσή του γίνεται και η μετάπτωση των spin στο πεδίο $\boldsymbol{B_0}$. Η συχνότητα της μετάπτωσης, ν_0 , ονομάζεται συχνότητα Larmor του πυρήνα.



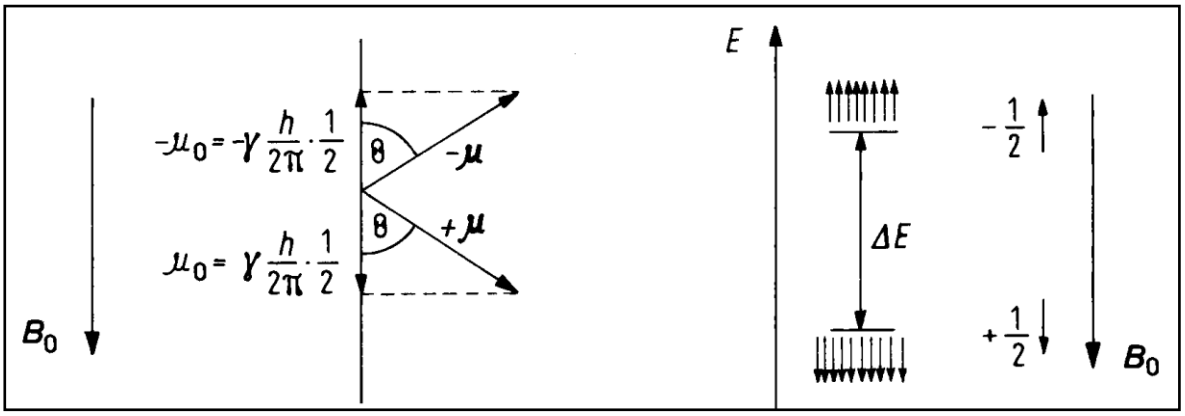
Εικόνα 1.6 Η συχνότητα Larmor κατά την μετάπτωση του πυρήνα σε ένα στατικό μαγνητικό πεδίο έντασης $\boldsymbol{B_0}$.

1.4.3 Πυρηνικά Ενεργειακά Επίπεδα εντός Μαγνητικού πεδίου

Η ενέργεια της μαγνητικής ροπής $\boldsymbol{\mu}$ σε μαγνητικό πεδίο εντάσεως $\boldsymbol{B_0}$ περιγράφεται από την εξίσωση:

$$E = -\boldsymbol{\mu_0 B_0} = -\gamma \frac{h}{2\pi} I B_0. \tag{1.3}$$

Ακολουθώντας τους κανόνες της κβαντομηχανικής, τότε ένας πυρήνας με συνολικό spin I καταλαμβάνει $2I + 1$ διαφορετικές ενεργειακές στάθμες, όταν βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου. Έτσι για τους πυρήνες με $I = ½$, όπως οι πυρήνες ^{1}H και ^{13}C οι προσανατολισμοί του ανύσματος της στροφορμής τους είναι δύο, άρα καταλαμβάνουν και δύο ενεργειακές στάθμες, που συμβολίζονται με + 1/2 και – 1/2 (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Προσανατολισμός των πυρήνων με $I = 1/2$ σε μαγνητικό πεδίο εντάσεως $\boldsymbol{B_0}$. Αριστερά: οι ενεργειακές τους στάθμες. Δεξιά: οι πληθυσμοί των spin.[62]

Η μετάπτωση των πυρηνικών spin στη διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου $\boldsymbol{B_0}$ ευνοείται ενεργειακά (Εικόνα 1.7 Αριστερά), αφού η συνιστώσα της πυρηνικής μαγνητικής ροπής $\boldsymbol{\mu}$ στην διεύθυνση του πεδίου ενισχύει το μαγνητικό πεδίο.

Οι ενεργειακές στάθμες $E_{+1/2}$ και $E_{-1/2}$ και η ενεργειακή διαφορά τους περιγράφονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$E_{+1/2} = -\frac{h}{4\pi}\gamma B_0. \tag{1.4}$$

$$E_{-1/2} = \frac{h}{4\pi}\gamma B_0. \tag{1.5}$$

$$\Delta E = E_{-1/2} - E_{+1/2} = \frac{h}{2\pi}\gamma B_0 = h\nu_0. \tag{1.6}$$

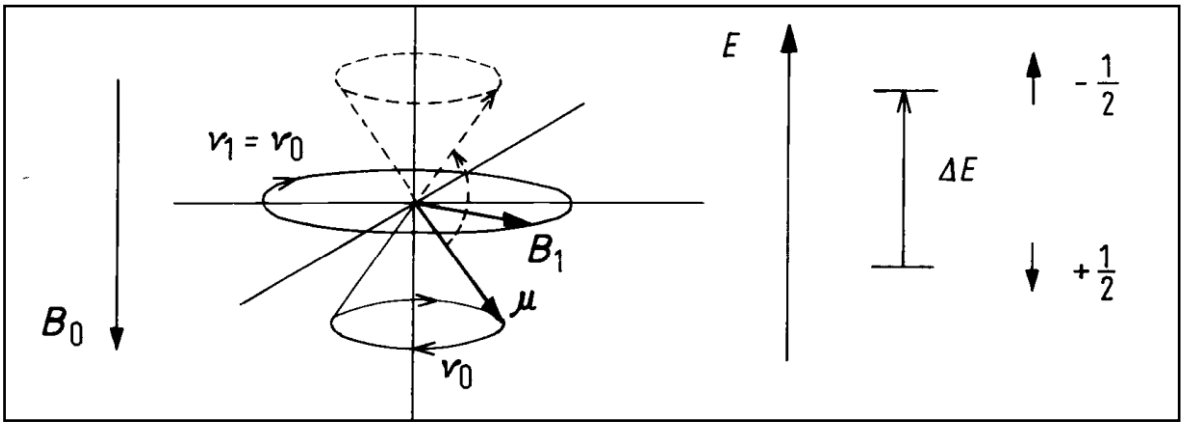
1.4.4 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Η διαφορά ενέργειας ΔE περιγράφεται από την εξίσωση (1.6) και απεικονίζεται διαγραμματικά στην Εικόνα (1.7, Δεξιά) κατά τη διεύθυνση και αντίθετα της διεύθυνσης του μαγνητικού πεδίου $\boldsymbol{B_0}$. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1.6), η συχνότητα Larmor (ν_0) ενός πυρήνα με $I = 1/2$ ισούται με την παρακάτω εξίσωση (λαμβάνοντας υπόψη ότι ισχύει $\Delta E = h\nu_0$):

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0. \tag{1.7}$$

Έτσι, για ένα μαγνητικό πεδίο εντάσεως 2.35 Tesla, η συχνότητα Larmor του πυρήνα ^{13}C ισούται περίπου με 25 MHz, όντας κατά πολύ μικρότερη από του πυρήνα ^{1}H (100 MHz).

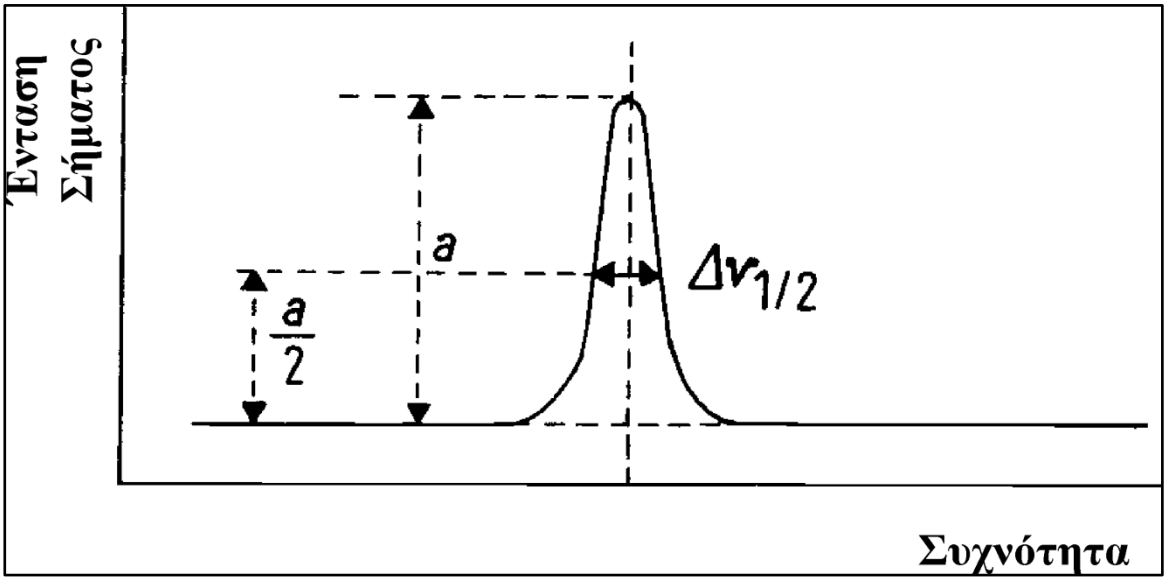
Όταν μαγνητικό πεδίο εντάσεως $\boldsymbol{B_1}$ και συχνότητας ν_1 εφαρμόζεται στο πεδίο $\boldsymbol{B_0}$, ένα ποσοστό πυρηνικών spin που εκτελούν μεταπτωτική πορεία κατά την διεύθυνση του πεδίου $\boldsymbol{B_0}$ μπορούν να αποκτήσουν ενέργεια ίση με την ενεργειακή διαφορά ΔE υπό δύο συνθήκες: α) το διάνυσμα του εξωτερικού πεδίου $\boldsymbol{B_1}$ πρέπει να έχει συνιστώσα η οποία να περιστρέφεται στο ίδιο επίπεδο που εκτελείται η μετάπτωση των spin και β) η συχνότητα του πεδίου $\boldsymbol{B_1}$ πρέπει να ισούται με την συχνότητα Larmor ν_0 των παρατηρούμενων πυρήνων (Εικόνα 1.8). Ως αποτέλεσμα, ένας πληθυσμός των spin αλλάζει διεύθυνση μετάπτωσης, αντίθετα της διεύθυνσης του μαγνητικού πεδίου $\boldsymbol{B_0}$ και πραγματοποιείται απορρόφηση της ενέργειας ΔE από το μαγνητικό πεδίο $\boldsymbol{B_1}$ (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός). [61-63]



Εικόνα 1.8 Η εφαρμογή πεδίου εντάσεως $\boldsymbol{B_1}$ σε πυρήνα κατά την μετάπτωσή του στην ίδια διεύθυνση του στατικού μαγνητικού πεδίου $\boldsymbol{B_0}$.

Για την παρατήρηση του φαινομένου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, αρκεί η τοποθέτηση ενός δείγματος που περιέχει πυρηνικά spin (για παράδειγμα πυρήνες ^{1}H, ^{13}C) σε ένα στατικό μαγνητικό πεδίο $\boldsymbol{B_0}$. Παράλληλα εφαρμόζεται πεδίο $\boldsymbol{B_1}$ ραδιοσυχνότητας ν_1 κάθετα στο πεδίο $\boldsymbol{B_0}$. Όταν η συχνότητα ν_1 γίνει ίση με τη συχνότητα Larmor των υπό παρατήρηση πυρήνων, ένα σήμα απορρόφησης καταγράφεται στον δέκτη του φασματογράφου NMR (Εικόνα 1.9).

Η συνεχής εφαρμογή του πεδίου $\boldsymbol{B_1}$ θα προκαλέσει τον κορεσμό των πυρήνων στις δύο ενεργειακές στάθμες, με αποτέλεσμα την εξαφάνιση της απορρόφησης στο φάσμα. Γι' αυτό απαιτούνται μηχανισμοί που να επαναφέρουν τα spin στην ενεργειακή τους ισορροπία. Η μηχανισμοί αυτοί αποκαλούνται μηχανισμοί αποκατάστασης των πυρήνων.



Εικόνα 1.9 Περιγραφή του σήματος NMR ($\Delta\nu_{1/2}$ είναι το εύρος στο μισό του ύψους του σήματος).

1.4.5 Πυρηνική Αποκατάσταση (Nuclear Relaxation)

Σε κατάσταση θερμικής ισορροπίας οι πληθυσμοί των πυρηνικών spin έιναι κατανεμημένοι στις ενεργειακές στάθμες σύμφωνα με την κατανομή κατά Boltzmann, η οποία ευνοεί την χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Για την περίπτωση πυρήνων με $I = 1/2$, οι πληθυσμοί των spin κατανέμονται στις δύο ενεργειακές στάθμες και

συμβολίζονται με N_+ και N_-. Ο λόγος των πληθυσμών N_+ / N_- υπακούει σε κατανομή Boltzmann:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 + \frac{\Delta E}{kT}. \tag{1.8}$$

Σε θερμοκρασία δωματίου, η τιμή της διαφοράς ενέργειας των spin ($\Delta E = 2\mu_0 B_0$) είναι κατά πολύ μικρότερη από 4.2 Joule, ακόμη και σε πολύ υψηλά μαγνητικά πεδία, με αποτέλεσμα ο όρος $\frac{\Delta E}{kT}$ να είναι πολύ μικρός και η κατανομή N_+ / N_- ελάχιστα μεγαλύτερη από τη μονάδα (~1).

Όπως αναφέρθηκε, κατά τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο $\boldsymbol{B_1}$, προκαλεί μεγαλύτερη μεταφορά πληθυσμών spin από τη χαμηλότερη στην υψηλότερη ενεργειακή τους στάθμη σε σχέση από την υψηλότερη στη χαμηλότερη. Καθώς λοιπόν διαταράσσεται αυτή η ισορροπία, τα πυρηνικά spin μεταφέρονται στην υψηλή ενεργειακή στάθμη και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα επανέρχονται σε θερμική ισορροπία με το περιβάλλον τους (πλέγμα), μέσω της αποκατάστασής τους.[62, 63] Αυτού του είδους η διαδικασία (αποκατάσταση spin-πλέγματος ή **spin-lattice relaxation**) περιγράφεται από ένα ρυθμό πρώτης τάξεως με σταθερά $1/T_1$ που είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα. Ο χρόνος T_1 καλείται χρόνος αποκατάστασης spin-πλέγματος και κυμαίνεται από 10^{-4} έως 10^4 δευτερόλεπτα.

Για διαλύματα μορίων με πολύ γρήγορη διαμοριακή κίνηση, ο χρόνος T_1 περιγράφεται ως ο χρόνος παραμονής ενός πυρηνικού spin σε κάποια ενεργειακή του στάθμη. Έτσι σύμφωνα με την αρχή της απροσδιοριστίας του Heisenberg ισχύει:

$$\Delta E\ \Delta t = h\Delta\nu\Delta t \sim h \Leftrightarrow \Delta\nu\Delta t \sim 1, \tag{1.9}$$

όπου, το ελάχιστο εύρος στο μισό του ύψους ενός σήματος NMR ($\Delta\nu_{1/2}$, Εικόνα 1.7), επειδή η απορρόφηση οποιασδήποτε κορυφής του φάσματος αποδεικνύεται πως είναι Lorentzian, προσεγγίζεται από την σχέση:

$$\Delta\nu_{1/2} \geq {}^{1}/_{\pi T_1}. \tag{1.10}$$

Παράλληλα, είναι γνωστό ότι στα στερεά και στα διαλύματα ουσιών που αντιπροσωπεύονται από αργές μοριακές κινήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο οι διαπυρηνικές αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου. Επιπλέον, τα ενεργειακά κβάντα $\Delta E = 2\ \mu_0\ B_0$

ανταλλάσσονται ως ένα βαθμό μεταξύ των πυρήνων. Αυτοί οι δύο παράγοντες (αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου και η ανταλλαγή ενέργειας) συμβάλλουν στη μείωση της διάρκειας παραμονής των πυρηνικών spin στις ενεργειακές τους καταστάσεις, οδηγώντας στη διεύρυνση των κορυφών. Αυτού του είδους πρώτης τάξεως αποκατάσταση, αποκαλείται αποκατάσταση spin-spin (**spin-spin relaxation**), ο ρυθμός της χαρακτηρίζεται από την χρονική σταθερά $1/T_2$ και ανταγωνίζεται την αποκατάσταση spin-πλέγματος. Αντίστοιχα με τον χρόνο T_1, ο χρόνος T_2 ονομάζεται χρόνος αποκατάστασης spin-spin.

Εφόσον η αποκατάσταση spin-spin μειώνει τον χρόνο παραμονής ενός πυρήνα σε μια συγκεκριμένη ενεργειακή κατάσταση, με $T_2 \leq T_1$, το εύρος στο μισό του ύψους μιας κορυφής εκφράζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια (εξίσωση 1.11) και είναι αντιπροσωπευτικό της spin-spin αποκατάστασης.

$$\Delta\nu_{1/2} = \text{const.}\, {}^{1}/_{T_2}. \tag{1.11}$$

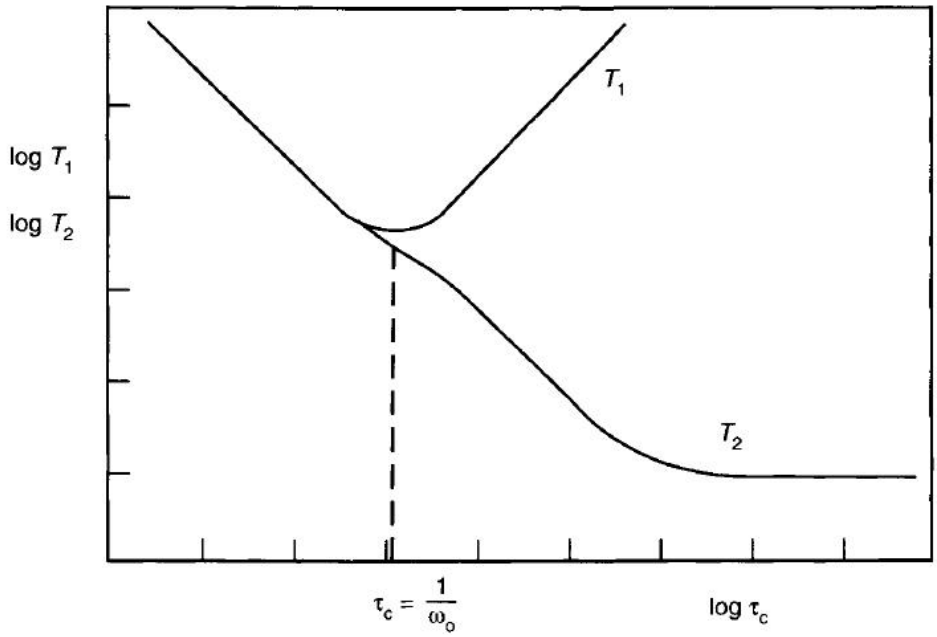
Επιπλέον, η τιμή $\Delta\nu_{1/2}$ μιας παρατηρούμενης κορυφής εξαρτάται από τον βαθμό ανομοιογένειας του πεδίου ΔB_0, της οποίας η προσφορά στην τιμή $\Delta\nu_{1/2}$ περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\Delta\nu_{1/2(inhom)} = \frac{\gamma\Delta B_0}{2\pi} = \text{const.}\frac{\gamma\Delta B_0}{2}. \tag{1.12}$$

Έτσι η παρατηρούμενη τιμή $\Delta\nu_{1/2(obs.)}$ λαμβάνοντας υπόψη της εξισώσεις (1.11) και (1.12) θα ισούται με:

$$\Delta\nu_{1/2(obs)} = \Delta\nu_{1/2} + \Delta\nu_{1/2(inhom)} = \text{const.}\left(\frac{1}{\mathrm{T}_2} + \frac{\gamma\Delta B_0}{2}\right). \tag{1.13}$$

Όσον αφορά την αποκατάσταση spin-πλέγματος ενός πυρήνα σε ένα μόριο, αυτή επιταχύνεται από την αλληλεπίδρασή του με τον γειτονικό του πυρήνα αν ο τελευταίος έχει spin 1 ή μεγαλύτερο (για παράδειγμα τους πυρήνες ^{2}H, ^{14}N). Αυτό συμβαίνει διότι η τοπική κλίση της ηλεκτρικής τετραπολικής ροπής αυτών των πυρήνων προκαλεί επιπλέον πεδία κατά την κίνηση του μορίου στο διάλυμα και β) την αλληλεπίδραση του υπό μελέτη πυρήνα με τα ασύζευκτα ελεύθερα ηλεκτρόνια των παραμαγνητικών ουσιών όπως ελεύθερες ρίζες και μερικά χηλικά μέταλλα.



Εικόνα 1.10 Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 και T_2 σε σχέση με την περιστροφή των μορίων σε ένα διάλυμα (δηλαδή τον χρόνο τ_C), άρα και με το ιξώδες των διαλυμάτων.[109]

Η αποκατάσταση spin-spin είναι πιο αποτελεσματική σε στερεά και σε μεγάλου ιξώδους διαλύματα όπου τα μαγνητικά πεδία που προκαλούν τα δίπολα κατά την αργή κίνησή τους μεταβάλλονται με πολύ αργούς ρυθμούς (Εικόνα 1.10).

Εν συντομία, ο χρόνος T_2 επηρεάζει το εύρος των NMR κορυφών και όχι τον πληθυσμό των πυρηνικών spin στις ενεργειακές τους καταστάσεις, που επηρεάζεται από τον χρόνο T_1.

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή θα μας απασχολήσουν δύο μηχανισμοί που προκαλούν αποκατάσταση: η αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου (**dipole-dipole relaxation**) του α-άνθρακα ($^{13}C_\alpha$) των αμινοξέων με το συνδεδεμένο πυρήνα ^1H και η αλληλεπίδραση της τετραπολικής ροπής (**quadrupolar relaxation**) και του ηλεκτρικού πεδίου του τετραπολικού πυρήνα ^{14}N των αμινομάδων των ακετυλο-αμινοξέων και βεταϊνών.

Καθώς το άτομο του C_α βρίσκεται συνδεδεμένο ομοιοπολικά με ένα άτομο υδρογόνου (δύο υδρογόνα για την γλυκίνη και τα παράγωγά της), ο πυρήνας $^{13}C_\alpha$ υφίσταται την επίδραση όχι μόνο του στατικού πεδίου $\boldsymbol{B_0}$ αλλά και του τοπικού πεδίου του πυρηνικού spin του ^1H. Η μοριακή κίνηση των αμινοξέων και παραγώγων τους στα υδατικά διαλύματα θεωρείται πολύ γρήγορη. Οι περιστροφή του διπόλου $^{13}C_\alpha$-H είναι αντίστοιχα γρήγορη στα επιδιαλυτωμένα υπό μελέτη μόρια και οι προσανατολισμοί των πυρήνων άνθρακα και υδρογόνου συνεχώς μεταβάλλονται ως προς τη διεύθυνση του πεδίου $\boldsymbol{B_0}$. Οι

μεταβολές αυτές οδηγούν στην συνεχή μεταβολή του μαγνητικού προσανατολισμού των πυρηνικών spin, δημιουργώντας κυμαινόμενα τοπικά πεδία που συμβάλλουν σημαντικά στην αποκατάσταση του πυρήνα $^{13}C_{\alpha}$. Ο μηχανισμός αποκατάστασης διπόλου-διπόλου είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός που προκαλεί την αποκατάσταση spin-πλέγματος του $^{13}C_{\alpha}$ και γενικά των πυρήνων με spin 1/2 εκτός του πυρήνα ^{19}F. Το πλέγμα στην συγκεκριμένη περίπτωση αντιπροσωπεύεται από το ομοιοπολικά συνδεδεμένο υδρογόνο, μέσω του οποίου αποκαθίσταται ο $^{13}C_{\alpha}$. Ο χρόνος αποκατάστασης T_1 του $^{13}C_{\alpha}$ καθώς και οι παράγοντες που τον επηρεάζουν περιγράφονται εκτενώς στο 3° Κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής.

Όσον αφορά τον πυρήνα του ^{14}N ($I = 1$) είναι γνωστό ότι ανήκει στην ομάδα των τετραπολικών πυρήνων, όπως ο πυρήνας ^{17}O ($I = 5/2$). Οι συγκεκριμένοι πυρήνες εμφανίζουν την λεγόμενη ηλεκτρική τετραπολική ροπή και ανάλογα τη θέση που καταλαμβάνουν σε ένα μόριο και τους πυρήνες–ομάδες ατόμων που συνδέονται εμφανίζουν ορισμένη τιμή σταθεράς τετραπολικής σύζευξης (nuclear quadrupole coupling constant, NQCC), η οποία περιγράφει την μαγνήτιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της πυρηνικής τετραπολικής ροπής (eQ, όπου e το φορτίο του ηλεκτρονίου), και της κλίσης του ηλεκτρικού πεδίου.[2] Περισσότερες λεπτομέρειες και ενδεικτικές τιμές NQCC των πυρήνων ^{14}N και ^{17}O αναφέρονται στο Παράρτημα Ι.

Η ηλεκτροστατική ενέργεια που παράγεται από ένα ηλεκτρικό τετράπολο μειώνεται κατά την παράγωγο του πεδίου σε αντίθεση με την αντίστοιχη διπολική αποκατάσταση που μειώνεται ανάλογα με την ένταση του πεδίου. Επίσης, το μαγνητικό δίπολο και το ηλεκτρικό τετράπολο ενός πυρήνα είναι πάντα ισχυρά συζευγμένα, ώστε οι ενέργειες ενός τέτοιου πυρήνα, μέσα σε μαγνητικό πεδίο, να εξαρτώνται τόσο από το πεδίο $\boldsymbol{B_0}$ όσο και από την κλίση του ηλεκτρικού πεδίου του τετραπολικού πυρήνα (electric field gradient, efg). Ας σημειωθεί, ότι κάθε τετραπολικός πυρήνας εμφανίζει τοπική κλίση του ηλεκτρικού του πεδίου, κατά συνέπεια η κβάντωση των ενεργειακών επιπέδων του ως προς αυτήν, είναι ανεξάρτητη της ύπαρξης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Οι τετραπολικές συζεύξεις δεν γίνονται εμφανείς σε υγρά δείγματα επειδή, λόγω της περιστροφής των μορίων, οι τοπικοί άξονες των πυρηνικών τοπικών ηλεκτρικών πεδίων αλλάζουν συνεχώς θέση σε σχέση με το $\boldsymbol{B_0}$, ώστε οι μεταπτώσεις να συμβαίνουν μεταξύ όλων των πιθανών επιτρεπτών ενεργειακών σταθμών (ανάλογα με την τιμή του spin τους),

[2] Συμβολίζοντας τη NQCC με χ ισχύει: $\chi = eQV_z / h$, όπου V_z η συνιστώσα του ηλεκτρικού πεδίου, που πολλές φορές συμβολίζεται με eq, άρα $\chi = e^2Qq / h$.

με αποτέλεσμα τη λεγόμενη τετραπολική αποκατάσταση. Αποτέλεσμα της τετραπολικής αποκατάστασης είναι συχνά η εμφάνιση ευρειών φασματικών γραμμών. Ωστόσο, η συμμετρία του συστήματος παίζει κι αυτή σημαντικό ρόλο στην μορφή του τελικού σήματος, έτσι ώστε, σε συστήματα υψηλής συμμετρίας γύρω από έναν τετραπολικό πυρήνα, παρατηρείται συχνά η εμφάνιση σημάτων με μικρό εύρος, όπως θα αποδειχθεί παρακάτω (3° Κεφάλαιο) για τους πυρήνες ^{14}N της αμινομάδας των βεταϊνών (υψηλός βαθμός συμμετρίας) σε σχέση με των ακετυλο-αμινοξέων (χαμηλός βαθμός συμμετρίας) (Παράρτημα Ι).

Οι εξισώσεις που περιγράφουν τους χρόνους T_{1Q} και T_{2Q} κατά τον μηχανισμό της τετραπολικής αποκατάστασης του πυρήνα ^{14}N για τα ακετυλο-αμινοξέα και τις βεταΐνες καθώς και οι παράγοντες που τους επηρεάζουν, περιγράφονται εκτενώς στο 3° Κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής.

1.4.6 Η χημική μετατόπιση (NMR Chemical Shift)

Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα με $I \neq 0$ δεν προέρχεται από το πεδίο $\boldsymbol{B_0}$ στο οποίο μπορεί να βρεθεί, αλλά οφείλεται στο πεδίο των ηλεκτρονίων που το περιβάλλουν και διαταράσσεται από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο $\boldsymbol{B_0}$.[109] Επειδή τα ηλεκτρόνια είναι μαγνητικά σωματίδια, η κίνησή τους επηρεάζεται από την επιβολή ενός εξωτερικού πεδίου. Γενικά η κίνησή τους επάγεται από ένα εξωτερικό εφαρμοζόμενο πεδίο με κατεύθυνση αντίθετη από το πεδίο των ηλεκτρονίων (Νόμος του Lenz). Έτσι το μαγνητικό πεδίο στον πυρήνα εκφράζεται ως:

$$B_{nucleous} = B_0 - \sigma B_0 = B_0 \left(1 - \sigma\right). \tag{1.14}$$

Ο παράγοντας σ ονομάζεται παράγοντας προστασίας του πυρήνα (shielding factor) και η τιμή του είναι πολύ μικρή (της τάξεως 10^{-5} για τον πυρήνα των πρωτονίων και $< 10^{-3}$ για τους άλλους πυρήνες). Η εξίσωση (1.14) τονίζει ότι η χημική μετατόπιση είναι εξ' ολοκλήρου αποτέλεσμα της επίδρασης που ασκείται από την τοποθέτηση ενός μορίου σε ένα μαγνητικό πεδίο.

Ο Lamp έδειξε ότι για ένα ελεύθερο άτομο με σφαιρική συμμετρική ηλεκτρονιακή κατάσταση, *S*, η επίδραση ενός εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή ενός ρεύματος ηλεκτρονίων που οδηγεί στον παράγοντα προστασίας:

$$\sigma_D = \frac{4\pi e^2}{3mc^2}\int_0^\infty r\rho(r)\,dr\,, \tag{1.15}$$

όπου *ρ(r)* η πυκνότητα των ηλεκτρονίων σε συνάρτηση της απόστασής τους από τον πυρήνα και *e*, *m* και *c* οι συνήθεις θεμελιώδεις σταθερές.

Η θεωρία του Lamp είναι ανεπαρκής για τα μόρια, αφού έχει ως προϋπόθεση ότι η κίνηση των ηλεκτρονίων είναι ελεύθερη και σε οποιαδήποτε διεύθυνση, αγνοώντας ότι η κίνηση των ηλεκτρονίων σε ένα μόριο είναι αυστηρώς περιορισμένη. Έτσι ο Ramsey, χρησιμοποιώντας τη δευτέρου βαθμού θεωρία διατάραξης σωματιδίων (perturbation theory), μπόρεσε να περιγράψει τον παράγοντα *σ* για τα μόρια, με την έκφραση:

$$\sigma = \sigma_P + \sigma_D\,. \tag{1.16}$$

Ο όρος σ_D είναι πρώτου βαθμού, μπορεί να υπολογιστεί από την αρχική ηλεκτρονιακή κατάσταση και καλείται διαμαγνητικός όρος. Επίσης είναι θετικός και προκαλεί μείωση του μαγνητικού πεδίου στον πυρήνα και την προστασία του. Ο όρος σ_p είναι δευτέρου βαθμού και για τον υπολογισμό του απαιτεί την γνώση των κυματοσυναρτήσεων και των ενεργειών των διεγερμένων καταστάσεων. Αυτός ο όρος είναι αρνητικός και διορθώνει το γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια σε ένα μόριο δεν κατανέμονται σε σφαιρική συμμετρία γύρω από τους πυρήνες.

1.4.6.1 Μέτρηση των χημικών μετατοπίσεων

Οι χημικές μετατοπίσεις των NMR κορυφών μετριούνται σε μονάδες συχνότητας Hertz (Hz). Βέβαια η μέτρηση των χημικών μετατοπίσεων σε μονάδες συχνότητας έχει ένα μειονέκτημα, διότι η τιμή τους εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου και της συχνότητας rf μέσω της σχέσης Larmor,εξίσωση (1.7). Έτσι οι χημικές μετατοπίσεις

συνήθως αναφέρονται με την αδιάστατη μονάδα μέρη στο εκατομμύριο (parts of million, ppm), η οποία είναι ανεξάρτητη της συχνότητας rf και της έντασης του μαγνητικού πεδίου. Η σχέση που συνδέει την κλίμακα ppm μέσω της συχνότητας Larmor ενός πυρήνα με τον παράγοντα προστασίας του σ φαίνεται από την εξίσωση:

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1-\sigma). \tag{1.17}$$

Αν δείγμα που περιέχει ένωση αναφοράς (η οποία αναλύεται παρακάτω) βρεθεί εντός μαγνητικού πεδίου $\mathbf{B_0}$ και οι με παράγοντες προστασίας είναι σ_S και σ_R αντίστοιχα, τότε οι ενώσεις θα εμφανίζουν αντίστοιχες συχνότητες συντονισμού, ν_S και ν_R. Η χημική μετατόπιση δ του δείγματος, λαμβάνοντας υπόψη ότι η κλίμακα αυξάνεται σε υψηλότερες συχνότητες από την ένωση αναφοράς, ορίζεται ως:

$$\delta \equiv \frac{\nu_S - \nu_R}{\nu_R} 10^{-6}, \tag{1.18}$$

η οποία μέσω της εξίσωσης (1.17), γίνεται:

$$\delta = \frac{(1-\sigma_S)-(1-\sigma_R)}{(1-\sigma_R)} 10^{-6} = \frac{\sigma_R - \sigma_S}{1-\sigma_R} 10^{-6} \approx (\sigma_R - \sigma_S) 10^{-6}, \tag{1.19}$$

διότι $\sigma << 1$. Έτσι, μια μεγάλη τιμή χημικής μετατόπισης δ αντιστοιχεί σε ένα μικρότερο παράγοντα προστασίας σ.

1.4.6.2 Εσωτερικά και Εξωτερικά πρότυπα ενώσεων αναφοράς

Όπως αναφέρθηκε η μέτρηση της χημικής μετατόπισης γίνεται σε σύγκριση με τη μετατόπιση μιας ουσίας αναφοράς. Συνήθως στην φασματοσκοπία ^{1}H-NMR χρησιμοποιείται η χημική μετατόπιση των πρωτονίων της ένωσης τετραμεθυλοσιλυλ-προπανοϊκού οξέος (TMSP). Υπάρχουν δύο τρόποι χρήσης της ένωσης αναφοράς: α) Η τοποθέτησή της άμεσα στο υπό μελέτη δείγμα, για παράδειγμα στο ίδιο διάλυμα με την ουσία που μελετάται (εσωτερικό πρότυπο, internal reference) και β) η

τοποθέτησή της έμμεσα στο διάλυμα, μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα που τοποθετείται στο υπό μελέτη δείγμα, συνήθως με τον ίδιο διαλύτη (εξωτερικό πρότυπο, external reference). Στην περίπτωση του εσωτερικού προτύπου τα μόρια της ένωσης αναφοράς υπόκεινται στις ίδιες αλληλεπιδράσεις από το πεδίο με το υπό μελέτη δείγμα και η χημική τους μετατόπιση υπακούει στην εξίσωση (1.19). Το μόνο μειονέκτημα, υποθέτοντας ότι η ένωση αναφοράς δεν αντιδρά με την υπό μελέτη ουσία, είναι η πιθανότητα διαμοριακών αλληλεπιδράσεών της με την υπό μελέτη ουσία, που μπορούν να επηρεάσουν την συχνότητα συντονισμού των. Όσον αφορά τη χρήση εξωτερικού προτύπου, αποφεύγονται οι τυχόν παραπάνω διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ή αντιδράσεις, αλλά επεισέρχεται ο παράγοντας της διαφορετικής μαγνητικής δεκτικότητας (magnetic susceptibility, που θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω) που υφίσταται η ένωση αναφοράς σε σχέση με το υπό μελέτη δείγμα.

1.4.6.3 Επίδραση της Μαγνητικής Επιδεκτικότητας (magnetic susceptibility) στη χημική μετατόπιση

Η μαγνητική επαγωγή ενός πεδίου $\boldsymbol{B_0}$ σε μία ουσία που εισάγεται εντός αυτού, μεταβάλλεται από τη μαγνήτιση ($\boldsymbol{M}$) ανά μονάδα όγκου που επάγεται στο δείγμα και δίνεται από την εξίσωση:

$$M = \kappa B_0, \tag{1.20}$$

όπου κ η μαγνητική επιδεκτικότητα του όγκου, η οποία είναι αρνητική για όλες τις διαμαγνητικές ουσίες και της τάξεως 10^{-6}.[106] Η ηλεκτρομαγνητική θεωρία δείχνει ότι μαγνητική επαγωγή σε μία ουσία δίνεται σε μονάδες *cgs* από τον τύπο:

$$\left(B_0\right)_{bulk} = B_0\left[1+\left(\frac{4\pi}{3}-\alpha\right)\kappa\right]. \tag{1.21}$$

Στην εξίσωση (1.21) υπάρχουν δύο μεταβλητές, η κ και η α (ο παράγοντας σχήματος, shape factor). Αν η πρότυπη ένωση αναφοράς είναι εσωτερική, τότε θα ισχύει μία τιμή κ και για την ουσία και για την ένωση αναφοράς, οι οποίες δέχονται το ίδιο μαγνητικό πεδίο. Έτσι η επίδραση της μαγνητικής επιδεκτικότητας μπορεί να αγνοηθεί.

Όταν όμως η πρότυπη ένωση αναφοράς είναι εξωτερική, το δείγμα και το εξωτερικό πρότυπο είναι διαχωρισμένα και η εξίσωση (1.21) είναι διαφορετική για κάθε ουσία:

$$\begin{aligned}(B_0)_S &= B_0\left[1+\left(\frac{4\pi}{3}-\alpha\right)\kappa_S\right]\\ (B_0)_R &= B_0\left[1+\left(\frac{4\pi}{3}-\alpha\right)\kappa_R\right].\end{aligned} \tag{1.22}$$

Στην περίπτωση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο ο παράγοντας σχήματος α. Αν η διεπιφάνεια μεταξύ του δείγματος και της ένωσης αναφοράς είναι σφαιρική, τότε $\alpha = 4\pi/3$, με αποτέλεσμα η διόρθωση της επιδεκτικότητας να μειώνεται στο μηδέν. Σφαιρικά κελιά δειγμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί, αλλά γενικά είναι μη βολικά και με μη ομογενές γυαλί οδηγώντας σε μη αληθή συμπεράσματα. Για ένα κυλινδρικό σωλήνα που περιέχει το δείγμα, με μεγάλο μήκος σε σχέση με την διάμετρό του, τότε $\alpha = 0$ για την συνήθη γεωμετρία που χρησιμοποιείται για τους υπεραγώγιμους μαγνήτες (ο άξονας του σωλήνα είναι παράλληλος με αυτόν του μαγνήτη), $\alpha = 2\pi$ όταν οι άξονες είναι κάθετοι (συνήθως στους μόνιμους ηλεκτρομαγνήτες) και $\alpha = 4\pi/3$ αν ο άξονας του σωλήνα που περιέχει το δείγμα έχει κλίση γωνίας 57.4^{o} (“magic” angle) ως προς το μαγνητικό πεδίο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, όταν $\alpha \neq 4\pi/3$ τα μόρια της ουσίας του δείγματος και της πρότυπης ένωσης αναφοράς δέχονται διαφορετική επίδραση από το μαγνητικό πεδίο και η χημική τους μετατόπιση εκφράζεται λανθασμένα από την εξίσωση (1.19). Η τιμή της μεταβλητής κ_S ισούται περίπου με την τιμή αυτής του διαλύτη και είναι διαφορετική από την κ_R. Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (1.17), (1.18) και (1.22) και με διάφορες απλοποιήσεις, ισχύει ότι:

$$\delta_{measured} = \left[(\sigma_R - \sigma_S) - \left(\frac{4}{3}\pi - \alpha\right)(\kappa_R - \kappa_S)\right]10^{-6}, \tag{1.23}$$

όπου $(\sigma_R - \sigma_S)10^{-6} = \delta_{true}$ είναι η πραγματική τιμή της μετατόπισης. Προφανώς, τα παραπάνω ισχύουν με την προϋπόθεση ότι ισχύουν οι συνθήκες $\sigma << 1$ και $\kappa_R - \kappa_S << 1$, διότι οι τιμές κ είναι της τάξεως 10^{-6}. Σημειώνεται ότι για την μέτρηση των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων ^{1}H μιας ένωσης με τη χρήση εξωτερικού προτύπου αναφοράς, είναι απαραίτητο να γίνουν διορθώσεις λόγω της διαφορετικής μαγνητικής

επιδεκτικότητας, ενώ για άλλους πυρήνες (π.χ. του ^{13}C), σφάλματα της τάξεως του 0.1 ppm θεωρούνται αμελητέα.

1.4.6.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη χημική μετατόπιση NMR-^{1}H – Η επίδραση των διαλυτών και η περίπτωση των δεσμών υδρογόνου

Οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^{1}H επηρεάζονται από αρκετούς παράγοντες. Πρωταρχικό ρόλο έχει η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από έναν πυρήνα πρωτονίου, με την προστασία και αποπροστασία του να καθορίζουν τη χημική του μετατόπιση. Επιπλέον, η μαγνητική ανισοτροπία της μαγνητικής επιδεκτικότητας των γειτονικών πυρήνων ενός υδρογόνου σε ένα μόριο, μέσω της δημιουργίας επιπλέον μαγνητικών πεδίων λόγω της κίνησης των ηλεκτρονίων κλπ., επιδρά σε μεγάλο βαθμό στην χημική του μετατόπιση. Οι πυρήνες υδρογόνου που βρίσκονται σε αρωματικούς δακτυλίους υπόκεινται στην επίδραση της ροής ηλεκτρονίων, για παράδειγμα η ροή των π ηλεκτρονίων στον αρωματικό δακτύλιο του βενζολίου, με αποτέλεσμα την αποπροστασία των πυρήνων ^{1}H.

Όσον αφορά την επίδραση των διαλυτών στην πρωτονιακή χημική μετατόπιση είναι εύλογο να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Για παράδειγμα οι συγκρούσεις και οι απώσεις των αλληλεπιδρώντων μορίων του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας μπορούν να στρεβλώσουν ή να παραμορφώσουν το ηλεκτρονιακό περιβάλλον ενός πυρήνα, μεταβάλλοντας έτσι τον παράγοντα χημικής προστασίας του, σ, κατά μια τιμή ίση με $\Delta\sigma_W$. Σύμφωνα με τη θεωρία, η τιμή $\Delta\sigma_W$ πρέπει να είναι αρνητική και διάφορα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι μια αλλαγή της τάξεως 0.1-0.2 ppm στην προστασία ενός πυρήνα ^{1}H είναι αναπόφευκτη. Γενικά, η ύπαρξη πολικών αλογονικών ατόμων σε ένα διαλύτη προκαλούν αύξηση των αρνητικών τιμών $\Delta\sigma_W$.

Μια επιπλέον επίδραση, $\Delta\sigma_A$, των μορίων του διαλύτη στη χημική προστασία ενός πυρήνα προκαλείται από το μη τυχαίο προσανατολισμό της μαγνητικής ανισοτροπίας των μορίων του διαλύτη σε σχέση με τα μόρια της διαλυμένης ουσίας σε αυτόν. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πολύ παροδικό σύμπλοκο, στο οποίο τα μόρια του διαλύτη παρέχουν την γειτνιακή μαγνητική ανισοτροπία στα μόρια της ουσίας που έρχονται σε επαφή. Τα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων, των ομάδων όπως C=C, C=O, C≡C και C≡N υφίστανται μεγάλη επίδραση από τους αρωματικούς διαλύτες

οδηγώντας σε θετικές τιμές $\Delta\sigma_A$ περίπου ίσες με 0.5 ppm και από τους διαλύτες που περιέχουν τριπλούς δεσμούς οδηγώντας σε αρνητικές τιμές $\Delta\sigma_A$ περίπου ίσες με 0.2-0.4 ppm. Οι τιμές των $\Delta\sigma_A$ ποικίλουν από το ένα στο άλλο μέρος ενός μορίου εξαιτίας στερικών και άλλων επιδράσεων που επηρεάζουν την μαγνητική ανισοτροπία των μορίων του διαλύτη.

Όταν ένα πολικό μόριο διαλύεται σε ένα διαλύτη επάγει ένα πεδίο αντίδρασης (reaction field), προκαλώντας την μείωση της προστασίας ενός πρωτονίου του. Αυτή η επίδραση, $\Delta\sigma_E$, μπορεί να ισούται μέχρι 10 ppm για μόρια μεγάλης πολικότητας σε διαλύτες υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς.

Εκτός από τις γενικές επιπτώσεις των διαλυτών στη χημική μετατόπιση των πυρήνων, πραγματοποιούνται πιο ειδικές επιδράσεις των διαλυτών στα μόρια των διαλυμένων ουσιών, μέσω των μεταξύ των μοριακών αλληλεπιδράσεων. Η πιο σημαντική αλληλεπίδραση, που έχει άμεσο αντίκτυπο στην χημική μετατόπιση κυρίως των πυρήνων που συμμετέχουν σε αυτή ή βρίσκονται πολύ κοντά σε αυτή, είναι η δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Η έννοια και ο σχηματισμός του δεσμού υδρογόνου έχουν αναλυθεί εκτενώς προηγουμένως. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση έχει πολύ σημαντικό αντίκτυπο ειδικά στην πρωτονιακή χημική μετατόπιση. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, ο σχηματισμός ενός τέτοιου δεσμού προκαλεί αποπροστασία του πρωτονίου που συμμετέχει σε αυτόν (για παράδειγμα X-**H**···Y)-περίπου 1 ppm και περισσότερο. Γενικά, όσο πιο ισχυρός είναι ο δεσμός υδρογόνου, διαπιστώνοντάς το μετρώντας την ενθαλπία σχηματισμού του, τόσο πιο μεγάλη είναι η συνεισφορά του στην χημική μετατόπιση.

Η πρωτονιακή μετατόπιση σε υψηλότερες συχνότητες κατά το σχηματισμό του δεσμού υδρογόνου οφείλεται στη μείωση της διαμαγνητικής προστασίας (diamagnetic shielding) του πυρήνα του υδρογόνου, όπως έχει αποδειχθεί από μελέτες υπολογισμού των μοριακών τροχιακών που έδειξαν μειωμένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην περιφέρεια του πυρήνα υδρογόνου. Αυτή η ανακατανομή των ηλεκτρονίων στον δεσμό X-**H** πιθανώς προκαλείται από την μέσω χώρου αλληλεπίδρασή τους με τα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια του πυρήνα Y.

Η φασματοσκοπία ^{1}H-NMR θεωρείται η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την μελέτη των δεσμών υδρογόνου, ποιοτικά αλλά και ποσοτικά. Η μεγάλη πρωτονιακή αποπροστασία που υφίσταται ο πυρήνας του συμμετέχοντος υδρογόνου αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την ερμηνεία φασμάτων ^{1}H-NMR κυρίως για τις ομάδες –OH και –NH διαφόρων μορίων. Επιπλέον, και άλλοι πυρήνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

μελέτη των εν λόγω αλληλεπιδράσεων λόγω των μεγάλων μετατοπίσεων που υφίστανται, για παράδειγμα του ^{17}O, όμως η ευρύτητα των απορροφήσεών τους καταλήγει στο να μειονεκτούν σε σχέση με τους πυρήνες ^{1}H.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των μορίων διαλύτη με τα μόρια μιας ουσίας δημιουργούνται και σχάζουν πολύ γρήγορα, συνήθως αυτές οι δύο καταστάσεις δεν ανιχνεύονται, ανάλογα με το πόσο γρήγορη εναλλαγή έχουν, και παρατηρείται μία κορυφή του ^{1}H με μία συχνότητα ν. Πάντως, σε κατάλληλα συστήματα η μεταβολή της συχνότητας ν σε σχέση με την μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας που συμμετέχει στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη και τη μεταβολή της θερμοκρασίας του υπό μελέτη συστήματος, μπορούν να αναλυθούν με σκοπό την εύρεση των σταθερών ισορροπίας και άλλων θερμοδυναμικών ιδιοτήτων του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Οι προαναφερθείσες επιδράσεις των δεσμών υδρογόνου στην πρωτονιακή χημική μετατόπιση χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, με σκοπό την πλήρη ενεργειακή και θερμοδυναμική μελέτη των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του διαλύτη DMSO με τις ομάδες –OH και –NH διαφόρων μορίων.

1.5 Θεωρία Κβαντομηχανικών Υπολογισμών – Η περίπτωση των Συναρτησιοειδών ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Density Functional Theory, DFT) και Θεωρία διαταράξεως πολλών σωματιδίων (MP*n*)

Ο κλάδος της θεωρητικής χημείας αφορά την εφαρμογή μαθηματικών εργαλείων και μοντέλων της φυσικής στην προσπάθεια ανάλυσης και ερμηνείας χημικών προβλημάτων και διεργασιών. Τα μοντέλα αυτά αποτελούν ιδανικές περιγραφές χημικών συστημάτων τα οποία αποδίδουν εξαιρετικές προβλέψεις και για ιδιότητες ατόμων, μορίων αλλά και της πορείας χημικών αντιδράσεων.

Οι υπολογιστικές μέθοδοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στις μεθόδους οι οποίες στηρίζονται στις βασικές αρχές της κβαντομηχανικής και σε αυτές οι οποίες χρησιμοποιούν κυρίως αρχές της κλασσικής φυσικής για την περιγραφή χημικών συστημάτων.[64]

Στόχος των κβαντομηχανικών μεθόδων είναι η επίλυση της εξίσωσης του Schrödinger, η οποία περιγράφει την κατάσταση ενός κβαντομηχανικού συστήματος. Ο τρόπος με τον

οποίο επιχειρείται αυτή η επίλυση συνιστά το κριτήριο για την μεταξύ τους κατηγοριοποίηση. Τα περισσότερα χημικά συστήματα και διεργασίες είναι πολυατομικά και πολυπαραγοντικά συστήματα. Η παρουσία πολλών πυρήνων δυσχεραίνει τους κβαντομηχανικούς υπολογισμούς σε σχέση με αυτούς των διατομικών μορίων. Επιπλέον, η ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση ενός διατομικού μορίου είναι συνάρτηση μιας μόνο παραμέτρου, της διατομικής απόστασης. Αντίθετα, η ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση ενός πολυατομικού μορίου εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών και οι δίεδρες γωνίες περιστροφής γύρω από απλούς δεσμούς που καθορίζουν τη μοριακή διαμόρφωση. Συνεπώς, μια πλήρης κβαντομηχανική μελέτη ενός πολυατομικού μορίου συνεπάγεται τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής κυματοσυνάρτησης για όλες τις προηγούμενες παραμέτρους. Τα μήκη και οι γωνίες δεσμών του μορίου μεταβάλλονται με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ηλεκτρονιακής ενέργειας του μοριακού συστήματος.[65] Η φύση αυτών των υπολογισμών και η υποχρεωτική επίλυση μεγάλου αριθμού μαθηματικών εξισώσεων περιορίζει τη χρήση τους σε συστήματα μεσαίου έως σχετικά μεγάλου (~500) αριθμού ατόμων.

Εφαρμογές της κλασσικής φυσικής αποτελούν οι μέθοδοι μοριακής μηχανικής όπου δεν επιχειρείται η επίλυση της εξίσωσης του Schrödinger. Αντίθετα, αντιμετωπίζουν το μόριο ως μια συλλογή ατόμων ενωμένα με δεσμούς και εκφράζουν τη μοριακή ενέργεια συναρτήσει σταθερών δύναμης για τις κάμψεις και εκτάσεις των δεσμών και των σχηματιζόμενων γωνιών. Εφαρμόζονται κυρίως σε συστήματα με μεγάλο αριθμό ατόμων, όπως π.χ. πολυμερή και μεγάλες οργανικές αλυσίδες.[66]

Η επίλυση της εξίσωσης Schrödinger για πολυατομικά συστήματα επιχειρείται μέσω των μεθόδων: α) *ab initio*, β) ημιεμπειρικών (semiempirical) γ) εμπειρικών (empirical) και δ) θεωρίας συναρτησιοειδών ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Density Functional Theory), DFT.

Οι *ab initio* υπολογισμοί υιοθετούν πλήρως τις θεμελιώδεις αρχές της κβαντομηχανικής, και τις σταθερές της ταχύτητας του φωτός, όπως του Planck, καθώς και τις τιμές μάζας και φορτίου του πρωτονίου, νετρονίου και ηλεκτρονίου. Ο όρος *ab initio* δεν πρέπει να ερμηνεύεται με την έννοια ενός υπολογισμού απόλυτης ακρίβειας.[67]

Οι ημιεμπειρικές κβαντομηχανικοί μέθοδοι κάνουν χρήση ενός απλουστευμένου Χαμιλτονιανού τελεστή, αντί αυτού της πλήρης μορφής, αντικαθιστώντας μέρος των υπολογιζόμενων αλληλεπιδράσεων από παραμετροποιημένες τιμές. Οι τιμές αυτών των

παραμέτρων απορρέουν τόσο από πειραματικά δεδομένα όσο και από *ab initio* υπολογισμούς.

Οι εμπειρικές μεθοδολογίες χαρακτηρίζονται από την υπολογιστική τους απλότητα και την μειωμένη ακρίβεια των αποτελεσμάτων τους, καθώς αντικαθίσταται η επίλυση κάθε ολοκληρώματος από συνιστώμενες τιμές παραμέτρων. Ανάλογες μεθοδολογίες είναι αποτελούν οι Hückel Molecular Orbital, HMO, και Extended Hückel Molecular Orbital, EHMO.[68]

Η μεθοδολογία DFT χρησιμοποιεί την ηλεκτρονιακή πυκνότητα, ρ, αντί της κυματοσυνάρτησης Ψ, που περιγράφει το υπό μελέτη σύστημα για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής του ενέργειας.

Ο θεμελιώδης στόχος των περισσότερων κβαντομηχανικών μεθοδολογιών σε χημικά προβλήματα είναι η προσεγγιστική επίλυση της χρονοανεξάρτητης, μη σχετικιστικής εξίσωσης του Schrödinger:

$$\hat{H}\Psi_i\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_N,\vec{R}_1,\vec{R}_2,...,\vec{R}_M\right)=E_i\Psi_i\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_N,\vec{R}_1,\vec{R}_2,...,\vec{R}_M\right), \qquad (1.24)$$

όπου, $\hat{H}$ είναι ο Χαμιλτονιανός τελεστής του μοριακού συστήματος αποτελούμενο από M αριθμό πυρήνων και N αριθμό ηλεκτρόνιων, απουσία εξωτερικού μαγνητικού ή ηλεκτρικού πεδίου. Ο $\hat{H}$ είναι ένας διαφορικός τελεστής που αναπαριστά την συνολική ενέργεια του συστήματος:

$$\hat{H}=-\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\nabla_i^2-\frac{1}{2}\sum_{A=1}^{M}\frac{1}{M_A}\nabla_A^2-\sum_{i=1}^{N}\sum_{A=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}}+\sum_{i=1}^{N}\sum_{j>1}^{N}\frac{1}{r_{ij}}+\sum_{\mathrm{A}=1}^{\mathrm{M}}\sum_{\mathrm{B}>\mathrm{A}}^{M}\frac{Z_A Z_{\mathrm{B}}}{R_{AB}}, \qquad (1.25)$$

όπου, οι συντελεστές A και B αριθμούν το πλήθος των M πυρήνων, ενώ τα i και j δηλώνουν τα N ηλεκτρόνια του συστήματος, Z_A και Z_{B} δηλώνουν το φορτίο των αντίστοιχων πυρήνων, M_A η μάζα του πυρήνα A, r_{ij} την απόσταση των ηλεκτρονίων i και j, r_{iA} την απόσταση του ηλεκτρονίου από τον πυρήνα A και R_{AB} την απόσταση μεταξύ των πυρήνων A και B καθώς και ∇_q^2 αποδίδει τον Λαπλασιανό τελεστή ο οποίος ορίζεται ως άθροισμα των διαφορικών τελεστών των καρτεσιανών συντεταγμένων:

$$\nabla_q^2=\frac{\partial^2}{\partial x_q^2}+\frac{\partial^2}{\partial y_q^2}+\frac{\partial^2}{\partial z_q^2}, \qquad (1.26)$$

όπου, x_q, y_q και z_q αποτελούν τις καρτεσιανές συντεταγμένες του κάθε σωματιδίου. Επίσης, η μάζα του πυρήνα A ορίζεται ως πολλαπλάσιο της μάζας του ηλεκτρονίου (ατομικές μονάδες). Οι τρεις εναπομείναντες όροι καθορίζουν τη δυναμική ενέργεια του συστήματος. Ο πρώτος από αυτούς αναπαριστά τις ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρήνων και ηλεκτρονίων, ενώ ο δεύτερος και ο τρίτος όρος περιγράφουν τις απώσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων και των πυρήνων, αντίστοιχα.

Η κυματοσυνάρτηση $\Psi_i\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_N,\vec{R}_1,\vec{R}_2,...,\vec{R}_M\right)$ της εξίσωσης (1.24) περιγράφει την i κατάσταση του συστήματος, η οποία εξαρτάται από τις $3N$ χωρικές συντεταγμένες $\{\vec{r}_i\}$, τις N συντεταγμένες spin $\{s_i\}$ των ηλεκτρονίων, οι οποίες αποδίδονται συνολικά ως $\{\vec{x}_i\}$, και $3M$ χωρικές συντεταγμένες των πυρήνων $\{\vec{R}_I\}$. Η κυματοσυνάρτηση Ψ_i αποδίδει τη συμπεριφορά του συστήματος σε τυχόν εφαρμογή οιουδήποτε πεδίου. Τέλος, E_i αποτελεί την αριθμητική τιμή της ενέργειας για τη συγκεκριμένη κατάσταση που περιγράφει η κυματοσυνάρτηση Ψ_i.

Όλες οι προηγούμενες εξισώσεις είναι συμπυκνωμένες και απλοποιημένες εκφράσεις, απουσιάζουν δηλαδή θεμελιώδεις φυσικές σταθερές. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή του συστήματος ατομικών μονάδων (atomic units), το οποίο υιοθετείται στην περίπτωση μοριακών ή ατομικών συστημάτων. Σε αυτό το σύστημα, οι φυσικές ποσότητες εκφράζονται ως πολλαπλάσια των θεμελιωδών σταθερών. Η μάζα του ηλεκτρονίου, m_e, η απόλυτη τιμή του φορτίου του, $|e|$, η σταθερά του Planck, h, η ιδία διαιρεμένη με 2π, $\hbar$, και η διαπερατότητα του κενού, $4\pi\varepsilon_0$, λαμβάνουν τιμή μονάδος. Οι μάζες, τα φορτία, κ.λ.π., εκφράζονται ως πολλαπλάσια των ανωτέρω σταθερών, και απαλείφονται από τις εξισώσεις. Το ατομικό σύστημα μονάδων συνδέεται με το διεθνές σύστημα μονάδων, SI, μέσω των σχέσεων του Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Ατομικές Μονάδες

Μέγεθος	Ατομική μονάδα	Τιμή σε μονάδες SI	Σύμβολο
Μάζα	Μάζα αδρανείας ηλεκτρονίου	9.1094×10^{-31}Kg	m_e
Φορτίο	Στοιχειώδες φορτίο	1.6022×10^{-19}C	e
Δράση (Action)	Σταθερά Planck/2π	1.0546×10^{-34}J s	$\hbar$
Μήκος	$4\pi\varepsilon_o / m_e e^2$	5.2918×10^{-11}m	a_0 (bohr)
Ενέργεια	$\hbar^2 / m_e a_0^2$	4.3597×10^{-18}J	E_h (hartree)

Επισημαίνεται ότι τιμή της ενεργειακής μονάδας, E_h, ανταποκρίνεται στο διπλάσιο της ενέργειας ιονισμού του ατόμου του υδρογόνου δηλαδή, 1 hartree είναι ίσο με 27.21 eV ή 627.51 kcal/mol.

1.5.1 Η προσέγγιση Born-Oppenheimer και η αρχή της αντισυμμετρικότητας

Η εξίσωση του Schrödinger μπορεί να απλοποιηθεί περαιτέρω εάν λάβουμε υπόψη τις σημαντικές διαφορές μεταξύ των πυρηνικών και ηλεκτρονιακών μαζών. Ο πυρήνας του ατόμου του υδρογόνου (πρωτόνιο) είναι 1,800 φορές περίπου βαρύτερος από τη μάζα του ηλεκτρονίου, και για έναν τυπικό πυρήνα όπως του άνθρακα, η αναλογία μάζας πυρήνων-ηλεκτρονίου υπερβαίνει τις 20,000. Επομένως, οι πυρήνες κινούνται πολύ πιο αργά σε σχέση με τα ηλεκτρόνια και κατ' επέκταση θεωρούμε ότι τα ηλεκτρόνια κινούνται στο πεδίο που ασκείται από τους ακίνητους πυρήνες. Η συγκεκριμένη πρόταση είναι γνωστή και ως προσέγγιση Born-Oppenheimer. Η κινητική ενέργεια πυρήνων σταθερής θέσης είναι μηδενική και η δυναμική τους ενέργεια λόγω των διαπυρηνικών απώσεων παραμένει σταθερή. Επομένως, ο Χαμιλτονιανός τελεστής της εξίσωσης (1.25) απλοποιείται στην παρακάτω μορφή:

$$\hat{H}_{elec} = -\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\nabla_i^2 - \sum_{i=1}^{N}\sum_{A=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j>1}^{N}\frac{1}{r_{ij}} = \hat{T} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee}\,, \tag{1.27}$$

επονομαζόμενος και ως ηλεκτρονιακός Χαμιλτονιανός τελεστής.

Η επίλυση της εξίσωσης του Schrödinger με χρήση του ηλεκτρονιακού Χαμιλτονιανού τελεστή, $\hat{H}_{elec}$, βελτιώνει την ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση, Ψ_{elec}, και υπολογίζει την ηλεκτρονιακή ενέργεια, E_{elec}. Η Ψ_{elec} εξαρτάται από τις συντεταγμένες του ηλεκτρονίου, ενώ οι πυρηνικές συντεταγμένες υπεισέρχονται παραμετρικά στην Ψ_{elec}:

$$\hat{H}_{elec}\Psi_{elec} = E_{elec}\Psi_{elec}\,. \tag{1.28}$$

Η συνολική ενέργεια, E_{tot}, περιγράφεται από το άθροισμα της E_{elec} και του σταθερού όρου πυρηνικών απώσεων, E_{nuc}, δηλαδή:

$$E_{nuc} = \sum_{\mathrm{A}=1}^{\mathrm{M}}\sum_{\mathrm{B}>\mathrm{A}}^{M}\frac{Z_A Z_{\mathrm{B}}}{R_{AB}} \text{ και } E_{tot} = E_{elec} + E_{nuc}\,. \tag{1.29}$$

Η έλξη που ασκείται στα ηλεκτρόνια από τους πυρήνες, αποτελεί την αναμενόμενη τιμή του τελεστή $\hat{V}_{Ne}$ στην εξίσωση (1.27), και συχνά αναφέρεται ως εξωτερικό δυναμικό, V_{ext}, στη DFT. Εντούτοις, το V_{ext} δεν περιορίζεται απαραίτητα στην επίδραση του πυρηνικού πεδίου αλλά μπορεί να περιλάβει εξωτερικά εφαρμοζόμενα μαγνητικά, ηλεκτρικά ή/και άλλα πεδία. Στη συνέχεια του κεφαλαίου, θα μας απασχολήσει η επίλυση της εξισώσεως (1.28). χωρίς αναφορά του δείκτη «*elec*» στους όρους της.

Η κυματοσυνάρτηση Ψ δεν αποτελεί παρατηρήσιμο φυσικό μέγεθος. Η ερμηνεία της μπορεί να συσχετιστεί αποκλειστικά με το τετράγωνο της κυματοσυνάρτησης:

$$\left|\Psi\left(\vec{x}_1, \vec{x}_2, ..., \vec{x}_N\right)\right|^2 d\vec{x}_1, d\vec{x}_2, ..., d\vec{x}_N\,, \tag{1.30}$$

το οποίο αντιπροσωπεύει την πιθανότητα ταυτόχρονης εύρεσης των ηλεκτρονίων $1, 2, ..., N$ σε χωρικά στοιχεία $d\vec{x}_1, d\vec{x}_2, ..., d\vec{x}_N$. Τα ηλεκτρόνια αποτελούν αδιάκριτα σωματίδια, και η ανωτέρω υπολογιζόμενη πιθανότητα πρέπει να διατηρείται με την εναλλαγή οποιωνδήποτε δυο ηλεκτρονίων *i* και *j*, δηλαδή θα πρέπει να ισχύει:

$$\left|\Psi\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_i,\vec{x}_j,...,\vec{x}_N\right)\right|^2=\left|\Psi\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_j,\vec{x}_i,...,\vec{x}_N\right)\right|^2. \qquad (1.31)$$

Η εκάστοτε κυματοσυνάρτηση που περιγράφει τα σωματίδια ενός συστήματος μπορεί να είναι συμμετρική ή αντισυμμετρική ως προς τον εαυτό της, δηλαδή να διατηρεί ή να αντιστρέφει το πρόσημό της σε ενδεχόμενη εναλλαγή θέσης μεταξύ δυο σωματιδίων. Οι συμμετρικές κυματοσυναρτήσεις περιγράφουν τα σωματίδια με ονομασία μποζόνια, τα οποία φέρουν ακέραιες τιμές spin συμπεριλαμβανομένης και αυτής του μηδενός, π.χ. φωτόνια, ενώ οι αντισυμμετρικές κυματοσυναρτήσεις περιγράφουν σωματίδια με ονομασία φερμιόνια, τα οποία φέρουν ημιακέραιες τιμές spin, π.χ. ηλεκτρόνια $I = 1/2$.

$$\Psi\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_i,\vec{x}_j,...,\vec{x}_N\right)=-\Psi\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_j,\vec{x}_i,...,\vec{x}_N\right). \qquad (1.32)$$

Η παραπάνω ισότητα αντιπροσωπεύει την **αρχή αντισυμμετρικότητας** (antisymmetry principle) και είναι η κβαντομηχανική γενίκευση της απαγορευτικής αρχής του Pauli, που περιγράφει το γεγονός ότι είναι αδύνατο δυο ηλεκτρόνια να καταλαμβάνουν την ίδια κατάσταση. Αποτέλεσμα της ερμηνείας της πιθανότητας της κυματοσυνάρτησης αποτελεί η τιμή του ολοκληρώματος της εξίσωσης (1.30), η οποία είναι ίση με τη μονάδα. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα να βρεθούν N ηλεκτρόνια οπουδήποτε στο χώρο που ορίζει η κυματοσυνάρτηση είναι ίση με τη μονάδα (απόλυτα βέβαιο ενδεχόμενο),

$$\int...\int\left|\Psi\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,...,\vec{x}_N\right)\right|^2 d\vec{x}_1,d\vec{x}_2,...,d\vec{x}_N=1. \qquad (1.33)$$

Κάθε κυματοσυνάρτηση που ικανοποιεί την εξίσωση (1.32) ονομάζεται κανονικοποιημένη.

1.5.2 Η αρχή των μεταβολών (variational principle)

Η επίλυση της εξίσωσης Schrödinger για ένα οποιοδήποτε μόριο απαιτεί την κατασκευή του Χαμιλτονιανού τελεστή του συστήματος. Η εξίσωση (1.27) υποδηλώνει ότι η μοναδική πληροφορία που εξαρτάται από τη φύση του μορίου είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων N του συστήματος και το εξωτερικό δυναμικό V_{ext} ή V_{Ne}. Το εξωτερικό δυναμικό προσδιορίζεται αποκλειστικά από τις θέσεις και τα φορτία των πυρήνων που

απαρτίζουν το υπό μελέτη σύστημα. Τα εναπομείναντα μέρη, όπως οι τελεστές που αναπαριστούν την κινητική ενέργεια ή τις δια-ηλεκτρονιακές απώσεις, είναι ανεξάρτητα του συστήματος.

Επιπλέον, πρέπει να προσδιοριστεί η ιδιοσυνάρτηση Ψ_i και οι αντίστοιχες ιδιοτιμές E_i του $\hat{H}$. Μετά τον αρχικό προσδιορισμό του Ψ_i, όλες οι ιδιότητες του υπό μελέτη συστήματος προκύπτουν με την εφαρμογή του κατάλληλου τελεστή στην ιδιοσυνάρτηση. Πρακτικά αυτή η διαδικασία δεν έχει καμία εφαρμογή, με εξαίρεση ελάχιστων περιπτώσεων και δεν υπάρχει κάποιος γνωστό τρόπος για την ακριβή επίλυση της εξίσωσης Schrödinger για ατομικά και μοριακά συστήματα.

Αρχικά επιχειρείται η συστηματική προσέγγιση της κυματοσυνάρτησης της βασικής κατάστασης Ψ_0, δηλαδή της κατάστασης με την χαμηλότερη ενέργεια E_0. Η προσέγγιση αυτή στηρίζεται στην αρχή των μεταβολών (variational principle) και κατέχει εξέχουσα θέση σε όλες τις κβαντομηχανικές εφαρμογές. Η προσδοκώμενη τιμή για ένα συγκεκριμένο παρατηρήσιμο μέγεθος το οποίο περιγράφεται από τον τελεστή $\hat{O}$ για οποιαδήποτε κυματοσυνάρτηση Ψ_{trial}, δίνεται από την έκφραση:

$$\left\langle \hat{O} \right\rangle = \int ... \int \Psi_{trial}^{*} \hat{O} \Psi_{trial} d\vec{x}_1, d\vec{x}_2, ..., d\vec{x}_N \equiv \left\langle \Psi_{trial} \middle| \hat{O} \middle| \Psi_{trial} \right\rangle, \tag{1.34}$$

όπου, τα ολοκληρώματα αναπαρίστανται με την σημειογραφία που εισήγαγε ο Dirac και χρησιμοποιείται συχνά στην κβαντική χημεία. Ο αστερίσκος στην Ψ_{trial}^{*} υποδηλώνει ότι πρόκειται για τη συζυγή-μιγαδική (complex conjugate) της Ψ_{trial}.

Σύμφωνα με την αρχή των μεταβολών, η ενέργεια που υπολογίζεται από την εξίσωση (1.34), ως η προσδοκώμενη τιμή του Χαμιλτονιανού τελεστή για κάθε δοκιμαστική Ψ_{trial} κυματοσυνάρτηση, αποτελεί ανώτερο όριο της ορθής τιμής της ενέργειας της βασικής κατάστασης, δηλαδή θα ισχύει:

$$\left\langle \Psi_{trial} \middle| \hat{H} \middle| \Psi_{trial} \right\rangle = E_{trial} \geq E_0 = \left\langle \Psi_0 \middle| \hat{H} \middle| \Psi_0 \right\rangle. \tag{1.35}$$

Η ισότητα ισχύει μόνο στην περίπτωση όπου η Ψ_{trial} είναι ίση με την Ψ_0.

Πρέπει να τονιστεί ότι στις εξισώσεις (1.34) και (1.35) συναντάται για πρώτη φορά η κύρια μαθηματική αρχή της μεθόδου DFT. Για την ακρίβεια, στις παραπάνω εξισώσεις

παρατηρούμε τον κανόνα αντιστοίχησης συγκεκριμένης τιμής μιας μεταβλητής, π.χ. E_{trial}, σε μια συνάρτηση, π.χ. Ψ_{trial} και αυτός χαρακτηρίζεται ως συναρτησιοειδές (functional). Συγκρίνοντας με τη γνωστή έννοια της συνάρτησης, όπου η τιμή μιας εξαρτημένης μεταβλητής αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη τιμή μιας ανεξάρτητης μεταβλητής, στην περίπτωση του συναρτησιοειδούς ο ρόλος της ανεξάρτητης μεταβλητής ανατίθεται σε συγκεκριμένη συνάρτηση.

Επιστρέφοντας στη διαδικασία εύρεσης της τιμής ενέργειας βασικής κατάστασης και της αντίστοιχης κυματοσυνάρτησης χρησιμοποιώντας την αρχή των μεταβολών, προχωρούμε σε ελαχιστοποίηση του συναρτησιοειδούς $E[\Psi]$ αναζητώντας όλες τις αποδεκτές κυματοσυναρτήσεις των N ηλεκτρονίων. Αποδεκτές λύσεις αποτελούν οι κυματοσυναρτήσεις, οι οποίες είναι παντού συνεχείς και τετραγωνικά ολοκληρώσιμες (quadratic integrable). Εάν τα κριτήρια αυτά δεν ικανοποιούνται, τότε είναι αδύνατη η κανονικοποίηση της κυματοσυνάρτησης, εξίσωση (1.33). Η κυματοσυνάρτηση χαμηλότερης ενέργειας συμβολίζεται ως Ψ_0 και η τιμή της ενέργειας που αντιστοιχεί σε αυτή αποτελεί την τιμή ενέργειας της βασικής κατάστασης E_0. Η μέθοδος αυτή περιγράφεται ως ακολούθως:

$$E_0 = \min_{\Psi \to N} E[\Psi] = \min_{\Psi \to N} \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle, \tag{1.36}$$

όπου με $\Psi \to N$ συμβολίζεται οποιαδήποτε επιτρεπτή κυματοσυνάρτηση Ψ των N ηλεκτρονίων.

Η κανονικοποίηση των αρχικών κυματοσυναρτήσεων επιτυγχάνεται με χρήση συγκεκριμένων κατηγοριών συναρτήσεων, και προϋποθέτει τεράστια εμπειρία στη χρήση τους.

Συνεπώς, από τη στιγμή που είναι γνωστά τα N και V_{ext}, τα οποία προσδιορίζονται από τα Z_A και R_A, αντίστοιχα, είναι δυνατή η κατασκευή του Χαμιλτονιανού τελεστή $\hat{H}$. Από την εξίσωση (1.26) είναι θεωρητικά εφικτή η λήψη της κυματοσυνάρτησης βασικής κατάστασης, Ψ_0, η οποία με τη σειρά της επιτρέπει τον προσδιορισμό της ενέργειας E_0 και συνεπώς όλων των υπόλοιπων ιδιοτήτων του συστήματος. Αυτό αποδίδεται συνολικά μέσω της παρακάτω έκφρασης:

$$\{N, Z_A, R_A\} \Rightarrow \hat{H} \Rightarrow \Psi_0 \Rightarrow E_0. \tag{1.37}$$

Επομένως, τα N και V_{ext} καθορίζουν πλήρως και μοναδικά την κυματοσυνάρτηση Ψ_0 και την τιμή της βασικής ενέργειας E_0. Η τιμή της ενέργειας βασικής κατάστασης αποτελεί ένα συναρτησιοειδές του αριθμού των ηλεκτρονίων N και του δυναμικού V_{ext} των πυρήνων του υπό μελέτη συστήματος, δηλαδή:

$$E_0 = E\left[N, V_{ext}\right]. \tag{1.38}$$

1.5.3 Η προσέγγιση Hartree-Fock

Η προσέγγιση Hartree-Fock, HF, αποτελεί σημείο αναφοράς για σχεδόν όλες τις συμβατικές κβαντομηχανικές μεθοδολογίες.

Στη συζήτηση για την αρχή των μεταβολών, αποδείχθηκε ότι είναι αδύνατη η επίλυση της εξίσωσης (1.36) με αναζήτηση όλων των αποδεκτών κυματοσυναρτήσεων των N ηλεκτρονίων. Η μεθοδολογία Hartree-Fock στηρίζεται στην προσέγγιση της κυματοσυνάρτησης των N ηλεκτρονίων με ένα αντισυμμετρικό γινόμενο των N μονοηλεκτρονιακών κυματοσυναρτήσεων, $\chi_i\left(\vec{x}_i\right)$, το οποίο ονομάζεται διακρινούσα Slater, Φ_{SD}:

$$\Psi_0 \approx \Phi_{SD} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1\left(\vec{x}_1\right) & \chi_2\left(\vec{x}_1\right) & \cdots & \chi_N\left(\vec{x}_1\right) \\ \chi_1\left(\vec{x}_2\right) & \chi_2\left(\vec{x}_2\right) & \cdots & \chi_N\left(\vec{x}_2\right) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \\ \chi_1\left(\vec{x}_N\right) & \chi_2\left(\vec{x}_N\right) & \cdots & \chi_N\left(\vec{x}_N\right) \end{vmatrix}. \tag{1.39}$$

Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια τροποποιημένη έκφραση που περιέχει μόνο τα διαγώνια στοιχεία της Φ_{SD}:

$$\Phi_{SD} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \det\left\{\chi_1\left(\vec{x}_1\right) \;\; \chi_2\left(\vec{x}_2\right) \;\; \ldots \;\; \chi_N\left(\vec{x}_N\right)\right\}. \tag{1.40}$$

Οι μονοηλεκτρονιακές συναρτήσεις $\chi_i(\vec{x}_i)$ ονομάζονται spin τροχιακά (spin orbitals) και αποτελούνται από ένα χωρικό τροχιακό (spatial orbital), $\phi_i(\vec{r}_i)$, και μια από τις δύο συναρτήσεις spin, $a(s)$ ή $\beta(s)$, δηλαδή:

$$\chi(\vec{x}) = \phi(\vec{r})\sigma(s), \qquad \sigma = \alpha, \beta. \tag{1.41}$$

Οι συναρτήσεις spin έχουν την σημαντική ιδιότητα της ορθοκανονικότητας, δηλαδή:

$$\langle\alpha|\alpha\rangle = \langle\beta|\beta\rangle = 1 \text{ και } \langle\alpha|\beta\rangle = \langle\beta|\alpha\rangle = 0. \tag{1.42}$$

Τα spin τροχιακά είναι επίσης ορθοκανονικά, δηλαδή:

$$\int \chi_i^*(\vec{x})\chi_i(\vec{x})d\vec{x} = \langle\chi_i|\chi_j\rangle = \delta_{ij}, \tag{1.43}$$

όπου δ_{ij} συμβολίζει το δέλτα Kronecker το οποίο ισούται με τη μονάδα στην περίπτωση που το i είναι ίσο με το j και λαμβάνει μηδενική τιμή όταν το i είναι διάφορο του j. Ο όρος $1/\sqrt{N!}$ που προηγείται της διακρίνουσας, διασφαλίζει την συνθήκη κανονικοποίησης της εξίσωσης (1.33). Η διακρίνουσα Slater είναι όντως αντισυμμετρική, καθώς διαπιστώνεται αλλαγή πρόσημου με την εναλλαγή δύο σειρών ή γραμμών της.

Με δεδομένη πια τη μορφή της κυματοσυνάρτησης, ακολουθεί η εφαρμογή της αρχής των μεταβολών με στόχο την εύρεση της Φ_{SD} με την οποία αποδίδεται η χαμηλότερη ενέργεια. Η μοναδική δυνατότητα ευελιξίας στη διακρίνουσα Slater παρέχεται από τα spin τροχιακά. Στην προσέγγιση Hartree-Fock τα spin τροχιακά, $\{\chi_i\}$, μεταβάλλονται έτσι ώστε η τιμή της ενέργειας που προκύπτει να είναι η ελάχιστη δυνατή, ικανοποιώντας ταυτόχρονα το κριτήριο για την διατήρηση της ορθοκανονικότητάς τους, δηλαδή:

$$E_{HF} = \min_{\Phi_{SD}\to N} E[\Phi_{SD}]. \tag{1.44}$$

Η αναμενόμενη τιμή του Χαμιλτονιανού τελεστή με εφαρμογή του σε μια διακρίνουσα Slater προκύπτει με ανάπτυξη της διακρίνουσας και σταδιακή εφαρμογή όρων του Χαμιλτονιανού τελεστή σε αυτή. Η τιμή της ενέργειας Hartree-Fock δίνεται από:

$$E_{HF} = \langle\Phi_{\mathrm{SD}}|\hat{H}|\Phi_{\mathrm{SD}}\rangle = \sum_i^N \left(i\left|\hat{h}\right|i\right) + \frac{1}{2}\sum_i^N\sum_j^N (ii|jj) - (ij|ji), \tag{1.45}$$

όπου η έκφραση

$$\left(i\left|\hat{h}\right|i\right)=\int\chi_i^*\left(\vec{x}_1\right)\left\{-\frac{1}{2}\nabla^2-\sum_A^M\frac{Z_A}{r_{1A}}\right\}\chi_i\left(\vec{x}_1\right)d\vec{x}_1, \tag{1.46}$$

ορίζει την συνεισφορά της κινητικής ενέργειας και των ηλεκτρονιακών-πυρηνικών έλξεων, ενώ οι εξισώσεις

$$\left(ii\middle|jj\right)=\int\int\left|\chi_i\left(\vec{x}_1\right)\right|^2\frac{1}{r_{12}}\left|\chi_j\left(\vec{x}_2\right)\right|^2d\vec{x}_1d\vec{x}_2, \tag{1.47}$$

$$\left(ij\middle|ji\right)=\int\int\chi_i\left(\vec{x}_1\right)\chi_j^*\left(\vec{x}_1\right)\frac{1}{r_{12}}\chi_j\left(\vec{x}_2\right)\chi_i^*\left(\vec{x}_2\right)d\vec{x}_1d\vec{x}_2, \tag{1.48}$$

είναι τα αποκαλούμενα ολοκληρώματα Coulomb και ανταλλαγής (exchange) αντίστοιχα, τα οποία περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δυο ηλεκτρονίων.

Από την εξίσωση (1.45) προκύπτει ότι η τιμή της ενέργειας E_{HF} αποτελεί συναρτησιοειδές των spin τροχιακών, δηλαδή $E_{HF}\left[\left\{\chi_i\right\}\right]$. Επομένως, η μόνη δυνατότητα ελαχιστοποίησης της τιμής της ενέργειας HF, E_{HF}, μέσω της αρχής των μεταβολών έγκειται στην αρχική επιλογή των συναρτήσεων που περιγράφουν τα spin τροχιακά. Επιπλέον, η ορθοκανονικότητα των τροχιακών οφείλει να διατηρείται κατά τη διάρκεια της ελαχιστοποίησης. Οι εξισώσεις που προκύπτουν ονομάζονται εξισώσεις Hartree-Fock και έχουν την παρακάτω μορφή:

$$\hat{f}\chi_i=\varepsilon_i\chi_i,\quad i=1,2,\ldots,N. \tag{1.49}$$

Η μορφή αυτών των N εξισώσεων είναι παρόμοια με εκείνη των εξισώσεων ιδιοτιμών, όπου οι τιμές ε_i αποτελούν τις ιδιοτιμές του τελεστή Fock. Οι τιμές ε_i αποδίδουν την ενέργεια των spin τροχιακών. Ο τελεστής Fock, $\hat{f}$, είναι ουσιαστικά ένας μονοηλεκτρονιακός τελεστής ο οποίος ορίζεται ως:

$$\hat{f}_i=-\frac{1}{2}\nabla_i^2-\sum_A^M\frac{Z_A}{r_{iA}}+V_{HF}(i), \tag{1.50}$$

όπου ο πρώτος όρος περιγράφει την κινητική ενέργεια, ο δεύτερος τη δυναμική ενέργεια λόγω της έλξης ηλεκτρονίου-πυρήνα και ο τρίτος όρος ονομάζεται δυναμικό Hartree-Fock, $V_{HF}(i)$, που περιγράφει το μέσο απωστικό δυναμικό στο οποίο υπόκειται το *i*-οστό ηλεκτρόνιο λόγω των υπόλοιπων *N*-1 ηλεκτρονίων. Συνεπώς, ο πολύπλοκος τελεστής $1/r_{ij}$ που περιγράφει τις απώσεις δυο ηλεκτρονίων στην περίπτωση του Χαμιλτονιανού τελεστή, έχει αντικατασταθεί από έναν απλούστερο μονοηλεκτρονιακό τελεστή, $V_{HF}(i)$, ο οποίος περιγράφει τις αναπτυσσόμενες απώσεις μεταξύ του *i*-οστού ηλεκτρονίου και των υπολοίπων ηλεκτρονίων του συστήματος. Συγκεκριμένα, το δυναμικό V_{HF} αποτελείται από δυο μέρη:

$$V_{HF}\left(\vec{x}_1\right)=\sum_{j}^{N}\left(\hat{J}_j\left(\vec{x}_1\right)-\hat{K}_j\left(\vec{x}_1\right)\right), \tag{1.51}$$

όπου, $\hat{J}_j$ αποτελεί τον τελεστή Coulomb και $\hat{K}_j$ τον τελεστή ανταλλαγής (exchange).

Ο τελεστής Coulomb ορίζεται ως:

$$\hat{J}_j\left(\vec{x}_1\right)=\int\left|\chi_j\left(\vec{x}_2\right)\right|^2\frac{1}{r_{12}}d\vec{x}_2, \tag{1.52}$$

και περιγράφει το δυναμικό που υφίσταται ένα ηλεκτρόνιο στη θέση $\vec{x}_1$ λόγω της μέσης κατανομής φορτίου ενός άλλου ηλεκτρονίου στο spin τροχιακό χ_j. Η έκφραση $\left|\chi_j\left(\vec{x}_2\right)\right|^2 d\vec{x}_2$ περιγράφει την πιθανότητα ύπαρξης ενός ηλεκτρονίου στο χωρικό στοιχείο $d\vec{x}_2$. Καθώς το αποτέλεσμα της εφαρμογής του τελεστή, $\hat{J}_j\left(\vec{x}_1\right)$, σε ένα spin τροχιακό $\chi_j\left(\vec{x}_1\right)$, εξαρτάται αποκλειστικά από την τιμή του χ_j στη θέση $\vec{x}_1$, ο τελεστής Coulomb, $\hat{J}_j$ και το αποτέλεσμα που αυτός επιφέρει χαρακτηρίζονται ως τοπικής εμβέλειας (local).

Ο δεύτερος όρος στην εξίσωση (1.51) περιγράφει τη συνεισφορά του μονοηλεκτρονιακού τελεστή $V_{HF}(i)$, ως συνέπεια ανταλλαγής ηλεκτρονίων μεταξύ δυο spin τροχιακών. Ο τελεστής ανταλλαγής $\hat{K}$ δεν έχει κλασσική ερμηνεία και μπορεί να οριστεί μόνο μέσω της επίδρασης σε spin τροχιακό, η οποία οδηγεί σε ανταλλαγή των μεταβλητών στα δυο spin τροχιακά:

$$\hat{K}_j(\vec{x}_1)\chi_i(\vec{x}_1) = \int \chi_j^*(\vec{x}_2)\frac{1}{r_{12}}\chi_i(\vec{x}_2)d\vec{x}_2\chi_j(\vec{x}_1). \tag{1.53}$$

Το αποτέλεσμα της εφαρμογής του τελεστή $\hat{K}_j(\vec{x}_1)$ στο spin τροχιακό $\chi_i(\vec{x}_1)$ εξαρτάται από την τιμή του χ_i σε όλα τα σημεία του χώρου, εφόσον το χ_i περιγράφει πλέον τη θέση $\vec{x}_2$, η οποία αποτελεί και τη μεταβλητή ολοκλήρωσης. Συνεπώς, ο τελεστής ανταλλαγής, $\hat{K}_j(\vec{x}_1)$, και το αποτέλεσμα το οποίο αυτός επιφέρει χαρακτηρίζονται μη τοπικής εμβέλειας (non local). Η εμφάνιση του όρου ανταλλαγής οφείλεται αποκλειστικά στην αντισυμμετρικότητα της διακρίνουσας Slater και ισχύει για όλα τα φερμιόνια, ανεξαρτήτως του φορτίου που αυτά φέρουν. Ο τελεστής $1/r_{12}$ είναι ανεξάρτητος του spin. Λόγω της ορθοκανονικότητας των spin τροχιακών, οι συνεισφορές λόγω ανταλλαγής εμφανίζονται μόνο για ηλεκτρόνια όμοιου spin, διότι στην περίπτωση που τα spin είναι αντιπαράλληλα, ο όρος εντός του ολοκληρώματος στην εξίσωση (1.53) θα περιέχει τον παράγοντα $\langle a(s_2)|\beta(s_2)\rangle$ (ή $\langle \beta(s_2)|a(s_2)\rangle$), ο οποίος οδηγεί το ολοκλήρωμα σε μηδενική τιμή. Από τις εξισώσεις (1.47) και (1.48) προκύπτουν, αντίστοιχα, τα ολοκληρώματα Coulomb και ανταλλαγής.

Επίσης, στο διπλό άθροισμα που εμφανίζεται στην εξίσωση (1.45), ο όρος i ίσος με τον j είναι επιτρεπτός. Όταν ο όρος i ισούται με j, το ολοκλήρωμα της εξίσωσης (1.47) περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις Coulomb του φορτίου ενός ηλεκτρονίου με τον εαυτό του. Άμεση συνέπεια του ανωτέρω γεγονότος αποτελεί το αποτέλεσμα υπολογισμού της τιμής της ενέργειας μονοηλεκτρονιακού συστήματος, όπως του ατομικού υδρογόνου, όπου απουσιάζουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ ηλεκτρονίων, και η εξίσωση (1.47) καταλήγει σε διάφορο του μηδενός αποτέλεσμα. Αυτή η ιδιοαλληλεπίδραση (self interaction) είναι προφανώς αβάσιμη.

Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται από τον όρο ανταλλαγής. Όταν i ίσος με j, το ολοκλήρωμα Coulomb είναι ίσο με αυτό της ανταλλαγής και τα δύο ανάγονται στην έκφραση:

$$\int\int |\chi_i(\vec{x}_1)|^2 \frac{1}{r_{12}} |\chi_i(\vec{x}_2)|^2 d\vec{x}_1 d\vec{x}_2. \tag{1.54}$$

Η συμμετοχή τους στην εξίσωση (1.45) είναι ετερόσιμη και συνεπώς απαλείφονται. Το πρόβλημα της ιδιοαλληλεπίδρασης, το οποίο επιλύεται αποτελεσματικά στη μεθοδολογία Hartree-Fock, καθώς και η συνεισφορά της ενέργειας ανταλλαγής, αποτελούν σημαντικά εμπόδια στις προσεγγίσεις των συναρτησιοειδών ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

1.5.4. Αυτοσυνεπές πεδίο (Self Consistent Field) SCF

Η εξάρτηση των τελεστών Fock από τα spin τροχιακά ως συνέπεια του δυναμικού Hartree-Fock, V_{HF}, καθιστά την επίλυση της εξίσωσης (1.49) δυσχερή και οδηγεί στην διατύπωση ενός προβλήματος ψευδο-ιδιοτιμών (pseudo-eigenvalue problem) το οποίο υποχρεωτικά επιλύεται μέσω επαναληπτικών μεθόδων.

Η επαναληπτική τεχνική επίλυσης του προβλήματος ψευδο-ιδιοτιμών ονομάζεται διαδικασία αυτοσυνεπούς πεδίου (Self Consistent Field procedure), SCF. Η τεχνική SCF εκκινεί με μια αρχική εκτίμηση το σύνολο των τροχιακών, με το οποίο επιλύονται αρχικά οι εξισώσεις Hartree-Fock. Η νέα κυματοσυνάρτηση χρησιμοποιείται στην επόμενη επίλυση του προβλήματος ιδιοτιμών της ενέργειας έως ότου το άθροισμα των τελικών ιδιοτιμών της ενέργειας διαφοροποιείται κατά συγκεκριμένη τιμή από το άθροισμα των αμέσως προηγούμενων ιδιοτιμών της ενέργειας. Η SCF επίλυση των εξισώσεων HF πραγματοποιείται με την εισαγωγή ενός πεπερασμένου συνόλου βάσης (basis set), βάση του οποίου αναπτύσσονται τα μοριακά τροχιακά.

Η φυσική ερμηνεία των τιμών της ενέργειας ε_i των εκάστοτε τροχιακών της εξίσωσης (1.49) παρέχεται από το θεώρημα Koopman, σύμφωνα με το οποίο η τιμή ενέργειας ενός τροχιακού ε_i που λαμβάνεται με την εφαρμογή της θεωρίας Hartree-Fock, αποτελεί προσέγγιση της ενέργειας ιονισμού, δηλαδή της ενέργειας που απαιτείται για την απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου από το συγκεκριμένο τροχιακό, χ_i.

Ουσιαστικά ο τελεστής Fock είναι ένας μονοηλεκτρονιακός τελεστής, ο οποίος μέσω της εξίσωσης (1.55) περιγράφει το σύστημα N ηλεκτρονίων που δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά υφίστανται την επίδραση συγκεκριμένου δυναμικού πεδίου, V_{HF}. Η βασική αυτή ιδέα συναντάται και στην θεωρία DFT.

$$\hat{H}_{HF}\Phi_{SD} = E_{HF}^{0}\Phi_{SD} = \sum_{i}^{N} \hat{f}_i \Phi_{SD} = \sum_{i}^{N} \varepsilon_i \Phi_{SD}. \qquad (1.55)$$

1.5.5 Ηλεκτρονιακή πυκνότητα και DFT

Η προσπάθεια ερμηνείας της εξίσωσης της κυματοσυνάρτησης (1.24) με τη βοήθεια των πιθανοτήτων οδηγεί ευθέως στη κεντρική έννοια της μεθόδου DFT, δηλαδή την ηλεκτρονιακή πυκνότητα $\rho(\vec{r})$, η οποία ορίζεται ως το πολλαπλό ολοκλήρωμα ως προς τις συντεταγμένες spin όλων των ηλεκτρονίων και για όλες εκτός μιας χωρικών μεταβλητών:

$$\rho(\vec{r}) = N\int\cdots\int\left|\Psi\left(\vec{x}_1,\vec{x}_2,\ldots,\vec{x}_N\right)\right|^2 ds_1 d\vec{x}_2\ldots d\vec{x}_N\,. \tag{1.56}$$

Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθορίζει την πιθανότητα εύρεσης οποιουδήποτε από τα N ηλεκτρόνια σε χωρικό στοιχείο $d\vec{r}_1$ ανεξαρτήτου τιμής spin, θεωρώντας ότι τα υπόλοιπα N-1 ηλεκτρόνια κατέχουν τυχαίες θέσεις και spin στην κατάσταση που περιγράφει η κυματοσυνάρτηση Ψ. Για την ακρίβεια, η ποσότητα $\rho(\vec{r})$ αποτελεί πυκνότητα πιθανότητας αλλά έχει καθιερωθεί ο όρος ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Το πολλαπλό ολοκλήρωμα της εξίσωσης (1.56) αναπαριστά την πιθανότητα εύρεσης ενός ηλεκτρονίου σε χωρικό στοιχείο $d\vec{r}_1$, επειδή όμως τα ηλεκτρόνια αποτελούν μη διακριτά σωματίδια η αρχική τιμή της πιθανότητας πολλαπλασιάζεται με το πλήθος N των ηλεκτρονίων του συστήματος. Η $\rho(\vec{r})$ αποτελεί μη αρνητική συνάρτηση τριών μόνο χωρικών μεταβλητών, η οποία μηδενίζεται στο άπειρο και με ολοκλήρωσή της προκύπτει ο συνολικός αριθμός των ηλεκτρονίων του συστήματος:

$$\rho(\vec{r}\to\infty) = 0\,, \tag{1.57}$$

$$\int\rho(\vec{r})d\vec{r}_1 = N\,. \tag{1.58}$$

Σε αντίθεση με την κυματοσυνάρτηση Ψ, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα , ρ, αποτελεί παρατηρήσιμο μέγεθος και μπορεί να μετρηθεί πειραματικά με μεθόδους όπως η περίθλαση ακτινών Χ. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της είναι, ότι για κάθε άτομο ενός συστήματος, η $\rho(\vec{r})$ δύναται να λάβει τη μέγιστη και πεπερασμένη τιμή της, λόγω των ελκτικών δυνάμεων του πυρήνα. Όμως, σε αυτές τις θέσεις, η κλίση (gradient) της πυκνότητας παρουσιάζει ασυνέχεια και εμφανίζεται ακρότατο (cusp) στη συνάρτηση

ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εμφάνιση του ακρότατου οφείλεται στον αδύνατο προσδιορισμό του πηλίκου $-\frac{Z_A}{r_{iA}}$ του Χαμιλτονιανού τελεστή καθώς η απόσταση ηλεκτρονίου-πυρήνα προσεγγίζει τη μηδενική τιμή. Επίσης, σημαντική ιδιότητα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αποτελεί η ασυμπτωτική εκθετική μείωσή της σε μεγάλες αποστάσεις από τον πυρήνα, σύμφωνα με:

$$\rho(\vec{r}) \propto \exp\left[-2\sqrt{2I}\,|\vec{r}|\right], \tag{1.59}$$

όπου με I συμβολίζεται η ενέργεια πρώτου ιονισμού του συστήματος.

Η ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση ενός μορίου N-ηλεκτρονίων εξαρτάται από $3N$ χωρικές και N spin συντεταγμένες. Όμως, ο Χαμιλτονιανός τελεστής περιέχει χωρικούς όρους ενός και δύο ηλεκτρονίων. Συνεπώς, η μοριακή ενέργεια μπορεί να εκφραστεί με ολοκληρώματα που να περιλαμβάνουν μόνο έξι χωρικές συντεταγμένες. Κατά μια έννοια, η κυματοσυνάρτηση ενός πολυηλεκτρονιακού μορίου περιέχει περισσότερη πληροφορία από την απαιτούμενη και πάσχει από έλλειψη άμεσης φυσικής σπουδαιότητας. Το γεγονός αυτό προέτρεψε την αναζήτηση συναρτήσεων που περιλαμβάνουν μικρότερο αριθμό μεταβλητών σε σχέση με την κυματοσυνάρτηση Ψ, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της ενέργειας του συστήματος καθώς και άλλων ιδιοτήτων.

Το 1964, οι Pierre Hohenberg και Walter Kohn απέδειξαν ότι για μόρια με μη εκφυλισμένη βασική κατάσταση, η ενέργειά τους, η κυματοσυνάρτηση και όλες οι μοριακές ηλεκτρονιακές ιδιότητες μπορούν να προσδιοριστούν με μεγάλη ακρίβεια με τη βοήθεια της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της βασικής κατάστασης και τοιουτοτρόπως έθεσαν τα θεμέλια για την ανάπτυξη της **θεωρίας DFT**.[69] Το πρώτο θεώρημα αποδεικνύει ότι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθορίζει μοναδικά τον Χαμιλτονιανό τελεστή και, επομένως, όλες τις ιδιότητες του συστήματος. Συγκεκριμένα, το εξωτερικό δυναμικό $V_{ext}(\vec{r})$ αποτελεί μοναδικό συναρτησιοειδές της $\rho(\vec{r})$ ενός πολυηλεκτρονιακού συστήματος.

Από τη στιγμή που η ενέργεια βασικής κατάστασης αποτελεί συναρτησιοειδές της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς της, το ίδιο θα ισχύει και για τα συστατικά της μέρη και επομένως:

$$E_0\left[\rho_0\right] = T\left[\rho_0\right] + E_{ee}\left[\rho_0\right] + E_{Ne}\left[\rho_0\right], \tag{1.60}$$

όπου ο δείκτης Ne χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί το είδος του εξωτερικού δυναμικού που ασκείται, στην προκειμένη περίπτωση λόγω της έλξης των πυρήνων.

Εδώ, εξυπηρετεί ο διαχωρισμός της ανωτέρω έκφρασης σε εκείνους τους όρους που εξαρτώνται άμεσα από το σύστημα, δηλαδή τη δυναμική ενέργεια λόγω έλξης ηλεκτρονίων-πυρήνων, $\int \rho_0(\vec{r})V_{Ne}d\vec{r}$, και εκείνων που παραμένουν ανεξάρτητα των μεγεθών N, R_A και Z_A, δηλαδή:

$$E_0\left[\rho_0\right] = \underbrace{\int \rho_0(\vec{r})V_{Ne}d\vec{r}}_{\text{εξαρτώμενο από το σύστημα}} + \underbrace{T\left[\rho_0\right] + E_{ee}\left[\rho_0\right]}_{\text{ανεξάρτητο του συστήματος}}. \tag{1.61}$$

Οι ανεξάρτητοι όροι αποτελούν μια νέα ποσότητα, το συναρτησιοειδές Hohenberg-Kohn, $F_{HK}\left[\rho_0\right]$, και συνεπώς:

$$E_0\left[\rho_0\right] = \int \rho_0(\vec{r})V_{Ne}d\vec{r} + F_{HK}\left[\rho_0\right]. \tag{1.62}$$

Με άλλα λόγια, το συναρτησιοειδές Hohenberg-Kohn για δεδομένη τιμή ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\rho(\vec{r})$, προσδιορίζει την αναμενόμενη τιμή $\langle\Psi|\hat{T}+\hat{V}_{ee}|\Psi\rangle$, που αποτελεί το άθροισμα της κινητικής ενέργειας του συστήματος και του αποτελέσματος εφαρμογής του τελεστή ενδοηλεκτρονιακών απώσεων στην κυματοσυνάρτηση Ψ, η οποία αντιστοιχεί στη δεδομένη πυκνότητα. Άρα, η Ψ έχει την ιδιότητα να προσδιορίζει την ελάχιστη τιμή της ενέργειας του συστήματος, δηλαδή:

$$F_{HK}\left[\rho\right] = T\left[\rho\right] + E_{ee}\left[\rho\right] = \langle\Psi|\hat{T}+\hat{V}_{ee}|\Psi\rangle. \tag{1.63}$$

Με μια πρώτη ματιά, η παραπάνω εξίσωση αποτελεί την ουσία της θεωρίας συναρτησιοειδών ηλεκτρονιακής πυκνότητας DFT. Η υποτιθέμενη δυνατή επίλυση αυτής, θα οδηγούσε στην αναλυτική επίλυση της εξίσωσης Schrödinger και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με την ίδια ευκολία για όλα ανεξαιρέτως τα συστήματα, από το άτομο του υδρογόνου ως το γιγαντιαίο μόριο του DNA. Η $F_{HK}\left[\rho_0\right]$ περιέχει το συναρτησιοειδές της κινητική ενέργειας, $T\left[\rho\right]$, και αυτό της αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων, $E_{ee}\left[\rho\right]$. Η αναλυτική μορφή και των δυο αυτών συναρτησιοειδών δεν είναι γνωστή. Παρόλα αυτά,

το συναρτησιειδές αλληλεπίδρασης δύναται να εκφραστεί ως άθροισμα του κλασσικού μέρους Coulomb, $J[\rho]$, και ενός μη κλασσικού όρου, $E_{ncl}[\rho]$, συνεπώς:

$$E_{ee}[\rho] = \frac{1}{2}\int\int \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{ncl}[\rho] = J[\rho] + E_{ncl}[\rho]. \tag{1.64}$$

Ο μη κλασσικός όρος, $E_{ncl}[\rho]$, προσδιορίζει την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων, που οφείλεται: α) στην διόρθωση λόγω ιδιοαλληλεπίδρασης (self-interaction), β) στο ολοκλήρωμα ανταλλαγής και γ) στη συσχέτιση Coulomb, όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Η μεγάλη πρόκληση στην θεωρία DFT είναι η εύρεση των δυο άγνωστων συναρτησιοειδών $T[\rho]$ και $E_{ncl}[\rho]$.

Το γεγονός ότι η τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της βασικής κατάστασης οδηγεί στον προσδιορισμό των ιδιοτήτων ενός συστήματος, μας υποχρεώνει να αποδείξουμε ότι η παραπάνω τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντιστοιχεί στη βασική κατάσταση του συστήματος. Η συγκεκριμένη ανάγκη αντιμετωπίζεται με το δεύτερο θεώρημα των Hohenberg-Kohn, σύμφωνα με το οποίο μόνο η τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της βασικής κατάστασης του συστήματος μπορεί, μέσω του συναρτησιοειδούς $F_{HK}[\rho]$, να αποδώσει την τιμή της ενέργειας της βασικής κατάστασης. Ειδικότερα επιστρέφουμε στη χρήση της αρχής των μεταβολών στη θεωρία DFT και στη συγκεκριμένη περίπτωση υλοποιείται σύμφωνα με:

$$E_0 \le E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{Ne}[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}]. \tag{1.65}$$

Δηλαδή, για κάθε επιλεγόμενη συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας $\tilde{\rho}(\vec{r})$ η οποία ικανοποιεί τις περιοριστικές συνθήκες των εξισώσεων (1.57) και (1.58), η ενέργεια που προκύπτει από το συναρτησιοειδές της εξίσωσης (1.50) θα εκπροσωπεί ένα άνω όριο της ορθής τιμής της ενέργειας της βασικής κατάστασης, E_0. Η επιλογή συνάρτησης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\tilde{\rho}(\vec{r})$, οδηγεί στον ορισμό του Χαμιλτονιανού τελεστή, $\tilde{H}$, και της αντίστοιχης κυματοσυνάρτησης, $\tilde{\Psi}$. Η κυματοσυνάρτηση αυτή μπορεί να αποτελέσει δοκιμαστική κυματοσυνάρτηση του Χαμιλτονιανού τελεστή που προέκυψε από το ορθό εξωτερικό δυναμικό, V_{ext}, συνεπώς καταλήγουμε στην εξίσωση:

$$\left\langle \tilde{\Psi} \middle| \hat{H} \middle| \tilde{\Psi} \right\rangle = T\left[\tilde{\rho}\right] + V_{ee}\left[\tilde{\rho}\right] + \int \tilde{\rho}(\vec{r}) V_{ext} d\vec{r} = E\left[\tilde{\rho}\right] \geq E_0\left[\rho_0\right] = \left\langle \Psi_0 \middle| \hat{H} \middle| \Psi_0 \right\rangle, \quad (1.66)$$

η οποία αποδίδει και το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Φυσικά, η εφαρμογή της αρχής μεταβολών περιορίζεται στον υπολογισμό της τιμής της ενέργειας της βασικής κατάστασης, E_0, του συστήματος. Επομένως, αυτή η στρατηγική επίλυσης δεν μπορεί να μεταφερθεί άμεσα στο πρόβλημα του προσδιορισμού των ενεργειών και περαιτέρω ιδιοτήτων των ηλεκτρονιακά διεγερμένων καταστάσεων.

Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί, ότι η επιλογή του εξωτερικού δυναμικού, V_{ext}, αποτελεί κριτήριο διαχωρισμού μεταξύ των υποψήφιων συναρτήσεων ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ρ, στη διαδικασία των μεταβολών, γνωστό και ως πρόβλημα αντιπροσωπευτικότητας του εξωτερικού δυναμικού (V_{ext} representability). Συγκεκριμένα, το πρόβλημα έγκειται στην επιλογή της καταλληλότερης συνάρτησης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, στα πλαίσια του θεωρήματος Hohenberg-Kohn. Η προϋπάρχουσα απαίτηση εστιάζει στην αντισυμμετρικότητα που πρέπει να χαρακτηρίζει τις χρησιμοποιούμενες συναρτήσεις ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Όταν πληρείται αυτή η προϋπόθεση, τότε οι συναρτήσεις ρ καλούνται *N*-αντιπροσωπευτικές (*N*-representable) και επιτρέπουν τον υπολογισμό της ενέργειας της βασικής κατάστασης με χρήση της αρχής των μεταβολών.

Τέλος, από όλα τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι ενώ είναι δυνατή η εύρεση της κυματοσυνάρτησης που διέπει τη βασική κατάσταση μέσω της συνάρτησης ηλεκτρονιακής πυκνότητας (ελαχιστοποιώντας το συναρτησιοειδές $F\left[\rho\right]$), δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου DFT. Στην μέθοδο DFT δεν υπεισέρχεται η χρήση της κυματοσυνάρτησης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δύο θεωρήματα Hohenberg-Kohn, εάν είναι γνωστή η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της βασικής κατάστασης, $\rho_0(\vec{r})$, τότε είναι δυνατός ο υπολογισμός όλων των μοριακών ιδιοτήτων χωρίς γνώση της κυματοσυνάρτησης. Δεν παρέχεται όμως η στρατηγική για τον υπολογισμό της ενέργειας της βασικής κατάστασης, E_0, μέσω της συνάρτησης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, καθώς το συναρτησιοειδές, $F_{HK}\left[\rho_0\right]$, είναι άγνωστο και επίσης δεν υποδεικνύεται τρόπος υπολογισμού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας χωρίς της πρότερη γνώση της κυματοσυνάρτησης. Το καθοριστικό βήμα προόδου ως προς την κατάρτιση μιας πρακτικής μεθοδολογίας για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων προτάθηκε το 1965 από τους Kohn και Sham..[70]

Η μέθοδός τους είναι θεωρητικά σε θέση να δώσει ακριβή αποτελέσματα, όμως από τη στιγμή που οι εξισώσεις Kohn-Sham (KS) εμπεριέχουν ένα άγνωστο συναρτησιοειδές το οποίο απλώς προσεγγίζεται, η KS διατύπωση της DFT παρέχει προσεγγιστικά αποτελέσματα.

Η μέθοδος Kohn-Sham έχει ως κύριο στοιχείο ένα πλασματικό σύστημα αναφοράς, που υποδηλώνεται με το δείκτη s και το οποίο καλείται σύστημα μη αλληλεπιδρώντων N ηλεκτρονίων (non-interacting system), τα οποία δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και το κάθε ένα από αυτά τελεί υπό την επίδραση του ίδιου εξωτερικού δυναμικού, V_{ext}.

Τα θεωρήματα Hohenberg-Kohn θέτουν την βάση για το χειρισμό πολυατομικών συστημάτων με χρήση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας ως θεμελιώδους ποσότητας. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η ενέργεια της βασικής κατάστασης ενός ατομικού η μοριακού συστήματος δίνεται ως:

$$E_0 = \min_{\rho \to N} \left(F\left[\rho\right] + \int \rho(\vec{r}) V_{Ne} d\vec{r} \right), \tag{1.67}$$

όπου το συναρτησιοειδές $F\left[\rho\right]$ περιέχει τη συνολική συνεισφορά της κινητικής ενέργειας, της κλασικής αλληλεπίδρασης Coulomb, της μη κλασικής συνεισφοράς λόγω διόρθωσης ιδιοαλληλεπίδρασης και τέλος την επίδραση λόγω συσχέτισης των ηλεκτρονίων:

$$F\left[\rho(\vec{r})\right] = T\left[\rho(\vec{r})\right] + J\left[\rho(\vec{r})\right] + E_{ncl}\left[\rho(\vec{r})\right]. \tag{1.68}$$

Από όλες αυτές τις συνεισφορές, μόνο η συνεισφορά Coulomb, $J\left[\rho\right]$, είναι γνωστή. Επίσης, σημαντικό πρόβλημα υπεισέρχεται στην αντιμετώπιση του όρου της κινητικής ενέργειας, καθώς η έκφραση που συνδέει τη χωρική ηλεκτρονιακή κατανομή με τις ταχύτητες των ηλεκτρονίων είναι πολύπλοκη και ανακριβής. Επομένως, κρίθηκε απαραίτητη η καλύτερη περιγραφή της κινητικής ενέργειας και κατ' επέκταση του συναρτησιοειδούς της εξίσωσης (1.68).

Για να γίνει κατανοητή η αντιμετώπιση του προβλήματος από τους Kohn και Sham γίνεται μια αντιπαραβολή σε σχέση με τη μέθοδο Hartree-Fock που συζητήθηκε προηγούμενα. Στην HF, η κυματοσυνάρτηση προσεγγίζεται από μια διακρίνουσα Slater Φ_{SD} αποτελούμενη από N spin τροχιακά. Η Φ_{SD} μπορεί να θεωρηθεί και ως η πραγματική κυματοσυνάρτηση ενός συστήματος N μη αλληλεπιδρώντων ηλεκτρονίων. Αυτά είναι

ηλεκτρόνια τα οποία συμπεριφέρονται ως φερμιόνια χωρίς φορτίο και επομένως δεν υφίσταται αλληλεπίδραση απώσεων Coulomb και κινούνται υπό την επίδραση δυναμικού V_{HF}. Σύμφωνα με τον ανωτέρω τύπο κυματοσυνάρτησης, η κινητική ενέργεια μπορεί να εκφραστεί ακριβώς ως:

$$T_{HF} = -\frac{1}{2}\sum_{i}^{N}\langle \chi_i | \nabla^2 | \chi_i \rangle . \tag{1.69}$$

Τα spin τροχιακά χ_i παραμένουν ορθοκανονικά και επιλέγονται με τρόπο ώστε η αναμενόμενη τιμή της ενέργειας Hartree-Fock να παραμένει ελάχιστη, δηλαδή:

$$E_{HF} = \min_{\Phi_{SD}\to N} \langle \Phi_{SD} | \hat{T} + \hat{V}_{Ne} + \hat{V}_{ee} | \Phi_{SD} \rangle . \tag{1.70}$$

Η εξίσωση (1.69) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μεγαλύτερου μέρους της κινητικής ενέργειας στην μέθοδο DFT, λόγω θεώρησης των N μη αλληλεπιδρώντων ηλεκτρονίων.

Σημαντικό σημείο αποτελεί η κατασκευή συστήματος αναφοράς μη αλληλεπιδρώντων N ηλεκτρονίων, όπου ο Χαμιλτονιανός τελεστής θα περιλαμβάνει τοπικό δυναμικό $V_s(\vec{r})$, ως εξής:

$$H_s = -\frac{1}{2}\sum_{i}^{N}\nabla_i^2 + \sum_{i}^{N} V_s(\vec{r}) . \tag{1.71}$$

Η κυματοσυνάρτηση της βασικής κατάστασης αναπαρίσταται από μια διακρίνουσα Slater Θ_s αποτελούμενη από φ spin τροχιακά (Φ_{SD} και χ αντίστοιχα στη μέθοδο HF), δηλαδή:

$$\Theta_s = \frac{1}{\sqrt{N!}}\begin{vmatrix} \varphi_1(\vec{x}_1) & \varphi_2(\vec{x}_1) & \cdots & \varphi_N(\vec{x}_1) \\ \varphi_1(\vec{x}_2) & \varphi_2(\vec{x}_2) & \cdots & \varphi_N(\vec{x}_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \varphi_1(\vec{x}_N) & \varphi_2(\vec{x}_N) & \cdots & \varphi_N(\vec{x}_N) \end{vmatrix}, \tag{1.72}$$

όπου τα spin τροχιακά φ προσδιορίζονται κατ' αντιστοιχία με τη μέθοδο HF ως:

$$\hat{f}^{KS}\varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i . \tag{1.73}$$

Ο μονοηλεκτρονιακός τελεστής Kohn-Sham, $\hat{f}^{KS}$, ορίζεται ως:

$$\hat{f}^{KS} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + V_s(\vec{r}). \tag{1.74}$$

Τα spin τροχιακά φ καλούνται Kohn-Sham τροχιακά. Η σύνδεση του συγκεκριμένου τεχνητού συστήματος με το ρεαλιστικό ανάλογο επιτυγχάνεται επιλέγοντας ένα δυναμικό V_s τέτοιο ώστε η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας που προκύπτει από το άθροισμα των τετραγώνων των μέτρων των spin τροχιακών $\{\varphi_i\}$, να είναι ίση με αυτή της βασικής κατάστασης του εξεταζόμενου συστήματος όπου ισχύει η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων, δηλαδή:

$$\rho_s(\vec{r}) = \sum_i^N \sum_s |\varphi_i(\vec{r}, s)|^2 = \rho_0(\vec{r}). \tag{1.75}$$

Στόχος της μεθόδου Kohn-Sham είναι ο προσδιορισμός όσο δυνατόν μεγαλύτερου μέρους της πραγματικής κινητικής ενέργειας. Το μέρος της κινητικής ενέργειας που υπολείπεται αντιμετωπίζεται με προσεγγιστικό τρόπο. Με την έκφραση:

$$T_s = -\frac{1}{2}\sum_i^N \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle, \tag{1.76}$$

λαμβάνεται η κινητική ενέργεια του συστήματος αναφοράς μη αλληλεπιδρώντων ηλεκτρονίων, το οποίο χαρακτηρίζεται από την ίδια συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας με το πραγματικό. Φυσικά, η ενέργεια αυτή δεν έχει την ίδια τιμή με την κινητική ενέργεια του πραγματικού συστήματος, παρόλο που τα συστήματα χαρακτηρίζονται από την ίδια πυκνότητα. Οι Kohn-Sham αντιμετώπισαν το συγκεκριμένο πρόβλημα εισάγοντας τον εξής διαχωρισμό στο συναρτησιοειδές, $F[\rho]$, δηλαδή:

$$F[\rho(\vec{r})] = T_s[\rho(\vec{r})] + J[\rho(\vec{r})] + E_{XC}[\rho(\vec{r})], \tag{1.77}$$

όπου ο όρος E_{XC} αποτελεί την ενέργεια ανταλλαγής-συσχέτισης (exchange-correlation energy) και η οποία ορίζεται από τη έκφραση:

$$E_{XC}[\rho] \equiv \left(T[\rho] - T_s[\rho]\right) + \left(E_{ee}[\rho] - J[\rho]\right) = T_c[\rho] + E_{ncl}[\rho]. \tag{1.78}$$

Το μέρος της πραγματικής κινητικής ενέργειας, T_c, το οποίο δεν περιλαμβάνεται στην T_s, υπολογίζεται μέσω των μη κλασικών ηλεκτροστατικών συνεισφορών. Με άλλα λόγια, η ενέργεια ανταλλαγής-συσχέτισης, E_{XC}, προσθέτει όλους τους παραλειπόμενους όρους στην τελική τιμή της ενέργειας. Όπως υποδηλώνει η εξίσωση (1.75) μεταξύ των spin τροχιακών και της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, η T_s αναμένεται να αποτελέσει συναρτησιοειδές της ηλεκτρονιακής πυκνότητας ρ. Η συνολική ενεργειακή έκφραση του συστήματος μη αλληλεπιδρώντων ηλεκτρονίων περιλαμβάνει δυο συστατικά μέρη, την κινητική ενέργεια και την ενέργεια λόγω επίδρασης του εξωτερικού δυναμικού, V_s. Σύμφωνα με το θεώρημα Hohenberg-Kohn, η συνολική ενέργεια θα πρέπει να αποτελεί συναρτησιοειδές της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, άρα η αλληλεπίδραση με το δυναμικό V_s θα αποτελεί επίσης συναρτησιοειδές της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, όπως και η κινητική ενέργεια, παρόλο που ο όρος T_s της κινητικής ενέργειας δεν συνδέεται ρητά με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα αλλά με τα spin τροχιακά KS, εξίσωση (1.76).

Το επόμενο πρόβλημα που εμφανίζεται είναι ο ορισμός του δυναμικού, V_s, έτσι ώστε να οδηγούμαστε στον υπολογισμό διακρίνουσας Slater που χαρακτηρίζεται από την ίδια τιμή ηλεκτρονιακής πυκνότητας που διέπει και το πραγματικό σύστημα. Η επίλυση του προβλήματος, στηρίζεται στον επαναπροσδιορισμό της ενεργειακής έκφρασης του συστήματος με γνώμονα το διαχωρισμό της σε όρους σύμφωνα με την εξίσωση (1.77), δίνοντας έμφαση στην εμφάνιση των spin τροχιακών σύμφωνα με τις εξισώσεις (1.75) και (1.77), δηλαδή:

$$\begin{aligned} E\left[\rho(\vec{r})\right] &= T_s\left[\rho\right] + J\left[\rho\right] + E_{Ne}\left[\rho\right] = \\ &= T_s\left[\rho\right] + \frac{1}{2}\int\int \frac{\rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{XC}\left[\rho\right] + \int V_{Ne}\rho(\vec{r})d\vec{r} = \\ &= -\frac{1}{2}\sum_i^N \langle \varphi_i | \nabla^2 | \varphi_i \rangle + \frac{1}{2}\sum_i^N \sum_j^N \int\int |\varphi_i(\vec{r}_1)|^2 \frac{1}{r_{12}} |\varphi_j(\vec{r}_2)|^2 d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \\ &+ E_{XC}\left[\rho(\vec{r})\right] - \sum_i^N \int \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \varphi_i(\vec{r}_i) d\vec{r}_1. \end{aligned} \tag{1.79}$$

Ο όρος για τον οποίο δεν μπορεί να δοθεί αναλυτική έκφραση είναι ο E_{XC}. Εφαρμόζοντας την αρχή των μεταβολών προκύπτουν οι τελικές εξισώσεις,[71] δηλαδή:

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2+\left[\int\frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}}d\vec{r}_2+V_{XC}(\vec{r}_1)-\sum_A^M\frac{Z_A}{r_{1A}}\right]\right)\varphi_i$$
$$=\left(-\frac{1}{2}\nabla^2+V_{eff}(\vec{r}_1)\right)\varphi_i=\varepsilon_i\varphi_i. \tag{1.80}$$

Συγκρίνοντας τις εξισώσεις (1.80) και (1.74), παρατηρούμε ότι ο όρος εντός της αγκύλης στην πρώτη εξίσωση, V_{eff}, αναπαρίσταται ως όρος V_s στη δεύτερη εξίσωση, με συνέπεια:

$$V_s(\vec{r})\equiv V_{eff}(\vec{r})=\int\frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}}d\vec{r}_2+V_{XC}(\vec{r}_1)-\sum_A^M\frac{Z_A}{r_{1A}}. \tag{1.81}$$

Συνεπώς, γνωρίζοντας τους επιμέρους όρους της εξίσωσης (1.80) ορίζεται το δυναμικού, V_s, που προστίθεται στις εξισώσεις περιγραφής υπολογισμού της ενέργειας ενός σωματιδίου, μέσω των οποίων προσδιορίζονται τα spin τροχιακά, η συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας και τέλος η τιμή της ενέργειας βασικής κατάστασης, μέσω της έκφρασης (1.79). Επομένως, σε αναλογία με τις εξισώσεις Hartree-Fock, εξίσωση (1.49), η εξίσωση ενός ηλεκτρονίου Kohn-Sham, εξίσωση (1.79), επιλύεται και αυτή επαναληπτικά. Ο νέος όρος δυναμικού που εμφανίζεται, V_{XC}, οφείλεται στην ενέργεια ανταλλαγής-συσχέτισης, E_{XC}, με αποτέλεσμα το δυναμικό V_{XC} να ορίζεται ως η παράγωγος του συναρτησιοειδούς της ενέργειας, E_{XC}, ως προς την ηλεκτρονιακή πυκνότητα ρ, δηλαδή:

$$V_{XC}\equiv\frac{\delta E_{XC}}{\delta\rho} \tag{1.82}$$

Τονίζεται ότι με τον φορμαλισμό Kohn-Sham δεν εισάγεται ουδεμία προσέγγιση—σε αντίθεση με την περίπτωση της μεθόδου Hartree-Fock, όπου προσεγγίσεις υιοθετούνται από την αρχή, π.χ. η κυματοσυνάρτηση αντικαθίσταται από μια διακρίνουσα Slater—και συνεπώς, η μέθοδος Kohn-Sham χαρακτηρίζεται ως ακριβής. Η προσέγγιση εμφανίζεται αποκλειστικά στο στάδιο περιγραφής του συναρτησιοειδούς της ενέργειας ανταλλαγής-συσχέτισης, E_{XC}, και του αντίστοιχου δυναμικού, V_{XC}. Κεντρικός στόχος της σύγχρονης DFT αποτελεί η ορθότερη περιγραφή των δυο αυτών μεγεθών.

1.5.6 Συναρτησιοειδή τοπικής πυκνότητας (local density approximation) LDA και spin-τοπικής πυκνότητας (local spin density approximation) LSDA

Ο φορμαλισμός Kohn-Sham, όπως δείχθηκε προηγούμενα, επιτρέπει την ακριβή περιγραφή των περισσοτέρων όρων που συνεισφέρουν στον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής ενέργειας ατομικού ή μοριακού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του μεγαλύτερου μέρους της κινητικής ενέργειας. Οι εναπομείναντες άγνωστοι όροι περιλαμβάνονται στο συναρτησιοειδές ανταλλαγής-συσχέτισης, $E_{XC}[\rho]$. Η ποιότητα της εφαρμογής της θεωρίας DFT εξαρτάται από την ακριβή προσέγγιση του ανωτέρω συναρτησιοειδούς και η ορθότερη περιγραφή τους αποτελεί κύριο στόχο της μεθοδολογίας DFT.

Το συναρτησιοειδές E_{XC} αναλύεται ως:

$$E_{XC}[\rho] = E_X[\rho] + E_C[\rho]. \tag{1.83}$$

Τα πρώτα συναρτησιοειδή τα οποία προτάθηκαν από τους Hohenberg και Kohn έχουν ως σημείο εκκίνησης της αντίστοιχες εκφράσεις ενός ομογενούς ηλεκτρονιακού αερίου και περιγράφουν έγκυρα συστήματα όπου παρατηρούνται χαμηλές διακυμάνσεις στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Επεξεργάζονται μόνο τη συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας του υπό μελέτη συστήματος και όχι τον τρόπο μεταβολής της (gradient). Είναι τα λεγόμενα συναρτησιοειδή τοπικής πυκνότητας (local density approximation), LDA, και η γενική έκφραση που τα περιγράφει είναι η ακόλουθη:

$$E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\vec{r})\varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r}))d\vec{r}\,. \tag{1.84}$$

Ο όρος $\varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r}))$ περιγράφει την ενέργεια ανταλλαγής-συσχέτισης ανά σωματίδιο-ηλεκτρόνιο του ομογενούς ηλεκτρονιακού αερίου. Αυτή η ενέργεια εξαρτάται από την πιθανότητα $\rho(\vec{r})$ να βρεθεί ηλεκτρόνιο στη θέση $\vec{r}$. Η ποσότητα $\varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r}))$ διαχωρίζεται στους εξής επιμέρους όρους:

$$\varepsilon_{XC}(\rho(\vec{r})) = \varepsilon_X(\rho(\vec{r})) + \varepsilon_C(\rho(\vec{r})). \tag{1.85}$$

Ο μορφή του όρου ανταλλαγής, ε_X, είναι γνωστή από τη θεωρία Hartree-Fock και δίνεται ως:

$$\varepsilon_X = -\frac{3}{4}\sqrt[3]{\frac{3\rho(\vec{r})}{\pi}}\,. \tag{1.86}$$

Το ανωτέρω συναρτησιοειδές συχνά αναφέρεται ως «ανταλλαγή Slater» και αναπαρίσταται με «S», καθώς προτάθηκε από τον Slater στη δική του προσέγγιση του όρου ανταλλαγής στη θεωρία Hartree-Fock.

Ο όρος του συναρτησιοειδούς συσχέτισης, ε_C, δεν περιγράφεται με ακριβή μαθηματική έκφραση. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές βασιζόμενοι σε υψηλής ακριβείας κβαντομηχανικές προσομοιώσεις τύπου Monte Carlo του ομογενούς ηλεκτρονιακού αερίου,[72] κατέληξαν σε αναλυτικές εκφράσεις που περιγράφουν αυτόν τον όρο. Οι πιο διαδεδομένες από αυτές είναι α) αυτή των Vosko, Wilk και Nusair,[73] συντομογραφικά VWN και β) η πλέον πρόσφατη και μεγαλύτερης ακρίβειας των Perdew και Wang.[74]

Συνοψίζοντας, η τελική και πιο συνηθισμένη έκφραση με την οποία συναντάται το συναρτησιοειδές ανταλλαγής-συσχέτισης LDA είναι η ακόλουθη:

$$E_X^{LDA}[\rho] = -\frac{3}{2}\left(\frac{3}{4\pi}\right)^{\frac{1}{2}}\int \rho^{4/3}(\vec{r})d\vec{r} \tag{1.87}$$

Τα συναρτησιοειδή LDA αποτελούν το υπόστρωμα όλων σχεδόν των σύγχρονων και επικρατέστερων συναρτησιοειδών, αλλά δεν περιγράφουν καθόλου ικανοποιητικά την πλειονότητα μοριακών συστημάτων.

Τέλος, στην περίπτωση κατά την οποία το υπό μελέτη σύστημα είναι ανοιχτής στοιβάδας, η προσέγγιση βελτιώνεται όταν σε αυτήν συμπεριλαμβάνονται και οι spin πυκνότητες. Η επέκταση του LDA συναρτησιοειδούς καλείται spin-τοπικής πυκνότητας (local spin density approximation), LSDA, και δίνεται ως:

$$E_{XC}^{LSDA}\left[\rho_\alpha, \rho_\beta\right] = \int \rho(\vec{r})\varepsilon_{XC}\left(\rho_\alpha(\vec{r}), \rho_\beta(\vec{r})\right)d\vec{r}\,. \tag{1.88}$$

1.5.7 Συναρτησιοειδή γενικευμένης κλίσης παραγώγου (generalized gradient approximation) GGA

Η μειωμένη αποτελεσματικότητα των συναρτησιοειδών LDA οδήγησε στην ανάπτυξη παρόμοιων συναρτησιοειδών τα οποία περιλαμβάνουν και τον τρόπο μεταβολής της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Καλούνται συναρτησιοειδή γενικευμένης κλίσης παραγώγου GGA (generalized gradient approximation) ή αλλιώς συναρτησιοειδή διορθωμένης κλίσης (gradient corrected). Η μαθηματική έκφραση που τα περιγράφει δίνεται από:

$$E_{XC}^{GGA}\left[\rho_\alpha,\rho_\beta\right]=\int f\left(\rho_\alpha,\rho_\beta,\nabla\rho_\alpha,\nabla\rho_\beta\right)d\vec{r}\ . \tag{1.89}$$

Το E_{XC}^{GGA} χωρίζεται σε δυο μέρη. Οι εκφράσεις των E_X^{GGA} και E_C^{GGA} προκύπτουν μέσα από πολύπλοκους μαθηματικούς χειρισμούς και κατά συνέπεια δεν συμβάλλουν στην κατανόηση της φυσικής του συστήματος, καθώς πολλά από τα εμπλεκόμενα συναρτησιοειδή δεν έχουν φυσική σημασία. Το σημαντικότερο κριτήριο επιλογής τους είναι το τελικό αποτέλεσμα, γεγονός που τονίζει τον ρεαλιστικό χαρακτήρα της θεωρίας DFT.

Το σκέλος του συναρτησιοειδούς ανταλλαγής περιγράφεται ως:

$$E_X^{GGA}\left[\rho\right]=E_X^{LDA}\left[\rho\right]-\sum_\sigma\int F(s_\sigma)\rho_\sigma^{4/3}(\vec{r})d\vec{r}\ , \tag{1.90}$$

όπου το πεδίο ορισμού της συνάρτησης F δίδεται από την κλίση της spin ηλεκτρονιακής πυκνότητας spin σ (όπου σ λαμβάνει α ή β τιμή spin):

$$s_\sigma=\frac{\left|\nabla\rho_\sigma(\vec{r})\right|}{\rho_\sigma^{4/3}(\vec{r})}\ . \tag{1.91}$$

Το s_σ είναι αδιάστατο μέγεθος, εισάγει μια ανομοιογενή παράμετρο και συμβάλλει στην ορθότερη περιγραφή της πραγματικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Λαμβάνει μεγάλες τιμές όχι μόνο για μεγάλες κλίσεις της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αλλά και σε περιοχές μικρής πυκνότητας, όπως π.χ. απομακρυσμένα σημεία των πυρήνων. Οι μικρές τιμές επιτυγχάνονται σε αντίθετες περιπτώσεις.

Για την συνάρτηση F έχουν προταθεί δυο κύριες κατηγορίες συναρτησιοειδών. Το πρώτο και ευρύτερα εφαρμοζόμενο, βασίζεται σε ένα GGA συναρτησιοειδές ανταλλαγής, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Becke[75] και αναφέρεται ως B88.

Ακριβέστερα:

$$E_X^{B88} = E_X^{LDA} - \beta \int \frac{\rho^{4/3} s_\sigma^2}{1 + 6\beta s_\sigma \sinh^{-1} s_\sigma} d\vec{r} \ . \tag{1.92}$$

Η παράμετρος β ορίζεται εμπειρικά και η τιμή της προσδιορίστηκε στα 0.0042 Hartree, μετά από προσαρμογή της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων στις ακριβείς ενέργειες ανταλλαγής των ατόμων των ευγενών αερίων από το ήλιο, He, έως το ραδόνιο, Rn.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα συναρτησιοειδή όπου η F αποτελεί συνάρτηση της κλίσης spin-ηλεκτρονιακής πυκνότητας (reduced density gradient). Κυριότερους αντιπροσώπους αυτής της κατηγορίας αποτελούν τα συναρτησιοειδή των Becke,[76] B86, Perdew,[77] P, των Lacks και Gordon,[78] LG, με πιο πρόσφατο αυτό των Perdew, Burke και Ernzerhof,[79] PBE.

Τα αντίστοιχα συναρτησιοειδή συσχέτισης με διόρθωση κλίσης ηλεκτρονιακής πυκνότητας συμπεριλαμβάνουν περισσότερο πολύπλοκες αναλυτικές εκφράσεις. Το συναρτησιοειδές συσχέτισης του Perdew,[80] P86, παραμετροποιήθηκε εμπειρικά σύμφωνα με την ενέργεια συσχετισμού του ατόμου του νέου, Ne. Στη συνέχεια, το συναρτησιοειδές βελτιώθηκε και οδηγήθηκε σε μια μορφή απαλλαγμένη από την εμπειρική παράμετρο, γνωστή ως PW91.

Ένα επίσης δημοφιλές συναρτησιοειδές είναι αυτό που προτάθηκε από τους Lee, Yang και Parr,[81] LYP. Το συναρτησιοειδές LYP δεν στηρίζεται στο ομογενές ηλεκτρονιακό αέριο όπως άλλα συναρτησιοειδή, αλλά προκύπτει από υπολογισμό της ενέργειας συσχέτισης του ατόμου του ηλίου, He, με μια ακριβή κυματοσυνάρτηση συσχέτισης.[82] Εμπεριέχει μια εμπειρική παράμετρο η οποία διαφέρει από άλλα GGA συναρτησιοειδή ως προς τους τοπικούς όρους που περιέχει.

Κάθε συναρτησιοειδές ανταλλαγής θα μπορούσε θεωρητικά να συνδυαστεί με οποιοδήποτε συναρτησιοειδές συσχέτισης. Στην πραγματικότητα όμως χρησιμοποιούνται μόνο ορισμένοι συνδυασμοί. Για το μέρος της ανταλλαγής επιλέγεται, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, αυτό του Becke το οποίο συχνά συνδέεται με το συναρτησιοειδές συσχέτισης

του Perdew, BP86, ή των Perdew και Wang, BPW91, αλλά και με αυτό των Lee, Yang, Parr, BLYP.

1.5.8 Υβριδικά συναρτησιοειδή

Συνήθως οι συνεισφορές ανταλλαγής είναι, ως απόλυτοι αριθμοί, σημαντικά μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της συσχέτισης. Επομένως, μια ακριβής έκφραση του συναρτησιοειδούς ανταλλαγής είναι απαραίτητη προϋπόθεση για επιτυχή αποτελέσματα στη θεωρία DFT. Η αμεσότερη και καταλληλότερη στρατηγική για τον καλύτερο υπολογισμό της ενέργειας ανταλλαγής-συχέτισης βασίζεται στον συνδυασμό της θεωρίας Hartree-Fock και της DFT. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται ο ακριβής όρος ανταλλαγής της θεωρίας Kohn-Sham και προσεγγιστικά συναρτησιοειδή για το μέρος της ηλεκτρονιακής συσχέτισης το οποίο είναι ελλιπές στην θεωρία HF, δηλαδή:

$$E_{XC}^{hybrid} = c_{HF} E_{XC}^{HF} + c_{DFT} E_{XC}^{DFT} , \tag{1.93}$$

όπου τα c είναι σταθερές. Μια εναλλακτική έκφραση δίδεται ακολούθως:

$$E_{XC}^{hybrid} = E_{X}^{exact} + E_{C}^{KS} , \tag{1.94}$$

όπου οι συντελεστές c_{HF} και c_{DFT} λαμβάνουν τιμή ίση με τη μονάδα.

Το πιο δημοφιλές υβριδικό συναρτησιοειδές είναι το Becke τριών παραμέτρων[83] (Becke-style-three-parameter). Η αναλυτική έκφραση που το περιγράφει είναι η ακόλουθη:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1-a)E_{X}^{LSDA} + aE_{XC}^{\lambda=0} + bE_{X}^{B88} + cE_{C}^{LYP} + (1-c)E_{C}^{LSDA} , \tag{1.95}$$

όπου οι τιμές των παραμέτρων είναι 0.20 για το a, 0.71 για το b και 0.81 για το c. Η μεγάλη επιτυχία του **B3LYP** οφείλεται στην πολύ αναλυτική και λεπτομερειακή περιγραφή χημικών συστημάτων σε σχέση με άλλα συναρτησιοειδή και ιδιαίτερα σε συστήματα ανοιχτής στοιβάδας και των στοιχείων μετάπτωσης.

1.5.9 Βασικός μηχανισμός των υπολογισμών DFT

Όπως έχει ήδη δειχθεί, το κεντρικό συστατικό στην προσέγγιση Kohn-Sham της DFT αποτελεί η εξίσωση Kohn-Sham ενός ηλεκτρονίου:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2+\left(\sum_j^N\int\frac{\left|\varphi_j(\vec{r}_2)\right|^2}{r_{12}}d\vec{r}_2+V_{XC}(\vec{r}_1)-\sum_A^M\frac{Z_A}{r_{1A}}\right)\right]\varphi_i=\varepsilon_i\varphi_i\,, \tag{1.96}$$

όπου ο όρος στις αγκύλες καθορίζει τον μονοηλεκτρονιακό τελεστή Kohn-Sham και η εξίσωση (1.96) μπορεί να γραφεί και ως:

$$\hat{f}^{KS}\varphi_i=\varepsilon_i\varphi_i\,. \tag{1.97}$$

Ο τελεστής $\hat{f}^{KS}$ διαφέρει ως προς τον τελεστή Fock $\hat{f}$ της μεθόδου Hartree-Fock μόνο ως προς τον τρόπο που προσδιορίζει τη συμμετοχή της ανταλλαγής και συσχέτισης. Στον τελεστή $\hat{f}^{KS}$, οι μη κλασικές συνεισφορές εκφράζονται μέσω του δυναμικού ανταλλαγής-συσχέτισης, V_{XC}, του οποίου η ακριβής μαθηματική έκφραση είναι άγνωστη. Το V_{XC} αποτελεί το συναρτησιοειδές της παραγώγου της E_{XC} ως προς την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του συστήματος. Στον τελεστή Fock, $\hat{f}$, η συσχέτιση αγνοείται, ενώ η συνεισφορά λόγω ανταλλαγής δίδεται από τη δράση του τελεστή ανταλλαγής, $\hat{K}$, στο spin τροχιακό, χ_i.

Οι παραπάνω εξισώσεις Kohn-Sham αντιπροσωπεύουν ένα πολύπλοκο σύστημα συζευγμένων (coupled) ολοκληρωτικών και διαφορικών (integro-differential) εξισώσεων, όπου ο τελεστής κινητικής ενέργειας δίδεται μέσω ενός διαφορικού τελεστή ενώ η συνεισφορά Coulomb εκφράζεται μέσω ενός ολοκληρωτικού τελεστή, και επομένως καθίσταται απαραίτητη η επίλυσή τους με έναν υπολογιστικά αποτελεσματικό τρόπο. Στο τέλος της διαδικασίας, οι λύσεις είναι τα μοριακά spin τροχιακά Kohn-Sham, $\{\varphi_i\}$, τα οποία προσδιορίζουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα βασικής κατάστασης και η οποία συνδέεται άμεσα με την επιλογή του δυναμικού V_{XC}.

Σχεδόν όλες οι εφαρμογές της Θεωρίας Συναρτησιοειδών Kohn-Sham χρησιμοποιούν την επέκταση του γραμμικού συνδυασμού ατομικών τροχιακών (Linear Combination of Atomic Orbitals), LCAO, των KS spin μοριακών τροχιακών, ένα πλαίσιο το οποίο

εισήγαγε ο Roothan το 1951. Στην LCAO προσέγγιση εισάγεται μια ομάδα/σύνολο L προκαθορισμένων συναρτήσεων βάσης, $\{\eta_\mu\}$, τα οποία αναπτύσσουν γραμμικά τα spin τροχιακά Kohn-Sham ως:

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^{L} c_{\mu i}\eta_\mu \tag{1.98}$$

Εάν το σύνολο $\{\eta_\mu\}$ είναι πλήρες, το οποίο θα απαιτούσε ο αριθμός των προκαθορισμένων L συναρτήσεων να είναι άπειρος, τότε κάθε spin κυματοσυνάρτηση ϕ_i θα περιγραφόταν μέσω της εξίσωσης (1.98). Στην πραγματικότητα όμως, το L έχει πεπερασμένη τιμή και απαιτεί προσοχή η επιλογή των $\{\eta_\mu\}$ συναρτήσεων βάσης, έτσι ώστε ο γραμμικός συνδυασμός στην εξίσωση (1.98) να προσφέρει μια αξιόλογη προσέγγιση των πραγματικών Kohn-Sham spin τροχιακών. Επίσης, είναι γνωστό ότι χρησιμοποιώντας έναν γραμμικό συνδυασμό προκαθορισμένων συναρτήσεων βάσης για την περιγραφή των spin τροχιακών Kohn-Sham, οδηγούμαστε στην επίλυση του απλού γραμμικού προβλήματος βελτιστοποίησης των συντελεστών $\{c_{\mu i}\}$. Οι συναρτήσεις βάσης επιλέγονται σύμφωνα με ρεαλιστικά κριτήρια και δεν έχουν υποχρεωτικά κοινά γνωρίσματα με τα ατομικά τροχιακά. Εισαγωγή της επιλεγμένης βάσης συναρτήσεων $\{\eta_\mu\}$, στην εξίσωση (1.97) οδηγεί στην ακόλουθη έκφραση, η οποία είναι ανάλογη αυτής της μεθόδου Hartree-Fock, δηλαδή:

$$\hat{f}^{KS}(\vec{r}_1)\sum_{\nu=1}^{L} c_{\nu i}\eta_\nu(\vec{r}_1) = \varepsilon_i \sum_{\nu=1}^{L} c_{\nu i}\eta_\nu(\vec{r}_1)\,. \tag{1.99}$$

Πολλαπλασιάζοντας από αριστερά την εξίσωση (1.89) με μια πραγματική συνάρτηση βάσης η_μ και ολοκληρώνοντας ως προς όλες τις χωρικές συντεταγμένες λαμβάνεται L αριθμός εξισώσεων:

$$\sum_{\nu=1}^{L} c_{\nu i}\int \eta_\mu(\vec{r}_1)\hat{f}^{KS}\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}_1 = \varepsilon_i \sum_{\nu=1}^{L} c_{\nu i}\int \eta_\mu(\vec{r}_1)\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r} \;\; \text{για } 1 \le i \le L\,, \tag{1.100}$$

όπου τα ολοκληρώματα κάθε σκέλους της εξίσωσης ορίζουν έναν πίνακα.

Το μέρος του αριστερού σκέλους:

$$F_{\mu\nu}^{KS} = \int \eta_\mu(\vec{r}_1)\hat{f}^{KS}\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}_1\,, \tag{1.101}$$

αποτελεί στοιχείο του πίνακα Kohn-Sham, ενώ ο πίνακας αλληλοεπικάλυψης (overlap matrix) δίδεται από το μέρος του δεξιού σκέλους της εξίσωσης (1.101), δηλαδή:

$$S_{\mu\nu} = \int \eta_\mu(\vec{r}_1)\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}\,. \tag{1.102}$$

Και οι δυο πίνακες είναι διάστασης $L \times L$ και συμμετρικοί εφόσον είναι συμμετρική η βάση συναρτήσεων που εισάγεται. Στη γενική περίπτωση, οι πίνακες χαρακτηρίζονται ως αυτοσυζυγείς (μιγαδική περίπτωση) ή ερμιτιανοί (πραγματική περίπτωση). Εισάγοντας τον πίνακα C διάστασης $L \times L$, ο οποίος περιέχει τους συντελεστές συμμετοχής των κυματοσυναρτήσεων ως διανύσματα:

$$C = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1L} \\ c_{21} & c_{22} & \cdots & c_{2L} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ c_{L1} & c_{L2} & \cdots & c_{LL} \end{pmatrix}, \tag{1.103}$$

και με επίλυση της εξίσωσης (1.101) καταλήγουμε στον διαγώνιο πίνακα ε, ο οποίος εμπεριέχει τις ενέργειες των spin τροχιακών:

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon_{11} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \varepsilon_{22} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \varepsilon_{LL} \end{pmatrix}. \tag{1.104}$$

Η εξίσωση (1.100) μπορεί να εκφραστεί συνολικά ως μια εξίσωση πινάκων, δηλαδή:

$$F^{KS}C = SC\varepsilon\,. \tag{1.105}$$

Επομένως μέσω της επέκτασης LCAO, ένα πρόβλημα μη γραμμικής βελτιστοποίησης που απαιτούσε την πολύπλοκη επίλυση ολοκληρωτικών και διαφορικών εξισώσεων, μετατράπηκε σε γραμμικό πρόβλημα εύκολα επιλύσιμο μέσω γνωστών μεθόδων γραμμικής άλγεβρας, και διαθέσιμων από μεγάλο αριθμό υπολογιστικών προγραμμάτων.

Αναπτύσσοντας τον τελεστή $\hat{f}^{KS}$, τα επιμέρους στοιχεία του πίνακα Kohn-Sham λαμβάνουν την παρακάτω μορφή:

$$F_{\mu\nu}^{KS} = \int \eta_\mu \left(-\frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} + \int \frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}} d\vec{r}_2 + V_{XC}(\vec{r}_1) \right) \eta_\nu(\vec{r}_1) d\vec{r}_1$$

$$= -\frac{1}{2}\eta_\mu(\vec{r}_1)\nabla^2\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}_1 - \int \eta_\mu(\vec{r}_1)\sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}}\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}_1 \tag{1.106}$$

$$+\int\int \eta_\mu(\vec{r}_1)\frac{\rho(\vec{r}_2)}{r_{12}}\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r} + \int \eta_\mu(\vec{r}_1)V_{XC}(\vec{r}_1)\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}_1.$$

όπου οι δύο πρώτοι όροι εντός της παρένθεσης περιγράφουν την ηλεκτρονιακή κινητική ενέργεια και την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων-πυρήνων, εξαρτώνται από τις συντεταγμένες ενός μόνο ηλεκτρονίου και συχνά δίνονται μέσω ενός ολοκληρώματος ως:

$$h_{\mu\nu} = \int \eta_\mu(\vec{r}_1)\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_A^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \right]\eta_\nu(\vec{r}_1)d\vec{r}_1 \tag{1.107}$$

Ανεξαρτήτως του συνόλου βάσης των κυματοσυναρτήσεων $\{\eta_\mu\}$, ο υπολογισμός συνεισφοράς του μονοηλεκτρονιακού όρου, $h_{\mu\nu}$, πραγματοποιείται εύκολα μέσω γνωστών αλγόριθμων. Ο τρίτος όρος της παρένθεσης της εξίσωσης (1.106) απαιτεί τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας ρ, και χρησιμοποιεί την ακόλουθη εξίσωση σε μορφή LCAO:

$$\rho(\vec{r}) = \sum_i^N \left|\varphi_i(\vec{r})^2\right| = \sum_i^N \sum_\mu^L \sum_\nu^L c_{\mu i}c_{\nu i}\eta_\mu(\vec{r})\eta_\nu(\vec{r}) . \tag{1.108}$$

Οι συντελεστές ανάπτυξης, οι οποίοι εμπεριέχουν όλη τη σχετική πληροφορία για την ηλεκτρονιακή πυκνότητα, συνήθως περιγράφονται μέσω του πίνακα πυκνότητας (density matrix) P με στοιχεία:

$$P_{\mu\nu} = \sum_i^N c_{\mu i}c_{\nu i} . \tag{1.109}$$

Οπότε, μπορούμε να εκφράσουμε τη συνεισφορά Coulomb της εξίσωσης (1.106) αποκλειστικά με όρους των συναρτήσεων βάσης ως ένα ολοκλήρωμα δυο ηλεκτρονίων, δηλαδή:

$$J_{\mu\nu} = \sum_\lambda^L \sum_\sigma^L P_{\lambda\sigma}\int\int \eta_\mu(\vec{r}_1)\eta_\nu(\vec{r}_1)\frac{1}{r_{12}}\eta_\lambda(\vec{r}_2)\eta_\sigma(\vec{r}_2)d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 . \tag{1.110}$$

Μέχρι αυτό το σημείο, ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διατύπωση με τη θεωρία Hartree-Fock. Οι διαφορές ξεκινούν με τον όρο ανταλλαγής-συσχέτισης. Στη μέθοδο Kohn-Sham η συνεισφορά αυτή εκφράζεται ως το ολοκλήρωμα:

$$V_{\mu\nu}^{XC} = \int \eta_\mu(\vec{r}_1) V_{XC}(\vec{r}_1) \eta_\nu(\vec{r}_1) d\vec{r}_1 \,, \tag{1.111}$$

όπου πρέπει να ορίζεται η αναλυτική μορφή του V_{XC}. Υπενθυμίζεται ότι στην περίπτωση της θεωρίας Hartree-Fock το ολοκλήρωμα ανταλλαγής περιγράφεται ως:

$$K_{\mu\nu} = \sum_{\lambda}^{L} \sum_{\sigma}^{L} P_{\lambda\sigma} \int\int \eta_\mu(\vec{x}_1) \eta_\lambda(\vec{x}_1) \frac{1}{r_{12}} \eta_\nu(\vec{x}_2) \eta_\sigma(\vec{x}_2) d\vec{x}_1 d\vec{x}_2 \,. \tag{1.112}$$

1.5.10 Σύνολα βάσης

Τα spin χ_i που περιλαμβάνονται στο σύνολο βάσης, $\{\eta_\mu\}$, χρησιμοποιούνται στην κατασκευή της προσεγγιστικής κυματοσυνάρτησης του υπό μελέτη συστήματος. Υψηλής ποιότητας κυματοσυναρτήσεις που περιγράφουν την ηλεκτρονιακή συσχέτιση, απαιτούν τη χρήση μεγάλων συνόλων βάσης. Αυτό όμως οδηγεί σε δραματική αύξηση του υπολογιστικού κόστους. Βεβαίως, στην περίπτωση της μεθόδου KS, τα spin τροχιακά διαδραματίζουν έμμεσο ρόλο και χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\rho(\vec{r}) = \sum_{i}^{N} \left| \varphi_i(\vec{r}) \right|^2 \,. \tag{1.113}$$

Είναι γνωστό[84, 85] ότι οι προαπαιτούμενες προϋποθέσεις των spin τροχιακών είναι λιγότερες για υπολογισμούς της θεωρίας Kohn-Sham, σε σχέση με αυτούς που κάνουν χρήση θεωριών βασιζομένων στην κυματοσυνάρτηση. Στις περισσότερες θεωρίες που κάνουν χρήση της κυματοσυνάρτησης, το σύνολο $\{\eta_\mu\}$ αποτελείται από καρτεσιανά τροχιακά τύπου Gaussian (Gaussian-Type-Orbitals), GTO, η γενική μορφή των οποίων είναι:

$$\eta^{GTO} = \mathrm{N} x^l y^m z^n \exp\left[-ar^2\right], \tag{1.114}$$

όπου N ο παράγοντας κανονικοποίησης για τη διασφάλιση του αποτελέσματος ολοκληρώματος $\langle \eta_\mu | \eta_\mu \rangle$ ίσο με τη μονάδα, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι τα η_μ είναι ορθογώνια, δηλαδή, το a αποτελεί το εκθετικό μέρος του τροχιακού και προσδιορίζει τη ικανότητα διάχυσής του στο χώρο και το L $(l+m+n)$ χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των GTO σε συναρτήσεις s ($L=0$), p ($L=1$), d ($L=2$) κ.λ.π.

Η προτίμηση χρήσης GTO συναρτήσεων βάσης στην HF και άλλες συγγενείς μεθοδολογίες, σχετίζεται με τα υπολογιστικά πλεονεκτήματα που προσφέρει σημαντικός αριθμός αποτελεσματικών αλγορίθμων ικανών για τον υπολογισμό του μεγάλου αριθμού ολοκληρωμάτων δυο ηλεκτρονίων που απαντώνται στους όρους Coulomb και της Hartree-Fock ανταλλαγής.

Αντίθετα, τα τροχιακά τύπου Slater (Slater-Type-Orbitals), STO, επιτυγχάνουν ορθότερη περιγραφή του φυσικού προβλήματος καθότι προσομοιάζουν τις ακριβείς κυματοσυναρτήσεις του ατομικού υδρογόνου, α) επιτυγχάνουν διάφορη του μηδενός κλίση σε σχέση με τα GTO καθώς το r τείνει στο μηδέν και β) οδηγούνται στη μηδενική τιμή καθώς το r τείνει στο άπειρο βάσει της επιθυμητής εκθετικής απόσβεσης. Η τυπική έκφραση που τα περιγράφει είναι:

$$\eta^{STO} = \mathrm{N} r^{n-1} \exp\left[-\zeta r\right] Y_{lm}(\Theta, \phi), \tag{1.115}$$

όπου το n αποτελεί τον κύριο κβαντικό αριθμό, ζ τον εκθέτη του και $Y_{lm}(\Theta, \phi)$ είναι οι σφαιρικές αρμονικές που περιγράφουν το γωνιακό μέρος της συνάρτησης.

Ένας πρακτικός κανόνας είναι ότι συνήθως απαιτούνται τριπλάσιες συναρτήσεις GTO, αντί των STO, για να επιτευχθεί η ίδια ακρίβεια υπολογισμών. Δυστυχώς, τα ολοκληρώματα δυο ηλεκτρονίων, όπως στην εξίσωση (1.110), είναι εξαιρετικά δύσκολο να υπολογιστούν με χρήση STO συνόλων βάσης, καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμες αναλυτικές τεχνικές επίλυσής τους και είναι απαραίτητη η προσφυγή σε αριθμητικές μεθόδους. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι οι συναρτήσεις αυτές δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μοντέρνες κβαντομηχανικές μεθόδους.

Στην προσπάθεια επίτευξης της μεγαλύτερης δυνατής ακρίβειας, χωρίς δραματική αύξηση του υπολογιστικού κόστους, κατασκευάστηκαν τα λεγόμενα συμπτυγμένα (contracted) σύνολα βάσης GTO, στα οποία αρκετές πρωτογενείς (primitive) συναρτήσεις Gaussian - συνήθως μεταξύ τρεις έως έξι και σπάνια άνω των δέκα - συνδυάζονται μέσω

ενός γραμμικού συνδυασμού για να δημιουργήσουν μια συμπτυγμένη συνάρτηση τύπου Gaussian (Contracted Gaussian Function), CGF όπως:

$$\eta_{\tau}^{CGF} = \sum_{\mathrm{a}}^{A} d_{\mathrm{a}\tau} \eta_{\mathrm{a}}^{GTO} \,. \tag{1.116}$$

Κίνητρο για την διαδικασία σύμπτυξης αποτελεί ο τρόπος επιλογής των συντελεστών σύμπτυξης, $d_{\mathrm{a}\tau}$, ώστε η συνάρτηση CGF να προσεγγίζει, όσο το δυνατόν καλύτερα, τη συμπεριφορά μιας STO. Επιπλέον, η σύμπτυξη των πρωτογενών συναρτήσεων Gaussian συμβάλλει στην μείωση του υπολογιστικού κόστους.

Τα σύνολα βάσης CGF είναι πολύ δημοφιλή στη θεωρία DFT. Αποτελούν συνηθισμένη επιλογή σε προγράμματα που προσφέρουν τη χρήση των μεθόδων Kohn-Sham όπως το Gaussian, το Turbomole κ.λ.π.

Η απλούστερη και λιγότερο ακριβής ανάπτυξη των μοριακών τροχιακών χρησιμοποιεί μόνο μια συνάρτηση βάσης ή μια συμπυκνωμένη συνάρτηση στην περίπτωση των συνόλων CGF, για κάθε ατομικό τροχιακό, συμπεριλαμβανόμενων και των τροχιακών σθένους (valence). Αυτά τα σύνολα βάσης καλούνται ελάχιστα σύνολα βάσης (minimal basis set). Τυπικός εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το σύνολο βάσης STO-3G, όπου συνδυάζονται τρεις πρωτογενής συναρτήσεις GTO σε μια CGF.

Η επόμενη κατηγορία είναι αυτή των συνόλων βάσης διπλού ζήτα (double-zeta), όπου διπλασιάζεται το σύνολο των συναρτήσεων, δηλαδή χρησιμοποιούνται δυο συναρτήσεις για κάθε τροχιακό. Το γενικό όνομα double-zeta παραπέμπει στον εκθετικό παράγοντα ζ των συναρτήσεων STO. Θεωρώντας ότι οι χημικές αντιδράσεις διέπονται από αλλαγές του χώρου σθένους (valence) των ηλεκτρονιακών κυματοσυναρτήσεων, τότε η χρήση ενός διπλού συνόλου περιορίζεται για την περιγραφή των τροχιακών σθένους, ενώ ένα ελάχιστο σύνολο περιγράφει τα χημικώς αδρανή ηλεκτρόνια. Αυτά αποτελούν τα επονομαζόμενα σύνολα βάσης split-valence με τυπικά παραδείγματα τα 3–21G ή 6–31G, που αναπτύχθηκαν από τον Pople και συνεργάτες του. Σε πολλές εφαρμογές, τέτοια σύνολα βάσης αυξάνονται (augmented) με συναρτήσεις πόλωσης (polarization functions), δηλαδή συναρτήσεις με υψηλότερη γωνιακή στροφορμή (angular momentum) σε σχέση με αυτές που περιγράφουν το άτομο, π.χ. *p*-συναρτήσεις για το υδρογόνο ή *d*-συναρτήσεις για τα στοιχεία της πρώτης σειράς του περιοδικού πίνακα. Οι συναρτήσεις αυτές διασφαλίζουν τη σωστή περιγραφή στη μεταβολή των τροχιακών από την αρχική ατομική συμμετρία

στην τελική μοριακή, όπου συμμετέχουν. Τα πολωμένα double-zeta σύνολα βάσης ή split-valence αποτελούν το κύριο υπόστρωμα κβαντομηχανικών χημικών εφαρμογών, καθώς παρέχουν αξιοπιστία και ακρίβεια. Τυπικά παραδείγματα αυτών είναι τα 6–31G(*d*, *p*) σύνολα των Hehre, Ditchfield και Pople[86] και των Hariharan και Pople,[87] καθώς και τα πιο πρόσφατα SVP (split-valence polarization) σύνολα των Shäfer, Horn και Ahlrichs.[88]

Περαιτέρω βελτίωση της συμπεριφοράς των συνόλων βάσης επιτυγχάνεται με την αύξηση του αριθμού των GTO συναρτήσεων στις διάφορες κατηγορίες. Ειδικότερα, βάσει της ανωτέρω μεθοδολογίας προκύπτουν τα triple- και quadruple- zeta σύνολα βάσης, τα οποία φέρουν επαυξημένο αριθμό πολωμένων συναρτήσεων, συμπεριλαμβανομένων και συναρτήσεων μεγαλύτερης γωνιακής στροφορμής. Τα σύνολα βάσης cc-pVDZ, cc-pVTZ, cc-pVQZ, και cc-pV5Z (correlation-consistent polarized valence double/triple/quadruple/quintuple zeta) αποτελούν τυπικά παραδείγματα μοντέρνων αντιπροσώπων της ανωτέρω μεθοδολογίας.[89] Για παράδειγμα, η μεγάλη σύμπτυξη cc-pV5Z περιλαμβάνει, για τα στοιχεία της πρώτης σειράς του περιοδικού πίνακα, από το βόριο, B, ως το νέο, Ne, τις 14*s*-, 8*p*-, 4*d*-, 3*f*-, 2*g*- και 1*h*- πρωτογενείς GTO. Αυτές συμπυκνώνονται σε 6*s*- και 5*p*- συναρτήσεις CGF, ενώ οι συναρτήσεις πόλωσης δεν συμμετέχουν στη διαδικασία σύμπτυξης.

Οι Raymond και Wheeler[90] συμπέραναν σε μελέτη τους σχετικά με τη χρήση αυτών των correlation-consistent συνόλων βάσης στους Kohn-Sham υπολογισμούς, ότι, ο συνδυασμός της τεχνικής B3LYP με τα ανωτέρω σύνολα βάσης, αποδίδει εξαιρετικά αποτελέσματα.

1.5.11 Υπολογισμός δονητικών συχνοτήτων

Η δονητική φασματοσκοπία (vibrational spectroscopy) κατέχει σημαντική θέση σε πολλούς τομείς της χημικής έρευνας και συνεπώς η εφαρμογή μεθόδων ηλεκτρονιακής δομής στον υπολογισμό των αρμονικών συχνοτήτων υπό μελέτη συστημάτων αποκτά ιδιαίτερο ρόλο. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων έχει ταυτοποιηθεί με σύγκριση των θεωρητικών και των παρατηρημένων συχνοτήτων. Επίσης, ο *ab initio* υπολογισμός των αρμονικών συχνοτήτων οδηγεί στην εξαγωγή θερμοχημικών και κινητικών

αποτελεσμάτων χημικών διεργασιών[91] (όπως θα δούμε στην περίπτωση της μελέτης του διαλύτη DMSO).

Ο θεωρητικός υπολογισμός των αρμονικών δονητικών συχνοτήτων πραγματοποιείται αποτελεσματικά στα μοντέρνα κβαντομηχανικά υπολογιστικά πακέτα με υπολογισμό των αναλυτικών ή αριθμητικών δεύτερων παραγώγων της ολικής ηλεκτρονιακής ενέργειας της ένωσης ως προς τις συντεταγμένες του Hessian πίνακα.[92, 93]

Τις προηγούμενες δεκαετίες, γινόταν συστηματική σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων υπολογισμών συχνότητας Hartree-Fock με μικρά ή μεσαία σύνολα βάσης με τα αντίστοιχα πειραματικά. Παρατηρήθηκε μια συστηματική υπερεκτίμηση των υπολογισμένων συχνοτήτων σε ποσοστό 10 %, το οποίο οφείλεται στην απουσία σωστής περιγραφής της ηλεκτρονιακής συσχέτισης στη μεθοδολογία, σε ανεπάρκεια των συνόλων βάσης και στο γεγονός ότι δεν συμπεριλαμβάνονται όροι αναρμονικότητας.

Καθώς οι παρατηρούμενες αποκλίσεις είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ομοιόμορφες, το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με κλιμάκωση (scaling) των υπολογισμένων συχνοτήτων ή των διαγώνιων σταθερών δύναμης (force constants) κατά έναν εμπειρικό παράγοντα, πρακτική που αποδίδει σημαντικές βελτιώσεις στα τελικά αποτελέσματα. Οι παράγοντες κλιμάκωσης είναι συνήθως κοινοί για την ίδια τάξη ενώσεων.

Για συστήματα στα οποία η ηλεκτρονιακή συσχέτιση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, η Hartree-Fock μέθοδος αποτυγχάνει στο να υπολογίσει τόσο γεωμετρικά όσο και φασματοσκοπικά δεδομένα[94] και τα σφάλματα γίνονται μη συστηματικά. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι ενώσεις των στοιχείων μετάπτωσης, συστήματα πολλαπλών δεσμών και συστήματα ανοιχτής στοιβάδας (open shell).

Συνεπώς, η αποτελεσματική αντιμετώπιση της ηλεκτρονιακής συσχέτισης και η διαθεσιμότητα των αναλυτικών πρώτων και δεύτερων παραγώγων, οι οποίες δεν είναι πάντα διαθέσιμες ακόμη και σε μεταγενέστερες προσεγγίσεις HF υψηλής συσχέτισης, οδήγησε στην μεθοδολογία DFT.

Η σύγκριση των συχνοτήτων που αποδίδει η DFT στα συστήματα που προαναφέρθηκαν δεν έχει φθάσει ακόμη σε πολύ ικανοποιητικό σημείο, κυρίως λόγω του μικρού αριθμού πειραματικών δεδομένων. Όμως, οι διαθέσιμες μελέτες είναι ενθαρρυντικές και τα αποτελέσματα βρίσκονται σε πολύ καλή συμφωνία με τα πειραματικά αν και τονίζεται ότι απέχουν από την απόλυτη ακρίβεια.

Ο υπολογισμός των συχνοτήτων δόνησης είναι σημαντικός αλλά και αναγκαίος ιδιαίτερα στην περίπτωση σύγκρισης μεταξύ ενεργειακών αποτελεσμάτων που εμφανίζουν

μικρές διαφορές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο συνυπολογισμός της ενέργειας μηδενικού σημείου (zero point energy), ZPE, είναι καθοριστικός. Η ενέργεια μηδενικού σημείου περιγράφει την εγκλωβισμένη δυναμική ενέργεια του συστήματος στους 0 K. Προκειμένου να υπολογιστεί η ενθαλπία ή ελεύθερη ενέργεια συστήματος σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, οφείλουμε να προσθέσουμε στην ηλεκτρονιακή ενέργεια την ανάλογη θερμική διόρθωση.

1.5.12 Θεωρία διαταράξεως πολλών σωματιδίων, Møller-Plesset (MP*n*)

Το 1934 οι Møller και Plesset[110] πρότειναν την χρήση της θεωρίας διαταράξεως[111] για τον υπολογισμό των ατόμων και μορίων θεωρώντας ότι η αδιατάρακτη κυματοσυνάρτηση είναι η συνάρτηση Hartree-Fock (η οποία έχει αναλυθεί εκτενώς παραπάνω). Όμως οι πρώτοι μοριακοί υπολογισμοί άρχισαν το 1975.[112] Η MP αδιατάρακτη χαμιλτονιανή είναι το άθροισμα μονοηλεκτρονιακών Fock τελεστών:

$$\hat{H}^{o} = \sum_{m=1}^{n} \hat{F}(m) \tag{1.117}$$

$$\hat{H}^{o}\,\Psi_{HF} = \left(\sum_{m=1}^{n} \varepsilon_m\right)\Psi_{HF}, \tag{1.118}$$

όπου

$$\hat{F}(m)u_i(m) = \varepsilon_i u_i(m) \tag{1.119}$$

$$\hat{F}(m) \equiv -\frac{1}{2}\nabla_m^2 - \sum_{\alpha}\frac{Z_a}{r_{ma}} + \sum_{j=i}^{N}\left[\hat{J}_j(m) - \hat{K}_j(m)\right] \tag{1.120}$$

Η διατάραξη εκφράζεται ως:

$$\hat{H}' = \hat{H} - \hat{H}^{o} = \sum_{l}\sum_{m>l}\frac{1}{r_{lm}} - \sum_{m=1}^{N}\sum_{j=1}^{N}\left[\hat{J}_j(m) - \hat{K}_j(m)\right] \tag{1.121}$$

Το άθροισμα της αδιατάρακτης ενέργειας και της πρώτης τάξεως διόρθωσης αντιστοιχεί στην HF ενέργεια,

$$E_0^{(0)} + E_0^{(1)} = E_{HF}. \tag{1.122}$$

Συνυπολογίζοντας τη δεύτερης τάξεως διόρθωση (1.123) δίνεται η MP2, την τρίτη η MP3, την τέταρτη η MP4 κλπ. Συχνά, επειδή ο υπολογισμός της τρίτης διορθώσεως είναι πολύ χρονοβόρος, γίνεται της τέταρτης χωρίς την τρίτη, MP4(SDQ).

$$E_0^{(2)} = \sum_{s \neq 0} \frac{\left| \left\langle \Psi_s^{(0)} \middle| \hat{H}' \middle| \Psi_{HF} \right\rangle \right|^2}{E_0^{(0)} - E_s^{(0)}}, \tag{1.123}$$

όπου $\Psi_s^{(0)}$ όλες οι δυνατές Slater ορίζουσες που σχηματίζονται από n διαφορετικά τροχιακά spin-χώρου και $E_s^{(0)}$ οι αδιατάρακτες διεγερμένες ενέργειες που αντιστοιχούν στις αδιατάρακτες κυματοσυναρτήσεις $\Psi_s^{(0)}$.

Γενικά, δεν έχει αποδειχθεί ότι η σειρά MP συγκλίνει στην πραγματική τιμή, αλλά υπολογισμοί έχουν δείξει ότι συνήθως οι σειρές MP συγκλίνουν στα περισσότερα μόρια,[113, 114] αν και μερικές φορές παρατηρούνται αποκλίσεις. Πάντως, αν μπορούσαν να ληφθούν όλες οι διορθώσεις (άπειρες) ο υπολογισμός θα ήταν απόλυτα ακριβής.

Οι υπολογισμοί MP*n* δεν υπακούουν στην αρχή των μεταβολών, οπότε η απόλυτη ενέργεια που υπολογίζουν είναι χαμηλότερη της πραγματικής τιμής. Αντιθέτως, είναι εκτατικοί, αλλά γενικά μη συνεπείς. Επιπλέον έχουν ορισμένους περιορισμούς. Οι υπολογισμοί MP*n* δεν δίνουν ακριβή αποτελέσματα μακριά από την ισορροπία του υπό μελέτη συστήματος, με αποτέλεσμα την αδυναμία κατασκευής καμπυλών δυναμικής ενέργειας και δεν είναι εφαρμόσιμοι σε διεγερμένες καταστάσεις. Αντίθετα, σε θεμελιώδεις καταστάσεις, κλειστά συστήματα και κοντά στην χαμηλότερης ενέργειας γεωμετρία του συστήματος δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα. Το χρήσιμο επίσης της μεθόδου είναι η ευκολία της εφαρμογής της και είναι σχεδόν η μόνη μέθοδος μετά-HF που χρησιμοποιείται ευρέως από την επιστημονική κοινότητα.[115]

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Μελέτη ενυδάτωσης

2.1.1 Υλικά

Οι μετρήσεις των χρόνων αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ έγιναν για τα υδατικά διαλύματα των L-αμινοξέων: γλυκίνη, αλανίνη, σερίνη, βαλίνη, ισολευκίνη, ασπαρτικό οξύ, λυσίνη, ιστιδίνη, φαινυλαλανίνη, αργινίνη, τυροσίνη και θρυπτοφάνη, των N-ακετυλο-L-αμινοξέων: γλυκίνης, αλανίνης, βαλίνης, λευκίνης, ασπαρτικού οξέος, γλουταμινικού οξέος, μεθειονίνης και φαινυλαλανίνης, των βεταϊνών της: γλυκίνης, αλανίνης, βαλίνης, θρεονίνης, λευκίνης και φαινυλαλανίνης και των διπεπτιδίων θρεονίνης - λευκίνης, φαινυλαλανίνης - βαλίνης, αλανίνης - φαινυλαλανίνης, φαινυλαλανίνης - αλανίνης, τυροσίνης - αλανίνης, βαλίνης - μεθειονίνης, μεθειονίνης - λευκίνης, Αλανίνης - αλανίνης, γλυκίνης - γλυκίνης, βαλίνης - θρεονίνης, γλυκίνης - λευκίνης, βαλίνης - σερίνης, γλυκίνης - σερίνης, αλανίνης - γλυκίνης και γλυκίνης - αλανίνης. Όλες οι παραπάνω ενώσεις[3] αποκτήθηκαν από τη Sigma-Aldrich.

Οι μετρήσεις αποκατάστασης του πυρήνα ^{14}N των αμινομάδων, πραγματοποιήθηκαν για τα αντίστοιχα ακετυλο-αμινοξέα και τις βεταΐνες.

Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε υδατικά διαλύματα (D_2O, 99.9% σε D και απιονισμένου H_2O σε αναλογία 1:50 αντίστοιχα) σε δύο διαφορετικές τιμές pH. Τα διαλύματα των αμινοξέων μελετήθηκαν σε pH = 6.0 (κατάσταση διπολικού ιόντος) και σε pH = 0.5 (πρωτονιομένη κατάσταση). Τα υδατικά διαλύματα των ακετυλο-αμινοξέων μελετήθηκαν σε pH = 6.0 και pH = 1.8, των βεταϊνών σε pH = 6.0 και pH = 1.3, ενώ τα υδατικά διαλύματα των διπεπτιδίων μελετήθηκαν μόνο σε pH = 6.0. Το pH ρυθμίστηκε με προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCL, 1N) ή υδροξειδίου του νατρίου (NaOH, 1N). Όλες οι μετρήσεις NMR-^{13}C πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 298 K ±1 K, ενώ αυτές του NMR-^{14}N στους 308 K ±1 K και 318 K ±1 K. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων όλων των ενώσεων ήταν ~0.1M.[4]

---

[3] Οι βεταΐνες εκτός της γλυκίνης δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες. Η παρασκευή των υπολοίπων βεταϊνών έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω.

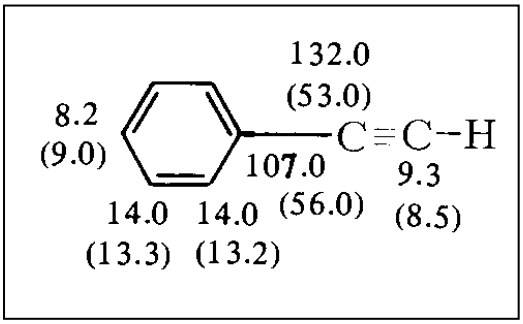
[4] Εκτός των διαλυμάτων των βεταϊνών (πλην της γλυκίνης), που προσαρμόστηκαν ανάλογα με τις ποσότητες που κατορθώθηκαν να συντεθούν.

2.1.2 Απομάκρυνση παραμαγνητικών ουσιών από τα υδατικά διαλύματα

Κατά τη διάρκεια της κίνησης των μορίων σε ένα διάλυμα, τα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια παράγουν ισχυρότερα μεταβαλλόμενα τοπικά πεδία απ' ότι τα πυρηνικά spin, λόγω της κατά πολύ μεγαλύτερης μαγνητικής τους ροπής. Αυτό το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα η αποκατάσταση να οφείλεται στις διπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηλεκτρονιακών spin με τους πυρήνες, κάτι ανάλογο με τις διπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πυρήνων. Έτσι, η ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων και γενικά παραμαγνητικών ουσιών σε ένα διάλυμα οδηγεί στην επιτάχυνση της αποκατάστασης, άρα σε μικρότερους χρόνους T_1 των πυρήνων των άλλων μορίων που συνυπάρχουν στο διάλυμα. [62, 63]

Η επιτάχυνση της αποκατάστασης των πυρηνικών spin είναι μεγαλύτερη όσο πιο αργά αποκαθίσταται ο πυρήνας σε κανονικές συνθήκες. Για παράδειγμα, γνωρίζοντας ότι η μαγνητική ροπή του ηλεκτρονίου λόγω spin, είναι 657 φορές μεγαλύτερη της αντίστοιχης του πρωτονίου, τότε ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εμφανίζει μηχανισμό αποκατάστασης περίπου 500,000 φορές δραστικότερο του πρωτονίου, καθιστώντας έτσι την παραμαγνητική αποκατάσταση τον κύριο μηχανισμό αποκατάστασης. [62, 63]

Όσον αφορά τη διπολική αποκατάσταση των πυρήνων ^{13}C, μέσω του παραδείγματος που ακολουθεί μπορούμε να κατανοήσουμε το πόσο μπορεί να επηρεαστεί από την ύπαρξη παραμαγνητικών ουσιών. Έτσι, στην περίπτωση του φαινυλεθυνίου (Εικόνα 2.1) σε διάλυμα ακετόνης, χωρίς την απομάκρυνση του παραμαγνητικού διαλυμένου μοριακού οξυγόνου, ο χρόνος αποκατάστασης T_1 του τεταρτοταγή άνθρακα, ο οποίος αποκαθίσταται πιο αργά από τους υπόλοιπους άνθρακες του μορίου, είναι σχεδόν δύο φορές μικρότερος απ' όταν το διάλυμα απαερωθεί και απαλλαχτεί από την παρουσία του μοριακού οξυγόνου. Σε αντίθεση με τον τεταρτοταγή άνθρακα, οι υπόλοιποι άνθρακες που αποκαθίστανται πιο γρήγορα, ανάλογα με τον αριθμό των συνδεδεμένων με αυτούς πρωτονίων, επηρεάζονται σε μικρότερο μεν αλλά σημαντικό βαθμό.



Εικόνα 2.1 Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 (sec) των ^{13}C του φαινυλεθυνίου σε διάλυμα ακετόνης. Στις παρενθέσεις περιγράφονται οι χρόνοι χωρίς την απομάκρυνση του παραμαγνητικού μοριακού οξυγόνου από το διάλυμα.[116]

Έτσι κρίθηκε απαραίτητη η απομάκρυνση του παραμαγνητικού μοριακού οξυγόνου κατά τη διάρκεια παρασκευής όλων των διαλυμάτων, μέσω συνεχούς διαβίβασης αερίου αζώτου για περίπου 15 λεπτά, καθώς και η προσθήκη ποσότητας εθυλενο-διαμινο-τεραοξικού οξέος (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) σε συγκέντρωση 10^{-5} M σε όλα τα υδατικά διαλύματα των αμινοξέων και παραγώγων τους, με σκοπό την δέσμευση οποιωνδήποτε παραμαγνητικών ιόντων (ιόντα μετάλλων κλπ), όπως σε παρόμοιες μελέτες προσδιορισμού αποκατάστασης πυρήνων.[38]

2.1.3 Παρασκευή N-τριμεθυλο-αμινοξέων (βεταϊνών)

Εκτός από τη βεταΐνη της γλυκίνης (Glycine betaine) οι υπόλοιπες βεταΐνες που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες. Κατά συνέπεια πραγματοποιήθηκε η σύνθεσή τους με την μέθοδο των *Goldberg et. al.*[117] Συνολικά παρασκευάστηκαν 5 βεταΐνες.

Αρχικά αναμείχθηκε ποσότητα του κάθε αμινοξέος (περίπου 1 g) με το αντιδραστήριο O-μεθυλο-N,N'-διισοπροπυλοουρία (MIU) σε αναλογία 1:4 moles αντίστοιχα, σε 100 ml μεθανόλης. Το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για τρεις ημέρες σε υδατόλουτρο περίπου στους 300 K. Μετά το πέρας των τριών ημερών το υπόλειμμα του MIU αφαιρέθηκε από το διάλυμα με διήθηση υπό κενό. Το διάλυμα της μεθανόλης συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε νερό και διηθήθηκε υπό κενό. Η διαδικασία (συμπύκνωση, διάλυση σε νερό, διήθηση) επαναλήφθηκε αρκετές φορές. Λόγω της μη διαλυτότητας του αντιδραστηρίου (MIU) στο νερό και της υψηλής διαλυτότητας

των βεταϊνών σε αυτό, πετυχαίνεται η απομόνωσή τους. Για την πλήρη απομόνωση των βεταϊνών πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση, αφού το τελικό αφυδατωμένο μίγμα διαλύθηκε σε αιθανόλη και ανακρυσταλλώθηκε σε μίγμα αιθανόλης - ακετόνης με αναλογία 6:1. Η ανακρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση όλων των βεταϊνών (Πίνακας 3.1). Ο έλεγχος της παρασκευής και απομόνωσης των βεταϊνών έγινε με ^{1}H-NMR.

Πίνακας 2.1 Οι βεταΐνες που συντέθηκαν και η απόδοση της σύνθεσής τους

Βεταΐνες*	**Απόδοση (%)**
Alanine betaine	15
Valine betaine	40
Threonine betaine	18
Leucine betaine	16
Phenylalanine betaine	40

* Η αρχική ποσότητα των αντίστοιχων αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 g

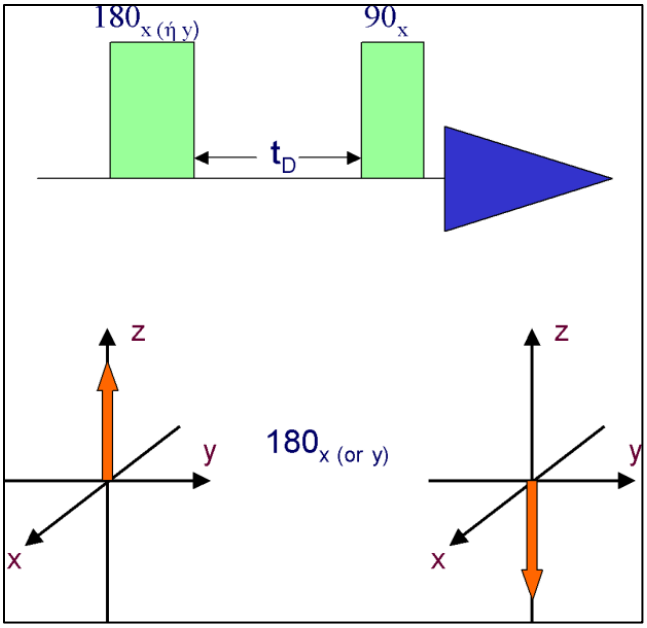
2.1.4 Οργανολογία

Η λήψη των φασμάτων NMR-^{13}C και NMR-^{14}N πραγματοποιήθηκε στο όργανο NMR Bruker Avance 400 MHz, εξοπλισμένο με υψηλής ανάλυσης πολυπυρηνικό υποδοχέα (high resolution multinuclear probe), διαμέτρου 5 mm.

2.1.5 Μετρήσεις χρόνων αποκατάστασης των πυρήνων ^{13}C

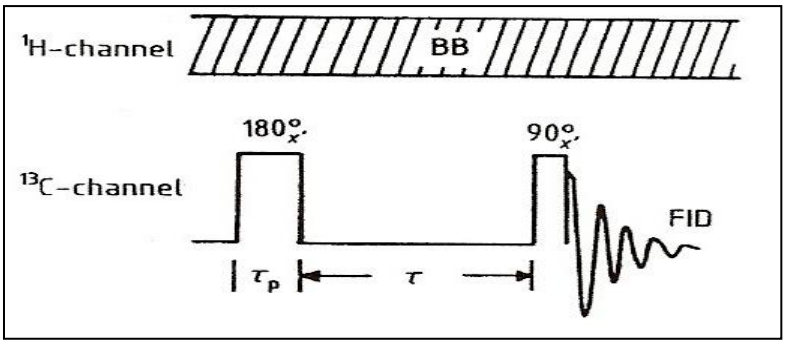
Για την μέτρηση του χρόνου αποκατάστασης (T_1) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αναστροφής και επαναφοράς της μαγνήτισης (Inversion Recovery), σύμφωνα με την οποία

παίρνονται μια σειρά από NMR-^{13}C φάσματα με την αλληλουχία παλμών 180^0_x-t-90^0_x-FID (Εικόνα 2.2 και 2.4), ενώ παράλληλα μειώνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του άνθρακα



Εικόνα 2.2 Η παλμική ακολουθία Inverssion-Recovery.

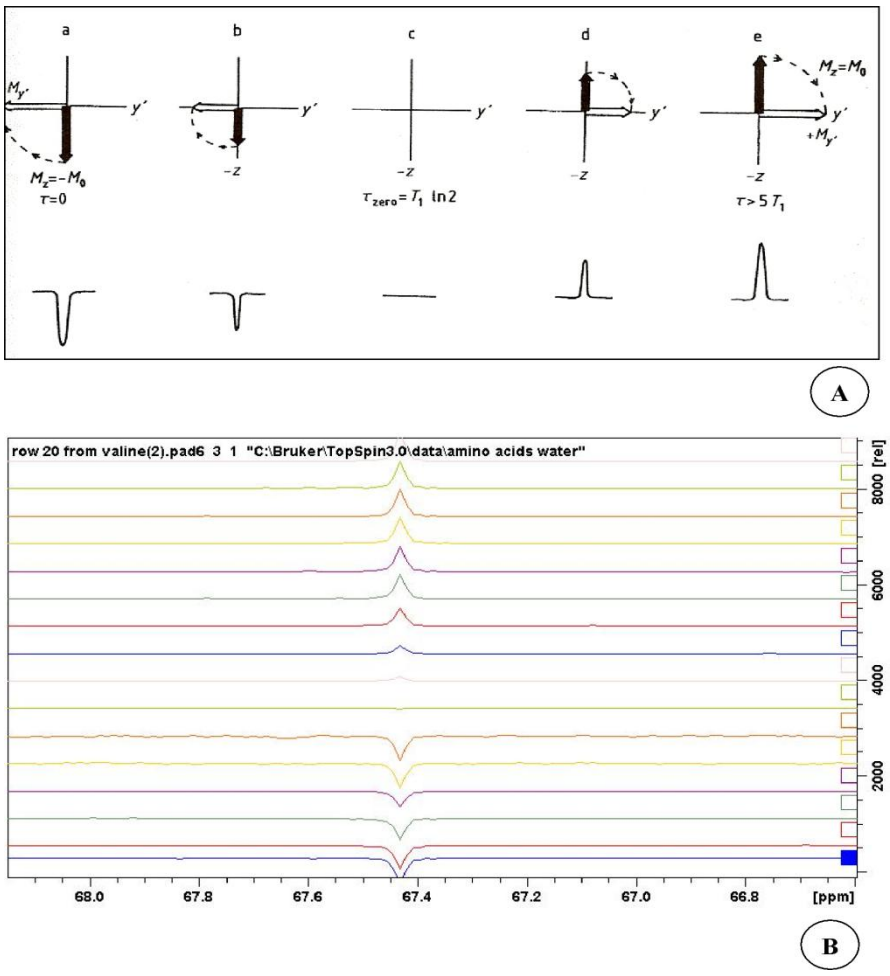
και των συζευγμένων υδρογόνων του με ευρείας ζώνης αποσύζευξη (proton broad band decoupling) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Η ευρεία ζώνη αποσύζευξης του πρωτονίου (^{1}H) από τον πυρήνα ^{13}C.

Για την κατανόηση της παραπάνω παλμικής αλληλουχίας στο σύστημα των spin και τις αλλαγές στο εύρος των κορυφών του φάσματος παραθέτεται ένα παράδειγμα με δείγμα προς εξέταση το χλωροφόρμιο (^{13}CHCL$_3$), που περιέχει πυρήνα ^{13}C (Εικόνα 2.4 **A**),[62] ενώ στην Εικόνα 2.4 **B** περιγράφεται η εφαρμογή της ίδιας παλμικής ακολουθίας για το αμινοξύ βαλίνη σε υδατικό διάλυμα pH = 6.0 (συγκεκριμένα ο κεντρικός άνθρακας του αμινοξέος, ^{13}C$_\alpha$).

Μετά την εφαρμογή του παλμού $180^0_{x'}$, η διεύθυνση του ανύσματος της πυρηνικής μαγνήτισης, $\mathbf{M_0}$, βρίσκεται στον άξονα –z . Κατά την διάρκεια του χρόνου καθυστέρησης (*t*) το σύστημα αποκαθίσταται με ένα σταθερό ρυθμό $k = T_1^{-1}$. Σύμφωνα με την Εικόνα 2.4 **A**, παρατηρούνται τα στάδια της εξέλιξης που επιτυγχάνονται μέσω της αποκατάστασης του συστήματος, από το διάνυσμα μαγνήτισης **M** (= $\mathbf{M_Z}$) για πέντε διαφορετικούς χρόνους καθυστέρησης *t*. Το διάγραμμα a αντιστοιχεί σε $t = 0$ και $\mathbf{M_Z} = -\mathbf{M_0}$. Το διάγραμμα b περιγράφει την φάση όπου μετά από λίγο χρόνο *τ* το $\mathbf{M_Z}$ παραμένει αρνητικό. Το διάγραμμα c, όπου $\mathbf{M_Z} = 0$, περιγράφει το σημαντικό στάδιο για την ποσοτική μέτρηση του χρόνου αποκατάστασης T_1. Για μεγαλύτερες τιμές του *t*, το $\mathbf{M_Z}$, δίνεται ξανά θετικό (διάγραμμα d') και στο e' το σύστημα έχει επανέλθει στην κατάσταση ισορροπίας με $\mathbf{M_Z} = \mathbf{M_0}$.



Εικόνα 2.4 (A) Σχηματική αναπαράσταση των μαγνητίσεων **M** και του σήματος ^{13}C NMR της ένωσης $^{13}CHCL_3$ κατά τη διάρκεια εφαρμογής της παλμικής ακολουθίας Inversion-Recovery.[62] **(B)** Τα σήματα $^{13}C_\alpha$ NMR για όλους τους χρόνους *τ* που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα Inversion-Recovery του αμινοξέος βαλίνη σε υδατικό διάλυμα pH = 6.0.

Οι μαγνητίσεις **M** δεν είναι άμεσα μετρήσιμες ποσότητες δεδομένου ότι σήμα προκαλείται στο δέκτη, όταν το άνυσμα της μαγνήτισης έχει εγκάρσια συνιστώσα (**M_x, M_y**). Γι' αυτό στη δεύτερη φάση της παλμικής ακολουθίας μετά τον χρόνο καθυστέρησης *t*, η μαγνήτιση **M_Z** με την εφαρμογή του παλμού $90^0{}_{X'}$ περιστρέφεται στη διεύθυνση του άξονα y'. Αυτό το γεγονός μας δίνει την εγκάρσια μαγνήτιση **$M_{y'}$,** η οποία μπορεί να παρατηρηθεί. Οι εντάσεις των σημάτων NMR τα οποία αποκτήθηκαν μετά από μετασχηματισμό Fourier, είναι ανάλογες των **M_y**. Για **M_Z** = 0 ($t = \tau_{null}$) δεν ανιχνεύεται κανένα σήμα. Σε μεγαλύτερες τιμές του χρόνου *t* το εύρος των σημάτων είναι θετικό και το μέγεθός τους διαμορφώνεται από τη μαγνήτιση **M_Z** σε κάθε περίπτωση.

Η τιμή της μαγνήτισης τη χρονική στιγμή *t* περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{M_z(t) - M_0}{T_1}$$

Η λύση της παραπάνω διαφορικής εξίσωσης καταλήγει στη μορφή:

$$M_z(t) = M_0\left(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}}\right), \qquad (2.1)$$

Όταν η ένταση του σήματος είναι μηδέν (zero-crossing point) η παραπάνω εξίσωση οδηγεί στο:

$$T_1 = \frac{\tau_{null}}{\ell n 2}$$

Η παραπάνω εξίσωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο να εκτιμηθεί η τιμή του T_1 για κάθε ένα σήμα σε ένα NMR-^{13}C φάσμα, εφόσον θελήσουμε να αποφύγουμε να κάνουμε μετρήσεις σε ολόκληρη τη διάρκεια της περιόδου αποκατάστασης του συστήματος.

Η εξίσωση (2.1) γενικεύεται στην:

$$M_z(t) = M_\infty - 2M_0 e^{-\frac{t}{T_1}}, \qquad (2.2)$$

όπου **M_∞** η μαγνήτιση για χρόνο t > $6T_1$ και **M_0** η μαγνήτιση για χρόνο t ~ 0.

Συνήθως είναι απαραίτητο να συγκεντρώσουμε πολλά FIDs, ώστε να αποκτήσουμε καλής ποιότητας NMR-^{13}C φάσματα. Κάθε φορά που επαναλαμβάνεται η αλληλουχία παλμού, $180^0{}_{x'}$–t–$90^0{}_{x'}$, εισάγεται άλλη μια παράμετρος, ένα χρόνος καθυστέρησης (***T_d***) ανάμεσα σε κάθε εφαρμογή της ακολουθίας παλμού, ίσος με περίπου έξι φορές τον χρόνο

αποκατάστασης ($6T_1$). Αυτό αποσκοπεί στο να επιτρέπεται στο σύστημα πυρήνων να επιστρέφει στη θερμική ισορροπία και οι μετρήσεις των εντάσεων των μαγνητίσεων **M** να είναι ακριβείς, ώστε να οδηγούν σε ακριβή υπολογισμό των χρόνων T_1. Έτσι η αλληλουχία παλμού στην ολοκληρωμένη μορφή της γίνεται:

$$(T_d–180^0_{x'}–\tau–90^0_{x'})_n$$

Στις εν λόγω μετρήσεις της παρούσας διατριβής επιλέχθηκαν 20 διαφορετικές τιμές *t* και η τιμή του T_d μεγαλύτερη ή ίση από το εξαπλάσιο των χρόνων αποκατάστασης T_1. Η ένταση των NMR-^{13}C σημάτων στα φάσματα που πάρθηκαν σε συνάρτηση με το διάστημα μεταξύ των παλμών περιγράφεται από την εξίσωση (2.2). Ο υπολογισμός των χρόνων T_1 πραγματοποιήθηκε με την ελαχιστοποίηση της εξίσωσης (2.2), με την χρήση της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων σε μη γραμμική παλινδρόμηση (least square non-linear regression).

2.1.6 Μετρήσεις NMR-^{14}N

Τα φάσματα NMR-^{14}N λήφθηκαν στο όργανο NMR Avance 400 MHz της εταιρείας Bruker, στη συχνότητα των 28.91 MHz, χωρίς τη χρησιμοποίηση «lock» στο δευτέριο του διαλύτη, με τη χρησιμοποίηση της παλμικής ακολουθίας a-ring, με σκοπό την ελάττωση της ηλεκτρικής αντήχησης, η οποία παρατηρείται στα φάσματα πυρήνων με μικρό γυρομαγνητικό λόγο. Οι χημικές μετατοπίσεις καταγράφηκαν σε σχέση με το σήμα του χλωριούχου αμμωνίου. Η πρωτονιακή αποσύζευξη (proton decoupling) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παλμική ακολουθία WALTZ-16 και η ισχύς του decoupler ήταν περίπου ίση με 1 W κατά τη διάρκεια της εφαρμογής του παλμού και μηδενική κατά τη διάρκεια του χρόνου καθυστέρησης. Ο σκοπός της αποσύζευξης ήταν η εξάλειψη περαιτέρω διεύρυνσης του εύρους των κορυφών ^{14}N λόγω της ανταλλαγής πρωτονίων στα υδατικά διαλύματα κυρίως του χαμηλού pH.

Το εύρος στο μισό του ύψους των κορυφών ^{14}N των υπό μελέτη μορίων, θεωρώντας την κίνησή τους ισοτροπική, περιγράφει τον εγκάρσιο χρόνο αποκατάστασης (transverse relaxation time), $\boldsymbol{T_{2Q}}$, που ισούται με τον χρόνο αποκατάστασης T_{1Q} σύμφωνα με την εξίσωση:[63]

$$T_{2Q} = 1/(\pi \Delta v_{1/2}) = T_{1Q} \quad (2.3)$$

Η παραπάνω εξίσωση προκύπτει από το γεγονός ότι σε καταστάσεις ακραίας κινητικής «στένωσης» (motional narrowing regime) των μορίων, η εγκάρσια αποκατάσταση είναι μια απλή εκθετική συνάρτηση, όπου $T_1 = T_2$. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η ανομοιογένεια του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου δε συνεισφέρει στην αποκατάσταση και μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, με αποτέλεσμα ο ποσοτικός καθορισμός της αποκατάστασης να προσδιορίζεται από τη μέτρηση του εύρους στο μέσο του ύψους των κορυφών.

2.1.7 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των χρόνων αποκατάστασης που προέκυψαν ως αποτέλεσμα των αντίστοιχων πειραμάτων για τους πυρήνες ^{13}C και ^{14}N, η εξέταση της σύμπτωσης των καμπυλών (coincidence of nonlinear regression) καθώς και η απεικόνισή τους πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism version 5.0 Trial.

2.1.8 Μέθοδοι κβαντομηχανικής – θεωρητικής προσέγγισης της ενυδάτωσης

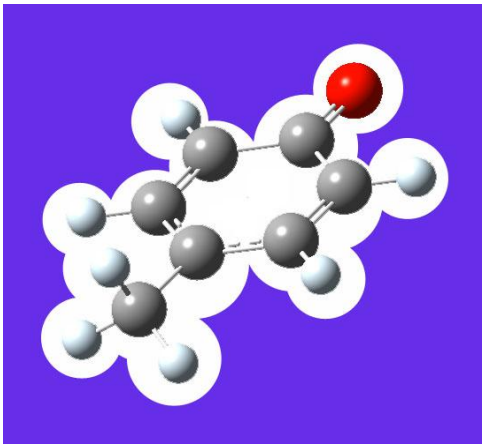
Οι μοριακές δομές της αλανίνης, ακετυλο-αλανίνης και βεταΐνης της αλανίνης στις καταστάσεις τους σε ουδέτερο και όξινο pH, χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση του βαθμού ενυδάτωσής τους. Παράλληλα μελετήθηκε και η ενυδάτωση του διπεπτιδίου της Αλανίνης μόνο στην κατάσταση διπολικού ιόντος. Όλοι οι υπολογισμοί της ελάχιστης ηλεκτρονιακής ενέργειας, καθώς και οι βελτιστοποιημένες γεωμετρίες όλων των υπό μελέτη βιομορίων, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη θεωρία συναρτησιοειδών ηλεκτρονιακής πυκνότητας, Density Functional Theory (DFT), σε επίπεδο B3LYP[71, 75, 81, 83] και με χρήση του cc-pVTZ[89] συνόλου βάσης, με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου GAUSSIAN03,[118] στο υπολογιστικό κέντρο επιστημονικής μοντελοποίησης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για όλα τα συμμετέχοντα ατομικά και μοριακά συστήματα πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί δονητικών συχνοτήτων στο ίδιο επίπεδο θεωρίας (B3LYP/cc-pVTZ). Για την

προσομοίωση του υδατικού διαλύματος (bulk solvent) εφαρμόστηκε το μοντέλο πολωμένου συνεχούς μέσου του Tomasi, (Polarised Continuum Model), IEF-PCM.[119-121] Ονομάζεται μέθοδος «συνεχούς μέσου», διότι ο διαλύτης προσομοιώνεται ως ένα ομοιόμορφο διηλεκτρικό μέσο αντί να αντιμετωπίζεται κάθε μόριό του ξεχωριστά. Το μοντέλο ορίζει μια κοιλότητα στον διαλύτη, στην οποία εμπεριέχεται η διαλυμένη ένωση. Η κοιλότητα αυτή αποτελεί συνένωση μιας σειράς αλληλένδετων ατομικών σφαιρών γύρω από τα άτομα του εξεταζόμενου μορίου και, επομένως η οριοθέτησή της εξαρτάται από τη διαλυμένη ουσία, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.5. Το ηλεκτροστατικό δυναμικό της διαλυμένης ουσίας και η πολωσιμότητα του διαλύτη δημιουργούν ένα δυναμικό αντίδρασης (reaction potential) με το οποίο αλληλεπιδρά η διαλυμένη ουσία. Τα ανωτέρω μεγέθη συνδέονται μέσω της ακόλουθης εξίσωσης Poisson:

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r})] = 4\pi \rho_M(\vec{r}) , \qquad (2.4)$$

όπου $\phi(\vec{r})$ το ηλεκτροστατικό δυναμικό, $\varepsilon(\vec{r})$ η διηλεκτρική σταθερά του μέσου (για το νερό είναι ίση με 78.50 pF/m) και $\rho_M(\vec{r})$ η ηλεκτρονιακή πυκνότητα και εξαρτώνται από τη γεωμετρία του μορίου ή του ατόμου.



Εικόνα 2.5 Σχηματική περιγραφή δράσης του μοντέλου πολωμένου συνεχούς μέσου IEF-PCM στην πλευρική αλυσίδα της τυροσίνης. Με μπλε χρώμα συμβολίζεται η κοιλότητα που σχηματίζεται στον υδατικό διαλύτη.

Το συγκεκριμένο μοντέλο θεωρείται πολύ αποτελεσματικό όταν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίων διαλύτη (στη συγκεκριμένη περίπτωση το H_2O) και μιας διαλυμένης ουσίας.[122, 123] Για την περαιτέρω διερεύνηση της ενυδάτωσης των παραπάνω βιομορίων, τοποθετήθηκαν σταδιακά και τυχαία ξεχωριστά

μόρια νερού γύρω από τα υπό μελέτη βιομόρια, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε η επίδραση του bulk διαλύτη[5].[54, 124]

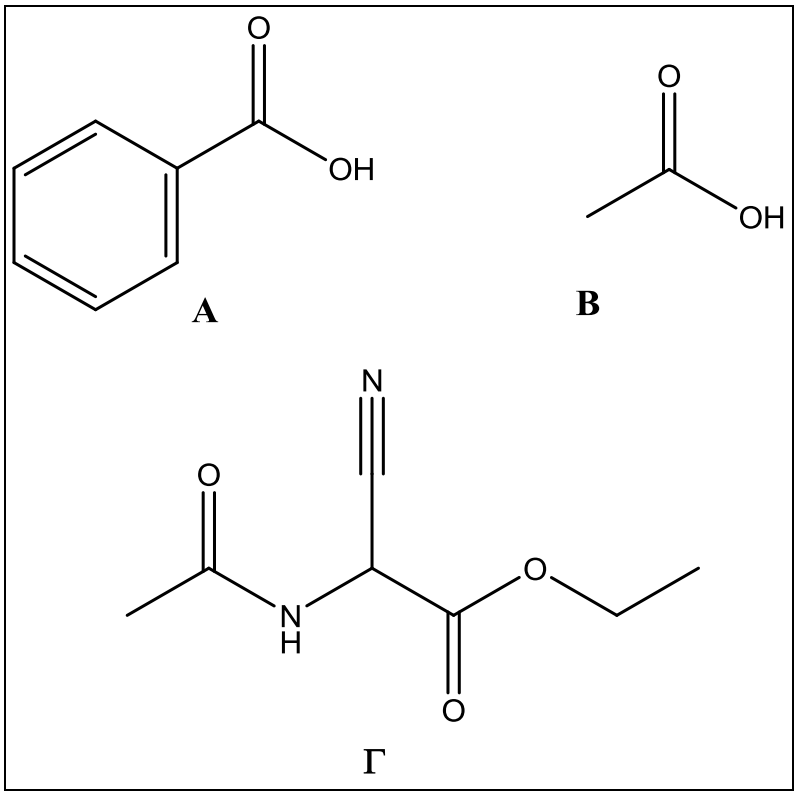
Ο απώτερος σκοπός ήταν η πρόβλεψη της δομής μιας πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης των υπό μελέτη βιομορίων, επιδεικνύοντας τον μέγιστο αριθμό μορίων νερού που μπορούν άμεσα (μέσω δεσμών υδρογόνου) να αλληλεπιδράσουν με τα παραπάνω μόρια και να διαπιστωθούν τυχόν αλλαγές στον αριθμό τους από την πρωτονιομένη στην ουδέτερου pH κατάσταση των αμινοξέων, ακέτυλο αμινοξέων και βεταϊνών.

2.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης βιομορίων με το διαλύτη DMSO

2.2.1 Υλικά - Οργανολογία

Στην προσπάθεια για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης των μορίων του διαλύτη DMSO με τα μόρια των αμινοξέων και των παραγώγων τους, δηλαδή στην προσπάθεια εύρεσης του τρόπου αλληλεπίδρασης με τις καρβοξυλομάδες (–COOH) και με το ιμιδικό υδρογόνο (-NH) των πεπτιδικών δεσμών των βιομορίων, χρησιμοποιήθηκαν ενώσεις μοντέλα, οι οποίες ήταν το βενζοϊκό και οξικό οξύ (Εικόνα 2.6 Α, Β) καθώς και ο αιθυλεστέρας της Ν-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης (Εικόνα 2.6 Γ). Τα δύο οξέα χρησιμοποιήθηκαν για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης με το καρβοξυλικό υδρογόνο και η τελευταία ένωση για την κατανόηση της αλληλεπίδρασης με το ιμιδικό υδρογόνο.

[5] Το συγκεκριμένο μοντέλο μελέτης της επιδιαλύτωσης μορίων ονομάζεται self-consistent reaction field (SCRF model).



Εικόνα 2.6 (**Α**) Η δομή του βενζοϊκού οξέος (**Β**) Η δομή του οξικού οξέος (**Γ**) Η δομή του αιθυλεστέρα της Ν-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης.

Για την ακριβέστερο προσδιορισμό των παραπάνω αλληλεπιδράσεων, είναι προφανές, ότι η αποφυγή της παρουσίας νερού κρίνεται απαραίτητη, ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο η αλληλεπίδραση των μορίων νερού με τις υπό μελέτη ομάδες. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε άνυδρος διαλύτης DMSO-d_6, η παρασκευή των δειγμάτων έγινε στο εσωτερικό ενός dry box με συνεχή διαβίβαση άνυδρου αερίου αζώτου και η φύλαξή τους σε ξηραντήρα υπό κενό. Όλες οι ενώσεις μοντέλα αποκτήθηκαν από την Sigma-Aldrich.

Το σύνολο των μετρήσεων και λήψεων φασμάτων NMR-^{1}H πραγματοποιήθηκαν στο όργανο NMR Bruker Avance 400 MHz.

2.2.2 Μετρήσεις NMR-^{1}H

Οι μελέτες των αλληλεπιδράσεων του DMSO με τις παραπάνω ενώσεις διεξήχθησαν μέσω της λήψεως φασμάτων NMR-^{1}H. Οι χημικές μετατοπίσεις μελετήθηκαν με αναφορά τη χημική μετατόπιση των ^{1}H της ένωσης TMSP (τριμεθυλοσιλυλ-προπανοϊκού οξέος),

διαλυμένο στο ίδιο διάλυμα των υπό μελέτη ενώσεων (internal reference) για την αποφυγή της διαφοράς της μαγνητικής επιδεκτικότητας, σε συγκέντρωση 20 μM. Παρασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων των ενώσεων που μελετήθηκαν, ξεκινώντας από 1 M έως 50 μM. Όλα τα φάσματα ελήφθησαν στις θερμοκρασίες 298, 303, 308, 313 και 320 K.

2.2.3 Μέθοδοι κβαντομηχανικής – θεωρητικής προσέγγισης των αλληλεπιδράσεων του DMSO με τις ομάδες -COOH

Η μοριακή δομή του οξικού οξέος μελετήθηκε για την αλληλεπίδραση των –COOH ομάδων με τα μόρια του διαλύτη DMSO. Όλοι οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί *ab initio*, έγιναν με τη βοήθεια της σουίτας προγραμμάτων GAUSSIAN03 στο υπολογιστικό κέντρο επιστημονικής μοντελοποίησης του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η γεωμετρική βελτιστοποίηση των μοριακών δομών που αναφέρθηκαν και στη συνέχεια μετρήσεις των συχνοτήτων των μοριακών τους δονήσεων μέσω πειραμάτων Møller-Plesset (MP2) και DFT (B3LYP), με ζεύγη βάσεων cc-pVTZ των τροχιακών κάθε ατόμου των μορίων. Για την προσομοίωση του διαλύτη DMSO (bulk solvent) εφαρμόστηκε το μοντέλο επιδιαλύτωσης IEF-PCM model, παρόμοια με το διαλύτη νερό για την μελέτη ενυδάτωσης. Για την περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των παραπάνω μορίων, τοποθετήθηκαν μόρια DMSO γύρω από τα υπό μελέτη μόρια, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε η επίδραση του bulk διαλύτη.

Η παραπάνω διαδικασία επιτρέπει το θεωρητικό υπολογισμό της ενέργειας των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων DMSO με τις υπό μελέτη ενώσεις, καθώς και την θερμοδυναμική προσέγγιση των συμπλόκων αυτών.

3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1 Ενυδάτωση

3.1.1 Αποτελέσματα Μετρήσεων Χρόνων Αποκατάστασης NMR-$^{13}C_{\alpha}$

Όπως αναφέρθηκε, μέσω των φασμάτων NMR-^{13}C, με την εφαρμογή της παλμικής ακολουθίας Inversion Recovery, πραγματοποιήθηκε η ακριβής μέτρηση των χρόνων αποκατάστασης spin-πλέγματος (T_1) των α-ανθράκων των αμινοξέων, των ακετυλο-αμινοξέων, των βεταϊνών και των διπεπτιδίων.

Σύμφωνα με τη δομή όλων των αμινοξέων και όλων των παραγώγων τους (ακετυλο-αμινοξέα, βεταΐνες, διπεπτίδια), δύο άτομα ανθράκων εμφανίζονται σε παρόμοια θέση σε όλα τα υπό μελέτη μόρια: ο α-άνθρακας (**C_{α}**) και ο άνθρακας της καρβοξυλομάδας (-**C**OO$^-$ ή -**C**OOH). Είναι προφανές ότι για την σύγκριση - ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ όλων των μορίων πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα του ενός ή και των δύο ανθράκων.

Λαμβάνοντας υπόψη την διπολική αποκατάσταση του ^{13}C (κυρίως στα διαμαγνητικά διαλύματα), γίνεται αντιληπτό πως ο α-άνθρακας των αμινοξέων και παραγώγων τους αποκαθίσταται κατά κύριο λόγο μέσω του ομοιοπολικά συνδεδεμένου υδρογόνου[6] του. Σε αντίθεση, η αποκατάσταση του άνθρακα της καρβοξυλομάδας χαρακτηρίζεται από μια πολυπλοκότητα και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι το μαγνητικό πεδίο που αντιλαμβάνεται ένας πυρήνας εξαρτάται από την ηλεκτρονιακή του προάσπιση. Αν η προάσπιση δεν ίση σε όλες τις διευθύνσεις γύρω από τον πυρήνα, τα δευτερογενή μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από τα ηλεκτρονιακά ρεύματα, δεν είναι υποχρεωτικά παράλληλα προς το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (***B_0***) με αποτέλεσμα να δημιουργούν κάθετη προς αυτό συνιστώσα (χημική προστασία μέσω της ανισοτροπίας, chemical shielding anisotropy, CSA). Έτσι, σε περιπτώσεις τριτοταγών ανθράκων (C=O και C≡O), οι οποίοι δεν έχουν κοντά τους κάποιο πρωτόνιο (ο καρβοξυλικός άνθρακας των αμινοξέων και παραγώγων τους), η αποκατάστασή τους

[6] Στην περίπτωση της γλυκίνης και όλων των παραγώγων της, η αποκατάσταση του $^{13}C_{\alpha}$ πραγματοποιείται μέσω των δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένων υδρογόνων του.

οφείλεται κυρίως στη CSA.[63, 109] Για το λόγο αυτό η μελέτη ενυδάτωσης των αμινοξέων και παραγώγων τους αποφασίστηκε να στηριχθεί στην αποκατάσταση των α-ανθράκων.

Η διπολική αποκατάσταση των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ περιγράφεται από τον χρόνο αποκατάστασης T_1 και συνδέεται με τον χρόνο συσχέτισης τ_c μέσω της σχέσης:[125]

$$\frac{1}{NT_1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2}{10 r_{C-H}^6} \left\{ \frac{\tau_C}{1+\left(\omega_H - \omega_C\right)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1+\omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1+\left(\omega_H + \omega_C\right)^2 \tau_C^2} \right\}, \tag{3.1}$$

όπου μ_0 η μαγνητική διαπερατότητα του κενού, $\hbar = h/2\pi$ όπου h η σταθερά του Planck, γ_C και γ_H ο γυρομαγνητικός λόγος άνθρακα και υδρογόνου αντίστοιχα, r_{C-H} η απόσταση του πυρήνα του άνθρακα με το υδρογόνο και N ο αριθμός των ομοιοπολικά συνδεδεμένων υδρογόνων. Στην παραπάνω εξίσωση διαφαίνεται το γεγονός ότι η αποκατάσταση των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ οφείλεται στο ομοιοπολικά συνδεδεμένο υδρογόνο του (δύο υδρογόνα για την Γλυκίνη και τα υπό μελέτη παράγωγά της).

Θεωρώντας τα υδατικά διαλύματα των μορίων που μελετώνται ισοτροπικά, ο χρόνος συσχέτισης (τ_c) ισούται με το χρόνο περιστροφής του βιομορίου (τ_R). Άρα η εξίσωση (3.1) μπορεί να αναδιατυπωθεί ως εξής:

$$\frac{1}{NT_1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2}{10 r_{C-H}^6} \left\{ \frac{\tau_R}{1+\left(\omega_H - \omega_C\right)^2 \tau_R^2} + \frac{3\tau_R}{1+\omega_C^2 \tau_R^2} + \frac{6\tau_R}{1+\left(\omega_H + \omega_C\right)^2 \tau_R^2} \right\} \tag{3.2}$$

Στη περίπτωση ισοτροπικών διαλυμάτων με μία μέτρια τιμή ιξώδους η (όπου η ελεύθερη κίνηση των μορίων είναι κατά Brown), ο χρόνος περιστροφής (τ_R) εκφράζεται από τη σχέση:[126]

$$\tau_R = \frac{V_m \eta f_r}{kT}, \tag{3.3}$$

όπου V_m ο μοριακός όγκος, f_r ο παράγοντας μικροϊξώδους, k η σταθερά Boltzman και T η θερμοκρασία.

Στην περίπτωση των αμινοξέων ο μοριακός όγκος V_m ισούται με:[31]

$$V_m = \frac{0.74 Mw_{eff}}{N_A \rho}, \tag{3.4}$$

όπου N_A είναι ο αριθμός Avogadro και Mw_{eff} και ρ το μοριακό βάρος και η πυκνότητα της διαλυμένης ουσίας στο διάλυμα αντίστοιχα.

Η ενσωμάτωση της εξίσωσης (3.4) στην εξίσωση (3.3) παράγει τη σχέση:

$$\tau_R = \frac{0.74 Mw_{eff} \eta f_r}{kTN_A \rho}, \tag{3.5}$$

Η εξίσωση (3.5) αποδεικνύει την ανάλογη σχέση μεταξύ των χρόνων περιστροφής των αμινοξέων και παραγώγων τους με το μοριακό βάρος που αποκτούν στα υδατικά τους διαλύματα. Η έκφραση «αποκτούν» δηλώνει ότι το Mw_{eff} δεν περιγράφει μόνο το πραγματικό μοριακό βάρος των υπό μελέτη μορίων, αλλά και τα μόρια διαλύτη (στη συγκεκριμένη περίπτωση τα μόρια νερού), τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτά. Είναι προφανές ότι οι κύριες αλληλεπιδράσεις εντοπίζονται στο βαθμό των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των. Δηλαδή ισχύει:

$$Mw_{eff} = Mw + 18n, \tag{3.6}$$

όπου n ο αριθμός μορίων νερού τα οποία αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα υπό μελέτη μόρια και Mw το πραγματικό μοριακό βάρος της διαλυμένης ένωσης.

Δεδομένου ότι η μελέτη ενυδάτωσης επικεντρώνεται σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες βιομορίων και ότι κάθε ομάδα περιέχει ενώσεις με διαφορετική πολικότητα, δομή, άρα και συμπεριφορά στα υδατικά διαλύματα, οι τιμές του ιξώδους και του παράγοντα ιξώδους πρέπει να εμφανίζονται παντού περίπου ίσες και ανεξάρτητες από την ιονισμένη κατάσταση των βιομορίων, ώστε να είναι εφικτή η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων όλων των υπό μελέτη ουσιών και η τιμή της εξίσωσης (3.5) να παραμένει αναλλοίωτη ή να υπόκειται σε στατιστικά αμελητέες αλλαγές.

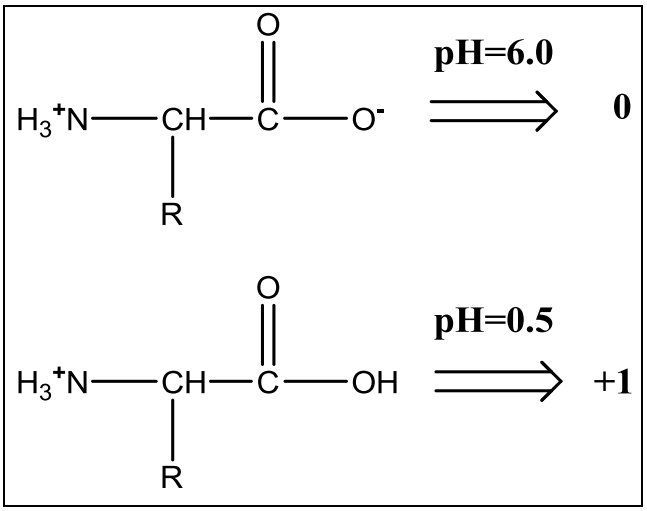
3.1.1.1 Αμινοξέα

Στο πειραματικό μέρος της διατριβής αναφέρθηκε πως η μελέτη της ενυδάτωσης των L-αμινοξέων (καθώς και όλων των παραγώγων τους) έγινε και στις δύο καταστάσεις τους: του διπολικού ιόντος και την πρωτονιομένη. Η κατάσταση διπολικού ιόντος των αμινοξέων χαρακτηρίζεται από το μηδενικό τους φορτίο ενώ η πρωτονιομένη εμφανίζεται με φορτίο + 1 (Εικόνα 3.1). Για την επίτευξη της κατάστασης διπολικού ιόντος των αμινοξέων το pH όλων των διαλυμάτων τους καθορίστηκε στη τιμή 6.0, ενώ για την

επίτευξη της πρωτονιομένης τους μορφής το pH των υδατικών τους διαλυμάτων ρυθμίστηκε περίπου στην τιμή 0.5. Οι τιμές του pH ορίστηκαν σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες που αναφέρουν παρόμοιες μελέτες.[38]

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1) αναφέρονται οι μετρήσεις των χρόνων αποκατάστασης T_1 για δώδεκα αμινοξέα που μελετήθηκαν σε υδατικά διαλύματα σε pH = 6.0 και pH = 0.5, καθώς και το μοριακό τους βάρος στην κατάσταση διπολικού ιόντος.

Παρατηρώντας τους χρόνους αποκατάστασης των αμινοξέων διαπιστώνεται ότι η αύξηση του μοριακού τους βάρους επιφέρει ελάττωση του μετρούμενου χρόνου αποκατάστασης εντός κάθε περιοχής pH, ενώ για την ίδια τιμή μοριακού βάρους ο χρόνος σε όξινο pH είναι πάντα μικρότερος του αντίστοιχου σε ουδέτερο pH.



Εικόνα 3.1 Η διπολικού ιόντος (επάνω) και πρωτονιομένη (κάτω) κατάσταση των αμινοξέων με τα αντίστοιχα φορτία τους.

Οι διαφορές που παρατηρούνται με την αύξηση του μοριακού βάρους των αμινοξέων είναι εύλογες, αφού από τις εξισώσεις (3.2) και (3.5) διαφαίνεται η εξάρτηση του χρόνου T_1 με το μοριακό βάρος της κάθε ένωσης. Παράλληλα, σύμφωνα με την εξίσωση (3.2), ο χρόνος αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_\alpha$ εξαρτάται σημαντικά από την απόσταση ($\boldsymbol{r_{C\text{-}H}}$) του δεσμού μεταξύ αυτού και του συνδεδεμένου πυρήνα υδρογόνου (το δίπολο C_α-H). Κρυσταλλογραφικές έρευνες σε τρία αμινοξέα (L-γλουταμικό οξύ, L-αλανίνη και L-σερίνη) αναφέρουν ότι η απόσταση του δεσμού παραμένει σχεδόν σταθερή και ίση με 1.1 Å.[127] Δημιουργείται λοιπόν το ερώτημα αν οι αποστάσεις των C_α-H παραμένουν σταθερές ή στατιστικά αμελητέες, στην διπολικού ιόντος και πρωτονιομένη μορφή των

αμινοξέων, ή αλλοιώνονται σημαντικά από τη μία κατάσταση στην άλλη, γι' αυτό και οι παρατηρούμενες διαφορές που περιγράφονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_\alpha$ των αμινοξέων σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων (± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.

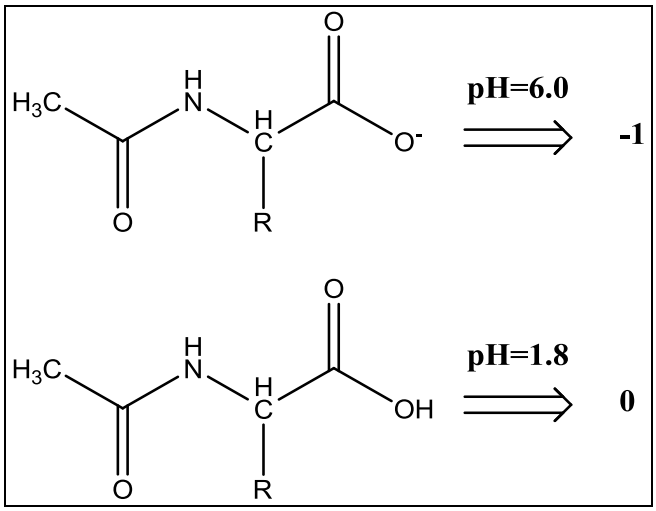
L-Αμινοξέα	Mw[α]	pH = 0.5	pH = 6.0
		T_1 (sec)	T_1 (sec)
Γλυκίνη	75.07	2.41 ± 0.06	4.18 ± 0.06
Αλανίνη	89.10	3.16 ± 0.06	4.56 ± 0.05
Σερίνη	105.09	2.46 ± 0.07	3.34 ± 0.05
Βαλίνη	117.15	2.19 ± 0.05	2.65 ± 0.05
Ισολευκίνη	131.18	1.84 ± 0.06	2.16 ± 0.06
Ασπαρτικό οξύ	133.11	1.74 ± 0.07	2.53 ± 0.06
Λυσίνη	146.19	1.78 ± 0.16	2.36 ± 0.19
Ιστιδίνη	154.11	1.52 ± 0.06	1.76 ± 0.07
Φαινυλαλανίνη	165.19	1.51 ± 0.06	1.71 ± 0.06
Αργινίνη	174.20	1.28 ± 0.05	1.52 ± 0.05
Τυροσίνη	181.19	1.12 ± 0.05	1.22 ± 0.03
Θρυπτοφάνη	203.23	1.08 ± 0.06	1.22 ± 0.05

[α] Το μοριακό βάρος (*Mw*) αντιστοιχεί στο πραγματικό μοριακό βάρος της διπολικού ιόντος κατάστασης των αμινοξέων.

3.1.1.2 Ακετυλο-αμινοξέα

Παράγωγα των αμινοξέων αποτελούν τα N-ακετυλο-L-αμινοξέα. Αντίθετα με τα αμινοξέα, τα ακετυλο-αμινοξέα σε υδατικά διαλύματα με pH = 6.0 εμφανίζουν αρνητικό φορτίο - 1, ενώ σε όξινο pH (στην πρωτονιομένη τους κατάσταση) το φορτίο τους είναι μηδενικό (Εικόνα 3.2).

Επιπλέον η δομή των ακετυλο-αμινοξέων στην περιοχή της αμινομάδας τους, προσομοιάζει τη δομή του πεπτιδικού δεσμού και σε συνδυασμό με τη μέχρι σήμερα σχεδόν ανύπαρκτη βιβλιογραφία για τη συμπεριφορά τους σε υδατικά περιβάλλοντα, αυξάνουν την ανάγκη για την κατανόηση και διαλεύκανση της ενυδάτωσής τους.



Εικόνα 3.2 Η ουδέτερου pH (πάνω) και πρωτονιομένη (κάτω) κατάσταση των ακετυλο-αμινοξέων με τα αντίστοιχα φορτία τους.

Παρόμοια με τα αμινοξέα, μετρήθηκαν οι χρόνοι αποκατάστασης (T_1) των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των ακετυλο-αμινοξέων στις δύο προαναφερθείσες (βλέπε πειραματικό μέρος) τιμές pH, 6.0 και 1.8. Για την επίτευξη πρωτονίωσης των ακετυλο-αμινοξέων, το pH των υδατικών διαλυμάτων προσαρμόστηκε στην τιμή 1.8, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές σταθεράς διάστασης (pK_a), που αναφέρονται για ορισμένα ακετυλο-αμινοξέα στη διεθνή βιβλιογραφία,[128, 129] που κυμαίνονται μεταξύ 2.3 και 2.6 (Παράρτημα ΙΙ). Οι τιμές των χρόνων αποκατάστασης που μετρήθηκαν για οκτώ ακετυλο-αμινοξέα αναφέρονται στον Πίνακα 3.2.

Παράλληλα με τα αμινοξέα και τα Ν-ακέτυλο παράγωγά τους εμφανίζουν διαφορετικούς χρόνους αποκατάστασης (T_1) των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ μεταξύ των δύο ιοντικών καταστάσεών τους και ελαττώνονται με την αύξηση του μοριακού τους βάρους.

Συγκρίνοντας τη δομή των αμινοξέων και των ακετυλο-αμινοξέων, κατανοούμε ότι η αμινομάδα των ακετυλο-αμινοξέων χάνει την δυνατότητα αλληλεπίδρασης μέσω δεσμών υδρογόνου με 2 τουλάχιστον μόρια νερού σε σχέση με τα αμινοξέα. Είναι εύλογο λοιπόν το ερώτημα: οι παρατηρούμενες διαφορές των χρόνων αποκατάστασης (T_1) των ακετυλο-αμινοξέων αν συγκριθούν με αυτούς των αμινοξέων δείχνουν ανάλογη μείωση της ενυδάτωσης;

Πίνακας 3.2 Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των ακετυλο-αμινοξέων σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων (± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.

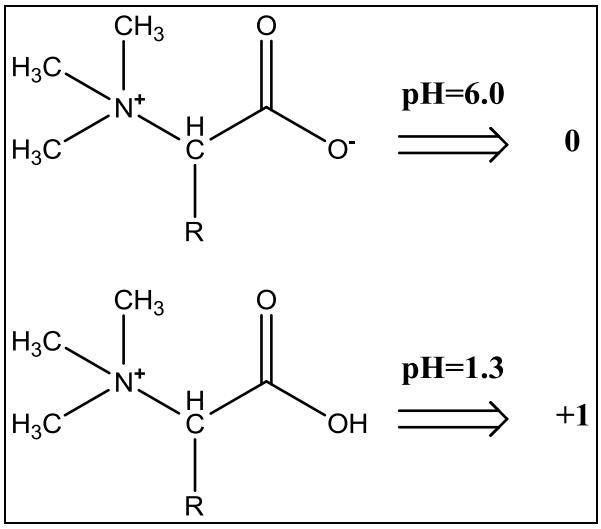
N-Ακετυλο-L-Αμινοξέα	Mw[α]	pH = 1.8	pH = 6.0
		T_1 (sec)	T_1 (sec)
Γλυκίνη	117.10	1.38 ± 0.11	1.48 ± 0.12
Αλανίνη	130.13	2.04 ± 0.06	2.45 ± 0.06
Βαλίνη	159.18	1.45 ± 0.06	1.60 ± 0.05
Λευκίνη	173.21	1.26 ± 0.06	1.34 ± 0.06
Ασπαρτικό οξύ	175.14	1.21 ± 0.07	1.43 ± 0.06
Γλουταμικό οξύ	189.17	1.28 ± 0.07	1.47 ± 0.05
Μεθειονίνη	191.25	1.19 ± 0.06	1.32 ± 0.06
Φαινυλαλανίνη	207.23	1.11 ± 0.06	1.23 ± 0.05

[α] Το μοριακό βάρος (*Mw*) αντιστοιχεί στο πραγματικό μοριακό βάρος της ουδέτερου pH κατάστασης των ακετυλο-αμινοξέων.

3.1.1.3 Βεταΐνες

Τα τριμεθυλο-άμινο υποκατεστημένα L-αμινοξέα [$-N^+(CH_3)_3$], οι αποκαλούμενες βεταΐνες, αποτελούν ένα επιπλέον παράγωγο των αμινοξέων. Ο βαθμός ενυδάτωσής τους καθώς και η λειτουργία τους στα κύτταρα αποτελούν ένα μυστήριο και κάποιες από τις πιθανές λειτουργίες τους έχουν προαναφερθεί.

Όσον αφορά τη μελέτη ενυδάτωσής τους, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μεθοδολογία με αυτή των ακετυλο-αμινοξέων και των αμινοξέων. Όπως και στην περίπτωση των αμινοξέων, οι βεταΐνες σε υδατικά διαλύματα με pH = 6.0 εμφανίζουν μηδενικό φορτίο ενώ στην πρωτονιομένη τους κατάσταση με φορτίο + 1, εξαιτίας του θετικά φορτισμένου τεταρτοταγούς αζώτου (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Η διπολικού ιόντος και πρωτονιομένη κατάσταση των βεταϊνών με τα αντίστοιχα φορτία τους.

Λίγες βιβλιογραφικές αναφορές υπάρχουν για την τιμή της σταθεράς διάστασης (pK_a) των βεταϊνών. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται πως για την βεταΐνη της γλυκίνης η τιμή pK_a ισούται με 1.83.[130] Οι Sharon Bonkoski και J. H. Perrin,[131] υπολόγισαν τις σταθερές διάστασης από κάποια άλατα βεταϊνών και κατέληξαν στην τιμή pK_a = 1.75 στους 25 ^oC. Στην παρούσα μελέτη, για την επίτευξη πρωτονίωσης των βεταϊνών, το pH των υδατικών διαλυμάτων τους ρυθμίστηκε στην τιμή 1.3 (Παράρτημα ΙΙ).

Η μελέτη ενυδάτωσης των βεταϊνών στις δύο ιονισμένες καταστάσεις τους δεν αποσκοπεί μόνο στη διερεύνηση του βαθμού ενυδάτωσής τους, αλλά και στην κατανόηση του βαθμού ενυδάτωσης των αμινομάδων και καρβοξυλομάδων των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων στις δύο καταστάσεις τους αντίστοιχα. Επιπλέον, αναμένεται να αποδειχθεί και ο ρόλος της αμινομάδας και καρβοξυλομάδας των αμινοξέων και ακέτυλο παραγώγων τους, στον τρόπο ενυδάτωσης που υφίστανται στην ουδέτερου pH και πρωτονιομένη τους κατάσταση.

Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3) περιγράφονται οι χρόνοι αποκατάστασης (T_1) των $^{13}C_\alpha$ έξι βεταϊνών που μελετήθηκαν. Η προβλεπόμενη διαφορά των χρόνων αποκατάστασης των βεταϊνών με την αύξηση των μοριακών τους βαρών παρατηρείται επίσης και σε αυτή την περίπτωση. Σε αντίθεση όμως, με τους χρόνους των αμινοξέων και των ακετυλο-αμινοξέων, οι μετρούμενοι χρόνοι των βεταϊνών δεν εμφανίζουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ της διπολικού ιόντος και πρωτονιομένης κατάστασής τους. Η συγκεκριμένη πληροφορία ήταν πολύ σημαντική, γεγονός που θα αποκαλυφθεί παρακάτω.

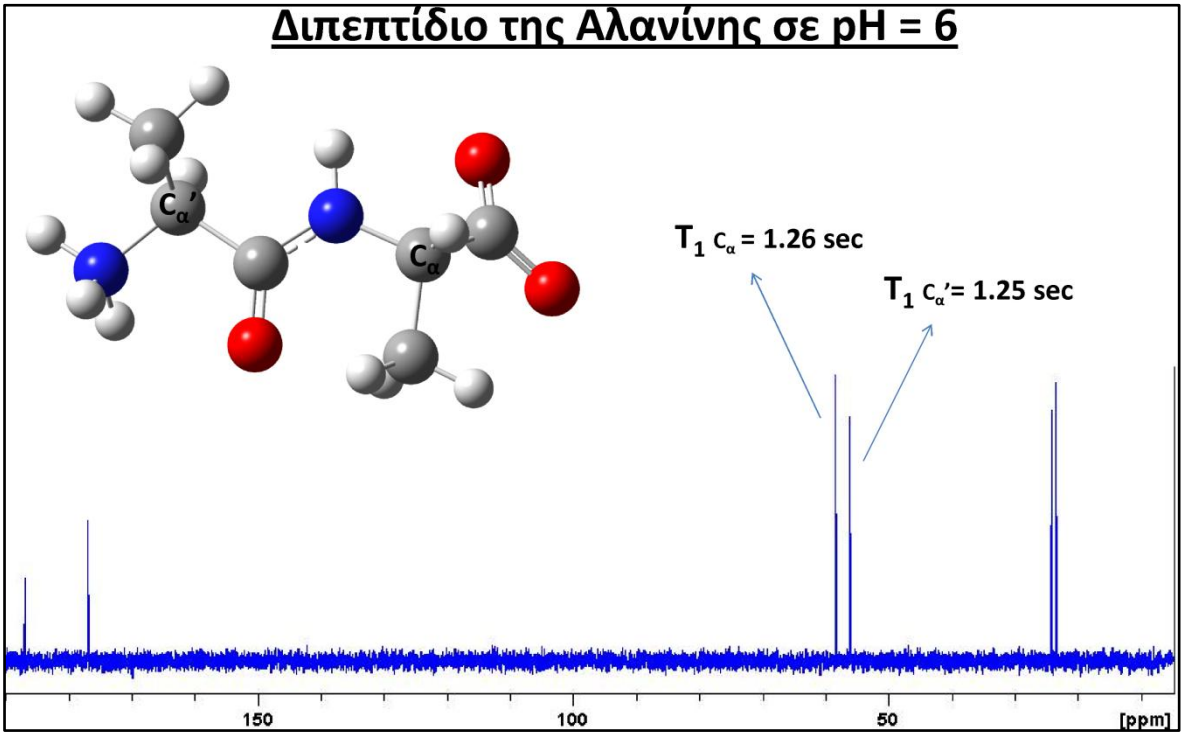
Πίνακας 3.3 Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_\alpha$ των βεταϊνών σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων (± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος N = 20 μετρήσεων), σε θερμοκρασία T = 298 K.

Βεταΐνες	Mw[α]	pH = 1.3	pH = 6.0
		T_1 (sec)	T_1 (sec)
Γλυκίνης	117.15	2.13 ± 0.06	2.38 ± 0.06
Αλανίνης	131.18	4.22 ± 0.06	3.73 ± 0.05
Βαλίνης	159.23	2.21 ± 0.06	2.21 ± 0.06
Θρεονίνης	161.21	1.99 ± 0.06	2.07 ± 0.06
Λευκίνης	173.26	1.72 ± 0.07	1.81 ± 0.06
Φαινυλαλανίνης	207.28	1.34 ± 0.05	1.37 ± 0.06

[α] Το μοριακό βάρος (*Mw*) αντιστοιχεί στο πραγματικό μοριακό βάρος της διπολικού ιόντος κατάστασης των βεταϊνών.

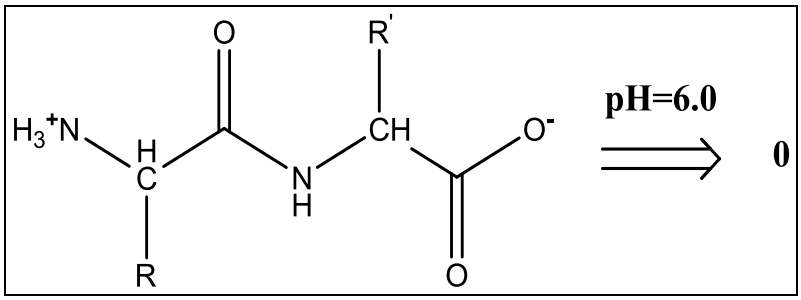
3.1.1.4 Διπεπτίδια

Είναι γνωστό, ότι τα NMR σήματα των πυρήνων $^{13}C_\alpha$ στα ολιγοπεπτίδια δεν συντονίζονται στην ίδια συχνότητα, με αποτέλεσμα την μη αλληλοεπικάλυψή τους (Εικόνα 3.4). Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια, τη δυνατότητα μέτρησης των χρόνων αποκατάστασης T_1 των επιμέρους αμινοξέων που τα απαρτίζουν, με τον ίδιο τρόπο όπως στα αμινοξέα και τα παράγωγά τους. Έτσι δίνεται η δυνατότητα, μελέτης της ενυδάτωσης και ολιγοπεπτιδίων, η οποία πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τα διπεπτίδια.



Εικόνα 3.4 Το φάσμα NMR-^{13}C (400 MHz) του διπεπτιδίου της αλανίνης σε υδατικό διάλυμα, pH = 6.0 (κατάσταση διπολικού ιόντος) και T = 298 K και οι αντίστοιχοι χρόνοι αποκατάστασης που μετρήθηκαν για τους α-άνθρακες του διπεπτιδίου. Είναι εμφανές ότι οι κορυφές των χημικών μετατοπίσεων των α-ανθράκων δεν αλληλεπικαλύπτονται, με αποτέλεσμα την εύκολη μελέτη της διπολικής αποκατάστασής τους.

Οι μετρήσεις των χρόνων αποκατάστασης T_1 πραγματοποιήθηκαν για 14 διαφορετικά διπεπτίδια (Πίνακας 3.4) στη κατάσταση διπολικού ιόντος (pH = 6.0, μηδενικό φορτίο, Εικόνα 3.5). Όπως διαφαίνεται, οι χρόνοι T_1 συμπεριφέρονται όπως ακριβώς και στην αποκατάσταση των $^{13}C_\alpha$ στα αμινοξέα και στα παράγωγά τους. Δηλαδή, παρατηρείται ελάττωσή τους καθώς το μέγεθος των διπεπτιδίων αυξάνει.



Εικόνα 3.5 Η διπολικού ιόντος κατάσταση των διπεπτιδίων (μηδενικό συνολικό φορτίο).

Παράλληλα, οι χρόνοι που αντιστοιχούν στους δύο πυρήνες $^{13}C_\alpha$ κάθε διπεπτιδίου, είναι σχεδόν πάντα ίσοι, με μικρές διαφορές, που οφείλονται στη μικρή ανισοτροπία του

μορίου. Εφόσον οι χρόνοι αποκατάστασης των δύο $^{13}C_{\alpha}$ των υπό μελέτη διπεπτιδίων είναι παραπλήσιοι και πολλές φορές ίσοι, ανεξαρτήτως της σειράς των αμινοξέων, σημαίνει ότι η κίνηση των διπεπτιδίων μπορεί να θεωρηθεί ισότροπη και άρα οι χρόνοι αποκατάστασης μπορούν να εξάγουν ασφαλή συμπεράσματα για την επιδιαλύτωσή τους.

Πίνακας 3.4 Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των διπεπτιδίων σε υδατικά διαλύματα με pH = 6.0 (± η τυπική απόκλιση, σε πλήθος $N = 20$ μετρήσεων), σε θερμοκρασία $T = 298$ K.

Διπεπτίδια (-NH_2 → -COOH)	Mw[α]	pH = 6.0	
		T_1[β] (sec)	
Αλανίνη-Γλυκίνη	146.14	1.66 ± 0.07	0.82 ± 0.07
Γλυκίνη-Αλανίνη	146.14	0.80 ± 0.07	1.61 ± 0.06
Αλανίνη-Αλανίνη	160.17	1.26 ± 0.06	1.26 ± 0.06
Γλυκίνη-Σερίνη	162.14	0.71 ± 0.06	1.40 ± 0.04
Γλυκίνη-Λευκίνη	188.23	0.56 ± 0.06	1.09 ± 0.04
Βαλίνη-Σερίνη	204.20	1.13 ± 0.04	1.06 ± 0.03
Βαλίνη-Θρεονίνη	218.30	0.96 ± 0.06	0.85 ± 0.06
Θρεονίνη-Λευκίνη	232.30	0.85 ± 0.04	0.78 ± 0.06
Αλανίνη-Φαινυλαλανίνη	236.30	0.86 ± 0.06	0.86 ± 0.05
Φαινυλαλανίνη-Αλανίνη	236.30	0.92 ± 0.06	0.91 ± 0.05
Βαλίνη-Μεθειονίνη	248.30	0.78 ± 0.05	0.85 ± 0.06
Τυροσίνη-Αλανίνη	252.30	0.84 ± 0.05	0.83 ± 0.05
Μεθειονίνη-Λευκίνη	262.40	0.74 ± 0.05	0.76 ± 0.05
Φαινυλαλανίνη-Βαλίνη	264.30	0.77 ± 0.07	0.69 ± 0.07

[α] Το μοριακό βάρος (*Mw*) αντιστοιχεί στο πραγματικό μοριακό βάρος της διπολικής κατάστασης των διπεπτιδίων.
[β] Οι χρόνοι T_1 αντιστοιχούν στον $^{13}C_{\alpha}$ κάθε αμινοξέος του διπεπτιδίου με την σειρά που εμφανίζονται.

3.1.2 Αποτελέσματα Μετρήσεων NMR-^{14}N

Σε διαμαγνητικά διαλύματα οι πυρήνες ^{14}N (I = 1) αποκαθίστανται μέσω της τετραπολικής αποκατάστασης. Στην κατάσταση ακραίας κινητικής στένωσης (motional narrowing), η οποία αναμένεται να ισχύει στα υδατικά διαλύματα των υπό μελέτη ενώσεων, ισχύει:[63]

$$\omega_0 \tau_c \ll 1$$

Στην περίπτωση ισοτροπικών διαλυμάτων, οι χρόνοι αποκατάστασης T_{1Q} (spin-πλέγματος) και T_{2Q} (spin-spin) του πυρήνα ^{14}N περιγράφονται από τον τύπο:[63]

$$\frac{1}{T_{1Q}} = \frac{1}{T_{2Q}} = \frac{3\pi^2}{10}\frac{(2I+3)}{I^2(2I-1)}x^2\left(1+\frac{\varepsilon^2}{3}\right)\tau_c\ , \qquad (3.7)$$

όπου I είναι ο αριθμός spin (I = 1 για τον πυρήνα ^{14}N), ω_0 η συχνότητα μεταπτωτικής κίνησης (συχνότητα Larmor), τ_c ο χρόνος συσχέτισης, που περιγράφει τον χρόνο επαναπροσανατολισμού του υπό μελέτη μορίου στην περιοχή της αμινομάδας, ε παράγοντας ασυμμετρίας[7] και χ η σταθερά πυρηνικής τετραπολικής σύζευξης (Παράρτημα Ι).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι στις παραπάνω συνθήκες ισχύει και η σχέση (2.3) τότε προκύπτει η σχέση:

$$\pi\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{T_{1Q}} = \frac{1}{T_{2Q}} = \frac{3\pi^2}{10}\frac{(2I+3)}{I^2(2I-1)}x^2\left(1+\frac{\varepsilon^2}{3}\right)\tau_c \qquad (3.8)$$

Η σχέση (3.8), πάντα σε συνθήκες ισοτροπικών διαλυμάτων, σε συνδυασμό με την σχέση (3.5), με την προϋπόθεση ότι η σταθερά χ παραμένει αμετάβλητη για κάθε υπό μελέτη μόριο, αποδεικνύει ότι η NMR φασματική γραμμή των πυρήνων ^{14}N προσφέρει δυναμικές πληροφορίες (αντίστοιχες με την διπολική αποκατάσταση του ^{13}C) για την άμεση συσχέτιση της τετραπολικής αποκατάστασης του ^{14}N με την επιδιαλύτωση των βιομορίων που μελετούνται.

[7] Γενικά αλλαγές των τιμών του παράγοντα ασυμμετρίας ε θεωρούνται αμελητέες, αφού η συνεισφορά τους στην μέτρηση του χρόνου αποκατάστασης είναι μικρότερη από 15 %, εκτός από ορισμένες περιπτώσεις όπου η τιμή τους είναι $\varepsilon > 0.7$

Όσον αφορά την τετραπολική αποκατάσταση του πυρήνα ^{14}N των αμινομάδων στα ακετυλο-αμινοξέα και τις βεταΐνες, είναι προφανές ότι δε μπορεί να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο αυτών ομάδων, όπως η ομαδοποίηση που μπορεί να πραγματοποιηθεί για τα αποτελέσματα της αποκατάστασης του $^{13}C_{\alpha}$, για όλες τις ομάδες βιομορίων που μελετήθηκαν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο πυρήνας ^{14}N της αμινομάδας των ακετυλο-αμινοξέων (υποκατάσταση ενός πρωτονίου της αμινομάδας των αμινοξέων με μια ακέτυλο ομάδα) έχει εντελώς διαφορετική συμμετρία της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας σε σχέση με τις βεταΐνες (προσθήκη τριών μεθυλίων αντί των πρωτονίων της αμινομάδας των αμινοξέων). Γι' αυτό το λόγο, η τετραπολική αποκατάσταση του πυρήνα ^{14}N των βεταϊνών είναι πολύ πιο αργή σε σχέση με τα ακετυλο-αμινοξέα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πολύ λεπτών φασματικών κορυφών ^{14}N στην περίπτωση των βεταϊνών (Εικόνα 3.6, Παράρτημα Ι).

3.1.2.1 Ακετυλο-Αμινοξέα

Στον Πίνακα 3.5 αναφέρονται οι μετρήσεις του εύρους στο μισό του ύψους των NMR κορυφών των πυρήνων ^{14}N της αμινομάδας των ακετυλο-αμινοξέων. Όπως αναφέρθηκε και στις μετρήσεις NMR-^{13}C, τα πειράματα εκτελέστηκαν σε υδατικά διαλύματα δύο τιμών pH, 6.0 και 1.8.

Παρατηρώντας τη διακύμανση των μετρούμενων τιμών, διαφαίνονται οι αλλαγές του εύρους στο μισό του ύψους των κορυφών ($\Delta\nu_{1/2}$) των πυρήνων ^{14}N καθώς το μοριακό βάρος αυξάνεται. Πράγματι, βάσει των σχέσεων (3.8) και (3.5), οι παραπάνω αλλαγές είναι εύλογες. Παράλληλα, διαφορές παρατηρούνται και στις μετρήσεις μεταξύ των δύο ιοντικών καταστάσεων που υφίστανται τα ακετυλο-αμινοξέα. Συγκεκριμένα, για κάθε αμινοξύ παρατηρείται αύξηση του εύρους στο όξινο pH σε σύγκριση με το ουδέτερο.

Εύστοχα, μια γρήγορη αλλά συνάμα επιπόλαιη ανάλυση των παρατηρούμενων διαφορών μεταξύ ουδέτερου και όξινου pH των υδατικών διαλυμάτων των ακετυλο-αμινοξέων, θα μετέφραζε αυτή την αλλαγή σε διαφορά βαθμού ενυδάτωσής των, παρακινούμενη ίσως από την περίπτωση των χρόνων αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$. Όμως, η τετραπολική αποκατάσταση του ^{14}N καθώς και η θέση της αμινομάδας στο μόριο των ακετυλο-αμινοξέων εμπεριέχουν πολλούς παράγοντες, που θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω, που συνεισφέρουν στις παρατηρούμενες διαφορές των τιμών $\Delta\nu_{1/2}$ στα

δύο διαφορετικά pH σε αντίθεση με τους πυρήνες $^{13}C_{\alpha}$, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η παρουσία διαφοράς ενυδάτωσης.

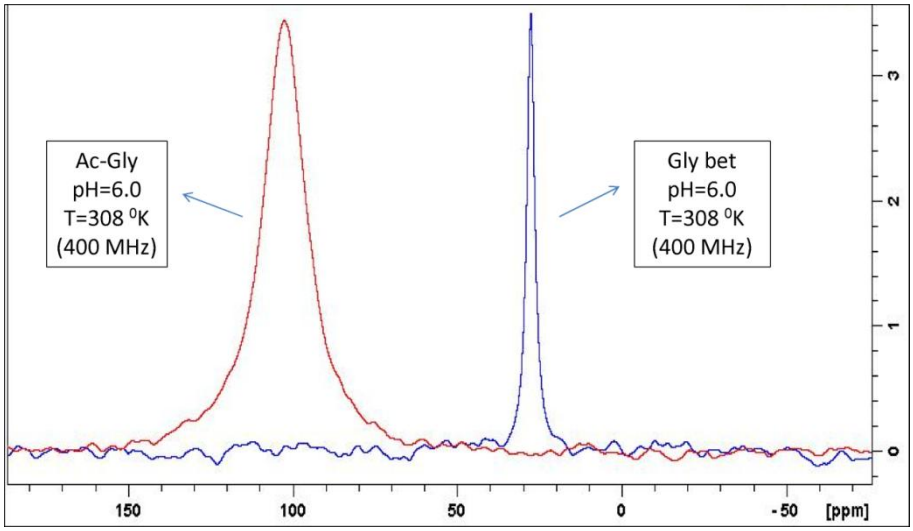
Πίνακας 3.5 Το εύρος στο μισό του ύψους ($\Delta\nu_{1/2}$) των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των ακετυλο-αμινοξέων σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων, σε θερμοκρασία T = 308 K.

N-Ακέτυλο-L-Αμινοξέα	Mw[α]	pH = 1.8	pH = 6.0
		$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz[β])	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz[β])
Γλυκίνη	117.10	854	710
Αλανίνη	130.13	1041	826
Βαλίνη	159.18	1059	1020
Λευκίνη	173.21	1611	1398
Ασπαρτικό οξύ	175.14	1668	1330
Γλουταμικό οξύ	189.17	1633	1343
Μεθειονίνη	191.25	1676	1342
Φαινυλαλανίνη	207.23	1804	1495

[α] Το μοριακό βάρος (*Mw*) αντιστοιχεί στο πραγματικό μοριακό βάρος των ακετυλο-αμινοξέων σε pH = 6.0.
[β] Το σφάλμα των μετρήσεων του εύρους στο μισό του ύψους των κορυφών NMR-^{14}N υπολογίζεται < ±5 %.

3.1.2.2 Βεταΐνες

Η ταχύτητα της τετραπολικής αποκατάστασης του ^{14}N της αμινομάδας των βεταϊνών, όπως ειπώθηκε παραπάνω, είναι πολύ αργή και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση στένωσης των φασματικών NMR-^{14}N σημάτων (Εικόνα 3.6). Αυτό το γεγονός εξυπηρετεί στην πιο γρήγορη λήψη των NMR-^{14}N φασμάτων καθώς επίσης και στην ακριβέστερη μέτρηση των τιμών $\Delta\nu_{1/2}$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μετρήσεις των ακετυλο-αμινοξέων και αμινοξέων.[38]



Εικόνα 3.6 Τα φάσματα των πυρήνων ^{14}N της αμινομάδας της ακετυλο-γλυκίνης και βεταΐνης της γλυκίνης σε υδατικό διάλυμα με pH = 6.0 (400 MHz). Διακρίνεται η τεράστια διαφορά του εύρους στο μισό του ύψους των κορυφών μεταξύ των δύο μορίων και αναδεικνύεται η σημαντικότητα της συμμετρίας γύρω από τους τετραπολικούς πυρήνες ^{14}N, όσον αφορά την αποκατάστασή τους (Παράρτημα Ι).

Στα πειράματα NMR-^{13}C που διεξήχθησαν για την πρωτονιομένη κατάσταση των βεταϊνών αναφέρθηκε πως το pH των υδατικών τους διαλυμάτων ρυθμίστηκε στη τιμή 1.3.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων NMR-^{14}N για 18 διαφορετικές τιμές pH (τιτλοδότηση) του υδατικού διαλύματος της μόνης εμπορικά διαθέσιμης βεταΐνης, της γλυκίνης και μετρήθηκαν οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (Πίνακας 3.6) του ^{14}N, με σκοπό την μελέτη της συμπεριφορά τους στις διαφορετικές τιμές pH και την σύγκρισή τους με την τιτλοδότηση που πραγματοποιήθηκε στην αντίστοιχη μελέτη ενυδάτωσης των αμινοξέων.[38]

Όπως διαφαίνεται στον Πίνακα 3.6, οι τιμές παραμένουν σχεδόν αναλλοίωτες σε όλο το εύρος τιμών pH. Παράλληλα οι μετρήσεις των αντίστοιχων τιμών $\Delta\nu_{1/2}$ του ^{14}N της αμινομάδας των υπολοίπων βεταϊνών (Πίνακας 3.7), μένουν σχεδόν ανέπαφες στην μορφή διπολικού ιόντος καθώς και στην πρωτονιομένη κατάστασή τους, ενώ μεταβάλλονται με την αύξηση του μοριακού βάρους.

Πίνακας 3.6. Τιτλοδότηση της βεταΐνης της γλυκίνης στους 308 K.

pH	**$\Delta\nu_{1/2}$[α]**
1.35	41.4
1.54	41.1
1.70	41.1
2.08	40.3
2.17	40.9
2.40	40.5
2.60	40.6
3.00	40.1
3.46	40.3
3.88	40.1
4.36	40.2
4.70	40.0
5.30	40.1
6.10	41.3
6.80	40.6
7.65	40.8
9.20	40.4
10.00	40.5

[α] Το σφάλμα των μετρήσεων του εύρους στο μισό του ύψους ($\Delta\nu_{1/2}$) των κορυφών NMR-^{14}N υπολογίζεται < ±5 %.

Πίνακας 3.7 Το εύρος στο μισό του ύψους ($\Delta\nu_{1/2}$) των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των βεταϊνών σε δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων, σε θερμοκρασία T = 308 K.

Βεταΐνες	Mw[α]	pH = 1.3	pH = 6.0
		$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz[β])	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz[β])
Γλυκίνης	117.15	41.1	41.3
Αλανίνης	131.18	65.7	63.4
Βαλίνης	159.23	64.5	65.0
Θρεονίνης	161.21	72.4	71.8
Λευκίνης	173.26	65.6	65.2
Φαινυλαλανίνης	207.28	84.0	82.0

[α] Το μοριακό βάρος (*Mw*) αντιστοιχεί στο πραγματικό μοριακό βάρος της διπολικού ιόντος κατάστασης των βεταϊνών.
[β] Το σφάλμα των μετρήσεων του πλάτους της μέσης του ύψους των κορυφών NMR-^{14}N υπολογίζεται < ±5 %.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται να επιβεβαιώσουν δύο συνθήκες. Πρώτον, στη τιμή pH = 1.3 των υδατικών διαλυμάτων των βεταϊνών οι χρόνοι αποκατάστασης των ^{14}N των βεταϊνών μένουν ανέπαφοι ανεξάρτητα με την ιονισμένη κατάστασή τους, σε αντίθεση με τα αμινοξέα στα οποία παρατηρείται μία αύξηση των τιμών του εύρους των κορυφών ^{14}N στις πολύ χαμηλές τιμές pH(< 2.0).[38] Δεύτερον, οι παραπάνω μετρήσεις έρχονται να συμπληρώσουν - επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα των χρόνων αποκατάστασης T_1 για τους πυρήνες $^{13}C_\alpha$ των βεταϊνών, τα οποία δεν δείχνουν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δύο τιμών pH, άρα ασήμαντες μεταβολές και στο Mw_{eff} των διπολικού ιόντος και πρωτονιομένων μορφών τους.

3.1.3 Επεξεργασία – Ανάλυση αποτελεσμάτων NMR-$^{13}C_\alpha$ και NMR-^{14}N

3.1.3.1 NMR-$^{13}C_\alpha$

3.1.3.1.1 Αμινοξέα

Η σχέση (3.2) περιγράφει τον χρόνο αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_\alpha$ των μορίων που μελετώνται. Επειδή το γινόμενο $(\omega_H + \omega_C)\tau_R$ είναι μικρότερο τις τιμής 0.2, η σχέση (3.2) μπορεί να αναλυθεί μέσω του αναπτύγματος σειράς Maclaurin και να μετατραπεί σε:

$$\frac{1}{NT_1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2\gamma_C^2\gamma_H^2}{10r_{C-H}^6} \sum_{n=0}^{\infty}(-1)^n[(\omega_H - \omega_C)^n + 3\omega_C^n + 6(\omega_H + \omega_C)^n]\,\tau_R^{2n+1} \qquad (3.9)$$

Σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες[31, 32, 38] αποδείχθηκε πως το ιξώδες των διαλυμάτων των αμινοξέων συγκέντρωσης 0.1 M είναι ανεξάρτητο από την φύση των αμινοξέων και της οποιαδήποτε ιονισμένης κατάστασής τους. Επιπλέον, ο παράγοντας μικροϊξώδους βρέθηκε να εξαρτάται από την φύση των αμινοξέων αλλά να μένει ανεπηρέαστος από την ιονισμένη κατάστασή τους. Οι Tritt-Goc και Fiat[32] μέτρησαν τον παράγοντα μικροϊξώδους για τρία αμινοξέα και κατάληξαν σε τιμές ίσες με 0.95 ± 0.05, θεωρώντας, όμως, την ενυδάτωσή τους μηδενική. Υποθέτοντας ένα βαθμό ενυδάτωσης ίσο με τρία ή τέσσερα μόρια νερού, οι τιμές του παράγοντα μικροϊξώδους των αμινοξέων ήταν 0.83 ± 0.06 και 0.81 ± 0.06, αντίστοιχα. Σε οποιαδήποτε περίπτωση, το σφάλμα στην μέτρηση των χρόνων τ_R μέσω της σχέσης (3.5) είναι μικρότερο του 6 %, και μικρότερο

από 4 % στον υπολογισμό των χρόνων T_1. Επομένως αν η σχέση (3.5) συμπεριληφθεί στην σχέση (3.9) τότε παράγεται η παρακάτω εξίσωση που αποκαλύπτει, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, την εξάρτηση του χρόνου T_1 με το Mw_{eff} του αντίστοιχου υπό μελέτη μορίου και τα αποτελέσματα των χρόνων αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ όλων των μελετώμενων μορίων μπορούν να περιγραφούν από αυτή:

$$\frac{1}{NT_1} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2}{10 r_{C-H}^6} \sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n [(\omega_H - \omega_C)^n + 3\omega_C^n + 6(\omega_H + \omega_C)^n] \left(\frac{0.74 Mw_{eff} \eta f_r}{kTN_A \rho}\right)^{2n+1} \tag{3.10}$$

Όπως έχει αποδειχθεί,[38] η 2ου βαθμού εξίσωση είναι αρκετή για να περιγράψει την εξάρτηση του αντιστρόφου των χρόνων αποκατάστασης T_1 με το μοριακό βάρος των υπό μελέτη μορίων. Έτσι η εξίσωση (3.10), απλοποιείται στην σχέση:

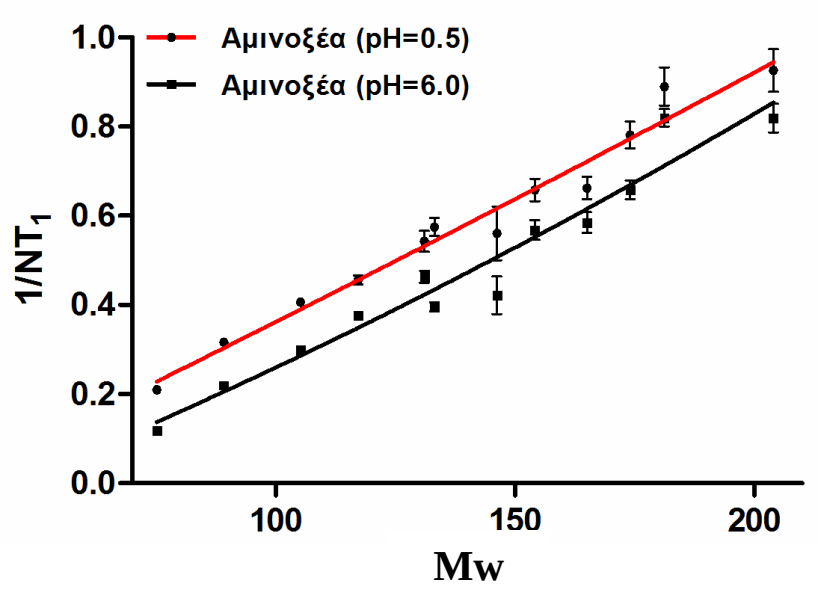
$$\frac{1}{NT_1} = \alpha_0 + \alpha_1 Mw + a_2 Mw^2 \tag{3.11}$$

και μέσω αυτής πραγματοποιήθηκε η διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης του μοριακού βάρους (*Mw*) με τον λόγο $1/NT_1$ για τις δύο ιοντικές καταστάσεις των αμινοξέων και παραγώγων τους.

Στην περίπτωση των αμινοξέων, στην Εικόνα 3.7 απεικονίζονται οι δύο εξισώσεις (Πίνακας 3.8) των παραγόμενων καμπυλών που περιγράφουν, ουσιαστικά, τον βαθμό ενυδάτωσής τους στη διπολικού ιόντος και πρωτονιομένη τους κατάσταση.

Πίνακας 3.8 Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στα αμινοξέα για δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.

	ΑΜΙΝΟΞΕΑ		
	pH	0.5	6.0
$^{13}C_{\alpha}$	α_0	-0.1689 ± 0.1520	-0.1851 ± 0.2006
	α_1	0.0052 ± 0.0023	0.0038 ± 0.0030
	α_2	1.419e-006 ± 8.193e-006	6.198e-006 ± 1.082e-005
	R^2	0.9715	0.9511
	$S_{y,x}$	0.0408	0.0538



Εικόνα 3.7 Οι καμπύλες που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 0.5 και (■)Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (Mw).

Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) των δύο καμπυλών υποδηλώνουν ξεκάθαρα την άμεση σχέση των μοριακών βαρών (*Mw*) των αμινοξέων με τους χρόνους αποκατάστασης των τριτοταγών ανθράκων τους. Επίσης, παρατηρείται ότι ο συντελεστής α_2 τείνει στο μηδέν, γεγονός που θα επέτρεπε την υπόθεση ότι η συσχέτιση των *Mw* και $1/NT_1$ είναι γραμμική. Δηλαδή, μέσω της εξίσωσης (3.2), θα μπορούσαν να υπολογιστούν οι χρόνοι τ_R και να καταλήξουμε στην σχέση:

$$\tau_R = \alpha_0 + \alpha_1 Mw_{eff} \tag{3.12}$$

Όμως, σύμφωνα με την σχέση (3.5), πρέπει να ικανοποιείται η συνθήκη που αναφέρει ότι όταν το *Mw* τείνει στο μηδέν τότε και ο χρόνος τ_R πρέπει να μηδενίζεται. Δηλαδή στην εξίσωση (3.12) ο σταθερός όρος α_0 πρέπει να τείνει στατιστικά στο μηδέν. Εξετάζοντας στατιστικά αυτή την υπόθεση, τότε σύμφωνα με τη θεωρία θα ισχύει:

$$|0 - \alpha_0| < (var a_0)^{1/2} t_{(\beta/2, m-n)},$$

όπου var a_0 είναι η διασπορά του σταθερού όρου της εξίσωσης και $t_{(\beta/2,m-n)}$ το ποσοστό $100\beta/2$ των σημείων από μια κατανομή *t* με *m-n* βαθμούς ελευθερίας. Στην περίπτωση των αμινοξέων (καθώς και όλων των παραγώγων τους) η παραπάνω προϋπόθεση ($\alpha_0 \rightarrow 0$) δεν ικανοποιείται για την εξίσωση (3.12), ενώ για την εξίσωση (3.11) ικανοποιείται σε όλες τις

περιπτώσεις. Επομένως, η μεταχείριση των δεδομένων έπρεπε να πραγματοποιηθεί βάσει της εξίσωσης (3.11), που όπως προαναφέρθηκε για την περίπτωση των αμινοξέων (αλλά και για όλα τα παράγωγά τους) αυτή ακολουθήθηκε.

Όπως παρατηρήθηκε από τις διαφορές των τιμών των χρόνων αποκατάστασης των αμινοξέων για τις δύο ιοντικές καταστάσεις τους, οι παραγόμενες καμπύλες τους διαφέρουν (Εικόνα 3.7). Αυτή η διαφορά των καμπυλών μεταφράζεται στην αλλαγή του βαθμού ενυδάτωσης των αμινοξέων από την διπολικού ιόντος στην πρωτονιομένη τους κατάσταση, με την προϋπόθεση ότι οι τιμές των αποστάσεων των δεσμών C_α-H μένουν ανεπηρέαστες από την εκάστοτε ιοντική κατάστασή τους.

Μέσω των θεωρητικών μελετών που διενεργήθηκαν και θα αναφερθούν λεπτομερώς παρακάτω, παρατηρήθηκε μεταβολή της απόστασης του δεσμού C_α-H για την Αλανίνη και τα παράγωγά της που κυμαινόταν μεταξύ 1.088 έως 1.095 Å. Οι μεταβολές αυτής της κλίμακας αντανακλούν σε διαφορές των χρόνων T_1 μικρότερες από 0.04 s, γεγονός που συμπεριλαμβάνεται στο πειραματικό σφάλμα των μετρήσεων τους, άρα θεωρούνται αμελητέες.

Αποδεικνύοντας λοιπόν ότι οι διαφορές των καμπυλών αποδίδονται σε αλλαγή του βαθμού ενυδάτωσης των αμινοξέων (συνεπώς και των παραγώγων τους), έγινε η προσπάθεια ποσοτικοποίησης της διαφοράς ενυδάτωσης σε μόρια νερού. Έτσι, στην τιμή $1/NT_1$ ίση με 0.2 Hz η διαφορά του Mw_{eff} μεταξύ των δύο καμπυλών ήταν 15.2 ± 4.1, ενώ στις τιμές 0.5 και 0.8 Hz η διαφορά ήταν 17.8 ± 1.0 και 19.3 ± 3.2 αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τα όρια εμπιστοσύνης των δύο καμπυλών, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η διαφορά του Mw μεταξύ των διπολικών ιόντων και πρωτονιομένων αμινοξέων ισούται με 17.0 ± 3.3, η οποία μεταφράστηκε σε ένα μόριο νερού επιπλέον ενυδάτωση για την πρωτονιομένη κατάστασή τους (Εικόνα 3.10).

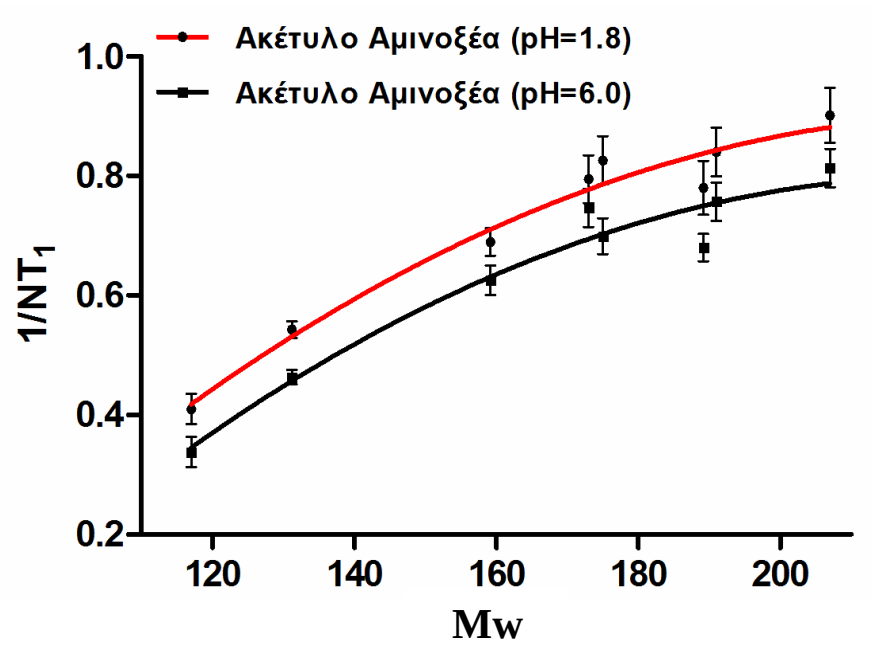
3.1.3.1.2 Ακετυλο-Αμινοξέα

Ακολουθώντας την ίδια επεξεργασία με τους χρόνους αποκατάστασης των αμινοξέων, για τους αντίστοιχους χρόνους των ακετυλο-αμινοξέων στις δύο ιοντικές καταστάσεις τους, παράχθηκαν δύο καμπύλες (Εικόνα 3.8) που περιγράφονται από τις εξισώσεις στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9 Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στα ακετυλο-αμινοξέα για δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.

	ΑΚΕΤΥΛΟ-ΑΜΙΝΟΞΕΑ		
	pH	1.8	6.0
$^{13}C_{\alpha}$	α_0	-1.1720 ± 0.4802	-0.8640 ± 0.3796
	α_1	0.0179 ± 0.0061	0.0135 ± 0.0048
	α_2	-3.828e-005 ± 1.903e-005	-2.637e-005 ± 1.505e-005
	R^2	0.9641	0.9712
	$S_{y,x}$	0.0400	0.0316

Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) των δύο καμπυλών των ακετυλο-αμινοξέων υποδηλώνουν ξεκάθαρα την άμεση σχέση των μοριακών βαρών (*Mw*) τους με τους χρόνους αποκατάστασης των τριτοταγών ανθράκων τους, όπως στην περίπτωση των αμινοξέων. Παράλληλα, εντοπίζονται διαφορές μεταξύ της καμπύλης του pH = 6.0 και αυτής του pH = 1.8, υποδηλώνοντας ότι και μεταξύ των δύο ιονισμένων καταστάσεων των ακέτυλο αμινοξέων υφίσταται διαφορετικός βαθμός ενυδάτωσης και μάλιστα υψηλότερος στην πρωτονιομένη τους κατάσταση.



Εικόνα 3.8 Οι καμπύλες που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα ακετυλο-αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 1.8 και (■)Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*).

Λόγω της διαφορετικής δομής των ακετυλο-αμινοξέων με αυτή των αμινοξέων, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η σύγκρισή τους και να εντοπιστεί, αν υπάρχει, διαφορά ενυδάτωσης μεταξύ των αντίστοιχων ιονισμένων καταστάσεων τους. Στην περίπτωση της μελέτης των χρόνων αποκατάστασης του $^{13}C_{\alpha}$ μας δίνεται η δυνατότητα της παραπάνω σύγκρισης, σε αντίθεση με την περίπτωση του ^{14}N για λόγους που προαναφέρθηκαν. Όπως θα αναμενόταν, τα ακετυλο-αμινοξέα θα έπρεπε να χαρακτηρίζονται από ένα μικρότερο βαθμό ενυδάτωσης σε σχέση με τα αμινοξέα.

Έτσι πραγματοποιήθηκε η σύγκριση μεταξύ των καμπυλών που περιγράφουν την ιονισμένη κατάσταση των αμινοξέων και των ακετυλο-αμινοξέων σε pH = 6.0 και pH = 1.8. Η στατιστική σύγκριση περαιώθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο GraphPad Prism, μέσω του *F-test* για τη ταύτιση μη γραμμικών παλινδρομήσεων. Μέσω της διαδικασίας του *F-test* ελέγχεται το αν οι εξισώσεις των δύο υπό μελέτη καμπυλών μπορούν να περιγραφούν από μία (null hypothesis), εξετάζοντας αν οι τιμές των α_0, α_1 και α_2 στατιστικά συμπίπτουν. Έτσι παράγεται η τιμή $0 \leq P \leq 1$, που εκφράζει σε ποιο πολλοστημόριο των πειραματικών σημείων η διαφορά του αθροίσματος τετραγώνων (sum-of-squares) θα είναι τόσο μεγάλη ή μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται και υποδηλώνει αν το null hypothesis ικανοποιείται.[8]

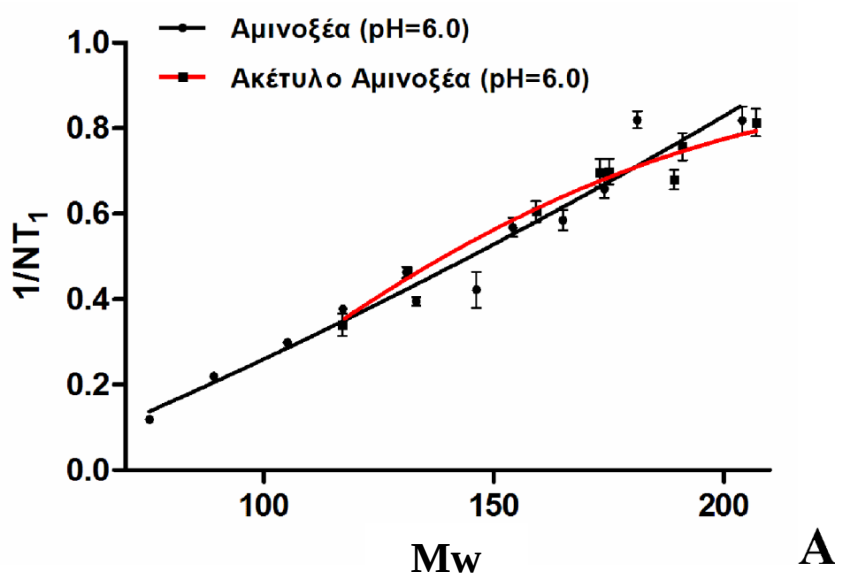
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του στατιστικού ελέγχου (Πίνακας 3.10), είναι εμφανές πως οι καμπύλες που περιγράφουν την διπολικού ιόντος και ουδέτερου pH κατάσταση των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων αντίστοιχα, συμπίπτουν (Εικόνα 3.9**A**). Την ίδια έκβαση είχε και η στατιστική μελέτη των καμπυλών για την πρωτονιομένη κατάσταση των παραπάνω μορίων (Εικόνα 3.9**B**).

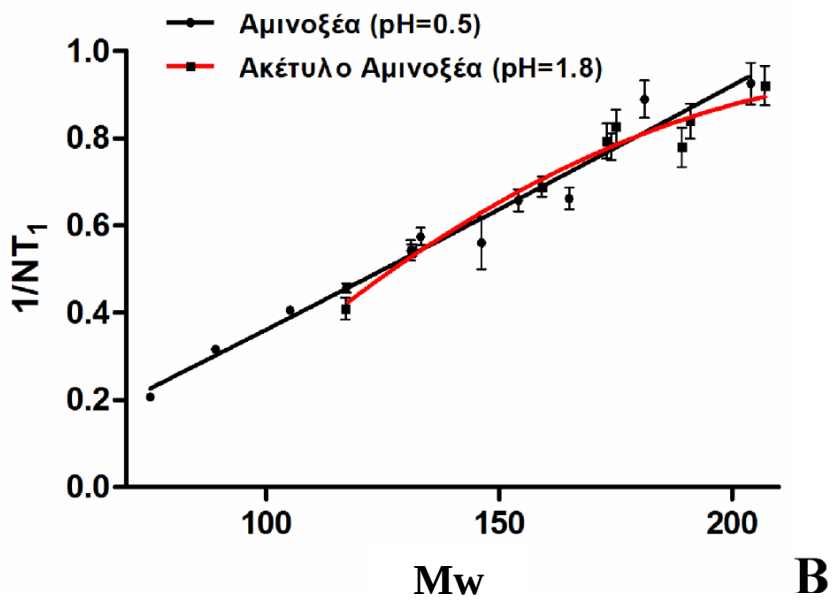
Πίνακας 3.10 Η στατιστική ανάλυση *F-test* για τις καμπύλες των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων για κάθε pH. Η τιμές *F* και *P* υποδηλώνουν ξεκάθαρα την σύμπτωση των καμπυλών. Επιπλέον δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών που προκύπτουν μετά την ομαδοποίηση των δεδομένων των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων ανά pH.

		ΑΜΙΝΟΞΕΑ – ΑΚΕΤΥΛΟ ΑΜΙΝΟΞΕΑ	
$^{13}C_{\alpha}$		**όξινο pH**	**pH = 6.0**
	F value	1.5100	0.7825
	P value	0.2554	0.5232

[8] Όσο η τιμή *P* τείνει στην μονάδα τόσο ικανοποιείται το null hypothesis, που στην παρούσα περίπτωση αποτελεί την ταύτιση των δύο καμπυλών. Το κατώτατο όριο της τιμής *P* ώστε να μην ικανοποιείται το null hypothesis ορίζεται από τον χρήστη και συνήθως ισούται με 0.05.

	α_0	-0.2653 ± 0.1404	-0.3411 ± 0.1649
	α_1	0.0066 ± 0.0020	0.0064 ± 0.0023
	α_2	-4.174e-006 ± 6.910e-006	-3.254e-006 ± 8.114e-006
	R^2	0.9622	0.9486
	$S_{y.x}$	0.0429	0.0504

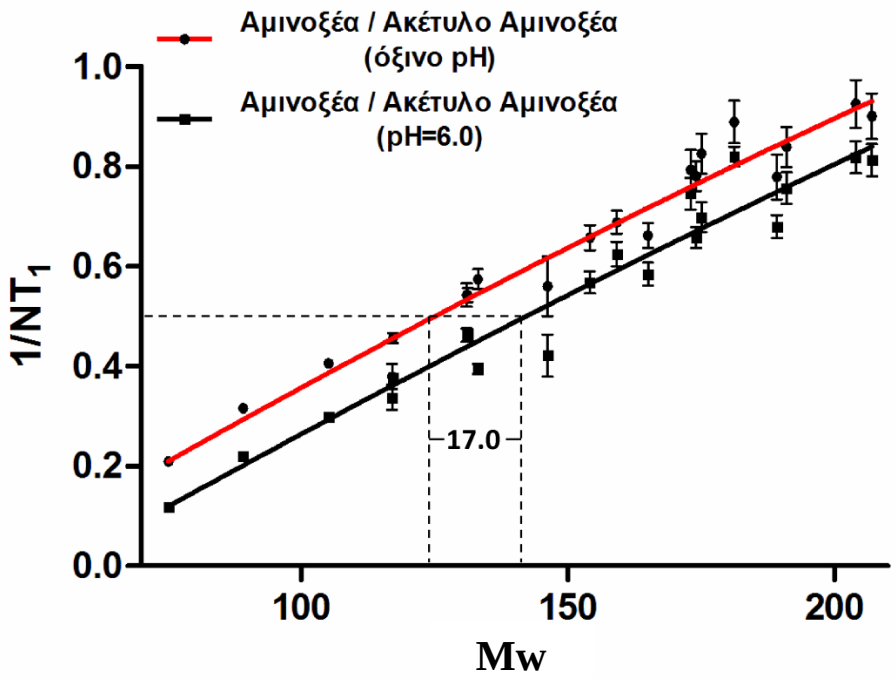




Εικόνα 3.9 (**A**) Σύγκριση των καμπυλών που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα αμινοξέα (▬) και ακετυλο-αμινοξέα (▬) των υδατικών τους διαλυμάτων σε pH = 6.0. (**B**) Σύγκριση των καμπυλών που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα αμινοξέα (▬) και ακετυλο-αμινοξέα (▬) των υδατικών τους διαλυμάτων σε όξινο pH. Είναι προφανές ότι οι καμπύλες συμπίπτουν για κάθε pH (οι τιμές $1/NT_1$ σε Hz), υποδηλώνοντας τον ίδιο βαθμό ενυδάτωσης σε κάθε περίπτωση.

Η παραπάνω στατιστική ανάλυση, οι οποία κατέληξε σε σύμπτωση των καμπυλών που περιγράφουν τον βαθμό ενυδάτωσης των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων στις δύο ιοντικές καταστάσεις τους, αποκαλύπτει ότι τα αμινοξέα και τα αντίστοιχα ακέτυλο παράγωγά τους περιγράφονται από τον ίδιο βαθμό ενυδάτωσης στις δύο ιοντικές καταστάσεις τους αντίστοιχα.

Η διαπίστωση αυτή, οδήγησε στην ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων των δύο παραπάνω ομάδων και τη χρησιμοποίησή τους στην ίδια καμπύλη ανά pH (Εικόνα 3.10, Πίνακας 3.10). Είναι προφανής η ύπαρξη διαφοράς ενυδάτωσης των ακετυλο-αμινοξέων στις δύο τιμές pH και μάλιστα ότι η πρωτονιομένη τους κατάσταση είναι ενυδατωμένη κατά ένα μόριο νερού επιπλέον.



Εικόνα 3.10 Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων για τα αμινοξέα και ακετυλο-αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το όξινο pH και (■) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*). Οι διακεκομμένες ευθείες περιγράφουν την διαφορά μοριακού βάρους για μία ίδια τιμή $1/NT_1$ μεταξύ των δύο pH. Ο βαθμός ενυδάτωσης των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων στο όξινο υδατικό περιβάλλον περιλαμβάνει ένα επιπλέον μόριο νερού σε σχέση με το ουδέτερο.

3.1.3.1.3 Βεταΐνες

Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των βεταϊνών εμφανίστηκαν αμετάβλητοι μεταξύ της διπολικού ιόντος και πρωτονιομένης τους κατάστασης. Άρα ήταν αναμενόμενο και οι καμπύλες (Εικόνα 3.11**A**) των χρόνων αποκατάστασης σε σχέση με το *Mw* να δείξουν μηδενική διαφορά στο βαθμό ενυδάτωσης των βεταϊνών στα δύο pH. Στον Πίνακα 3.11 αναφέρονται οι εξισώσεις των δύο καμπυλών των βεταϊνών. Εκτελώντας την ίδια στατιστική επεξεργασία με την περίπτωση των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων, αποδείχθηκε ότι οι δύο καμπύλες ταυτίζονται, δίνοντας τη δυνατότητα για την ομαδοποίηση των δεδομένων τους σε μία καμπύλη (Πίνακας 3.12, Εικόνα 3.11**B**).

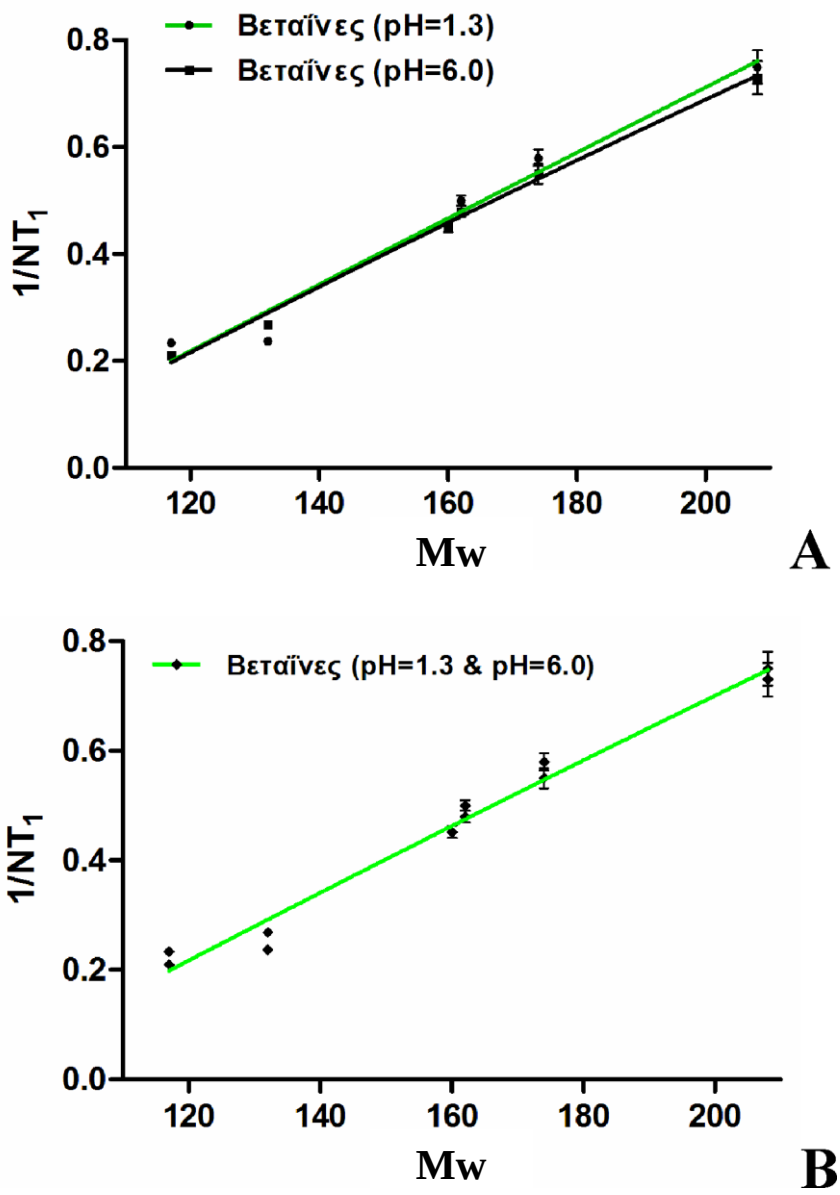
Πίνακας 3.11 Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στις βεταΐνες για δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.

	ΒΕΤΑΪΝΕΣ		
	pH	1.3	6.0
$^{13}C_{\alpha}$	α_0	-0.5473 ± 0.5131	-0.5862 ± 0.1995
	α_1	0.0065 ± 0.0065	0.0071 ± 0.0025
	α_2	-1.045e-006 ± 1.990e-005	-3.797e-006 ± 7.737e-006
	R^2	0.9709	0.9951
	$S_{y,x}$	0.0441	0.0172

Πίνακας 3.12 Η στατιστική ανάλυση *F-test* για τις καμπύλες των βεταϊνών για κάθε pH. Η τιμές *F* και *P* υποδηλώνουν ξεκάθαρα την σύμπτωση των καμπυλών. Επιπλέον δίνεται η εξίσωση της καμπύλης που προκύπτει μετά την ομαδοποίηση των δεδομένων των βεταϊνών.

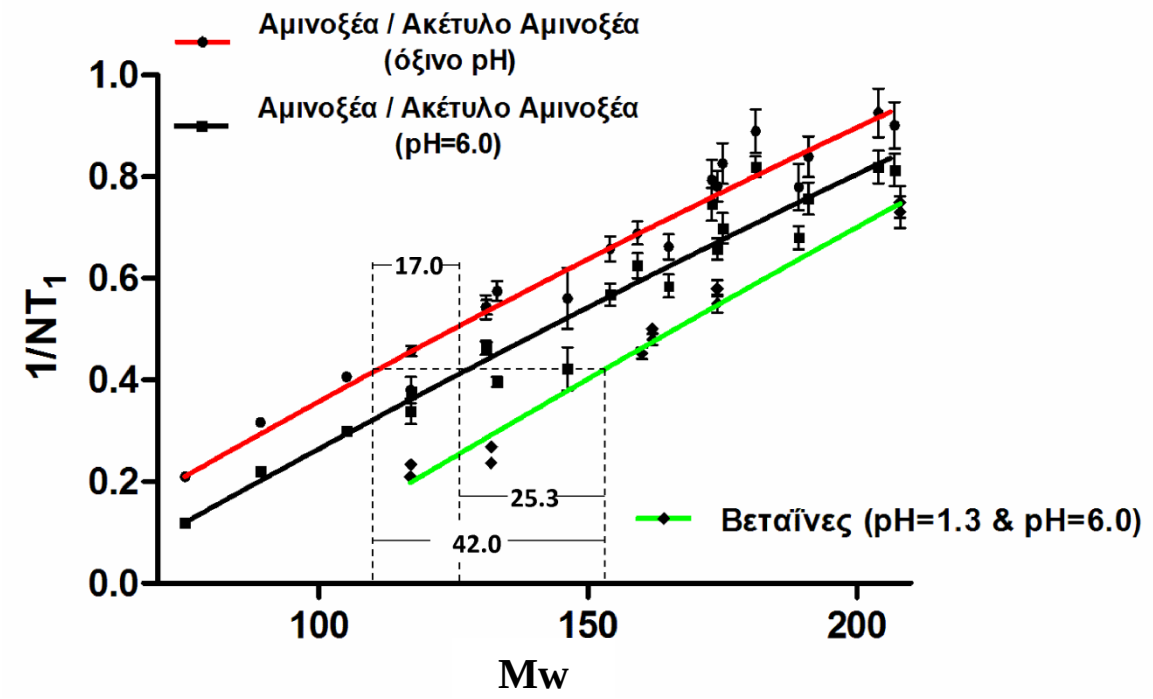
	ΒΕΤΑΪΝΕΣ (pH = 1.3 και pH = 6.0)	
	F value	0.1551
	P value	0.9226
$^{13}C_{\alpha}$	α_0	-0.5667 ± 0.2333
	α_1	0.0068 ± 0.0029
	α_2	-2.421e-006 ± 9.047e-006
	R^2	0.9810
	$S_{y.x}$	0.0284

Επιπλέον, έγινε προσπάθεια-παρόμοια με την περίπτωση των ακετυλο-αμινοξέων, που τελικώς κατέληξε σε ταύτιση βαθμού ενυδάτωσης με τα αμινοξέα-να αποδειχθεί η διαφορά βαθμού ενυδάτωσης των βεταϊνών από τα αντίστοιχα αμινοξέα και ακετυλο-αμινοξέα.



Εικόνα 3.11 (**A**) Οι καμπύλες που προκύπτουν από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τις βεταΐνες στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 1.3 και (■)Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*). (**B**) Η καμπύλη που προκύπτει από την ομαδοποίηση των δεδομένων για τις βεταΐνες από τις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων.

Η δομή των βεταϊνών περιλαμβάνει μία υδρόφοβη (τριμέθυλο υποκατεστημένη αμινομάδα) και μία υδρόφιλη περιοχή (καρβοξυλομάδα) γεγονός που οφείλει να οδηγήσει σε μικρότερο βαθμό ενυδάτωσης σε σχέση με τα αμινοξέα και ακετυλο-αμινοξέα. Πράγματι, για τρεις διαφορετικές τιμές $1/NT_1$ οι διαφορές του Mw_{eff} που προκύπτουν από την καμπύλη των βεταϊνών σε σχέση με την καμπύλη των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων στο ουδέτερο και όξινο pH, ισούνται με 25.3 ± 6.1 και 41.9 ± 7.9, αντιστοίχως (Εικόνα 3.12). Επομένως αποδεικνύεται ότι τα μόρια των βεταϊνών (ανεξαρτήτως της ιοντικής τους κατάστασης) εμφανίζουν 1-2 και 2-3 μόρια νερού μικρότερο βαθμό ενυδάτωσης σε σύγκριση με τα αμινοξέα και τα ακετυλο-αμινοξέα σε pH = 6.0 και pH = 1.3, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.12 Το σύνολο των καμπυλών που προκύπτουν για τα αμινοξέα, ακετυλο-αμινοξέα και βεταΐνες στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων και οι διαφορές του βαθμού ενυδάτωσής τους.

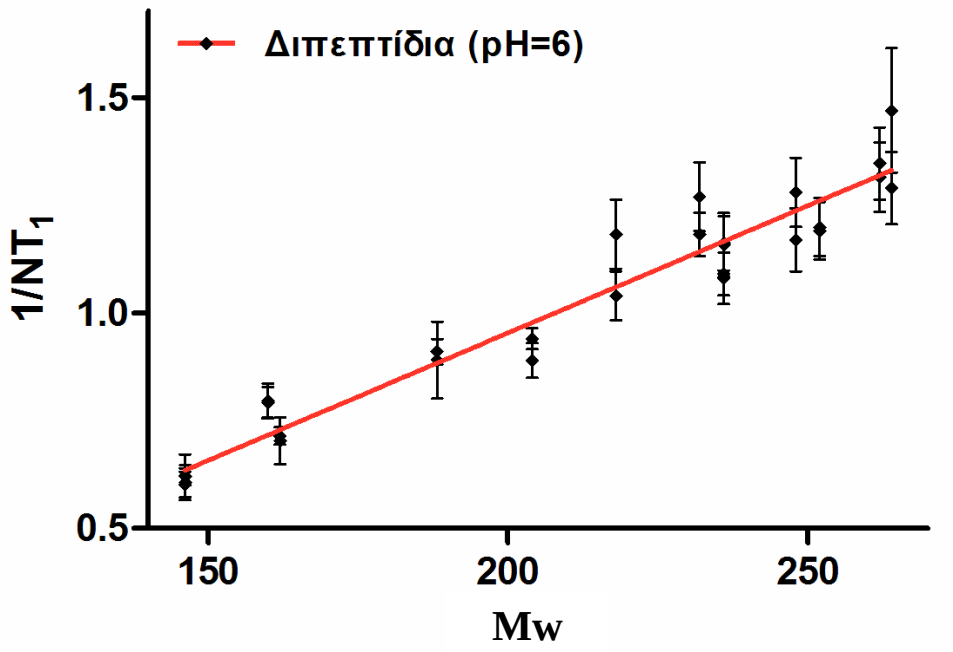
Ο βαθμός ενυδάτωσης των βεταϊνών μπορεί να θεωρηθεί ότι οφείλεται εξ ολοκλήρου στην παρουσία τις καρβοξυλομάδας τους.[9] Η πρωτονιομένη κατάσταση των βεταϊνών βρέθηκε να διαθέτει τον ίδιο βαθμό ενυδάτωσης με την διπολικού ιόντος. Η πρωτονίωση της καρβοξυλομάδας των αμινοξέων και των ακετυλο-αμινοξέων αποδείχθηκε ότι

[9] Βέβαια, ορισμένες έρευνες[47] για την μελέτη ενυδάτωσης της βεταΐνης της γλυκίνης, αναφέρονται στην επιδιαλύτωση της σε υδατικά διαλύματα λόγω περαιτέρω ελκτικών δυνάμεων «διασποράς» (hydration by dispersion) των μορίων νερού μέσω των μεθυλομάδων της, αλλά επικεντρώνονται στην ολική ενυδάτωσή της (bulk) και όχι στην άμεση αλληλεπίδραση των μορίων νερού μέσω δεσμών υδρογόνου.

προκαλεί την επιπλέον ενυδάτωσή τους με ένα μόριο νερού, γεγονός που όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των βεταϊνών, «ρυθμίζεται» από την αμινομάδα τους. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με πολύ πρόσφατες έρευνες, μέσω της φασματοσκοπίας φωτοδιάσπασης υπερύθρου (Infrared Photodissociation Spectroscopy), που αποκαλύπτουν ότι η πρωτονιομένη αμινομάδα (NH_3^+) της προλίνης, της φαινυλαλανίνης και των παραγώγων της, ευνοεί σε μεγαλύτερο βαθμό το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με μόρια νερού σε σχέση με την πρωτονιομένη καρβοξυλομάδα τους (-COOH).

3.1.3.1.4 Διπεπτίδια

Η ομαδοποίηση και η μεταχείριση των χρόνων αποκατάστασης των διπεπτιδίων, για την διπολικού ιόντος κατάστασής τους, έγινε με παρόμοιο τρόπο όπως για τα αμινοξέα και παράγωγά τους. Αποτέλεσμα ήταν μία καμπύλη που περιγράφει τον βαθμό ενυδάτωσης των υπό μελέτη διπεπτιδίων (Πίνακας 3.13, Εικόνα 3.13).

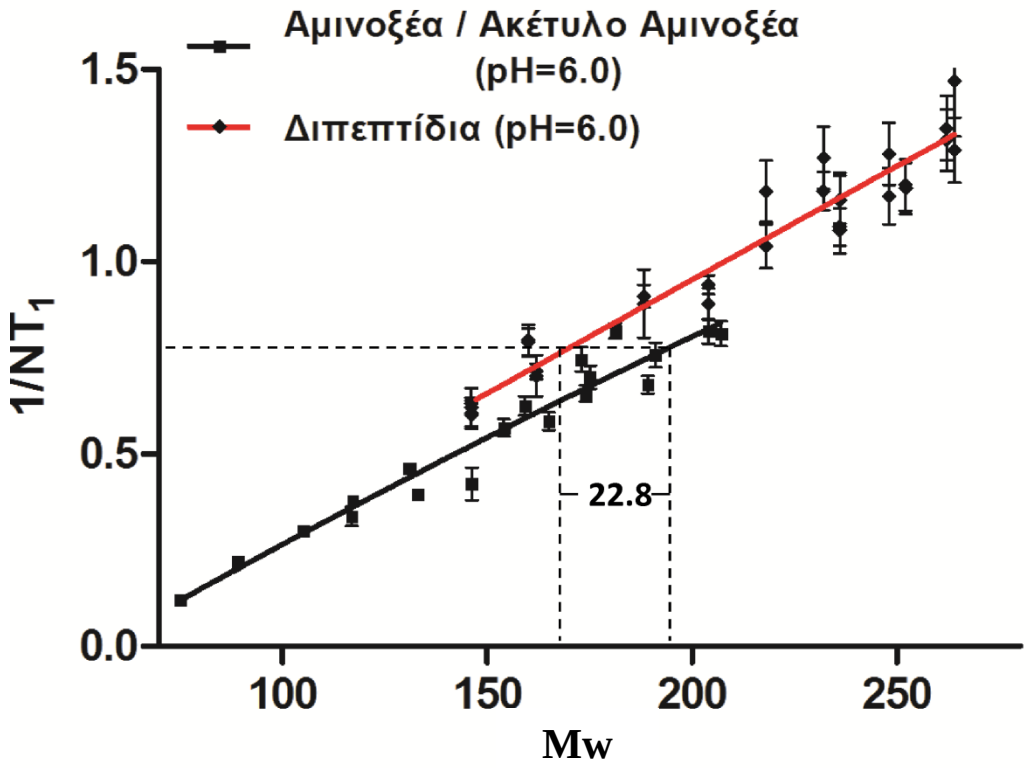


Εικόνα 3.13 Η καμπύλη που προκύπτει από την στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τα διπεπτίδια στην τιμή pH = 6.0 των υδατικών τους διαλυμάτων: (♦) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*).

Πίνακας 3.13 Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.11) για τους χρόνους αποκατάστασης T_1 των α-ανθράκων στα διπεπτίδια για την τιμή pH = 6.0 των υδατικών τους διαλυμάτων.

	ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ	
$^{13}C_{\alpha}$	**pH**	6.0
	α_0	-0.3911 ± 0.3622
	α_1	0.0076 ± 0.0036
	α_2	-4.418e-006 ± 9.033e-006
	R^2	0.9500
	$S_{y,x}$	0.0588

Η εξίσωση της καμπύλης δίνει την δυνατότητα να γίνει μία σύγκριση με τον βαθμό ενυδάτωσης των αμινοξέων και παραγώγων τους. Πράγματι συγκρίνοντας την καμπύλη



Εικόνα 3.14 Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων για τα αμινοξέα/ακετυλο-αμινοξέα και διπεπτίδια σε pH = 6.0 των υδατικών τους διαλυμάτων: (♦) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για τα διπεπτίδια και (■) Οι τιμές $1/NT_1$ (σε Hz) για τα αμινοξέα/ακετυλο-αμινοξέα ως προς το μοριακό τους βάρος (Mw). Οι διακεκομμένες ευθείες περιγράφουν την διαφορά μοριακού βάρους για μία ίδια τιμή $1/NT_1$ μεταξύ των δύο υπό μελέτη βιομοριακών ομάδων. Φαίνεται ότι ο βαθμός ενυδάτωσης των διπεπτιδίων περιλαμβάνει 1-2 επιπλέον μόρια νερού σε σχέση με των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων, για pH = 6.0.

των διπεπτιδίων με την αντίστοιχη των αμινοξέων / ακετυλο-αμινοξέων σε pH = 6.0, όμοια με παραπάνω, διαπιστώνεται ότι η διαφορά του Mw_{eff} που προκύπτει ισούται με 22.8 ± 7.8, δηλαδή 1-2 μόρια νερού (Εικόνα 3.14).

3.1.3.2 NMR-^{14}N

Η πιο πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη[38] διαφοράς ενυδάτωσης των πρωτονιομένων και της διπολικού ιόντος κατάστασης των αμινοξέων έγινε μέσω της αποκατάστασης του πυρήνα ^{14}N των αμινομάδων τους, όπως αναφέρθηκε παραπάνω και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η διαφορά ενυδάτωσής τους ήταν 2-3 μόρια νερού περισσότερα για την πρωτονιομένη τους κατάσταση, γεγονός που επέβαλλε να πραγματοποιηθεί και η μελέτη ενυδάτωσης των ακετυλο-αμινοξέων και βεταϊνών μέσω της αποκατάστασης του ^{14}N των αμινομάδων τους.

3.1.3.2.1 Ακετυλο-Αμινοξέα

Λόγω της θέσης των πυρήνων ^{14}N και γενικά της φύσης της τετραπολικής αποκατάστασης έπρεπε να αποδειχθεί ότι οι αλλαγές των $\Delta\nu_{1/2}$ που παρατηρήθηκαν στα ακετυλο-αμινοξέα (στις βεταΐνες δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές) κατά τη μεταβολή της ιοντικής τους κατάστασης, δεν οφείλονται σε παράγοντες όπως: α) η ανταλλαγή πρωτονίων και β) οι πιθανές αλλαγές των σταθερών πυρηνικής τετραπολικής σύζευξης (NQCC) κάθε ακετυλο-αμινοξέος στην αντίστοιχη ιοντική του κατάσταση, αλλά μόνο στην αλλαγή του Mw_{eff} των παραπάνω μορίων, που συνεπάγεται αλλαγή του βαθμού ενυδάτωσής των.

Η πιθανότητα διεύρυνσης των κορυφών λόγω της πρωτονιακής χημικής ανταλλαγής των πρωτονίων της αμινομάδας με αυτών του διαλύτη (νερό) εκμηδενίζεται μέσω της σύνθετης αποσύζευξης (composite decoupling) των πρωτονίων με το ^{14}N, με την εφαρμογή του παλμού WALTZ-16.[132, 133]

Όπως αποδείχθηκε στη προηγούμενη μελέτη[38] ενυδάτωσης των αμινοξέων μέσω της τετραπολικής αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N των αμινομάδων τους, στην περίπτωση

εσωτερικής κίνησης (internal motion) των διπόλων στο εσωτερικό των υπό μελέτη μορίων, ο συνολικός χρόνος περιστροφής τ_R που υπολογίζεται περιγράφεται από την σχέση:[134-136]

$$\tau_R = \tau_{mol}\left[A + (B + C)\frac{(12/r)\tau_{int}}{\tau_{mol}+(12/r)\tau_{int}}\right], \qquad (3.13)$$

όπου τ_{int} είναι ο χρόνος εσωτερικής περιστροφής, τ_{mol} ο χρόνος της μοριακής περιστροφής, $A = ¼(3\cos^2\theta - 1)^2$, $B = 3\sin^2\theta \cos^2\theta$ και $C = ¾\sin^4\theta$ (όπου θ η γωνία μεταξύ του άξονα περιστροφής, και r ο μηχανισμός μεταπήδησης r-fold.

Αν, για λόγους απλοποίησης θεωρηθεί ότι $(12/r)\tau_{int} = \tau_i$, τότε η εξίσωση (3.13) ύστερα από την απλοποίησή της παίρνει τη μορφή:

$$\tau_R = (1 - A)\tau_i + A\tau_{mol} - \frac{(1-A)\tau_i^2}{\tau_{mol}+\tau_i} \qquad (3.14)$$

Λαμβάνοντας υπόψη τις σχέσεις (3.5), (3.14) και κάποιους περαιτέρω μαθηματικούς υπολογισμούς, η σχέση (3.8) μπορεί να εκφραστεί με ένα πιο προσιτό τρόπο και να αναδιατυπωθεί ως εξής:

$$\Delta v_{1/2} = \alpha_0 + \alpha_1 Mw + \frac{\alpha_2}{Mw+\alpha_3}, \qquad (3.15)$$

όπου α_0, α_1, α_2 και α_3 είναι σταθερές που μπορούν να υπολογιστούν από την ελαχιστοποίηση της εξίσωσης (3.13) ως προς το μοριακό βάρος των υπό μελέτη μορίων (Mw). Από την παραπάνω εξίσωση παρατηρείται πως μια πολυωνυμική εξίσωση 3^{ου} ή 2^{ου} βαθμού μπορεί να εκφράσει τη μη γραμμική σύνδεση του εύρους στο μισό του ύψους των κορυφών ^{14}N με το μοριακό βάρος των υπό μελέτη μορίων. Λόγω του αριθμού των ακετυλο-αμινοξέων και των βεταϊνών που μελετήθηκαν, προτιμήθηκε η 2^{ου} βαθμού πολυωνυμική εξίσωση που περιγράφει τον βαθμό ενυδάτωσής των.[10] Επιπροσθέτως, το πρόβλημα χρήσης πολυωνυμικών εξισώσεων ως προσέγγιση μη γραμμικών εξισώσεων έγκειται κυρίως στη δυνατότητα των πολυωνυμικών 3^{ου} βαθμού και άνω να αλλάζουν κλίση, ορίζοντας τοπικά μέγιστα ή ελάχιστα, καθώς και σημεία καμπής.

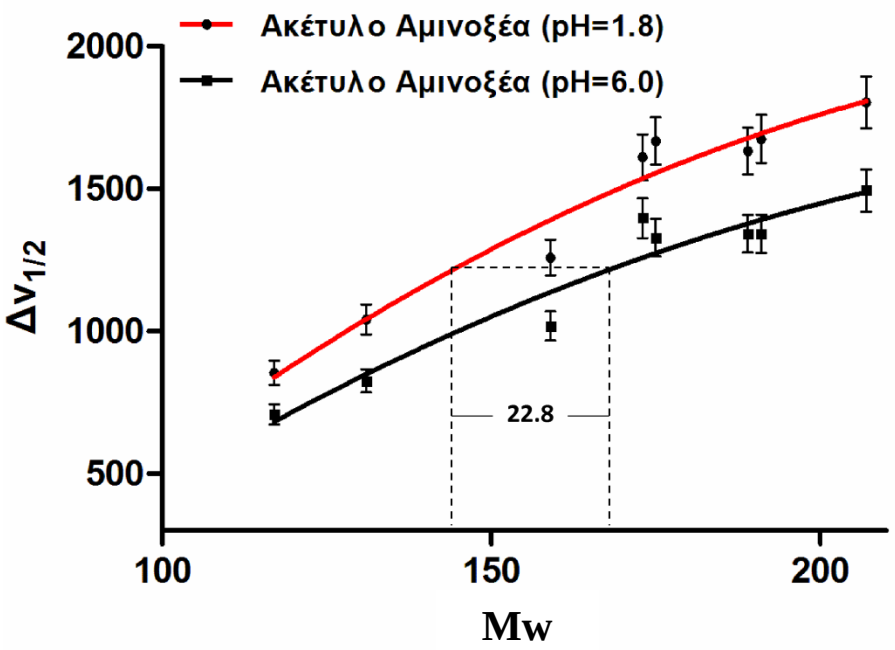
Ακολουθώντας την ίδια επεξεργασία με τους χρόνους αποκατάστασης των $^{13}C_\alpha$ και έχοντας υπόψη την εξίσωση (3.15), παράχθηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες των ακετυλο-αμινοξέων για την μεταβολή των χρόνων αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N

[10] Εξάλλου, στην προηγούμενη μελέτη[38] της ενυδάτωσης των αμινοξέων μέσω της αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N προτιμήθηκε η 2^{ου} βαθμού πολυωνυμική εξίσωση για την επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων.

($\Delta\nu_{1/2}$) σε pH = 6.0 και 1.8 (Εικόνα 3.15). Οι εξισώσεις των δύο καμπυλών αναφέρονται στον Πίνακα 3.14. Για τρεις διαφορετικές τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ υπολογίστηκε η διαφορά των Mw_{eff} των ακετυλο-αμινοξέων από την ουδέτερου pH στην πρωτονιομένη κατάσταση και ισούται με 22.8 ± 8.8 (Εικόνα 3.15). Η διαφορά αυτή αντιστοιχεί σε 1 ή λιγότερο πιθανά σε 2 μόρια νερού περισσότερα για την πρωτονιομένη κατάσταση των ακετυλο-αμινοξέων. Όπως φαίνεται, τα αποτελέσματα της τετραπολικής αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N έρχονται σε συμφωνία με αυτά της διπολικής αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ για τα ακετυλο-αμινοξέα.

Πίνακας 3.14 Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.15) για τις τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των ακετυλο-αμινοξέων για τις τιμές pH = 6.0 και pH = 1.8 των υδατικών τους διαλυμάτων.

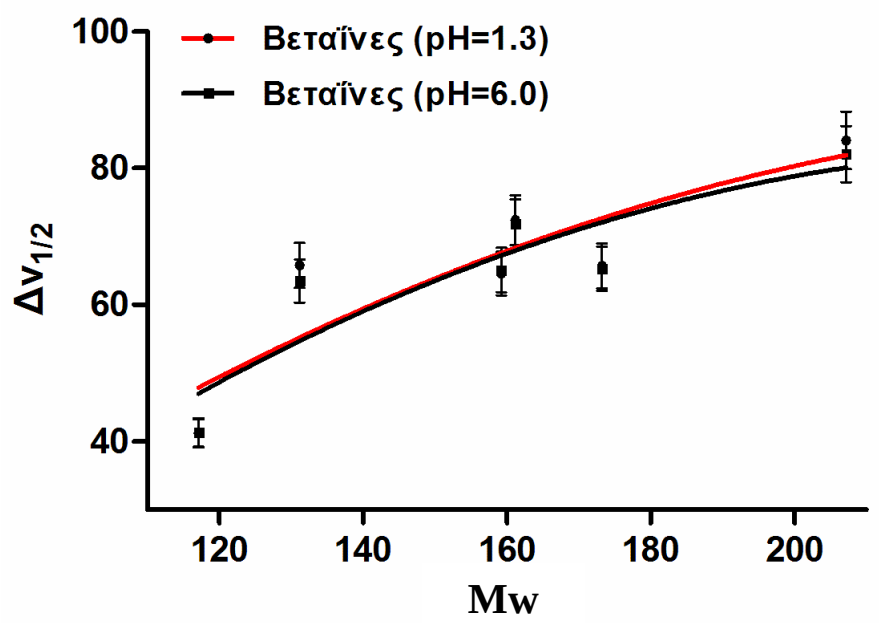
	ΑΚΕΤΥΛΟ-ΑΜΙΝΟΞΕΑ		
	pH	1.8	6.0
^{14}N	**α_0**	-1625 ± 1052	-1310 ± 1093
	α_1	26.88 ± 13.42	21.59 ± 13.94
	α_2	-0.0497 ± 0.0417	-0.0389 ± 0.0433
	R^2	0.9542	0.9302
	$S_{y,x}$	87.70	91.07



Εικόνα 3.15 Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων $\Delta\nu_{1/2}$ για τα ακετυλο-αμινοξέα στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το όξινο pH και (■) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (*Mw*). Οι διακεκομμένες ευθείες περιγράφουν την διαφορά μοριακού βάρους για μία ίδια τιμή $\Delta\nu_{1/2}$ μεταξύ των δύο pH. Διακρίνεται ότι ο βαθμός ενυδάτωσης ακετυλο-αμινοξέων στο όξινο υδατικό περιβάλλον περιλαμβάνει 1 επιπλέον μόριο νερού (λιγότερα από 2) σε σχέση με το ουδέτερο.

3.1.3.2.2 Βεταΐνες

Σχολιάζοντας τις τιμές των $\Delta\nu_{1/2}$ του ^{14}N για τα μόρια των βεταϊνών αναφέρθηκε η αμεταβλητότητά τους στις δύο τιμές pH, σε συμφωνία με την αμεταβλητότητα των χρόνων αποκατάστασης T_1 του $^{13}C_{\alpha}$. Επομένως, οι καμπύλες ^{14}N των βεταϊνών στις δύο τιμές pH (Πίνακας 3.15) αναμένεται να ταυτίζονται (Εικόνα 3.16, Πίνακας 3.16), δείχνοντας μηδαμινή διαφορά των Mw_{eff}, άρα μηδενική διαφορά ενυδάτωσης.



Εικόνα 3.16 Οι καμπύλες που προκύπτουν από την ομαδοποίηση των δεδομένων $\Delta\nu_{1/2}$ για τις βεταΐνες στις δύο τιμές pH των υδατικών τους διαλυμάτων: (●) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το όξινο pH και (■) Οι τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ (σε Hz) για το pH = 6.0 ως προς το μοριακό τους βάρος (Mw).

Η μη μεταβολή των τιμών $\Delta\nu_{1/2}$ και η παραπάνω ταύτιση των καμπυλών, αποδεικνύουν εμμέσως, ότι η απόσταση του δεσμού C_α-H παραμένει ανεξάρτητη της ιοντικής κατάστασης των βεταϊνών ή είναι τόσο μικρή που μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα και για τα αμινοξέα / ακετυλο-αμινοξέα Το γεγονός αυτό πιστοποιεί τα αποτελέσματα και συμπεράσματα της μελέτης ενυδάτωσης των παραπάνω βιομορίων μέσω των χρόνων αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_\alpha$, δείχνοντας ότι οι διαφορές των Mw_{eff} που μετρήθηκαν από τις καμπύλες των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων στα δύο pH είναι ακριβείς και περιγράφουν μόνο τη διαφορά βαθμού ενυδάτωσή των.

Πίνακας 3.15 Στατιστική ανάλυση της εξίσωσης (3.15) για τις τιμές $\Delta\nu_{1/2}$ των κορυφών ^{14}N της αμινομάδας των βεταϊνών για τις τιμές pH = 6.0 και pH = 1.3 των υδατικών τους διαλυμάτων.

	ΒΕΤΑΪΝΕΣ		
	pH	1.3	6.0
^{14}N	**α_0**	-42.16 ± 104.80	-52.91 ± 91.44
	α_1	0.99 ± 1.32	1.13 ± 1.15
	α_2	-0.0018 ± 0.0040	-0.0023 ± 0.0035
	R^2	0.7600	0.8000
	$S_{y,x}$	8.874	7.740

Πίνακας 3.16 Η στατιστική ανάλυση *F-test* για τις καμπύλες των βεταϊνών για κάθε pH. Η τιμές *F* και *P* υποδηλώνουν ξεκάθαρα την σύμπτωση των καμπυλών.

		ΒΕΤΑΪΝΕΣ (pH = 1.3 και pH = 6.0)
^{14}N	**F value**	0.0122
	P value	0.9980

3.1.3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων NMR-^{14}N, NMR-^{17}O και NMR-^{13}C – Ποιος πυρήνας εμφανίζεται πιο «αξιόπιστος» για την μελέτη ενυδάτωσης;

Η παρουσίαση της ανάλυσης και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων αποκατάστασης ^{14}N και ^{13}C για την μελέτη ενυδάτωσης των αμινοξέων και δύο παραγώγων τους εμπεριείχε ένα μεγάλο όγκο συμπερασμάτων. Σε αυτό το μέρος της διατριβής γίνεται η προσπάθεια συνολικής σύγκρισης των παραπάνω συμπερασμάτων με ορισμένες προηγούμενες προαναφερθέντες μελέτες προσέγγισης της διαφοράς ενυδάτωσης μόνο των αμινοξέων (μεταξύ της διπολικού ιόντος και πρωτονιομένης κατάστασής τους), μέσω της αποκατάστασης των τετραπολικών πυρήνων ^{14}N (της αμινομάδας) και ^{17}O (της καρβοξυλομάδας).

Τα αποτελέσματα προηγουμένων μελετών βασισμένα στη μελέτη των χρόνων αποκατάστασης ($\Delta\nu_{1/2}$) των πυρήνων ^{14}N[38] και ^{17}O[31] έδειξαν ότι η πρωτονιομένη κατάσταση των αμινοξέων ενυδατώνεται με 2-3 και 1-3 μόρια νερού επιπλέον, αντιστοίχως. Οι μετρήσεις της αποκατάστασης των ακετυλο-αμινοξέων που πραγμτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη κατέληξαν σε διαφορά ενός πιθανότατα ή το πολύ 2 μορίων νερού. Η αντίστοιχη προσέγγιση μέσω της αποκατάστασης του $^{13}C_{\alpha}$, κατέληξε πρακτικά σε συμφωνία για την περίπτωση των ακετυλο-αμινοξέων, καταδεικνύοντας 1 μόριο νερού επιπλέον ενυδάτωση για την πρωτονιομένη κατάστασή τους, εμφανίζοντας παράλληλα μερική ασυμφωνία στην περίπτωση των αμινοξέων. Μια πιθανή εξήγηση της μερικής ασυμφωνίας, ίσως να βρίσκεται στο γεγονός ότι οι τιμές των NQCC στους πυρήνες ^{14}N και ^{17}O μεταβάλλονται και μάλιστα όχι στον ίδιο βαθμό για όλα τα αμινοξέα και ακετυλο-αμινοξέα. Συγκεκριμένα, οι τιμές NQCC των πυρήνων ^{14}N και ^{17}O που μετρήθηκαν για την κατάσταση διπολικού ιόντος των αμινοξέων έδειξαν διασπορά της τάξεως του ± 15 % από την μέση τιμή (1230 Hz), ενώ λίγες είναι γνωστές για την πρωτονιομένη τους κατάσταση,[137, 138] οπότε δε μπορεί να απαντηθεί με

βεβαιότητα αν παραμένουν σταθερές στις δύο ιοντικές καταστάσεις, όπως υποτέθηκε στις προηγούμενες μελέτες. Όσον αφορά τις τιμές NQCC για τα ακετυλο-αμινοξέα, έδειξαν μια διασπορά ± 3 % από την μέση τιμή (3282 Hz). Αν οι τιμές NQCC του ^{14}N επηρεάζονται από την ιοντική κατάσταση, τότε οι τιμές των αμινοξέων αναμένεται να επηρεάζονται περισσότερο απ' ότι των ακετυλο-αμινοξέων, επειδή στα τελευταία ο τανυστής (tensor) της τετραπολικής ροπής των πυρήνων ^{14}N αλληλεπιδρά με τον αντίστοιχο των πυρήνων ^{17}O της ακέτυλο ομάδος. Επιπροσθέτως, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων με τον διαλύτη (νερό) καθώς και η χημική ανταλλαγή, φαινόμενα που απαιτούν τη συμμετοχή των αμινομάδων και καρβοξυλομάδων τους, μπορεί να συνεισφέρουν σε μικρό βαθμό στην αύξηση των μεταβολών των τιμών $\Delta\nu_{1/2}$.[139]

Στην αντίπερα όχθη, οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων ^{13}C και συγκεκριμένα του τριτοταγούς $^{13}C_{\alpha}$ επηρεάζονται μόνο από την απόσταση του δεσμού $^{13}C_{\alpha}$-H, που όπως αποδείχθηκε μένει ανεξάρτητη ή ελάχιστα μεταβαλλόμενη στις ιοντικές καταστάσεις των αμινοξέων και παραγώγων τους.

Επίσης, ένα πλεονέκτημα της αποκατάστασης του $^{13}C_{\alpha}$ είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα διερεύνησης της ενυδάτωσης των ολιγοπεπτιδίων. Τα σήματα NMR των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ των ολιγοπεπτιδίων δεν αλληλεπικαλύπτονται, σε αντίθεση με αυτά του ^{14}N, με αποτέλεσμα την λεπτομερή μελέτη ενυδάτωσης και των ολιγοπεπτιδίων (όπως για παράδειγμα η μελέτη ενυδάτωσης που διεξήχθη για την ομάδα των διπεπτιδίων).

Συμπερασματικά, η χρήση της διπολικής αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ είναι πιο αξιόπιστη και ακριβής, διαθέτοντας περισσότερες προοπτικές για την μελέτη της ενυδάτωσης των αμινοξέων και όλων των παραγώγων τους στις διάφορες ιοντικές καταστάσεις τους.

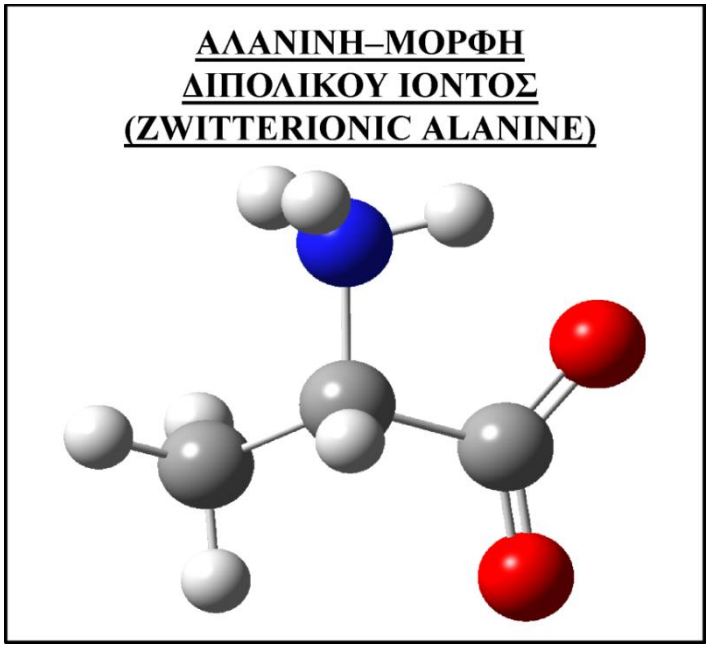
3.1.4 Αποτελέσματα Θεωρητικής Προσέγγισης της Ενυδάτωσης[11]

3.1.4.1 Αμινοξέα (αλανίνη)

Η προσομοίωση της επιδιαλύτωσης των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με χρήση του αμινοξέος αλανίνη. Η μελέτη της επιδιαλύτωσης έγινε και στις δύο ιοντικές καταστάσεις

[11] Σημειώνεται ότι η γεωμετρία και οι ενέργειες (zero point energies) όλων των δομών που ακολουθούν περιγράφονται στο Παράρτημα III και όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-PVTZ, με την εφαρμογή του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk water).

του αμινοξέος, δηλαδή την πρωτονιομένη και τη μορφή διπολικού ιόντος. Στο πρώτο στάδιο έγινε η προσπάθεια βελτιστοποίησης των δύο ιοντικών μορφών της Αλανίνης, χωρίς την διερεύνηση της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσής τους. Ο σκοπός ήταν να βρεθεί η πλήρως βελτιστοποιημένη, χαμηλότερη ενεργειακά δομή τους (Εικόνες 3.17 και 3.18**A**) σε υδατικό διάλυμα (bulk water) ώστε να χρησιμοποιηθεί για το δεύτερο στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει τη μοντελοποίηση, προσέγγιση της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης των δύο ιοντικών καταστάσεων του μορίου της αλανίνης, με την παράλληλη εφαρμογή του bulk water. Στην παρούσα μελέτη, πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης θεωρήθηκε ο μέγιστος συνολικός αριθμός μορίων νερού που αλληλεπιδρούν άμεσα (μέσω ισχυρών δεσμών υδρογόνου, απόσταση O' ' 'H ≤ 2 Å) με το υπό μελέτη μόριο.

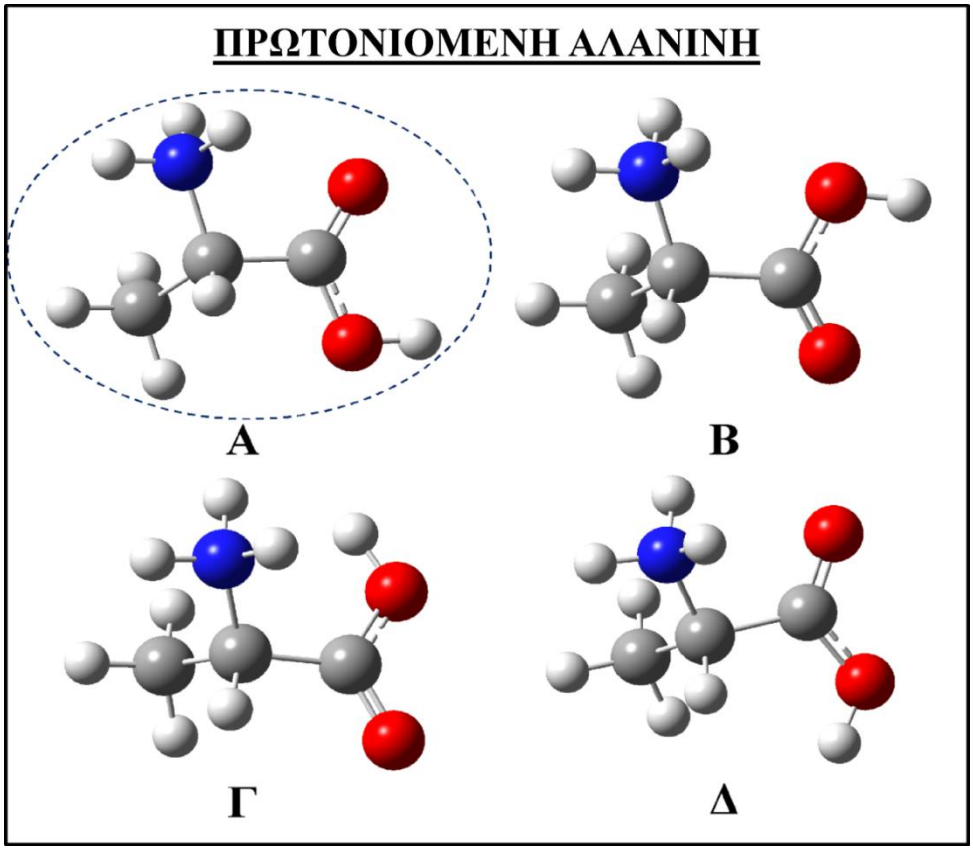


Εικόνα 3.17 Η δομή της κατάστασης διπολικού ιόντος της αλανίνης σε υδατικό διάλυμα.

Η δομή των αμινοξέων εμφανίζει δύο πολικές περιοχές (αμινομάδα, καρβοξυλομάδα), που διαθέτουν την ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με τα μόρια νερού. Όσον αφορά το μόριο της αλανίνης, η πλευρική του αλυσίδα αποτελείται από ένα υδρόφοβο μεθύλιο, επομένως αναμένονται ισχυρές αλληλεπιδράσεις των μορίων νερού μόνο με τις πολικές ομάδες του μορίου. Πράγματι, προσπάθειες για την απόδειξη τυχόν δεσμών υδρογόνου μορίων νερού με την πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος αλανίνη, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υφίστανται τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις.[51] Ως συνέπεια, ακολουθώντας πρόσφατες παραπλήσιες μελέτες ενυδάτωσης,[54, 140] τοποθετηθήκαν σταδιακά μόρια νερού, σε τυχαία διάταξη και απόσταση από τις πολικές ομάδες του

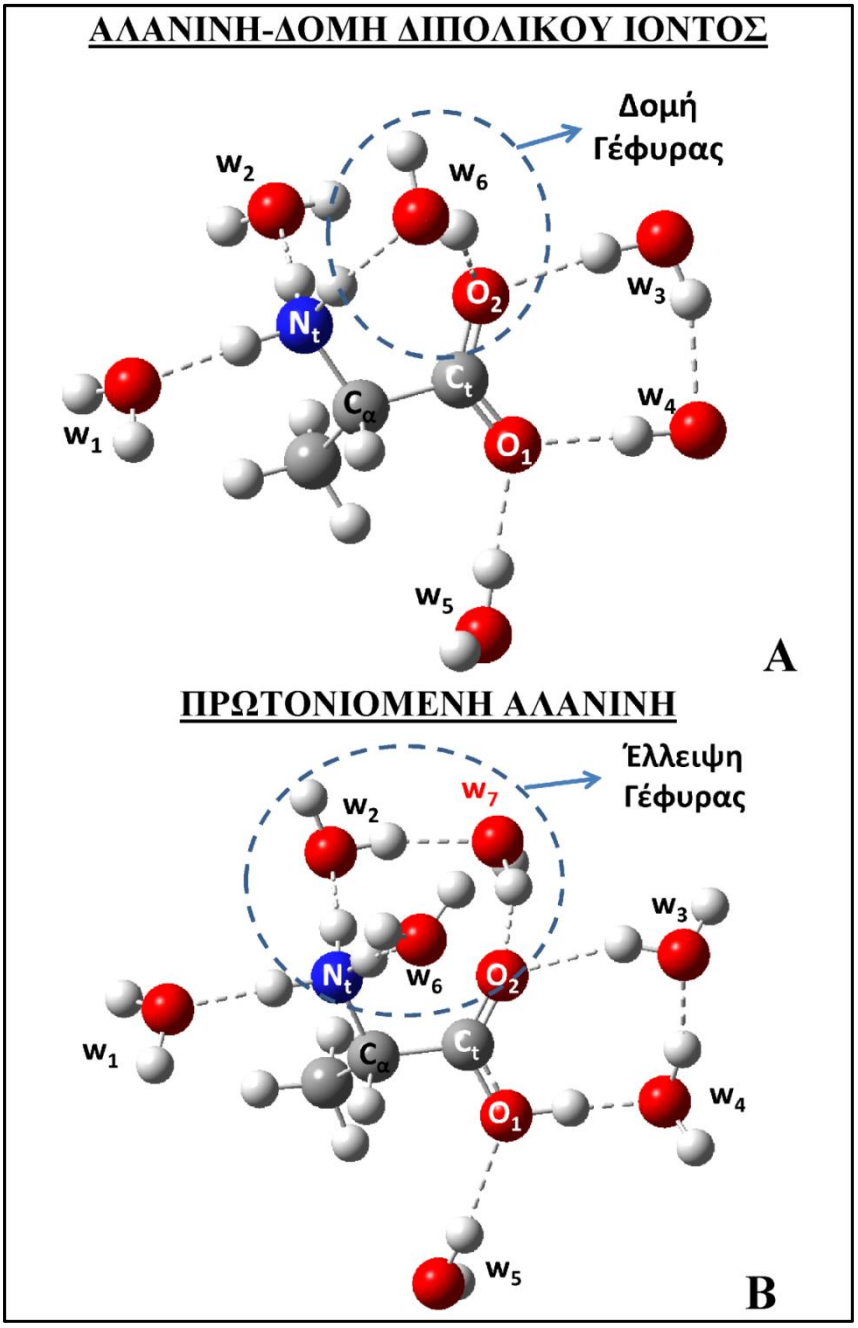
μορίου της αλανίνης, βελτιστοποιώντας κάθε φορά την συνολική δομή των μορίων φτάνοντας στην ελάχιστη ενεργειακά δομή. Η επαλήθευση της ελαχιστοποίησης γινόταν με τον υπολογισμό των δονητικών συχνοτήτων του συνόλου των ατόμων κάθε φορά.

Στην περίπτωση της κατάστασης του διπολικού ιόντος της αλανίνης, η τελική δομή με το μέγιστο αριθμό μορίων νερού, που αλληλεπιδρούν άμεσα με το μόριο, κατέληξε με τη συμμετοχή 6 μορίων νερού (Εικόνα 3.19**A**). Όπως απεικονίζεται, η ομάδα του καρβοξυλίου σχηματίζει 4 δεσμούς υδρογόνου με αντίστοιχο αριθμό μορίων νερού. Δύο δεσμοί υδρογόνου αντιστοιχούν για κάθε οξυγόνο. Δύο μόρια νερού (w3, w4) δημιουργούν έναν οκταμελή δακτύλιο με την αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα της αλανίνης. Παράλληλα ένα μόριο νερού (w6), εμφανίζεται να δημιουργεί μια δομή γέφυρας, όπου σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με ένα άτομο οξυγόνο (O2) της καρβοξυλομάδας και έναν δεσμό με ένα υδρογόνο της αμινομάδας. Η δομή γέφυρας έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχες θεωρητικές μελέτες ενυδάτωσης του αμινοξέος λευκίνη και μάλιστα θεωρείται η προτιμητέα δομή (δομή με την χαμηλότερη ενέργεια), αν η πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης του μορίου περιλάμβανε μόνο ένα μόριο νερού.[140] Τα άλλα δύο μόρια νερού (w1, w2) συμμετέχουν στην ενυδάτωση του μορίου μέσω δύο δεσμών υδρογόνου με τα δύο υδρογόνα της αμινομάδας του.



Εικόνα 3.18 Οι πιθανές δομές της πρωτονιομένης κατάστασης του αμινοξέος αλανίνη. Η δομή **Α** εμφανίζεται με την χαμηλότερη ενέργεια (Παράρτημα ΙΙΙ), με αποτέλεσμα την επικράτησή της στο υδατικό διάλυμα όξινου pH.

Η πρωτονιομένη κατάσταση του παραπάνω αμινοξέος εμφανίζεται με συνολικό φορτίο + 1, το οποίο οφείλεται στην θετικά φορτισμένη αμινομάδας του. Στην Εικόνα 3.18 απεικονίζονται όλες οι πιθανές δομές της πρωτονιομένης Αλανίνης σε υδατικό διάλυμα. Εφόσον πραγματοποιήθηκε η γεωμετρική βελτιστοποίηση και των τεσσάρων πιθανών δομών της πρωτονιομένης αλανίνης, αποδείχθηκε ότι χαμηλότερη ενεργειακά δομή είναι αυτή που απεικονίζεται στη θέση Α της Εικόνας 3.18 και αυτή χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω μελέτη για την προσομοίωση της πρώτης σφαίρας ενυδάτωσής της. Ο μέγιστος αριθμός μορίων νερού, που αλληλεπιδρούν άμεσα με το μόριο της πρωτονιομένης αλανίνης ήταν 7(Εικόνα 3.19**Β**), δηλαδή ένα μόριο νερού περισσότερο από την διπολικού ιόντος κατάστασής του. Πιο αναλυτικά, ο οκταμελής δακτύλιος και ο αριθμός μορίων νερού (τέσσερα) που συμμετέχουν στην επιδιαλύτωση της μηδενικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας του πρωτονιομένου μορίου, παρέμειναν ίδια με την διπολικού ιόντος κατάστασής του, αλλά παύει να σχηματίζεται η δομή «γέφυρας» μεταξύ καρβοξυλομάδας-αμινομάδας.

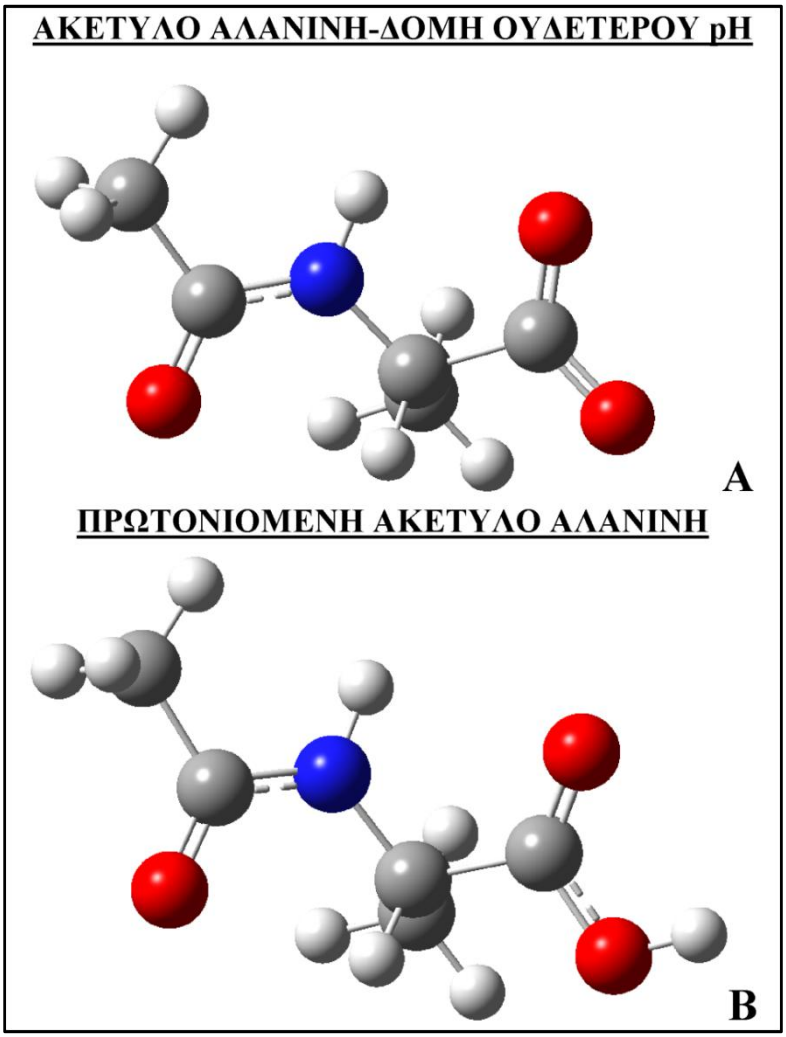


Εικόνα 3.19 **(A)** Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της κατάστασης διπολικού ιόντος της αλανίνης (6 μόρια νερού), με το σχηματισμό της δομής γέφυρας. **(B)** Η αντίστοιχη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης της πρωτονιομένης κατάστασης της αλανίνης (7 μόρια νερού), όπου παύει να σχηματίζεται η δομή γέφυρας.

Συγκεκριμένα, η αμινομάδα βρίσκεται να είναι πλήρως ενυδατωμένη (τρία μόρια νερού), επιτρέποντας σε ένα επιπλέον μόριο νερού (w7) να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με το O2 της καρβοξυλομάδας.

3.1.4.2 Ακετυλο-Αμινοξέα (ακετυλο-αλανίνη)

Η ομάδα των ακέτυλο αμινοξέων εκπροσωπήθηκε από το μόριο της ακετυλο-αλανίνης στις δύο υπό μελέτη ιοντικές καταστάσεις του.



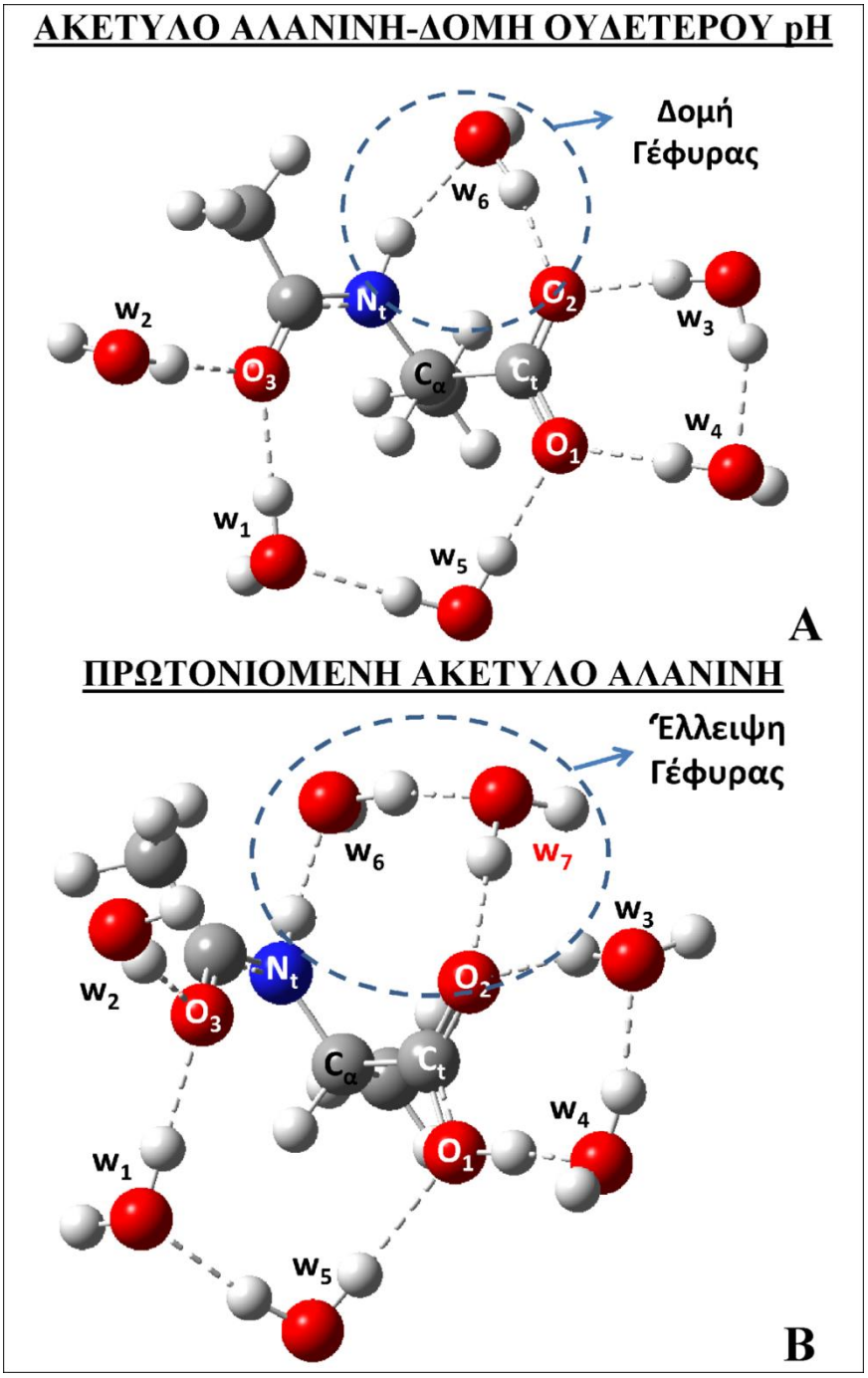
Εικόνα 3.20 **(Α)** Η δομή του μορίου της ακετυλο-αλανίνης σε υδατικό διάλυμα με pH = 6.0. **(Β)** Η αντίστοιχη δομή της πρωτονιομένης κατάστασης της ακετυλο-αλανίνης.

Στην κατάσταση του ουδέτερου pH (Εικόνα 3.20**Α**), η δομή του μορίου της ακετυλο-αλανίνης στην μελέτη ενυδάτωσής σε συνθήκες μόνο bulk water εμφανίζεται με φορτίο – 1, ενώ στο όξινο pH (πρωτονιομένη κατάσταση) το φορτίο του είναι μηδενικό[12] (Εικόνα 3.20**Β**).

[12] Όμοια με την πρωτονιομένη αλανίνη, υπάρχουν άλλες τρεις δομές-ισομερή της πρωτονιομένης ιοντικής κατάστασης της ακετυλο-αλανίνης και αναφέρονται στο Παράρτημα IV.

Ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία με το αμινοξύ αλανίνη, διαπιστώθηκε, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 3.21**A**, πως ο μέγιστος αριθμός των ισχυρά, άμεσα αλληλεπιδρώντων μορίων νερού με το μόριο της ακετυλο-αλανίνης στο ουδέτερο pH, ήταν 6, όμοια με την περίπτωση του μορίου της δομής διπολικού ιόντος της αλανίνης. Παρόλο την ύπαρξη της ακέτυλο ομάδας στην αμινομάδα, γεγονός που αναμενόταν να οδηγεί σε τουλάχιστον δύο μόρια νερού λιγότερο, βρέθηκε ότι το οξυγόνο της (O3) μπορεί να αλληλεπιδράσει, σχηματίζοντας δύο ισοδύναμους δεσμούς υδρογόνου (το μήκος δεσμού O· · ·H μετρήθηκε 2.03 Å), με δύο μόρια νερού. Οι δομές του οκταμελή δακτυλίου και επιπλέον δύο αλληλεπιδρώντων μορίων νερού της καρβοξυλομάδας καθώς και η «γέφυρα» μεταξύ του O2 της καρβοξυλομάδας και του ιμιδικού υδρογόνου της αμινομάδας εξακολουθούν να υφίστανται ακολουθώντας το μοντέλο επιδιαλύτωσης του διπολικού ιόντος του αμινοξέος αλανίνη.

Σε περιβάλλον όξινου pH, η βελτιστοποιημένη πρωτονιομένη μορφή της ακετυλο-αλανίνης με το μέγιστο αριθμό μορίων νερού, αποκτά την ίδια διάταξη με αυτή του επιδιαλυτωμένου μορίου της αλανίνης, δηλαδή αποτελείται από 7 μόρια νερού, αδυνατώντας να σχηματίσει την δομή «γέφυρας» (Εικόνα 3.21**B)**. Τα υπόλοιπα μόρια νερού αλληλεπιδρούν όπως στο μόριο της ακετυλο-αλανίνης στο ουδέτερο pH.



Εικόνα 3.21 **(Α)** Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της ακετυλο-αλανίνης σε υδατικό διάλυμα ουδέτερου pH (6 μόρια νερού), με το σχηματισμό της δομής γέφυρας **(Β)** Η αντίστοιχη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης της πρωτονιομένης κατάστασης της ακετυλο-αλανίνης (7 μόρια νερού), όπου παύει να σχηματίζεται η δομή γέφυρας.

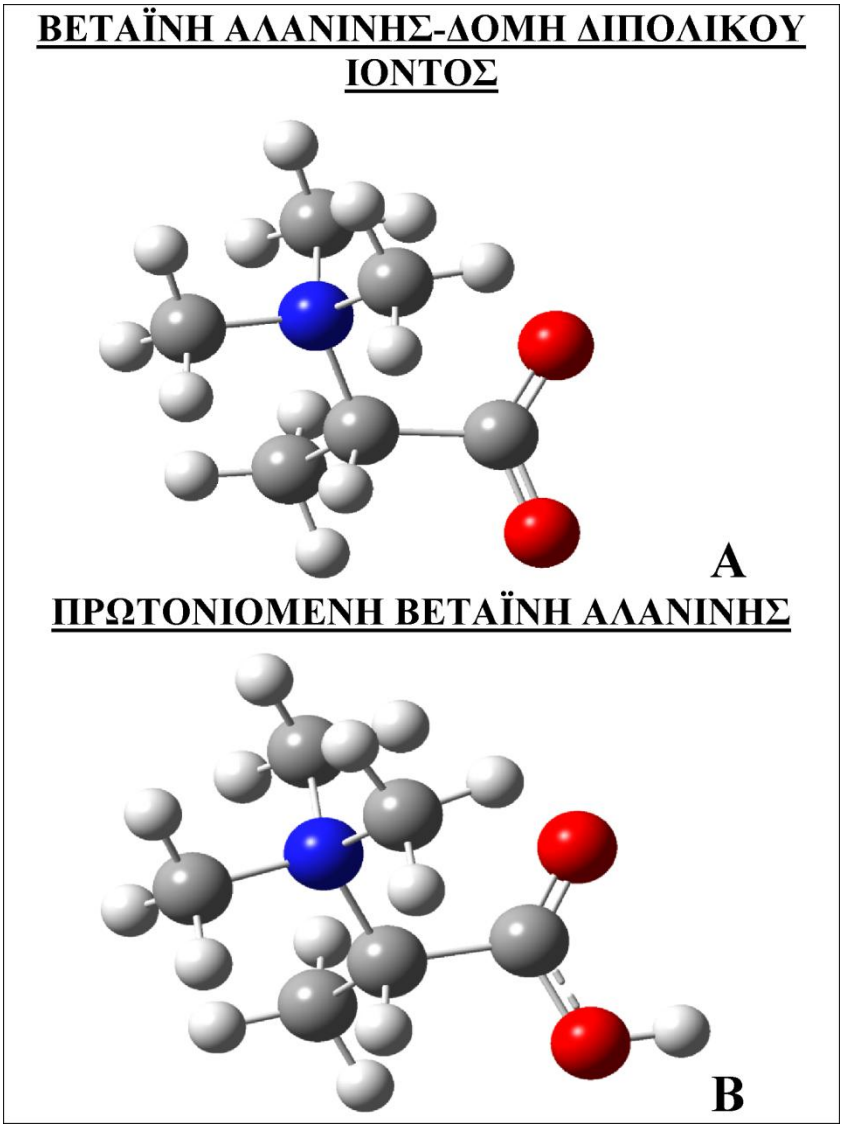
3.1.4.3 Βεταΐνες (βεταΐνη της αλανίνης)

Η ιδιομορφία της δομής των μορίων των βεταϊνών, επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση τους με τα μόρια νερού μέσω της καρβοξυλομάδας τους. Αν τα καρβοξυλικά άκρα της αλανίνης και ακετυλο-αλανίνης αλληλεπιδρούν, ανεξάρτητα της ιοντικής τους κατάστασης, πάντα με 4 μόρια νερού το μέγιστο, αναμένεται να ισχύει κάτι παρόμοιο με το μόριο βεταΐνης της αλανίνης[13] (Εικόνα 3.22). Η βελτιστοποιημένη διπολικού ιόντος δομή του μορίου (μηδενικό φορτίο) βρέθηκε να μπορεί να αλληλεπιδρά με τέσσερα μόρια νερού (Εικόνα 3.23**A**), ακριβώς με τον ίδιο τρόπο των δομών διπολικού ιόντος για τα μόρια της αλανίνης και ακετυλο-αλανίνης. Η παρουσία του οκταμελούς δακτυλίου και των 2 επιπλέον μορίων νερού γύρω από τη μόνη υδρόφιλη περιοχή της καρβοξυλομάδας της βεταΐνης, έμεινε ανεπηρέαστη και στην πρωτονιομένη της κατάσταση (4 μόρια νερού) (Εικόνα 3.23**B**). Έτσι αποδείχθηκε ότι ο μέγιστος αριθμός μορίων που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το μόριο της βεταΐνης της αλανίνης, ανεξαρτήτως ιονισμένης κατάστασης, είναι 4 μόρια νερού, ενώ παράλληλα επιβεβαιώνεται και η προαναφερθείσα υπόθεση ότι η αμινομάδα «ελέγχει» την επιπλέον ενυδάτωση των πρωτονιομένων αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων.

Έχοντας επίγνωση ότι το μοντέλο επιδιαλύτωσης της θεωρητικής μελέτης ενυδάτωσης των υπό μελέτη βιομορίων είναι αρκετά προσεγγιστικό, η παρακάτω σύγκρισή του με πρόσφατες αλλά και παλαιότερες πειραματικές και θεωρητικές μελέτες, αποδεικνύει ότι μπορεί να προσομοιάσει και τουλάχιστον να προσεγγίσει τον μέγιστο αριθμό μορίων νερού που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα αμινοξέα, ακετυλο-αμινοξέα και βεταΐνες.[54, 124, 140] Αυτό είναι αρκετό για την επιβεβαίωση και «ισχυροποίηση» των αποτελεσμάτων - συμπερασμάτων μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Πολύ πρόσφατη έρευνα των Panuszko et al., με την χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) και παρόμοιων με των παρόντων θεωρητικών μελετών, απέδειξε ότι το μόριο της βεταΐνης της γλυκίνης στη διπολικού ιόντος κατάστασή του αλληλεπιδρά άμεσα με 4 μόρια νερού, σχηματίζοντας ακριβώς την ίδια δομή που προέβλεψαν τα θεωρητικά πειράματα που αναλύθηκαν για το μόριο της βεταΐνης της αλανίνης στη κατάσταση διπολικού ιόντος.[54]

---

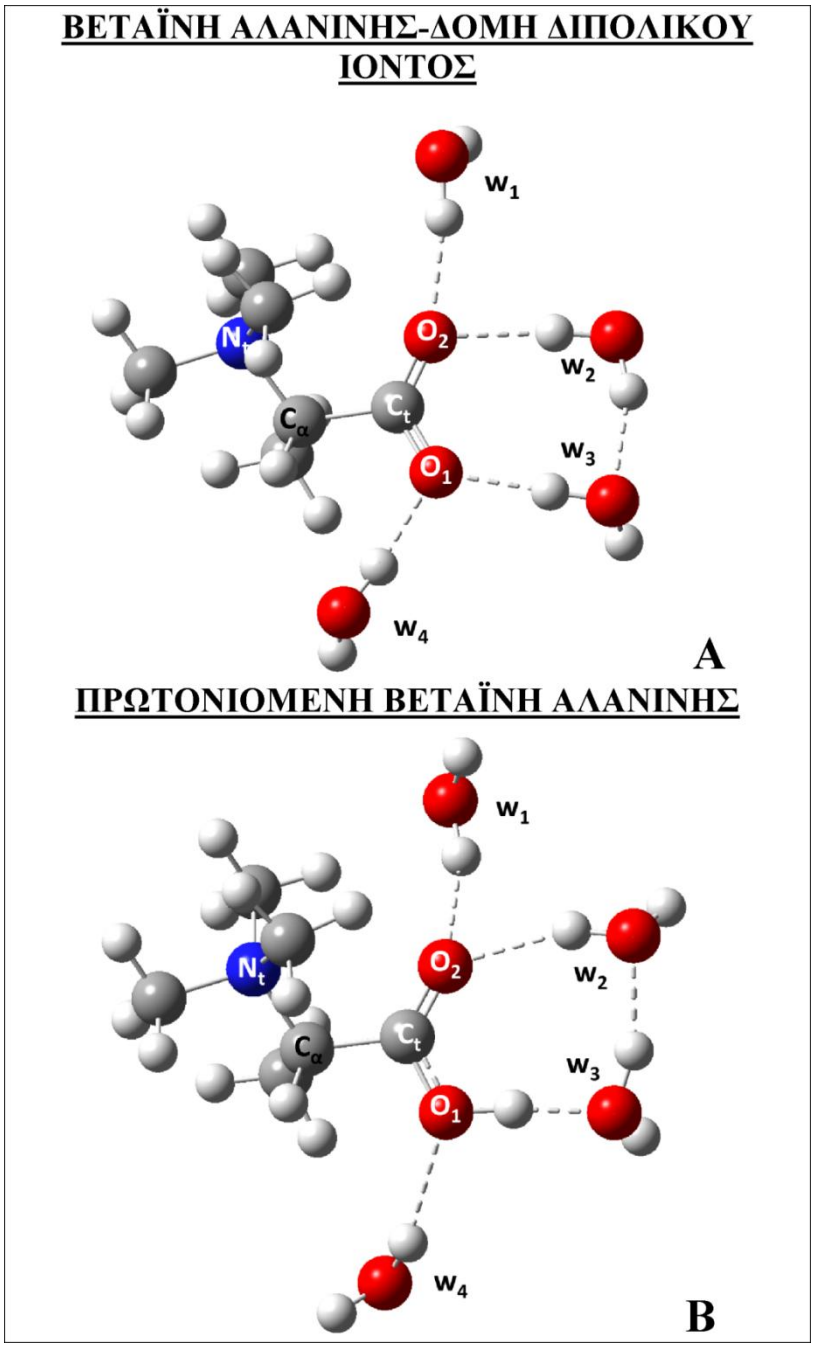
[13] Όμοια με την πρωτονιομένη αλανίνη και ακετυλο-αλανίνη υπάρχουν άλλες τρεις δομές-ισομερή της πρωτονιομένης κατάστασης της βεταΐνης της αλανίνης, οι οποίες αναφέρονται λεπτομερώς στο Παράρτημα IV.



Εικόνα 3.22 **(A)** Η δομή της κατάστασης διπολικού ιόντος της βεταΐνης της αλανίνης σε υδατικό διάλυμα **(B)** Η αντίστοιχη δομή της πρωτονιομένης κατάστασης του μορίου της βεταΐνης της αλανίνης.

Παλαιότερες έρευνες των Tritt-Goc και Fiat[32] μέσω NMR-^{17}O έδειξαν ότι η ενυδάτωση των αμινοξέων περιλαμβάνει 3 ή 4 μόρια νερού, λαμβάνοντας όμως υπόψη ότι μόνο η καρβοξυλομάδα τους μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με αυτά. Οι παραπάνω έρευνες επιβεβαιώνουν σε μεγάλο βαθμό τις παρούσες θεωρητικές μελέτες και δικαιολογούν το ότι στα μόρια των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων (που προσφέρουν περισσότερες θέσεις αλληλεπίδρασης με τα μόρια νερού) η πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης μπορεί να περιλαμβάνει 6 (σε pH = 6.0) και 7 μόρια νερού (πρωτονιομένη κατάσταση). Αυτή η υπόθεση έρχεται να επιβεβαιωθεί με την επίσης πολύ πρόσφατη μελέτη των Yuheng Yao et al.,[46] που προσπάθησαν μέσω διαφόρων ισχυρών θεωρητικών μελετών (Monte Carlo

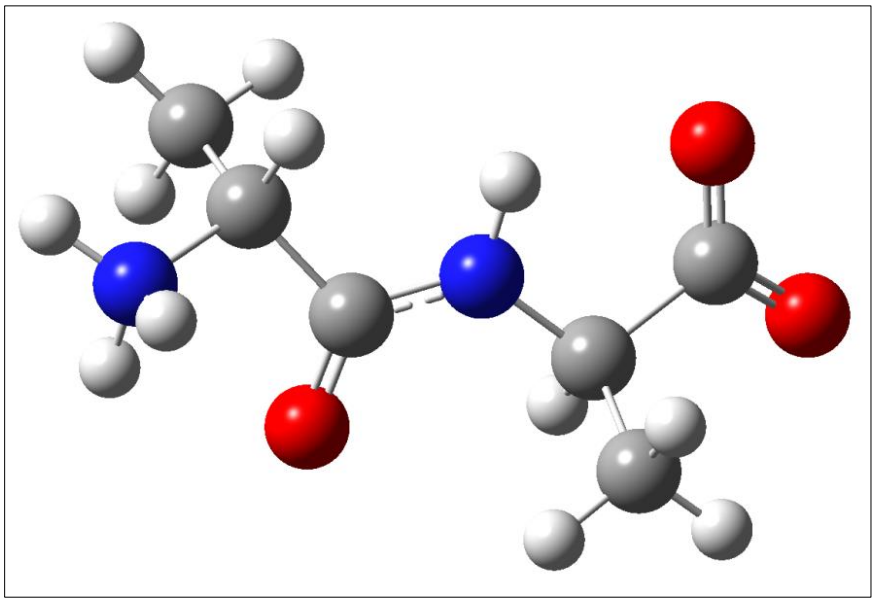
υπολογισμούς και ab-initio υπολογισμούς/MP2) να υπολογίσουν ακριβώς τον αριθμό και την τοπολογία των μορίων νερού στη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης του μορίου της αποπρωτονιομένης γλυκίνης, όπου κατέληξαν σε μία δομή με μέσω όρο 6 μόρια νερού, με ελάχιστα διαφοροποιημένη διάταξη σε σχέση με τις παρούσες δομές του μορίου της αλανίνης.



Εικόνα 3.23(Α) Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της βεταΐνης της αλανίνης στη κατάσταση διπολικού ιόντος (4 μόρια νερού) **(Β)** Η αντίστοιχη πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης της πρωτονιομένης κατάστασης της της βεταΐνης της αλανίνης (4 μόρια νερού).

3.1.4.4 Διπεπτίδια-Η περίπτωση του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη

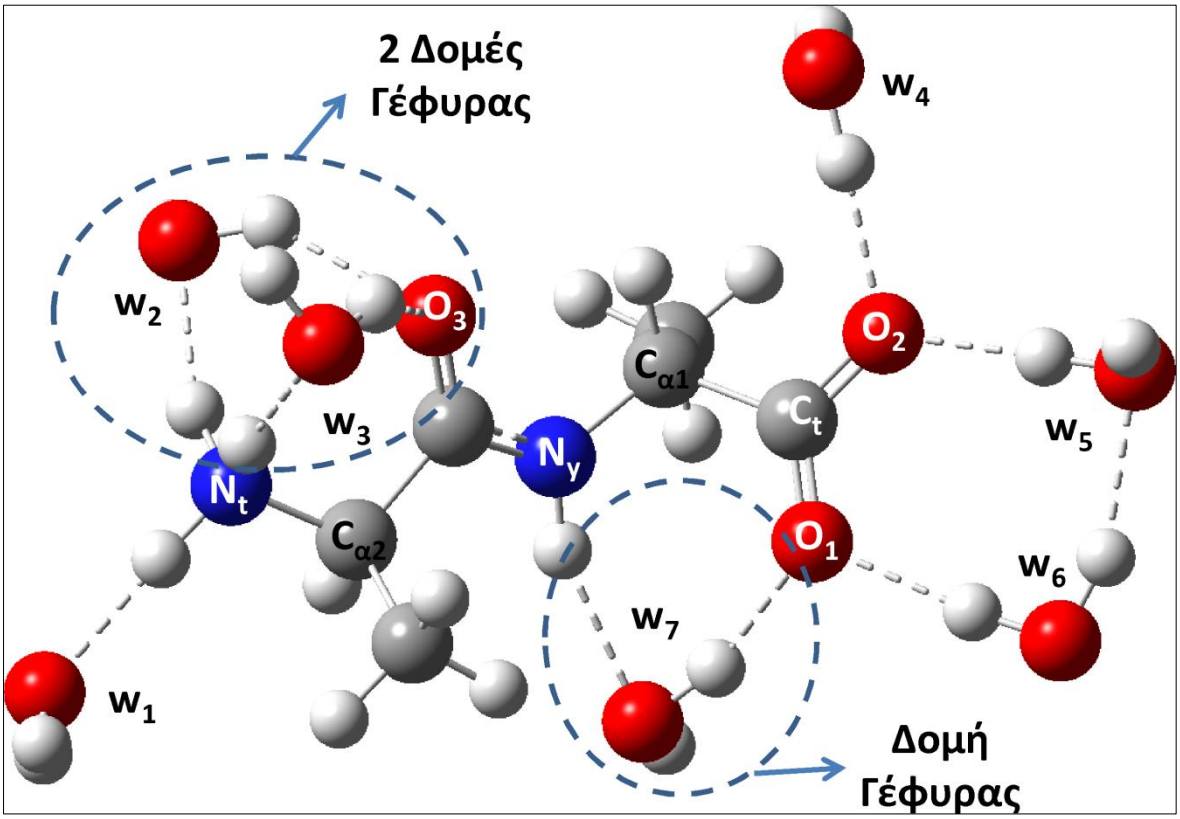
Όπως προαναφέρθηκε η μελέτη ενυδάτωσης των διπεπτιδίων εστιάστηκε στη διπολικού ιόντος κατάστασής τους. Έτσι η θεωρητική προσέγγιση του βαθμού ενυδάτωσής των πραγματοποιήθηκε μόνο στην παραπάνω ιοντική τους κατάσταση. Η χαμηλότερη ενεργειακά δομή του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη στην διπολικού ιόντος κατάστασής του σε υδατικό διάλυμα, περιγράφεται στην Εικόνα 3.24.



Εικόνα 3.24 Η δομή της κατάστασης διπολικού ιόντος του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη σε υδατικό διάλυμα.

Επομένως, η προσομοίωση του μέγιστου αριθμού των άμεσα αλληλεπιδρώντων μορίων νερού με το μόριο του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη πραγματοποιήθηκε και για την παραπάνω δομή. Αφού ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με την αλανίνη και τα παράγωγά της, διαπιστώθηκε ότι ο μέγιστος αριθμός μορίων νερού που μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με το μόριο του διπεπτιδίου της αλανίνης είναι 7 (Εικόνα 3.25).

Σύμφωνα λοιπόν με την Εικόνα 3.25, παρατηρείται ο σχηματισμός τριών δομών γέφυρας: 2 δομές σχηματίζονται μεταξύ του O3 και της αμινομάδας του διπεπτιδίου και άλλη μία δομή σχηματίζεται μεταξύ του O1 και της ιμινο ομάδας του πεπτιδικού δεσμού. Η τελευταία δομή γέφυρας έρχεται να επαληθεύσει την παραπάνω μελέτη της ακετυλο-αλανίνης, όπου πάλι εμφανίζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και στην ίδια τοπολογία.



Εικόνα 3.25 Η δομή της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη στη κατάσταση διπολικού ιόντος (7 μόρια νερού). Όπως απεικονίζεται εμφανίζονται 3 δομές γέφυρας με τη συμμετοχή 3 μορίου νερού (2 στο αμινοτελικό άκρο και 1 στην ιμινο ομάδα) και η δομή των τεσσάρων αλληλεπιδρώντων μορίων νερού με το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει η ίδια με τα αμινοξέα, ακετυλο-αμινοξέα και βεταΐνες.

3.1.5 Συσχέτιση Φασματοσκοπικών και Κβαντομηχανικών Αποτελεσμάτων

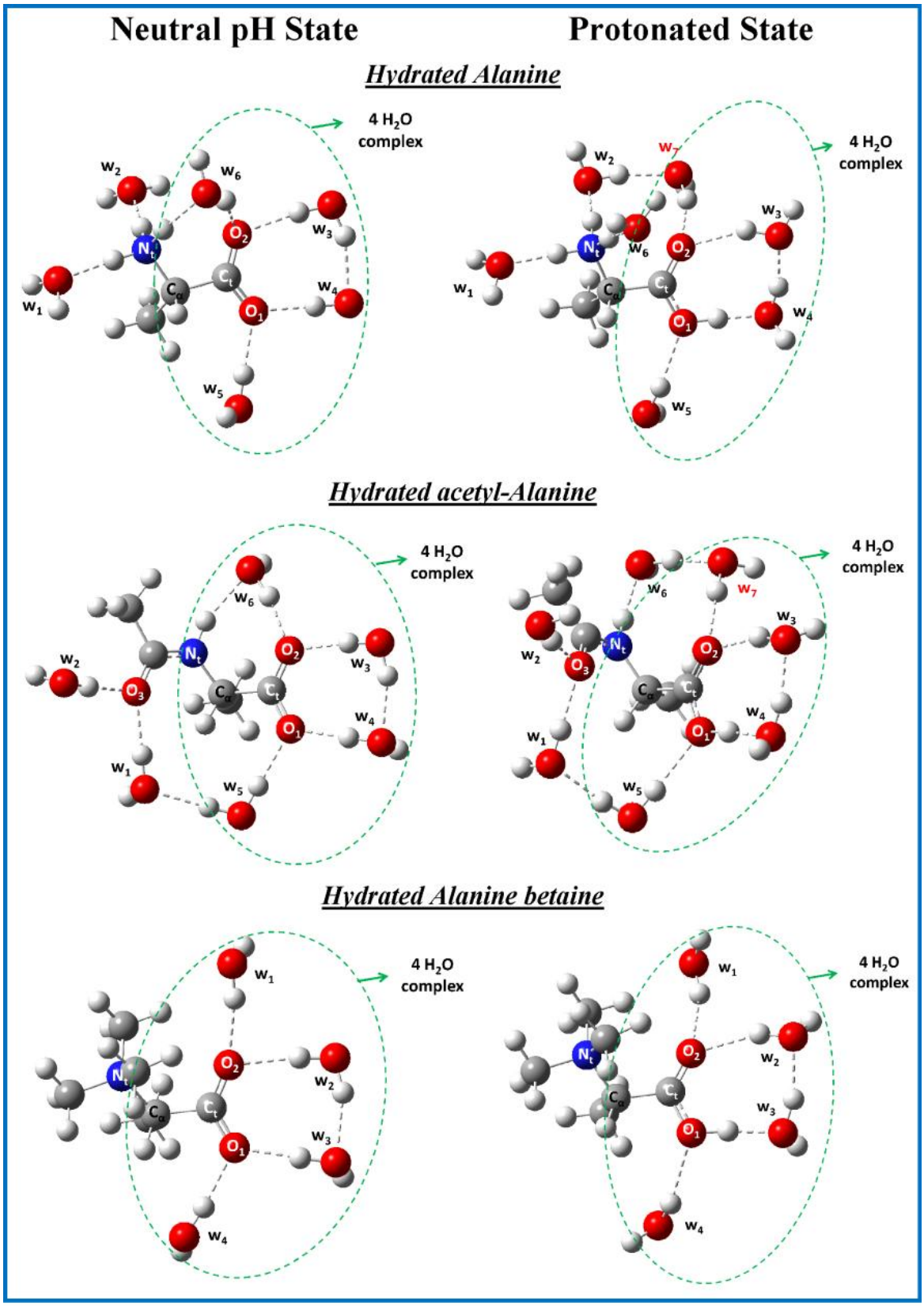
Η θεωρητική προσέγγιση της ενυδάτωσης των δομών διπολικού ιόντος και πρωτονιομένου μορίου της αλανίνης έδειξε ότι ένα επιπλέον μόριο νερού μπορεί να συμμετέχει στην ενυδάτωση της πρωτονιομένης κατάστασης. Το ίδιο συμπέρασμα εξήχθη και για την πρωτονιομένη κατάσταση του μορίου της ακετυλο-αλανίνης, αφού παράλληλα διαπιστώθηκε ότι ο ίδιος αριθμός μορίων νερού μπορούν να αλληλεπιδράσουν στα μόρια της αλανίνης και της ακετυλο-αλανίνης στις δύο ιοντικές καταστάσεις τους αντίστοιχα. Το μόριο της βεταΐνης της αλανίνης, αποδείχθηκε ότι ενυδατώνεται με τέσσερα μόρια νερού ανεξαρτήτως ιοντικής κατάστασής του. Δηλαδή η διαφορά ενυδάτωσης των μορίων των βεταϊνών σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινοξέα / ακετυλο-αμινοξέα καταδείχτηκε σε 2 και 3

μόρια νερού λιγότερη από την διπολικού ιόντος και πρωτονιομένης τους κατάστασης, αντίστοιχα. Διακρίνεται λοιπόν, μια απόλυτη ταύτιση της θεωρητικής και της πειραματικής προσέγγισης της ενυδάτωσης των αμινοξέων και των παραγώγων τους.

Παράλληλα, αποσαφηνίζεται και θεωρητικά ότι η επιπλέον ενυδάτωση του ενός μορίου νερού της πρωτονιομένης κατάστασης των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων, ρυθμίζεται από την αμινομάδα τους (Εικόνα 3.26).

Η συμπληρωματικότητα, ταύτιση των θεωρητικών και φασματοσκοπικών μελετών (κυρίως για την αποκατάσταση του $^{13}C_{\alpha}$, που εξάλλου αποδείχθηκε πιο ακριβής) προκαλεί μια περαιτέρω επιβεβαίωση για όλα τα εξαγόμενα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης ενυδάτωσης και οδηγεί στην πλήρη αποσαφήνιση της επιδιαλύτωσης στα υδατικά διαλύματα τριών σημαντικών, για την λειτουργία των πρωτεϊνών και κυττάρων, ομάδων βιομορίων.

Επιπλέον, για πρώτη φορά προσεγγίζεται πειραματικά ο αριθμός των μορίων νερού που συμμετέχουν στην πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσης των διπεπτιδίων (7-8 μόρια νερού) στην κατάσταση του διπολικού τους ιόντος. Τέλος, αναδεικνύεται μία μέθοδος μεγάλης ακρίβειας για την προσέγγιση των αριθμών μορίου νερού που αλληλεπιδρούν άμεσα με τα αμινοξέα και παράγωγά τους και προφανώς μετέχουν στην πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσής των.



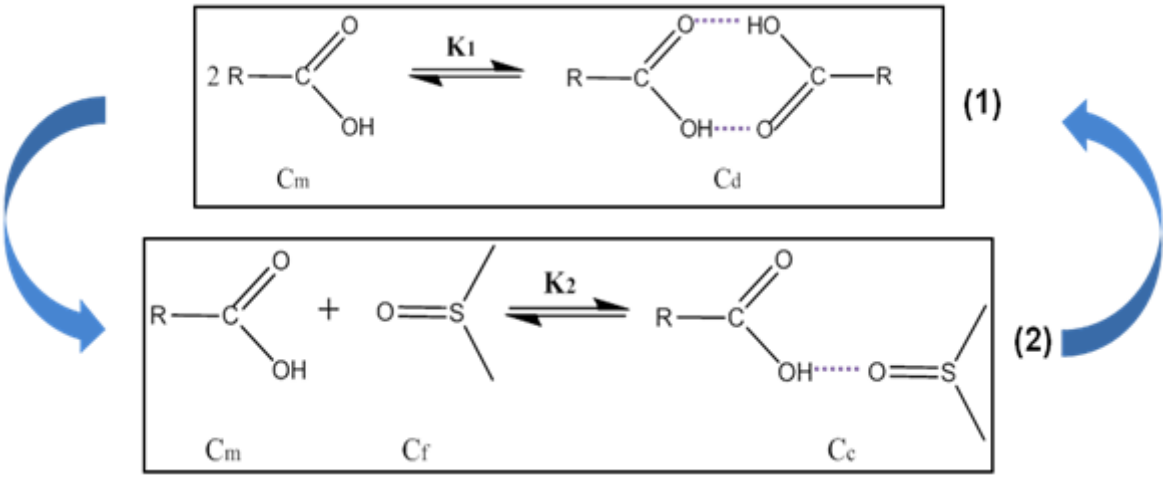
Εικόνα 3.26 Παρατηρείται ότι 4 μόρια νερού (διακεκομμένοι κύκλοι) αλληλεπιδρούν παρόμοια με την καρβοξυλομάδα της αλανίνης, της ακετυλο-αλανίνης και της βεταΐνης της αλανίνης ανεξαρτήτως της ιοντικής κατάστασής των. Αυτό αναδεικνύει το ρόλο της αμινο και ιμινο ομάδας στην επιπλέον ενυδάτωση της πρωτονιομένης κατάστασης της αλανίνης και ακέτυλο αλανίνης.

3.2 Αλληλεπίδραση των ομάδων –COOH και –NH με τον διαλύτη DMSO

3.2.1 Αποτελέσματα NMR-^{1}H για την ομάδα -COOH

Στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διατριβής, παρουσιάστηκαν οι παράγοντες που συνεισφέρουν στη χημική μετατόπιση των συχνοτήτων συντονισμού (NMR σημάτων) στους υπό μελέτη πυρήνων. Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες περιλαμβάνονται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου (ανάλογα με την έντασή του) και η μεταβολή της θερμοκρασίας., οι οποίοι θα εκμεταλλευτούν για την μελέτη αλληλεπίδρασης των ομάδων -COOH και -NH με τα μόρια του διαλύτη DMSO καθώς και για την θερμοδυναμική ανάλυση των συμπλόκων που σχηματίζονται.

Όσον αφορά την περίπτωση των ομάδων -COOH, είναι γνωστό ότι σε διάλυμα διαλύτη DMSO θα ισχύουν οι ισορροπίες που περιγράφονται στην Εικόνα 3.27, όπου K_1 και K_2



Εικόνα 3.27 Οι ισορροπίες που συμβαίνουν μεταξύ των μορίων ενός καρβοξυλικού οξέος με τα μόρια του διαλύτη DMSO σε διάλυμα άνυδρου DMSO: (1) Ο σχηματισμός διμερούς, K_1 η σταθερά σχηματισμού του και (2) Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ ενός μορίου καρβοξυλικού οξέος με ένα μόριο DMSO, K_2 η σταθερά σχηματισμού του υδρογονικού δεσμού.

οι σταθερές που τις διέπουν, C_m, C_d οι συγκεντρώσεις των οξέων στη μονομερή και διμερή τους κατάσταση αντίστοιχα, C_f η συγκέντρωση των «ελεύθερων» μορίων του DMSO και C_c η συγκέντρωση των μορίων DMSO και οξέος που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών υδρογόνου. Είναι προφανές ότι η ισορροπία (1) πραγματοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό όταν η συγκέντρωση του οξέος είναι υψηλή. Αυτό συμβαίνει επειδή η περίσσεια του

διαλύτη, δηλαδή η υψηλή του συγκέντρωση σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του οξέος, ευνοεί το σχηματισμό του μεικτού διμερούς. Σε μικρές συγκεντρώσεις οξέος λοιπόν, κυριαρχεί η ισορροπία (2), που περιγράφει την αλληλεπίδραση ενός μορίου DMSO με το Η της ομάδας –COOH των οξέων (Εικόνα 3.27).

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω ισορροπίες προκύπτουν οι παρακάτω σχέσεις:

$$C_m + 2C_d + C_c = C_0 \ , \tag{3.16}$$

όπου C_0 η ολική συγκέντρωση του οξέος.

$$C_f + C_c = C_s \ , \tag{3.17}$$

όπου C_s η ολική συγκέντρωση του διαλύτη DMSO.

Από τις ισορροπίες (1) και (2) ισχύει επίσης:

$$K_1 = \frac{C_d}{C_m^2} \tag{3.18}$$

$$K_2 = \frac{C_c}{C_m C_f} \tag{3.19}$$

$$C_f = \frac{C_s}{1+K_2 C_m} \tag{3.20}$$

$$C_c = \frac{K_2 C_s C_m}{1+K_2 C_m} \tag{3.21}$$

και

$$C_d = K_1 C_m^2 \ , \tag{3.22}$$

Ο συνδυασμός των σχέσεων 3.17-3.22 και η αντικατάστασή τους στην σχέση 3.16 παράγουν την παρακάτω τριτοβάθμια εξίσωση:

$$2K_1K_2C_m^3 + (2K_1 + K_2)C_m^2 + [1 + K_2(C_s - C_0)]C_m - C_0 = 0 \tag{3.23}$$

Η λύση[14] της εξίσωσης (3.23) προσδιορίζει την συγκέντρωση του μονομερούς οξέος (C_m) και ισούται με:

[14] Ως τριτοβάθμια, η εξίσωση (3.23) διαθέτει τρεις λύσεις. Όμως μόνο μία λύση είναι αποδεκτή (έχει φυσική σημασία), επειδή μόνο αυτή ικανοποιεί την προϋπόθεση ότι, όταν η ολική συγκέντρωση του οξέος, C_0, τείνει στο μηδέν τότε πρέπει και η τιμή της συγκέντρωσης του μονομερούς, C_m, να μηδενίζεται (Η εξίσωση 3.23 επιλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού *WOLFRAM MATHEMATICA 7.0*)

$$
\begin{aligned}
Cm :\; & \frac{2\,K1 + K2}{6\,K1\,K2} \cdot \Big(\cdot \big(2\,K1 + K2 \big)^2 + 6\,K1\,K2 \big(1 - C\,K2 + Cs\,K2 \big) \Big) \\
& \Big(3\,2^{2/3}\,K1\,K2 \\
& \quad \Big(- 16\,K1^3 + 12\,K1^2\,K2 + 6\,K1\,K2^2 + 72\,C\,K1^2\,K2^2 + 36\,Cs\,K1^2\,K2^2 - 2\,K2^3 - 18\,C\,K1\,K2^3 + 18\,Cs\,K1\,K2^3 + \\
& \qquad \Big(\Big(- 16\,K1^3 + 12\,K1^2\,K2 + 6\,K1\,K2^2 + 72\,C\,K1^2\,K2^2 + 36\,Cs\,K1^2\,K2^2 - 2\,K2^3 - 18\,C\,K1\,K2^3 + 18\,Cs\,K1\,K2^3 \Big)^2 + \\
& \qquad\quad 4 \Big(- \big(2\,K1 + K2 \big)^2 + 6\,K1\,K2 \big(1 - C\,K2 + Cs\,K2 \big) \Big)^3 \Big)^{1/3} \Big) + \frac{1}{6\,2^{1/3}\,K1\,K2} \\
& \Big(- 16\,K1^3 + 12\,K1^2\,K2 + 6\,K1\,K2^2 + 72\,C\,K1^2\,K2^2 + 36\,Cs\,K1^2\,K2^2 - 2\,K2^3 - 18\,C\,K1\,K2^3 + 18\,Cs\,K1\,K2^3 + \\
& \qquad \Big(\Big(- 16\,K1^3 + 12\,K1^2\,K2 + 6\,K1\,K2^2 + 72\,C\,K1^2\,K2^2 + 36\,Cs\,K1^2\,K2^2 - 2\,K2^3 - 18\,C\,K1\,K2^3 + 18\,Cs\,K1\,K2^3 \Big)^2 + \\
& \qquad\quad 4 \Big(- \big(2\,K1 + K2 \big)^2 + 6\,K1\,K2 \big(1 - C\,K2 + Cs\,K2 \big) \Big)^3 \Big)^{1/3}
\end{aligned}
$$

Η λύση της εξίσωσης (3.23) αποδεικνύει ότι η συγκέντρωση C_m συνδέεται με τις σταθερές ισορροπίας K_1 και K_2 και τις ολικές συγκεντρώσεις DMSO και οξέος.

Οι χημικές μετατοπίσεις των παρατηρούμενων φασμάτων NMR-^{1}H, σε διάφορες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων, αντιπροσωπεύουν τις προαναφερθέντες ισορροπίες. Σε περιπτώσεις ταχείας ανταλλαγής (όπως στη συγκεκριμένη), οι μετατοπίσεις του διαλύτη DMSO εκφράζονται από τη σχέση:

$$\delta_{o.s} = X_f \delta_f + X_c \delta_c \xLeftrightarrow{(3.19),(3.20),(3.21)} \delta_{o,s} = \delta_c + \frac{\delta_f - \delta_c}{1 + K_2 C_m}, \qquad (3.24)$$

όπου $\delta_{o,s}$ η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση των πρωτονίων του DMSO, X_f και X_c το γραμμομοριακό κλάσμα των μη αλληλεπιδρώντων μορίων DMSO («ελεύθερο» DMSO) και αυτών που αλληλεπιδρούν («δεσμευμένου» DMSO) με την –COOH ομάδα αντίστοιχα, δ_f και δ_c οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του «ελεύθερου» και «δεσμευμένου» DMSO, αντιστοίχως. Επισημαίνεται ότι όλες οι χημικές μετατοπίσεις ορίστηκαν βάσει αυτής του *TMSP* σε DMSO (C_{TMSP} = 20 μM) ως internal reference.

Η σχέση (3.24) περιλαμβάνει την τιμή της συγκέντρωσης C_m και αν συνδυαστεί με τη λύση της εξίσωσης (3.23), συνδέει τις μετρούμενες χημικές μετατοπίσεις ^{1}H-NMR του διαλύτη DMSO με τις σταθερές που διέπουν τις ισορροπίες (1) και (2), επιτρέποντας τον υπολογισμό τους. Για τον υπολογισμό των σταθερών K_1 και K_2 απαιτείται, μετά την αντικατάσταση του C_m στην εξίσωση (3.24), η ελαχιστοποίηση μιας μεγάλου βαθμού πολυπλοκότητας εξίσωσης. Η επίτευξη της ελαχιστοποίησης διεξήχθη μέσω ενός «homemade» λογισμικού, βασισμένο στη γλώσσα προγραμματισμού *FORTRAN*, με τη χρήση της μαθηματικής βιβλιοθήκης *NAG*.

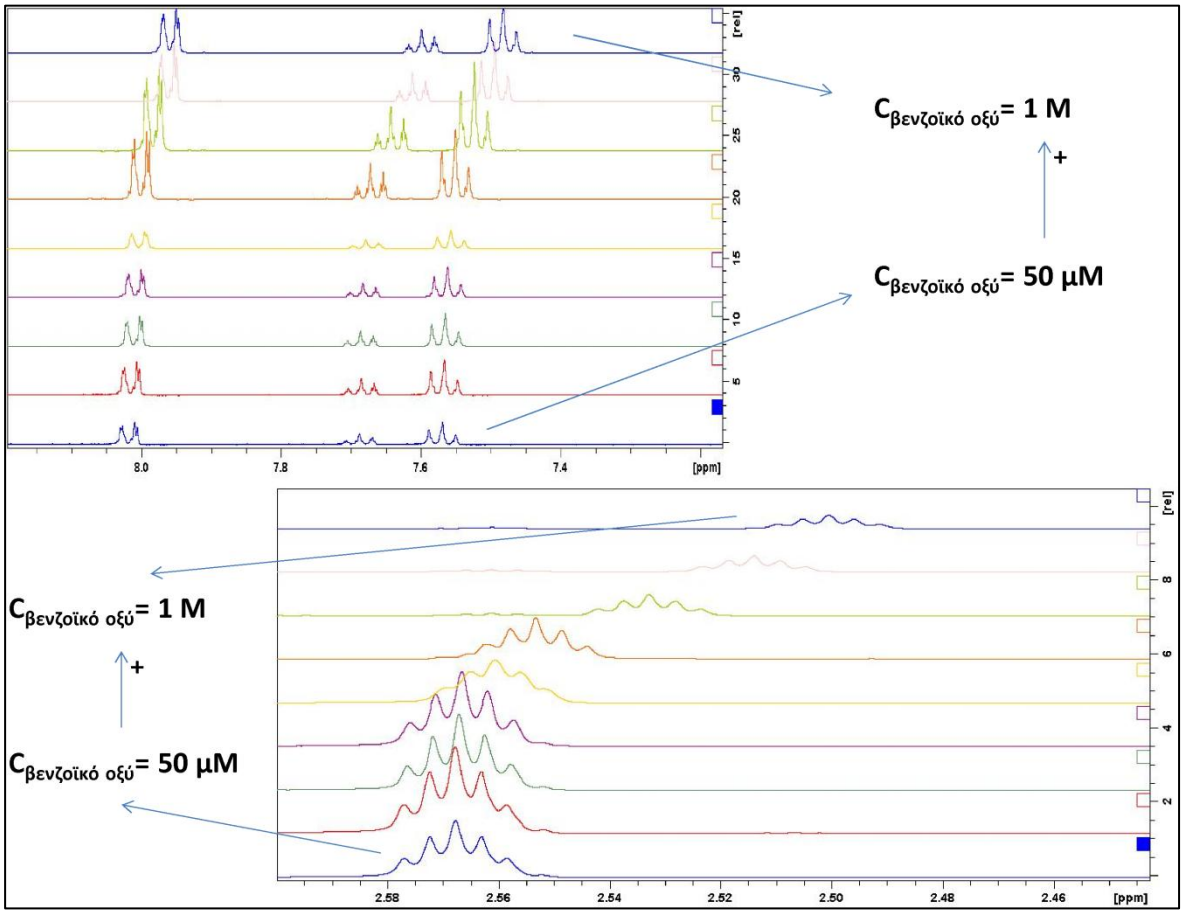
Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη προσεγγίζει την αλληλεπίδραση –COOH· · ·DMSO μέσω των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του διαλύτη DMSO. Μεγάλο ενδιαφέρον θα αποτελούσε η εφικτή προσέγγιση της εν λόγω αλληλεπίδρασης μέσω των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων των ενώσεων-μοντέλων που βρίσκονται πλησίον της ομάδας –COOH, όπου και αναπτύσσεται ο δεσμός υδρογόνου με το DMSO ή ο σχηματισμός των διμερών. Αυτή η προσέγγιση θα προκαλούσε μια τεράστια αύξηση της πολυπλοκότητας άρα και της αστάθειας των συναρτήσεων που θα έπρεπε να ελαχιστοποιηθούν, λόγω της συμμετοχής των χημικών μετατοπίσεων των διμερών μεταξύ των μορίων κάθε οξέος. Γι' αυτόν τον λόγο δεν προτιμήθηκε η παραπάνω προσέγγιση.

3.2.1.1 Η περίπτωση της –COOH ομάδας (βενζοϊκό και οξικό οξύ)

Όπως προαναφέρθηκε, μια αποτελεσματική μέθοδος προσδιορισμού μοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως οι υπό μελέτη σχηματισμοί δεσμών υδρογόνου μεταξύ της ομάδας –COOH και των μορίων DMSO, είναι η παρατήρηση και η μετέπειτα επεξεργασία των ^{1}H χημικών μετατοπίσεων των συμμετεχόντων μορίων στην εν λόγω αλληλεπίδρασή τους. Αυτές οφείλουν να μεταβάλλονται (όπως αναλύθηκε στο Θεωρητικό Μέρος), με την αυξομείωση της συγκέντρωσης του διαλύματος της υπό μελέτη ένωσης, που περιέχει την ομάδα –COOH. Παράλληλα, μια περαιτέρω θερμοκρασιακή αυξομείωση των υπό μελέτη διαλυμάτων, που με την σειρά της οδηγεί σε επιπλέον μεταβολές των παρατηρούμενων ^{1}H χημικών μετατοπίσεων, επιτρέπει την θερμοδυναμική μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται.

Στις υψηλές συγκεντρώσεις (1-0.05 M) των οξέων παρατηρούνται μεγάλες μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του DMSO και των υπό μελέτη ενώσεων, υποδεικνύοντας τον εύλογο σχηματισμό διμερών των μορίων του βενζοϊκού και οξικού οξέος, ενώ καθώς τα διαλύματα γίνονται όλο και πιο αραιά οι μεταβολές μικραίνουν φτάνοντας ουσιαστικά σε ένα πλατό (Εικόνες 3.28 και 3.29). Πρακτικά, η χημική μετατόπιση των πρωτονίων του DMSO στη συγκέντρωση των 50 μM του κάθε οξέος αντιπροσωπεύει τη χημική μετατόπιση των μη αλληλεπιδρώντων μορίων DMSO (δ_f). Παράλληλα, η χημική μετατόπιση των μορίων του DMSO στην υψηλότερη συγκέντρωση των διαλυμάτων (1 M) αντιπροσωπεύει τη χημική μετατόπιση του συνολικού αριθμού των

αλληλεπιδρώντων-δεσμευμένων μορίων DMSO με την ομάδα -COOH των υπό μελέτη ενώσεων (δ_c). Υπενθυμίζοντας τη λύση της εξίσωσης (3.23) και την εξίσωση (3.24), βάσει των οποίων υπολογίζονται οι σταθερές K_1 και K_2, παρατηρείται ότι η προσεγγιστική γνώση των τιμών των μεταβλητών δ_f και δ_c είναι προαπαιτούμενη για την ελαχιστοποίηση της εξίσωσης που οδηγεί στον προσδιορισμό των παραπάνω σταθερών.

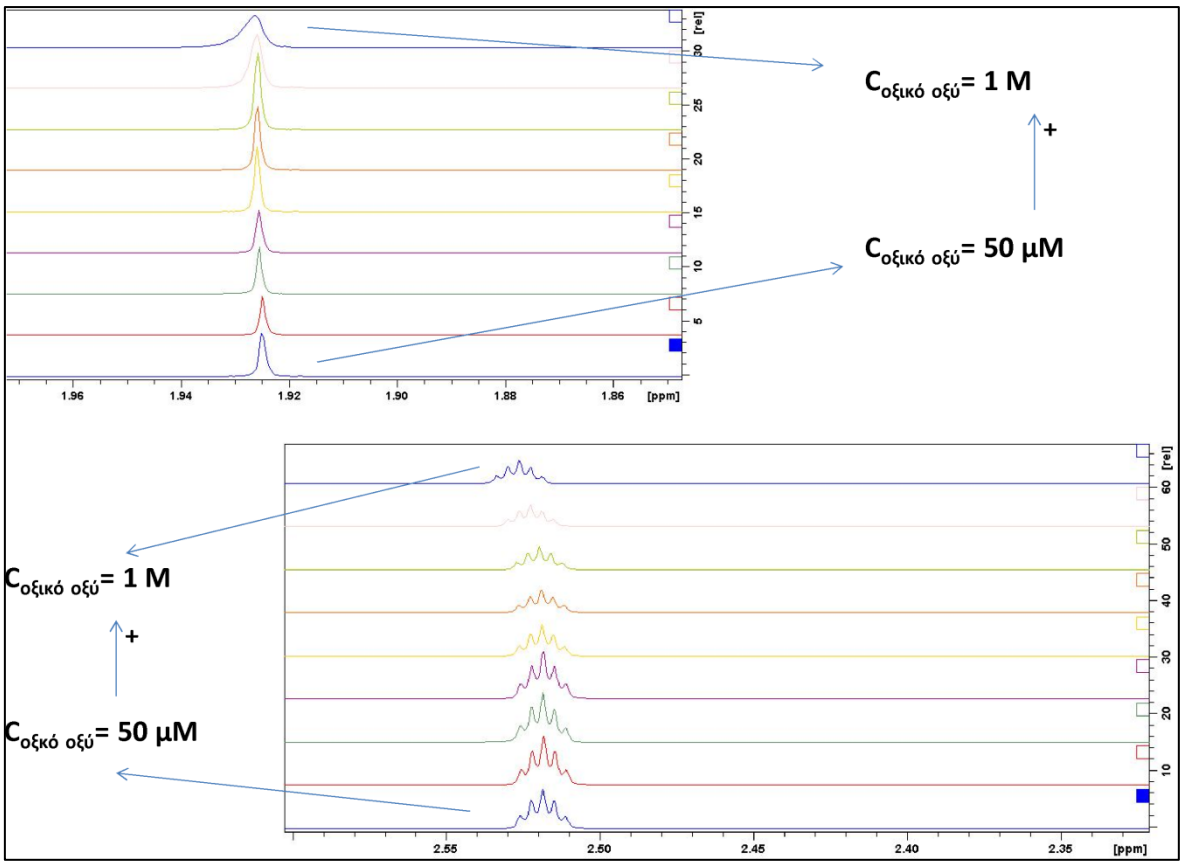


Εικόνα 3.28 (Επάνω) Διακρίνεται η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του βενζοϊκού δακτυλίου κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του βενζοϊκού οξέος σε DMSO (25 ^{0}C). (Κάτω) Παρόμοια παρατηρείται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του DMSO κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του βενζοϊκού οξέος (25 ^{0}C).

Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι ο προσδιορισμός των σταθερών K_1 και K_2 για το βενζοϊκό και οξικό οξύ, για όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 3.17).

Πίνακας 3.17 Οι σταθερές K_1 και K_2 σε 5 θερμοκρασίες για το βενζοϊκό και οξικό οξύ σε DMSO

T (K)	*Οξικό οξύ*		*Βενζοϊκό οξύ*	
	K_1	K_2	K_1	K_2
298	0.0130 ± 0.02	0.889 ± 0.2	0.0161 ± 0.02	0.793 ± 0.2
303	0.0126 ± 0.02	0.890 ± 0.3	0.0156 ± 0.02	0.787 ± 0.2
308	0.0115 ± 0.02	0.885 ± 0.2	0.0155 ± 0.02	0.764 ± 0.1
313	0.0112 ± 0.02	0.880 ± 0.2	0.0146 ± 0.02	0.757 ± 0.2
320	0.0101 ± 0.02	0.861 ± 0.2	0.0138 ± 0.02	0.757 ± 0.2



Εικόνα 3.29 (Επάνω) Διακρίνεται η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων της μεθυλομάδας του οξικού οξέος κατά την αύξηση της συγκέντρωσής του σε DMSO (25 ^{0}C). (Κάτω) Παρόμοια παρατηρείται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του DMSO κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος (25 ^{0}C).

Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται παρατηρείται ότι οι τιμές των K_1, K_2 μειώνονται, γεγονός το οποίο είναι απόλυτα λογικό. Παράλληλα η σταθερά K_2 είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την K_1, υποδηλώνοντας την ισχυρότατη αλληλεπίδραση (σχηματισμός δεσμών υδρογόνου) των μορίων DMSO με την καρβοξυλομάδα. Συγκρίνοντας τις τιμές K

που υπολογίστηκαν για τα δύο οξέα παρατηρείται η ομοιότητά τους και το γεγονός ότι η σταθερά K_2 είναι και στις δύο περιπτώσεις πολύ μεγαλύτερη από την K_1. Έτσι, είναι εύλογο να θεωρηθεί ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των σταθερών ισορροπίας K είναι ακριβής και ο σχηματισμός του συμπλόκου -COOH· · ·DMSO ευνοείται σε σχέση με το σχηματισμό διμερών μεταξύ των μορίων των οξέων.

Έχοντας υπολογίσει τις τιμές των σταθερών K_1 και K_2 για πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες, είναι εφικτός και ο υπολογισμός των θερμοδυναμικών σταθερών (Πίνακας 3.18) των υπό μελέτη σχηματιζόμενων συμπλόκων μέσω της εξίσωσης Van't Hoff:

$$\ln K(T) = -\frac{\Delta H^0}{R}\frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R}, \qquad (3.25)$$

όπου ΔH^0 και ΔS^0 η μεταβολή της κανονικής ενθαλπίας και εντροπίας των παραπάνω αντιδράσεων οι οποίες συνδέονται με τη μεταβολή της κανονικής ενέργειας Gibbs (ΔG^0) μέσω της σχέσης:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \qquad (3.26)$$

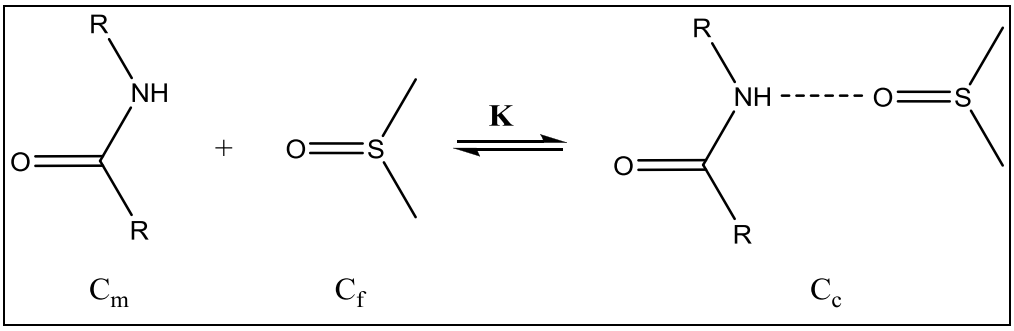
Πίνακας 3.18 Η θερμοδυναμική ανάλυση των συμπλόκων που σχηματίζονται σε διαλύματα βενζοϊκού και οξικού οξέος σε DMSO.

	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol*K)	$T\Delta S^0$ (298 K) (kJ/mol)	ΔG^0 (298 K) (kJ/mol)
Διμερές Οξικού οξέος	-9.40	-67.50	-20.12	10.73
Οξικό οξύ-DMSO	-0.99	-4.22	-1.26	0.26
Διμερές Βενζοϊκού οξέος	-5.54	-52.82	-15.74	10.21
Βενζοϊκό οξύ-DMSO	-1.89	-8.28	-2.47	0.58

Η σύγκριση των τιμών $|\Delta H^0|$ και $|T\Delta S^0|$ ($|\Delta H^0| < |T\Delta S^0|$) τόσο για το σύμπλοκο οξέος-DMSO όσο και για το σχηματισμό διμερών καταλήγει στο συμπέρασμα ότι όλες οι αλληλεπιδράσεις και ο σχηματισμός των εν λόγω συμπλόκων καθοδηγούνται εντροπικά.

3.2.2 Αποτελέσματα NMR-^{1}H για την ομάδα -NH

Όσον αφορά την μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιμιδικού υδρογόνου της ομάδας –NH ενός πεπτιδικού δεσμού με τα μόρια του διαλύτη DMSO, η κατάσταση είναι λιγότερο περίπλοκη σε σχέση με την ομάδα –COOH, λόγω της μη ύπαρξης σχηματισμού διμερών. Έτσι, σε διάλυμα DMSO ισχύει η παρακάτω ισορροπία που περιγράφεται στην Εικόνα 3.30, όπου K η σταθερά που τη διέπει, C_m η συγκέντρωση της ένωσης που περιέχει τον πεπτιδικό δεσμό, C_f η συγκέντρωση των «ελεύθερων» μορίων του DMSO και C_c η συγκέντρωση των μορίων DMSO και της προαναφερθείσας ένωσης που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου.



Εικόνα 3.30 Η ισορροπία που πραγματοποιείται μεταξύ των μορίων μίας ένωσης που περιλαμβάνει έναν πεπτιδικό δεσμό με τα μόρια του διαλύτη DMSO σε διάλυμα άνυδρου DMSO. Παρατηρείται ο δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του ιμιδικού υδρογόνου της ομάδας -NH με ένα μόριο DMSO, K_1 η σταθερά σχηματισμού του υδρογονικού δεσμού.

Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω ισορροπία προκύπτουν οι παρακάτω σχέσεις:

$$C_m + C_C = C_0\,, \tag{3.27}$$

όπου C_0 η ολική συγκέντρωση της ουσίας που περιέχει την ομάδα –NH και

$$C_f + C_C = C_S \tag{3.28}$$

όπου C_s η ολική συγκέντρωση του διαλύτη DMSO.

Επιπλέον, από τις σχέσεις (3.27) και (3.28) προκύπτει ότι η σταθερά K ισούται με:

$$K = \frac{C_C}{C_f C_m} \Leftrightarrow K\left(C_S - C_C\right)\left(C_0 - C_C\right) - C_C = 0 \Leftrightarrow KC_S C_0 - KC_0 C_C - KC_S C_C + KC_C^2 - C_C = 0 \Leftrightarrow$$
$$\Leftrightarrow C_C = \frac{1 + K\left(C_0 + C_S\right) - \sqrt{\left[1 + K\left(C_0 + C_S\right)\right]^2 - 4K^2 C_S C_0}}{2K}. \tag{3.29}$$

Η 2ου βαθμού εξίσωση (3.29) περιγράφει την συγκέντρωση του συμπλέγματος -NH···DMSO ως προς την σταθερά K της ισορροπίας σχηματισμού του συμπλέγματος.

Οι παρατηρούμενες χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^{1}H του διαλύτη DMSO ($\delta_{o,s}$), στην περίπτωση της αλληλεπίδρασής του με την ομάδα –NH, αναμένεται να μεταβάλλονται παρόμοια με αυτές των ομάδων –NH ($\delta_{o,NH}$) λόγω της μη ύπαρξης περαιτέρω αλληλεπιδράσεων (π.χ. ο σχηματισμός διμερών των ομάδων –COOH κλπ.) και περιγράφονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\delta_{O,S} = \delta_f X_f + \delta_C X_C = \delta_f \frac{C_f}{C_S} + \delta_C \frac{C_C}{C_S} \tag{3.30}$$

$$\delta_{O,NH} = \delta_m X_m + \delta_C X_C = \delta_m \frac{C_m}{C_0} + \delta_C \frac{C_C}{C_0} \tag{3.31}$$

Λαμβάνοντας υπόψη τις σχέσεις (3.27), (3.28) και την εξίσωση (3.29), τότε οι σχέσεις (3.30) και (3.31) αναδιατυπώνονται ως εξής:

$$\delta_{O,S} = \delta_f \frac{C_f}{C_S} + \delta_C \frac{C_C}{C_S} = \delta_f \frac{C_S - C_C}{C_S} + \delta_C \frac{C_C}{C_S} =$$
$$= \delta_f + \left(\delta_C - \delta_f\right)\frac{C_C}{C_S} = \tag{3.32}$$
$$= \delta_f + \left(\delta_C - \delta_f\right)\frac{1 + K\left(C_0 + C_S\right) - \sqrt{\left[1 + K\left(C_0 + C_S\right)\right]^2 - 4K^2 C_S C_0}}{2KC_S}$$

$$\delta_{O,NH} = \delta_m \frac{C_m}{C_0} + \delta_C \frac{C_C}{C_0} = \delta_m \frac{C_0 - C_C}{C_0} + \delta_C \frac{C_C}{C_0} =$$

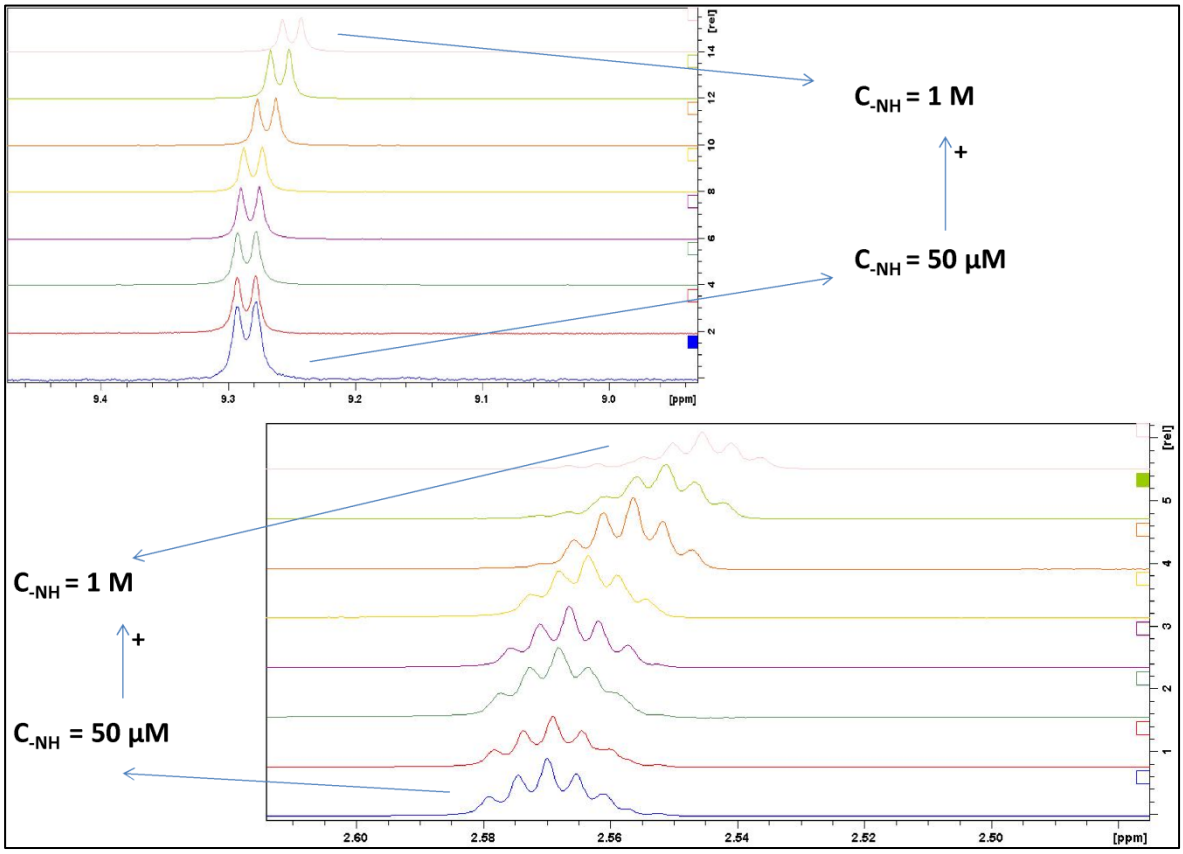
$$= \delta_m + \left(\delta_C - \delta_m\right)\frac{C_C}{C_0} = \tag{3.33}$$

$$= \delta_m + \left(\delta_C - \delta_m\right)\frac{1 + K\left(C_0 + C_S\right) - \sqrt{\left[1 + K\left(C_0 + C_S\right)\right]^2 - 4K^2 C_S C_0}}{2KC_0}$$

3.2.2.1 Η περίπτωση της ομάδας –NH (αιθυλεστέρας της N-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης)

Ο αιθυλεστέρας της N-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης (Εικόνα 2.6 **Γ**) αποτελεί την τέλεια ένωση μοντέλο όσον αφορά την χρήση της για την μελέτη της –NH ομάδας του πεπτιδικού δεσμού με τα μόρια του DMSO. Εκτός του γεγονότος ότι προσομοιάζει απόλυτα τη δομή του πεπτιδικού δεσμού, υπερτερεί των περισσοτέρων ενώσεων-μοντέλων που έχουν μελετηθεί έως σήμερα (N-μεθυλο-φορμαμίδιο, διμεθυλο-φορμαμίδιο κλπ.) για την αλληλεπίδραση της -NH ομάδας με τα μόρια του DMSO, διότι δε διαθέτει διαμορφωμερή, αποτελεί ένα (μη φυσικό) παράγωγο των αμινοξέων και δεν περιέχει επιμέρους περιοχές-ομάδες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα (δηλ. με δεσμούς υδρογόνου) με τα μόρια του DMSO. Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων η ένωση αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Έτσι, ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για τα μόρια του βενζοϊκού και οξικού οξέος, προέκυψαν οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^{1}H της ομάδας –NH και των μορίων του DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις της υπό μελέτη ένωσης για πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες.



Εικόνα 3.31 (Επάνω) Διακρίνεται η διαφορά των ^{1}H-NMR χημικών μετατοπίσεων της –NH ομάδας της υπό μελέτη ένωσης κατά την αύξηση της συγκέντρωσής της σε DMSO (25 ^{0}C). (Κάτω) Παρόμοια παρατηρείται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του DMSO κατά την αύξηση της συγκέντρωσης της υπό μελέτη ένωσης (25 ^{0}C).

Η ελαχιστοποίηση των εξισώσεων (3.32) και (3.33) οδηγεί στην τιμή της σταθεράς K σχηματισμού του συμπλόκου –NH···DMSO. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του DMSO (Εικόνα 3.31 κάτω) και της ομάδας –NH (Εικόνα 3.31 πάνω) στη συγκέντρωση των 50 μM της υπό μελέτη ένωσης δόθηκαν ως προσεγγιστικές αρχικές τιμές δ_f (για το DMSO) και δ_c (για την ομάδα –NH) αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες στη συγκέντρωση 1 M της υπό μελέτη ένωσης ως τιμές δ_c (για το DMSO) και δ_f (για την ομάδα –NH).

Η έκβαση όλων των παραπάνω ήταν ο προσδιορισμός της σταθεράς ισορροπίας K για την ένωση του αιθυλεστέρα της N-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης στο διαλύτη DMSO, για όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (Πίνακας 3.19).

Πίνακας 3.19 Η σταθερά K σε 5 θερμοκρασίες για τον αιθυλεστέρα της N-ακετυλο-2-κυανιο-γλυκίνης σε DMSO μέσω των χημικών μετατοπίσεων ^{1}H-NMR του DMSO και της –NH ομάδας.

T (K)	*αιθυλεστέρας της N-ακετυλο-2-κυανιο-Γλυκίνης*	
	K (-NH proton)	K (DMSO protons)
298	0.594 ± 0.1	0.446 ± 0.2
303	0.520 ± 0.2	0.439 ± 0.1
308	0.516 ± 0.2	0.430 ± 0.1
313	0.505 ± 0.2	0.416 ± 0.2
320	0.500 ± 0.2	0.416 ± 0.2

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.19 δείχνουν πως αναλόγως του τρόπου προσέγγισης προσδιορισμού της σταθεράς ισορροπίας K του σχηματισμού του συμπλόκου –NH· · ·DMSO παρατηρούνται κάποιες μικρές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά K εμφανίζεται μεγαλύτερη αν υπολογιστεί μέσω των χημικών μετατοπίσεων του πρωτονίου της ομάδας –NH σε σχέση με των πρωτονίων του DMSO. Η παραπάνω διαφορά είναι εύλογη και μπορεί να εξηγηθεί αφενός από το γεγονός ότι το πρωτόνιο της –NH ομάδας συμμετέχει άμεσα στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το DMSO, με αποτέλεσμα να υφίσταται μεγαλύτερη χημική μετατόπιση σε σχέση με τα πρωτόνια του DMSO και αφετέρου επειδή στα πυκνά κυρίως διαλύματα, η συγκέντρωση του DMSO δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια.

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με παραπάνω προσδιορίστηκαν οι θερμοδυναμικές σταθερές (Πίνακας 3.20) που χαρακτηρίζουν τον σχηματισμό του συμπλόκου -NH· · ·DMSO στην υπό μελέτη ένωση.

Πίνακας 3.20 Η θερμοδυναμική ανάλυση του συμπλόκου NH· · ·DMSO για τον αιθυλεστέρα της N-ακετυλο-2-κυανιο-Γλυκίνης σε διάλυμα DMSO.

	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol*K)	$T\Delta S^0$ (298 K) (kJ/mol)	ΔG^0 (298 K) (kJ/mol)
-NH proton	-5.49	-23.18	-6.90	1.41
DMSO protons	-2.78	-16.03	-4.78	2.00

Σύμφωνα με την παραπάνω θερμοδυναμική μελέτη επισημαίνεται ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου –NH˙˙˙DMSO καθοδηγείται εντροπικά, όπως και ο σχηματισμός όλων των συμπλόκων των υπό μελέτη οξέων στο DMSO.

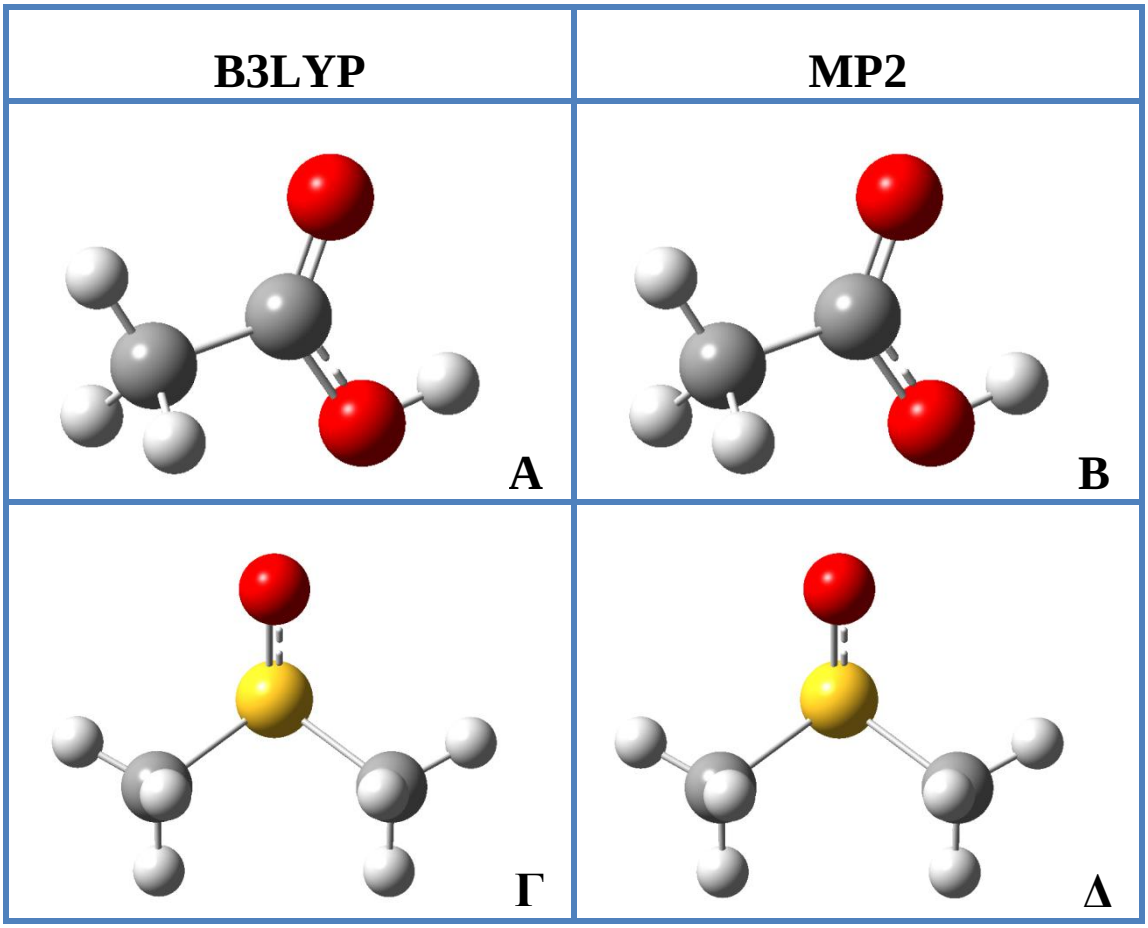
3.2.3 Αποτελέσματα Θεωρητικής Προσέγγισης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της –COOH ομάδας με τα μόρια του διαλύτη DMSO.[15]

Η κβαντομηχανική μελέτη της αλληλεπίδρασης του διαλύτη DMSO με την ομάδα -COOH, επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό και τη μελέτη των ισχυρών, όπως αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα NMR, δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε μέσω DFT (B3LYP/cc-pVTZ) και *ab initio* (MP2/cc-pVTZ) υπολογισμών η ενέργεια των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του ατόμου οξυγόνου των μορίων DMSO και του υδρογόνου της -COOH ομάδας, ενώ παράλληλα έγινε η αντίστοιχη θερμοδυναμική μελέτη των παραπάνω συμπλόκων. Θεωρητικές προσεγγίσεις για την αντίστοιχη αλληλεπίδραση των μορίων DMSO και της –NH ομάδας έχουν πραγματοποιηθεί πολλάκις, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, αποδεικνύοντας τον σχηματισμό υψηλής ενέργειας δεσμών υδρογόνου (8 kcal/mol[7]), υπονοώντας την μεγάλη ισχύ τους. Έτσι κρίθηκε μη απαραίτητη η πραγματοποίησή τους.

3.2.3.1 Η περίπτωση του οξικού οξέος

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της δομής του μορίου του οξικού οξέος, παρουσία της επίδρασης του διαλύτη DMSO, με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO) σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ (Εικόνα 3.32**A**) και MP2/cc-pVTZ (Εικόνα 3.32**B**).

[15] Σημειώνεται ότι η γεωμετρία όλων των δομών που ακολουθούν περιγράφεται στο Παράρτημα V.



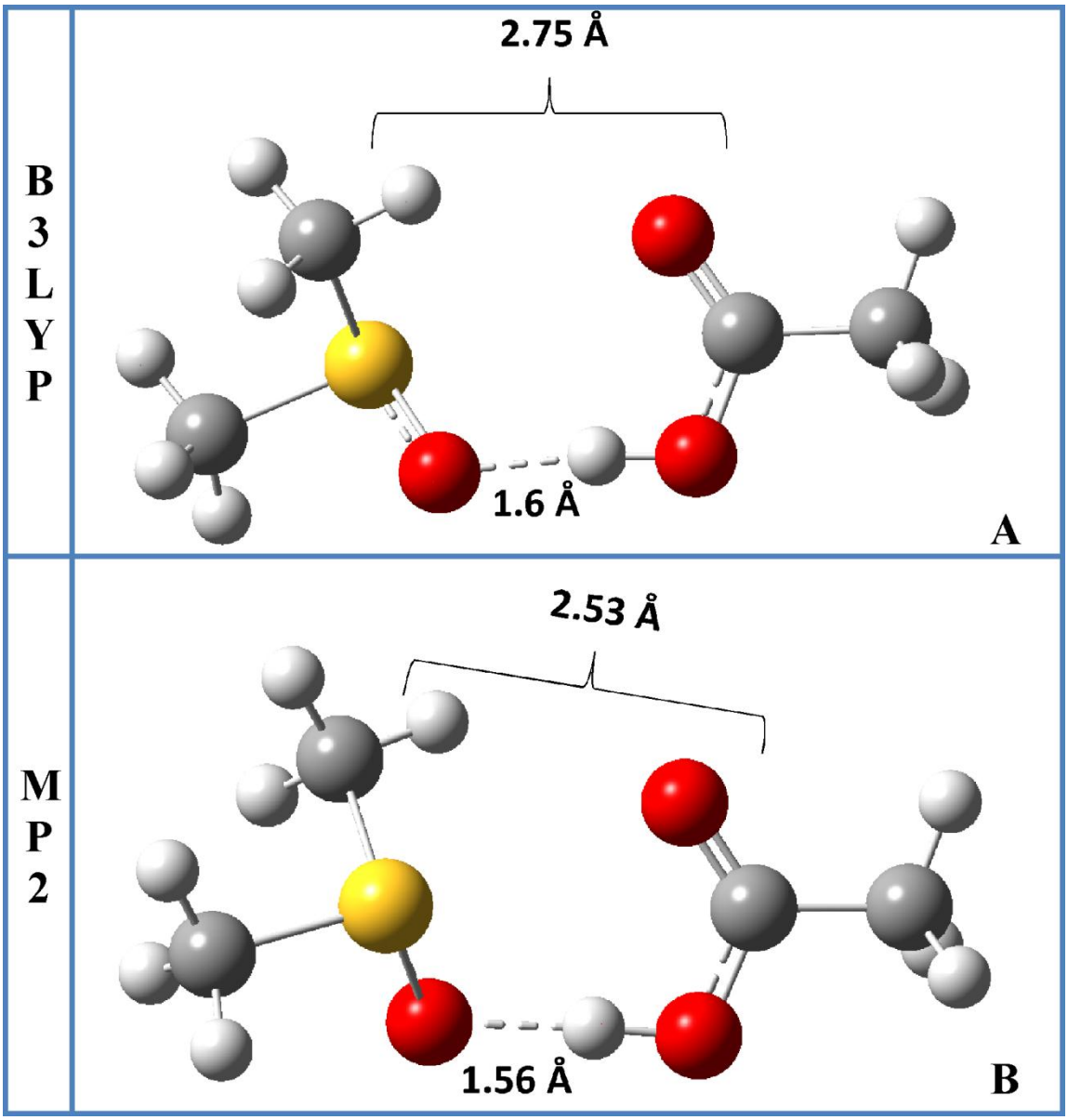
Εικόνα 3.32 (Α), (Β) Η δομή του οξικού οξέος σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα. **(Γ), (Δ)** Η δομή του DMSO σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι οι δομές υπολογίστηκαν με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO).

Παράλληλα υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των δονητικών συχνοτήτων των ατόμων του οξικού οξέος με σκοπό την επιβεβαίωση του ολικού ενεργειακού ελαχίστου της δομής του. Στη συνέχεια επιτεύχθηκε, στα ίδια επίπεδα θεωρίας και μοντέλου επιδιαλύτωσης, η βελτιστοποίηση της δομής ενός μορίου DMSO (Εικόνα 3.32 **Γ**, **Δ**), που αναμένεται να αλληλεπιδράσει με το μόριο του οξικού οξέος. Τα αποτελέσματα των παραπάνω τεσσάρων υπολογιστικών πειραμάτων είχαν ως αποτέλεσμα την μέτρηση των ενεργειών ενός μορίου οξικού οξέος ($E_{o\xi}$) και ενός μορίου DMSO (E_{DMSO}) σε διάλυμα DMSO σε διαφορετικά επίπεδα θεωρίας (Πίνακας 3.21).

Για τον ενεργειακό υπολογισμό του δεσμού υδρογόνου (E_{HB}) που αναπτύσσεται μεταξύ του υδρογόνου της καρβοξυλομάδας του οξικού οξέος με το οξυγόνο της θειονυλο-ομάδας των μορίων του DMSO, πραγματοποιήθηκε η ενεργειακή βελτιστοποίηση του συμπλόκου

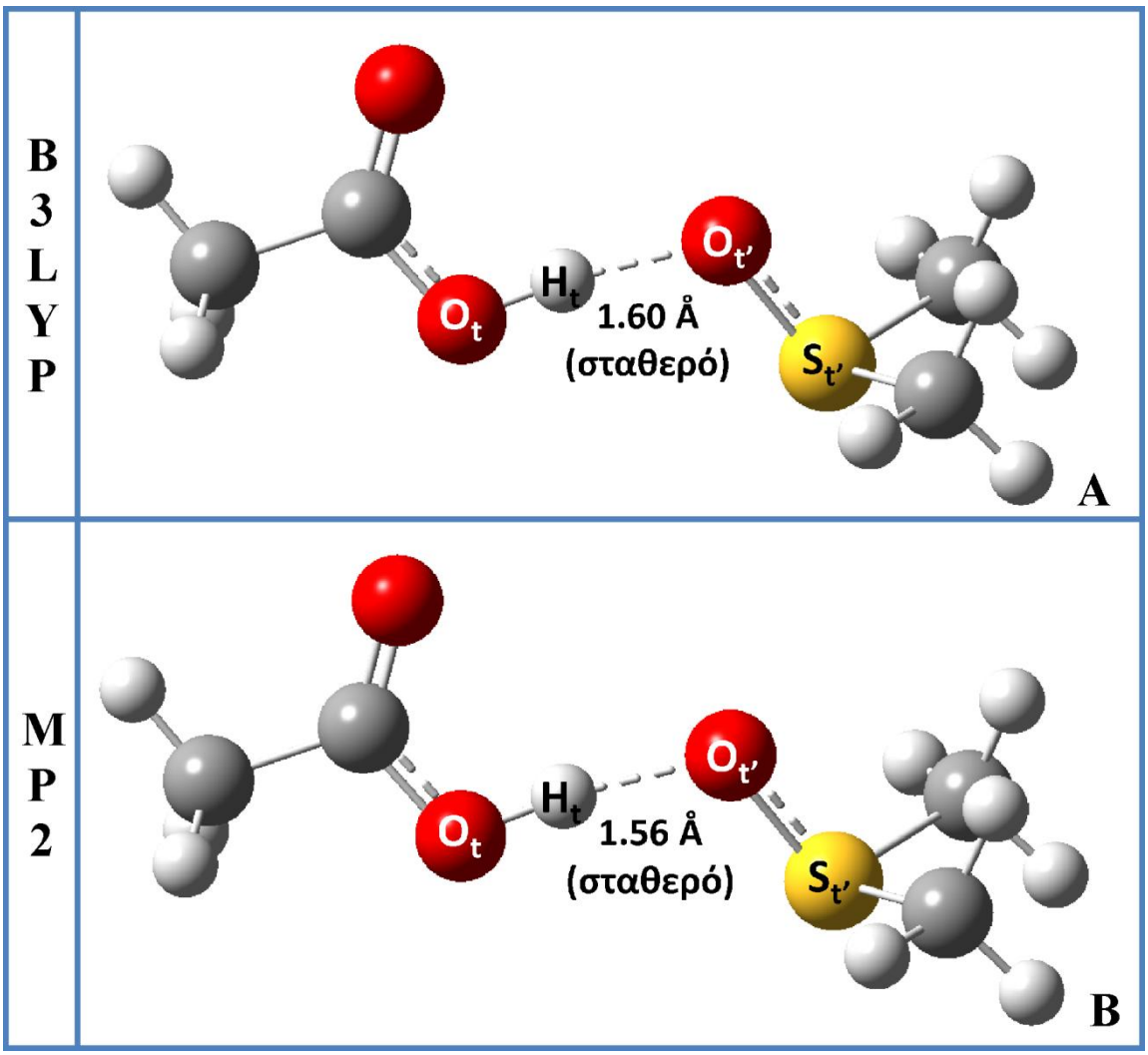
DMSO-οξικού οξέος (E_C) (Πίνακας 3.21) στα ίδια επίπεδα θεωρίας και μοντέλου επιδιαλύτωσης που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω (Εικόνα 3.33).

Όπως διακρίνεται στην Εικόνα 3.33 ο δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ της –OH ομάδος με ένα μόριο DMSO είναι πάρα πολύ ισχυρός (λόγω της μικρής απόστασής του). Επιπλέον, διαφαίνεται η ύπαρξη μιας επιπλέον αλληλεπίδρασης μεταξύ του ενός μεθυλίου στο μόριο του DMSO και του καρβονυλικού οξυγόνου της καρβοξυλομάδας του οξικού οξέος. Επομένως η ενέργεια του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO (E_C) περιλαμβάνει δύο αλληλεπιδράσεις, έναν δεσμό υδρογόνου ενέργειας E_{HB} και μια επιπλέον ασθενή αλληλεπίδραση van den Waals ενέργειας E_{VDW}. Ο υπολογισμός της E_{VDW}



Εικόνα 3.33 (A), (B) Η βέλτιστη δομή του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO).

επετεύχθη με το «πάγωμα» της δίεδρης γωνίας $O_t – H_t – O_{t'} – S_{t'}$ και της απόστασης $H_t – O_{t'}$ της δομής που προκύπτει (Εικόνα 3.34) με ενέργεια E_{CF}, ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του ενός μεθυλίου του DMSO και του καρβονυλικού οξυγόνου του οξικού οξέος. Η τιμή της απόστασης $H_t – O_{t'}$ καθορίστηκε ίση με αυτή που υπολογίστηκε στην βέλτιστη δομή του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO και η τιμή της δίεδρης γωνίας ήταν ίση με 17.36^o, αφού κρίθηκε ικανή ώστε να μην αλληλεπιδρά το μεθύλιο του DMSO με το καρβονυλικό οξυγόνου του οξικού οξέος. Με αυτό τον τρόπο η διαφορά των ενεργειών E_C και E_{CF} απέδωσε την ενέργεια E_{VDW} της παραπάνω αλληλεπίδρασης (Πίνακας 3.21).



Εικόνα 3.34 (A), (B) Η βέλτιστη δομή του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/cc-pVTZ και MP2/cc-pVTZ αντίστοιχα με τη χρήση του μοντέλου επιδιαλύτωσης IEF-PCM (bulk DMSO) και σταθερή την τιμή της απόστασης του δεσμού υδρογόνου και της **δίεδρης γωνίας O_t - H_t – $O_{t'}$ – $S_{t'}$.**

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω η ενέργεια του δεσμού υδρογόνου υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης:

$$E_{HB} = E_C - \left(E_{o\xi} + E_{DMSO} + E_{VDW}\right) \quad (3.32).$$

Πίνακας 3.21 Θεωρητική προσέγγιση των ενεργειών του συμπλόκου οξικού οξέος-DMSO και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται.

ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ-DMSO		
Ενέργεια$^{\alpha}$ (*E*)	**B3LYP/cc-pVTZ**	**MP2/cc-pVTZ**
E_C	491037.109930	490279.575086
$E_{o\xi}$	143819.163880	143555.387085
E_{CF}	491036.393954	490279.427872
E_{DMSO}	347209.876541	346714.793554
E_{VDW}	0.715975	0.147214
$E_{HB}{}^{\beta}$	7.353534	9.247233

$^{\alpha}$ Όλες οι τιμές των ενεργειών είναι σε kcal/mol
$^{\beta}$ Η τιμή της ενέργειας του δεσμού υδρογόνου προκύπτει από την εξίσωση (3.32)

Έτσι, η ενέργεια του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ ενός μορίου DMSO και της -COOH ομάδας υπολογίστηκε με τη μέθοδο B3LYP και MP2 και βρέθηκε ίση με 7.35 και 9.24 kcal/mol, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το Θεωρητικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής (Παράγραφοι 1.2.3 και 1.3.2), οι μέθοδος MP2 εμφανίζεται πολύ πιο ακριβής στην πρόβλεψη των ενεργειών αλληλεπιδράσεων (όπως οι δεσμοί υδρογόνου) και τα αποτελέσματά της συγκλίνουν περισσότερο στην πραγματική τιμή των υπό μελέτη συστημάτων και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων σε σχέση αυτών της μεθόδου B3LYP. Πρέπει να τονιστεί ότι ανεξαρτήτως θεωρητικής προσέγγισης και μεθόδου, ο υπό μελέτη δεσμός υδρογόνου εμφανίζεται πολύ ισχυρός και πάρα πολύ ισχυρότερος αυτών των μορίων νερού που αλληλεπιδρούν με την ομάδα -COOH, των οποίων η ενέργεια έχει υπολογιστεί περίπου 5-6 kcal/mol. Επομένως, η χημική ανταλλαγή των μορίων DMSO σε σχέση με την ομάδα –COOH θα είναι σε μεγάλο βαθμό πιο αργή.

3.2.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων NMR-^{1}H και κβαντομηχανικής προσέγγισης

Η θερμοδυναμική ανάλυση και ο υπολογισμός των σταθερών ισορροπίας των συμπλόκων και γενικότερα των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων DMSO με τις –COOH ομάδες των οξέων και των –NH ομάδων κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω ομάδων με τα μόρια του DMSO είναι πολύ ισχυρές και μάλιστα οδηγούνται εντροπικώς. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι και ο διμερισμός των οξέων καθοδηγείται από την εντροπία.

Η θεωρητική προσέγγιση της αλληλεπίδρασης του DMSO με την –COOH ομάδα κατέδειξε τον ισχυρό δεσμό υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ των. Αναλυτικότερα, υπολογίζοντας ότι η ενέργεια του παραπάνω δεσμού υδρογόνου είναι της τάξεως των 9 kcal/mol, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η χημική ανταλλαγή των μορίων του DMSO κατά την αλληλεπίδρασή τους με τις –COOH ομάδες είναι σχετικά αργή αν συγκριθεί με την αντίστοιχη των μορίων νερού. Παράλληλα επιβεβαιώνονται τα πειραματικά αποτελέσματα της θερμοδυναμικής ανάλυσης του βενζοϊκού και οξικού οξέος.

Ανάγοντας τα παραπάνω αποτελέσματα σε βιομοριακό επίπεδο, μπορεί να θεωρηθεί πως τα μόρια του διαλύτη DMSO συμπλοκοποιούνται ισχυρώς με τα πεπτιδικά και πρωτεϊνικά καρβοξυτελικά άκρα καθώς και με τις –NH ομάδες των πεπτιδικών δεσμών,[7] αλλά και με τις αντίστοιχες καρβοξυλομάδες και αμινομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Με την παραπάνω θεώρηση αναδύεται το ερώτημα αν ο διαλύτης DMSO είναι ο κατάλληλος για την δομική μελέτη βιομορίων. Λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο των μεθυλίων του DMSO, με την «δεσμοποίησή» του στις παραπάνω ομάδες ίσως περιορίζει ή «καθοδηγεί» την δομή των βιομορίων. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε ότι σύγχρονες έρευνες αναφέρουν ως ιδανικό περιβάλλον για την δομική και λειτουργική μελέτη πρωτεϊνών και πεπτιδίων τα μίγματα διαλυτών, κυρίως του DMSO με το νερό.[141-143]

4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των πεπτιδίων και ενώσεων μοντέλων αντιπροσωπευτικών των πεπτιδίων με δύο είδη διαλυτών: το νερό και το DMSO.

Η ανασκόπηση των αποτελεσμάτων της ενυδάτωσης των πεπτιδίων οδήγησε σε μία σειρά συμπερασμάτων που μπορούν να συνοψιστούν παρακάτω:

1. Οι χρόνοι αποκατάστασης T_1 των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ για τα αμινοξέα, ακετυλο-αμινοξέα, βεταΐνες και διπεπτίδια έδειξαν ότι επηρεάζονται κατά την αλλαγή του pH των υδατικών τους διαλυμάτων, επομένως και κατά την αλλαγή της ιοντικής τους κατάστασης. Η αλλαγή των τιμών T_1 συνδέθηκε άμεσα με την επιδιαλύτωση των παραπάνω μορίων άρα και με τον αριθμό μορίων νερού που αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτά. Έτσι η μεταβολή των χρόνων αποκατάστασης μεταφράστηκε σε μεταβολή του βαθμού ενυδάτωσης των υπό μελέτη μορίων και πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η διπολικού ιόντος κατάσταση των αμινοξέων υφίσταται τον ίδιο βαθμό ενυδάτωσης αυτή του ουδέτερου pH των ακετυλο-αμινοξέων. Παρόμοια, η πρωτονιομένη κατάσταση των εν λόγω βιομορίων βρέθηκε να ενυδατώνεται στον ίδιο βαθμό, ενώ περιέχει ένα επιπλέον μόριο νερού σε σχέση με την διπολικού ιόντος και ουδέτερου pH κατάστασής των αντίστοιχα. Η παράλληλη μελέτη για τα μόρια των βεταϊνών αποκάλυψε την σταθερή ενυδάτωσή τους ανεξάρτητα της ιοντικής τους κατάστασης. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε σε δύο περαιτέρω συμπεράσματα. Εκτός του ότι διαφάνηκε πως ο βαθμός ενυδάτωσης των βεταϊνών υπολείπεται 1-2 ή 2-3 μόρια νερού των αμινοξέων / ακετυλο-αμινοξέων στην ουδέτερου pH ή πρωτονιομένης τους κατάστασης αντίστοιχα, αναδείχθηκε ο ρόλος της αμινομάδας ως ο ρυθμιστής και υπαίτιος της επιπλέον ενυδάτωσης των αμινοξέων και ακετυλο-αμινοξέων.

   Η παραπάνω μεθοδολογία ακολουθήθηκε για την προσέγγιση του υδροδυναμικού μοντέλου των διπεπτιδίων επίσης. Έτσι, διαπιστώθηκε πως ο βαθμός ενυδάτωσης ενός μεγάλου αριθμού διπεπτιδίων στην κατάσταση διπολικού ιόντος περιέχει 1-2 μόρια νερού περισσότερα από την αντίστοιχη των αμινοξέων. Σημειώνεται πως είναι η πρώτη μελέτη στην βιβλιογραφία για τον λεπτομερή προσδιορισμό μορίων νερού που αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτή την ομάδα βιομορίων.

2. Τα δεδομένα που εξήχθησαν από τη θεωρητική προσέγγιση της πρώτης σφαίρας επιδιαλύτωσης της αλανίνης, ακετυλο-αλανίνης, βεταΐνης της αλανίνης και του διπεπτιδίου της αλανίνης κατέδειξαν το μέγιστο αριθμό μορίων νερού που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα εν λόγω μόρια. Αρχικά διαπιστώθηκε μια πλήρη συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα, όπου το μόριο της αλανίνης στην διπολικού ιόντος κατάσταση εμφανίζεται με ένα λιγότερο μόριο νερού απ' ότι στην πρωτονιομένη του κατάσταση παρόμοια με την ακετυλο-αλανίνη, ενώ παράλληλα 6 και 7 μόρια νερού συμπληρώνουν τον μέγιστο αριθμό μορίων που συμμετέχουν στην πρώτη σφαίρα επιδιαλύτωσής των στο pH = 6.0 και όξινο pH αντίστοιχα. Το μόριο της βεταΐνης της αλανίνης αλληλεπιδρά με 4 μόρια νερού (άρα 3 μόρια νερού λιγότερα από τα αμινοξέα και ακετυλο-αμινοξέα) και στις δύο ιοντικές καταστάσεις του. Επιπροσθέτως, η διπολικού ιόντος δομή του διπεπτιδίου αλανίνη-αλανίνη σε υδατικό διάλυμα διαπιστώθηκε ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με 7 μόρια, δηλαδή 1 μόριο παραπάνω από την αντίστοιχη των αμινοξέων. Συνοψίζοντας, παρατηρείται μια απόλυτη ταύτιση θεωρητικών και φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων.

3. Παρατηρώντας την συμφωνία των αποτελεσμάτων της αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ με την αντίστοιχη θεωρητική προσέγγιση της ενυδάτωσης των υπό μελέτη μορίων, ενισχύεται η φασματοσκοπική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με σκοπό τη μελέτη ενυδάτωσης αμινοξέων και παραγώγων τους, αναδεικνύοντάς την αρχικά ως πιο ακριβή και επισφαλή σε σύγκριση με τις προηγούμενες της αποκατάστασης των πυρήνων ^{14}N και ^{17}O, αλλά και πιο «εξελίξιμη». Ο όρος «εξελίξιμη» παραπέμπει στο γεγονός ότι η μελέτη αποκατάστασης των πυρήνων $^{13}C_{\alpha}$ επέτρεψε την λεπτομερή μελέτη ενυδάτωσης των διπεπτιδίων, οδηγώντας την παραπέρα διερεύνηση της ενυδάτωσης ολιγοπεπτιδίων.

Όσον αφορά την φασματοσκοπική και κβαντομηχανική μελέτη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των –COOH και –NH ομάδων με τον διαλύτη DMSO παρουσιάζονται τα εξής συμπεράσματα:

1. Για πρώτη φορά υπολογίζονται οι σταθερές ισορροπίας K του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των εν λόγω ομάδων με τα μόρια του DMSO και παράλληλα πραγματοποιείται η θερμοδυναμική μελέτη όλων των συμπλόκων που σχηματίζονται,

συμπεριλαμβανομένου τον σχηματισμό διμερών μεταξύ των οξέων στο διαλύτη DMSO. Οι τιμές των σταθερών K για τον σχηματισμό των συμπλόκων -COOH˙˙˙DMSO και των διμερών των οξέων (βενζοϊκό και οξικό οξύ) έδειξαν ότι τα μόρια του DMSO αλληλεπιδρούν με τις ομάδες –COOH μέσω ισχυρών δεσμών υδρογόνου, ενώ παράλληλα ο σχηματισμός όλων οδηγείται από την εντροπία. Η τιμή της σταθεράς K που αντιστοιχεί στην αλληλεπίδραση -NH˙˙˙DMSO έδειξε επίσης τον σχηματισμό ισχυρών δεσμών υδρογόνου και η θερμοδυναμική ανάλυση οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο σχηματισμός τους καθοδηγείται εντροπικώς.

2. Η αντίστοιχη θεωρητική μελέτη που εστιάστηκε στον υπολογισμό της ενέργειας του δεσμού υδρογόνου -COOH˙˙˙DMSO οδήγησε στην τιμή των ~8-9 kcal/mol. Από αυτή τη τιμή είναι προφανές ότι η χημική ανταλλαγή των μορίων DMSO με την ομάδα -COOH είναι αρκετά πιο βραδεία σε σύγκριση με αυτή των μορίων νερού.

3. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη και τα δύο παραπάνω συμπεράσματα είναι εύλογο να θεωρηθεί ότι οι ομάδες –COOH των βιομορίων (καρβοξυ-τελικά άκρα των πεπτιδίων, πλευρικές ομάδες αμινοξέων όπως του ασπαρτικού οξέος κλπ.) και αντίστοιχα οι –NH ομάδες των πεπτιδικών δεσμών σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του διαλύτη DMSO. Το γεγονός αυτό υποθάλπει ένα σημαντικό «κίνδυνο» στις δομικές μελέτες πεπτιδίων. Η εν λόγω ισχυρή συμπλοκοποίηση του DMSO με τις παραπάνω ομάδες μπορεί να οδηγήσει σε καθοδηγούμενη αναδίπλωση και δομή των βιομορίων, μειώνοντας τον βαθμό ελευθερίας στην κίνηση και στον προσανατολισμό των προαναφερθέντων ομάδων. Αντιθέτως, επαληθεύεται ο χαρακτηρισμός του διαλύτη DMSO ως ο διαλύτης που προσομοιάζει υδρόφοβα περιβάλλοντα όπως τα τμήματα των συμπαγών κυτταρικών λιπιδιακών μεμβρανών, όπου ο βαθμός ελευθερίας είναι μειωμένος και ορισμένος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Παράγοντες που επηρεάζουν τις τιμές NQCC (χ) των πυρήνων ^{14}N και ^{17}O

Το εύρος των σημάτων NMR-^{14}N εξαρτάται από την ηλεκτρονιακή συμμετρία που περιβάλλει τους πυρήνες ^{14}N στο μόριο όπου βρίσκονται καθώς και από την ευκινησία των ομάδων όπου βρίσκονται. Επιπλέον, η επίτευξη της μείωσης του εύρους των σημάτων NMR-^{14}N πραγματοποιείται με την μείωση του ιξώδους των υπό μελέτη διαλυμάτων μέσω της θερμοκρασιακής τους αύξησης.

Όπως αναφέρθηκε οι χρόνοι T_{1Q} και T_{2Q} (εξισώσεις 3.7 και 3.8) που περιγράφουν την τετραπολική αποκατάσταση των πυρήνων ^{14}N είναι αντιστρόφως ανάλογοι του τετραγώνου της πυρηνικής τετραπολικής σταθεράς σύζευξης (NQCC ή χ). Συνεπώς, η γνώση των τιμών χ των πυρήνων ^{14}N είναι απαραίτητη για την μελέτη της αποκατάστασής των, καθώς επίσης αποτελούν ένδειξη της ηλεκτρονιακής συμμετρίας που τους περιβάλλει. Έτσι, όταν οι τιμές χ είναι ≤ 1 MHz και το άζωτο βρίσκεται σε «υψηλής συμμετρίας» περιβάλλον σε ένα μόριο, όπως στην περίπτωση των NH_4^+, NF_4^+ και γενικά R_4N^+, τότε το εύρος των κορυφών ^{14}N είναι πολύ μικρό, οι κορυφές πολύ οξείες και η αποκατάσταση αργή. Παρόμοια, οξείες κορυφές NMR-^{14}N εμφανίζονται όταν το άτομο του αζώτου βρίσκεται στην κεντρική θέση ευθύγραμμων ομάδων (NO_2^+, N_3^-), οι οποίες είναι πολύ ευκίνητες στα διαλύματα. Αρκετά πιο ευρείες εμφανίζονται οι κορυφές ^{14}N στην πυραμιδική τους διάταξη (όπως η αμινομάδα των βεταϊνών) με υψηλότερες τιμές χ. Επιπλέον, κατά την πρωτονίωση η τιμές χ μειώνονται, όπως επίσης και κατά το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Όλα τα παραπάνω και περαιτέρω περιπτώσεις αναφέρονται με παραδείγματα στην παρακάτω εικόνα:[144]

Sample[a]	$W_{1/2}$[b] (Hz)	T_q (ms)	χ (MHz)
Four-coordinate nitrogen			
Me_4NBr (1 M aq., 316 K)	0.1	10^4	
n-Bu_4NI (0.07 M aq., 316 K)	0.18	1800	0.04
n-Bu_4NI (0.07 M in benzene, 335 K)	3.7	85	0.23
NF_4AsF_6(HF)	3		
NH_4Cl (1 M aq., 316 K)		1600	
NH_4Cl (1 M in D_2O, 316 K)		1200	
NH_4Cl, ND_4Cl(s, 295 K)		700–800	0.016
n-HexylNMe_3Br (0.55 M in D_2O)		260	0.083
n-$C_{12}H_{25}NMe_3Cl$ (C_{12}TAC) (49% w/w in D_2O)		T_1 = 24	0.083
		T_2 = 3.7	
n-$C_{16}H_{33}NMe_3Br$ (C_{16}TAB) (0.4 M aq.)		T_1 = 10	0.083
		T_2 = 1	
$Na[Co(NH_3)_2(NO_2)_4]$(aq.)	170		2.09
$(NH_3F)(CF_3SO_3)$(HF) at 283 K	300		
at 233 K	550		
$[Co(NH_3)_6]Cl_3$(aq.)	370		3.62
$[Co(NH_3)_6](ClO_4)_3$ (0.24–0.5 M in DMSO-d_6)		0.29	3.3
$[Co(en)_3]Cl_3$(aq.)	600		
Choline Me_3N headgroup of sphingomyelin (aq., 320 K)		T_1 = 37	0.135
		T_2 = 2.0	
Six-coordinate nitrogen (see text)			
$[Rh_6(\mu_6\text{-N})(CO)_{15}]^-$(acetone-$d_6$)	20		
$[Co_6(\mu_6\text{-N})(CO)_{15}]^-$(acetone-$d_6$)	40		
Linear two-coordinate nitrogen			
N_2O (15 atm in hexane) (N*N*O)	0.45	2960	0.238
MeNC(*l*)	0.26	1220	0.27
t-BuNC(*l*)	1.6	180	
NO_2AsF_6(HF)	5		
$PdCNBu^t$ complexes ($CDCl_3$)	4–12	30–80	
NaN_3 (1 M aq.) (N*N*N^-)		29.3	1.03
$[\eta^5\text{-}C_5H_5)Mo(CO)_2(NO)](CH_3CN)$	30		
$[Mo(NO)(S_2CNMe_2)_3](CH_2Cl_2)$	40		
$[Mo(NS)(S_2CNMe_2)_3](CH_2Cl_2)$	150		
$[Os(NBu^t)O_3](CD_2Cl_2)$	30		
$[Ta(NHBu^t)_2(NSiMe_3)_2\{N(SiMe_3)_2\}]$ (CD_2Cl_2)	52		
$[W(NBu^t)_2(OBu^t)_2](CD_2Cl_2)$	185		
Terminal (one-coordinate) nitrogen			
N_2O (15 atm in hexane) (*N*NO)		280	0.792
N_2(*l*, 126 K)		18.5	5.39
N_2 (*l*, 77 K)		1.7	
$^{14}N^{15}N$(g, 294 K)		15.3	
NaN_3 (1 M aq.) (*N*NN^-)		7.4	1.79
ClCN(*l*)		6	3.219
MeCN (1% v/v in hexane)	53.5		3.74
MeCN(*l*)	78		
$NO^+AsF_6^-$(HF)	95		
MeSCN(*l*)		2.0	3.75
HC–C≡C–CN (5 M in tol.-d_8)	189	1.7	4.14
NC–C≡C–CN (inf. diln. in hexane)	244		4.14
NC–C≡C–CN(*l*)	394		
CCl_3CN < *l*)		1.5	4.1
$K_4[Fe(CN)_6]$ (0.2–0.8 M aq.)	550–650		
$K_3[Co(CN)_6]$(aq.)	570		3.62
$K_3[Fe(CN)_6]$ (0.2–1.0 M aq.)	780–1040		

Sample[a]	$W_{1/2}$[b] (Hz)	T_q (ms)	χ (MHz)
Planar three-coordinate nitrogen			
$NaNO_3(s)$		10^5	0.745
$NaNO_3$ (1 M aq. 295 K)		85	
$EtONO_2(l)$		45	0.9
$MeNO_2(l)$		22	1.7
$(NOF_2)AsF_6(HF)$	18		
Pyridine *N*-oxide (0.2 M in CCl_4)	28.3	11.2	1.1
$PhNO_2$ (1:1 v/v in hexane)		6.2	1.426
$PhNO_2(l)$		3.2	
Pyrrole (17 mol% in pyridine)		4	2.12
Pyrrole(l)		2.0	2.06
$Me_2NCHO(l)$		2.0	3.6
PhN = *N*(O)Ph(l, 284 K)	700		1.4
Pyramidal nitrogen			
$MeNH_2(l)$	30		3.98
$Me_3N(l)$	100		5.2
$Me_2NH(l)$	125		5.05
$(CH_2)_6N_4$ (0.1 M in hexane)	122	2.6	4.19
$(CH_2)_6N_4$ (0.1 M in CCl_4)	294		4.17
$(CH_2)_6N_4$ (0.1 M in $CDCl_3$)	1052		4.31
$NF_3(l$, 108 K)	318	1	7.07
$CH(CH_2CH_2)_3N$ (0.5 M in $CHCl_3$, 278 K)			5.4
$N(CH_2CH_2)_3N(s)$ at 415 K	484	T_2 = 0.658	4.925
$N(CH_2CH_2)_3N(s)$ at 354 K	2100	T_2 = 0.152	
Bent two-coordinate nitrogen			
$HNCO(C_6H_{12})$	20		
$MeNCO(l)$	35		
$EtONO(l)$		5.2	3.8
Pyridine(l)		1.65	4.58
i-C_5H_9 $ONO(l)$		1.6	
$Na[Co(NH_3)_2(ONO)_4](aq.)$	700		4.25

Εικόνα 1. Π1 Παραδείγματα από το εύρος στο μισό του ύψους των κορυφών NMR-^{14}N ($W_{1/2}$), των χρόνων αποκατάστασης (T_q) και των τιμών χ των πυρήνων ^{14}N σε κάθε περίπτωση.

Όσον αφορά τις τιμές της πυρηνικής τετραπολικής σταθεράς σύζευξης (χ) των τετραπολικών πυρήνων ^{17}O, πληθώρα αυτών έχουν μετρηθεί πειραματικώς και κυμαίνονται από -8 έως 17 MHz σε διάφορες ενώσεις. Συνοπτικά, οι τιμές χ (σε MHz) των πυρήνων ^{17}O κυμαίνονται ως εξής:[145]

$$O - O > N - O > NO_2 > C = O > P - OR \simeq S = O > ROH > SO_2 > P = O \simeq C = O > XO_n^{m-}$$

16 - 17 16 13 11 – 9 9.5 – 9 9 – 8 6.7 4 1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

% Πρωτονίωση των ακετυλο-αμινοξέων

Υποθέτοντας ότι η μέση τιμή pK_a των ακετυλο-αμινοξέων ισούται με 2.5 (όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Αποτελέσματα-Συζήτηση) τότε στο pH = 1.8 η % πρωτονίωση των ακετυλο-αμινοξέων αναλύεται παρακάτω.

Η ισορροπία που πραγματοποιείται κατά την πρωτονίωση είναι η εξής:

$$XH \underset{}{\overset{K_a}{\rightleftharpoons}} X^- + H^+$$

Τότε, σε pH = 1.8 θα ισχύει:

$$K_\alpha = 10^{-2.5} = \frac{[X^-][H^+]}{[XH]} = \frac{[X^-]10^{-1.8}}{[XH]} \Leftrightarrow \frac{[X^-]}{[XH]} = 0.2,$$

όπου $[X^-]$ η συγκέντρωση των μη πρωτονιομένων ακετυλο-αμινοξέων και $[XH]$ η συγκέντρωση των πρωτονιομένων ακετυλο-αμινοξέων. Άρα, προκύπτει ότι:

$$\frac{[X^-]}{[XH]+[X^-]} = \frac{0.2}{1.2} = 0.16 \ \textit{ή}\ 16\%$$

Επομένως, το 16 % από το σύνολο των μορίων των ακετυλο-αμινοξέων βρίσκεται σε μη πρωτονιομένη κατάσταση ή το **84 % έχει πρωτονιωθεί**. Αυτό σημαίνει πως οποιαδήποτε αλλαγή των τιμών T_1 ή $\Delta\nu_{1/2}$ που οφείλεται στην πρωτονίωση των ακετυλο-αμινοξέων μπορεί να μετρηθεί με αμελητέο σφάλμα. Παράλληλα, στο pH = 1.8 αποφεύγεται ο **κίνδυνος υδρόλυσης** της ακέτυλο ομάδος των αμινοξέων.

% Πρωτονίωση των βεταϊνών

Υποθέτοντας ότι η μέση τιμή pK_a των βεταϊνών ισούται με 1.75 (όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Αποτελέσματα-Συζήτηση) τότε στο pH = 1.3 η % πρωτονίωση των βεταϊνών αναλύεται παρακάτω.

Η ισορροπία που πραγματοποιείται κατά την πρωτονίωση είναι η εξής:

$$XH \underset{}{\overset{K_a}{\rightleftharpoons}} X^- + H^+$$

Τότε, σε pH = 1.3 θα ισχύει:

$$K_\alpha = 10^{-1.75} = \frac{[X^-][H^+]}{[XH]} = \frac{[X^-]10^{-1.3}}{[XH]} \Leftrightarrow \frac{[X^-]}{[XH]} = 0.35,$$

όπου $[X^-]$ η συγκέντρωση των μη πρωτονιομένων βεταϊνών και $[XH]$ η συγκέντρωση των πρωτονιομένων βεταϊνών. Άρα, προκύπτει ότι:

$$\frac{[X^-]}{[XH]+[X^-]} = \frac{0.35}{1.35} = 0.26 \text{ ή } 26\%.$$

Επομένως, το 26 % από το σύνολο των μορίων των βεταϊνών βρίσκεται σε μη πρωτονιομένη κατάσταση ή το **74 % έχει πρωτονιωθεί**. Αυτό σημαίνει πως οποιαδήποτε αλλαγή των τιμών T_1 ή $\Delta\nu_{1/2}$ που οφείλεται στην πρωτονίωση των βεταϊνών μπορεί να μετρηθεί με αμελητέο σφάλμα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Δομές ενυδάτωσης – Ενέργειες (Ε)

- **<u>Αλανίνη κατάσταση διπολικού ιόντος (Εικόνα 3.17)</u>**

13 Atoms

E = -323.895614 Hartrees

	X	Y	Z
N	1.224118	-1.179802	0.067500
H	1.806347	-1.150269	-0.776584
C	0.584352	0.147113	0.396565
H	0.649993	0.258533	1.481669
C	1.286512	1.299869	-0.298192
C	-0.925639	0.003998	0.035846
H	1.271088	1.172657	-1.382845
H	0.763525	2.222527	-0.059432
H	2.322722	1.392036	0.029152
O	-1.288925	-1.153614	-0.307151
O	-1.616738	1.029591	0.147148
H	0.399318	-1.792766	-0.122290
H	1.792137	-1.557802	0.832536

- **<u>Αλανίνη πρωτονιομένη κατάσταση (Εικόνα 3.18)</u>**

A

14 Atoms

E = -324.35316 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.455502	-1.005060	-0.183237
H	-1.435535	-1.321782	0.797938
C	-0.597552	0.207204	-0.393166
H	-0.630959	0.429776	-1.464610
C	-1.123108	1.385973	0.418404
C	0.828242	-0.177380	-0.021084
H	-1.100908	1.169999	1.487679
H	-0.501721	2.257446	0.227065
H	-2.146017	1.621549	0.124950
O	1.116608	-1.238327	0.481147
H	-1.130749	-1.796197	-0.759211
H	-2.435208	-0.815113	-0.440326
O	1.674347	0.796506	-0.314480
H	2.596479	0.529532	-0.049087

B

14 Atoms

E = -324.350935 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.280909	-1.170821	-0.147322
H	-1.243634	-1.447891	0.845205
C	-0.623537	0.160013	-0.393092
H	-0.721160	0.348609	-1.467515
C	-1.321717	1.252986	0.405978
C	0.869072	0.101295	-0.088487
H	-1.263724	1.057767	1.477898
H	-0.836482	2.203772	0.199191
H	-2.368727	1.327570	0.113197
H	-0.832607	-1.922973	-0.690709
H	-2.273115	-1.142199	-0.427015
O	1.586078	1.053308	-0.263970
O	1.254774	-1.083260	0.374720
H	2.236087	-1.075056	0.548602

Γ

14 Atoms

E = -324.337727 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.365817	-1.046117	-0.436192
H	-1.462326	-1.511710	0.481146
C	-0.592257	0.247866	-0.383522
H	-0.643372	0.653471	-1.395635
C	-1.226786	1.210094	0.612952
C	0.897475	0.029013	-0.101222
H	-1.198534	0.814543	1.629678
H	-0.683787	2.153463	0.592109
H	-2.263394	1.406620	0.338389
H	-0.935907	-1.723157	-1.087186
O	1.720638	0.638300	-0.733919
O	1.281687	-0.805105	0.866005
H	0.582325	-1.188209	1.449832
H	-2.323477	-0.869598	-0.780927

Δ

14 Atoms

E = -324.347504 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.450737	-0.954318	-0.338835
H	-1.389093	-1.411278	0.583878
C	-0.569020	0.257362	-0.400096
H	-0.574480	0.597735	-1.440670
C	-1.097515	1.340433	0.537650
C	0.831952	-0.189823	0.009276
H	-1.110609	0.989158	1.570253
H	-0.459196	2.220405	0.478587
H	-2.106087	1.632765	0.245747
O	1.008355	-1.176566	0.682195
H	-1.172339	-1.656099	-1.041698
O	1.843065	0.586541	-0.354494
H	1.599487	1.292407	-1.007355
H	-2.436390	-0.712510	-0.519491

- **<u>Αλανίνη κατάσταση διπολικού ιόντος + 6 H_2O (Εικόνα 3.19 A)</u>**

31 Atoms

E = -782.777157 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.888117	-0.387634	-0.208629
H	-1.924313	-0.887471	0.700847
C	-0.851041	0.692549	-0.171888
H	-0.907940	1.209184	-1.134621
C	-1.170652	1.666891	0.957664
C	0.567392	0.088791	-0.063129
H	-1.104738	1.173202	1.928231
H	-0.468027	2.495463	0.935830
H	-2.178471	2.066485	0.840744
O	0.674235	-1.161312	-0.023797
O	1.506647	0.921505	-0.033098
H	-1.672243	-1.089872	-0.937150
H	-2.820302	0.024439	-0.402245
H	-0.127272	-2.196841	-1.366229
O	-0.846605	-2.373905	-2.000818
H	-1.161385	-3.269699	-1.791453
O	4.212775	0.332756	0.058175
H	3.255266	0.548443	0.021457
H	4.475406	0.541566	0.968869
H	3.784207	-1.538271	0.049692
O	3.262923	-2.359255	0.066959

H	2.351282	-2.016108	0.060329
H	-4.385901	1.539278	-1.398136
O	-4.398048	0.787822	-0.779331
H	-4.944202	1.088690	-0.031781
H	-1.161577	-1.952515	2.669072
O	-2.024171	-1.740267	2.271659
H	-2.541234	-1.341796	2.993524
O	1.486298	3.714119	-0.269605
H	1.000103	3.919288	-1.082636
H	1.481530	2.738878	-0.220982

- **<u>Αλανίνη πρωτονιομένη κατάσταση + 7 H_2O (Εικόνα 3.19 B)</u>**

35 Atoms

E = -859.713324 Hartrees

	X	Y	Z
N	1.846971	-0.294279	0.373522
H	1.841830	-0.948960	-0.442032
C	0.922976	0.853637	0.162853
H	1.028887	1.518518	1.026470
C	1.284660	1.607898	-1.117918
C	-0.515189	0.354887	0.150564
H	1.154653	0.975285	-1.996065
H	0.659898	2.492065	-1.215965
H	2.325323	1.926786	-1.071038
O	-0.799273	-0.833780	0.116067
H	1.599091	-0.820561	1.236967
H	2.815656	0.067291	0.483981
O	-1.386357	1.332177	0.176687
H	-2.367912	1.000618	0.169730
O	-3.820782	0.588270	0.162570
H	-3.830804	-0.343191	0.489900
H	-4.349134	1.106217	0.796468
H	-0.964800	-2.020218	-1.459688
O	-0.705298	-2.563177	-2.218196
H	-1.141918	-2.153840	-2.985757
H	0.808919	-2.419898	2.730967

O	1.188844	-1.526670	2.804379
H	1.937909	-1.625303	3.418621
H	1.041238	-2.213836	-2.130879
O	1.940737	-1.880669	-1.922301
H	2.507337	-2.667831	-1.855881
H	-3.699526	-2.676777	0.575180
O	-3.367760	-1.905993	1.068299
H	-2.427157	-1.837479	0.844733
H	4.537903	1.560544	1.184943
O	4.446591	0.719138	0.703276
H	5.008937	0.818540	-0.085402
O	-1.093304	4.285017	-0.407546
H	-1.546812	4.326615	-1.265458
H	-1.250196	3.382326	-0.103323

- **<u>Ακετυλο-Αλανίνη κατάσταση ουδέτερου pH (Εικόνα 3.20 A)</u>**

17 Atoms

E = -476.155007 Hartrees

	X	Y	Z
N	-0.587592	-0.321838	0.203352
C	0.597234	0.469227	-0.103374
H	0.451805	0.924698	-1.084483
C	0.812857	1.584844	0.927028
C	1.848265	-0.442096	-0.184697
H	0.954664	1.162430	1.923718
H	1.697047	2.165473	0.667334
H	-0.049779	2.250286	0.952889
O	1.752952	-1.605609	0.280904
O	2.865232	0.082642	-0.696728
H	-0.406239	-1.212793	0.651653
C	-1.832642	0.023276	-0.161787
C	-2.934450	-0.950522	0.201089
H	-3.439556	-1.266107	-0.712194
H	-2.574245	-1.830195	0.732234
H	-3.669253	-0.435773	0.820491
O	-2.093044	1.071275	-0.764759

- **<u>Ακετυλο-Αλανίνη πρωτονιομένη κατάσταση (Εικόνα 3.20 Β)</u>**

18 Atoms

E = -476.625284 Hartrees

	X	Y	Z
N	-0.671959	-0.203114	0.384908
C	0.536989	0.492476	-0.006189
H	0.360476	0.919284	-0.995264
C	0.898351	1.627205	0.967424
C	1.687874	-0.495251	-0.133265
H	1.060082	1.236572	1.973071
H	1.800997	2.141581	0.642369
H	0.079695	2.344385	1.002060
O	1.672690	-1.634946	0.273009
H	-0.601517	-0.880926	1.140605
O	2.741339	0.066293	-0.730579
H	3.482018	-0.592322	-0.765449
C	-1.867355	0.020850	-0.204960
O	-2.018403	0.830471	-1.120386
C	-3.029175	-0.792397	0.318516
H	-3.842723	-0.114849	0.576164
H	-3.385286	-1.445090	-0.479528
H	-2.775137	-1.398671	1.186106

- **<u>Ακετυλο-Αλανίνη κατάσταση ουδέτερου pH + 6 H_2O (Εικόνα 3.21 A)</u>**

35 Atoms

E = -935.033088 Hartrees

	X	Y	Z
N	-0.926023	-1.040062	0.607020
C	-0.009157	0.039810	0.947403
H	-0.494974	0.968858	0.674785
C	0.289815	0.054626	2.451585
C	1.319759	-0.045213	0.158421
H	0.770968	-0.873899	2.762255
H	0.952778	0.885791	2.689134
H	-0.633059	0.172353	3.019484
O	1.757309	-1.179007	-0.164756
O	1.890440	1.054452	-0.063615
H	-0.599221	-1.990394	0.767942
H	1.162066	-2.751700	0.396982
O	0.619531	-3.508836	0.709184
H	1.013948	-3.781250	1.553063
O	4.427598	1.408774	-1.063929
H	3.516699	1.284513	-0.711446
H	4.982194	1.518583	-0.275366
H	4.480807	-0.456252	-1.509141
O	4.211434	-1.388116	-1.579885
H	3.357491	-1.383259	-1.108625
C	-2.113171	-0.875693	0.019765
C	-2.895570	-2.135897	-0.260650

H	-3.316563	-2.076859	-1.262761
H	-2.290676	-3.034826	-0.163569
H	-3.729421	-2.193445	0.441487
O	-2.591057	0.237824	-0.278692
H	-2.316488	2.010497	0.055151
O	-2.180599	2.960407	0.237414
H	-2.560350	3.098877	1.120541
O	-4.822087	0.264010	-2.011065
H	-4.065323	0.276494	-1.396306
H	-5.580713	0.037084	-1.452090
O	0.629909	3.558926	0.421524
H	-0.321709	3.374678	0.341680
H	1.063812	2.701334	0.259077

- **<u>Ακετυλο-Αλανίνη πρωτονιομένη κατάσταση + 7 H_2O (Εικόνα 3.21 B)</u>**

39 Atoms

E = -1011.974906 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.248263	0.814420	-0.742436
C	-0.146574	0.111280	-1.369810
H	-0.468608	-0.897972	-1.620132
C	0.287646	0.834398	-2.649685
C	1.055441	-0.016768	-0.429898
H	0.609618	1.852537	-2.431633
H	1.110222	0.301580	-3.123393
H	-0.547026	0.874834	-3.348312
O	1.328317	0.811851	0.428067
H	-1.398839	1.799803	-0.972856
O	1.777202	-1.084056	-0.683043
H	2.609095	-1.179630	-0.084740
O	3.884622	-1.424739	0.735025
H	3.929395	-0.668733	1.367534
H	3.807326	-2.228835	1.279424
H	0.990357	2.681955	0.444831
O	0.845808	3.643207	0.411654
H	1.635280	4.003694	-0.027022
H	-0.651467	3.819060	-0.569604
O	-1.502703	3.662266	-1.030909
H	-1.430012	4.115305	-1.886713
H	4.158898	1.526453	1.993198

O	3.557040	0.799287	2.229602
H	2.752888	0.949145	1.703208
C	-2.000386	0.255134	0.213428
O	-1.806077	-0.907914	0.612928
C	-3.113255	1.097825	0.779516
H	-3.038212	2.140859	0.482753
H	-4.064768	0.694560	0.427438
H	-3.105701	1.011164	1.864802
H	-2.503679	-1.342308	2.298193
O	-2.801844	-1.511323	3.209318
H	-2.045236	-1.250463	3.756784
O	-1.770368	-3.509957	-0.468492
H	-2.558404	-3.553398	-1.035165
H	-1.778301	-2.608101	-0.099688
O	0.662474	-3.603745	-1.881462
H	-0.204589	-3.653810	-1.435482
H	1.036608	-2.778860	-1.549180

- **<u>Βεταΐνη της Αλανίνης κατάσταση διπολικού ιόντος (Εικόνα 3.22 Α)</u>**

22 Atoms

E = -441.835160 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.032714	-0.140401	-0.081230
C	0.313930	0.585232	-0.337517
H	0.292823	0.781375	-1.410856
C	0.428323	1.902809	0.423205
C	1.587230	-0.278364	-0.056269
H	0.485764	1.750076	1.500386
H	1.358575	2.369194	0.105699
H	-0.379338	2.599471	0.205193
O	1.518548	-1.220414	0.764817
O	2.585545	0.121480	-0.688483
C	-2.159264	0.687105	-0.629510
H	-1.963797	0.898353	-1.677742
H	-3.080936	0.118923	-0.530372
H	-2.242058	1.611590	-0.068837
C	-1.292748	-0.403040	1.375387
H	-0.449675	-0.958329	1.768456
H	-1.410003	0.544361	1.891866
H	-2.214195	-0.975448	1.452801
C	-1.028774	-1.448830	-0.823653
H	-2.009614	-1.905615	-0.718959
H	-0.823245	-1.247951	-1.872471
H	-0.260233	-2.081194	-0.397082

- **<u>Βεταΐνη της Αλανίνης πρωτονιομένη κατάσταση (Εικόνα 3.22 Β)</u>**

23 Atoms

E = -442.292392 Hartrees

	X	Y	Z
N	-1.066381	-0.152153	-0.087064
C	0.259959	0.587751	-0.325481
H	0.276590	0.781990	-1.401355
C	0.375446	1.909808	0.435101
C	1.483189	-0.273004	0.006635
H	0.412517	1.761776	1.513106
H	1.306119	2.384498	0.129614
H	-0.433202	2.594544	0.191269
O	1.522549	-1.157416	0.828369
O	2.515694	0.143021	-0.712992
H	3.332647	-0.360710	-0.444529
C	-2.189315	0.676312	-0.655540
H	-3.105568	0.098190	-0.572054
H	-2.287750	1.596756	-0.090893
H	-1.975476	0.889945	-1.699828
C	-1.052140	-1.463428	-0.831827
H	-0.817272	-1.265236	-1.875091
H	-0.311196	-2.117739	-0.388496
H	-2.040256	-1.908079	-0.751014
C	-1.358720	-0.412942	1.368032
H	-2.296336	-0.960726	1.419037
H	-0.549884	-0.996916	1.789034

H	-1.462730	0.534944	1.886107

- **<u>Βεταΐνη της Αλανίνης κατάσταση διπολικού ιόντος + 4 H_2O (Εικόνα 3.23 Α)</u>**

34 Atoms

E = -747.747229 Hartrees

	X	Y	Z
N	2.116164	0.077011	-0.190628
C	0.950026	-0.787197	0.342470
H	1.049791	-1.719817	-0.207919
C	1.047179	-1.066854	1.839669
C	-0.467188	-0.222891	0.042317
H	0.861521	-0.173286	2.433319
H	0.274989	-1.795049	2.082460
H	2.002917	-1.499107	2.130559
O	-0.661345	1.010211	0.088643
O	-1.324494	-1.116810	-0.159877
C	3.377550	-0.741387	-0.154775
H	3.231934	-1.641599	-0.745975
H	4.181339	-0.144767	-0.578241
H	3.617894	-0.998540	0.870944
C	2.348978	1.336018	0.599625
H	1.449275	1.936159	0.583330
H	2.623258	1.072166	1.615846
H	3.170429	1.870896	0.129058
C	1.851888	0.437536	-1.626915
H	2.730358	0.943247	-2.019223
H	1.670180	-0.476897	-2.186719
H	0.989649	1.090814	-1.674148

H	-2.497036	1.625266	0.284647
O	-3.443708	1.836119	0.341403
H	-3.856983	0.984777	0.115316
H	-3.118776	-0.969958	-0.280878
O	-4.092478	-0.861905	-0.308388
H	-4.409553	-1.290036	0.503254
H	-0.375514	2.851854	-0.238874
O	-0.089538	3.769757	-0.358756
H	-0.326954	4.205625	0.475075
H	-0.593874	-4.241936	0.235561
O	-0.546018	-3.766146	-0.607873
H	-0.877947	-2.870051	-0.408546

- **<u>Βεταΐνη της Αλανίνης πρωτονιομένη κατάσταση + 4 H_2O (Εικόνα 3.23 Β)</u>**

35 Atoms

E = -748.198943 Hartrees

	X	Y	Z
N	-2.108408	-0.277173	-0.481766
C	-1.069782	0.765927	-0.028347
H	-1.196415	1.595198	-0.728821
C	-1.282974	1.259354	1.403614
C	0.378157	0.279073	-0.160816
H	-1.039442	0.494893	2.139443
H	-0.627469	2.114995	1.559517
H	-2.302857	1.601210	1.567446
O	0.734106	-0.873631	0.021221
O	1.172886	1.278656	-0.445620
H	2.161483	1.027892	-0.459503
C	-1.708906	-0.863530	-1.811847
H	-0.835271	-1.489876	-1.679976
H	-2.540854	-1.456626	-2.181544
H	-1.499786	-0.048750	-2.501575
C	-3.424305	0.430510	-0.683531
H	-4.149239	-0.303409	-1.024964
H	-3.756644	0.861818	0.254547
H	-3.294112	1.206755	-1.433285
C	-2.316634	-1.390727	0.510529
H	-2.747176	-0.980443	1.418201
H	-3.013419	-2.097328	0.066430

H	-1.372423	-1.875852	0.722954
H	4.139298	1.082099	0.237753
O	3.666319	0.780992	-0.559133
H	3.772608	-0.199107	-0.586402
H	2.492232	-1.794448	-0.398397
O	3.420254	-1.909220	-0.653364
H	3.832312	-2.399478	0.080260
H	0.381862	-3.991619	1.102589
O	0.345899	-3.288151	1.772227
H	0.663661	-2.503169	1.311026
O	0.793937	4.041305	0.855325
H	0.163803	4.617722	0.392038
H	1.006167	3.354491	0.211756

- **<u>Διπεπτίδιο της Αλανίνης κατάσταση διπολικού ιόντος (Εικόνα 3.24)</u>**

23 Atoms

E = -571.319174 Hartrees

	X	Y	Z
N	-3.363505	0.501270	-0.539515
H	-3.223236	1.099927	-1.365991
C	-2.233749	-0.475329	-0.373587
C	-1.039501	0.347815	0.132543
O	-1.257258	1.305006	0.881926
H	-3.393056	1.121809	0.284604
H	-4.273866	0.034174	-0.646646
N	0.157781	-0.081908	-0.247650
H	0.252456	-0.880221	-0.874850
C	1.423646	0.463992	0.237745
C	1.777342	1.781061	-0.460973
H	1.004763	2.529077	-0.287003
H	2.723579	2.156035	-0.074378
H	1.877566	1.627849	-1.537039
H	1.326736	0.644551	1.310613
C	2.546695	-0.585860	0.027078
O	2.287479	-1.561270	-0.721414
O	3.624811	-0.345058	0.614735
C	-2.625978	-1.547365	0.636995
H	-1.807873	-2.257129	0.747358
H	-2.833833	-1.104975	1.611957
H	-3.506445	-2.094167	0.297737

H	-2.037712	-0.907769	-1.357009

- **<u>Διπεπτίδιο της Αλανίνης κατάσταση διπολικού ιόντος + 7 H_2O (Εικόνα 3.24)</u>**

44 Atoms

E = -1106.670246 Hartrees

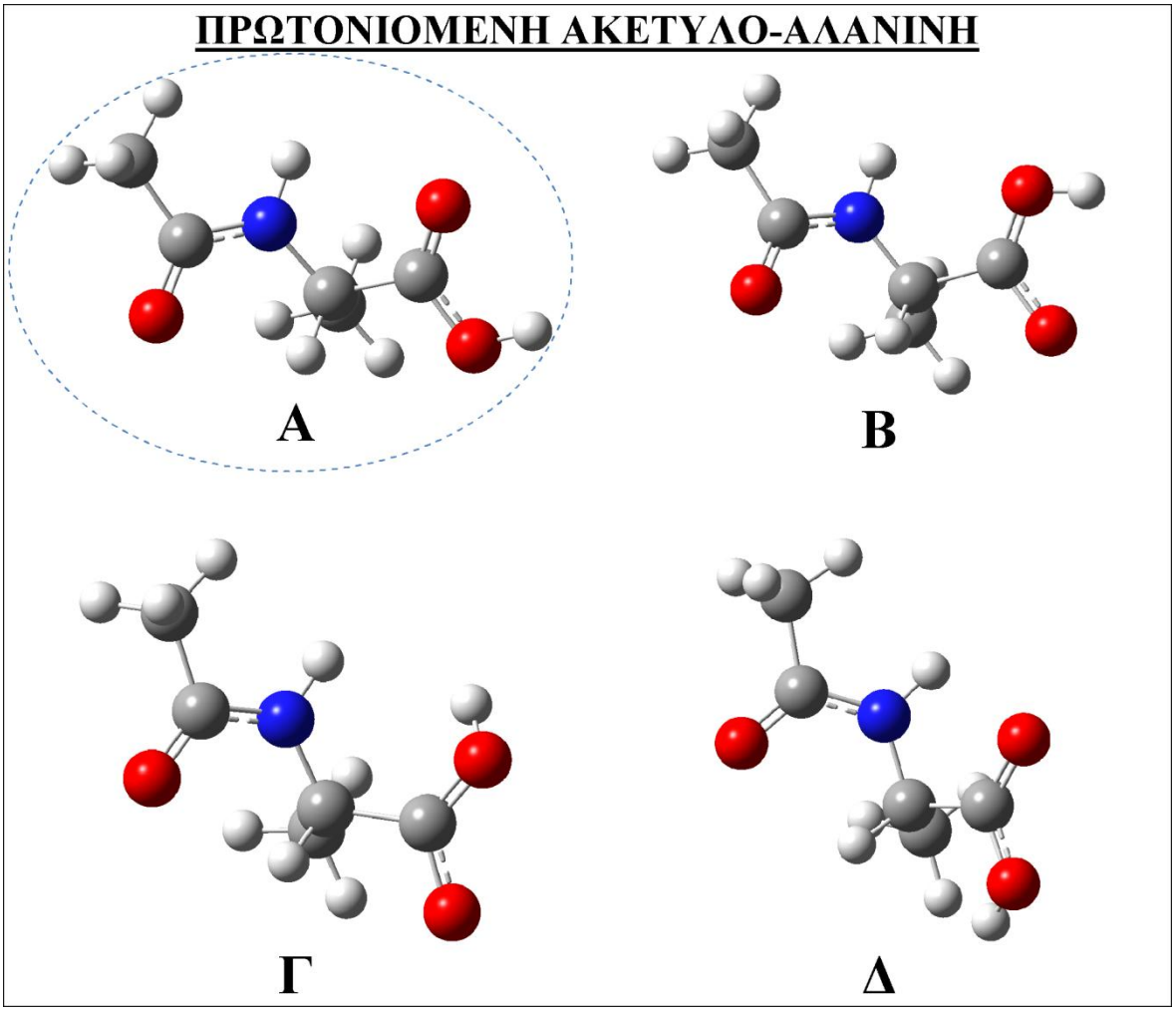
	X	Y	Z
N	-3.630375	0.001677	0.278332
H	-3.819109	0.804380	-0.346632
C	-2.370493	-0.701776	-0.106583
C	-1.228676	0.323894	-0.201168
O	-1.342771	1.457023	0.295328
H	-3.548912	0.390898	1.234842
H	-4.431017	-0.656072	0.241982
H	-2.179394	1.652614	2.079433
O	-2.843045	1.305578	2.698809
H	-3.346746	2.070736	2.997382
H	-5.968302	-2.376025	0.904865
O	-5.767166	-1.854403	0.119597
H	-5.760410	-2.487463	-0.607342
H	-2.761443	2.582507	-0.709122
O	-3.674811	2.533039	-1.031162
H	-3.621412	2.665230	-1.984068
N	-0.144084	-0.114752	-0.832950
H	-0.137821	-1.065814	-1.198650
C	1.091071	0.651874	-0.961940
C	1.426364	0.895250	-2.438659
H	0.620052	1.443528	-2.924013
H	2.342933	1.476678	-2.522150

H	1.569228	-0.049214	-2.965049
H	0.927186	1.603210	-0.465606
C	2.285933	-0.042025	-0.267155
O	2.271105	-1.290039	-0.127729
O	3.227377	0.722407	0.073992
O	4.523502	-2.598230	0.967017
H	3.714387	-2.197647	0.595375
H	5.062872	-1.814031	1.166085
O	5.573300	0.038205	1.308722
H	4.730842	0.285456	0.861269
H	5.435905	0.267122	2.233832
O	0.495021	-2.895246	-1.422606
H	0.820659	-3.163586	-2.288000
H	1.248079	-2.444293	-0.979323
O	2.924655	3.460684	0.262227
H	3.087874	3.812570	-0.618139
H	3.041392	2.491439	0.169961
C	-2.067369	-1.814026	0.896599
H	-1.862638	-1.403917	1.885015
H	-2.917174	-2.491409	0.966436
H	-1.204571	-2.387063	0.566785
H	-2.539568	-1.129585	-1.092976

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Δομές Πρωτονιομένων Ισομερών των παραγώγων της Αλανίνης

- **Πρωτονιομένη Ακετυλο-Αλανίνη (B3LYP/cc-PVTZ, IEF-PCM)**



Εικόνα 1. Π4 Το σύνολο των πιθανών διαμορφώσεων της πρωτονιομένης ακετυλο-Αλανίνης. Ο μπλε διακεκομμένος κύκλος δείχνει την προτιμητέα (χαμηλότερη ενεργειακά) δομή της πρωτονιομένης ακετυλο-Αλανίνης.

Οι ενέργειες των δομών ήταν οι εξής:

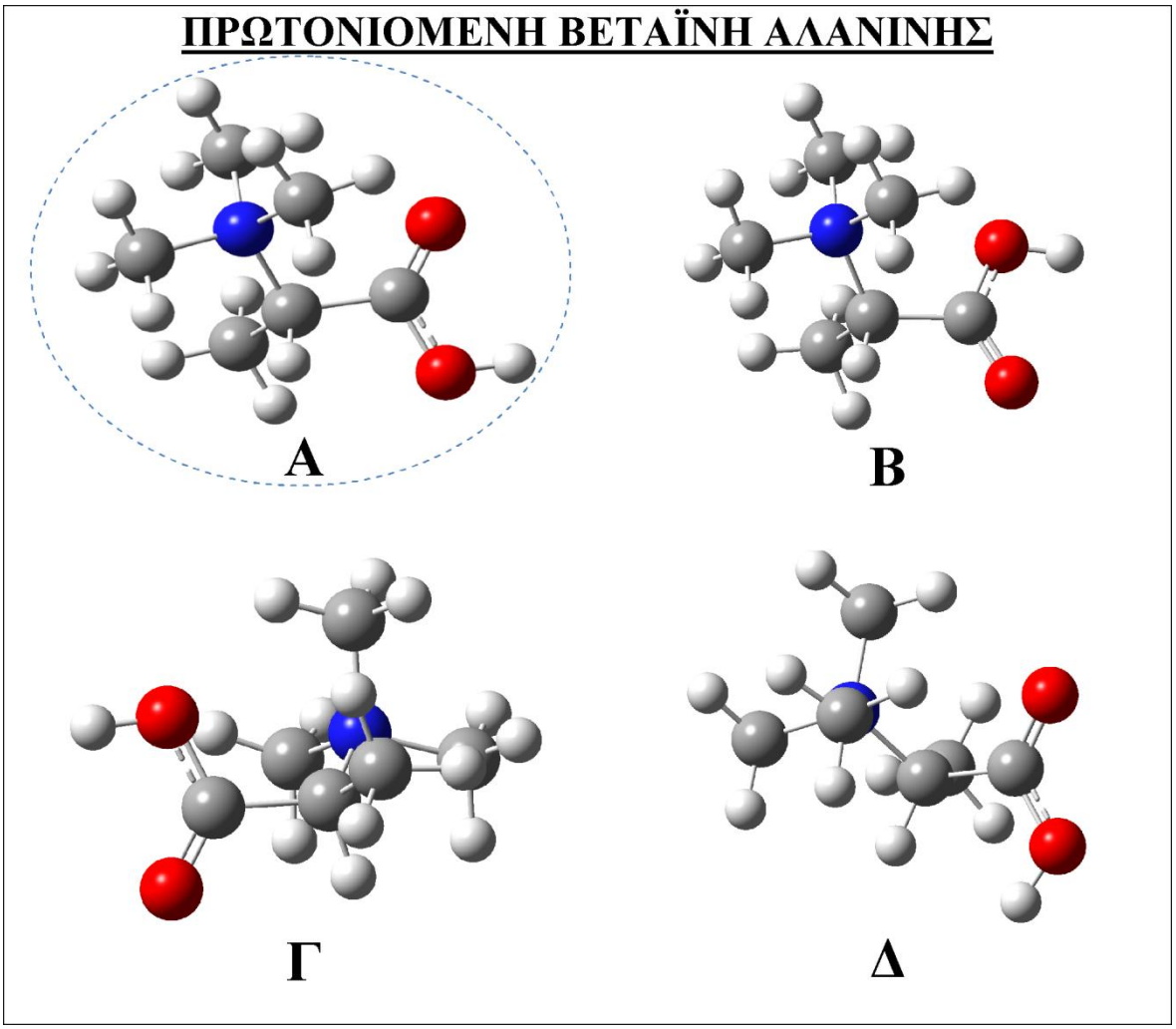
Α: **-476.625284** Hartrees

Β: -476.625004 Hartrees

Γ: -476.625112 Hartrees

Δ: -476.624992 Hartrees

- **<u>Πρωτονιομένη Βεταΐνη της Αλανίνης (B3LYP/cc-PVTZ, IEF-PCM)</u>**



Εικόνα 2. Π4 Το σύνολο των πιθανών διαμορφώσεων της πρωτονιομένης βεταΐνης της Αλανίνης. Ο μπλε διακεκομμένος κύκλος δείχνει την προτιμητέα (χαμηλότερη ενεργειακά) δομή της πρωτονιομένης βεταΐνης της Αλανίνης.

Α: **-442.292392** Hartrees

Β: -442.290432 Hartrees

Γ: -442.290067 Hartrees

Δ: -442.286993 Hartrees

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Δομές Οξέων – DMSO

- **<u>Οξικό οξύ – B3LYP (Εικόνα 3.32 A)</u>**

8 Atoms

	X	Y	Z
C	1.390147	-0.122963	-0.000220
H	1.668537	-0.685660	0.890875
H	1.922017	0.822316	-0.021235
H	1.665306	-0.725368	-0.865770
C	-0.088358	0.121585	-0.000633
O	-0.789719	-1.029736	-0.000128
H	-1.734012	-0.807591	0.001587
O	-0.626854	1.205307	0.000085

- **<u>Οξικό οξύ – MP2 (Εικόνα 3.32 B)</u>**

8 Atoms

	X	Y	Z
C	-1.381844	-0.112244	-0.000039
H	-1.655601	-0.692827	-0.873470
H	-1.902501	0.833389	-0.003805
H	-1.656136	-0.685816	0.877896
C	0.087666	0.119970	-0.000100
O	0.772846	-1.035858	-0.000010
H	1.713663	-0.805603	0.000151
O	0.635359	1.198920	0.000018

- **DMSO – B3LYP (Εικόνα 3.32 Γ)**

10 Atoms

	X	Y	Z
S	0.000267	0.218646	-0.446657
O	0.001650	1.493558	0.381242
C	1.365124	-0.798422	0.189624
H	1.333708	-1.776201	-0.287359
H	2.287627	-0.286340	-0.072132
H	1.266390	-0.882980	1.270342
C	-1.366811	-0.795791	0.189575
H	-2.287906	-0.277256	-0.064198
H	-1.343014	-1.770277	-0.294536
H	-1.264149	-0.888476	1.269262

- **DMSO – MP2 (Εικόνα 3.32 Δ)**

10 Atoms

	X	Y	Z
S	0.000228	0.215604	-0.448058
O	0.001244	1.480675	0.380263
C	1.332589	-0.789820	0.189696
H	1.302086	-1.765422	-0.281902
H	2.258373	-0.286211	-0.057652
H	1.216207	-0.866908	1.265081
C	-1.333877	-0.787748	0.189629
H	-2.258586	-0.280283	-0.053681
H	-1.308240	-1.761766	-0.285476
H	-1.215710	-0.869072	1.264503

- **<u>Οξικό οξύ + DMSO – B3LYP (Εικόνα 3.33 A)</u>**

18 Atoms

	X	Y	Z
C	3.840892	-0.000942	-0.129824
H	4.241812	-0.246237	0.854073
H	4.137338	-0.799692	-0.809621
H	4.252461	0.944536	-0.468047
C	2.340522	0.078144	-0.058726
O	1.784588	-1.071033	0.310355
H	0.779869	-0.978186	0.358502
O	1.696285	1.081239	-0.311783
S	-1.587648	-0.025383	-0.383656
O	-0.812622	-0.984386	0.536406
C	-3.301443	-0.593285	-0.275727
H	-3.939521	0.124219	-0.787329
H	-3.347186	-1.556663	-0.776541
H	-3.575383	-0.688738	0.772792
C	-1.746861	1.514582	0.554428
H	-0.744686	1.927693	0.627077
H	-2.397989	2.193121	0.007027
H	-2.149017	1.288525	1.539825

- **<u>Οξικό οξύ + DMSO – MP2 (Εικόνα 3.33 B)</u>**

18 Atoms

	X	Y	Z
C	-3.698882	0.095948	-0.198741
H	-4.006882	-0.650031	-0.922685
H	-4.155392	-0.160681	0.750746
H	-4.027421	1.075512	-0.513593
C	-2.212122	0.071899	-0.058305
O	-1.756033	-1.116599	0.306820
H	-0.752482	-1.057466	0.404473
O	-1.492804	1.035369	-0.256911
S	1.460274	-0.028324	-0.355721
O	0.801563	-1.010227	0.614883
C	1.673275	1.475938	0.575365
H	2.270173	2.170565	-0.004700
H	0.679724	1.872074	0.736315
H	2.155058	1.229893	1.514650
C	3.168290	-0.538028	-0.385530
H	3.201893	-1.506485	-0.867567
H	3.741320	0.183049	-0.956815
H	3.524457	-0.606129	0.635639

- **<u>Οξικό οξύ + DMSO frozen – B3LYP (Εικόνα 3.34 A)</u>**

18 Atoms

	X	Y	Z
C	-4.017045	-0.277885	-0.562548
H	-4.042079	0.181538	-1.550768
H	-4.083337	-1.356689	-0.703981
H	-4.860900	0.068102	0.025652
C	-2.724087	0.066941	0.126166
O	-1.660198	-0.344489	-0.556301
H	-0.797941	-0.105095	-0.088217
O	-2.652557	0.652850	1.190447
S	1.864836	-0.139788	-0.412722
O	0.667720	0.155484	0.504789
C	2.897176	1.344927	-0.331191
H	3.841975	1.141942	-0.830685
H	2.361514	2.134310	-0.851167
H	3.049755	1.604064	0.714210
C	2.926994	-1.254771	0.539818
H	2.379567	-2.186386	0.655252
H	3.843757	-1.425763	-0.020752
H	3.132364	-0.805437	1.509056

- **<u>Οξικό οξύ + DMSO frozen – MP2 (Εικόνα 3.34 B)</u>**

18 Atoms

	X	Y	Z
C	-3.941485	-0.344526	-0.532633
H	-3.951704	-0.020217	-1.567107
H	-4.009078	-1.426589	-0.526621
H	-4.781923	0.080686	-0.004027
C	-2.661343	0.078607	0.109674
O	-1.600070	-0.421131	-0.509081
H	-0.755512	-0.113542	-0.049851
O	-2.591834	0.797125	1.088419
S	1.799787	-0.164593	-0.388999
O	0.654297	0.241478	0.540041
C	2.864892	1.261687	-0.448375
H	3.780636	0.993591	-0.962289
H	2.339786	2.031802	-0.997891
H	3.060854	1.579638	0.569201
C	2.852561	-1.199816	0.607814
H	2.296114	-2.102204	0.825224
H	3.746010	-1.438135	0.042441
H	3.091346	-0.667026	1.520993

Βιβλιογραφικές Αναφορές

[1] S.N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 67-97.

[2] Y. Levy, J.N. Onuchic, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 389-415.

[3] H. Edsall, J., & McKenzie, *Adv. Biophys.* **1983**, *16*, 53-183.

[4] M. Gao, H. Zhu, X.-Q. Yao, Z.-S. She, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *392*, 95-99.

[5] X. Hu, H. Li, W. Liang, S. Han, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *417*, 320-325.

[6] M.B. Peirotti, M.V. Piaggio, J. a Deiber, *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 548-554.

[7] J.M.M. Cordeiro, A.K. Soper, *Chem. Phys.* **2011**, *381*, 21-28.

[8] IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, **1997**.

[9] K. Horie, M. Báron, R.B. Fox, J. He, M. Hess, J. Kahovec, T. Kitayama, P. Kubisa, E. Maréchal, W. Mormann, R.F.T. Stepto, D. Tabak, J. Vohlídal, E.S. Wilks, W.J. Work, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 889-906.

[10] K.S. Richardson, T.H. Lowry, *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, **1997**.

[11] Σ Χαμόδρακας, *Μοριακη Βιοφυσικη*, Εκδόσεις Συμμετρία, **1993**.

[12] E. Arunan, G.R. Desiraju, R. A. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, D.C. Clary, R.H. Crabtree, J.J. Dannenberg, P. Hobza, H.G. Kjaergaard, A.C. Legon, B. Mennucci, D.J. Nesbitt, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 1637-1641.

[13] M. Chaplin, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2006**, *7*, 861-6.

[14] (a) J. Janin, *Structure* **1999**, *7*, R277-9.(b) Ch. Reddy, A. Das, B. Jayaram, *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 619-632.

[15] D. Zhong, S.K. Pal, A.H. Zewail, *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *503*, 1-11.

[16] D. Laage, G. Stirnemann, F. Sterpone, R. Rey, J.T. Hynes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 395-416.

[17] I. Gitlin, J.D. Carbeck, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3022-3060.

[18] V. Makarov, B.M. Pettitt, M. Feig, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 376-384.

[19] Y.-K. Cheng, P.J. Rossky, *Nature* **1998**, *392*, 696-699.

[20] A.R. Bizzarri, S. Cannistraro, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6617-6633.

[21] M. Falconi, M. Brunelli, A. Pesce, M. Ferrario, M. Bolognesi, A. Desideri, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2003**, *51*, 607-615.

[22] R.H. Henchman, J. Andrew McCammon, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2080-2090.

[23] M. Levitt, B.H. Park, *Structure* **1993**, *1*, 223-226.

[24] D. Russo, G. Hura, T. Head-Gordon, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1852-1862.

[25] S.K. Pal, A.H. Zewail, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2099-2124.

[26] A.S. Morris, N. Thanki, J.M. Goodfellow, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 717-728.

[27] A. Hirabayashi, Y. Takada, H. Kambara, Y. Umemura, H. Ito, K. Kuchitsu, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *204*, 152-156.

[28] J.L. Alonso, E.J. Cocinero, A. Lesarri, M.E. Sanz, J.C. López, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3471-3474.

[29] N. Thanki, J.M. Thornton, J.M. Goodfellow, *J. Mol. Biol.* **1988**, *202*, 637-657.

[30] O. Likhodi, T.V. Chalikian, *Ultrasonics* **2000**, 7860-7868.

[31] J. Lauterwein, I.P. Gerothanassis, R. Huston, M. Schumacher, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3804-3811.

[32] J. Tritt-Goc, D. Fiat, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 156-163.

[33] T. Vogl, H.J. Hinz, G.R. Hedwig, *Biophysical Chemistry* **1995**, *54*, 261-269.

[34] C. Liu, L. Zhou, R. Lin, *J. Solution Chem.* **2007**, *36*, 923-937.

[35] T. Banipal, K. Singh, P. Banipal, J. Kaur, *J. Chem. Thermodyn.* **2008**, *40*, 1166-1185.

[36] H. Zhao, *Biophys. Chem.* **2006**, *122*, 157-183.

[37] C.M. Romero, E. Moreno, J.L. Rojas, *Thermochim. Acta* **1999**, *328*, 33-38.

[38] A.N. Troganis, C. Tsanaktsidis, I.P. Gerothanassis, *J. Magn. Reson.* **2003**, *164*, 294-303.

[39] C. Michaux, J. Wouters, E.A. Perpète, D. Jacquemin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 632-638.

[40] B. Gao, T. Wyttenbach, M.T. Bowers, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9995-10000.

[41] C. Michaux, J. Wouters, D. Jacquemin, E.A. Perpète, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *445*, 57-61.

[42] H. Wincel, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *439*, 157-161.

[43] H. Wincel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 2083-2089.

[44] S. Liao, M.E. Green, *Comput. Theor. Chem.* **2011**, *963*, 207-214.

[45] F. Sterpone, G. Stirnemann, J.T. Hynes, D. Laage, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 2083-2089.

[46] Y. Yao, D. Chen, S. Zhang, Y. Li, P. Tu, B. Liu, M. Dong, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 6213-6221.

[47] A. White, S. Jiang, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 660-667.

[48] M. Dracínský, J. Kaminský, P. Bour, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 14698-707.

[49] I.M. Degtyarenko, K.J. Jalkanen, A.A. Gurtovenko, R.M. Nieminen, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 4227-4234.

[50] B. Hernández, F. Pflüger, A. Adenier, S.G. Kruglik, M. Ghomi, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15319-15330.

[51] B. Hernández, F. Pflüger, M. Nsangou, M. Ghomi, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3169-3178.

[52] N. Derbel, B. Hernández, F. Pflüger, J. Liquier, F. Geinguenaud, N. Jaïdane, Z.B. Lakhdar, M. Ghomi, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1470-1477.

[53] B. Gao, T. Wyttenbach, M.T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4695-4701.

[54] A. Panuszko, M. Śmiechowski, J. Stangret, *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 115104.

[55] S.T. Chambers, C.K. M, *J. Clin. Invest.* **1987**, *79*, 731-737.

[56] L.R. Singh, T.A. Dar, S. Rahman, S. Jamal, F. Ahmad, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 929-935.

[57] S. Ressl, A.C. Terwisscha Van Scheltinga, C. Vonrhein, V. Ott, C. Ziegler, *Nature* **2009**, *458*, 47-52.

[58] V.N. Afanas'ev, E.Y. Tyunina, V.V. Ryabova, *Russ. J. Gen. Chem.* **2005**, *75*, 1723-1728.

[59] K.J. Jalkanen, I.M. Degtyarenko, R.M. Nieminen, X. Cao, L. a Nafie, F. Zhu, L.D. Barron, *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *119*, 191-210.

[60] M.H. Baslow, *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 1335-1344.

[61] Α. Τρογκάνης, *Φυσικοχημεία Βιολογικών Συστημάτων*, Πανεπιστημίο Ιωαννίνων, **2008**.

[62] E. Breitmaier, W. Voelter, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, VCH, **1989**.

[63] J. Kowalewski, L. Mäler, *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*, Taylor & Francis, **2006**.

[64] F.A. Foresman J. B., *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, Gaussian Inc., Pittsburgh, Pa.

[65] Levine I. N., *Quantum Chemistry*, ,5th Edition Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey, U.S.A., **2000**.

[66] R. Leach, *Molecular Modelling. Principles Applications*, Longman, **1996**.

[67] W. Koch, Holthausen M. C., *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. 2nd Edition, Wiley, **2001**.

[68] Κ. Τσίπης, *Εισαγωγή στην Κβαντική Χημεία, Τόμος Ι Στοιχειώδης Μεθοδολογία Δομή*, Εκδοτικός Οίκος Ζήτη, **1992**.

[69] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864-B871.

[70] W. Kohn, L.J. Sham, *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133-A1138.

[71] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.

[72] D.M. Ceperley, B.J. Alder, *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45*, 566-569.

[73] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200-1211.

[74] K. Burke, J.P. Perdew, Y. Wang, *Derivation of a Generalized Gradient Approximation: The PW91 Density Functional, in Electronic Density Functional Theory. Recent Progress and New Directions*, Plenum Press, New York, **1998**.

[75] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623-11627.

[76] A.D. Becke, *Int. J. Quant. Chem. Symp.* **1989**, *23*, 599-603.

[77] J.P. Perdew, W. Yue, *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8800-8802.

[78] D.J. Lacks, R.G. Gordon, *Phys. Rev. A* **1993**, *47*, 4681-4690.

[79] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865-3868.

[80] J.P. Perdew, *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822-8824.

[81] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

[82] R. Colle, O. Salvetti, *Theor. Chim. Acta* **1975**, *37*, 329-334.

[83] A.D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.

[84] T.J. Lee, C.W. Bauschlicher Jr., D. Jayatilaka, *Theor. Chem. Acc.* **1997**, *97*, 185-194.

[85] J.M.L. Martin, *Some Observations Case Studies on Basis Set Convergence in Density Functional Theory. A Bridge Between Chemistry Physics*, VUB Press Brussels, **2000**.

[86] W.J. Hehre, K. Ditchfield, J.A. Pople, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257-2261.

[87] P.C. Hariharan, J.A. Pople, *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-222.

[88] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571-2577.

[89] T.H. Dunning Jr., *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007-1023.

[90] K.S. Raymond, R.A. Wheeler, *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 207-216.

[91] W.J. Hehre, L. Radom, P. v R. Schleyer, J.A. Pople, *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, **1986**.

[92] B.G. Johnson, M.J. Fisch, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 7429-7442.

[93] R.E. Stratmann, J.C. Burant, G.E. Scuseria, M.J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 10175-10183.

[94] W.D. Allen, A.G. Császár, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 2983-3015.

[95] R.H. Figueroa, E. Roig, H.H. Szmant, *Spectrochim. Acta* **1966**, *22*, 587-592.

[96] W.R. Fawcett, A.A. Kloss, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 3333-3337.

[97] S.W. Shirley, B.H. Stewart, S. Mirelman, *Urology* **1978**, *11*, 215-220.

[98] J. Geiss, *The Century of Space Science*, Kluwer Academic, **2001**.

[99] C.M. Soares, V.H. Teixeira, A.M. Baptista, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1628-1641.

[100] D.S. Clark, P. Ball, J.A. Littlechild, D.W. Rice, B. Halle, *Phil. Trans. R. Soc. B* **2004**, *359*, 1299-1307.

[101] P.J. Halling, J.L. Finney, M.W. Ho, F. Franks, J.A. Littlechild, *Phil. Trans. R. Soc. B* **2004**, *359*, 1287-1297.

[102] D.E. Pegg, *Meth. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 39-57.

[103] S. Toba, D.S. Hartsough, K.M. Merz Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6490-6498.

[104] A.M.S. Duarte, C.P.M. Van Mierlo, M.A. Hemminga, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8664-8671.

[105] M.A.C. Preto, A. Melo, L.M. Rodrigues, H.L.S. Maia, M.J. Ramos, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13620-13628.

[106] Y.-J. Zheng, R.L. Ornstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4175-4180.

[107] J.M.M. Cordeiro, A.R.S.A. Bosso, *J. Mol. Liq.* **2010**, *154*, 36-40.

[108] V. Theodorou, A.N. Troganis, I.P. Gerothanassis, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2243-2245.

[109] E.D. Becker, *High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications*, Academic Press, **2000**.

[110] C. Møller, M.S. Plesset, *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618.

[111] E.C. Kemble, *The Fundamental Principles of Quantum Mechanics*, McGraw-Hill N.Y., **1937**.

[112] R.J. Bartlett, *Ann. Rev. Phys. Rev.* **1981**, *32*, 359-380.

[113] N.C. Handy, P.J. Knowles, K. Somasundram, *Theor. Chim. Acta* **1985**, *68*, 87-100.

[114] P.J. Knowles, K. Somasundram, N.C. Handy, K. Hirao, *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *113*, 8-12.

[115] K. Wolinski, P. Pulay, *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 3647-3659.

[116] G.C. Levy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, *0*, 47-48.

[117] Y. Goldberg, E. Abele, G. Bremanis, P. Trapenciers, A. Gaukhman, J. Popelis, A. Gomtsyan, I. Kalviņš, M. Shymanska, E. Lukevics, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 1911-1922.

[118] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, W.C. Pople, J.A. Revision E.01,Gaussian, Inc., **2007**.

[119] M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, J. Tomasi, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *255*, 327-335.

[120] S. Miertš, E. Scrocco, J. Tomasi, *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117-129.

[121] S. Miertuš, J. Tomasi, *Chem. Phys.* **1982**, *65*, 239-245.

[122] E. Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032-3041.

[123] W. Sang-Aroon, V. Ruangpornvisuti, *Int. J. Quantum Chem.* **2008**, *108*, 1181-1188.

[124] S. De, S.M. Ali, A. Ali, V.G. Gaikar, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 8285-8294.

[125] L.M. Kroon-Batenburg, J. Kroon, B.R. Leeflang, *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 21-42.

[126] R.T. Boere, R.G. Kidd, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1982**, *13*, 319-385.

[127] A.A. Al-Karaghouli, F.E. Cole, M.S. Lehmann, C.F. Miskell, J.J. Verbist, T.F. Koetzle, *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 1360-1366.

[128] H.A. Azab, Z.M. Anwar, R.G. Ahmed, *J. Chem. Eng. Data* **2011**, *56*, 833-849.

[129] a F. Hofmann, A. Roda, *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 1477-1489.

[130] R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott, K.M. Jones, *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press, **1986**.

[131] S. Bonkoski, J.H. Perrin, *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1784-1785.

[132] A.J. Shaka, J. Keeler, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, *19*, 47-129.

[133] A.J. Shaka, J. Keeler, R. Freeman, *J. Magn. Reson. (1969)* **1983**, *53*, 313-340.

[134] A. Allerhand, D. Doddrell, R. Komoroski, *J. Chem. Phys.* **1971**, *55*, 189-198.

[135] D. Doddreix, V. Glushko, A. Allerhand, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 3689-3696.

[136] D.E. Woessner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 1855-1859.

[137] T. Giavani, H. Bildsøe, J. Skibsted, H.J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.* **2004**, *166*, 262-272.

[138] D.T. Edmonds, *Phys. Rep.* **1977**, *29*, 233-290.

[139] A. Bagno, F. Rastrelli, G. Saielli, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *47*, 41-93.

[140] A.K. Rai, X. Xu, Z. Lin, D.K. Rai, *Vib. Spectrosc.* **2011**, *56*, 74-81.

[141] M. Tusch, J. Krüger, G. Fels, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2919-2928.

[142] K. Rajagopal, S. Edwin Gladson, *Thermochim. Acta* **2011**, *525*, 197-205.

[143] S.A. Markarian, L.S. Gabrielyan, *J. Mol. Liq.* **2011**, *164*, 207-211.

[144] J. Mason, *Encyclopedia of NMR, Chapter: Nitrogen NMR*, Wiley, **2007**

[145] I.P. Gerothanassis, *Encyclopedia of NMR, Chapter: Oxygen-17 NMR*, Wiley, **2007**