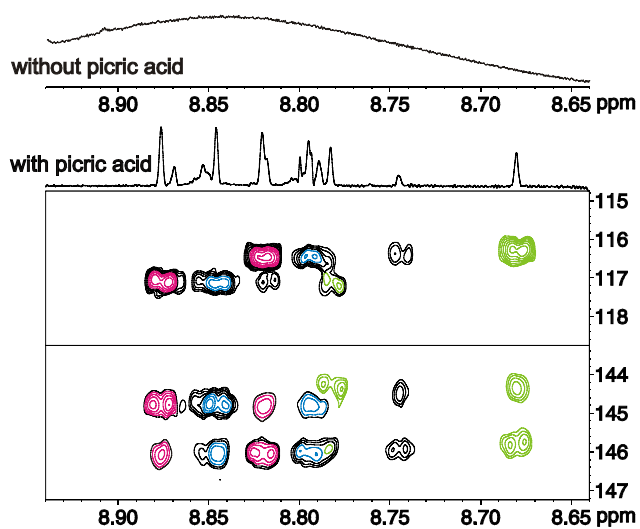




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μελέτη Φαινολικών Ενώσεων Φυτικής Προέλευσης με Χρήση
Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Συνδυαστικών
Τεχνικών**



Παντελής Π. Χαρισιάδης

Χημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

Ημερομηνία αίτησης του κ. Παντελή Χαρισιάδη: 13-12-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 656^A/15-12-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Καθηγητής Ιωάννης Π. Γεροθανάσης

Μέλη:

Αναπλ. Καθηγήτρια Βασιλική Θεοδώρου-Κασιούμη

Επικ. Καθηγητής Αναστάσιος Ν. Τρογκάνης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 666^A/27-04-2007

Θέμα: «Μελέτη Φαινολικών Ενώσεων Φυτικής Προέλευσης με τη Χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Συνδυαστικών Τεχνικών»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 818^A/27-06-2011

1. Καθηγητής Ιωάννης Π. Γεροθανάσης
2. Αναπλ. Καθηγήτρια Βασιλική Δ. Θεοδώρου-Κασιούμη
3. Επικ. Καθηγητής Αναστάσιος Ν. Τρογκάνης
4. Καθηγητής Βασίλειος Ε. Τσίκαρης
5. Καθηγητής Γεώργιος Α. Πηλίδης
6. Αναπλ. Καθηγητής Κων/νος Δ. Σταλίκας
7. Λέκτορας Ανδρέας Γ. Τζάκος

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 12-10-2011

Προς: τη Γραμματεία του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα, 12-10-2011

**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ
κ. ΠΑΝΤΕΛΗ ΧΑΡΙΣΙΑΔΗ**

Σήμερα στις 12 Οκτωβρίου και ώρα 18:00, η επταμελής εξεταστική επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. Καθηγητή **Ιωάννη Π. Γεροθανάση**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, επιβλέπων καθηγητής
2. Αναπλ. Καθηγήτρια **Βασιλική Δ. Θεοδώρου-Κασιούμη**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής
3. Επικ. Καθηγητή **Αναστάσιο Ν. Τρογκάνη**, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής
4. Καθηγητή **Βασίλειο Ε. Τσίκαρη**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής
5. Καθηγητή **Γεώργιο Α. Πηλίδη**, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής
6. Αναπλ. Καθηγητή **Κων/νο Δ. Σταλίκας**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής
7. Λέκτορα **Ανδρέα Γ. Τζάκο**, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος της εξεταστικής επιτροπής

που ορίστηκε με την απόφαση του Τμήματος Χημείας (Συνεδρίαση 818^Α/27-06-2011), συνήλθε στην αίθουσα σεμιναρίων του Δ.Ι.Κ.Ε.Π.Π.Ε.Ε. «Στ. Νιάρχος» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής του υποψήφιου διδάκτορα κ. Παντελή Χαρισιάδη του Πασχάλη με τίτλο:

**«Μελέτη Φαινολικών Ενώσεων Φυτικής Προέλευσης με Χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού
Μαγνητικού Συντονισμού και Συνδυαστικών Τεχνικών»**

Πριν την έναρξη της συνεδρίας ο επιβλέπων καθηγητής ενημέρωσε τα μέλη και το κοινό για τη διαδικασία σύμφωνα με το άρθρο 13, 12 του Νόμου 2083/92. Ο κ. Παντελής Χαρισιάδης παρουσίασε επί μία ώρα περίπου τα κυριότερα αποτελέσματα της διατριβής του, απάντησε σε ερωτήσεις του ακροατηρίου και στην συνέχεια σε ερωτήματα της εξεταστικής επιτροπής.

Στην συνέχεια αποχώρησε ο κ. Παντελής Χαρισιάδης μαζί με το ακροατήριο. Η επταμελής εξεταστική επιτροπή έπειτα από σύσκεψη και λεπτομερή συζήτηση έκρινε ότι η διατριβή είναι υψηλού επιπέδου, πρωτότυπη και συμβάλει ουσιαστικά στην εξέλιξη της επιστήμης. Η επιτροπή κατόπιν ψηφοφορίας αποφάσισε ομόφωνα να προτείνει την απονομή του τίτλου του διδάκτορος στον κ. Παντελή Χαρισιάδη με βαθμό «Άριστα» από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η εξεταστική επιτροπή:

1. Καθηγητής **Ιωάννης Π. Γεροθανάσης**

2. Αναπλ. Καθηγήτρια **Βασιλική Δ. Θεοδώρου-Κασιούμη**

3. Επικ. Καθηγητής **Αναστάσιος Ν. Τρογκάνης**

4. Καθηγητής **Βασίλειος Ε. Τσίκαρης**

5. Καθηγητής **Γεώργιος Α. Πηλίδης**

6. Αναπλ. Καθηγητής **Κων/νος Δ. Σταλίκας**

7. Λέκτορας **Ανδρέας Γ. Τζάκος**

*«Είναι αναγκαία η καταιγίδα για τα δέντρα που θέλουν να φτάσουν σε
υπερήφανα ύψη»
Νίτσε*

*Στους γονείς μου,
τους κόπους των οποίων εύχομαι να τίμησα και προς τους οποίους το
ευχαριστώ δεν χωράει σε ολόκληρη διατριβή.*

Στη Μαρία

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ιωάννη Π. Γεροθανάση. Την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή συμπληρώνουν η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Βασιλική Θεοδώρου-Κασιούμη και ο Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αναστάσιος Ν. Τρογκάνης.

Θερμά ευχαριστώ τον επιβλέποντα μου, Καθηγητή κ. Ιωάννη Π. Γεροθανάση για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγηση του, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε και για όλες τις υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Θεοδώρου-Κασιούμη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αναστάσιο Ν. Τρογκάνη, για τις σημαντικές υποδείξεις τους, τα εύστοχα σχόλια, το συνεχές ενδιαφέρον και την άμεση συνεργασία κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ακόμη θερμά ευχαριστώ τον Λέκτορα Ανδρέα Γ. Τζάκο για τις πολύτιμες συζητήσεις και την συμπαράσταση που μου προσέφερε όλο αυτό τον καιρό.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του Κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τη Δρ. Βασιλική Εξάρχου και τον Δρ. Κων/νο Τσιαφούλη, για όλη τη βοήθεια που μου προσέφεραν για τη λήψη των φασμάτων NMR, καθώς και τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Καραταπάνη Ανδρέα, Βασιλική Κοντογιάννη, Αλεξάνδρα Πριμηκύρη, Χαράλαμπο Παππά και Ελένη Κυριακού για την συνεργασία τους και την φιλική ατμόσφαιρα.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες στο Ίδρυμα Ιωσήφ και Εσθήρ Γκανή, για τη μερική χρηματοδότηση της διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς του γονείς μου για την ηθική, οικονομική και ψυχολογική συμπαράσταση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής.

Παντελής Π. Χαρισιάδης
Ιωάννινα, Οκτώβριος 2011

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής οι παρακάτω εργασίες έχουν ήδη δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ή βρίσκονται υπό κρίση:

1. Exploring the ‘‘forgotten’’ –OH NMR Spectral Region in Natural Products.

Charisiadis P., Exarchou V., Troganis A.N., Gerothanassis I. P.

Chem. Commun., **2010**, 46, 3589-3591.

2. Novel Determination of the Total Phenolic Contents in Crude Plant Extracts by the Use of ^1H NMR of the -OH Spectral Region.

Neratzaki A.A., Tsiafoulis C.G., Charisiadis P., Kontogianni V.G., Gerothanassis I.P.

Anal. Chim. Acta, **2011**, 688, 54-60.

3. Unprecedented Ultra High-resolution Hydroxy Group ^1H NMR Spectroscopic Analysis of Plant Extracts.

Charisiadis P., Primikyri A., Exarchou V., Tzakos A., Gerothanassis I.P.

J. Nat. Prod., **2011**, accepted.

4. Unexpected Enzyme-Catalyzed Regioselective Acylation of Flavonoid Aglycones.

Kyriakou E., Primikyri A., Charisiadis P., Katsoura M., Gerothanassis I.P., Stamatis H., Tzakos A.G.

under evaluation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	xi
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	xxii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xxxix
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.2 Φαινόλες και Φαινολικά Οξέα.....	4
1.3 Φαινυλοπροπανοειδή	5
1.4 Φλαβονοειδή	5
1.5 Πολυμερείς Φαινολικές Ενώσεις	8
1.6 Σεκοϊριδοειδή - Ελαιοευρωπαϊνή και Παράγωγα	9
2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ	11
2.1 Χημική Μετατόπιση.....	11
2.1.2 Τοπική Παραμαγνητική Προστασία	13
2.1.3 Μαγνητική Ανισοτροπία	15
2.1.4 Επίδραση του Διαλύτη και των Δεσμών Υδρογόνου.....	16
2.2 Σταθερές Σύζευξης.....	20
2.2.1 Ομοπυρηνική Σύζευξη Spin-Spin ^1H - ^1H (Spin-Spin Coupling).....	20
2.2.2 Ετεροπυρηνική Σύζευξη Spin-Spin ^1H - ^{13}C (Spin-Spin Coupling)	23
2.3 Φαινόμενο Ανταλλαγής Πρωτονίων - Επίδραση Δεσμού Υδρογόνου και pH	25
2.3.1 Επίδραση Διαμοριακών και Ενδομοριακών Δεσμών Υδρογόνου	25
2.3.2 Επίδραση του Διαλύτη και της Συγκέντρωσης.....	28
2.3.3 Επίδραση της Θερμοκρασίας.....	31
2.4 Μελέτη Δυναμικών και Θερμοδυναμικών Ισορροπιών με τη Φασματοσκοπία NMR.....	34
2.5 Φασματοσκοπία NMR Δύο Διαστάσεων	39
2.5.1 Τεχνική Ετεροπυρηνικής Φασματοσκοπίας Συσχέτισης Πολλαπλού Κβάντου ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC ^1H - ^{13}C).	39
2.5.2 Τεχνική Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Coherence HMBC ^1H - ^{13}C).	41

2.5.3 Τεχνική της Ομοπυρηνικής Φασματοσκοπίας Συσχέτισης μέσω του Φαινομένου NOE ^1H - ^1H (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy, ^1H - ^1H NOESY).....	44
3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ.....	49
3.1 Υγρή Χρωματογραφία	49
3.2 Υγρή Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματόμετρο Μάζας	49
3.3 Υγρή Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματογράφο NMR.....	50
3.3.1 LC-NMR με Κρυογενική (cryogenic) Τεχνολογία.....	51
3.3.2 LC-SPE-NMR.....	52
4. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	59
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	61
5.1 Αντιδραστήρια - Υλικά	61
5.2 Δείγματα	61
5.3 Προετοιμασία Εκχυλισμάτων	61
5.4 Μελέτη της Σύστασης των Εκχυλισμάτων με Χρήση Φασματοσκοπίας NMR Μιας (1D) και Δύο (2D) Διαστάσεων.....	64
5.5 Μελέτη της Σύστασης των Εκχυλισμάτων με Χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	64
5.6 Μελέτη της Σύστασης των Εκχυλισμάτων με τη Χρήση της Συνδυαστικής Τεχνικής LC-MS	65
5.7 Μελέτη της Σύστασης των Εκχυλισμάτων με τη Χρήση της Συνδυαστικής Τεχνικής LC-SPE-NMR	65
5.7.1 Οργανολογία.....	66
5.7.2 Σύστημα Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΛΗΨΗΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	69
6.1 Εισαγωγή.....	69
6.2 Επιλογή Δευτεριωμένου Διαλύτη.....	70
6.3 Οξόνιση του Δευτεριωμένου Διαλύτη - Εφαρμογή της Μεθοδολογίας σε Μίγμα Πρότυπων Ενώσεων	71
6.4 Εφαρμογή της Μεθοδολογίας Αραιών Διαλυμάτων σε Ακετονικό Εκχύλισμα Ρίγανης ..	84

6.5 Εφαρμογή της Μεθοδολογίας Αραιών Διαλυμάτων σε Μεθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς.....	93
7. ΧΡΗΣΗ ΠΙΚΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	99
7.1 Σύγκριση Οξέων - Επιλογή Πικρικού Οξέος	99
7.2 Εφαρμογή Πικρικού Οξέος σε Πρότυπη Ένωση.....	102
7.3 Εφαρμογή σε Ακετονικό Εκχύλισμα Ρίγανης - Επίδραση της Θερμοκρασίας	107
7.4 Μέθοδος της Επιμόλυνσης (spiking) με Πρότυπες Ενώσεις.....	111
7.5 Εφαρμογή σε Μεθανολικό και Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς	115
7.6 Εφαρμογή της Μεθοδολογίας Πικρικού Οξέος σε Μεθανολικό και Υδατικό Εκχύλισμα Ρίγανης	127
8. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR, LC-SPE-NMR ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	135
8.1 Φασματοσκοπία NMR μίας (1D) και δύο (2D) Διαστάσεων	135
8.2 LC-SPE-NMR.....	140
8.3 Απομόνωση Κλασμάτων - Χρήση Πικρικού Οξέος.....	154
9. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ -OH ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ.....	177
10. ΜΕΛΕΤΕΣ NMR ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	187
10.1 Εισαγωγή	187
10.2 Επίδραση Δευτεριωμένου Διαλύτη.....	187
10.3 Επίδραση της Θερμοκρασίας.....	193
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	197
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	199
SUMMARY	201
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	203
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	220

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACN	Acetonitrile / ακετονιτρίλιο
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization / Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης
DAD	Diode Array Detector / Ανιχνευτής Συστοιχίας διόδων
EI	Electron Ionization / Ηλεκτρονικός Ιοντισμός
ESI	Electron Spray Ionization / Ιοντισμός με Ηλεκροψεκασμό
FAB	Fast Atom Bombardment / Ιοντισμός μέσω Βομβαρδισμού με Ταχέως Κινούμενα Άτομα
HMBC ^1H - ^{13}C	Heteronuclear Multiple Bond Coherence / Ετεροπυρηνική Φασματοσκοπία Συσχέτισης Μέσω Πολλαπλών Δεσμών ^1H - ^{13}C
HMQC ^1H - ^{13}C	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence / Ετεροπυρηνική Φασματοσκοπία Συσχέτισης Πολλαπλού Κβάντου
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
HSQC ^1H - ^{13}C	Heteronuclear Single Quantum Coherence / Ετεροπυρηνική Φασματοσκοπία Συσχέτισης Απλού Κβάντου
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization / Ιοντισμός Εκρόφησης με Λείζερ με Υποβοήθηση από Μήτρα
MeOH	Methanol / Μεθανόλη
MS	Mass Spectrometry / Φασματομετρία Μάζης
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NOESY ^1H - ^1H	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy / Ομοπυρηνική Φασματοσκοπία Φαινομένου NOE ^1H - ^1H
PA	Picric acid / πικρικό οξύ
SPE	Solid Phase Extraction / Εκχύλιση Στερεάς Φάσης
TFA	Trifluoroacetic acid / Τριφθοροξικό οξύ
TCA	Trichloroacetic acid / Τριχλωροξικό οξύ
UV	Ultraviolet / Υπεριώδες
V/V	Volume per volume / όγκος προς όγκο

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1.1:	Άνθη ρίγανης και φύλλα ελιάς.	1
Σχήμα 1.1.2:	Γραφική απεικόνιση της κατάθεσης ευρεσιτεχνιών από το 1960 έως το 2010, σύμφωνα με τα στοιχεία από το www.scopus.com .	2
Σχήμα 1.1.3:	Δραστικές ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 1184) από το 1981 έως το 2006 κατηγοριοποιημένες ανά πηγή προέλευσης και ανά έτος [Newman <i>et al.</i> , 2007].	3
Σχήμα 1.1.4:	Δραστικές ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 974) από το 1981 έως το 2006 με κριτήριο την προέλευση τους [Newman <i>et al.</i> , 2007].	3
Σχήμα 1.2.1:	Χημικοί τύποι φαινολών και φαινολικών οξέων που απαντούν ευρέως.	5
Σχήμα 1.3.1:	Χημικοί τύποι φαινυλοπροπανοειδών που απαντούν ευρέως.	5
Σχήμα 1.4.1:	Χημικοί τύποι παραγώγων φλαβόνης [Ραγκούση, 1996].	6
Σχήμα 1.4.2:	Χημικός τύπος βασικού σκελετού ανθοκυανινών.	6
Σχήμα 1.4.3:	Χημικός τύπος φλαβονοειδούς με C-γλυκοζιλίωση στο δακτύλιο (A) στη θέση 6.	7
Σχήμα 1.4.4:	Χημικοί τύποι χαρακτηριστικών μεθόξυ φλαβονοειδών.	7
Σχήμα 1.5.1:	Χημικοί τύποι δομικών μονάδων ταννίνης και μελανίνης [Ραγκούση, 1996].	8
Σχήμα 1.6.1:	Βιοσύνθεση ελαιοευρωπαϊνης [Soler-Rivas <i>et al.</i> , 2000; Damtoft <i>et al.</i> , 1993].	9
Σχήμα 1.6.2:	Δομές αλδεϋδικών μορφών ελαιοευρωπαϊνης [De Nino <i>et al.</i> , 2000; Montedoro <i>et al.</i> , 1993].	10
Σχήμα 2.1.1:	Εύρος των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων [Γεροθανάσης, 1998].	13
Σχήμα 2.1.2:	Εύρος των χημικών μετατοπίσεων άνθρακα-13 διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων.[Γεροθανάσης, 1998].	14
Σχήμα 2.1.3:	Μαγνητική ανισοτροπία (α) βενζολικού δακτυλίου,(β) καρβονυλικού δεσμού (C=O), (γ) διπλού δεσμού μεταξύ δύο ανθράκων (C=C), (δ) τριπλού δεσμού μεταξύ ανθράκων (C≡C) [Γεροθανάσης, 1998].	16

- Σχήμα 2.1.4:** Ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου του μηλεϊνικού (1) και διμεθυλομηλονικού ανιόντος (2). Τα πρωτόνια που συμμετέχουν στον ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζονται στα 20 και 19 ppm, αντίστοιχα [Frey *et al.*, 2001]. 17
- Σχήμα 2.1.5:** Σχηματισμός ισχυρών ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλικών πρωτονίων OH(6) και OH(8) με το καρβονυλικό οξυγόνο CO(7) της υπερεϊκίνης [Tatsis *et al.*, 2008]. 18
- Σχήμα 2.1.6:** Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου: Συσχέτιση κρυσταλλογραφικών αποστάσεων R(OH...O) (Å) και χημικής μετατόπισης NMR-¹H [Tatsis *et al.*, 2008]. 18
- Σχήμα 2.1.7:** Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου σαλικυλικής αλδεύδης και *ο*-υδροξυακετοφαινόνης [Breitmaier *et al.*, 1990]. 19
- Σχήμα 2.2.1:** (Α) Εξάρτηση της ³J_{HH} από τη διέδρη γωνία φ, σύμφωνα με την εξίσωση Karplus (Β) Σχηματική αναπαράσταση διέδρης γωνίας (φ) [Balci, 2005]. 21
- Σχήμα 2.2.2:** Τύποι φασμάτων NMR που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων ως συνάρτηση του λόγου Δν/J [Balci, 2005]. 23
- Σχήμα 2.2.3:** Διάγραμμα της σταθεράς σύζευξης ³J_{CH} ως συνάρτηση της διέδρης γωνίας Φ, όπως προκύπτει από την εξίσωση Karplus για το μόριο του προπανίου [Breitmaier *et al.*, 1990]. 24
- Σχήμα 2.2.4:** Σταθερές σύζευξης ³J_{CH} των *cis* και *trans* του πρωτονίων της σαλικυλικής αλδεύδης που συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου [Breitmaier *et al.*, 1990]. 25
- Σχήμα 2.3.1:** Δομές συντονισμού καρβοξυλικών οξέων. 25
- Σχήμα 2.3.2:** Σχηματική απεικόνιση διαμοριακού δεσμού υδρογόνου [Pavia *et al.*, 2001]. 26
- Σχήμα 2.3.3:** Σχηματική απεικόνιση ανταλλαγής υδρογόνων [Pavia *et al.*, 2001]. 27
- Σχήμα 2.3.4:** Η επίδραση της ταχύτητας ανταλλαγής στη διεύρυνση κορυφών σε ένα φάσμα NMR [Pavia *et al.*, 2001]. 27
- Σχήμα 2.3.5:** Φάσμα NMR-¹H κερκετίνης, 10 mM, σε διαλύτη 0.5 mL DMSO-*d*₆ (T=298K, ns=32, t_{exp}=4m). Ένθετο τυπική απεικόνιση φλαβονοειδών (κερκετίνη) με δεσμό υδρογόνου OH(5)···OC(4). 28

- Σχήμα 2.3.6:** Φάσματα NMR- ^1H της ελαιοευρωπαϊνης σε διαλύτες (A) DMSO- d_6 και (B) ακετονιτρίλιο- d_3 . Με αστερίσκο υποδηλώνεται η απορρόφηση των ομάδων $-\text{OH}$. 31
- Σχήμα 2.3.7:** Ισορροπία ισομερών σθένους του κυκλοεπτατριένιο - 2-κυκλο[4.1.0]επτα-1,3-διένιο. 32
- Σχήμα 2.3.8:** Μεταβολή της χημικής μετατόπισης των υδροξυλικών πρωτονίων της κεμπφερόλης σε διαλύτη ακετόνη- d_6 ως συνάρτηση της θερμοκρασίας [Exarchou *et al.*, 2002b]. 33
- Σχήμα 2.3.9:** Φάσματα μεταβλητής θερμοκρασίας πρωτονίου NMR της κερκετίνης σε διαλύτη μεθανόλη- d_3 [Exarchou *et al.*, 2002b]. 34
- Σχήμα 2.4.1:** Επίδραση του χρόνου ζωής, τ , κατά την ανταλλαγή πρωτονίων στη μεταβολή του φάσματος NMR [Γεροθανάσης, 1998]. 35
- Σχήμα 2.4.2:** Φάσματα NMR- ^1H του κυκλοεξανίου- d_{11} ως συνάρτηση της θερμοκρασίας [Γεροθανάσης, 1998]. 36
- Σχήμα 2.4.3** Δεδομένα ολοκλήρωσης (A) των πρωτονίων $-\text{CH}_3$ του *N*-μεθυλοφορμαμιδίου (NMF) και (B) των πρωτονίων $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ του *N*-tert-βουτυλοφορμαμιδίου (TBF), όπως αυτά προέκυψαν από τα φάσματα NMR- ^1H , κατά τη μελέτη της ισορροπίας *cis-trans* των αμιδίων σε διαλύτη 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$, συγκέντρωσης 20 mM [Troganis *et al.*, 2005]. 38
- Σχήμα 2.5.1:** Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC ^1H - ^{13}C [Bax & Subramanian, 1986]. 40
- Σχήμα 2.5.2:** Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HSQC ^1H - ^{13}C της κερκετίνης σε διαλύτη DMSO- d_6 όπου οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στη σύζευξη $^1J_{\text{HC}}$ μεταξύ των πυρήνων ($\text{H}2' - \text{C}2'$), ($\text{H}6' - \text{C}6'$), ($\text{H}5' - \text{C}5'$), ($\text{H}6 - \text{C}6$) και ($\text{H}8 - \text{C}8$). 41
- Σχήμα 2.5.3:** Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC ^1H - ^{13}C [Bax & Summers, 1986]. 42
- Σχήμα 2.5.4:** (A) Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HMBC ^1H - ^{13}C της κερκετίνης σε διαλύτη DMSO- d_6 , όπου οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στις συζεύξεις $^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ και $^4J_{\text{HC}}$, και (B) Ενδεικτικές συσχετίσεις $^nJ_{\text{HC}}$ της κερκετίνης. 43
- Σχήμα 2.5.5.:** Η παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY ^1H - ^1H και η συμπεριφορά των ανυσμάτων μαγνήτισης των δύο spin A και B [Bovey 1998]. 45

Σχήμα 2.5.6:	Εξάρτηση του φαινομένου NOE από το γινόμενο $\omega_0\tau_c$.	46
Σχήμα 2.5.7:	Η παλμική ακολουθία του πειράματος ROESY ^1H - ^1H [Neuhaus & Williamson, 2000].	47
Σχήμα 2.5.8:	Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων NOE (επιδεικνύονται με τα βέλη) των πρωτονίων του καφεϊκού οξέος.	47
Σχήμα 3.3.1:	Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR.	53
Σχήμα 3.3.2:	Σύστημα LC-SPE-NMR, Κέντρο NMR Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.	53
Σχήμα 3.3.3:	Το φάσμα NMR- ^1H μιας κορυφής από το ακετονικό εκχύλισμα ελληνικής ρίγανης, που παγιδεύτηκε τρεις φορές στην ίδια μικροστήλη σε φασματόμετρο 600MHz. (Α) Χρήση παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη, (Β) χωρίς τη χρήση παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη, με 32 παλμούς και σε θερμοκρασία δωματίου [Exarchou <i>et al.</i> , 2003].	55
Σχήμα 3.3.4:	Φάσματα καρβακρόλης (Α) ^1H - ^{13}C HMQC και (Β) ^1H - ^{13}C HMBC σε φασματογράφο 600MHz κατόπιν τριπλής παγίδευσης στην ίδια μικροστήλη [Exarchou <i>et al.</i> , 2003].	56
Σχήμα 5.3.1:	Συσκευή συνεχούς εκχύλισης τύπου Soxhlet.	62
Σχήμα 6.2.1:	Φάσματα 500MHz NMR- H^1 της ελαιοευρωπαϊνης σε διαλύτες (Α) DMSO- d_6 , (Β) ακετόνη- d_6 και (C) ακετονιτρίλιο- d_3 (T=292K, ns=32, t_{expt} =4min). Με αστερίσκο υποδηλώνεται η απορρόφηση των ομάδων -OH.	71
Σχήμα 6.3.1:	Χημικοί τύποι των μορίων της λουτεολίνης και της κερκετίνης.	72
Σχήμα 6.3.2:	(Α) Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H , της περιοχής απορροφήσεων των ομάδων -OH, μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 , (Β) το ίδιο διάλυμα όπως στο (Α) με την προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=64, t_{expt} =7min18s) [Charisiadis <i>et al.</i> , 2010].	73
Σχήμα 6.3.4:	Γραφική λογαριθμική απεικόνιση της ταχύτητας ανταλλαγής ενεργών πρωτονίων ως συνάρτηση του pH σε υδατικά διαλύματα στους 25°C [Wüthrich, 1986].	74
Σχήμα 6.3.5:	(Α) Φάσμα 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 , (Β) το ίδιο διάλυμα όπως στο (Α) με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, t_{expt} =10h) [Charisiadis <i>et al.</i> , 2010].	76

- Σχήμα 6.3.6:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, $t_{\text{exp}}=9\text{h}57\text{min}18\text{s}$) [Charisiadis *et al.*, 2010]. 77
- Σχήμα 6.3.7:** Σχηματική απεικόνιση των λαμβανομένων κορυφών διασταύρωσης του OH(5) με τους αντίστοιχους άνθρακες όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC. 78
- Σχήμα 6.3.8:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, $t_{\text{exp}}=10\text{h}$) [Charisiadis *et al.*, 2010]. 79
- Σχήμα 6.3.9:** Σχηματική απεικόνιση και βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης, διαμέσου των ομάδων -OH της κερκετίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC. 82
- Σχήμα 6.3.10:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, $t_{\text{exp}}=10\text{h}$) και διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της κερκετίνης διαμέσου των ομάδων -OH [Charisiadis *et al.*, 2010]. 83
- Σχήμα 6.4.1:** Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης (80 mg) σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=1024, $t_{\text{exp}}=2\text{h}$). 84
- Σχήμα 6.4.2:** Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=1024, $t_{\text{exp}}=2\text{h}$) (a) 80 mg, (b) 20 mg και (c) 5 mg εκχυλίσματος. (A) η περιοχή των 11.8 - 13.1 ppm και (B) η περιοχή των 9.4 - 11.2 ppm [Charisiadis *et al.*, 2010]. 85
- Σχήμα 6.4.3:** Συντακτικοί τύποι ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο ακετονικό εκχυλίσματα ρίγανης: ταξιφολίνη (t), εριοδικτυόλη (e), νανιργενίνη (n), απιγενίνη (a), καρβακρόλη (c) και ροσμαρινικό οξύ (r). 86

- Σχήμα 6.4.4:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=72, t_{expt} =14h), όπου υποδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των ομάδων –OH των ενώσεων ταξιφολίνη (t), εριοδικτυόλη (e), νανιργενίνη (n), απιγενίνη (a), καρβακρόλη (c) και ροσμαρινικό οξύ (r) [Charisiadis *et al.*, 2010]. 87
- Σχήμα 6.4.5:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=72, t_{expt} =14h), όπου υποδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των ομάδων –OH των ενώσεων ταξιφολίνη (t), εριοδικτυόλη (e), νανιργενίνη (n) και απιγενίνη (a) [Charisiadis *et al.*, 2010]. 87
- Σχήμα 6.4.6:** Σχηματική απεικόνιση και βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης, διαμέσου των ομάδων –OH της νανιργενίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC. 91
- Σχήμα 6.4.7:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR 500MHz ^1H - ^{13}C HMBC ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=72, t_{expt} =14h), και διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της νανιργενίνης διαμέσου των ομάδων –OH [Charisiadis *et al.*, 2010]. 92
- Σχήμα 6.5.1:** Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (80 mg) σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=1024, t_{expt} =2h). 93
- Σχήμα 6.5.2:** Συντακτικοί τύποι των κυρίαρχων ενώσεων εκχυλίσματος φύλλων ελιάς: ελαιοευρωπαϊνή (OL) και υδροξυτυροσόλη (HT). 94
- Σχήμα 6.5.3:** Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH των κυρίαρχων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K). (A) 80 mg (ns=1024, t_{expt} =2h), (B) 5 mg (ns=1024, t_{expt} =2h), (C) 0.25 mg (ns=4096, t_{expt} =8h) και (D) 0.05 mg (ns=7168, t_{expt} =13.5h) εκχυλίσματος, αντίστοιχα. (E) το ίδιο φάσμα όπως το (D) μετά την εφαρμογή μετασχηματισμού Lorentz-Gauss, όπου οι απορροφήσεις των ενώσεων ελαιοευρωπαϊνή (OL), υδροξυτυροσόλη (HT) και αλδεϋδική μορφή της ελαιοευρωπαϊνής (OL_{ald}) υποδηλώνονται. 95

Σχήμα 6.5.4: Φάσμα 500 MHz NMR-¹H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH των κυρίαρχων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, 0.1 mg σε διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=7168, t_{exp}=13.5h). (A) το εκχύλισμα ως έχει, (B) το (A) με προσθήκη 9.25 nmol ελαιοευρωπαϊνης, και (C) το (B) με προσθήκη 5.84 nmol υδροξυτυροσόλης. Οι απορροφήσεις των ενώσεων ελαιοευρωπαϊνη (OL) και υδροξυτυροσόλη (HT) υποδηλώνονται.

97

Σχήμα 7.1.1: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR-¹H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH των κυρίαρχων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, 20.0 mg σε διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{exp}=32min). (A) απουσία οξέων; (B) με λόγο μαζών [HCl]/[εκχύλισμα] = 6.5×10^{-3} , (3.57 μmol HCl); (C) με λόγο μαζών [CCl₃COOH]/[εκχύλισμα] = 211.3×10^{-3} , (25.86 μmol TCA); (D) με λόγο μαζών [CF₃COOH]/[εκχύλισμα] = 25.4×10^{-3} , (4.45 μmol TFA); (E) με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 49.3×10^{-3} , (4.30 μmol PA). Τα (B), (C) και (D) παρουσιάζουν τη βέλτιστη διακριτική ικανότητα που επιτεύχθηκε σε κάθε περίπτωση [Charisiadis *et al.*, 2011].

99

Σχήμα 7.1.2: Τμήμα κρυσταλλικής δομής της [(Hmop)(pa)] (σύμπλοκο μορφολίνης με πικρικό οξύ) όπου υποδηλώνεται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου στο δακτύλιο R₁²(6), καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις π–π, NO–π και CH–π [Refat *et al.*, 2010].

101

Σχήμα 7.1.3: Αλληλεπίδραση μεταξύ 1-ναφθαλαμίνης και πικρικού οξέος [Singh & Ahmad, 2010].

101

Σχήμα 7.1.4: Δεσμοί υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) κατά την αλληλεπίδραση της 2-(4-γουανιδυλοφαινυλο)-1-φαίνυλο-αιθανόνης (GPPE) με πικρικό οξύ [Zeslawska *et al.*, 2007].

102

Σχήμα 7.1.5: Αλληλεπίδραση της 2,2-διπυριδίνης, ως δότη, και του πικρικού οξέος, ως δέκτη, προς σχηματισμό συμπλόκου άλατος με μοριακό λόγο 1:1 και ιοντικού δεσμού υδρογόνου [Teleb & Gaballa, 2005].

102

Σχήμα 7.2.1: Συντακτικοί τύποι πικρικού οξέος (PA) και καφεϊκού οξέος (CA).

102

- Σχήμα 7.2.2:** Φάσμα 500 MHz NMR-¹H καφεϊκού οξέος περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH (C = 5.7×10^{-3} M, T=292K, ns=32, t_{expt} =4min) (A) σε DMSO-*d*₆ (το επάνω τμήμα αποτελεί προσομοίωση των κορυφών του σύνθετου σήματος με δύο ευρείες απορροφήσεις $\Delta\nu_{1/2} \approx 203$ και $\Delta\nu_{1/2} \approx 164$ Hz, αντίστοιχα), (B) και (C) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αναλογία συγκεντρώσεων [PA]/[CA] 12×10^{-3} και 219×10^{-3} , αντίστοιχα [Charisiadis *et al.*, 2011]. 103
- Σχήμα 7.2.3:** Γραφική απεικόνιση του εύρους των απορροφήσεων, $\Delta\nu_{1/2}$, ως προς το λόγο συγκέντρωσης πικρικού οξέος προς καφεϊκό οξύ, [PA]/[CA], των ομάδων OH(4), OH(3) και –COOH του καφεϊκού οξέος και του H₂O, του διαλύματος του Σχήματος 7.2.2. 104
- Σχήμα 7.2.4:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR-¹H υδροξυτυροσόλης (C = 19.6×10^{-3} M, T=288K, ns=16, t_{expt} =2min) (A) σε DMSO-*d*₆ και (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αναλογία συγκεντρώσεων [PA]/[HT] = 1.3×10^{-3} [Charisiadis *et al.*, 2011]. 105
- Σχήμα 7.2.5:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ¹H-¹³C HMBC NMR του διαλύματος του Σχήματος 7.2.4A (C = 19.6×10^{-3} M, T=288K, ns=8, t_{expt} =1h) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 106
- Σχήμα 7.3.1:** Φάσμα 500 MHz NMR-¹H δείγματος 80 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{expt} =30min) (Επιδεικνύεται η περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH. (A) απουσία πικρικού οξέος, (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 0.6×10^{-3} . Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος. 107
- Σχήμα 7.3.2:** Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 80 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{expt} =30min). (A) Απουσία πικρικού οξέος, και (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 0.6×10^{-3} . 108

Σχήμα 7.3.3: Επιλεγμένη περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 80 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{expt}=30min). (A) Απουσία πικρικού οξέος, και (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 0.6 x 10⁻³. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος. 108

Σχήμα 7.3.4: Επιλεγμένη περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 20 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{expt}=30min). (A) Απουσία πικρικού οξέος, και (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 2.3 x 10⁻³. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος. 109

Σχήμα 7.3.5: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 20mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{expt}=30min). (A) Απουσία πικρικού οξέος, (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 2.3 x 10⁻³, (C) όπως το (B) σε T=288K και (D) όπως το (B) σε T=284K. 110

Σχήμα 7.4.1: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=32, t_{expt}=4min). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών: 0.17 μmol εριοδικτυόλης, 0.20 μmol ταξιφολίνης και 0.36 μmol ναρινγενίνης. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο. 111

Σχήμα 7.4.2: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=32, t_{expt}=4min). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών: 0.17 μmol εριοδικτυόλης, 0.20 μmol ταξιφολίνης και 0.36 μmol ναρινγενίνης. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο. 112

- Σχήμα 7.4.3:** Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=128, *t*_{exp}=16min). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών: 0.15 μmol απιγενίνης και 0.11 μmol λουτεολίνης. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο. 113
- Σχήμα 7.4.4:** Περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=128, *t*_{exp}=16min). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδούς και φαινολικού οξέος: 0.36 μmol ναρινγενίνης και 0.53 μmol ροσμαρινικού οξέος. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο. 114
- Σχήμα 7.5.1:** Συντακτικοί τύποι ενώσεων που απαντώνται στο μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς [Charisiadis *et al.*, 2011]. 116
- Σχήμα 7.5.2:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 1D NMR-¹H 20 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=288K). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 49.3 x 10⁻³ και (C) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αραίωση κατά ένα παράγοντα 4 και λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 49.4 x 10⁻³ [Charisiadis *et al.*, 2011]. 117
- Σχήμα 7.5.3:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ¹H-¹³C HMBC NMR 10mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO-*d*₆ με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 49.3 x 10⁻³ (T=288K, ns=88, *t*_{exp}=11.5h). (A) Οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6, C-5, και C-7 της ένωσης λουτεολίνη-4'-*O*-γλυκοζίτη (**5**), και οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6 και C-7 της λουτεολίνης (**4**), υποδεικνύονται με κόκκινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. (B) Οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5' και C-6' OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-4' και C-7', αντίστοιχα, και οι κοινές κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες C-5' και C-6' υποδεικνύονται με μπλέ χρώμα για την ελαιοευρωπαϊνή (**7**), πράσινο για την υδροξυτυροσόλη (**3**) και κόκκινο για την αλδεϋδική μορφή της ελαιοευρωπαϊνης (**9**) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 119

- Σχήμα 7.5.4:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 1D NMR- ^1H 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) Με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 67.3×10^{-3} . 120
- Σχήμα 7.5.5:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=88, t_{expt} =11.5h). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της υδροξυτυροσόλης (3) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 122
- Σχήμα 7.5.6:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=88, t_{expt} =11.5h). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της ελαιοευρωπαϊνης (7) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 123
- Σχήμα 7.5.7:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=88, t_{expt} =11.5h). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της διαλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (8) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 124
- Σχήμα 7.5.8:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=88, t_{expt} =11.5h). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (9) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 125
- Σχήμα 7.5.9:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=88, t_{expt} =11.5h). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της ένωσης λουτεολίνη-4'-O-γλυκοζίτης (5) [Charisiadis *et al.*, 2011]. 126
- Σχήμα 7.6.1:** Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H εκχυλίσματος 20 mg OAQ σε 0.6 mL DMSO- d_6 (T=288K, ns=256, t_{expt} =33min). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αραίωση κατά ένα παράγοντα 4 και με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 286.5×10^{-3} . 127

- Σχήμα 7.6.2:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος του Σχήματος 7.6.1. Υποδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων. 128
- Σχήμα 7.6.3:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος του Σχήματος 7.6.1. (Α) Η περιοχή των 7.8 - 10.5 ppm, (Β) η περιοχή των 12.8 - 14.1 ppm. Η κορυφή με αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος, ενώ με (r) υποδηλώνονται οι απορροφήσεις των ομάδων -OH του ροσμαρινικού οξέος. 129
- Σχήμα 7.6.4:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=76, t_{expt} =10h) του δείγματος του Σχήματος 7.6.1B. 130
- Σχήμα 7.6.5:** Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H εκχυλίσματος 20 mg OME σε 0.6 mL DMSO- d_6 (T=288K, ns=256, t_{expt} =33min). (Α) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (Β) το ίδιο διάλυμα όπως στο (Α) με αραίωση κατά ένα παράγοντα 2 και με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 225.7×10^{-3} . 131
- Σχήμα 7.6.6:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος του Σχήματος 7.6.5. (Α) Η περιοχή των 7.8 - 10.5 ppm, (Β) η περιοχή των 12.8 - 14.1 ppm. Η κορυφή με αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος, ενώ με (r) υποδηλώνονται οι απορροφήσεις των ομάδων -OH του ροσμαρινικού οξέος. 132
- Σχήμα 7.6.7:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=102, t_{expt} =13h) του δείγματος του Σχήματος 7.6.5B. 133
- Σχήμα 7.6.8:** Επιλεγμένη περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=102, t_{expt} =13h) του δείγματος του Σχήματος 7.6.5B. 134
- Σχήμα 8.1.1:** (Α) Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H εκχυλίσματος 30.5 mg OET σε 0.6 mL DMSO- d_6 (T=285K, ns=512, t_{expt} =33min). (Β) Η περιοχή των 7.8 - 13.2 ppm. 136
- Σχήμα 8.1.2:** (Α) Φάσμα 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 30.5 mg εκχυλίσματος OET σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=285K, ns=88, t_{expt} =11.5h). (Β) Περιοχή απορρόφησης των ομάδων -OH. 138
- Σχήμα 8.1.3:** Επιλεγμένες περιοχές κορυφών διασταύρωσης ομάδων -OH φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR του Σχήματος 8.1.2. 139
- Σχήμα 8.2.1:** Χρωματογραφικά προφίλ του εκχυλίσματος OET στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκε για την παγίδευση των συστατικών με LC-SPE-NMR (ενέσιμος όγκος: 30 μL διαλύματος 30 mg/mL). 140

- Σχήμα 8.2.2:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **4** (ροσμαρινικό οξύ) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{expt}}=2\text{m}$). 142
- Σχήμα 8.2.3:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **5** (αρομαδενδρίνη) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=16$, $t_{\text{expt}}=1\text{m}$). 142
- Σχήμα 8.2.4:** (Α) Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **7** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=256$, $t_{\text{expt}}=26\text{m}$). (Β) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^1H COSY NMR ($T=298\text{K}$, $ns=8$, $t_{\text{expt}}=2\text{h}$). Επιδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των αρωματικών πρωτονίων του δακτυλίου (Β) του φλαβονοειδούς. 143
- Σχήμα 8.2.5:** (Α) Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **8** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{expt}}=4\text{m}$). Επάνω τμήμα τυπική απεικόνιση φλαβονοειδούς. (Β) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=298\text{K}$, $ns=60$, $t_{\text{expt}}=17\text{h}$). 145
- Σχήμα 8.2.6:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **10** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{expt}}=4\text{m}$). 147
- Σχήμα 8.2.7:** (Α) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR της κορυφής **10** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=60$, $t_{\text{expt}}=17\text{h}$). (Β) Επιλεγμένες περιοχές του (Α). Οι κοινές διασταύρωσης των μεθόξυ ομάδων με τα αντίστοιχα πρωτόνια επιδεικνύονται. 148
- Σχήμα 8.2.8:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **11** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=128$, $t_{\text{expt}}=14\text{m}$). 149

- Σχήμα 8.2.9:** (Α) Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^1H COSY NMR της κορυφής **11** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE (T=298K, ns=8, t_{expt} =3h). Επιδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των αρωματικών πρωτονίων του δακτυλίου (Β) του φλαβονοειδούς και της ισοπρόπυλο ομάδας των παραγώγων της καρβακρόλης. (Β) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=298K, ns=60, t_{expt} =17h). 151
- Σχήμα 8.2.10:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **12** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE (T=298K, ns=256, t_{expt} =28m). 153
- Σχήμα 8.3.1:** Χρωματογραφικά προφίλ του εκχυλίσματος OET στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κλασμάτων (ενέσιμος όγκος: 2.5 mL διαλύματος 27.2 mg/mL). 154
- Σχήμα 8.3.2:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **4** (ροσμαρινικό οξύ) σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=292K, ns=64, t_{expt} =8m). (Α) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (Β) με προσθήκη 65 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. 155
- Σχήμα 8.3.3:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **6** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=128, t_{expt} =17m. (Α) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (Β) με προσθήκη 36 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος. 156
- Σχήμα 8.3.4:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=96, t_{expt} =12.5h). της κορυφής **6** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 36 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων -OH: (Α) OH(5) και OH(6), και (Β) OH(4'). 158
- Σχήμα 8.3.5:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **7** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=290K, ns=256, t_{expt} =34m). (Α) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (Β) με προσθήκη 37 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). 159

- Σχήμα 8.3.6:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=96, t_{expt} =12.5h). της κορυφής **7** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 36 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων –OH: (A) OH(5) και OH(6), και (B) OH(4'). 161
- Σχήμα 8.3.7:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **10** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=256, t_{expt} =34m). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 3 μL διαλύματος 2 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος. 162
- Σχήμα 8.3.8:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=120, t_{expt} =16h) της κορυφής **10** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 3 μL διαλύματος 2 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων –OH: (A) OH(5) και OH(6), και (B) των μεθόξυ ομάδων. 164
- Σχήμα 8.3.9:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **12** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=256, t_{expt} =34m). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 27 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος. 165
- Σχήμα 8.3.10:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=112, t_{expt} =15h). της κορυφής **12** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 27 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων OH(5) και OH(6), και των μεθόξυ ομάδων. 167
- Σχήμα 8.3.11:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **13** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=289K, ns=256, t_{expt} =34m). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 49 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. 168

- Σχήμα 8.3.12:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=289K, ns=76, t_{expt} =10h) της κορυφής **13** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 49 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των μεταξύ των ομάδων OH(1) και OH(6), και των αντίστοιχων πρωτονίων. 170
- Σχήμα 8.3.13:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **14** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=289K, ns=128, t_{expt} =17m). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 13 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. 171
- Σχήμα 8.3.14:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=289K, ns=76, t_{expt} =10h) της κορυφής **14** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 13 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των μεταξύ των ομάδων OH(1) και OH(6), και των αντίστοιχων πρωτονίων. 172
- Σχήμα 8.3.15:** Δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν. 173
- Σχήμα 8.3.16:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H σε διαλύτη DMSO- d_6 . (A) εκχύλισμα OET (B) μεθόξυ παράγωγο **1**, (C) μεθόξυ παράγωγο **3** και (D) μεθόξυ παράγωγο **2**. 174
- Σχήμα 8.3.17:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H σε διαλύτη DMSO- d_6 (T = 288 K). (A) εκχύλισμα OET, (B) παράγωγο **5**, (C) παράγωγο **6**. 174
- Σχήμα 9.1:** Τυπική απεικόνιση δομής φλαβονοειδούς. 177
- Σχήμα 9.2:** Δομές συντονισμού I και II τυπικών φλαβονοειδών παρουσία διπλού δεσμού στη θέση C2-C3 του δακτυλίου (C). 178
- Σχήμα 9.3:** Δομές συντονισμού I και II τυπικών φλαβονοειδών παρουσία υποκαταστάτη -OH στη θέση 3 του δακτυλίου (C). 179
- Σχήμα 9.4:** Ταξινόμηση απορροφήσεων ομάδων -OH σε εκχύλισμα φυσικού προϊόντος, OET (εκχύλισμα ρίγανης σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα) και OME (μεθανολικό εκχύλισμα ρίγανης). 180
- Σχήμα 9.5:** Διαγραμματική αναπαράσταση των περιοχών απορρόφησης των ομάδων -OH στην κλίμακα των ppm. 183

- Σχήμα 9.6:** (Α) Φάσμα NMR- ^1H εκχυλίσματος *Arabidopsis* (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{KH}_2\text{PO}_4$ in D_2O , pH 6.0) [Kim *et al.*, 2010], (Β) Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H εκχυλίσματος ρίγανης οξικού αιθυλεστέρα σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$, (Γ) η περιοχή 8 - 13 ppm του Β, και (Δ) η περιοχή 12.5 - 13 ppm του (Β). 185
- Σχήμα 10.2.1:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς ($T=298\text{K}$, $n_s=512$, $t_{\text{exp}}=1\text{h}$) σε 0.6 mL διαλύτη: (Α) $\text{DMSO}-d_6$, (Β) ακετονιτρίλιο- d_3 , (Γ) μεθανόλη- d_4 και (Δ) D_2O . Ως ένθετο παρατίθεται φάσμα αυξημένης διακριτικής ικανότητας μέσω μετασχηματισμού Lorentz-Gauss της κάθε αλδεϋδικής κορυφής. 188
- Σχήμα 10.2.2:** Συντακτικοί τύποι της ελαιοευρωπαϊνης και αλδεϋδικών παραγώγων της. 189
- Σχήμα 10.2.3:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=288\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων H-6 και H-5 της διαλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (2). 189
- Σχήμα 10.2.4:** Προτεινόμενη προσβολή της $\text{HC}(5)\text{O}$ αλδεϋδικής ομάδας από μεθανόλη- d_4 με σχηματισμό ημιακεταλικής μορφής. 190
- Σχήμα 10.2.5:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη μεθανόλη- d_4 ($T=292\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων H-6 της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (3). 191
- Σχήμα 10.2.6:** Δομές συντονισμού α,β -ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης. 192
- Σχήμα 10.2.7:** Προτεινόμενη προσβολή της $\text{HC}(5)\text{O}$ αλδεϋδικής ομάδας από D_2O με σχηματισμό της εφυδατωμένης μορφής. 192
- Σχήμα 10.2.8:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη D_2O ($T=292\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων των αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης (2 και 4). 193

- Σχήμα 10.3.1:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη 0.6 mL D_2O (ns=64, t_{expt} =9m). (A) T=280 K, (B) T=300 K και (C) T=330 K. Ως ένθετο παρατίθεται φάσμα αυξημένης διακριτικής ικανότητας μέσω μετασχηματισμού Lorentz-Gauss της κάθε αλδεϋδικής κορυφής. 194
- Σχήμα 10.3.2:** Γραφική παράσταση Van't Hoff των δεδομένων του Πίνακα 10.3.1. Η ευθεία γραμμή αποτελεί τη βέλτιστη προσωμοίωση στην εξίσωση: $\ln K_{eq} = -\Delta H^\circ/(RT) + \Delta S^\circ/R$. 195
- Σχήμα 10.3.3:** Διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου καρβονυλικής ομάδας με μόρια D_2O . 196

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1.1:	Μετατοπίσεις ^{13}C σε ppm λόγω της ομάδας X στην αλληλουχία $\text{X} - \text{C}_\alpha - \text{C}_\beta - \text{C}_\gamma$ [Γεροθανάσης, 1998].	15
Πίνακας 2.2.1:	Τιμές της σταθεράς σύζευξης των πρωτονίων επιλεγμένων αιθυλενικών και αρωματικών ενώσεων [Gunther, 1995].	22
Πίνακας 2.3.1:	Εύρη απορροφήσεων πρωτονίων χαρακτηριστικών ομάδων [Pavia <i>et al.</i> , 2001].	26
Πίνακας 2.3.2:	Τιμές μεταβολής της χημικής μετατόπισης των υδροξυλικών πρωτονίων της κεμπφερόλης σε διαλύτη ακετόνη- d_6 ως συνάρτηση της θερμοκρασίας [Exarchou <i>et al.</i> , 2002b].	33
Πίνακας 2.4.1:	Θερμοδυναμικές παράμετροι <i>cis-trans</i> ισομερισμού <i>N</i> -μεθυλοφορμαμιδίου (NMF) και <i>N</i> -tert-βουτυλοφορμαμιδίου (TBF) [Troganis <i>et al.</i> , 2005].	38
Πίνακας 5.3.1:	Συγκεντρωτικός πίνακας των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν με τους αντίστοιχους κωδικούς.	63
Πίνακας 6.3.1:	Εύρη απορροφήσεων, $\Delta\nu_{1/2}$, των πρωτονίων $-\text{OH}$ μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5m M) σε διαλύτη DMSO- d_6 πριν και μετά τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM.	73
Πίνακας 6.3.2:	Κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων $-\text{OH}$ με τα αντίστοιχα άτομα άνθρακα καθώς όπως προέκυψαν από πείραμα $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM. Οι σταθερές σύζευξης, $^nJ_{\text{HC}}$, στις οποίες οφείλονται οι κορυφές διασταύρωσης επισημαίνονται επίσης.	80
Πίνακας 6.3.3:	Βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης των ομάδων $-\text{OH}$ της κερκετίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC.	82

Πίνακας 6.4.1:	Κορυφές διασταύρωσης των ομάδων –OH με τα αντίστοιχα άτομα άνθρακα καθώς όπως προέκυψαν από πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC του ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO- d_6 . Οι αντίστοιχες σταθερές σύζευξης, $^nJ_{\text{HC}}$, στις οποίες οφείλονται οι κορυφές διασταύρωσης επισημαίνονται επίσης.	89
Πίνακας 6.4.2:	Βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης των ομάδων –OH της ναρινγενίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC.	91
Πίνακας 7.5.1:	Επίπεδα συγκεντώσεων ^{a,b} των ενώσεων 3 - 9 εκχυλίσματος φύλλων ελιάς [Charisiadis <i>et al.</i> , 2011].	121
Πίνακας 8.2.1:	Σύσταση της κινητής φάσης για τη μελέτη του εκχυλίσματος OET με LC-SPE-NMR [Exarchou <i>et al.</i> , 2003].	140
Πίνακας 8.2.2:	Απόδοση κορυφών του χρωματογραφήματος του Σχήματος 7.2.1.	141
Πίνακας 10.3.1:	Τιμές ελεύθερης ενέργειας ΔG και $\ln K_{eq}$ για διάφορες τιμές θερμοκρασίας T, όπου $\ln K_{eq}$ είναι ο λογάριθμος του λόγου των ολοκληρωμάτων των πρωτονίων H-6 της αλδεϋδικής μορφής (4) προς τη διαλδεϋδική μορφή (2).	195
Πίνακας Π1:	Χημικές μετατοπίσεις της ναρινγενίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- d_6 .	203
Πίνακας Π2:	Χημικές μετατοπίσεις της ταξιφολίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- d_6 .	204
Πίνακας Π3:	Χημικές μετατοπίσεις της αρομαδενδρίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- d_6 .	205
Πίνακας Π4:	Χημικές μετατοπίσεις της απιγενίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- d_6 .	206
Πίνακας Π5:	Χημικές μετατοπίσεις του ροσμαρινικού οξέος σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- d_6 .	207
Πίνακας Π6:	Χημικές μετατοπίσεις της καρβακρόλης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- d_6 .	208
Πίνακας Π7:	Χημικές μετατοπίσεις της ελαιοευρωπαϊνης σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- d_6 .	209

Πίνακας Π8:	Χημικές μετατοπίσεις της υδροξυτυροσόλης σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	210
Πίνακας Π9:	Χημικές μετατοπίσεις της διαλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης σε υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	211
Πίνακας Π10:	Χημικές μετατοπίσεις της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	212
Πίνακας Π11:	Χημικές μετατοπίσεις της λουτεολίνη-4'- <i>O</i> -γλυκοζίτης (5) σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	213
Πίνακας Π12:	Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (1) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	214
Πίνακας Π13:	Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (2) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	215
Πίνακας Π14:	Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (3) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	216
Πίνακας Π15:	Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (4) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	217
Πίνακας Π16:	Χημικές μετατοπίσεις παραγώγου καρβακρόλης (5) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	218
Πίνακας Π17:	Χημικές μετατοπίσεις παραγώγου καρβακρόλης (6) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO- <i>d</i> ₆ .	219

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΩΣ ΠΗΓΗ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ - ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ

1.1 Εισαγωγή

Τα φυσικά προϊόντα (Σχήμα 1.1.1) είναι ανεξάντλητη πηγή βιοενεργών συστατικών που αποκτούν ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση τους στη θεραπευτική και τη βιοτεχνολογία. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι περίπου το 50% των φαρμάκων κατά του καρκίνου είναι είτε φυτικά προϊόντα είτε προέρχονται άμεσα από αυτά [Kingston, 2011]. Η αναζήτηση συστατικών με ποικίλες δράσεις σε φυσικά προϊόντα είναι μια εξαιρετικά δύσκολη και επίπονη διαδικασία, εξαιτίας της πολυπλοκότητάς τους.



Oregano vulgare



Olea europaea leaves

Σχήμα 1.1.1: Άνθη ρίγανης και φύλλα ελιάς.

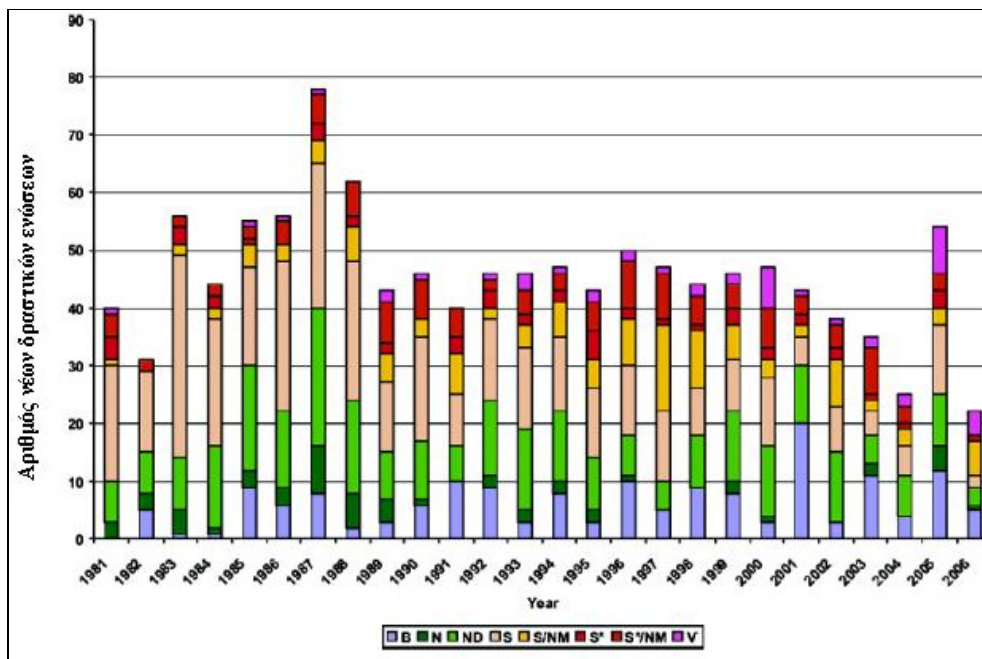
Τα τελευταία χρόνια είναι αναμφισβήτητο γεγονός η στροφή της επιστημονικής κοινότητας στην αναζήτηση φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοενεργές ενώσεις για την πρόληψη ή/και καταπολέμηση μεγάλου αριθμού ασθενειών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι την τελευταία δεκαετία αυξήθηκε κατά 350% η κατάθεση ευρεσιτεχνιών για την απομόνωση βιοενεργών ενώσεων και την παρασκευή εκχυλισμάτων ή κλασμάτων με ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία (Σχήμα 1.1.2).



Σχήμα 1.1.2: Γραφική απεικόνιση της κατάθεσης ευρεσιτεχνιών από το 1960 έως το 2010, σύμφωνα με τα στοιχεία από το www.scopus.com.

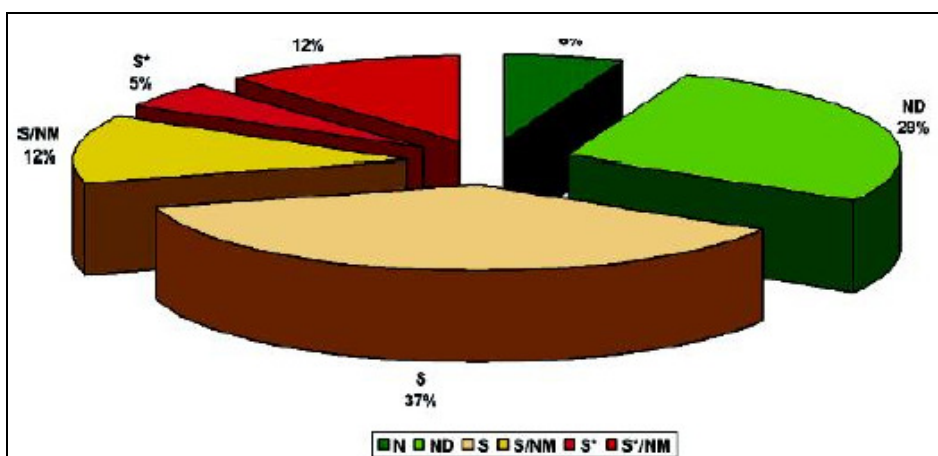
Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι υπάρχουν κατά προσέγγιση 500.000-750.000 είδη ανώτερων φυτών στη γη, από τα οποία ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 10% έχει ερευνηθεί ως προς τη σύστασή του. Πολλά από αυτά τα φυτά έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες και είναι γνωστό ότι από το σύνολο των φαρμάκων που κυκλοφορούν, περισσότερο από το 25% είναι φυτικής προέλευσης και το 50% των φαρμάκων κατά του καρκίνου είναι είτε φυσικά προϊόντα είτε προέρχονται άμεσα από αυτά [Meinwald 2011; Newman & Cragg 2007]. Τα φυσικά προϊόντα είναι ανεξάντλητη πηγή βιοενεργών συστατικών και η εμβάθυνση στη χημεία των φυσικών προϊόντων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της σκελετικής τους πολυπλοκότητας και των πολύ ιδιαίτερων χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων τους.

Ιδιαίτερα σημαντικά είναι και τα στοιχεία που αφορούν την εισαγωγή νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων από το 1981 έως το 2002, σύμφωνα με τα οποία το 67 % των δραστικών ουσιών τους έχουν φυτική προέλευση [Gragg *et al.*, 2006; 1997]. Πιο συγκεκριμένα, το 34 % των φαρμάκων προκύπτουν είτε άμεσα είτε έμμεσα από φυτικά εκχυλίσματα, το 24 % είναι φαρμακευτικά σκευάσματα που προσομοιάζουν τα φυτικά προϊόντα και έχουν παρασκευασθεί με συνθετικό ή με ημι-συνθετικό τρόπο, και τέλος το 37% των δραστικών ουσιών που περιέχονται στα φαρμακευτικά σκευάσματα προκύπτουν εξολοκλήρου με συνθετικό τρόπο (Σχήματα 1.1.3 και 1.1.4) [Newman *et al.*, 2007].



Σχήμα 1.1.3: Δραστικές ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 1184) από το 1981 έως το 2006 κατηγοριοποιημένες ανά πηγή προέλευσης και ανά έτος [Newman *et al.*, 2007].

Δραστικές Ουσίες	
N:	φυσικό προϊόν
ND:	ημισυνθετικός τρόπος παραγωγής αλλά με βάση κάποιο φυσικό προϊόν
NM:	συνθετικός τρόπος αλλά προσομοιάζουν τις αντίστοιχες που περιέχονται στα φυσικά προϊόντα
S:	αμιγώς συνθετικός τρόπος παραγωγής
S*:	αμιγώς συνθετικός τρόπος παραγωγής έπειτα από μελέτη φυσικού προϊόντος
B:	βιολογικά, αμινοξέα/πρωτεΐνες απομονωμένα από οργανισμούς/κύτταρα
V:	εμβόλια



Σχήμα 1.1.4: Δραστικές ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων (N = 974) από το 1981 έως το 2006 με κριτήριο την προέλευση τους [Newman *et al.*, 2007].

Στο σημείο αυτό είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι δραστικές ουσίες με φυτική προέλευση νοούνται εκείνες που είναι φυσικό προϊόν (*N*), εκείνες που προκύπτουν με ημισυνθετικό τρόπο παραγωγής αλλά η βάση τους είναι κάποιο φυσικό προϊόν (*ND*) και εκείνες που παράγονται με συνθετικό τρόπο αλλά προσομοιάζουν τις αντίστοιχες που περιέχονται στα φυσικά προϊόντα (*NM*). Τέλος, εκτός από τον αμιγώς συνθετικό τρόπο παραγωγής τους (*S*), υπάρχουν και ενώσεις που δεν έχουν καμιά φυτική προέλευση αλλά ο σχεδιασμός τους έχει προκύψει από τη μελέτη φυσικού προϊόντος (*S**).

Ο αριθμός των φαινολικών ενώσεων που απαντώνται στα φυσικά προϊόντα είναι ιδιαίτερα μεγάλος. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μόνο από την κατηγορία των φλαβονοειδών, έχουν ταυτοποιηθεί από φυτά πάνω από 8.000 ενώσεις [[Lattanzio et al., 2006](#)]. Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη στο μόριο τους ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου υπακατεστημένου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά είναι:

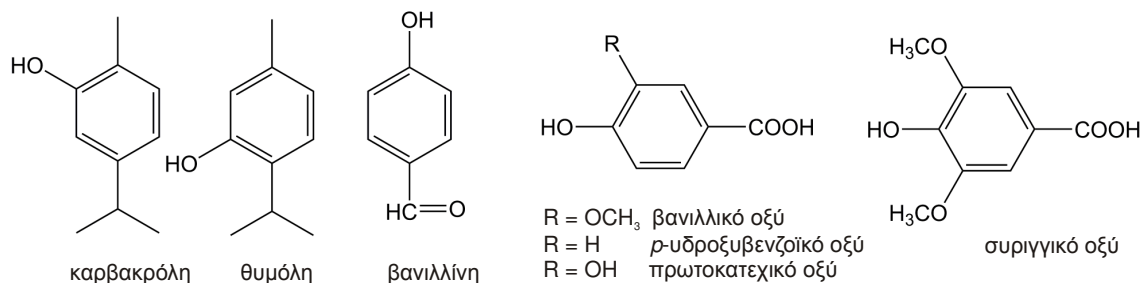
- απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα,
- φαινυλοπροπανοειδή,
- φλαβονοειδή, ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους το σκελετό της φλαβόνης και αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των φυσικών φαινολικών ενώσεων, και
- Πολυμερείς φαινολικές ενώσεις, όπως οι ταννίνες.

Φαινολικές μονάδες εμφανίζονται μερικές φορές και σε μόρια τερπενίων, στεροειδών και αλκαλοειδών [[Ραγκούση, 1996](#)].

1.2 Φαινόλες και Φαινολικά Οξέα

Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα σπάνια απαντώνται σε ελεύθερη μορφή στα φυτά. Συνήθως βρίσκονται υπό μορφή διμερών, εστέρων, αλάτων ή γλυκοζιτών, των οποίων αποτελούν το άγλυκο τμήμα των ενώσεων. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα απλών φαινολών, που απαντώνται στα φυτά είναι: η καρβακρόλη, κυρίαρχο συστατικό της ρίγανης, η θυμόλη κυρίαρχο συστατικό του θυμαριού και η βανιλίνη, αρωματική ουσία του καρπού του βανιλινόδεντρου (Σχήμα 1.2.1).

Εκτός από τις φαινόλες, πολύ γνωστά φαινολικά οξέα, που απαντώνται συχνά στα φυτά, είναι το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχικό, το βανιλικό και το συριγγικό (Σχήμα 1.2.1). Τα φαινολικά οξέα προκύπτουν βιογενετικά από αποικοδόμηση των φαινυλοπροπανοειδών [[Ραγκούση, 1996](#)].



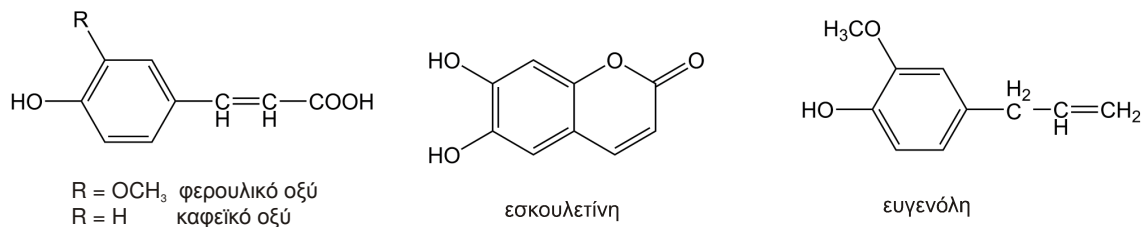
Σχήμα 1.2.1: Χημικοί τύποι φαινολών και φαινολικών οξέων που απαντούν ευρέως.

1.3 Φαινυλοπροπανοειδή

Η τάξη αυτή φαινολικών ενώσεων έχει στο φαινολικό δακτύλιο μια πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Τα σπουδαιότερα φαινυλοπροπανοειδή στα φυτά είναι:

- τα υδροξυκινναμωνικά οξέα, όπως φερουλικό και καφεϊκό, τα οποία συνήθως βρίσκονται υπό μορφή εστέρων
- οι κουμαρίνες, όπως εσκουλετίνη, και
- τα φαινυλοπροπένια, όπως ευγενόλη (Σχήμα 1.3.1).

Τα περισσότερο διαδεδομένα φαινυλοπροπανοειδή ανήκουν στην κατηγορία των υδροξυκινναμωνικών οξέων. Σε αυτά οφείλεται η ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι στις ασθένειες. Οι κουμαρίνες βρίσκονται σε πολλά φυτά υπό μορφή γλυκοζυλιωμένων παραγώγων. Τα φαινυλοπροπένια βρίσκονται μαζί με τα τερπένια ως συστατικά των αιθέριων ελαίων και συμμετέχουν στην οσμή των φυτών.

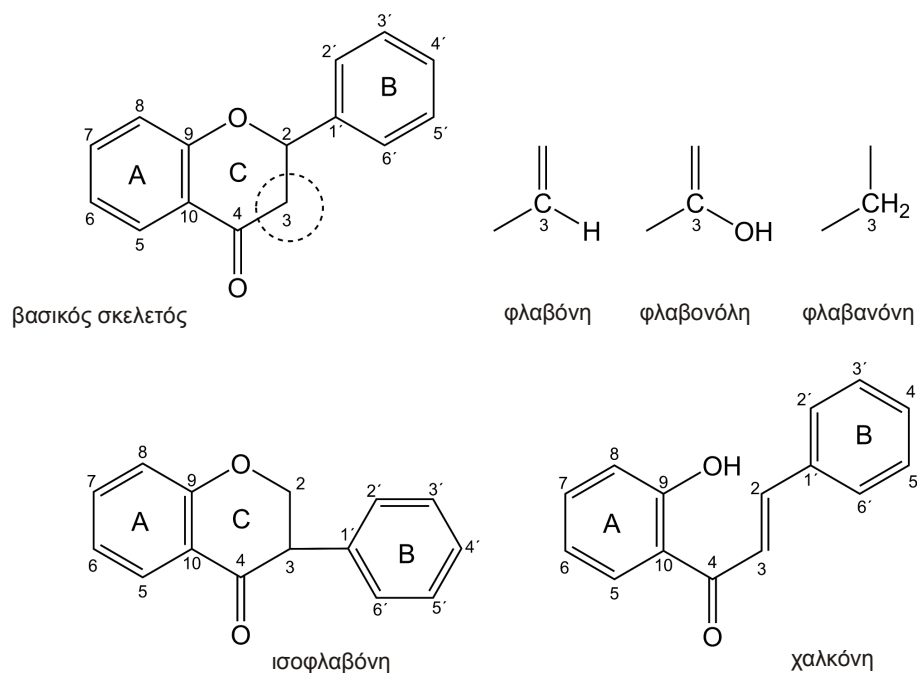


Σχήμα 1.3.1: Χημικοί τύποι φαινυλοπροπανοειδών που απαντούν ευρέως.

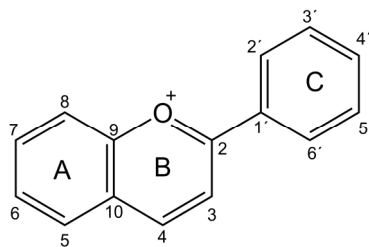
1.4 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ομάδες φαινολικών ενώσεων στα φυτά. Εκτιμάται ότι περίπου το 2% του άνθρακα που φωτοσυντίθενται από τα φυτά μετατρέπεται σε φλαβονοειδή ή σε σχετιζόμενα με αυτά συστατικά. Είναι η πολυπληθέστερη

τάξη φυσικών φαινολικών ενώσεων, κυρίως χρωστικών των φυτών, που προσδίδουν όμως και χαρακτηριστική γεύση καθώς και άρωμα σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Από άποψη δομής ανήκουν σε δύο μεγάλες ομάδες: α) τα παράγωγα της φλαβόνης (Σχήμα 1.4.1) και β) τις ανθοκυανίνες (Σχήμα 1.4.2). Στη φύση ανευρίσκονται δέκα περίπου διαφορετικές τάξεις παραγώγων της φλαβόνης. Οι περισσότερες διαδεδομένες είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι χαλκόνες και οι ισοφλαβόνες (Σχήμα 1.4.1). Εξαιτίας των ελκυστικών χρωμάτων τους οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανιδίνες μπορούν να λειτουργήσουν ως οπτικά σήματα για τα έντομα που πραγματοποιούν την επικονίαση. Οι φλαβονόλες μπορούν να δράσουν ως αμυντικό σύστημα εναντίον εντόμων επιβλαβών για τα φυτά. Επίσης, τα φλαβονοειδή δρουν ως καταλύτες της φωτοσύνθεσης.

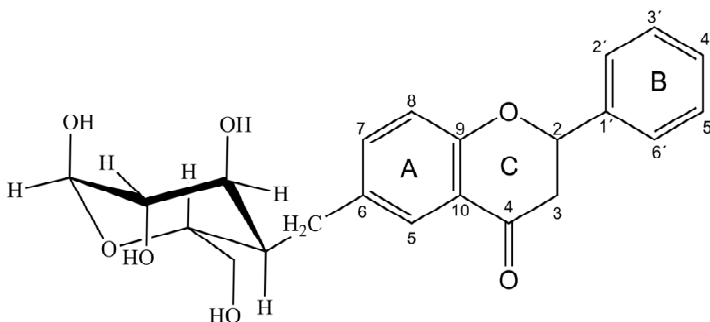


Σχήμα 1.4.1: Χημικοί τύποι παραγώγων φλαβόνης [Ραγκούση, 1996].



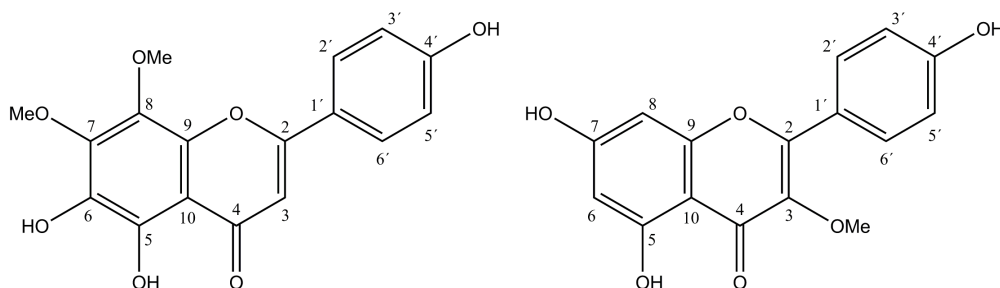
Σχήμα 1.4.2: Χημικός τύπος βασικού σκελετού ανθοκυανινών.

Είναι πολύ σπάνιο να υπάρχει ένα μόνο φλαβονοειδές στο φυτικό ιστό. Τις περισσότερες φορές απαντώνται ως μίγματα ενώσεων, από την ίδια ή από διαφορετικές τάξεις. Τα φλαβονοειδή απαντούν στα φυτά ενωμένα με σάκχαρα ως *O*-γλυκοζίτες. Ανευρίσκονται επίσης και ως *C*-γλυκοζιτικά παράγωγα, όπου το σάκχαρο ενώνεται απευθείας με τον πυρήνα του φλαβονοειδούς με δεσμό C – C (Σχήμα 1.4.3) . Οι *C*-γλυκοζίτες είναι σπανιότεροι από τους *O*-γλυκοζίτες.



Σχήμα 1.4.3: Χημικός τύπος φλαβονοειδούς με *C*-γλυκοζιλίωση στο δακτύλιο (A) στη θέση 6.

Τον τελευταίο καιρό, το ενδιαφέρον της επιστημονική κοινότητας έχει εστιαστεί στα μεθόξυ παράγωγα των φλαβονοειδών (Σχήμα 1.4.4). Πρόσφατες μελέτες επιδεικνύουν την υψηλή αντικαρκινική, αντιπολλαπλασιαστική, αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δράση που κατέχουν αυτά τα παράγωγα [Akao *et al.*, 2008; Benavente-Garcia & Castillo, 2008; Manthey & Guthrie, 2002]. Ιδιαίτερα υψηλή αντικαρκινική δράση κατέχουν φλαβονοειδή με μεθόξυ υποκατάσταση στο δακτύλιο (C) στη θέση 3 [Rubio *et al.*, 2006].



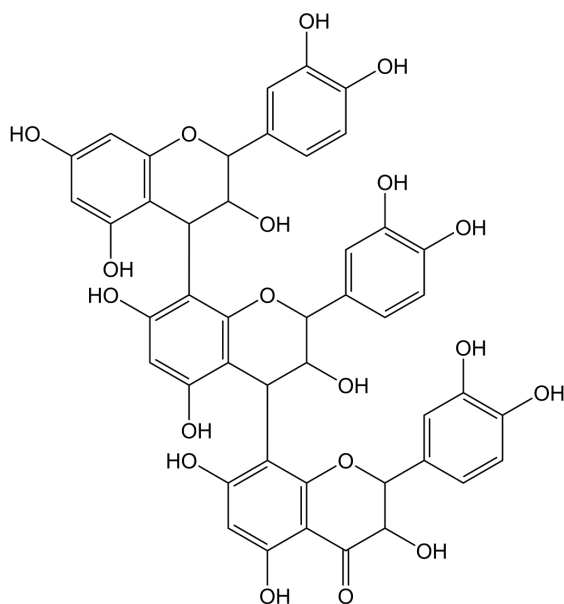
Σχήμα 1.4.4: Χημικοί τύποι χαρακτηριστικών μεθόξυ φλαβονοειδών.

Οι ανθοκυανίνες είναι η σπουδαιότερη ομάδα φυτικών χρωστικών. Το όνομά τους, που είναι σύνθετο από τις ελληνικές λέξεις άνθος και κυανούς, προτάθηκε από τον Marquart το 1835 για το χαρακτηρισμό του μπλέ χρώματος του άνθους του καλαμποκιού. Σήμερα οι ανθοκυανίνες ευθύνονται για όλο το φάσμα των φυτικών χρωμάτων κόκκινου - ιώδες - μπλε. Η παρουσία τους στα φυτά είναι μόνο υπό μορφή γλυκοζιτών, κυρίως στη θέση 3 του δακτυλίου (C), των οποίων τα άγλυκα τμήματα είναι γνωστά ως ανθοκυανιδίνες.

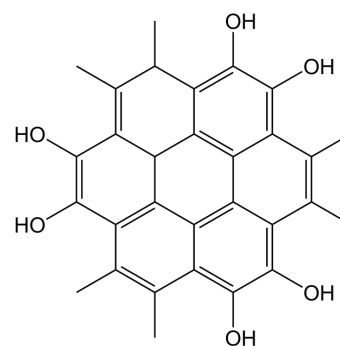
Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές και έχουν επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Έτσι τα όξινα άλατα είναι συνήθως κόκκινα, τα μεταλλικά άλατα είναι συνήθως μπλε, ενώ τα ουδέτερα διαλύματα είναι συνήθως ιώδη.

1.5 Πολυμερείς Φαινολικές Ενώσεις

Στα φυτά πολύ συχνά απαντώνται πολυμερείς ενώσεις φαινολικού τύπου, η μελέτη των οποίων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πρόκειται για τις ταννίνες και τις μελανίνες (Σχήμα 1.5.1).



δομική μονάδα συμπυκνωμένης ταννίνης



δομική μονάδα μελανίνης

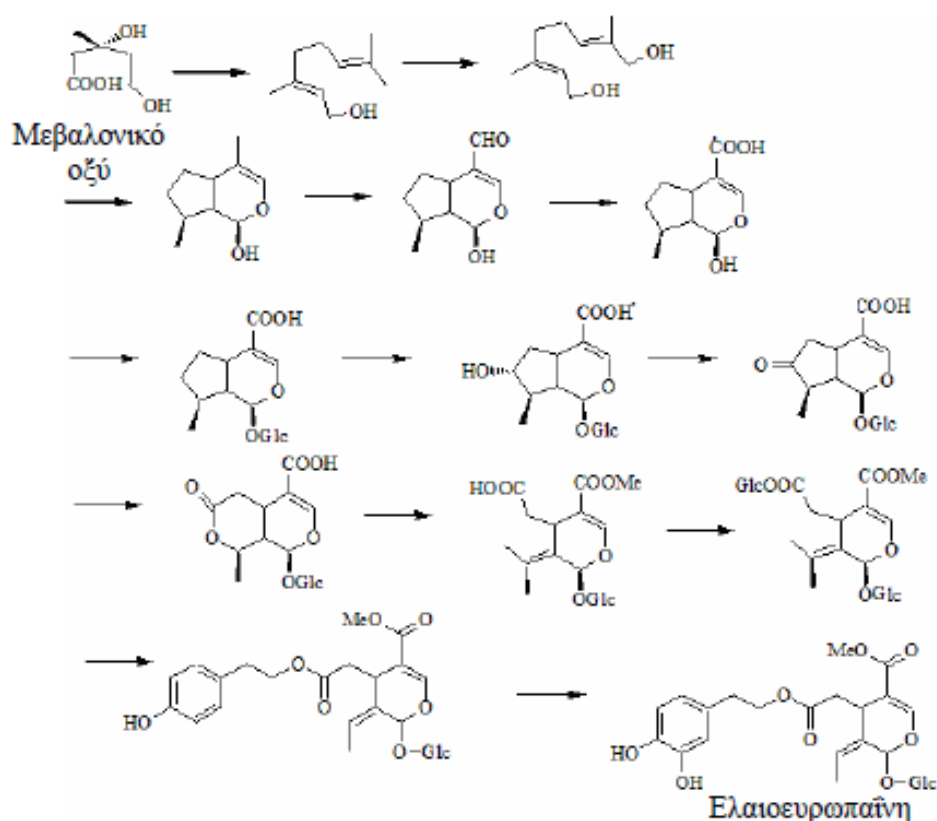
Σχήμα 1.5.1: Χημικοί τύποι δομικών μονάδων ταννίνης και μελανίνης [Ραγκούση, 1996].

Οι ταννίνες είναι πολυμερή φαινολικού τύπου, χωρίς όμως κάποιο κοινό βασικό δομικό σκελετό. Υπάρχουν στο φλοιό πολλών φυτικών ειδών και συνήθως είναι άχρωμες. Στις μελανίνες, αντίθετα, εντοπίζεται βασικός δομικός σκελετός συμπυκνωμένων

αρωματικών δακτυλίων. Στις ενώσεις αυτές οφείλεται το μαύρο χρώμα του φλοιού των σπόρων ορισμένων φυτών.

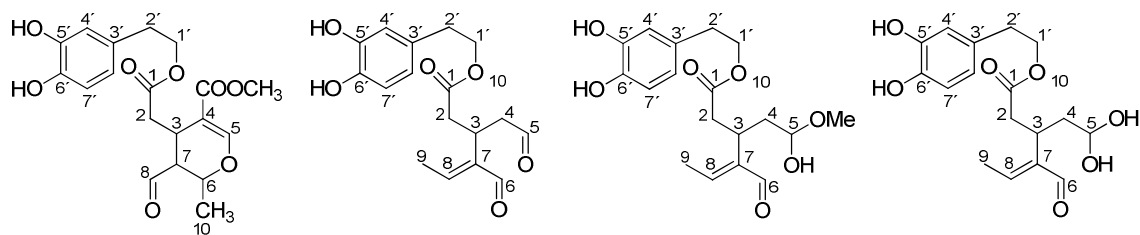
1.6 Σεκοϊριδοειδή - Ελαιοευρωπαΐνη και Παράγωγα

Τα σεκοϊριδοειδή θεωρούνται ότι προέρχονται από τα ιριδοειδή (κυρίως ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα, που διαθέτουν δομή κυκλοπεντανονοτετραϋδροπυρανίου), κυρίως μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος και διάνοιξη του δακτυλίου του κυκλοπεντανίου των ιριδοειδών. Τόσο τα ιριδοειδή, όσο και τα σεκοϊριδοειδή είναι συνήθως γλυκοζιτικώς ενωμένες ενώσεις. Στην οικογένεια *Oleaceae*, τα σεκοϊριδοειδή παράγονται συνήθως από γλυκοζίτες (ολεοζίτες) που χαρακτηρίζονται από μία εξωκυκλική 8, 9-ολεφινική ομάδα, συνδυασμό του ελενολικού οξέος με ένα σάκχαρο [Soler-Rivas *et al.*, 2000]. Χαρακτηριστική ένωση αυτής της κατηγορίας αποτελεί η ελαιοευρωπαΐνη, ένας γλυκοζίτης της 2-(3,4-διυδροξυφαινυλο) αιθανόλης (υδροξυτυροσόλη), η βιοσύνθεση της οποίας [Damtoft *et al.*, 1993], προχωρεί μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (Σχήμα 1.6.1).



Σχήμα 1.6.1: Βιοσύνθεση ελαιοευρωπαΐνης [Soler-Rivas *et al.*, 2000; Damtoft *et al.*, 1993].

Η ελαιοευρωπαϊνή αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό της οικογένειας των *Oleaceae* (φύλλα ελιάς, ελαιόκαρπος, ελαιόλαδο). Στη διεθνή βιβλιογραφία εντοπίζονται αρκετά παράγωγα αυτής, κατά κύριο λόγο αλδεϋδικές μορφές (Σχήμα 1.6.2).



Σχήμα 1.6.2: Δομές αλδεϋδικών μορφών ελαιοευρωπαϊνής [De Nino *et al.*, 2000; Montedoro *et al.*, 1993].

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

2.1 Χημική Μετατόπιση

Η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας NMR βασίζεται στη δυνατότητα διαφοροποίησης κάθε πυρήνα ανάλογα με το χημικό του περιβάλλον. Αυτό σημαίνει ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα επηρεάζεται από την κατανομή των ηλεκτρονίων στους χημικούς δεσμούς του μορίου. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονιακή προστασία που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα υδρογόνου [Gerothanassis & Kalodimos, 1996].

Στην περίπτωση σφαιρικής κατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας, όπως για παράδειγμα στο άτομο του υδρογόνου, το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (B_0) προκαλεί κίνηση φορτίου με αποτέλεσμα τη δημιουργία μαγνητικής συνιστώσας αντίθετης φοράς του B_0 (διαμαγνητική προστασία). Ο πυρήνας αντιλαμβάνεται μαγνητικό πεδίο ίσο με $B = B_0(1-\sigma)$, όπου η σταθερά προστασίας σ , μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο του Lamb με βάση την ηλεκτρονική πυκνότητα $\rho(r)$ που περιβάλλει τον πυρήνα:

$$\sigma = \frac{\mu_0 e^2}{3m_e} \int_0^\infty r \rho(r) dr \quad [2.1]$$

όπου μ_0 είναι η μαγνητική ροπή στην κατάσταση ισορροπίας,

e το φορτίο του ηλεκτρονίου,

m_e η μάζα του ηλεκτρονίου και

$\rho(r)$, είναι μια παράμετρος που περιγράφει την ηλεκτρονική πυκνότητα ως συνάρτηση της απόστασης r από τον πυρήνα.

Στα περισσότερα μόρια η ηλεκτρονιακή κατανομή γύρω από τον πυρήνα δεν είναι σφαιρική και η κυκλοποίηση των ηλεκτρονίων, λόγω της επίδρασης του μαγνητικού πεδίου B_0 , είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Ως συνέπεια, προκαλείται μείωση του διαμαγνητικού αποτελέσματος. Αυτή η μείωση μπορεί να περιγραφεί με μια μαγνητική ροπή που ενισχύει την ένταση του εξωτερικού πεδίου B_0 . Με άλλα λόγια το μαγνητικό πεδίο προκαλεί την ανάμιξη της βασικής και της διεγερμένης ενεργειακής κατάστασης του ηλεκτρονίου, που

εκδηλώνεται με τη δημιουργία μαγνητικής ροπής με κατεύθυνση ίδια με εκείνης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (παραμαγνητικό αποτέλεσμα).

Η σταθερά σ είναι το άθροισμα της διαμαγνητικής και της παραμαγνητικής συνιστώσας που προκύπτουν από την κίνηση των ηλεκτρονίων,

$$\sigma = \sigma_d(\text{διαμαγνητική}) + \sigma_p(\text{παραμαγνητική}) \quad [2.2]$$

Σημειώνεται, πως ο παραμαγνητικός όρος αναφέρεται σε παραμαγνητισμό ανεξάρτητο της θερμοκρασίας, ο οποίος είναι εντελώς διαφορετικός στην προέλευση από τον εξαρτημένο από τη θερμοκρασία παραμαγνητισμό του spin του ηλεκτρονίου.

Για την καλύτερη μελέτη της σταθεράς προστασίας ενός πυρήνα είναι χρήσιμος ο διαχωρισμός της σε τέσσερις παράγοντες [Bovey, 1998]:

- (i) τοπική διαμαγνητική προστασία,
- (ii) τοπική παραμαγνητική προστασία,
- (iii) μαγνητική ανισοτροπία,
- (iv) επίδραση διαλύτη και δεσμών υδρογόνου.

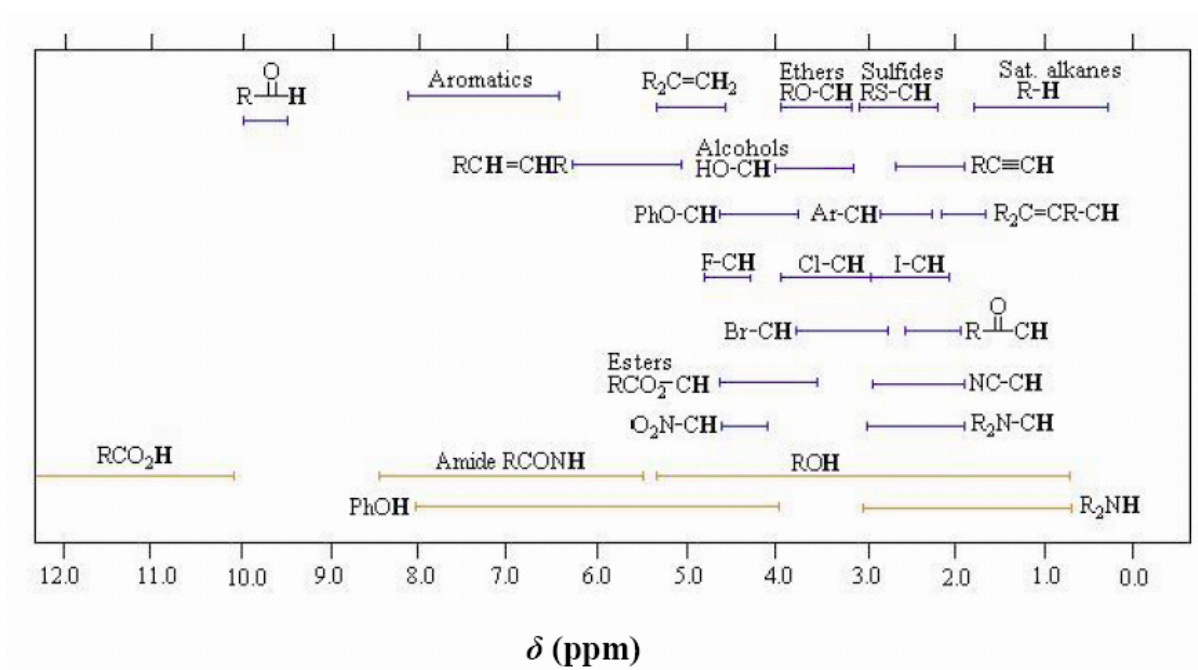
Οι παράγοντες αυτοί αναλύονται διεξοδικά στις υποενότητες 2.1.1 - 2.1.4.

2.1.1 Τοπική Διαμαγνητική Προστασία

Η συνεισφορά των τοπικών διαμαγνητικών ρευμάτων στην τιμή της χημικής μετατόπισης εξαρτάται από την ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα: όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα, τόσο μεγαλύτερη είναι η προστασία [Gerathanassis & Kalodimos, 1996]. Ο παράγοντας αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία στην κλίμακα χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου.

Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων του ^1H εκτείνεται σε μια περιοχή ≈ 20 ppm που μπορεί να χωριστεί σε μικρότερα τμήματα όπως αυτά των αλειφατικών πρωτονίων, των ολεφινικών, των ακετυλενικών, των πρωτονίων αρωματικών δακτυλίων και τέλος των πρωτονίων της καρβοξυλομάδας και της αλδεϋδομάδας. Για τα αλειφατικά πρωτόνια (C-H) η σταθερά προστασίας μειώνεται κατά τη σειρά $\text{CH}_3 > \text{CH}_2 > \text{CH}$. Η συχνότητα συντονισμού των ολεφινικών, ακετυλενικών και αρωματικών πρωτονίων ακολουθεί τη σειρά $\text{C}_6\text{H}_6 > \text{CH}_2=\text{CH}_2 > \text{CH}\equiv\text{CH}$, η οποία δεν συμφωνεί με τη σειρά «οξύτητας» των υδρογόνων, εξηγείται όμως με βάση την ανισοτροπία των χημικών δεσμών. Υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων προκαλούν

μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε υψηλότερες συχνότητες, όπως η σειρά F-CH, Cl-CH και I-CH (βλέπετε Σχήμα 2.1.1). Κατ' επέκταση σε υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων, το πρωτόνιο συντονίζεται σε χαμηλότερες τιμές συχνότητων. Τέλος, τα σήματα των πρωτονίων των ομάδων -OH, -NH, -COOH χρήζουν ιδιαίτερης μελέτης, διότι εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του δείγματος, το διαλύτη και τη θερμοκρασία. Το μεγάλο εύρος των μεταβολών στη χημική μετατόπιση των σημάτων των παραπάνω ομάδων οφείλεται στην ικανότητα των πρωτονίων αυτών των ομάδων να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου και σε φαινόμενα ανταλλαγής (βλέπετε υποενότητα 2.1.4).



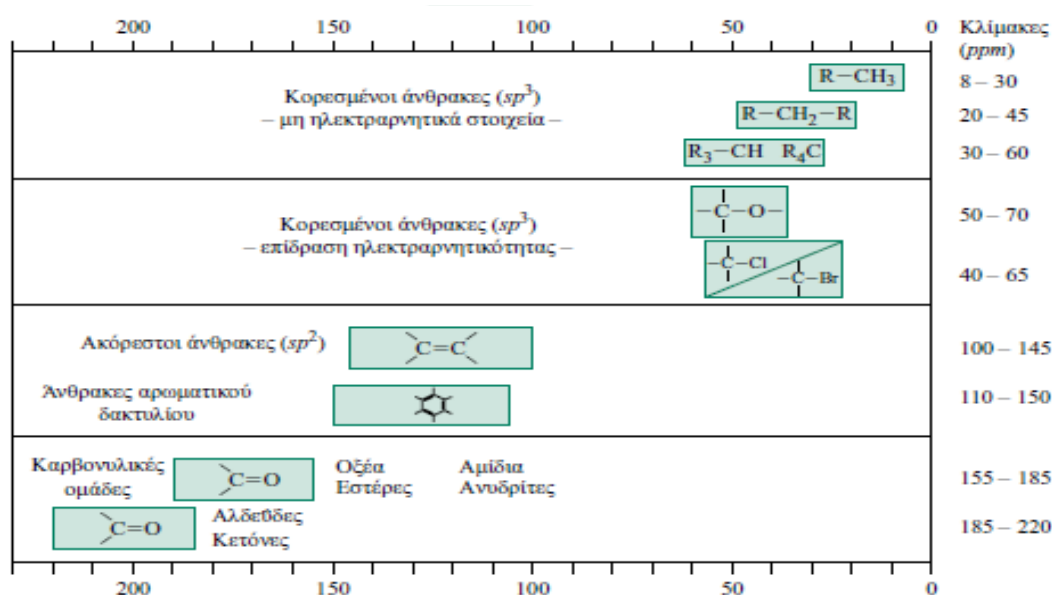
Σχήμα 2.1.1: Εύρος των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων [Γεροθανάσης, 1998].

2.1.2 Τοπική Παραμαγνητική Προστασία

Η τοπική παραμαγνητική προστασία εξαρτάται από το αντίστροφο του κύβου της ακτίνας των τοπικών ηλεκτρονίων σθένους, δηλαδή τον όρο $\langle 1/r^3 \rangle$, όπου r η ακτίνα του Bohr, τη μέση ενέργεια διέγερσης των ηλεκτρονίων ΔE , και τους παράγοντες πυκνότητας φορτίου (Q_{AA}) και κλάσματος δεσμού των τροχιακών p (ή d) (ΣQ_{AB}) (εξίσωση [2.3]).

$$\sigma_p = \frac{e^2 h}{8 \pi^2 m_e^2 c^2} \frac{1}{\Delta E} \frac{1}{\langle r^3 \rangle_{2p}} [Q_{AA} + \sum_{A \neq B} Q_{AB}] \quad [2.3]$$

Συγκεκριμένα, μεγάλες τιμές του όρου $\langle 1/r^3 \rangle$, προκαλούν μεγάλες μεταβολές στην πυρηνική προστασία [Jameson & Gutowsky, 1964]. Δεδομένου ότι η παραμαγνητική προστασία οφείλεται και στην ανάμιξη της βασικής και της διεγερμένης ενεργειακής κατάστασης του ηλεκτρονίου είναι προφανές ότι χαμηλές ενέργειες διέγερσης οδηγούν σε μεγάλες τιμές της παραμαγνητικής αποπροστασίας. Τέλος είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό ότι η πολλαπλότητα του δεσμού $[Q_{AA} + \sum Q_{AB}]$ είναι ανάλογη της συνεισφοράς της παραμαγνητικής προστασίας στη χημική μετατόπιση. Ο παράγοντας αυτός έχει καθοριστική σημασία στις χημικές μετατοπίσεις ετεροπυρήνων όπως του άνθρακα-13 (Σχήμα 2.1.2).



Σχήμα 2.1.2: Εύρος των χημικών μετατοπίσεων άνθρακα-13 διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων [Γεροθανάσης, 1998].

Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ^{13}C είναι περίπου 200 ppm για τις συμβατικές οργανικές ενώσεις. Είναι, συνεπώς, σε σχέση με την κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ^1H περίπου 10 φορές μεγαλύτερη. Γενικά, η συχνότητα συντονισμού εμφανίζεται σε μικρότερες τιμές σε άνθρακα υβριδισμού sp^3 σε σχέση με άνθρακα υβριδισμού sp^2 [Γεροθανάσης, 1998].

$$C_{sp^2} < C_{sp^3} < C_{sp} \quad (\delta \text{ TMS} = 0)$$

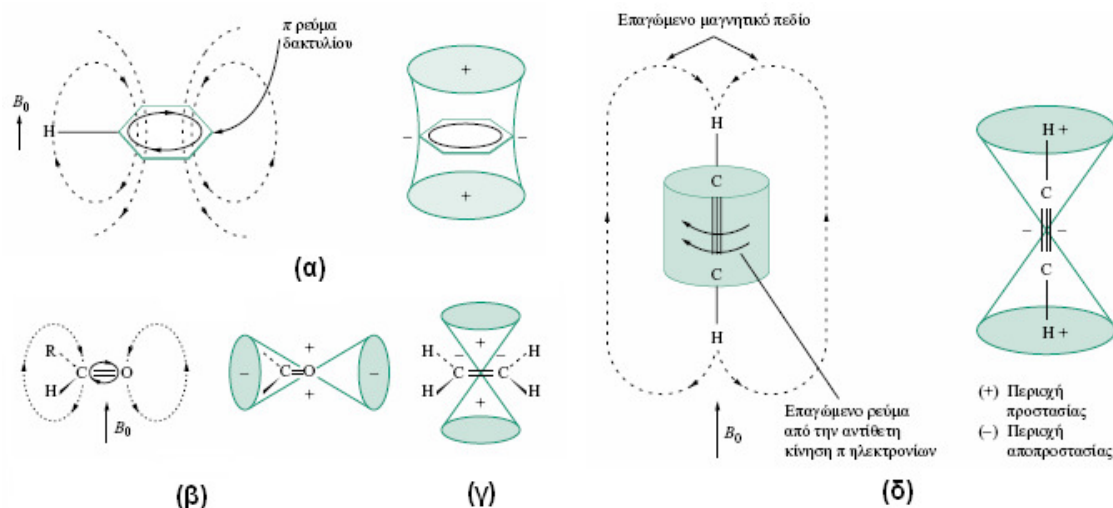
Υποκαταστάτες X δέκτες ηλεκτρονίων προκαλούν σημαντική αποπροστασία (μεγαλύτερες τιμές δ) στον α -C και σε μικρότερο βαθμό στον β -C (Πίνακας 2.1.1).

Πίνακας 2.1.1: Μετατοπίσεις ^{13}C σε ppm λόγω της ομάδας X στην αλληλουχία $\text{X} - \text{C}_\alpha - \text{C}_\beta - \text{C}_\gamma$ [Γεροθανάσης, 1998].

X	α	β	γ
CH_3	+9	+10	-2
C_6H_5	+23	+9	-2
OCH_3	+58	+8	-4
COCH_3	+30	+1	-2
NH_2	+29	+11	-5
NO_2	+63	+4	-
CN	+4	+3	-3
F	+68	+9	-4
Cl	+31	+11	-4

2.1.3 Μαγνητική Ανισοτροπία

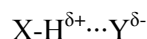
Σημαντικός παράγοντας της σταθεράς προστασίας, που έχει ιδιαίτερη σημασία σε πυρήνες ^1H , περιλαμβάνει την επίδραση των ηλεκτρονιακών νεφών πολλαπλών δεσμών στα γειτονικά πρωτόνια. Με την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα π ηλεκτρόνια πολλαπλών δεσμών δημιουργούν επαγόμενα μαγνητικά πεδία τα οποία έχουν ανισότροπη κατανομή σε σχέση με τον άξονα του δεσμού και είναι, συνεπώς, κατά περιοχές διαμαγνητικά ή παραμαγνητικά. Η μαγνητική ανισοτροπία που παρουσιάζει το μόριο του βενζολίου και γενικότερα τα αρωματικά συστήματα είναι ίσως το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα. Αναλυτικότερα υπό την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 , δημιουργείται από την κίνηση των π ηλεκτρονίων, επαγωγικό ρεύμα, το λεγόμενο « π ρεύμα δακτυλίου». Η κατεύθυνση του ρεύματος αυτού είναι τέτοια ώστε το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο B' να έχει φορά αντιπαράλληλη ως προς το B_0 . Λόγω των μαγνητικών γραμμών του δευτερογενούς μαγνητικού πεδίου B' , το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο συναντά τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου με παράλληλη φορά ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 με συνέπεια τα πρωτόνια να αποπροστατεύονται και να συντονίζονται σε μεγαλύτερες συχνότητες. Παρόμοια φαινόμενα μαγνητικής ανισοτροπίας παρουσιάζουν ο τριπλός και ο διπλός δεσμός μεταξύ ατόμων άνθρακα, και ο καρβονυλικός δεσμός όπως εικονίζονται στο Σχήμα 2.1.3.



Σχήμα 2.1.3: Μαγνητική ανισοτροπία (α) βενζολικού δακτυλίου, (β) καρβονυλικού δεσμού (C=O), (γ) διπλού δεσμού μεταξύ δύο ανθράκων (C=C), (δ) τριπλού δεσμού μεταξύ ανθράκων (C≡C) [Γεροθανάσης, 1998].

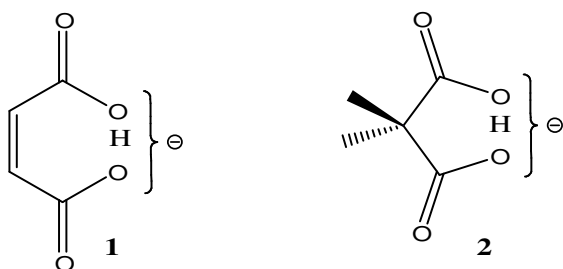
2.1.4 Επίδραση του Διαλύτη και των Δεσμών Υδρογόνου

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερά προστασίας, περιλαμβάνει επιδράσεις του διαλύτη, φαινόμενα ηλεκτρικού πεδίου, δεσμούς υδρογόνου κτλ. Ο σχηματισμός ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου ασκεί μεγάλη επίδραση στις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων και, ειδικότερα, στην περίπτωση πυρήνων πρωτονίου, προκαλεί σημαντική μείωση της σταθεράς προστασίας των. Ας θεωρήσουμε για παράδειγμα το δεσμό O-H...O, στον οποίο το πρωτόνιο βρίσκεται ανάμεσα στο ηλεκτρονικό νέφος των δύο ατόμων οξυγόνου, αφού η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων οξυγόνου είναι συνήθως μικρότερη από το άθροισμα των ακτίνων van der Waals των ατόμων οξυγόνου. Θα μπορούσε λοιπόν να υποθεθεί ότι επέρχεται αύξηση στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πυρήνα υδρογόνου που αναμένεται να προκαλέσει αύξηση του διαμαγνητικού όρου της σταθεράς προστασίας [Bovey, 1998]. Προφανώς, η πειραματικά παρατηρούμενη αποπροστασία του εμπλεκόμενου σε δεσμό υδρογόνου πρωτονίου οφείλεται σε άλλους παράγοντες, όπως η διατάραξη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του ομοιοπολικού δεσμού X-H από την παρουσία του δότη Y:



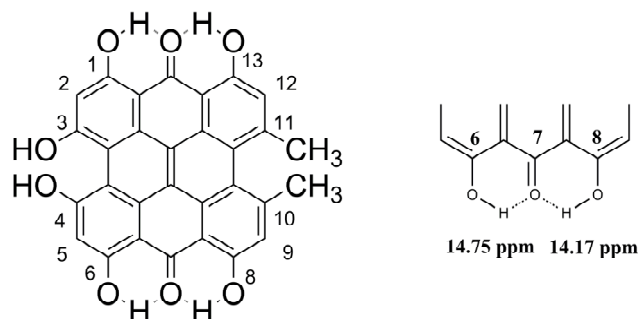
Σύμφωνα με μία διαφορετική θεώρηση, το ηλεκτροστατικό πεδίο του δεσμού υδρογόνου τείνει να έλξει το υδρογόνο προς το Y και να απομακρύνει τα δεσμικά ηλεκτρόνια του δεσμού X-H προς το X, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του υδρογόνου και επομένως αύξηση της αποπροστασίας του [Bovey, 1998].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου που μπορούν να σχηματιστούν όταν η διαμόρφωση του μορίου είναι τέτοια, ώστε τα άτομα που αλληλεπιδρούν να βρεθούν στην κατάλληλη, για τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου, γεωμετρία. Οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό σε στερεά φάση και σε κατάσταση διαλύματος τόσο σε πρωτικούς όσο και σε μη πρωτικούς διαλύτες. Η ύπαρξη ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου σε φυσικά προϊόντα έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία NMR-¹H, όπως στην περίπτωση των ανιόντων δικαρβοξυλικών οξέων, μηλεϊνικού και διμεθυλομηλονικού, όπου το πρωτόνιο που συμμετέχει στον ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζεται στα 20 και 19 ppm αντίστοιχα.



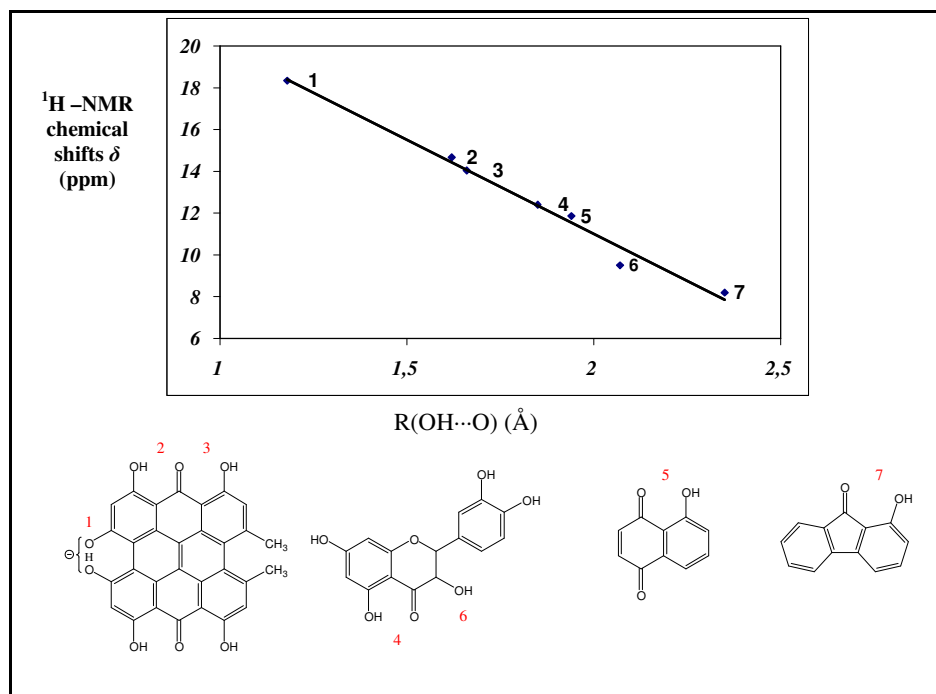
Σχήμα 2.1.4: Ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου του μηλεϊνικού (1) και διμεθυλομηλονικού ανιόντος (2). Τα πρωτόνια που συμμετέχουν στον ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζονται στα 20 και 19 ppm, αντίστοιχα [Frey *et al.*, 2001].

Στην περίπτωση του διαλύματος υπερεϊκίνης σε μεθανόλη (Σχήμα 2.1.5) παρατηρείται με την μείωση της θερμοκρασίας η εμφάνιση μιας ευρείας κορυφής στην περιοχή των 17.3 - 17.5 ppm, με ολοκλήρωμα που αντιστοιχεί σε ένα πρωτόνιο [Tatsis *et al.*, 2008]. Με βάση τη χημική μετατόπιση και το ολοκλήρωμα αυτού, το σήμα συντονισμού αποδίδεται στο OH(3) του ανιόντος της υπερεϊκίνης. Η απορρόφηση αυτή είναι χαρακτηριστική της ανιονικής μορφής της υπερεϊκίνης και βρίσκεται σε συμφωνία με τα υπόλοιπα βιβλιογραφικά δεδομένα NMR. Η μεγάλη τιμή της χημικής μετατόπισης οφείλεται στην ύπαρξη ισχυρού δεσμού υδρογόνου, όπως στην περίπτωση του μηλεϊνικού ανιόντος όπου το πρωτόνιο που συμμετέχει στον ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζεται στα 20 ppm.



Σχήμα 2.1.5: Σχηματισμός ισχυρών ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλικών πρωτονίων OH(6) και OH(8) με το καρβονυλικό οξυγόνο CO(7) της υπερεικίνης [Tatsis *et al.*, 2008].

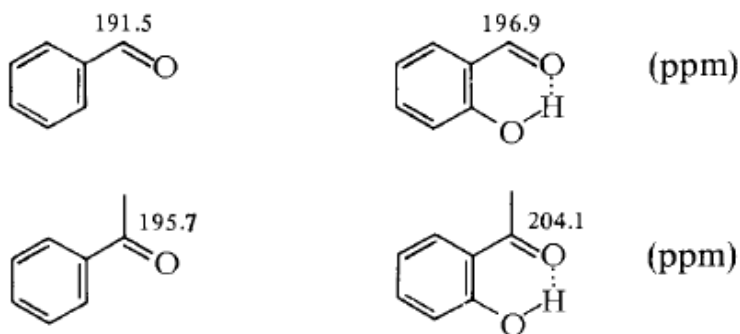
Τα παραπάνω δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα του ανιόντος της υπερεικίνης σε πυριδίνη [Fernandes *et al.*, 2008]. Η γεωμετρία του μορίου στην περιοχή bay δείχνει ότι το πρωτόνιο βρίσκεται σχεδόν στο μέσον της ευθείας που ορίζουν τα οξυγόνα στις θέσεις 3 και 4 του ανθρακικού σκελετού της υπερεικίνης. Η απόσταση O(3)-O(4) είναι 2.36 Å και οι αποστάσεις O(3)-H(3)···O(4) είναι 1.17 & 1.20 Å, αντίστοιχα, και υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός ισχυρότατου δεσμού υδρογόνου.



Σχήμα 2.1.6: Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου: Συσχέτιση κρυσταλλογραφικών αποστάσεων R(OH···O) (Å) και χημικής μετατόπισης NMR-¹H [Tatsis *et al.*, 2008].

Στα peri υδροξύλια OH(1,6) και OH(8,13) τα οποία συντονίζονται στα 14.7 και 14.1 ppm αντίστοιχα, οι αντίστοιχες αποστάσεις δεσμών, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του ανιόντος της υπερεικίνης είναι O(6)-H(6)···O(7) 1.13 & 1.50 Å και O(8)-H(8)···O(7) 0.81 & 1.79 Å. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε άριστη συμφωνία σε σχέση με την εξάρτηση της ισχύος του δεσμού υδρογόνου, όπως εκφράζεται σε ppm από την φασματοσκοπία NMR-¹H, και την απόσταση του δεσμού όπως προκύπτει από κρυσταλλογραφικές μελέτες (Σχήμα 2.1.6).

Η επίδραση του δεσμού υδρογόνου στις χημικές μετατοπίσεις του ¹³C είναι σημαντική, αλλά όχι τόσο έντονη όπως στην περίπτωση του ¹H. Παράδειγμα αποτελεί η σαλικυλική αλδεϋδη αλλά και η ο-υδροξυακετοφαινόνη. Η δημιουργία δεσμού υδρογόνου σχετίζεται με το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του καρβονυλικού οξυγόνου. Ως αποτέλεσμα, ο καρβονυλικός άνθρακας γίνεται πιο θετικός οπότε παρατηρείται αποπροστασία (Σχήμα 2.1.7) [Breitmaier *et al.*, 1990].



Σχήμα 2.1.7: Ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου σαλικυλικής αλδεϋδης και ο-υδροξυακετοφαινόνης [Breitmaier *et al.*, 1990].

Συνεπώς, η τιμή της συχνότητας συντονισμού εξαρτάται από τη μοριακή δομή και, κατά συνέπεια, την ηλεκτρονική πυκνότητα του πυρήνα. Εξαρτάται, όμως, και από άλλους παράγοντες από τους οποίους ιδιαίτερα σημαντικός είναι η μαγνητική ανισοτροπία (βλέπετε υποενότητα 2.1.3).

2.2 Σταθερές Σύζευξης

Τα σήματα συντονισμού πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια ή άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με την μορφή πολλαπλών κορυφών, οι οποίες έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin - spin και οφείλεται στη μέσω δεσμών αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών είναι ότι ισαπέχουν μεταξύ τους κατά μια σταθερά J που καλείται σταθερά σύζευξης και είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου B_0 . Η σταθερά σύζευξης (J coupling) εξαρτάται από τους γυρομαγνητικούς λόγους των πυρήνων που βρίσκονται σε σύζευξη, τη δομή και τη γεωμετρία του μορίου. Για το λόγο αυτό η τιμή της σταθεράς σύζευξης ποικίλει. Η σταθερά σύζευξης έχει τόσο μεγαλύτερη τιμή όσο πλησιέστερα βρίσκονται οι πυρήνες που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών. Η σταθερά J διακρίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεσμών που χωρίζουν τους πυρήνες που συζευγνύονται (nJ , όπου n ο αριθμός των δεσμών) [Βαλαβανίδης, 2006; Αλεξάνδρου, 1992].

2.2.1 Ομοπυρηνική Σύζευξη Spin-Spin ^1H - ^1H (Spin-Spin Coupling)

Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλους πυρήνες πρωτονίων εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών. Η πολλαπλότητα των σημάτων συντονισμού (λεπτή υφή του φάσματος) εξηγείται θεωρητικά με την παραδοχή της αλληλεπίδρασης των πυρηνικών μαγνητικών διπόλων με ενδιάμεση σύζευξη με τα μαγνητικά ηλεκτρονικά δίπολα των ηλεκτρονίων του δεσμού. Οι διάφοροι προσανατολισμοί spin ενός πυρήνα αντιπροσωπεύουν ασθενή μαγνητικά πεδία, που μεταφέρονται μέσω των ηλεκτρονίων σθένους στο γειτονικό πυρήνα τροποποιώντας έτσι το εξωτερικό πεδίο, με αποτέλεσμα την πολλαπλότητα ενός σήματος συντονισμού.

Οι μεγαλύτερες τιμές στη σταθερά σύζευξης παρατηρούνται μεταξύ πρωτονίων που απέχουν δύο (2J) έως τρεις (3J) δεσμούς. Όταν η πληροφορία της σύζευξης μεταδίδεται μέσα από μια σειρά σ δεσμών μειώνεται τουλάχιστον κατά μια τάξη μεγέθους για κάθε ενδιάμεσο δεσμό. Σε ορισμένα άκαμπτα συστήματα η σύζευξη πρωτονίου-πρωτονίου έχει σχετικά μεγάλη τιμή ακόμη και όταν παρεμβαίνουν τέσσερις (4J) δεσμοί. Η πληροφορία της σύζευξης μπορεί να μεταφερθεί διαμέσου τεσσάρων ή πέντε δεσμών στα αρωματικά συστήματα όπου τα π ηλεκτρόνια παίζουν σαφώς σημαντικό ρόλο. Συζεύξεις μακράς αλυσίδας γίνονται εμφανείς όταν μεταφέρονται μέσα από μια σειρά πολλαπλών δεσμών (πχ. αλλυλικά συστήματα) [Bovey, 1998].

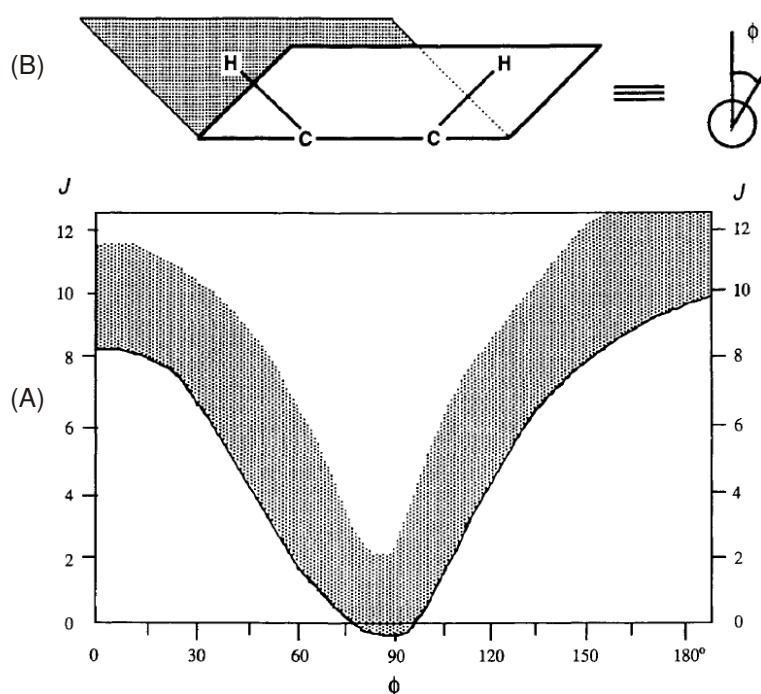
Η τιμή της σταθεράς σύζευξης που παρατηρείται μεταξύ πρωτονίων που απέχουν μεταξύ τους τρεις δεσμούς ($^3J_{HH}$), εξαρτάται από τη διαμόρφωση και ειδικότερα από την diedρη γωνία (ϕ) (Σχήμα 2.2.1B), που σχηματίζουν τα υπό σύζευξη πρωτόνια σύμφωνα με την εξίσωση Karplus:

$$J = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi \quad [2.4]$$

όπου A , B και C είναι σταθερές με τιμές περίπου +7, -1, και +5 Hz, αντίστοιχα. Συνεπώς η τιμή της J μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διαμόρφωσης ενός μορίου. Από την θεωρητική σχέση του Karplus αλλά και τα πειραματικά δεδομένα για μια σειρά ενώσεων προέκυψαν οι παρακάτω εξισώσεις που συνδέουν την $^3J_{HH}$ με τη diedρη γωνία ϕ :

$$^3J_{HH} = 8.5 \cos^2 \phi - 0.28 \quad (\text{Hz}), \quad 0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ \quad [2.5]$$

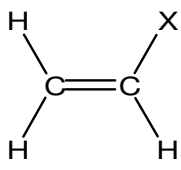
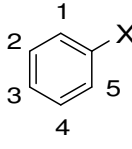
$$^3J_{HH} = 9.5 \cos^2 \phi - 0.28 \quad (\text{Hz}), \quad 90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ \quad [2.6]$$



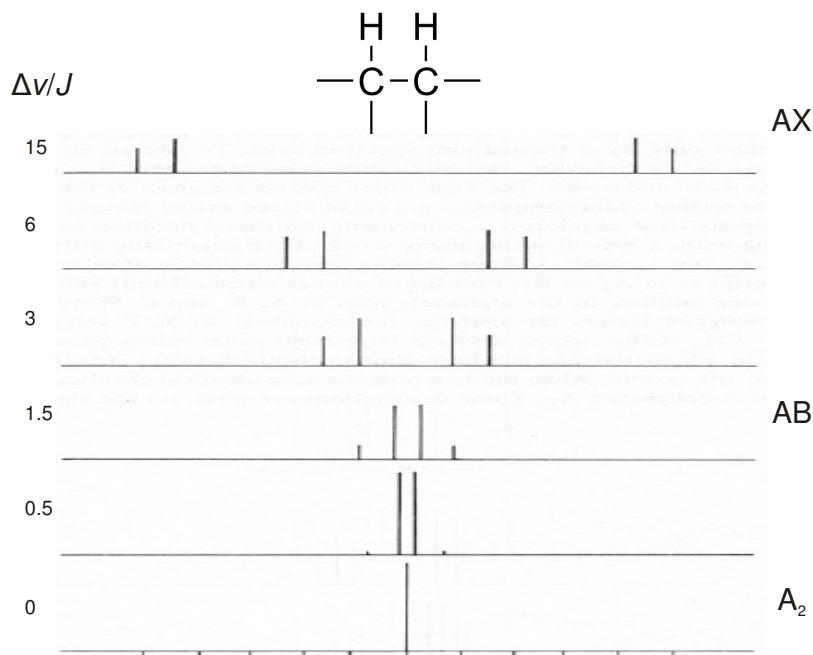
Σχήμα 2.2.1: (A) Εξάρτηση της $^3J_{HH}$ από τη diedρη γωνία ϕ , σύμφωνα με την εξίσωση Karplus, (B) Σχηματική αναπαράσταση diedρης γωνίας (ϕ) [Balci, 2005].

Από τις παραπάνω εξισώσεις προκύπτει ότι για $\varphi=90^\circ$, $^3J_{\text{HH}} = -0.3$, ενώ για $\varphi=0^\circ$ και για $\varphi=180^\circ$ προκύπτουν αντίστοιχα οι τιμές $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ και $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz. Οι παραπάνω εξισώσεις μπορούν να εφαρμοστούν και στα αιθυλενικά παράγωγα για τα οποία προβλέπεται ότι η $^3J_{\text{trans}}(\varphi=180^\circ)$ είναι μεγαλύτερη από τη $^3J_{\text{cis}}(\varphi=90^\circ)$. Στον Πίνακα 2.2.1 παρουσιάζονται τιμές της σταθεράς σύζευξης των πρωτονίων επιλεγμένων ενώσεων όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 2.2.1: Τιμές της σταθεράς σύζευξης των πρωτονίων επιλεγμένων αιθυλενικών και αρωματικών ενώσεων [Gunther, 1995].

		X	$^3J_{\text{cis}}$ (Hz)		$^3J_{\text{trans}}$ (Hz)		
		COOH	10.2		17.2		
		C ₆ H ₅	11.48		18.59		
	X	$^3J_{(1,2)}$ (Hz)	$^4J_{(1,3)}$ (Hz)	$^5J_{(1,4)}$ (Hz)	$^4J_{(1,5)}$ (Hz)	$^3J_{(2,3)}$ (Hz)	$^4J_{(2,4)}$ (Hz)
	H	7.54	1.37	0.66	1.37	7.54	1.37
	COOH	7.86	1.35	0.63	1.79	7.49	1.31
	OH	8.17	1.09	0.49	2.71	7.40	1.74
	OCH ₃	8.30	1.03	0.44	2.94	7.36	1.76

Ο τύπος του φάσματος είναι συνάρτηση της διαφοράς της συχνότητας συντονισμού $\Delta\nu$, μεταξύ των δύο πυρήνων που συζευγνύονται και του μεγέθους της σταθεράς J . Οι πυρήνες που διαφέρουν σημαντικά στη χημική μετατόπιση σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης, J , συμβολίζονται, με ακραία γράμματα του λατινικού αλφάβητου AMX ή AX ($\Delta\nu \gg J$). Οι πυρήνες που δεν διαφέρουν σημαντικά στη χημική μετατόπιση σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης, J , συμβολίζονται με γειτονικά γράμματα του λατινικού αλφάβητου ABC ή AC ($\Delta\nu \geq J$). Στο παρακάτω σχήμα εικονίζονται τύποι φασμάτων που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων ως συνάρτηση του λόγου $\Delta\nu/J$.



Σχήμα 2.2.2: Τύποι φασμάτων NMR που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων ως συνάρτηση του λόγου $\Delta\nu/J$ [Balci, 2005].

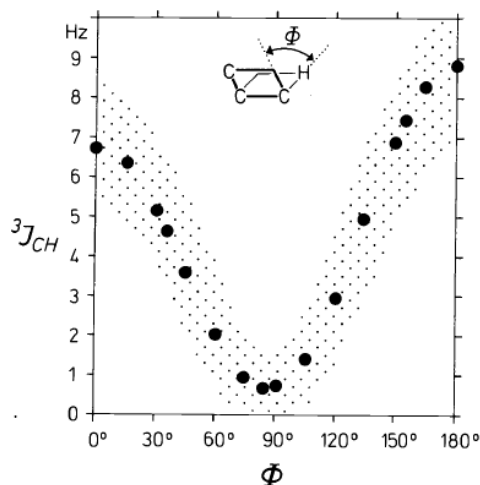
2.2.2 Ετεροπυρηνική Σύζευξη Spin-Spin ^1H - ^{13}C (Spin-Spin Coupling)

Οι σταθερές σύζευξης ^{13}C - ^1H μέσω ενός δεσμού ποικίλουν από 120 μέχρι 320 Hz. Οι σταθερές σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$ αυξάνουν κατά τη μεταβολή του υβριδισμού από sp^3 σε sp , σύμφωνα με την αύξηση του ποσοστού συμμετοχής του s τροχιακού στον υβριδισμό. Τυπικές τιμές είναι: CH_4 (sp^3) $^1J_{\text{CH}} = 125$ Hz, $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ (sp^2) $^1J_{\text{CH}} = 157$ Hz και $\text{HC}\equiv\text{CH}$ (sp) $^1J_{\text{CH}} = 250$ Hz [Γεροθανάσης, 1998; Breitmaier *et al.*, 1990].

Η παρουσία ηλεκτραρνητικών υποκαταστατών αυξάνει τη σύζευξη. Για παραδείγμα στην ομάδα $-\text{O}-\text{CH}_3$ $^1J_{\text{CH}} = 140$ Hz και στην ομάδα $\text{Cl}-\text{CH}_3$ $^1J_{\text{CH}} = 150$ Hz.

Οι σταθερές σύζευξης $^2J_{\text{CH}}$ και $^3J_{\text{CH}}$ είναι μικρότερες και έχουν τιμές μεταξύ 1 - 10 Hz. Η σύζευξη δύο δεσμών $^2J_{\text{CH}}$ είναι πολύ μικρότερη από αυτήν του ενός δεσμού. Το μέγεθος της (1 - 12 Hz) είναι περίπου το μισό της δίδυμης σύζευξης πρωτονίων και ο προσδιορισμός της από τα φάσματα είναι αρκετά δύσκολος. Όπως και στην περίπτωση των πρωτονίων, η σύζευξη τριών δεσμών $^3J_{\text{CH}}$ έχει περισσότερο ενδιαφέρον, γιατί εξαρτάται από το μήκος του δεσμού και τη διέδρο γωνία (εξίσωση και καμπύλη Karplus, Σχήμα 2.2.3).

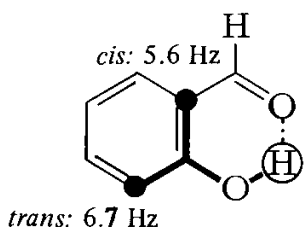
$$^3J_{CH} = 4.26 - \cos \Phi + 3.56 \cos 2\Phi$$



Σχήμα 2.2.3: Διάγραμμα της σταθεράς σύζευξης $^3J_{CH}$ ως συνάρτηση της διεδρής γωνίας Φ , όπως προκύπτει από την εξίσωση Karplus για το μόριο του προπανίου [Breitmaier *et al.*, 1990].

Ως σύζευξη μακράς εμβέλειας, θεωρούμε τη σύζευξη μεταξύ πυρήνων οι οποίοι βρίσκονται σε απόσταση τεσσάρων ή περισσότερων δεσμών (nJ ($n \geq 4$)). Επειδή η αλληλεπίδραση των πυρήνων εξασθενεί με την αύξηση του αριθμού των δεσμών, η σταθερά σύζευξης μακράς εμβέλειας αναμένεται να είναι πολύ μικρή σε σχέση με τη δίδυμη και γειτονική σύζευξη (συνήθως 0.1 - 3 Hz).

Οι φαινολικές υδροξυλικές ομάδες εμφανίζουν $^3J_{CH}$ μέσω του οξυγόνου όταν το πρωτόνιο της -OH ομάδας συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου. Μικρές διαφορές στη σταθερά σύζευξης εμφανίζονται στην περίπτωση που έχουμε διαφορετικές διαμορφώσεις *cis* και *trans* μέσω του πρωτονίου που συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου. Παράδειγμα αυτού αποτελεί η σαλικυλική αλδεΐδη (Σχήμα 2.2.4) [Γεροθανάσης, 1998; Breitmaier *et al.*, 1990].

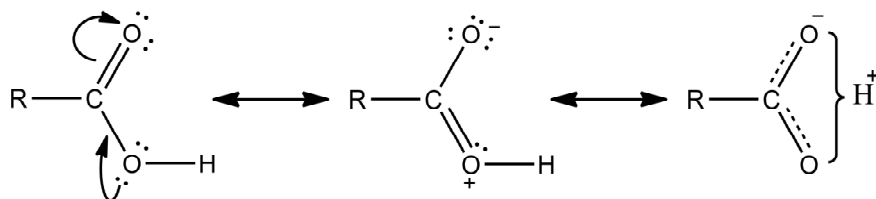


Σχήμα 2.2.4: Σταθερές σύζευξης $^3J_{CH}$ των *cis* και *trans* του πρωτονίων της σαλικυλικής αλδεύδης που συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου [Breitmaier *et al.*, 1990].

2.3 Φαινόμενο Ανταλλαγής Πρωτονίων - Επίδραση Δεσμού Υδρογόνου και pH

2.3.1 Επίδραση Διαμοριακών και Ενδομοριακών Δεσμών Υδρογόνου

Μερικά από τα λιγότερα προστατευμένα πρωτόνια, είναι αυτά των καρβοξυλικών οξέων (RCOOH) τα οποία απορροφούν στην περιοχή 10 έως 12 ppm. Τόσο το φαινόμενο του συντονισμού όσο και η ηλεκτρανητικότητα του ατόμου του καρβονυλικού οξυγόνου έλκουν το ζεύγος ηλεκτρονίων του δεσμού του -OH με συνέπεια την αυξημένη οξύτητα και την αποπροστασία του πρωτονίου της -COOH.



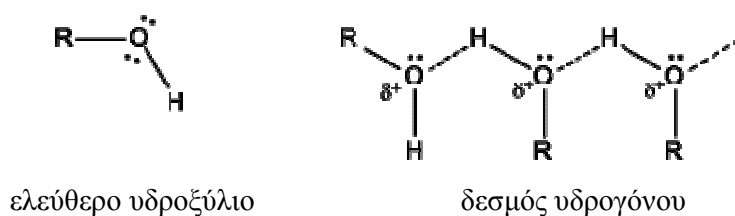
Σχήμα 2.3.1: Δομές συντονισμού καρβοξυλικών οξέων.

Πρωτόνια τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (π.χ. πρωτόνια καρβοξυλικών ομάδων, φαινολικών υδροξυλίων, υδροξυλίων αλκοολών ή αμινοομάδων) εμφανίζουν ευρεία κλίμακα απορροφήσεων (Πίνακας 2.3.1). Όσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός υδρογόνου τόσο πιο αποπροστατευμένο είναι το πρωτόνιο που συμμετέχει στο δεσμό.

Πίνακας 2.3.1: Εύρη απορροφήσεων πρωτονίων χαρακτηριστικών ομάδων [Pavia *et al.*, 2001].

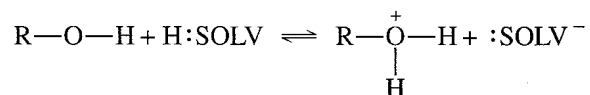
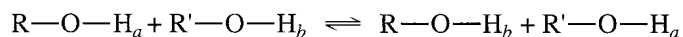
Οξέα	RCOOH	10.5 - 12.0 ppm
Φαινόλες	ArOH	4.0 - 7.0
Αλκοόλες	ROH	0.5 - 5.0
Αμίνες	RNH ₂	0.5 - 5.0
Αμίδια	RCONH ₂	5.0 - 8.0
Ενόλες	CH=CH-OH	> 15

Η πιθανότητα σχηματισμού διαμοριακών δεσμών υδρογόνου είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας. Όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση του διαλύματος, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Ενώ όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μικρότερη είναι αυτή η πιθανότητα. Ο σχηματισμός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου εξαρτάται σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σχέση με τους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη συγκέντρωση. Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία για τη διάκριση ενδο- και δια-μοριακών δεσμών υδρογόνου [Jeffrey & Saenger, 1991].



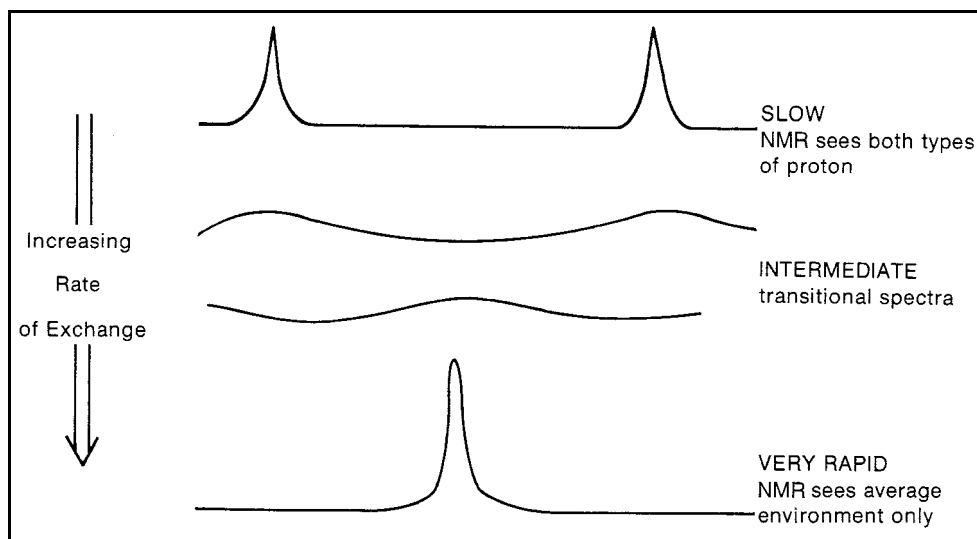
Σχήμα 2.3.2: Σχηματική απεικόνιση διαμοριακού δεσμού υδρογόνου [Pavia *et al.*, 2001].

Υδρογόνα τα οποία μπορούν να ανταλλάγουν είτε με πρωτόνια του διαλύτη είτε άλλων μορίων, δείχνουν μια ευρεία περιοχή απορροφήσεων. Οι παρακάτω εξισώσεις υποδεικνύουν τις πιθανές ανταλλαγές.



Σχήμα 2.3.3: Σχηματική απεικόνιση ανταλλαγής υδρογόνων [Pavia *et al.*, 2001].

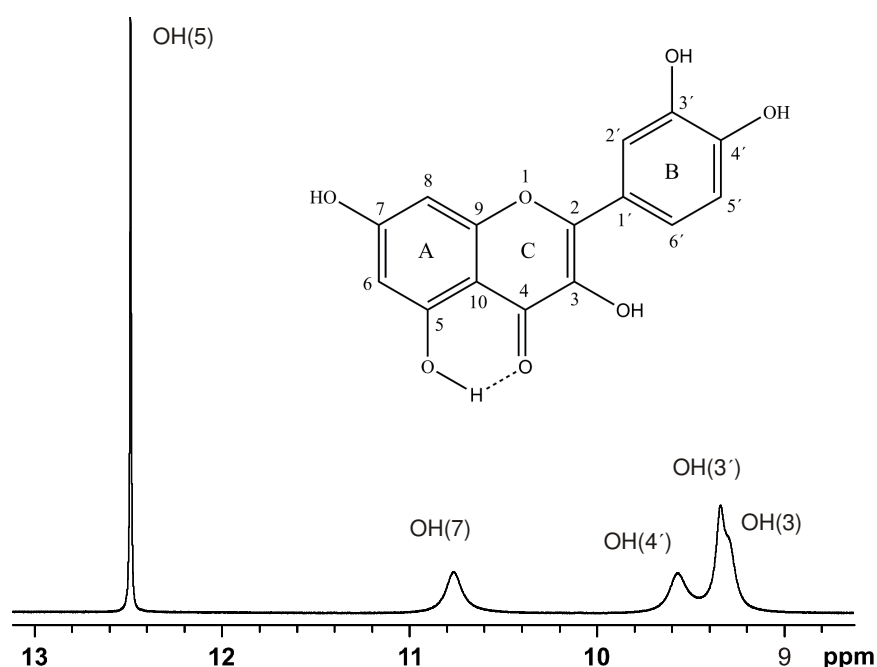
Διαμοριακή ανταλλαγή πρωτονίων συχνά οδηγεί σε διεύρυνση των κορυφών. Οι κορυφές αντί να εμφανιστούν ως οξείες σε εύρος, πολλές φορές διευρύνονται και υπολείπονται σε ένταση. Μία κορυφή που οφείλεται, για παράδειγμα, σε απορρόφηση –O-H μπορεί να διακριθεί από τις υπόλοιπες απλές κορυφές, σε αρκετές περιπτώσεις, και μόνο από τη μορφή της. Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, σημειώνουμε μόνο την εξάρτηση από τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία. Στο Σχήμα 2.3.4 αποτυπώνεται διαγραμματικά η επίδραση στο φάσμα NMR της ταχύτητας ανταλλαγής, από πολύ αργή έως πολύ γρήγορη, ως προς την κλίμακα χρόνου του NMR.



Σχήμα 2.3.4: Η επίδραση της ταχύτητας ανταλλαγής στη διεύρυνση κορυφών σε ένα φάσμα NMR [Pavia *et al.*, 2001].

Στην περίπτωση των φλαβονοειδών (Σχήματα 1.4.1 και 2.3.5), παρά τον μεγάλο αριθμό ομάδων –OH, οι εξαιρετικά λεπτές κορυφές απορρόφησης που εμφανίζονται στα 11 - 13 ppm αποδίδονται στο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του υδροξυλίου που βρίσκεται στη θέση 5 του δακτυλίου (A), το οποίο συμμετέχει σε έναν ισχυρό ενδομοριακό δεσμό

υδρογόνου με το οξυγόνο του CO(4). Ο ενδομοριακός αυτός δεσμός υδρογόνου ελλοιώνει σε σημαντικό βαθμό την ανταλλαγή του πρωτονίου OH(5) με τα μόρια H₂O που υπάρχουν στο διάλυμα με αποτέλεσμα να λαμβάνονται εξαιρετικά λεπτές απορροφήσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες –OH (Σχήμα 2.3.5). Επιπλέον, η εμφάνιση των σημάτων στα 13 ppm περίπου υποδηλώνει την παρουσία φλαβονών στα εκχυλίσματα, δεδομένου ότι το σήμα συντονισμού του πρωτονίου OH(5) είναι περισσότερο αποπροστατευμένο στις φλαβόνες συγκριτικά με το αντίστοιχο σήμα των φλαβονολών που εμφανίζεται στα 12 ppm. Αυτό συμβαίνει διότι η παρουσία της ομάδας OH(3) στις φλαβονόλες προκαλεί μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο άτομο του οξυγόνου της ομάδας του CO(4) με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ισχυρός ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου. Όπως γίνεται αντιληπτό, με τον παραπάνω τρόπο, επιτυγχάνεται η διάκριση των φλαβονών και φλαβονολών [Exarchou *et al.*, 2002a; 2002b].



Σχήμα 2.3.5: Φάσμα NMR-¹H κερκετίνης, 10 mM, σε διαλύτη 0.5 mL DMSO-*d*₆ (T=298K, ns=32, t_{exp}=4m). Ένθετο τυπική απεικόνιση φλαβονοειδών (κερκετίνη) με δεσμό υδρογόνου OH(5)⋯OC(4).

2.3.2 Επίδραση του Διαλύτη και της Συγκέντρωσης

Κατά τη λήψη φασμάτων NMR χρησιμοποιούνται διαλύτες οι οποίοι πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές. Πρέπει να είναι φθηνοί, να διαλύουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων και να περιέχουν κυρίως το δευτεριωμένο ισότοπο. Το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο

(CDCl₃) είναι ένας συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης που πληροί αυτές τις προδιαγραφές. Ένας άλλος χρήσιμος διαλύτης είναι το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆). Βασικό πλεονέκτημα του DMSO-*d*₆ αποτελεί η υψηλή διαλυτική του ικανότητα, αλλά έχει ως μειονέκτημα το υψηλό σημείο πήξεως (~ 18 °C), γεγονός, που το καθιστά δύσχρηστο για πειράματα χαμηλής θερμοκρασίας.

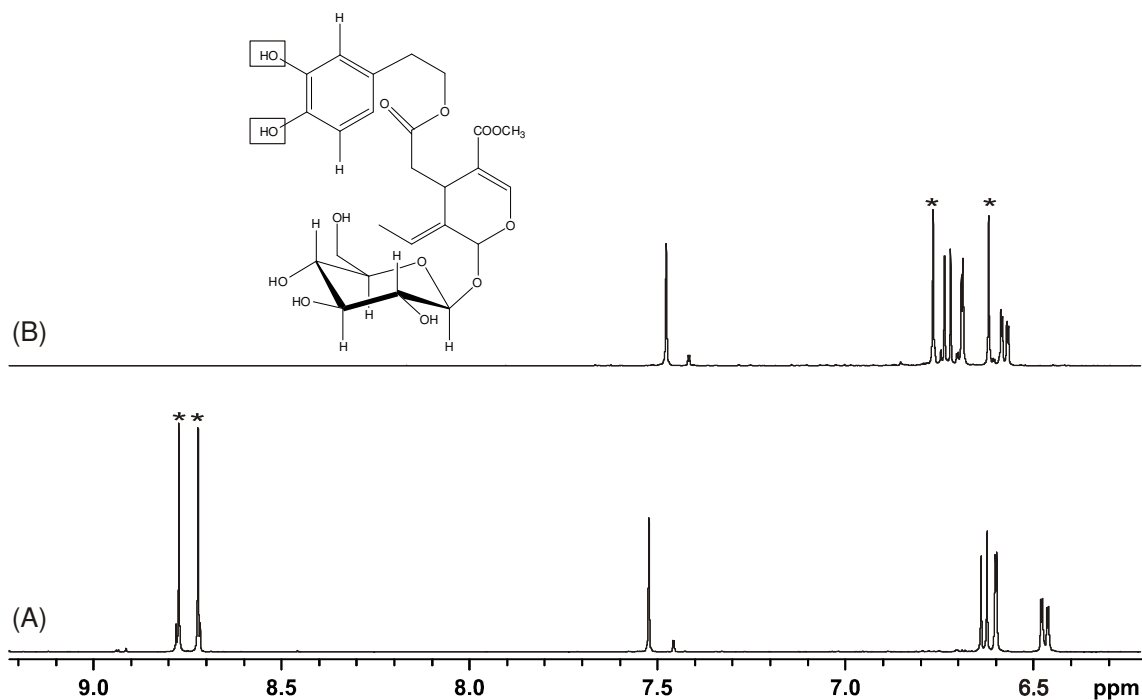
Η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση, εξαρτάται όχι μόνο από τη δομή της ένωσης που μελετάται (αναλύτης), αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης αυτής και των μορίων διαλύτη που την περιβάλλουν. Εάν ο διαλύτης είναι μη πολικός, όπως οι υδρογονάνθρακες, τότε υφίστανται ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικού αναλύτη και διαλύτη (αλληλεπιδράσεις Van der Waals) και ως εκ τούτου ο διαλύτης επηρεάζει ελάχιστα την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση.

Εάν ο διαλύτης που θα επιλεγεί είναι πολικός (πχ ακετόνη, χλωροφόρμιο ή διμεθυλοσουλφοξείδιο) υφίστανται ισχυρές αλληλεπιδράσεις διπόλου - διπόλου μεταξύ αναλύτη και διαλύτη, ιδίως εάν ο αναλύτης περιέχει πολικούς δεσμούς. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικού διαλύτη και πολικού αναλύτη είναι πιθανόν ισχυρότερες από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλύτη και τετραμεθυλοσιλανίου ως ένωσης αναφοράς (TMS, το οποίο είναι μη πολικό). Ως αποτέλεσμα η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση του αναλύτη θα είναι μετατοπισμένη σε σύγκριση με την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση σε μη πολικό διαλύτη.

Εάν ο διαλύτης έχει ισχυρή μαγνητική ανισοτροπία (π.χ. βενζόλιο, πυριδίνη, ακετονιτρίλιο), τότε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και του ανισοτροπικού πεδίου του διαλύτη θα επηρεάσουν ισχυρά τη χημική μετατόπιση. Και σε αυτήν την περίπτωση ο διαλύτης θα αλληλεπιδράσει πιο ισχυρά με τον αναλύτη απ' ό,τι με το TMS. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση του αναλύτη θα είναι μετατοπισμένη σημαντικά ως προς την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση του TMS. Διαλύτες όπως το βενζόλιο και η πυριδίνη προκαλούν μετατόπιση της απορρόφησης ενός πρωτονίου σε μικρότερες τιμές ppm, ενώ άλλοι διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο, προκαλούν μετατόπιση προς την αντίθετη κατεύθυνση. Αυτή η διαφορά φαίνεται να εξαρτάται από τη διευθέτηση στο χώρο των μορίων του διαλύτη. Αρωματικοί διαλύτες όπως βενζόλιο και πυριδίνη, έχουν επίπεδη διευθέτηση, ενώ το ακετονιτρίλιο έχει ραβδοειδή διάταξη. Η διάταξη των μορίων του διαλύτη επηρεάζει την φύση του συμπλόκου αναλύτη - διαλύτη που σχηματίζεται στο διάλυμα.

Η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποσαφηνιστούν πολύπλοκα φάσματα που εμφανίζουν αλληλεπικαλύψεις πολλαπλών κορυφών. Με την προσθήκη μιας μικρής ποσότητας (< 20 %) βενζολίου- d_6 ή πυριδίνης- d_5 σε διάλυμα $CDCl_3$ μιας άγνωστης ένωσης, παρατηρείται σημαντική μεταβολή στο φάσμα. Οι αλλαγές στις σταθερές προάσπισης στο πρωτονιακό φάσμα μπορούν να προκαλέσουν μετατόπιση μέχρι και 1 ppm, με αποτέλεσμα οι αλληλοεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές να διαχωριστούν μεταξύ τους ικανοποιητικά, ώστε να μπορεί να γίνει ανάλυση του φάσματος. Η χρήση αυτής της «τεχνικής του βενζολίου» είναι ένας εύκολος τρόπος απλοποίησης πολύπλοκων φασμάτων.

Το μέγεθος της παρατηρούμενης μετατόπισης λόγω του διαλύτη μπορεί να είναι της τάξης μερικών δέκατων ενός ppm έως αρκετών ppm στην κλίμακα ενός πρωτονιακού φάσματος και εξαρτάται κυρίως από τη λειτουργική ομάδα στην οποία ανήκει το πρωτόνιο. Χαρακτηριστική περίπτωση σημαντικής επίδρασης του διαλύτη είναι η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση των φαινολικών υδροξυλίων της ελαιοευρωπαϊνης. Στο Σχήμα 2.3.6 παρατίθενται τα φάσματα πρωτονίου NMR της ελαιοευρωπαϊνης σε δύο διαφορετικούς διαλύτες, $DMSO-d_6$ και ακετονιτρίλιο- d_3 . Στα φάσματα αυτά παρατηρούμε τη διασπορά των απορροφήσεων των $-OH$ ομάδων από 8.72 και 8.77 ppm στο $DMSO-d_6$, σε 6.63 και 6.78 ppm στο ακετονιτρίλιο- d_3 , αντίστοιχα. Όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη τόσο οι απορροφήσεις των πρωτονίων που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το διαλύτη μετατοπίζονται προς υψηλότερες συχνότητες (μεγαλύτερες τιμές ppm).

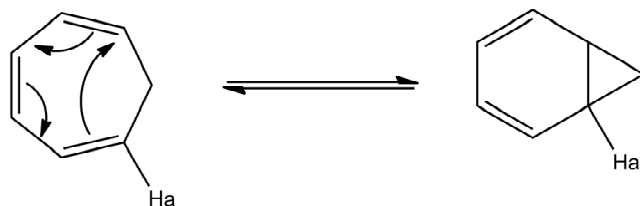


Σχήμα 2.3.6: Φάσματα NMR- ^1H της ελαιοευρωπαϊνης σε διαλύτες (A) $\text{DMSO}-d_6$ και (B) ακετονιτρίλιο- d_3 . Με αστερίσκο υποδηλώνεται η απορρόφηση των ομάδων $-\text{OH}$.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι ποσότητα 1 mg ενός δείγματος σε 0.5 mL διαλύτη θεωρείται υψηλή συγκέντρωση για όργανο μέτρου έως υψηλού μαγνητικού πεδίου. Συνεπώς, με κατάλληλη αραίωση είναι εφικτό να ελαχιστοποιηθούν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.

2.3.3 Επίδραση της Θερμοκρασίας

Γενικά, η θερμοκρασία δεν επηρεάζει αισθητά τη χημική μετατόπιση. Ωστόσο, εάν πραγματοποιούνται δυναμικές διεργασίες, όπως περιστροφή μέσω δεσμών, αναστροφή δακτυλίου και ισομερείωση λόγου σθένους, καθώς και σχάση δεσμών υδρογόνου, τότε η θερμοκρασία μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στη χημική μετατόπιση. Για παράδειγμα, το κυκλοεπτατριένιο (cycloheptatriene) βρίσκεται σε ισορροπία με το ισομερές σθένους 2-κυκλο[4.1.0]επτα-1,3-διένιο (norcaradiene) (Σχήμα 2.3.7).



Σχήμα 2.3.7: Ισορροπία ισομερών σθένους του κυκλοεπτατριένιο - 2-κυκλο[4.1.0]επτα-1,3-διένιο.

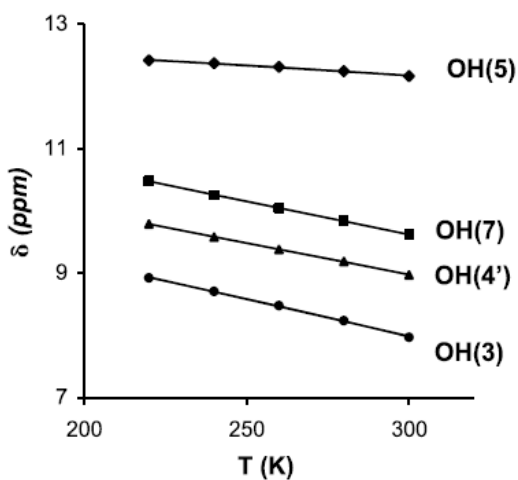
Αυτή η ισορροπία μπορεί να επηρεαστεί μεταβάλλοντας την θερμοκρασία. Για παράδειγμα το πρωτόνιο Ha στο κυκλοεπτατριένιο είναι συνδεδεμένο με άνθρακα που φέρει διπλό δεσμό. Εάν η ισορροπία μετατοπιστεί προς τα δεξιά, δηλ. προς το 2-κυκλο[4.1.0]επτα-1,3-διένιο, το συγκεκριμένο πρωτόνιο θα αλλάξει θέση δεσμού και θα αποτελεί μέρος του κυκλοπροπανικού δακτυλίου. Η χημική μετατόπιση του πρωτονίου αυτού θα αλλάξει και συγκεκριμένα η συχνότητα απορρόφησης θα μετατοπιστεί προς χαμηλότερη συχνότητα. Γενικώς η μεταβολή της θερμοκρασίας θα επηρεάσει την θέση της παραπάνω ισορροπίας, είτε προς τα δεξιά είτε προς τα αριστερά, και άρα τη θέση πρόσδεσης του συγκεκριμένου πρωτονίου. Αυτό εκφράζεται με την παρατηρούμενη διαφορά στη χημική μετατόπιση αυτού του πρωτονίου.

Η επίδραση της θερμοκρασίας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην περίπτωση των απορροφήσεων χαρακτηριστικών ομάδων που σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με μόρια του διαλύτη, όπως των υδροξυλίων των φλαβονοειδών.

Στο Σχήμα 2.3.8 απεικονίζεται η μεταβολή της χημικής μετατόπισης των υδροξυλικών πρωτονίων σε διαλύτη ακετόνη- d_6 ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, στην περίπτωση της κεμπφερόλης [Exarchou *et al.*, 2002b], ενώ οι αντίστοιχες τιμές μεταβολής $\Delta\delta/\Delta T$ παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.2. Είναι φανερό ότι το υδροξύλιο OH(5) επηρεάζεται σε πολύ μικρότερο βαθμό από τη μεταβολή της θερμοκρασίας, γεγονός που επιβεβαιώνει το σχηματισμό του ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο στη θέση 4.

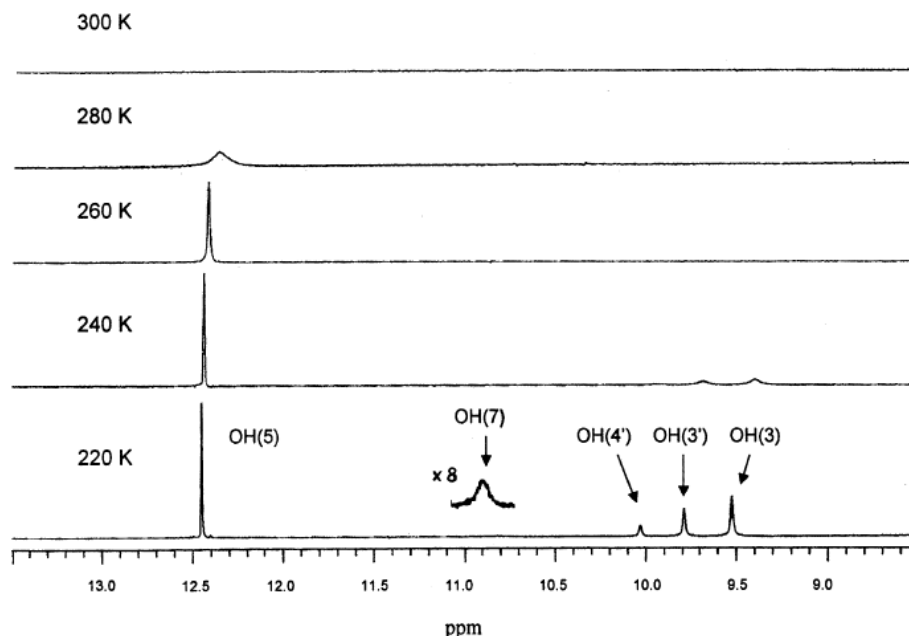
Πίνακας 2.3.2: Τιμές μεταβολής της χημικής μετατόπισης των υδροξυλικών πρωτονίων της κεμπφερόλης σε διαλύτη ακετόνη- d_6 ως συνάρτηση της θερμοκρασίας [Exarchou *et al.*, 2002b].

$\Delta\delta/\Delta T$				
OH(5)	OH(7)	OH(4')	OH(3')	OH(3)
-3.1	-10.7	-10.1	-	-11.8



Σχήμα 2.3.8: Μεταβολή της χημικής μετατόπισης των υδροξυλικών πρωτονίων της κεμπφερόλης σε διαλύτη ακετόνη- d_6 ως συνάρτηση της θερμοκρασίας [Exarchou *et al.*, 2002b].

Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε πειράματα NMR- ^1H μεταβλητής θερμοκρασίας είναι εφικτό, σε χαμηλή θερμοκρασία, να παρατηρηθούν οι απορροφήσεις όλων των ευκίνητων υδροξυλίων ακόμη και σε πρωτικούς διαλύτες (μεθανόλη- d_3) λόγω σημαντικής μείωσης της ταχύτητας ανταλλαγής πρωτονίων όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.3.9.



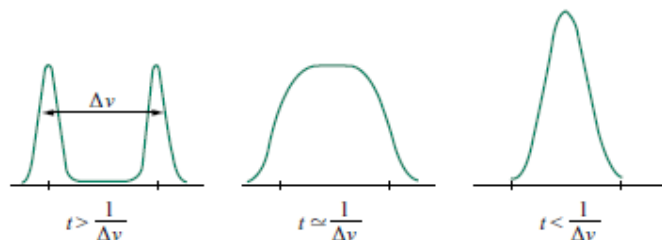
Σχήμα 2.3.9: Φάσματα μεταβλητής θερμοκρασίας πρωτονίου NMR της κερκετίνης σε διαλύτη μεθανόλη- d_3 [Exarchou *et al.*, 2002b].

2.4 Μελέτη Δυναμικών και Θερμοδυναμικών Ισορροπιών με τη Φασματοσκοπία NMR

Η μελέτη χημικών συστημάτων που είναι σε δυναμική ισορροπία, όπως ταυτομερών, διαμορφομερών, ισομερών κλπ., αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR. Ας θεωρήσουμε ένα πρωτόνιο που ανταλλάσσεται μεταξύ δύο καταστάσεων Α και Β με χημικές μετατοπίσεις δ_{HA} και δ_{HB} , αντίστοιχα. Εάν ο χρόνος ζωής, t , του πρωτονίου σε κάθε κατάσταση είναι μεγαλύτερος του αντίστροφου της διαφοράς των δύο συχνοτήτων συντονισμού ν_{HA} και ν_{HB} ($\nu_{HA} > \nu_{HB}$)

$$t > \frac{1}{\nu_{HA} - \nu_{HB}} = \frac{1}{\Delta\nu}$$

τότε παρατηρούνται δύο κορυφές (Σχήμα 2.4.1), οι εντάσεις των οποίων εξαρτώνται από το σημείο ισορροπίας του συστήματος.



Σχήμα 2.4.1: Επίδραση του χρόνου ζωής, t , κατά την ανταλλαγή πρωτονίων στη μεταβολή του φάσματος NMR [Γεροθανάσης, 1998].

Εάν ο χρόνος t είναι μικρότερος του αντίστροφου της διαφοράς των δύο συχνοτήτων συντονισμού

$$t < \frac{1}{\nu_{\text{HA}} - \nu_{\text{HB}}} = \frac{1}{\Delta\nu}$$

τότε παρατηρείται μία απλή κορυφή, η θέση της οποίας καθορίζεται από το σημείο ισορροπίας του χημικού συστήματος.

Εάν ο χρόνος, t , είναι του ίδιου μεγέθους με το αντίστροφο της διαφοράς των δύο συχνοτήτων συντονισμού

$$t \cong \frac{1}{\Delta\nu}$$

τότε παρατηρείται μία ευρεία καμπύλη, από το εύρος $\Delta\nu$ της οποίας είναι δυνατό να βρεθεί ο χρόνος αλληλομετατροπής με βάση την αρχή της απροσδιοριστίας:

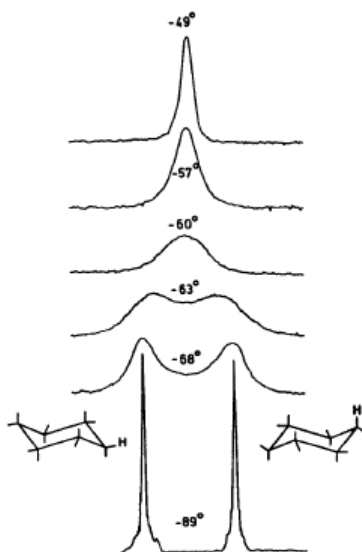
$$\Delta t \cdot \Delta E \cong \frac{h}{2\pi} \quad \text{ή}$$

$$\Delta t = \frac{1}{2\pi\Delta\nu}$$

Στην πράξη η τελευταία προϋπόθεση επιτυγχάνεται με μεταβολή της θερμοκρασίας, T , μέχρις ότου συνενωθούν οι δύο χωριστές κορυφές. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε

συστήματα ισορροπίας με συστατικά των οποίων η διάρκεια ζωής είναι της τάξης 10^{-6} s. Η χρονική αυτή κλίμακα καλύπτει τα περισσότερα μοριακά συστήματα που ενδιαφέρουν την Οργανική Χημεία.

Στο Σχήμα 2.4.2 απεικονίζονται τα φάσματα NMR- ^1H του κυκλοεξανίου- d_{11} ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Υποκατάσταση ενός πρωτονίου από ένα δευτέριο μειώνει, λόγω μικρότερης μαγνητικής ροπής του δευτερίου, τη σταθερή σύζευξη. Συνεπώς, είναι σαν να μην υπάρχουν υδρογόνα σε αυτή τη θέση του μορίου και τα φάσματα είναι πολύ απλούστερα. Καθώς το κυκλοεξάνιο ψύχεται, η απλή οξεία κορυφή που παρατηρείται στη θερμοκρασία του δωματίου διευρύνεται και διασπάται στους $-63\text{ }^\circ\text{C}$ σε δύο κορυφές, οι οποίες στους $-89\text{ }^\circ\text{C}$ είναι ευκρινώς διαχωρισμένες. Η μία κορυφή οφείλεται στο αξονικό πρωτόνιο και η άλλη στο ισημερινό.



Σχήμα 2.4.2: Φάσματα NMR- ^1H του κυκλοεξανίου- d_{11} ως συνάρτηση της θερμοκρασίας [Γεροθανάσης, 1998].

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια σημαντική τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη της μετατροπής ενός μορίου από μία μορφή A σε μία άλλη B, και παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικών θερμοδυναμικών και κινητικών μελετών. Οι μελέτες επικεντρώνονται στην επίδραση του διαλύτη, της θερμοκρασίας και του pH.

Η μετατροπή $A \rightarrow B$ μπορεί να περιγραφεί από τη σταθερά ισορροπίας K_{eq} σύμφωνα με την εξίσωση:

$$K_{eq} = \frac{[B]}{[A]} \quad [2.9]$$

η οποία σχετίζεται άμεσα με την ενέργεια Gibbs, ΔG° , μέσω της εξίσωσης:

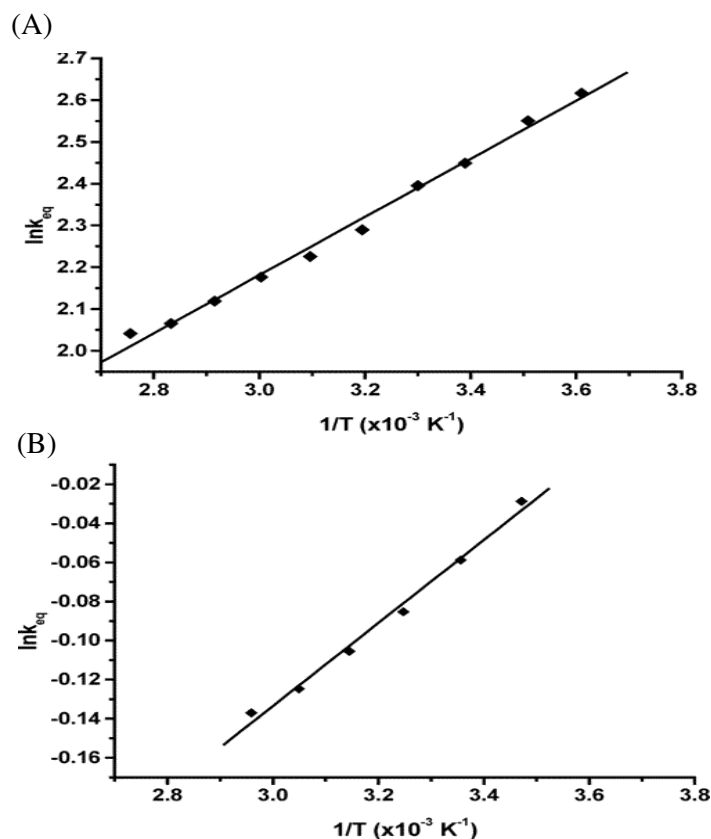
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad [2.10]$$

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι μετατροπής του A προς B μπορούν να εξαχθούν από πειράματα NMR μεταβλητής θερμοκρασίας, υπό την προϋπόθεση ότι οι σχετικές συγκεντρώσεις των δύο μορφών μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια. Όταν η σταθερά ισορροπίας, για τη συγκεκριμένη διεργασία, υπολογιστεί για μια σειρά θερμοκρασιών, τότε σύμφωνα με την εξίσωση Van't Hoff ,

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad [2.11]$$

με καταχώρηση των τιμών $\ln K_{eq}$ έναντι των τιμών $1/T$, σε σύστημα ορθογωνίων αξόνων, προκύπτουν οι τιμές μεταβολής της ενθαλπίας ΔH° και της εντροπίας ΔS° .

Ως εφαρμογή αναφέρονται οι μελέτες *cis-trans* ισομερισμού αμιδίων και πεπτιδίων όπως στην περίπτωση *cis-trans* ισομερισμού των *N*-μεθυλοφορμαμιδίου (NMF) και *N*-tert-βουτυλοφορμαμιδίου (TBF) (Σχήμα 2.4.3) από τις οποίες προέκυψαν οι θερμοδυναμικές παράμετροι ΔH° και ΔS° του Πίνακα 2.4.1 [Troganis *et al.*, 2005].



Σχήμα 2.4.3 Δεδομένα ολοκλήρωσης (A) των πρωτονίων $-\text{CH}_3$ του *N*-μεθυλοφορμαμιδίου (NMF) και (B) των πρωτονίων $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ του *N*-tert-βουτυλοφορμαμιδίου (TBF), όπως αυτά προέκυψαν από τα φάσματα $\text{NMR}-^1\text{H}$, κατά τη μελέτη της ισορροπίας *cis-trans* των αμιδίων σε διαλύτη 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$, συγκέντρωσης 20 mM [Troganis *et al.*, 2005].

Πίνακας 2.4.1: Θερμοδυναμικές παράμετροι *cis-trans* ισομερισμού *N*-μεθυλοφορμαμιδίου (NMF) και *N*-tert-βουτυλοφορμαμιδίου (TBF) [Troganis *et al.*, 2005].

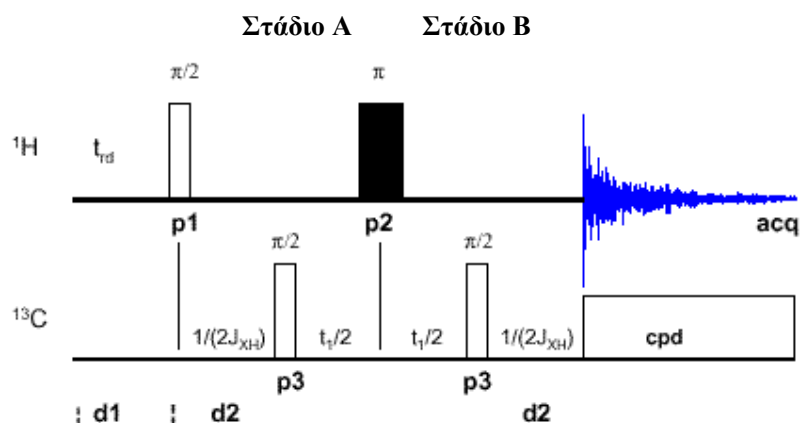
πεπτίδιο	διαλύτης	ΔH° (kJ/mol^{-1})	ΔS° ($\text{JK}^{-1}/\text{mol}^{-1}$)	$T\Delta S^\circ$ (kJ/mol^{-1})	ΔG (kJ/mol^{-1})
NMF	90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$	-5.79 ± 0.18	0.77 ± 0.57	-0.23 ± 0.17	-6.02 ± 0.18
TBF	90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$	-1.72 ± 0.06	-6.28 ± 0.20	-1.87 ± 0.06	0.15 ± 0.06
NMF	CDCl_3	-3.71 ± 0.17	3.42 ± 0.65	-1.02 ± 0.19	-4.73 ± 0.19
TBF	CDCl_3	1.60 ± 0.09	5.75 ± 0.33	-1.71 ± 0.10	-0.11 ± 0.10

2.5 Φασματοσκοπία NMR Δύο Διαστάσεων

2.5.1 Τεχνική Ετεροπυρηνικής Φασματοσκοπίας Συσχέτισης Πολλαπλού Κβάντου ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC ^1H - ^{13}C).

Με τη χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών μαγνητικών πυρήνων (πχ. ^1H - ^{13}C). Το μειονέκτημα της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας ^1H - ^{13}C είναι η πολύ μικρή περιεκτικότητα του άνθρακα-13 στο φυσικό στοιχείο (~ 1.11 %) και η μικρή τιμή του γυρομαγνητικού του λόγου, που έχουν ως συνέπεια τη μειωμένη ευαισθησία του (σχετική ευαισθησία ως προς το $^1\text{H} \approx 1/400$) [Breitmaier & Voelter, 1990]. Αύξηση της ευαισθησίας του πυρήνα ^{13}C επιτυγχάνεται, όταν η παρατήρηση της συμπεριφοράς του γίνεται διαμέσου της επίδρασης που ασκεί στον, μεγαλύτερης ευαισθησίας, πυρήνα του πρωτονίου. Με τον τρόπο αυτό ο πυρήνας του πρωτονίου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταγραφή του σήματος [Griesinger *et al.*, 1996; Günther, 1995; Sanders & Hunder, 1993]. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται τόσο στην τεχνική HMQC όσο και στην τεχνική HMBC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Coherence ^1H - ^{13}C), όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

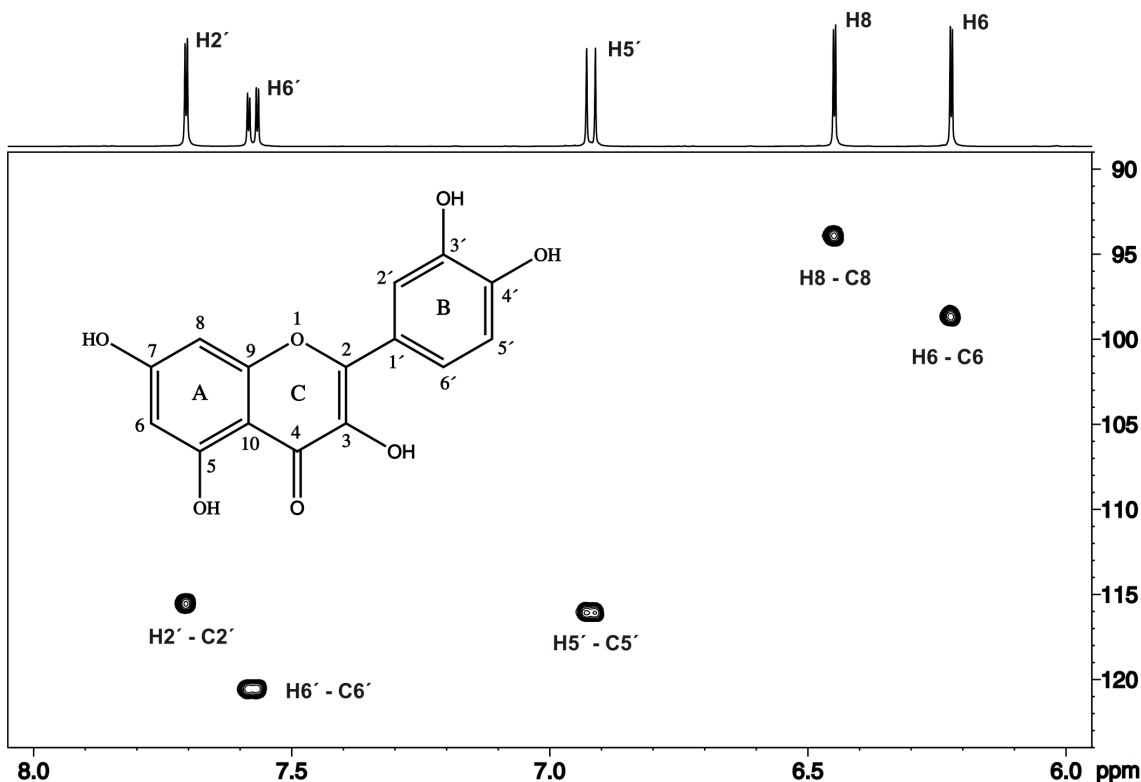
Η φασματοσκοπία HMQC ^1H - ^{13}C συσχετίζει πυρήνες άνθρακα-13 που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με πυρήνες πρωτονίου ($^1J_{\text{HC}}$). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC ^1H - ^{13}C (Σχήμα 2.5.1) μπορεί, περιγραφικά, να διακριθεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (A) επιτυγχάνεται η μεταφορά μαγνήτισης από τον πυρήνα του πρωτονίου στον πυρήνα του άνθρακα-13, μέσω της εφαρμογής παλμών 90° και στους δύο πυρήνες. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται και η καταστολή των σημάτων συντονισμού των πυρήνων πρωτονίου που δε συζεύγνυνται με πυρήνες άνθρακα-13. Στο δεύτερο στάδιο (B) η μαγνήτιση μεταφέρεται από τον ^{13}C στον πυρήνα ^1H και ανιχνεύεται. Η παλμική ακολουθία έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δισδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες ^1H - ^{13}C που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης $^1J_{\text{HC}}$ [Günther, 1995].



Σχήμα 2.5.1: Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC ^1H - ^{13}C [Bax & Subramanian, 1986].

Τροποποίηση των παλμικών ακολουθιών των δύο τελευταίων τεχνικών που αναφέρθηκαν οδηγούν σε διάφορους τύπους πειραμάτων ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Έτσι, εναλλακτικά της τεχνικής HMQC ^1H - ^{13}C μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης απλού κβάντου ^1H - ^{13}C , (Heteronuclear Single Quantum Coherence, HSQC ^1H - ^{13}C), στην οποία εμφανίζονται τελικά μόνο οι μεταπτώσεις απλού κβάντου. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται συνήθως σε συνδυασμό με την τεχνική βαθμίδωσης πεδίου (Gradient-enhanced Heteronuclear Single Quantum Coherence, ^1H - ^{13}C , GE-HSQC ^1H - ^{13}C) με αποτέλεσμα την εμφάνιση διασταυρούμενων κορυφών που οφείλονται σε ασθενείς συζεύξεις [Parella & Belloc, 2001; Marek *et al.*, 1997].

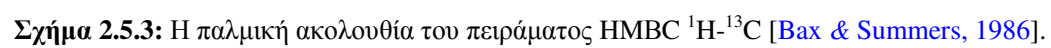
Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας, δηλαδή η εμφάνιση της άμεσης αλληλεπίδρασης των πυρήνων ^1H και ^{13}C μέσω σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$ απεικονίζονται στο Σχήμα 2.5.2.

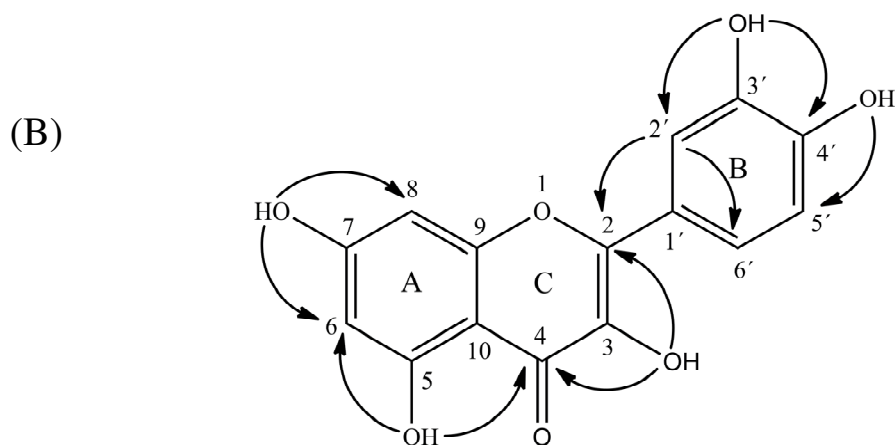
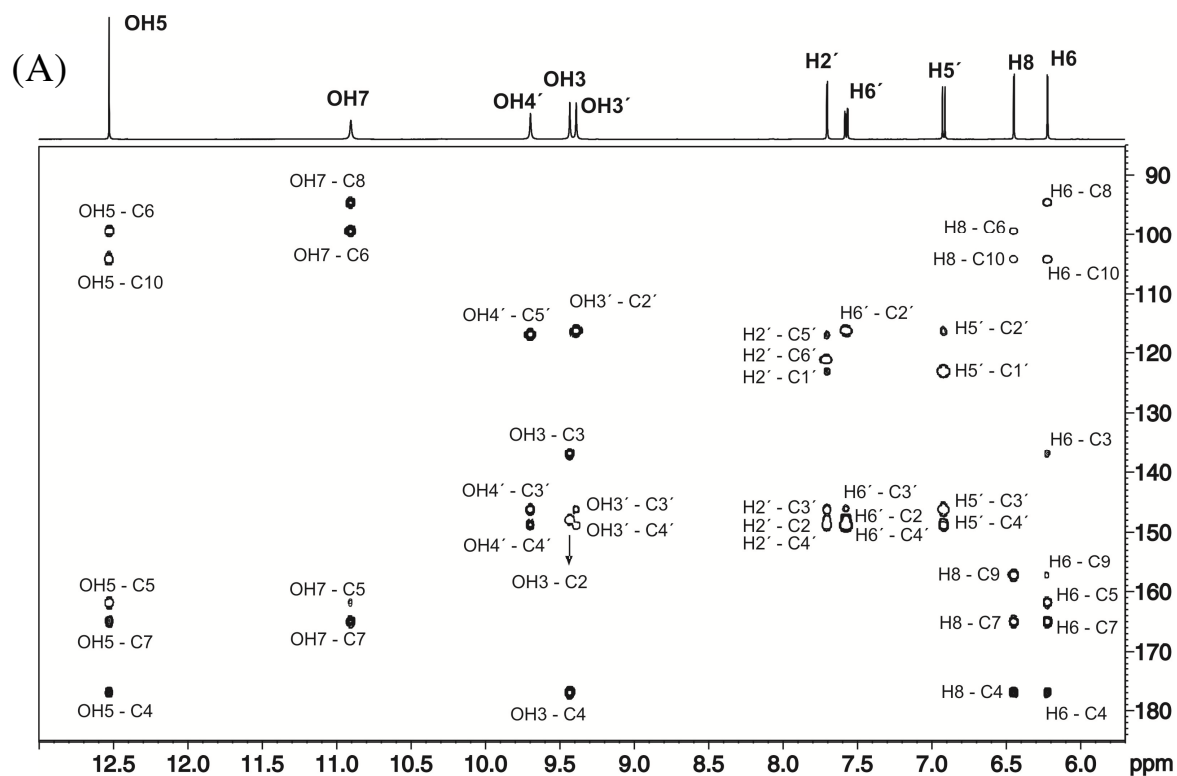


Σχήμα 2.5.2: Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HSQC ^1H - ^{13}C της κερκετίνης σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ όπου οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στη σύζευξη $^1J_{\text{HC}}$ μεταξύ των πυρήνων ($\text{H2}' - \text{C2}'$), ($\text{H6}' - \text{C6}'$), ($\text{H5}' - \text{C5}'$), ($\text{H6} - \text{C6}$) και ($\text{H8} - \text{C8}$).

2.5.2 Τεχνική Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Coherence HMBC ^1H - ^{13}C).

Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία HMQC ^1H - ^{13}C , η τεχνική HMBC ^1H - ^{13}C παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων άνθρακα-13 που συζεύγγονται με πυρήνες πρωτονίου οι οποίοι απέχουν πλέον του ενός δεσμού, συνήθως δύο έως τέσσερις δεσμούς ($^{2-4}J_{\text{CH}}$). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC ^1H - ^{13}C (Σχήμα 2.5.3) περιλαμβάνει αρχικά ένα παλμό 90° με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες συζεύξεις $^1J_{\text{CH}}$, έτσι ώστε οι διασταυρούμενες κορυφές, που τελικά θα προκύπτουν, να αντιστοιχούν σε συζεύξεις $^nJ_{\text{CH}}$ (όπου $n > 1$). Ο δεύτερος παλμός 90° ^{13}C δημιουργεί μεταπτώσεις μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται με την επίδραση του παλμού ^1H 180° που ακολουθεί. Τέλος με την εφαρμογή του παλμού ^{13}C 90° και την καταγραφή του φάσματος, προκύπτει ο δισδιάστατος χάρτης της τεχνικής HMBC ^1H - ^{13}C (Σχήμα 2.5.4) [Rahman & Choudhary, 1996].





Σχήμα 2.5.4: (A) Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HMBC ^1H - ^{13}C της κερκετίνης σε διαλύτη DMSO- d_6 , όπου οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στις συζεύξεις $^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ και $^4J_{\text{HC}}$, και (B) Ενδεικτικές συσχετίσεις $^nJ_{\text{HC}}$ της κερκετίνης.

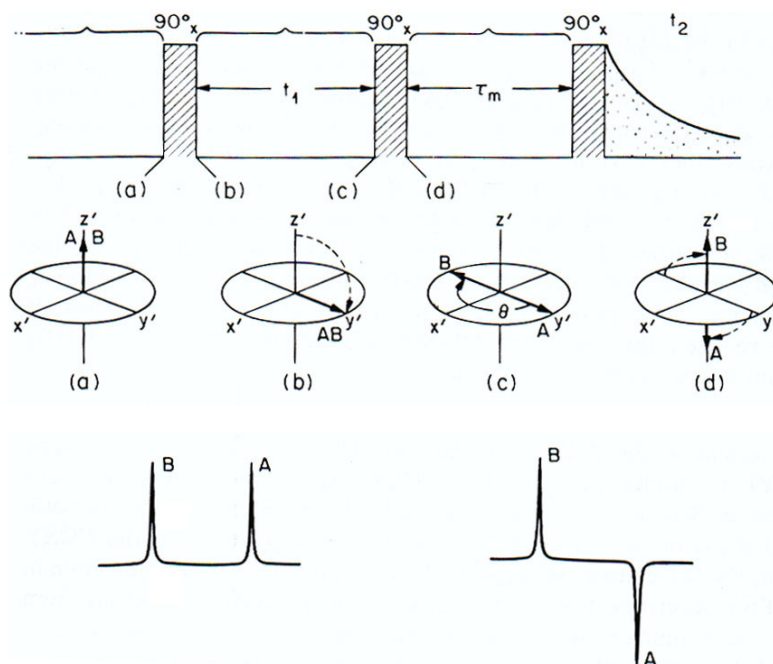
2.5.3 Τεχνική της Ομοπυρηνικής Φασματοσκοπίας Συσχέτισης μέσω του Φαινομένου NOE ^1H - ^1H (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy, ^1H - ^1H NOESY)

Στο δισδιάστατο πείραμα NOESY ^1H - ^1H οι διασταυρούμενες κορυφές οφείλονται στην ανταλλαγή μαγνήτισης λόγω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μέσω του χώρου. Πρόκειται για σημαντική τεχνική, γιατί με τη χρήση της είναι δυνατή η συλλογή πληροφοριών σχετικά με τις αποστάσεις των πυρήνων στο χώρο. Στο Σχήμα 2.5.5 απεικονίζεται η παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY ^1H - ^1H καθώς και το διανυσματικό διάγραμμα απεικόνισης της συμπεριφοράς ενός συστήματος δύο πυρήνων A και B με διαφορετική συχνότητα συντονισμού, που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου και δε συζεύγγονται μεταξύ τους μέσω δεσμών. Ο πρώτος παλμός 90° εφαρμόζεται μετά την περίοδο προετοιμασίας και μετατρέπει την μαγνήτιση M των δύο spin A και B σε παρατηρούμενη μαγνήτιση (μεταφορά στον άξονα y) (Σχήμα 2.5.5b). Κατά τη διάρκεια του χρόνου t_1 τα ανύσματα της μαγνήτισης των δύο πυρήνων εξελίσσονται (Σχήμα 2.5.5c). Ακολουθεί παλμός 90° ο οποίος μεταφέρει τη μαγνήτιση στον άξονα z (Σχήμα 2.5.5d). Κατά τη διάρκεια του χρόνου μίξης, τ_m , λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων A και B που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου (dipolar coupled). Μετά το χρόνο τ_m , ακολουθεί η εφαρμογή ενός τρίτου παλμού 90° (παλμός ανίχνευσης) ο οποίος μεταφέρει τη μαγνήτιση των πυρήνων στο επίπεδο xy, προκειμένου να καταγραφεί. Έτσι, η ένταση του σήματος A που ανιχνεύεται οφείλεται όχι μόνον στη χαρακτηριστική του συχνότητα αλλά επηρεάζεται και από τη συχνότητα του σήματος B με αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφής εκτός διαγωνίου [Bovey, 1998; Braun *et al.*, 1998].

Αποτέλεσμα της παραπάνω παλμικής ακολουθίας είναι η καταγραφή τεσσάρων διαφορετικών σημάτων κατά τη διάρκεια του χρόνου t_2 , στο σύστημα δύο πυρήνων A και B:

- (1) Σήμα που οφείλεται στη συχνότητα περιστροφής του πυρήνα A, στο οποίο δεν έχει συμβεί ανταλλαγή μαγνήτισης με τον πυρήνα B.
- (2) Σήμα οφειλόμενο στον πυρήνα A, στο οποίο έχει συμβεί ανταλλαγή μαγνήτισης με τον πυρήνα B.
- (3) Σήμα που οφείλεται στη συχνότητα περιστροφής του πυρήνα B, στο οποίο δεν έχει συμβεί ανταλλαγή μαγνήτισης με τον πυρήνα A.
- (4) Σήμα οφειλόμενο στον πυρήνα B, που ανταλλάσσει μαγνήτιση με τον πυρήνα A.

Τα (1) και (3) αντιστοιχούν σε σήματα που εμφανίζονται πάνω στη διαγώνιο σε αντίθεση με τα σήματα τύπου (2) και (4) που εμφανίζονται ως διασταυρούμενες κορυφές εκτός διαγωνίου [Bovey, 1998].



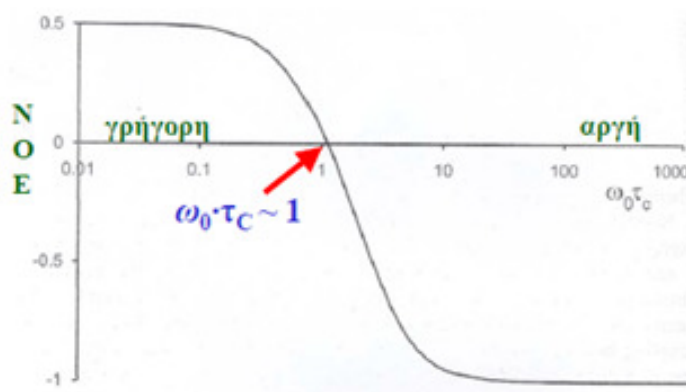
Σχήμα 2.5.5.: Η παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY ^1H - ^1H και η συμπεριφορά των ανυσμάτων μαγνήτισης των δύο spin A και B [Bovey 1998].

Η ένταση των σημάτων εξαρτάται από το ποσοστό ανταλλαγής μαγνήτισης των πυρήνων A και B και τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης των spin (τ_m). Όταν ο χρόνος ανάμιξης είναι περίπου ίσος με το μικρότερο χρόνο αποδιέγερσης (T_1) των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων, τότε παρατηρείται η μέγιστη ένταση των διασταυρούμενων κορυφών [Bovey, 1998].

Η φασματοσκοπία NOESY ^1H - ^1H βρίσκει σημαντική εφαρμογή στη μελέτη δομικών χαρακτηριστικών βιολογικών μακρομορίων όπως πεπτιδίων, πρωτεϊνών [Johnson *et al.*, 2010], DNA και RNA [Tzakos *et al.*, 2004]. Με τη χρήση της μελετώνται πυρήνες που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 5 Å και είναι δυνατός ο υπολογισμός των αποστάσεων των πυρήνων στο χώρο με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων [Wüthrich, 1989].

Το μειονέκτημα της τεχνικής είναι η αδυναμία της χρήσης της σε μόρια μικρού μοριακού βάρους στην περιοχή συνήθως 500 - 1500 Dalton. Αυτό οφείλεται στην εξάρτηση του φαινομένου NOE από το γινόμενο $\omega_0\tau_c$, όπου, ω_0 είναι η συχνότητα περιστροφής Larmor του πυρήνα και τ_c ο χρόνος συσχέτισης των πυρήνων που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου (δηλαδή ο χρόνος κατά τον οποίο μεταβάλλεται ο προσανατολισμός τους). Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις εφαρμόζεται η τεχνική ROESY (Rotating frame Overhauser Enhancement

Spectroscopy) ή CAMELSPIN (Cross relaxation Appropriate for Minimolecules Emulated by Locked SPINs) η οποία συμπληρώνει το «κενό» της τεχνικής NOESY ^1H - ^1H [Bax & Grzesiek, 1996].



Σχήμα 2.5.6: Εξάρτηση του φαινομένου NOE από το γινόμενο $\omega_0\tau_c$.

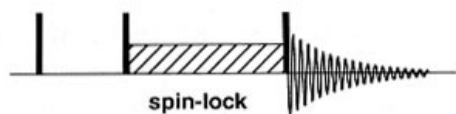
Στο Σχήμα 2.5.6 απεικονίζεται η μεταβολή της έντασης του φαινομένου NOE ενός συστήματος δύο πυρήνων ως συνάρτηση του γινομένου $\omega_0\tau_c$.

Διακρίνονται τρεις περιοχές:

1. Γρήγορη ταχύτητα περιστροφής ($\omega_0\tau_c \ll 1$), $\text{NOE}(\text{max}) = 0.5$
2. Πολύ αργή ταχύτητα περιστροφής ($\omega_0\tau_c > 1$), $\text{NOE} = -1$
3. Ενδιάμεση ταχύτητα περιστροφής ($\omega_0\tau_c \sim 1$), το NOE αλλάζει πρόσημο, ενώ σε κάποιο σημείο γίνεται ίσο με μηδέν.

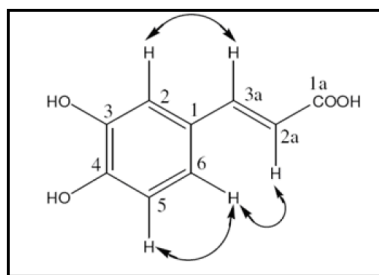
Η ενδιάμεση περιοχή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το μέγεθος του μορίου, το ιξώδες του διαλύματος, τη θερμοκρασία, την ένταση του πεδίου B_0 (τη συχνότητα ω_0) και, μερικές φορές, από το pH του διαλύματος.

Στο Σχήμα 2.5.7 παρουσιάζεται η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται κατά τη λήψη του φάσματος ROESY ^1H - ^1H .



Σχήμα 2.5.7: Η παλμική ακολουθία του πειράματος ROESY ^1H - ^1H [Neuhaus & Williamson, 2000].

Κατά την περίοδο ανάμιξης των spin, εφαρμόζεται παλμός «κλειδώματος» του πεδίου με τη βοήθεια του οποίου οι υπό αλληλεπίδραση πυρήνες αντιλαμβάνονται την ύπαρξη μόνο του πεδίου B_1 ως αποτελεσματικού πεδίου και περιστρέφονται συγχρόνως στο επίπεδο xy . Όταν τα ανύσματα της μαγνήτισης των δύο πυρήνων περιστραφούν με την ίδια συχνότητα, λαμβάνει χώρα ανταλλαγή της μαγνήτισης.



Σχήμα 2.5.8: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων NOE (επιδεικνύονται με τα βέλη) των πρωτονίων του καφεϊκού οξέος.

3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

3.1 Υγρή Χρωματογραφία

Τα τελευταία είκοσι χρόνια η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί βασική αναλυτική τεχνική στο διαχωρισμό και χαρακτηρισμό συστατικών φυτικών εκχυλισμάτων. Οι υγροχρωματογραφικές τεχνικές επιτρέπουν τον επιτυχή διαχωρισμό όλων των συστατικών ταυτόχρονα, ακόμη κι αν συνυπάρχουν πιθανά παράγωγα ή προϊόντα αποικοδόμησης. Σε αρκετές περιπτώσεις, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των αναλυόμενων ουσιών που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση παρουσία παρεμποδιστικών ενώσεων ή ενώσεων που συνεκλούνται. Η χρήση της HPLC για τη μελέτη φαινολικών συστατικών σε φυτικά εκχυλίσματα ή βιολογικά δείγματα συγκεντρώνει πλήθος πλεονεκτημάτων και ιδιαίτερα αυξημένο ενδιαφέρον εξαιτίας: (1) του διαφορετικού τύπου στηλών που είναι εμπορικά διαθέσιμες, (2) της δυνατότητας σύζευξης δυο στηλών και (3) της δυνατότητας σύζευξης με διάφορους ανιχνευτές όπως συστοιχίας διόδων λυχνιών DAD, φασματογράφο μάζας MS και φασματογράφο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR [Stalikas, 2007].

3.2 Υγρή Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματόμετρο Μάζας

Στην ανάλυση φυσικών προϊόντων η φασματομετρία μαζών (MS) αποτελεί βασικό εργαλείο των ερευνητών και τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά σε σύζευξη με την υγρή χρωματογραφία. Για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με LC-MS χρησιμοποιούνται κυρίως φασματογράφοι μαζών τύπου: α) χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) και β) ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI). Για τον ιονισμό της ένωσης χρησιμοποιείται τόσο αρνητική όσο και θετική τάση [Boue *et al.*, 2003; Justesen, 2001]. Τελευταία έχουν αναφερθεί και άλλοι τρόποι ιονισμού των φαινολικών ενώσεων όπως ο ιονισμός μέσω βομβαρδισμού με ταχεία άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB) [Ma *et al.*, 2000] και ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) [Wang & Sporns, 2000a; 2000b; 1999]. Στη μελέτη φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται κυρίως φασματογράφοι ηλεκτροψεκασμού (ESI) διότι ο ηλεκτρονικός ιοντισμός (EI)

επιτρέπει την ανάλυση πτητικών, θερμικά σταθερών μικρού μοριακού βάρους ενώσεων. Με την τεχνική ESI είναι εφικτή η ανάλυση μαζών σχεδόν οποιουδήποτε ιόντος σε διάλυμα, συμπεριλαμβανομένων ανόργανων αλάτων βιολογικών μακρομορίων, όπως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η ηπιότητα της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού που επεκτείνει τα όρια της πολικότητας των αναλυόμενων ενώσεων πολύ περισσότερο από ότι οι προγενέστερες τεχνικές MS. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής ESI-MS σε σχέση με άλλες τεχνικές ιονισμού, όπως FAB και MALDI, είναι η συμβατότητά της με την υγρή χρωματογραφία. Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη φασματομετρία μαζών ιονισμού ηλεκτροψεκασμού αποτελεί τον συνδυασμό συστήματος υψηλού διαχωρισμού με μία ιδιαίτερα ευαίσθητη φασματοσκοπική τεχνική. Ο μηχανισμός διαχωρισμού, που βασίζεται στην υδροφοβικότητα των ενώσεων, η υψηλή διαχωριστική ικανότητα για μια πληθώρα χημικών ενώσεων και η χρήση πτητικών πρόσθετων στην κινητή φάση που υποστηρίζει τη δημιουργία ιόντων σε διάλυμα, καθιστούν ευκολότερη τη συμβατότητα της HPLC με φασματογράφους ESI-MS.

3.3 Υγρή Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματογράφο NMR

Αναμφισβήτητα, τα τελευταία χρόνια κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος η μελέτη νέων βιοδραστικών ενώσεων στο φυτικό βασίλειο. Στην προσπάθεια αναζήτησης νέων ενώσεων με βιολογικές δράσεις, τα φυτικά εκχυλίσματα υποβάλλονται σε διαδικασίες κλασμάτωσης και απομόνωσης καθαρών ενώσεων για τη διευκρίνιση των δομών τους [Shahildi, 1997; Colquhoun & Goodfellow, 1994]. Τα φυτικά εκχυλίσματα, συχνά, περιέχουν μεγάλο αριθμό ενώσεων που παρουσιάζουν χημική συνάφεια. Οι δομές των συστατικών των εκχυλισμάτων και οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία με αποτέλεσμα η απομόνωση και ταυτοποίησή τους να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες διαδικασίες και με αυξημένο κόστος. Έτσι τις τελευταίες δύο δεκαετίες πραγματοποιήθηκε η σύζευξη διαχωριστικών τεχνικών με φασματοσκοπικές μεθόδους ώστε να είναι δυνατή η αναζήτηση νέων ενώσεων στο φυτικό εκχύλισμα χωρίς να προηγηθεί η οποιαδήποτε διαδικασία απομόνωσης.

Όπως αναλύθηκε προηγουμένως, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στη διερεύνηση της δομής πολύπλοκων οργανικών ενώσεων, αλλά, σε αρκετές περιπτώσεις, η περιορισμένη ευαισθησία

της μεθόδου είναι ανυπέρβλητο εμπόδιο. Η αποσαφήνιση της δομής των ενώσεων πραγματοποιείται με βάση τις χημικές μετατοπίσεις, τις σταθερές σύζευξης, τους λόγους των ολοκληρωμάτων των σημάτων συντονισμού αλλά και με τη βοήθεια των πειραμάτων δυο διαστάσεων όταν η συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης το επιτρέπει. Η ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό υποδεικνύει την παρουσία ή μη ορισμένων κατηγοριών ενώσεων, αλλά αδυνατεί να παρέχει σαφείς δομικές πληροφορίες για κάθε ένα από τα επιμέρους συστατικά. Έτσι η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματοσκοπία NMR είναι απαραίτητη. Η σύζευξη LC-NMR επιτεύχθηκε σχεδόν πριν τριάντα χρόνια [Albert *et al.*, 1989; Bayer *et al.*, 1984; Haw *et al.*, 1980; Watanabe *et al.*, 1978]. Όμως την τελευταία δεκαετία, οι τεχνικές LC-NMR και LC-NMR/MS αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για αναλύσεις ρουτίνας σε πολλά εργαστήρια διεθνώς, κυρίως, εξαιτίας της ανάπτυξης της τεχνολογίας. Προς αυτήν την κατεύθυνση βοήθησαν: (1) η δυνατότητα κατασκευής ισχυρότερων μαγνητικών πεδίων, (2) η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση υποδοχέων συνεχούς ροής, (3) η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την καταστολή των σημάτων συντονισμού των διαλυτών και (4) τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την εξέλιξη των χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών [Neuhaus *et al.*, 1996; Smallcombe *et al.*, 1995; Spraul *et al.*, 1993].

3.3.1 LC-NMR με Κρυογενική (cryogenic) Τεχνολογία

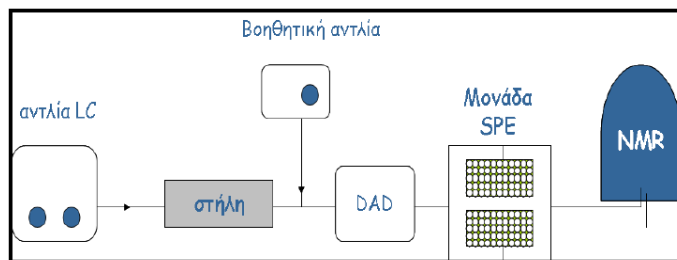
Η εφαρμογή της κρυογενικής τεχνολογίας στο σύστημα LC-NMR είναι μία από τις σημαντικότερες τεχνολογικές αναβαθμίσεις που εφαρμόστηκαν για την αύξηση της ευαισθησίας της φασματοσκοπίας NMR. Η ψύξη του πηνίου ραδιοσυχνότητας αλλά και των ηλεκτρονικών του προ-ενισχυτή σε θερμοκρασίες υγρού ηλίου, ενώ το δείγμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, εξαλείφει σε σημαντικό βαθμό τον θερμοηλεκτρονικό θόρυβο που σχετίζεται με τα αρχικά στάδια καταγραφής του σήματος και αυξάνει τον παράγοντα ποιότητας του πηνίου [Black *et al.*, 1993; Styles *et al.*, 1984; 1989]. Η χρήση της παραπάνω τεχνολογίας οδηγεί σε αύξηση του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N) κατά ένα παράγοντα 3 - 4 και συνεπώς ελαττώνει το χρόνο λήψεως του φάσματος κατά ένα παράγοντα 9 - 16 [Exarchou *et al.*, 2005; Flynn *et al.*, 2000]. Η πρώτη εφαρμογή κρυογενικού υποδοχέα με κυψελίδα ροής για LC-NMR αναφέρθηκε το 2003, και δείχνει τη δυνατότητα συνδυασμού της κρυογενικής τεχνολογίας και της χρήσης σε συνθήκες ροής [Spraul *et al.*, 2003]. Η περαιτέρω χρήση της κρυογενικής τεχνολογίας στο σύστημα LC-SPE-NMR/MS επέτρεψε για

πρώτη φορά την απευθείας παρατήρηση του φάσματος ^{13}C φυσικών προϊόντων με LC-NMR [Exarchou *et al.*, 2003]. Η ευαισθησία που επιτεύχθηκε ήταν αποτέλεσμα της συνδυασμένης χρήσης της κρυογενικής τεχνολογίας σε συνθήκες ροής, της εισαγωγής μονάδας εκχύλισης στερεάς φάσης στο σύστημα LC-NMR και της διαδικασίας της πολλαπλής παγίδευσης, που θα αναλυθούν στη συνέχεια.

3.3.2 LC-SPE-NMR

Ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα της τεχνικής LC-NMR είναι το υψηλό κόστος της ανάλυσης λόγω της χρήσης δευτεριωμένων διαλυτών κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκε η εισαγωγή μονάδας Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) στο σύστημα LC-NMR. Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια ταχεία και επαναλήψιμη τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως για την προκατεργασία του δείγματος [Thurman *et al.*, 1998]. Ταυτόχρονα, αποτελεί και έναν απλό τρόπο αύξησης της ευαισθησίας της τεχνικής LC-NMR καθώς η μονάδα SPE επιτρέπει την προσυγκέντρωση των συστατικών και την αύξηση της διαθέσιμης προς ανάλυση συγκέντρωσης. Υπάρχει ένας σχετικά μεγάλος αριθμός μελετών για την απευθείας αυτοματοποιημένη σύζευξη σε σειρά της μονάδας SPE με σύστημα LC-UV [Mattina *et al.*, 1994; Slobodnik *et al.*, 1993], αποσκοπώντας στην αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος πριν τον υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό. Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί η χρήση μιας προστατευτικής στήλης στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης για την συμπύκνωση των εκλούμενων συστατικών πριν την ανάλυση με NMR [Griffiths & Horton, 1998]. Τέλος, έχει περιγραφεί και η πολλαπλή παγίδευση των εκλούμενων συστατικών με χρήση μικροστηλών SPE ώστε να επιτευχθεί αύξηση της ευαισθησίας του LC-NMR [Nyberg *et al.*, 2001].

Σε ένα σύστημα LC-SPE-NMR, τα διαχωριζόμενα συστατικά που εκλούνται από τη στήλη παγιδεύονται αυτόματα σε μη πολικές μικροστήλες SPE. Για το σκοπό αυτό, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.3.1, προστίθεται στα συστατικά που εκλούνται από τη στήλη νερό μέσω μιας επιπλέον ισοκρατικής αντλίας, ώστε να μεταβληθεί η εκλουστική δύναμη και να επιτευχθεί η παγίδευση των συστατικών στις μικροστήλες. Ακολουθεί ξήρανση των μικροστηλών με αέριο άζωτο για να απομακρυνθούν οι πρωτονιωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Τέλος, τα συστατικά που παγιδεύονται ανακτώνται με τη βοήθεια δευτεριωμένου διαλύτη της επιλογής των ερευνητών (συνήθως δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο και σπανιότερα μεθανόλη ή χλωροφόρμιο) και μεταφέρονται στον υποδοχέα NMR για τη λήψη φασμάτων.



Σχήμα 3.3.1: Τυπική οργανολογική διάταξη LC-SPE-NMR.

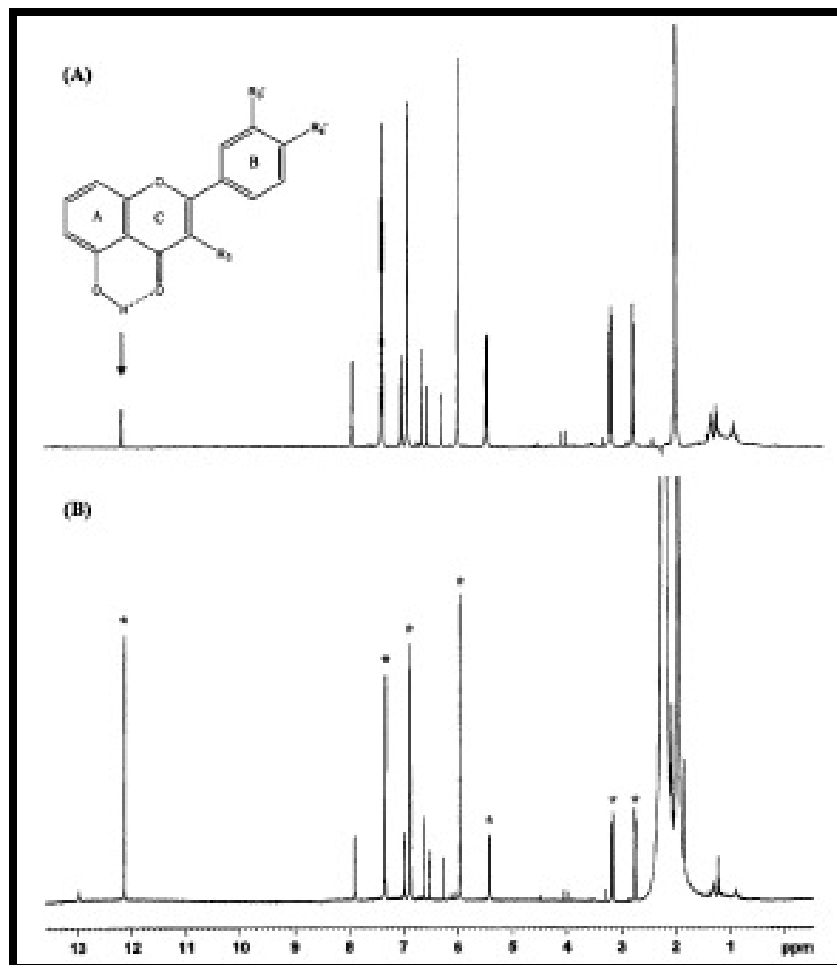


Σχήμα 3.3.2: Σύστημα LC-SPE-NMR, Κέντρο NMR Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η συζευγμένη τεχνική LC-SPE-NMR επιτρέπει τη χρήση συμβατικών διαλυτών υγρής χρωματογραφίας για το χρωματογραφικό μέρος της ανάλυσης, ενώ η μετέπειτα έκλουση των αναλυτών από τη μονάδα SPE με δευτεριωμένους διαλύτες κάνει λιγότερο επιτακτική την ανάγκη για καταστολή του σήματος του διαλύτη [Yang, 2006] κατά τη λήψη του φάσματος NMR. Η επέκταση της τεχνικής με τη χρήση φασματογράφου μάζας σε LC-SPE-NMR/MS προσφέρει τη δυνατότητα πλήρους ταυτοποίησης των συστατικών ενός πολύπλοκου μίγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δυνατότητα της πολλαπλής παγίδευσης του ίδιου συστατικού στην ίδια μικροστήλη με συνεχόμενες ενέσεις στο χρωματογραφικό σύστημα μπορεί να λύσει και το πρόβλημα της χαμηλής συγκέντρωσης ορισμένων συστατικών του μίγματος [Miliauskas *et al.*, 2006]. Για την επίλυση του ίδιου προβλήματος έχει αναφερθεί και η χρήση ημι-παρασκευαστικής στήλης. Το πρώτο πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα LC-SPE-NMR χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη ακετονικού εκχυλίσματος Ελληνικής ρίγανης από την ερευνητική μας ομάδα [Exarchou *et al.*, 2003]. Στη

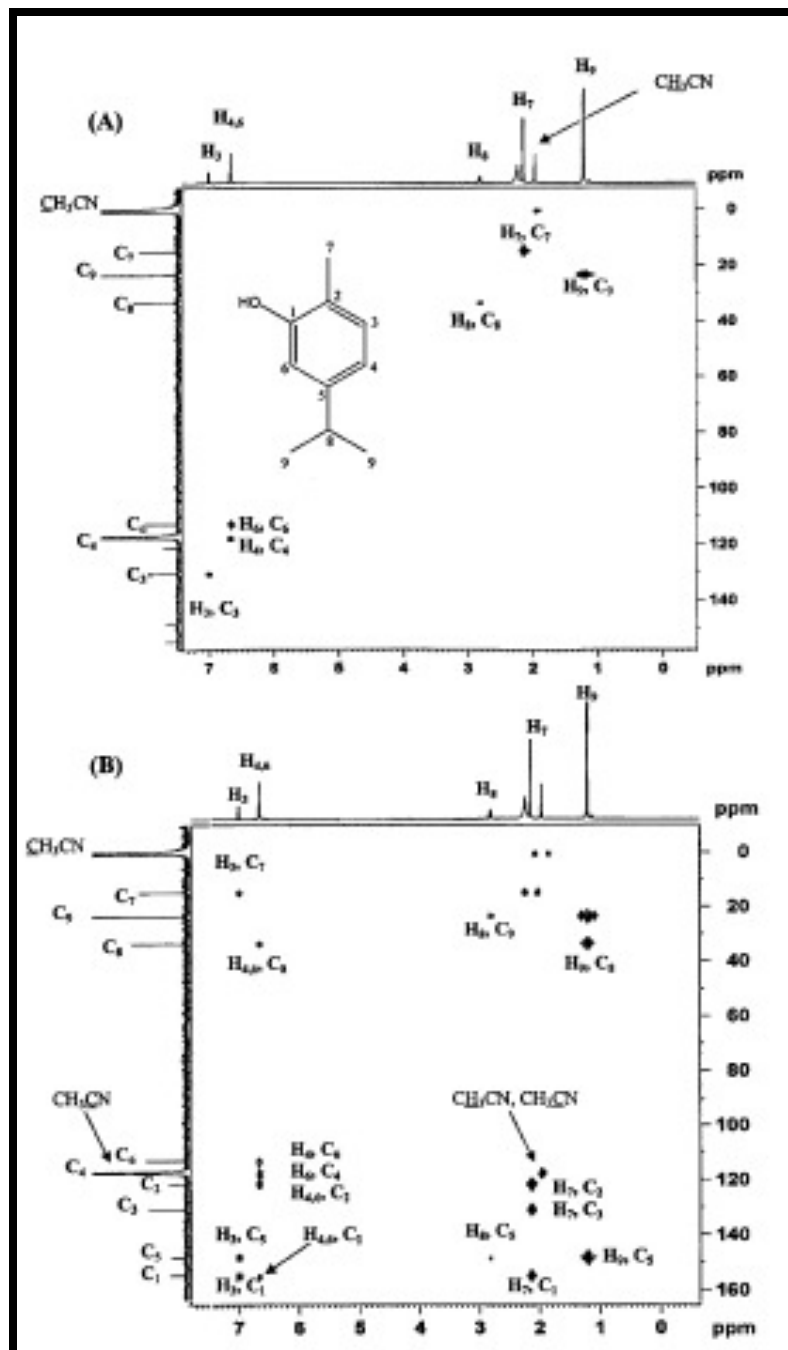
συνέχεια η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων όπως *Rhaponticum carthanoides* [Miliauskas *et al.*, 2005], *Kanaria laniflora* [Clarkson *et al.*, 2005], *Harpagophytum procumbens* [Seger *et al.*, 2005], *Smirnowia iranica* [Lambert *et al.*, 2005a; 2005b], *Olea Europea* [Goulas *et al.*, 2009] αλλά και σε εμπορικά δείγματα δεντρολίβανου [Pukalskas *et al.*, 2005] και κλάσματος ελαιολάδου [Christoforidou *et al.*, 2005].

Είναι φανερό λοιπόν, ότι η τεχνική LC-SPE-NMR είναι εξαιρετικά χρήσιμη στη μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων. Η εφαρμογή της κρυογενικής τεχνολογίας στην παραπάνω τεχνική αυξάνει ακόμη περισσότερο την ευαισθησία της, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Για παράδειγμα στο Σχήμα 3.3.3 απεικονίζεται το φάσμα NMR-¹H μιας κορυφής από το ακετονικό εκχύλισμα ελληνικής ρίγανης, που παγιδεύτηκε τρεις φορές στην ίδια μικροστήλη και αναλύθηκε σε φασματογράφο 600MHz εφοδιασμένο με υποδοχέα κρυογενικής τεχνολογίας (ενεργός όγκος 20 μ L). Η λήψη του φάσματος πραγματοποιήθηκε με 32 παλμούς και ο χρόνος του πειράματος δεν ξεπερνά τα δυο λεπτά. Στο Σχήμα 3.3.3(B) παρατίθεται το ίδιο φάσμα χωρίς την εφαρμογή της παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη [Exarchou *et al.*, 2003].



Σχήμα 3.3.3: Το φάσμα NMR- ^1H μιας κορυφής από το ακετονικό εκχύλισμα ελληνικής ρίγανης, που παγιδεύτηκε τρεις φορές στην ίδια μικροστήλη σε φασματόμετρο 600MHz. (A) Χρήση παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη, (B) χωρίς τη χρήση παλμικής ακολουθίας καταστολής του σήματος του διαλύτη, με 32 παλμούς και σε θερμοκρασία δωματίου [Exarchou *et al.*, 2003].

Στην ίδια εργασία φάσματα μιας και δυο διαστάσεων της καρβακρόλης λήφθηκαν σε λιγότερο από μια ώρα. Η κρυογενική τεχνολογία σε συνδυασμό με τη χρήση της μονάδας SPE και την πολλαπλή παγίδευση της προς ανάλυση ουσίας στην ίδια μικροστήλη, επέτρεψαν την καταγραφή φασμάτων ^{13}C , ^1H - ^{13}C HMQC και ^1H - ^{13}C HMBC της καρβακρόλης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα με την τεχνική του LC-NMR, όπως φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 3.3.4).



Σχήμα 3.3.4: Φάσματα καρβακρόλης (A) ^1H - ^{13}C HMQC και (B) ^1H - ^{13}C HMBC σε φασματογράφο 600MHz κατόπιν τριπλής παγίδευσης στην ίδια μικροστήλη [Exarchou *et al.*, 2003].

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τα τελευταία χρόνια έγιναν προσπάθειες να αξιολογηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργία ενός συστήματος LC-SPE-NMR. Τα αποτελέσματα των προσπαθειών αυτών δεν ήταν ιδιαίτερα εντυπωσιακά καθώς φαίνεται ότι δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν γενικοί κανόνες και οδηγίες για την

αποτελεσματικότερη χρήση του συστήματος γενικά, αλλά θα πρέπει κάθε φορά να ελέγχονται οι παράμετροι του συστήματος καθώς φαίνεται να επηρεάζονται άμεσα από το δείγμα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η διαδικασία της «παγίδευσης» στις μικροστήλες και η ανάκτηση από αυτές. Έτσι, μερικές από τις παραμέτρους που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του συστήματος είναι το είδος του πληρωτικού υλικού των μικροστηλών, ο δευτεριωμένος διαλύτης ανάκτησης και ο λόγος των ροών των δυο αντλιών του συστήματος [Clarkson *et al.*, 2007; Miliauskas *et al.*, 2006].

4. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διεθνώς μια στροφή στη χρήση φυσικών προϊόντων ιδιαίτερα στον τομέα των φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι μεγάλο μέρος των φαρμακευτικών σκευασμάτων που κυκλοφορούν στο εμπόριο περιέχουν συστατικά φυτικής προέλευσης. Παράλληλα με τη συστηματική και σε βάθος έρευνα για τη μελέτη της χημικής σύστασης, της βιολογικής δράσης ή της βελτίωσης της ποιότητας γνωστών φυσικών προϊόντων, γίνεται ιδιαίτερη προσπάθεια σε διεθνή κλίμακα για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικά δραστικών ενώσεων από φυτά - πηγές διαφόρων βιολογικών συστατικών. Η λαϊκή εμπειρία στη θεραπευτική χρήση των φυτών αποτελεί πηγή γνώσης που παρέχει πλούσιο υλικό στη σύγχρονη επιστημονική έρευνα.

Η αναζήτηση φυτοχημικών ενώσεων με ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως η αντιοξειδωτική, είναι μια εξαιρετικά δύσκολη και επίπονη διαδικασία εξαιτίας της πολυπλοκότητάς τους. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει συνήθως το διαχωρισμό και την απομόνωση των συστατικών με χρωματογραφικές μεθόδους και το χαρακτηρισμό και τη μελέτη της δομής τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η παραπάνω προσέγγιση είναι χρονοβόρα και δεν οδηγεί πάντα στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Τις τελευταίες δεκαετίες αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία η ανάπτυξη και η εφαρμογή συνδυαστικών τεχνικών και συγκεκριμένα υγροχρωματογραφικών τεχνικών σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (Liquid chromatography - Mass Spectrometry, LC-MS) καθώς και υγροχρωματογραφικών τεχνικών σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Liquid chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, LC-NMR), που απαλλάσσουν τους ερευνητές από τη χρονοβόρα και επίπονη απομόνωση κάθε συστατικού του προς ανάλυση δείγματος, καθώς επιτρέπουν την ταυτοποίηση των συστατικών ενός φυτικού εκχυλίσματος χωρίς να προηγηθεί οποιαδήποτε διαδικασία απομόνωσης. Αναμφισβήτητα, η συνδυαστική τεχνική LC-NMR, η οποία έχει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση φαρμακευτικών προϊόντων, φυσικών προϊόντων, βιολογικών υγρών κ.ά., κατέχει ξεχωριστή και δεσπόζουσα θέση ανάμεσα σε αυτές και αποτελεί την πιο πρόσφατη και πολλά υποσχόμενη συνδυαστική τεχνική.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση του βέλτιστου τρόπου εργασίας για την ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου ανάλυσης διαφορετικών τάξεων ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα με τη χρήση μεθοδολογιών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) μιας (1D) και δύο (2D) διαστάσεων, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα φυτών σε οργανικούς διαλύτες που ανήκουν στις οικογένειες *Lamiaceae* και *Oleaceae* και έγινε συστηματική προσπάθεια ταυτοποίησης των κύριων συστατικών τους. Οι κατηγορίες βιοενεργών συστατικών που μελετήθηκαν ήταν κυρίως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και παράγωγά τους, ελαιοευρωπαΐνη και παράγωγά της αλλά και σύνθετες πρότυπες ενώσεις. Τα εκχυλίσματα των φυτών που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν από εκχύλιση με πολικούς κυρίως διαλύτες, προκειμένου να παραληφθούν τα περισσότερα πολικά συστατικά. Η διαλυτότητα στο νερό είναι απαραίτητη προϋπόθεση ενός συστατικού που είναι πιθανό να αποτελέσει πρόδρομη ένωση για την παρασκευή φαρμακευτικού σκευάσματος [Wexler *et al.*, 2005; Morelock *et al.*, 1994]. Επιπλέον, τα υδατικά εκχυλίσματα προσομοιάζουν περισσότερο τα αφεψήματα, δηλαδή τον τύπο του εκχυλίσματος που καταναλώνεται από τον άνθρωπο. Η πρώτη εκτίμηση της σύστασης των εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση δισδιάστατων μεθοδολογιών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους. Επιπλέον εφαρμόστηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών για την περαιτέρω ανάλυση των πολύπλοκων εκχυλισμάτων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Αντιδραστήρια - Υλικά

Οι πρότυπες ενώσεις καφεϊκό οξύ, ναρινγενίνη, απιγενίνη, ροσμαρινικό οξύ και κερκετίνη αγοράστηκαν από την Fluka (Buchs, Switzerland) ενώ οι ενώσεις ελαιοευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη, λουτεολίνη, 7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 4'-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ταξιφολίνη και εριοδικτυόλη από την Extrasynthese (Genay, France). Το πικρικό οξύ αγοράστηκε από τη Ferak (Berlin, Germany), το τριφθοροξικό οξύ από την Fluka (Buchs, Switzerland) και το τριχλωροξικό οξύ από την Merck (Darmstadt, Germany). Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε με δευτεριωμένους διαλύτες μεθανόλη- d_4 , ακετονιτρίλιο- d_3 , ακετόνη- d_6 , DMSO- d_6 και D_2O , η προμήθεια των οποίων έγινε από τη Deutero (Kastellaun, Germany). Για την εκχύλιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε n-εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη, ακετόνη και νερό από την Riedel de Haen (Seelze, Germany). Για την υγροχρωματογραφική μελέτη των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό βαθμού καθαρότητας ανάλυσης HPLC από την Scharlau (Barcelona, Spain). Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα οξικό και μυρμηγκικό οξύ της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany).

5.2 Δείγματα

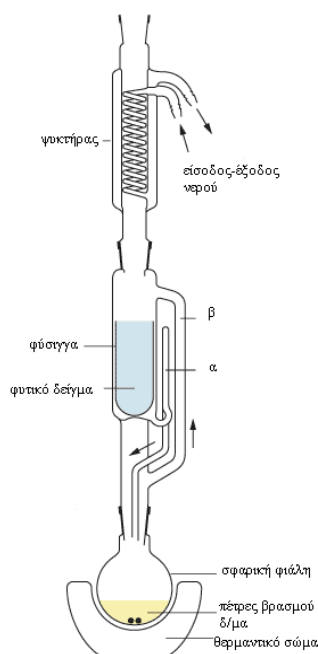
Τα φυτικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν κατατάσσονται στις οικογένειες *Lamiaceae* (*Oreganum vulgare*, ρίγανη) και *Oleaceae*, (*Olea europaea* L., φύλλα ελιάς) (Σχήμα 1.1.1). Τα αποξηραμένα δείγματα ρίγανης ήταν εμπορικά διαθέσιμα, ενώ τα φύλλα ελιάς συλλέχθηκαν την περίοδο του Νοεμβρίου από τη Βορειοδυτική Ελλάδα. Συνολικά παρασκευάστηκαν έξι (6) εκχυλίσματα, όπως αναλυτικά αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 5.3.1).

5.3 Προετοιμασία Εκχυλισμάτων

Από τα φυτικά δείγματα φύλλων ελιάς *Olea europaea* παρασκευάστηκαν δύο εκχυλίσματα, ένα υδατικό (AOLE) και ένα μεθανολικό (MOLE). Τα φύλλα, αφού πλύθηκαν

με νερό και αποξηράνθηκαν σε ατμόσφαιρα δωματίου, αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη (-20°C). Για το υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, ποσότητα 50 g ξηρών φύλλων μεταφέρθηκε σε 250mL δις απεσταγμένου νερού θερμοκρασίας βρασμού ($\sim 100^{\circ}\text{C}$) και το όλο εκχύλισμα αφέθηκε για επώαση επί μία (1) ώρα. Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος και απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλοποίηση. Για το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, ποσότητα 50 g ξηρών φύλλων μεταφέρθηκε σε 250 mL μεθανόλης και το όλο εκχύλισμα αφέθηκε για επώαση επί επτά (7) ημέρες σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος και απομάκρυνση του διαλύτη με περιστροφικό εξάτμιστήρα.

Από τα φυτικά δείγματα φύλλων ρίγανης *Oreganum vulgare* παρασκευάστηκαν τέσσερα εκχυλίσματα: (i) ακετονικό εκχύλισμα (OAC), (ii) εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (OET), (iii) μεθανολικό εκχύλισμα (OME) και (iv) υδατικό εκχύλισμα (OAQ). Αρχικά το φυτικό δείγμα υπόκειται σε λειοτριβήση, στη συνέχεια φυλάσσεται σε γυάλινα δοχεία στο σκοτάδι σε κατάψυξη (-20°C). Η διαδικασία παρασκευής των εκχυλισμάτων αναλύεται παρακάτω:



Σχήμα 5.3.1: Συσκευή συνεχούς εκχύλισης τύπου Soxhlet.

Το ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης παρασκευάστηκε σε συσκευή συνεχούς εκχύλισης τύπου Soxhlet (Σχήμα 5.3.1) με την οποία εκχυλίζονται μεγάλες ποσότητες δείγματος με

μικρή ποσότητα διαλύτη. Ζυγίστηκε δείγμα 5 g ξηρών φύλλων και μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ειδική φύσιγγα από διηθητικό χαρτί. Το δείγμα καλύφθηκε με βαμβάκι και η φύσιγγα τοποθετήθηκε σε εκχυλιστήρα Soxhlet. Σε προζυγισμένη εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη που φέρει πέτρες βρασμού, προστέθηκε επαρκής ποσότητα διαλύτη εκχύλισης (~ 200 mL ακετόνης). Η φιάλη θερμάνθηκε μέχρι βρασμού του διαλύτη. Οι ατμοί του διαλύτη περνούν από τον σωλήνα β και φθάνουν στον ψυκτήρα, όπου υγροποιούνται. Οι σταγόνες του υγρού διαλύτη πέφτουν στον εκχυλιστήρα και παραλαμβάνουν ένα μέρος της εκχυλιζόμενης ουσίας. Όταν ο διαλύτης φθάσει στο ανώτατο όριο του σιφωνίου α, προκαλεί σιφωνισμό και επαναρρέει στη σφαιρική φιάλη [Αλεξάνδρου, 1986]. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τυπική διάρκεια εκχύλισης περίπου έξι (6) ώρες. Κατόπιν απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστροφικό εξατμιστήρα και λαμβάνεται το στερεό εκχύλισμα.

Κατά παρόμοιο τρόπο παρασκευάστηκαν και τα άλλα δύο εκχυλίσματα ρίγανης, του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης. Στην ίδια συσκευή Soxhlet και στο ίδιο αρχικό φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας οι διαλύτες: n-εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν τα εκχυλίσματα ρίγανης του οξικού αιθυλεστέρα (OET) και της μεθανόλης (OME).

Το υδατικό εκχύλισμα ρίγανης (OAQ) παρασκευάστηκε όπως και το υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση αφέθηκαν για επώαση 5 g φυτικού υλικού σε 200 mL δις απεσταγμένου νερού.

Πίνακας 5.3.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των εκχυλισμάτων που παρασκευάστηκαν με τους αντίστοιχους κωδικούς.

Κωδικός	Περιγραφή Εκχυλίσματος
AOLE	Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς
MOLE	Μεθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς
OAC	Ακετονικό Εκχύλισμα Ρίγανης
OET	Εκχύλισμα Ρίγανης σε Οξικό Αιθυλεστέρας
OME	Μεθανολικό Εκχύλισμα Ρίγανης
OAQ	Υδατικό Εκχύλισμα Ρίγανης

5.4 Μελέτη της Σύνστασης των Εκχυλισμάτων με Χρήση Φασματοσκοπίας NMR Μιας (1D) και Δύο (2D) Διαστάσεων

Η λήψη φασμάτων NMR των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στους φασματογράφους NMR Bruker AV-250, Bruker AV-400 και Bruker AV-500 συζευγμένου με σύστημα HPLC και υποδοχέα κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TopSpin 2.1. Για την ετοιμασία των δειγμάτων διάφορες ποσότητες εκχυλίσματος (0.05 - 80 mg) διαλύθηκαν σε 0.6 mL δευτεριωμένου διαλύτη.

5.5 Μελέτη της Σύνστασης των Εκχυλισμάτων με Χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Agilent G13311A. Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων έγινε με την χρήση ανιχνευτή φωτοδιόδων Bruker DAD (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Η ψηφιοποίηση του σήματος του ανιχνευτή καθώς και ο έλεγχος όλου του συστήματος έγινε μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με λογισμικό HyStar 3.2 της Agilent. Για τον επιτυχή διαχωρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αναλυτικές στήλες Discovery C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μ m) και Altima C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μ m) και βαθμιδωτή έκλουση με χρήση δυο διαλυτών: (A) οξυνισμένο H₂O, (B) οξυνισμένο ακετονιτρίλιο ή ακετονιτρίλιο/μεθανόλη, με ταχύτητα ροής 0.6 mL/min. Η οξύνιση των διαλυτών (με οξικό οξύ ή μυρμηγκικό οξύ) πραγματοποιήθηκε για να αποφευχθεί η διάσταση των φαινολικών υδροξυλίων (–OH) των φλαβονοειδών και των καρβοξυλίων (–COOH) των φαινολικών οξέων. Οι διαλύτες υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με ειδικά φίλτρα και διαδικασία απομάκρυνσης του αέρα με ειδική συσκευή απαέρωσης πριν την είσοδό τους για χρωματογραφία. Ο ενέσιμος όγκος του δείγματος κάθε φορά ήταν 20 μ L. Για την υγροχρωματογραφική ανάλυση των εκχυλισμάτων 1 mg του κάθε εκχυλίσματος διαλύθηκε σε 1 mL μίγματος νερού-ακετονιτρίλιου (1:1).

Για το διαχωρισμό μέσω παρασκευαστικής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε σύστημα της Shimadzu (Japan, Tokyo) το οποίο περιλαμβάνει δύο αντλίες LC-8A, μίκτη, CBM-20A, ανιχνευτή DAD, SPD-M20A, αυτόματο δειγματολήπτη, SIL-10AP, και αυτόματο συλλέκτη κλασμάτων, FRC-10A. Ο έλεγχος όλου του συστήματος έγινε μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή με λογισμικό LC solution (v. 1.2.3). Χρησιμοποιήθηκε στήλη Ascentis C18 (25

cm x 21.2 mm, 10μm) που προμηθεύτηκε από τη Supelco (Bellefonte, USA). Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύστημα διαλυτών όπως και παραπάνω.

5.6 Μελέτη της Σύνστασης των Εκχυλισμάτων με τη Χρήση της Συνδυαστικής Τεχνικής LC-MS

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων με την συνδυαστική τεχνική υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Φασματομετρίας Μαζών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου Agilent 1100 εφοδιασμένο με ανιχνευτή φωτοδιόδων Agilent G1315B DAD και φασματογράφο μάζας με ανιχνευτή παγίδευσης ιόντων (ion trap mass). Ο φασματογράφος μαζών είναι τύπου Agilent G2455A τεχνολογίας ηλεκτροψεκασμού, που επιτρέπει την ανάλυση πτητικών, θερμικά σταθερών μικρού μοριακού βάρους ενώσεων. Για τον ιονισμό των φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων επιλέχθηκε αρνητική τάση 4.5 kV και η σάρωση, για την ανίχνευση των ιόντων, πραγματοποιήθηκε για τιμές του λόγου m/z από 50 έως 1200. Ο έλεγχος του συστήματος και η επεξεργασία των φασμάτων μάζας έγινε με το λογισμικό της Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Όσον αφορά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 5.5, με τη διαφορά ότι ο ενέσιμος όγκος ήταν 10 μL αντί των 20 μL.

5.7 Μελέτη της Σύνστασης των Εκχυλισμάτων με τη Χρήση της Συνδυαστικής Τεχνικής LC-SPE-NMR

Η αρχή λειτουργίας της συνδυαστικής τεχνικής LC-SPE-NMR βασίζεται στη δυνατότητα «αποθήκευσης» των εκλούμενων ενώσεων από την χρωματογραφική στήλη σε κατάλληλες μικροστήλες SPE. Κάθε ένωση παγιδεύεται σε μια μικροστήλη ξεχωριστά. Η παγίδευσή τους επιτυγχάνεται με τη συνεχή προσθήκη νερού, μέσω αντλίας στην έξοδο της στήλης, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εκλουστικής δύναμης και την κατακράτησή τους στις μικροστήλες. Για την επίτευξη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων που θα επιτρέψει τη λήψη φασμάτων NMR δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία πολλαπλής παγίδευσης. Ακολουθεί διαβίβαση ρεύματος αερίου αζώτου για την απομάκρυνση των διαλυτών της χρωματογραφίας. Στη συνέχεια, οι «παγιδευμένες» ενώσεις ανακτώνται και

μεταφέρονται με δευτεριωμένο διαλύτη στην κυψελίδα συνεχούς ροής του υποδοχέα του φασματογράφου NMR για τη λήψη φασμάτων των ενώσεων.

5.7.1 Οργανολογία

Η μελέτη της σύστασης των φυτικών εκχυλισμάτων με την τεχνική LC-SPE-NMR πραγματοποιήθηκε σε όργανο LC-NMR της εταιρείας Bruker. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από αντλία προώθησης διαλυτών Agilent G13311A και τον ανιχνευτή UV διόδου λυχνιών (DAD) τύπου Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany. Για την έγχυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης Agilent G1311A με βρόγχο, που μπορεί να εισάγει από 0 έως 100 μL .

Για την αυτόματη παγίδευση των κορυφών χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης τύπου Bruker/Spark Prospect 2 (Bruker BioSpin and Spark, Emmen, The Netherlands) η οποία είναι εφοδιασμένη με μικροστήλες Hysphere, που φέρουν πληρωτικά υλικά διαφόρων τύπων. Η προσθήκη νερού για την κατακράτηση των ενώσεων στις μικροστήλες έγινε με τη χρήση ισοκρατικής (isocratic) αντλίας Knauer K 120 (Berlin, Germany). Τα παγιδευμένα συστατικά του εκχυλίσματος μετά την ξήρανσή τους μεταφέρθηκαν με 205 μL δευτεριωμένου διαλύτη (ακετονιτρίλιο- d_3 ή μεθανόλη- d_4) σε φασματογράφο Bruker AV-500 NMR, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με υποδοχέα συνεχούς ροής LC-SEI 4mm ^1H - ^{13}C , κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας, με ενεργό όγκο κυψελίδας ανίχνευσης 30 μL .

5.7.2 Σύστημα Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εισαγωγή του συστήματος SPE στο σύστημα LC-NMR είναι καθοριστική καθώς συγκεντρώνει πλήθος πλεονεκτημάτων αλλά, ταυτόχρονα, αποτελεί και το πιο κρίσιμο σημείο της τεχνικής LC-SPE-NMR, δεδομένου ότι κατά την παγίδευση και ανάκτηση των συστατικών στις μικροστήλες λαμβάνουν χώρα αρκετές φυσικοχημικές διεργασίες. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης τύπου Bruker/Spark Prospect 2 (Bruker BioSpin and Spark, Emmen, The Netherlands).

Το πρώτο βήμα που αφορά τη χρήση της μονάδας SPE στο σύστημα LC-SPE-NMR είναι η επιλογή του τύπου του πληρωτικού υλικού των μικροστηλών, που εξαρτάται από το είδος των υπό ανάλυση ενώσεων. Το σύστημα περιέχει οκτώ διαφορετικά είδη μικροστηλών που διαφέρουν ως προς τον τύπο του πληρωτικού υλικού, το μέγεθος των σωματιδίων των μικροστηλών και άλλα τεχνικά χαρακτηριστικά. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή,

κατόπιν βελτιστοποίησης των συνθηκών παγίδευσης για τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή επιλέχθηκε ως καταλληλότερη φάση η ρητίνη GP.

Το επόμενο βήμα είναι η προετοιμασία των μικροστηλών, ώστε να μπορούν να κατακρατήσουν τις υπό ανάλυση ενώσεις με τη μέγιστη δυνατή απόδοση. Για το λόγο αυτό πλένονται αυτόματα με 1 mL ακετονιτριλίου, με ταχύτητα ροής 1 mL/min, και κατόπιν εξισορροπούνται με 1 mL ύδατος με ταχύτητα ροής 1 mL/min, πριν από κάθε χρήση.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται ο υδροχρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων με τη μόνη διαφοροποίηση ότι, μετά τη στήλη, έχουμε την συνεχή προσθήκη ύδατος με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Με το τέλος της παγίδευσης των ενώσεων και της απομάκρυνσης των πρωτικών διαλυτών (H_2O , MeOH) με διαβίβαση αερίου αζώτου, ακολουθεί η ανάκτηση με κατάλληλους δευτεριωμένους διαλύτες. Για το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε, απαιτούνται 205 μL δευτεριωμένου διαλύτη. Η ποσότητα είναι αυστηρά καθορισμένη και εξαρτάται από τον όγκο της κυψελίδας ανίχνευσης του υποδοχέα, αλλά και από το μήκος του τριχοειδούς σωλήνα (tube) που μεταφέρει την υπό μελέτη ένωση στην κυψελίδα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΛΗΨΗΣ ΦΑΣΜΑΤΩΝ NMR ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

6.1 Εισαγωγή

Στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη και η εφαρμογή μεθοδολογιών φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον οποιοδήποτε προηγούμενο διαχωρισμό τους. Οι παραπάνω ενώσεις θα αναζητηθούν κυρίως σε εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων της Ελληνικής χλωρίδας και ιδιαίτερα της περιοχής της Ηπείρου, και συγκεκριμένα φυτών που ανήκουν στις οικογένειες *Lamiaceae* και *Oleaceae*.

Ανάμεσα στις πιο σημαντικές και λειτουργικές ομάδες όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες φυτικών προϊόντων είναι τα φαινολικά υδροξύλια ($-OH$). Είναι, επίσης γεγονός ότι η πλειονότητα των βιοενεργών ενώσεων, που έχουν απομονωθεί από φυτικά προϊόντα και εμφανίζουν φαρμακευτική χρήση, φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες $-OH$, ιδιαίτερα φαινολικού τύπου. Γενικά, στη φασματοσκοπία NMR- 1H οι απορροφήσεις συντονισμού των φαινολικών υδροξυλικών πρωτονίων εμφανίζονται εξαιρετικά διευρυμένες στη θερμοκρασία δωματίου, ιδιαίτερα, όταν το φάσμα ληφθεί σε πρωτικό διαλύτη [Sanders & Hunter, 1993; Englander & Kallenbach, 1984]. Αυτό οφείλεται στην ευκινησία των υδροξυλικών πρωτονίων και στη γρήγορη, για την κλίμακα χρόνου του NMR, ανταλλαγή τους με τα πρωτόνια πρωτικών διαλυτών ή με τα ίχνη ύδατος σε μη πρωτικούς διαλύτες. Εντούτοις, με τη λήψη φάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων και οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται οξείες. Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας [Exarchou *et al.*, 2002a; 2002b] μελετήθηκε ο διαχωρισμός των φλαβονών απιγενίνη και λουτεολίνη, με λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας του μίγματος των δυο φλαβονών σε διαλύτη μεθανόλη- d_3 , και διαπιστώθηκε ότι, με τη λήψη του φάσματος στην κατάλληλη θερμοκρασία η διάκρισή τους

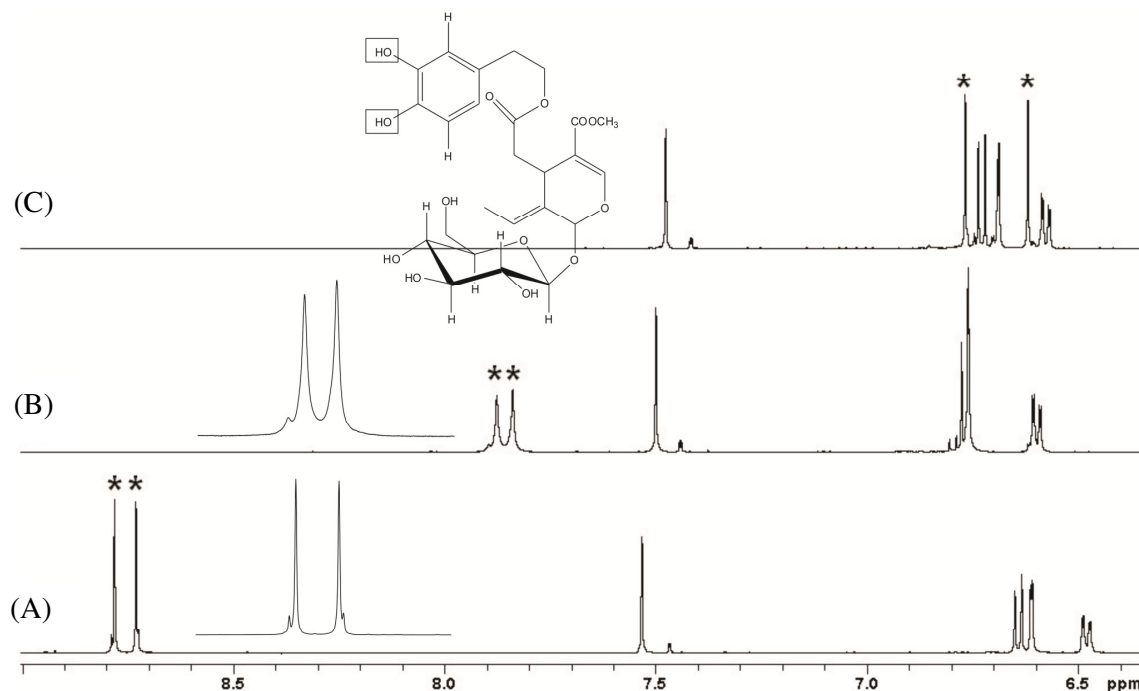
είναι εφικτή στο μίγμα των πρότυπων ενώσεων. Όμως, η περιορισμένη διαλυτότητα των ενώσεων σε χαμηλή θερμοκρασία και η πολυπλοκότητα των δισδιάστατων φασμάτων NMR περιορίζει την χρήση αυτών των μεθόδων για την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων σε πολύπλοκα εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται μία απλή μέθοδος NMR για την παρατήρηση των ομάδων –OH σε αραιωμένα δείγματα με κατάλληλο διαλύτη για την σημαντική ελάττωση της ταχύτητας ανταλλαγής των πρωτονίων. Περαιτέρω επιδεικνύεται η εφαρμογή δισδιάστατου τεχνικής ^1H - ^{13}C NMR για την πλήρη ταυτοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών σε εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων, χωρίς τη χρήση πολύπλοκων και χρονοβόρων εργαστηριακών τεχνικών για την απομόνωση κάθε συστατικού χωριστά.

6.2 Επιλογή Δευτεριωμένου Διαλύτη

Στην προσπάθεια ανάπτυξης μεθοδολογίας NMR επιλέχθηκε ως διαλύτης το DMSO- d_6 λόγω της άριστης διαλυτικής του ικανότητας, γεγονός ιδιαίτερα χρήσιμο στην περίπτωση ανάλυσης φυτικών εκχυλισμάτων με δισδιάστατη φασματοσκοπία ^1H - ^{13}C NMR εξαιτίας της μικρής φυσικής αφθονίας του ισότοπου του ^{13}C στο φυσικό στοιχείο (~ 1.11 %). Παρουσιάζει όμως το μειονέκτημα του υψηλού σημείου πήξεως (~18 °C) πράγμα που το καθιστά ακατάλληλο για πειράματα χαμηλής θερμοκρασίας. Αντίθετα σε πειράματα υψηλής θερμοκρασίας είναι ιδιαίτερα εύχρηστος διαλύτης, αν και θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή λόγω της οξειδωτικής του δράσης.

Δύο επιπλέον σημαντικά πλεονέκτηματα που παρουσιάζει ως διαλύτης το DMSO- d_6 στα φάσματα NMR είναι: (α) η σημαντική εκλέπτυνση των απορροφήσεων λόγω της μεγάλης ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με ομάδες –OH και ως εκ τούτου ελάττωσης της ταχύτητας ανταλλαγής πρωτονίου και (β) η σημαντική αποπροστασία των απορροφήσεων των ομάδων –OH κατά αρκετά ppm. Στο Σχήμα 6.2.1 παρουσιάζεται επιλεκτικό τμήμα των φασμάτων NMR- ^1H της ελαιοευρωπαϊνης σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες, με έμφαση στην περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH.



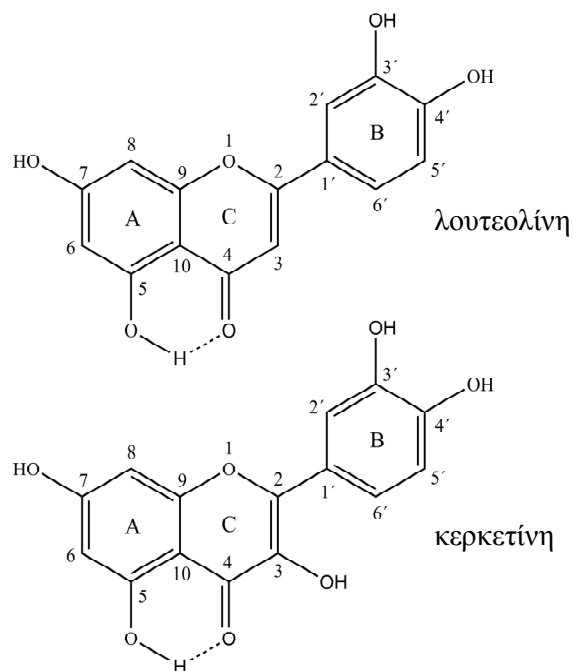
Σχήμα 6.2.1: Φάσματα 500MHz NMR-H¹ της ελαιοευρωπαϊνης σε διαλύτες (A) DMSO-*d*₆, (B) ακετόνη-*d*₆ και (C) ακετονιτρίλιο-*d*₃ (T=292K, ns=32, *t*_{exp}=4min). Με αστερίσκο υποδηλώνεται η απορρόφηση των ομάδων -OH.

Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση που γίνεται χρήση διαλύτη DMSO-*d*₆, τα σήματα συντονισμού των ομάδων -OH εμφανίζονται σε χαρακτηριστική περιοχή (> 8.5 ppm), εκτός της πολύπλοκης περιοχής των αρωματικών απορροφήσεων (8 - 6 ppm) όπου συχνά υπάρχει σημαντική αλληλοεπικάλυψη των σημάτων. Επιπλέον, τα σήματα συντονισμού εμφανίζονται συγκριτικά ως λεπτές και οξείες κορυφές ακόμη και στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων των υπό μελέτη ενώσεων. Αυτό το γεγονός προσδίδει στο DMSO-*d*₆ εξαιρετικές ιδιότητες για την αύξηση της διακριτικής ικανότητας και ως εκ τούτου του διαγνωστικού χαρακτήρα των λαμβανόμενων δισδιάστατων φασμάτων ¹H-¹³C NMR.

6.3 Οξύνιση του Δευτεριωμένου Διαλύτη - Εφαρμογή της Μεθοδολογίας σε Μίγμα Πρότυπων Ενώσεων

Η λουτεολίνη και η κερκετίνη (Σχήμα 6.3.1) είναι δύο φυσικά προϊόντα που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών, η οποία απαρτίζεται από περισσότερα από 8.000 μέλη. Οι ενώσεις αυτές τα τελευταία χρόνια έχουν αποσπάσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής

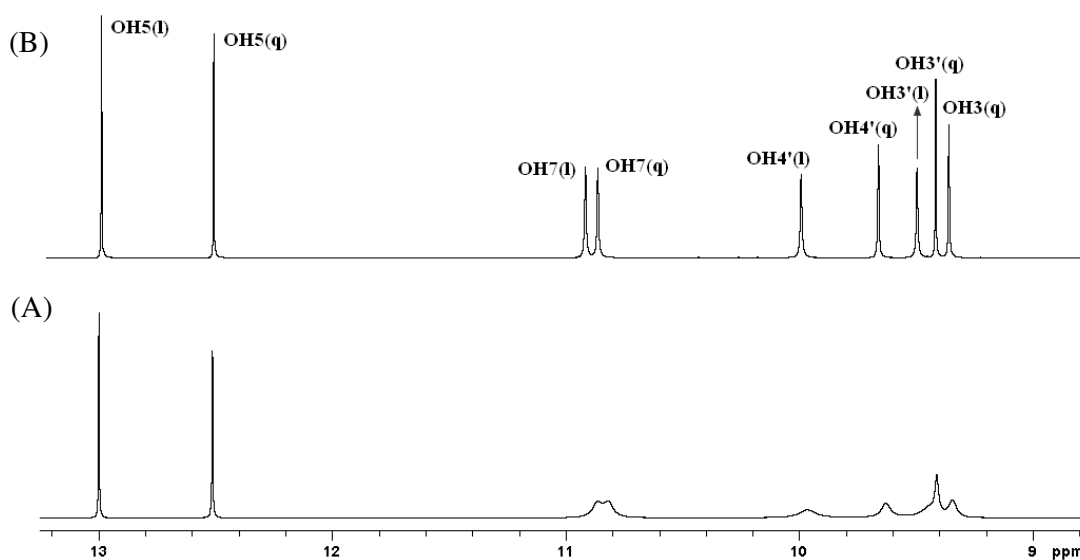
κοινότητας για πιθανή αντικαρκινική και θεραπευτική δράση [Andersen & Markham, 2006; Xagorari *et. al.*, 2001]. Σημειώνεται ότι οι δομές αυτών των δύο ενώσεων είναι σχεδόν ταυτόσημες και διαφοροποιούνται μόνο ως προς την υποκατάσταση στη θέση 3 του δακτυλίου (C) (–H για τη λουτεολίνη και –OH για τη κερκετίνη).



Σχήμα 6.3.1: Χημικοί τύποι των μορίων της λουτεολίνης και της κερκετίνης.

Το φάσμα NMR- ^1H της περιοχής απορροφήσεων των ομάδων –OH μίγματος λουτεολίνης ($C = 5.8 \text{ mM}$) και κερκετίνης ($C = 5.5 \text{ mM}$), σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, απεικονίζεται στο Σχήμα 6.3.2A. Εκτός από τις εξαιρετικά λεπτές απορροφήσεις στα 13.0 και 12.5 ppm, που οφείλονται στα υδροξύλια $\text{OH}(5)$ της λουτεολίνης και της κερκετίνης, αντίστοιχα, και τα οποία σχηματίζουν ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο C-4 , όλες οι υπόλοιπες απορροφήσεις των υδροξυλίων εμφανίζονται ως διευρυμένες κορυφές. Η διεύρυνση και ο βαθμός αλληλοεπικάλυψης των κορυφών είναι τόσο σημαντικός, ώστε είναι αδύνατον να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των απορροφήσεων. Το γεγονός επίσης, ότι οι ενώσεις έχουν παρόμοια δομή, δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο τη διαδικασία ταυτοποίησης. Με την προσθήκη μικρής ποσότητας οξέος (5 μL HCl , 2 mM) στο διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$ (Σχήμα 6.3.2B), επιτυγχάνεται η εκλέπτυνση όλων των απορροφήσεων των υπόλοιπων υδροξυλομάδων καθώς και η ταυτοποίηση όλων των σημάτων συντονισμού

των υδροξυλίων (επτά στο σύνολο) με την εφαρμογή δισδιάστατης φασματοσκοπίας ^1H - ^{13}C NMR.



Σχήμα 6.3.2: (A) Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H , της περιοχής απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$, μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$, (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με την προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=64, t_{expt} =7min18s) [Charisiadis *et al.*, 2010].

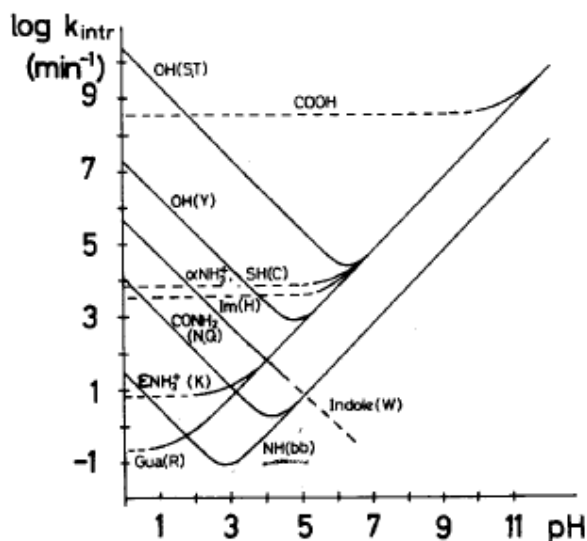
Πίνακας 6.3.1: Εύρη απορροφήσεων, $\Delta\nu_{1/2}$, των πρωτονίων $-\text{OH}$ μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5m M) σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ πριν και μετά τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM.

ppm	12.99	12.51	10.91	10.86	9.99	9.66	9.49	9.41	9.36
	OH(5) (l)	OH(5) (q)	OH(7) (l)	OH(7) (q)	OH(4') (l)	OH(4') (q)	OH(3') (l)	OH(3) (q)	OH(3') (q)
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz) ¹	1.3	1.3	σύνθετο σήμα ~ 53.0		~ 84.0	~ 55.0	σύνθετο σήμα ~ 80.0		
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz) ²	1.2	1.2	3.8	3.5	3.7	2.7	3.8	1.7	2.3

¹πριν την προσθήκη οξέος, ²μετά την προσθήκη οξέος.

Η εμφάνιση των έντονων και εκλεπτυσμένων απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ θα πρέπει να αποδοθεί στη μείωση της ταχύτητας ανταλλαγής των πρωτονίων με τα μόρια του H_2O που υπάρχουν στο δείγμα. Αυτή η ανταλλαγή εξαρτάται από την ποσότητα του H_2O που

υπάρχει και είναι γνωστό ότι καταλύεται από βάση ή οξύ [Eigen, 1964; Englander & Kallenbach, 1984].

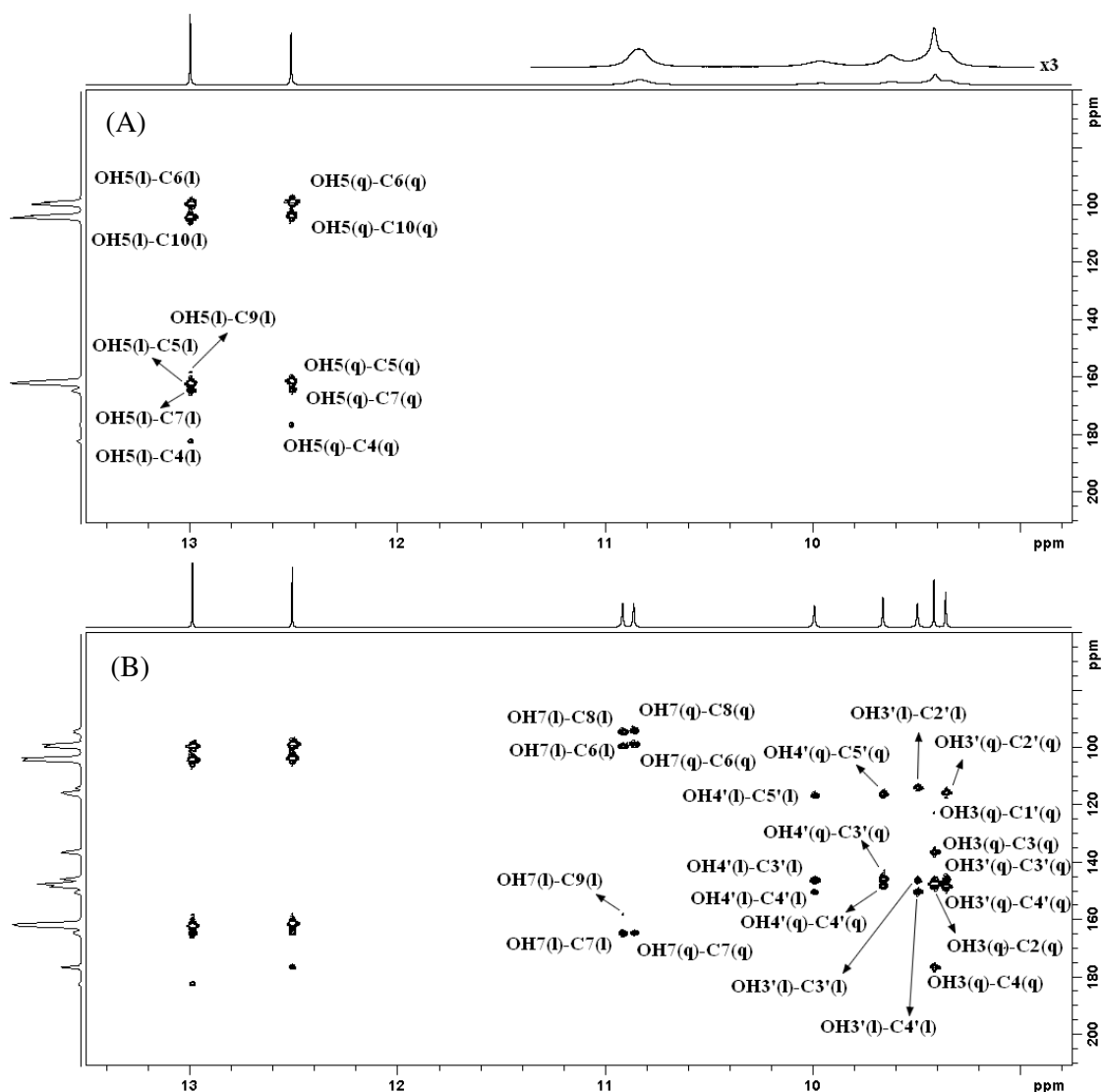


Σχήμα 6.3.4: Γραφική λογαριθμική απεικόνιση της ταχύτητας ανταλλαγής ενεργών πρωτονίων ως συνάρτηση του pH σε υδατικά διαλύματα στους 25°C [Wüthrich, 1986].

Στη γραφική απεικόνιση του διαγράμματος του Σχήματος 6.3.4 [Wüthrich, 1986], παρατηρείται ότι η ταχύτητα ανταλλαγής ευκίνητων πρωτονίων ομάδων $-NH$ (πεπτιδικών αλυσίδων), $CO-NH_2$, και $-OH$ σε υδατικά διαλύματα, ως συνάρτηση του pH του διαλύματος, παρουσιάζει καμπύλη τύπου U. Ειδικότερα για την περίπτωση ομάδων $-OH$ φαινολικού τύπου παρουσιάζεται ελάχιστο, στην περιοχή $pH \approx 4 - 5$. Παρόμοια καμπύλη έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση μεικτών διαλυτών (H_2O και οργανικού διαλύτη) [Englander & Kallenbach, 1984]. Συνεπώς, η προσεκτική εμπειρική ρύθμιση του pH φυτικών εκχυλισμάτων σε μη-υδατικούς διαλύτες για την ελαχιστοποίηση της ταχύτητας ανταλλαγής των ομάδων $-OH$ με το H_2O , καταλήγει στην εκλέπτυνση των απορροφήσεων αυτών των ομάδων [Sanders & Hunter, 1987]. Από λεπτομερή μελέτη μεγάλου αριθμού φυτικών εκχυλισμάτων προκύπτει ότι σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αναγκαία η προσθήκη οξέος για την επίτευξη εκλέπτυνσης των απορροφήσεων των ομάδων $-OH$ φαινολικού τύπου. Συνεπώς, το φαινομενικό pH των φυτικών εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν πριν την προσθήκη οξέος, ήταν υψηλότερο της τιμής του ελαχίστου. Για παράδειγμα το pH υδατικού εκχυλίσματος

ρίγανης και φύλλων ελιάς είναι 6.35 και 5.10, αντίστοιχα, και συνεπώς, υψηλότερο της τιμής του ελαχίστου.

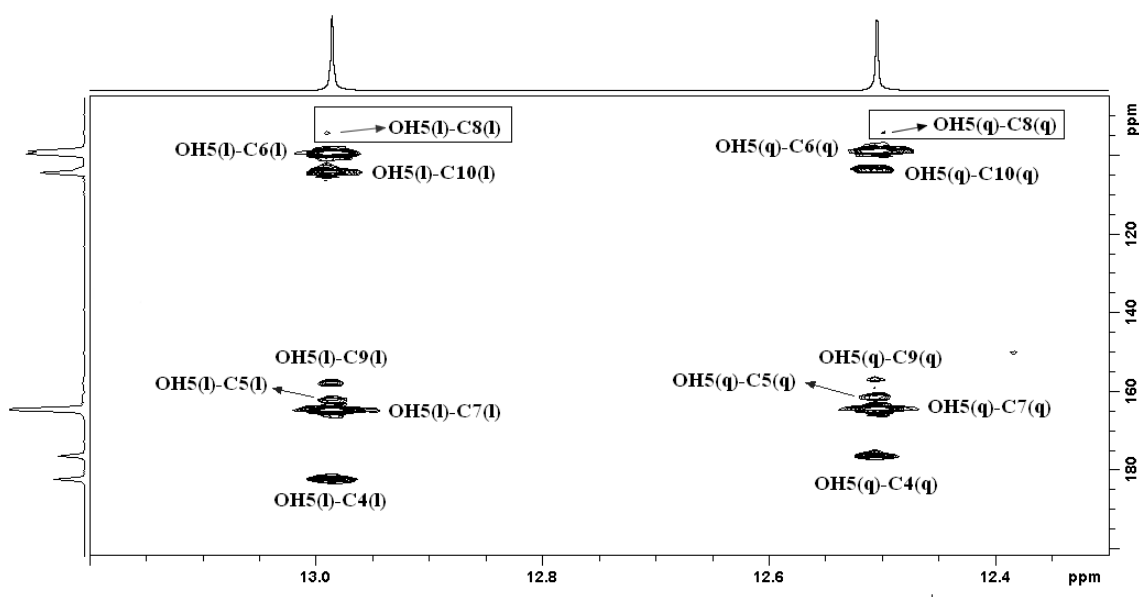
Λόγω της σημαντικής βελτίωσης της διακριτικής ικανότητας των $-H$ των ομάδων $-OH$, με την προσθήκη του οξέος σε σύγκριση με το φάσμα σε μη οξινισμένο $DMSO-d_6$, είναι εφικτή η παρατήρηση ευκρινών κορυφών διασταύρωσης μέσω εφαρμογής πειραμάτων $^1H-^{13}C$ HMBC. Παρότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει σαφής αναφορά ως προς το λόγο $^nJ/\Delta\nu_{1/2}$ που απαιτείται για την ευκρινή λήψη κορυφής διασταύρωσης, μία συντηρητική υπόθεση είναι ότι θα πρέπει να ισχύει η σχέση $^nJ_{CH} \geq (1/2)\Delta\nu_{1/2}$. Στο Σχήμα 6.3.3 απεικονίζεται το δισδιάστατο φάσμα $^1H-^{13}C$ HMBC του μίγματος των δύο ενώσεων, πριν και μετά την προσθήκη του οξέος. Είναι χαρακτηριστικό ότι στην περιοχή των 11.0 - 9.0 ppm απουσιάζουν όλες οι κορυφές διασταύρωσης στην περίπτωση του μη-οξυνισμένου $DMSO-d_6$, ενώ εμφανίζονται μόνο οι κορυφές διασταύρωσης των $OH(5)$ των δύο ενώσεων που, όπως προαναφέρθηκε, συμμετέχουν σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου.



Σχήμα 6.3.5: (A) Φάσμα 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 , (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, t_{exp} =10h) [Charisiadis *et al.*, 2010].

Στο Σχήμα 6.3.5A παρατηρούμε ότι οι δύο έντονες απορροφήσεις ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.3$ Hz) των πρωτονίων OH(5) της λουτεολίνης και της κερκετίνης, οι οποίες συμμετέχουν σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό με το καρβονύλιο C-4, εμφανίζουν έξι κορυφές διασταύρωσης στο δισδιάστατο χάρτη. Συγκεκριμένα με τους άνθρακες C-5 (161.9(l) και 160.9(q) ppm), C-6 (99.2(l) και 98.4(q) ppm), C-10 (104.1(l) και 103.5(q) ppm), C-7 (164.5(l) και 164.2(q) ppm), C-9 (157.7(l) και 156.7(q) ppm) και C-4 (182.0(l) και 176.1(q) ppm). Μία ακόμη κορυφή διασταύρωσης μακράς συσχέτισης, $^5J_{\text{HC}}$, παρατηρήθηκε με τον άνθρακα C-8 (94.0(l) και

93.8(q) ppm) στο πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC που βελτιστοποιήθηκε πειραματικά μέσω της παραμέτρου d6 (Σχήμα 2.5.3) για παρατήρηση κορυφών διασταύρωσης λόγω σταθερών σύζευξης μακράς εμβέλειας ≤ 2.5 Hz (Σχήμα 6.3.6). Μέχρι στιγμής στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένος αριθμός αναφορών σχετικά με μακράς εμβέλειας σταθεράς σύζευξης $^{4,5}J_{\text{HC}}$ σε βενζόλιο, πυριμιδίνη και μονοϋποκατεστημένο βενζόλιο, οι οποίες κυμαίνονται από 0.5 έως 2.0 Hz [Breitmaier *et al.*, 1990]. Από όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχει αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία ύπαρξης κορυφών διασταύρωσης σε πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC λόγω σταθεράς σύζευξης μακράς εμβέλειας $^{4,5}J_{\text{HC}}$.

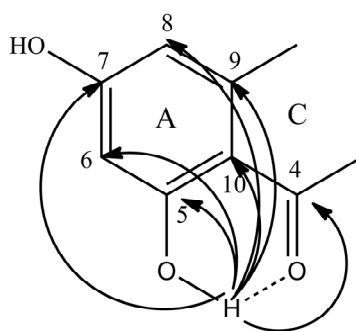


Σχήμα 6.3.6: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, t_{exp} =9h57min18s) [Charisiadis *et al.*, 2010].

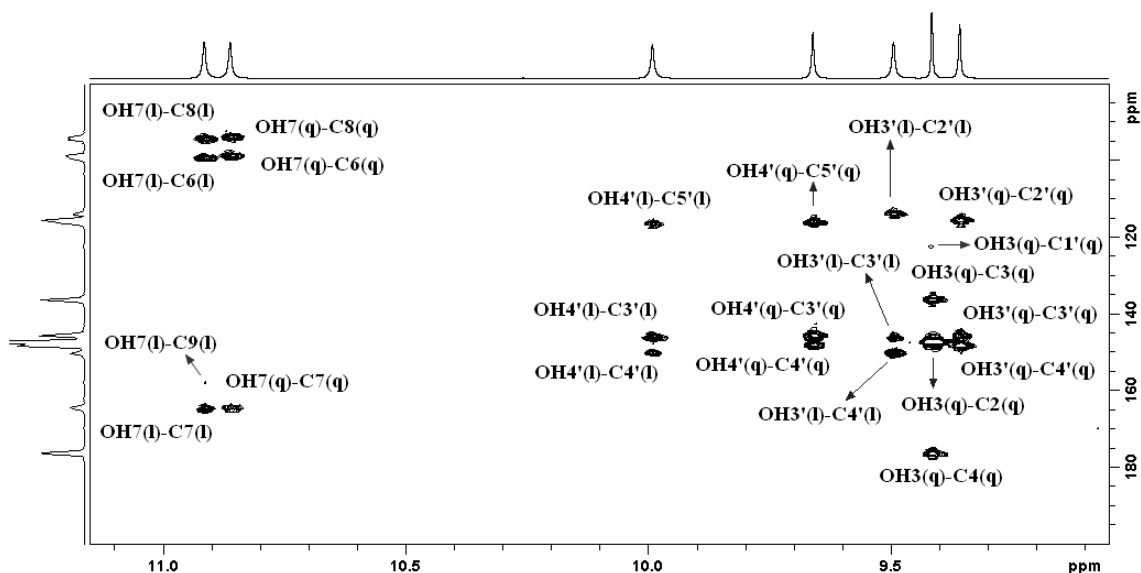
Από το Σχήμα 6.3.6 προκύπτει ότι τα πρωτόνια OH(5) της λουτεολίνης και της κερκετίνης εμφανίζουν σημαντική διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις του φάσματος NMR- ^1H κατά 0.5 ppm, 13.0 ppm για τη λουτεολίνη και 12.5 ppm για τη κερκετίνη, παρότι οι ενώσεις αυτές έχουν παρόμοια δομή και διαφοροποιούνται μόνο ως προς την υποκατάσταση στη θέση 3 του δακτυλίου (C). Το γεγονός αυτό δηλώνει την εξαιρετική ευαισθησία του δεσμού υδρογόνου και, ως εκ τούτου, της χημικής μετατόπισης ως προς υποκαταστάσεις μακράς απόστασης και έχει ιδιαίτερη διαγνωστική σημασία. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η απορρόφηση του C-4 είναι σε εξαιρετικά αποπροστατευμένη περιοχή του

φάσματος ^{13}C και ως εκ τούτου δεν υπάρχουν αλληλεπικαλύψεις με άλλες απορροφήσεις. Το καρβονύλιο C-4, εμφανίζεται στα 182.0 ppm για τη λουτεολίνη και 176.1 ppm για τη κερκετίνη, λόγω της διαφορετικής υποκατάστασης στη θέση 3 του δακτυλίου (C) που επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ηλεκτρονική πυκνότητα του καρβονυλικού οξυγόνου C-4. Συνεπώς, η κορυφή διασταύρωσης OH(5) – C-4, είναι ιδιαίτερα διαγνωστικού χαρακτήρα που μας επιτρέπει την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση των δύο αυτών ενώσεων.

Οι λαμβανόμενες κορυφές διασταύρωσης του OH(5) με τους γειτονικούς άνθρακες από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC απεικονίζονται στο Σχήμα 6.3.7, και υποδηλώνουν την πλήρη απεικόνιση και ταυτοποίηση του δακτυλίου (A).



Σχήμα 6.3.7: Σχηματική απεικόνιση των λαμβανομένων κορυφών διασταύρωσης του OH(5) με τους αντίστοιχους άνθρακες όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC.



Σχήμα 6.3.8: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, t_{expt} =10h) [Charisiadis *et al.*, 2010].

Στο Σχήμα 6.3.8 παρατηρούνται οι κορυφές διασταύρωσης των υπόλοιπων υδροξυλικών ομάδων του μίγματος λουτεολίνης και κερκετίνης. Το πρωτόνιο OH(3) της κερκετίνης παρουσιάζει τέσσερις κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες C-3 (136.1 ppm), C-2 (147.1 ppm), C-4 (176.2 ppm) και C-1 (122.3 ppm). Το πρωτόνιο OH(7) της λουτεολίνης παρουσιάζει τέσσερις κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες C-7 (164.4 ppm), C-6 (99.1 ppm), C-8 (94.3 ppm) και C-9 (157.7 ppm). Τα πρωτόνια OH(7), OH(3') και OH(4') της κερκετίνης και τα πρωτόνια OH(3') και OH(4') της λουτεολίνης δείχνουν κορυφές διασταύρωσης με τρία άτομα άνθρακα. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό κορυφών διασταύρωσης στο δισδιάστατο χάρτη, σε σύγκριση με τα πρωτόνια OH(5), γεγονός που αποδίδεται στο μεγαλύτερο εύρος των κορυφών ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.7 - 3.8$ Hz). Συγκεντρωτικά, οι κορυφές διασταύρωσης των φαινολικών πρωτονίων του μίγματος λουτεολίνης και κερκετίνης καθώς και η αντίστοιχη ταυτοποίηση των πρωτονίων OH και των ανθράκων παρουσιάζονται στο Πίνακα 6.3.2 και βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Andersen & Markham, 2006].

Πίνακας 6.3.2: Κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων –OH με τα αντίστοιχα άτομα άνθρακα καθώς όπως προέκυψαν από πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM. Οι σταθερές σύζευξης, $^nJ_{\text{HC}}$, στις οποίες οφείλονται οι κορυφές διασταύρωσης επισημαίνονται επίσης.

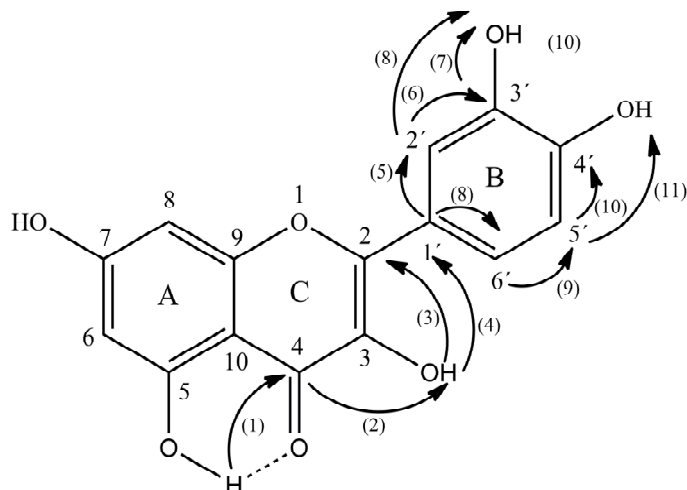
ppm		C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'
12.99	OH(5)(l)			182.0 (4J)	161.9 (2J)	99.2 (3J)	164.5 (4J)	94.0 (5J)	157.7 (4J)	104.1 (3J)					
12.51	OH(5)(q)			176.1 (4J)	160.9 (2J)	98.4 (3J)	164.2 (4J)	93.8 (5J)	156.7 (4J)	103.5 (3J)					
10.91	OH(7)(l)					99.1 (3J)	164.4 (2J)	94.3 (3J)	157.7 (4J)						
10.86	OH(7)(q)					98.5 (3J)	164.2 (2J)	93.8 (3J)							
9.99	OH(4')(l)												146.0 (3J)	150.0 (2J)	116.4 (3J)
9.66	OH(4')(q)												145.4 (3J)	148.0 (2J)	116.0 (3J)
9.49	OH(3')(l)											113.7 (3J)	145.9 (2J)	150.1 (3J)	
9.41	OH(3)(q)	147.1 (3J)	136.1 (2J)	176.2 (3J)							122.3 (4J)				
9.36	OH(3')(q)											115.4 (3J)	145.5 (2J)	148.1 (3J)	

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η εξαιρετική ευαισθησία $\delta(^1\text{H})$ των ομάδων $-\text{OH}$ σε αλλαγές του ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος σε συνδυασμό με την αύξηση της διακριτικής ικανότητας των ομάδων $-\text{OH}$ αποτελεί μία άριστη μεθοδολογία για την επίτευξη της πλήρους ταυτοποίησης των μιγμάτων φλαβονοειδών, παρότι αρκετά άτομα άνθρακα του σκελετού τους έχουν παρόμοιες ή ταυτόσημες απορροφήσεις.

Συμπερασματικά, το πειραματικό πρωτόκολλο για την πλήρη ταυτοποίηση των φλαβονοειδών μέσω των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ έχει ως εξής:

- 1) Ρύθμιση του pH για ελαχιστοποίηση της ταχύτητας ανταλλαγής των ομάδων $-\text{OH}$.
- 2) Λήψη φάσματος $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC βελτιστοποιημένου ως προς τις σταθερές σύζευξης $^nJ_{\text{HC}}$ στην περιοχή τιμών 6 με 10 Hz.
- 3) Λήψη φάσματος $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC βελτιστοποιημένου ως προς τις ασθενείς σταθερές σύζευξης $^5J_{\text{HC}} \leq 2.5$ Hz.

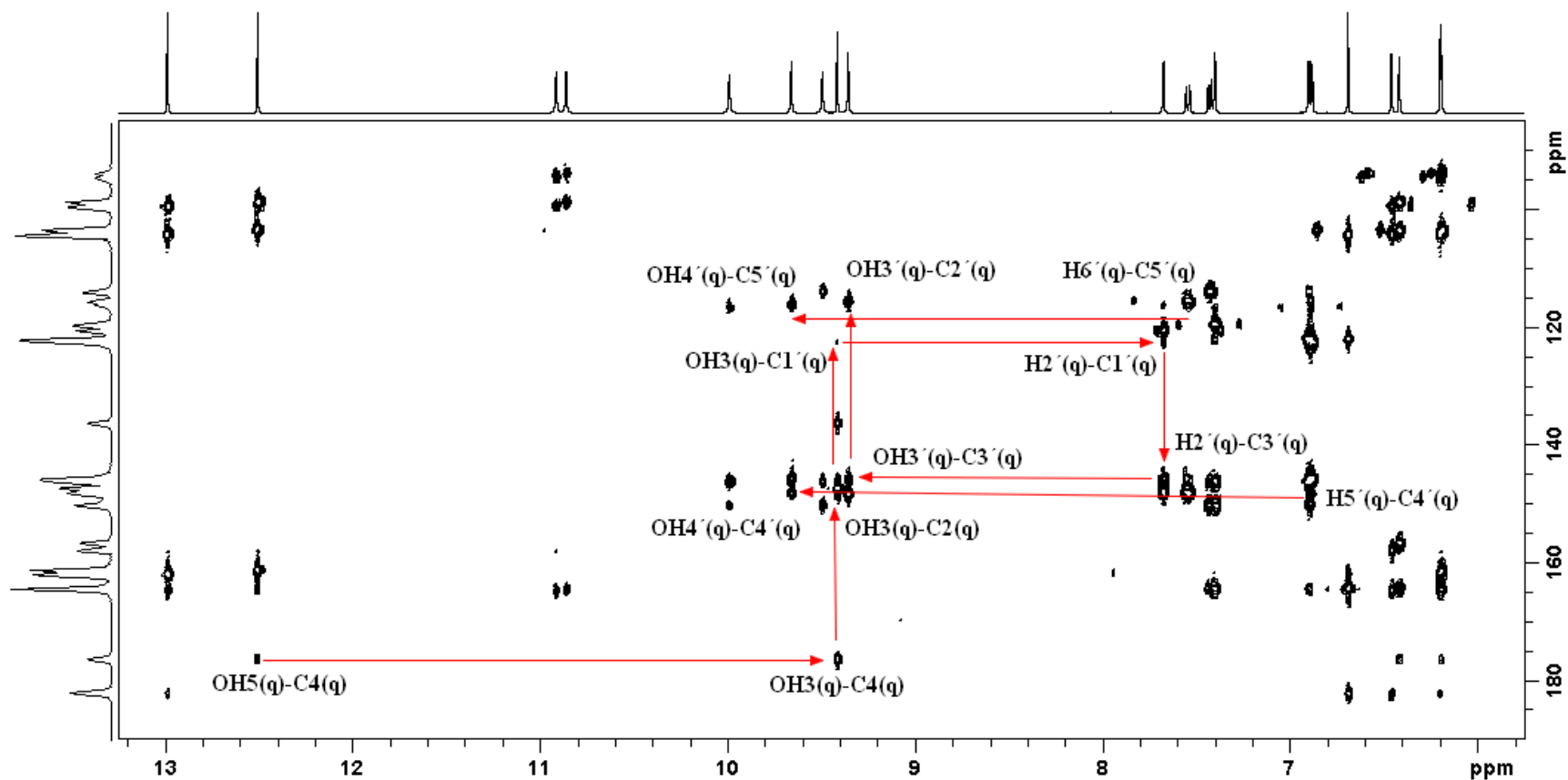
Τα βήματα κατά σειρά που ακολουθήθηκαν, μέσω των φασμάτων $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC, για την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών και συγκεκριμένα της κερκετίνης στο παραπάνω μίγμα προτύπων, παρουσιάζονται παρακάτω ως ακολούθως: (α) η αποτύπωση της σχηματικής πορείας ταυτοποίησης στο Σχήμα 5.3.9, (β) τα βήματα προτεραιότητας στον Πίνακα 6.3.3 και (γ) η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης διαμέσου των ομάδων $-\text{OH}$ στο φάσμα $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC του Σχήματος 6.3.10.



Σχήμα 6.3.9: Σχηματική απεικόνιση και βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης, διαμέσου των ομάδων -OH της κερκετίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC.

Πίνακας 6.3.3: Βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης των ομάδων -OH της κερκετίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC.

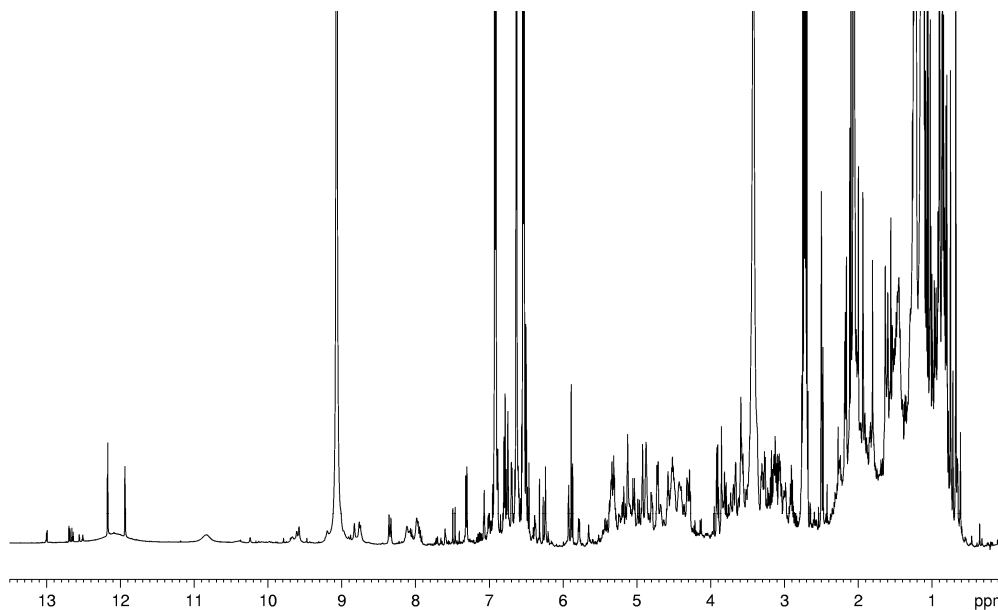
βήμα	κορυφή διασταύρωσης	βήμα	κορυφή διασταύρωσης
(1)	$\text{OH}(5) - \text{C}-4$	(9)	$\text{C}-5' - \text{H}-6'$
(2)	$\text{C}-4 - \text{OH}(3)$	(10)	$\text{OH}(4') - \text{C}-5'$
(3)	$\text{OH}(3) - \text{C}-2$	(11)	$\text{C}4' - \text{H}-5'$
(4)	$\text{C}-1' - \text{OH}(3)$		
(5)	$\text{H}-2' - \text{C}-1'$		
(6)	$\text{C}-3' - \text{H}-2'$		
(7)	$\text{OH}(3') - \text{C}-3'$		
(8)	$\text{C}-2' - \text{OH}(3')$		



Σχήμα 6.3.10: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500MHz ^1H - ^{13}C HMBC μίγματος λουτεολίνης (l, C = 5.8 mM) και κερκετίνης (q, C = 5.5 mM) σε διαλύτη DMSO- d_6 με τη προσθήκη 5 μL HCl, 2 mM (T=292K, ns=72, t_{expt} =10h) και διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της κερκετίνης διαμέσου των ομάδων -OH [Charisiadis *et al.*, 2010].

6.4 Εφαρμογή της Μεθοδολογίας Αραιών Διαλυμάτων σε Ακετονικό Εκχύλισμα Ρίγανης

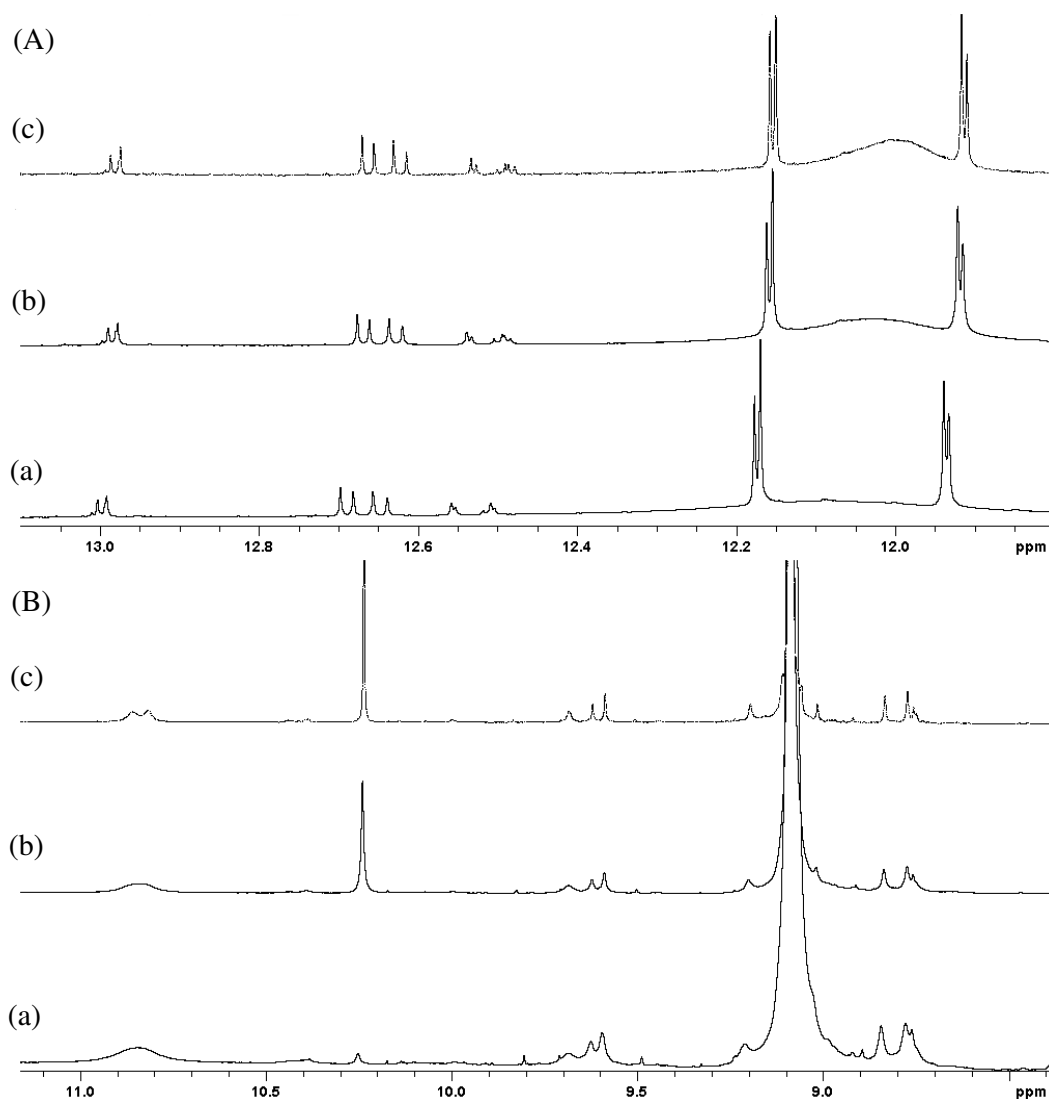
Για την εφαρμογή της παραπάνω μεθοδολογίας σε πραγματικό δείγμα επιλέχτηκε το ακετονικό εκχύλισμα της ρίγανης, λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης που παρουσιάζει και της πολυπλοκότητας της σύστασής του [Exarchou *et al.*, 2002; 2003].



Σχήμα 6.4.1: Φάσμα 500 MHz NMR-¹H ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης (80 mg) σε διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=1024, *t*_{exp}=2h).

Από το Σχήμα 6.4.1 είναι προφανής η πολυπλοκότητα που παρουσιάζει το φάσμα NMR-¹H ιδίως στην περιοχή των αρωματικών και αλειφατικών απορροφήσεων (0 - 8 ppm). Αντίθετα η περιοχή από 8 - 13 ppm χαρακτηρίζεται από σχετική απλότητα. Βέβαια, οι απορροφήσεις είναι σχετικά διευρυμένες, με εξαίρεση την περιοχή απορροφήσεων των ομάδων OH(5) των φλαβονοειδών (12 - 13 ppm) που σχηματίζουν ισχυρούς ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου.

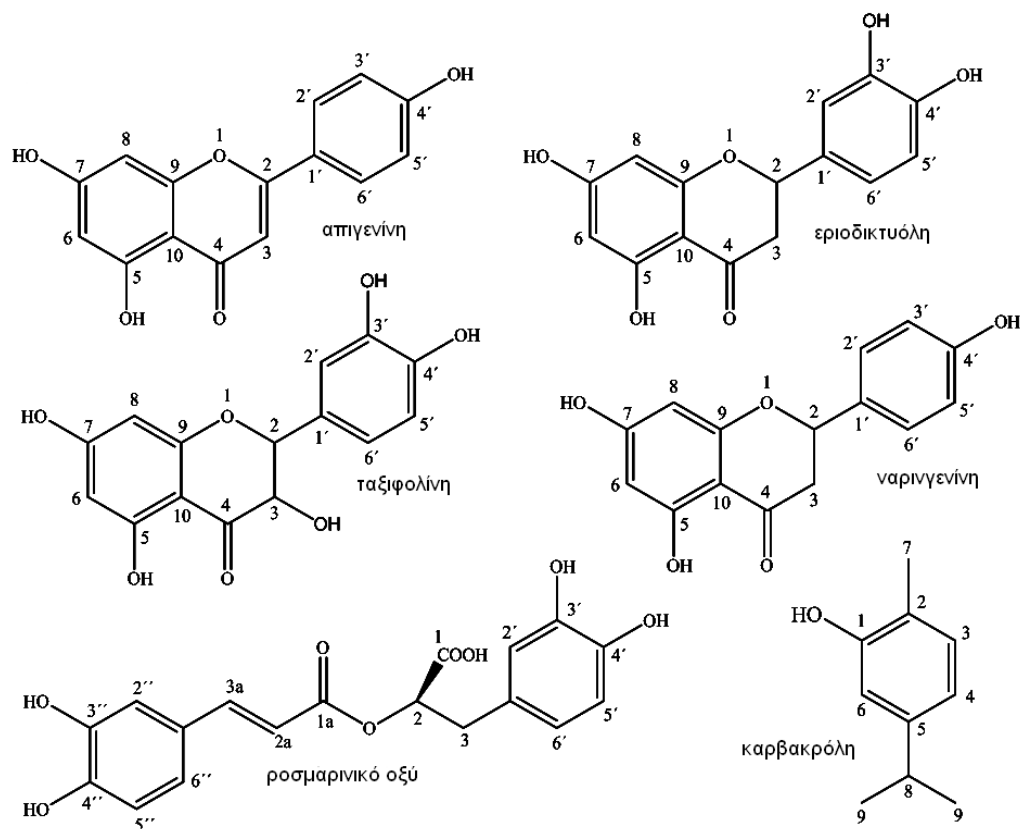
Η αραιώση του δείγματος προς μικρότερες συγκεντρώσεις, από 80 mg σε 20 mg και 5 mg εκχυλίσματος, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το φάσμα NMR-¹H των 5 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO-*d*₆ παρείχε φάσμα υψηλής διακριτικής ικανότητας, ενώ αρκετές απορροφήσεις ομάδων -OH εκλεπτύνθηκαν αισθητά (Σχήμα 6.4.2). Η εκλέπτυνση των κορυφών αποδίδεται στη μείωση της ταχύτητας διαμοριακής ανταλλαγής του πρωτονίου μεταξύ των διαφόρων ομάδων -OH και μεταξύ των ομάδων -OH και -COOH.



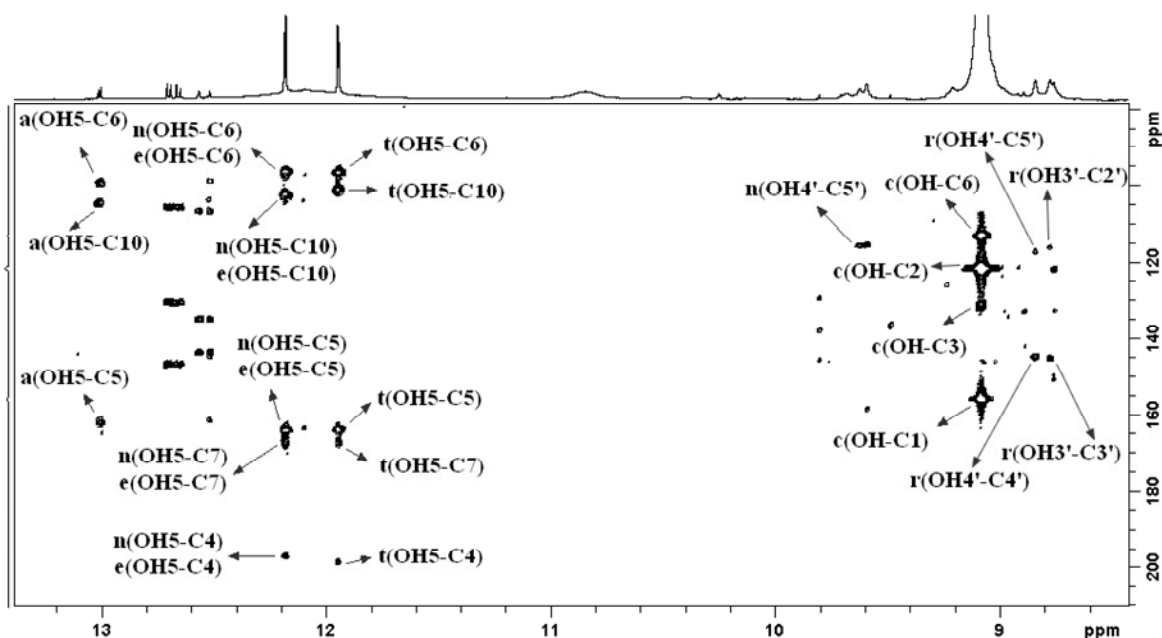
Σχήμα 6.4.2: Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO- d_6 ($T=292\text{K}$, $ns=1024$, $t_{\text{exp}}=2\text{h}$) (a) 80 mg, (b) 20 mg και (c) 5 mg εκχυλίσματος. (A) η περιοχή των 11.8 - 13.1 ppm και (B) η περιοχή των 9.4 - 11.2 ppm [[Charisiadis *et al.*, 2010](#)].

Στο Σχήμα 6.4.2 παρατηρείται ότι από την ευρεία απορρόφηση στα 10.84 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 60.2$ Hz) (Σχήμα 5.4.2Ba) προέκυψαν δύο διακριτές απορροφήσεις στα 10.81 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 15.2$ Hz) και 10.85 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 17.4$ Hz) (Σχήμα 6.4.2Bc). Από την ευρεία απορρόφηση στα 10.25 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 59.1$ Hz) προέκυψε σε μία οξεία απορρόφηση με $\Delta\nu_{1/2} \approx 2.0$ Hz. (Σχήμα 6.4.2Ba). Από τις ευρείες απορροφήσεις στην περιοχή των 9.57 με 9.67 ppm, με εύρη απορροφήσεων από 9.4 έως 16.0 Hz προέκυψαν τρεις διακριτές απορροφήσεις στα 9.67 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 7.1$ Hz), 9.61 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 3.0$ Hz) και 9.57 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 2.5$ Hz).

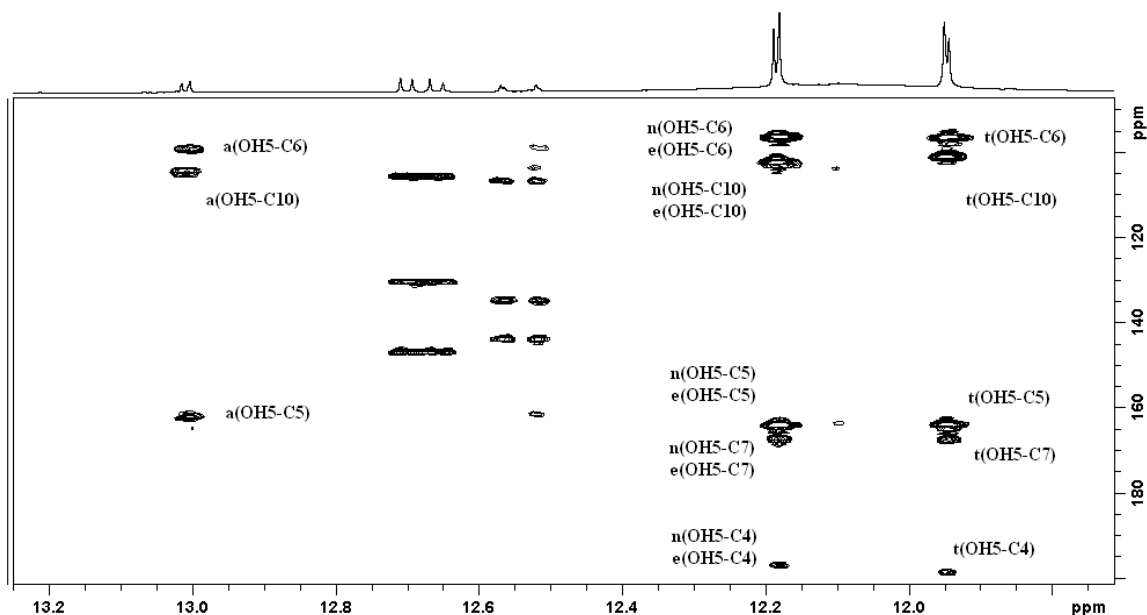
Με εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας ^1H - ^{13}C HMBC (Σχήμα 6.4.4 και 6.4.5), τόσο στο αρχικό διάλυμα του εκχυλίσματος όσο και στα αραιωμένα, προέκυψε ένας σημαντικός αριθμός κορυφών διασταύρωσης στην περιοχή των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$. Οι λαμβανόμενες συσχετίσεις ήταν ικανοποιητικές για να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των ενώσεων του εκχυλίσματος που παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.4.3. Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση, στο ακετονικό εκχύλισμα της ρίγανης με τη χρήση της οργανολογίας LC-SPE-NMR [Exarchou *et al.*, 2003] των φλαβονοειδών ταξιφολίνη, αρομαντεντρίνη, εριοδικτυόλη, νανιργενίνη και απιγενίνη, καθώς επίσης και της καρβακρόλης και του ροσμαρινικού οξέος. Για αυτό το λόγο οι ομάδες $-\text{OH}$ των παραπάνω ενώσεων αποτέλεσαν το στόχο της ανάλυσης με τη νέα μεθοδολογία.



Σχήμα 6.4.3: Συντακτικοί τύποι ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης: ταξιφολίνη (t), εριοδικτυόλη (e), νανιργενίνη (n), απιγενίνη (a), καρβακρόλη (c) και ροσμαρινικό οξύ (r).



Σχήμα 6.4.4: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=292\text{K}$, $ns=72$, $t_{\text{expt}}=14\text{h}$), όπου υποδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των ομάδων $-\text{OH}$ των ενώσεων ταξιφολίνη (t), εριοδικτυόλη (e), νανιργενίνη (n), απιγενίνη (a), καρβακρόλη (c) και ροσμαρινικό οξύ (r) [Charisiadis *et al.*, 2010].



Σχήμα 6.4.5: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=292\text{K}$, $ns=72$, $t_{\text{expt}}=14\text{h}$), όπου υποδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των ομάδων $-\text{OH}$ των ενώσεων ταξιφολίνη (t), εριοδικτυόλη (e), νανιργενίνη (n) και απιγενίνη (a) [Charisiadis *et al.*, 2010].

Οι απορροφήσεις των ομάδων –OH στα 12.18 και 9.62 ppm εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τα άτομα άνθρακα στα 96.1 (C6), 102.2 (C-10), 163.7 (C-5), 167.2 (C-7) και 196.5 (C-4) ppm and 115.4 (C-5') ppm αντίστοιχα, και αποδίδονται στα πρωτόνια OH(5) και OH(4') της νανιργενίνης. Η ομάδα –OH στα 11.93 ppm εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τα άτομα άνθρακα στα 96.2 (C-6), 100.9 (C-10), 163.8 (C-5), 167.3 (C-7) and 198.6 (C-4) ppm και αποδίδεται στο πρωτόνιο OH(5) της ταξιφολίνης. Η ομάδα –OH στα 12.99 ppm εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τα άτομα άνθρακα στα 99.1 (C-6), 104.1 (C-10) και 161.9 (C-5) ppm και αποδίδεται στο πρωτόνιο OH(5) της απιγενίνης. Η ομάδα –OH στα 12.17 ppm εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τα άτομα άνθρακα στα 96.3 (C-6), 101.9 (C-10), 163.6 (C-5), 167.3 (C-7) και 196.6 (C-4) ppm και αποδίδεται στο πρωτόνιο OH(5) της εριοδικτυόλης. Η κυρίαρχη απορρόφηση της ομάδας –OH στα 9.07 ppm, εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τα άτομα άνθρακα στα 112.8 (C-6), 121.4 (C-2), 131.4 (C-3) και 155.6 (C-1) ppm και αποδίδεται στο πρωτόνιο –OH της καρβακρόλης, που αποτελεί το κύριο συστατικό της ρίγανης. Οι απορροφήσεις των ομάδων –OH στα 8.83 και 8.77 ppm εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τα άτομα άνθρακα στα (117.1 (C-2') και 144.7 (C-3') ppm) και (115.9 (C-5') και 144.7 (C-4') ppm) αντίστοιχα, και αποδίδονται στα πρωτόνια των OH(3') και OH(4') του ροσμαρινικού οξέος.

Το σύνολο των κορυφών διασταύρωσης των ομάδων –OH, μέσω των οποίων πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων, παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 6.4.1.

Πίνακας 6.4.1: Κορυφές διασταύρωσης των ομάδων –OH με τα αντίστοιχα άτομα άνθρακα καθώς όπως προέκυψαν από πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC του ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$. Οι αντίστοιχες σταθερές σύζευξης, $^nJ_{\text{HC}}$, στις οποίες οφείλονται οι κορυφές διασταύρωσης επισημαίνονται επίσης.

ppm		C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-10	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-1
12.99	OH(5)(a)				161.9 (2J)	99.1 (3J)		104.1 (3J)					
12.18	OH(5)(n)			196.5 (4J)	163.7 (2J)	96.1 (3J)	167.2 (4J)	102.2 (3J)					
12.17	OH(5)(e)			196.6 (4J)	163.6 (2J)	96.3 (3J)	167.3 (4J)	101.9 (3J)					
11.93	OH(5)(t)			198.6 (4J)	163.8 (2J)	96.2 (3J)	167.3 (4J)	100.9 (3J)					
9.62	OH(4')(n)									115.4 (3J)		115.4 (3J)	
9.07	OH(c)	121.4 (3J)	131.4 (4J)			112.8 (3J)							155.6 (2J)
8.83	OH(3')(r)								117.1 (3J)	144.7 (2J)			
8.77	OH(4')(r)										144.7 (2J)	115.9 (3J)	

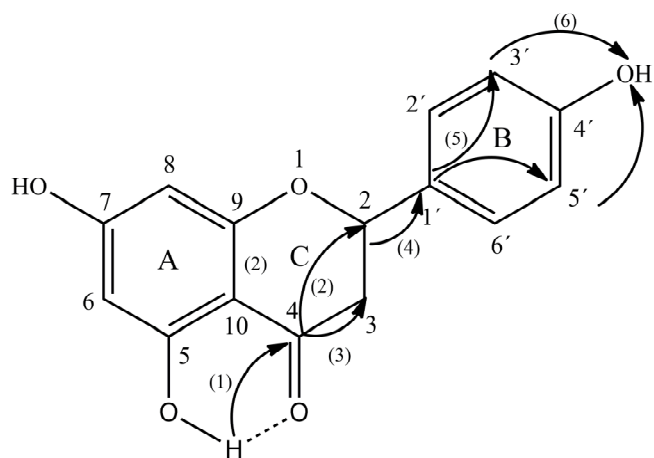
Από όσο γνωρίζουμε, η ερευνητική αυτή εργασία [Charisiadis *et al.*, 2010] αποτελεί την πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία εφαρμογής πειράματος ^1H - ^{13}C HMBC NMR για την ανάλυση φυσικών εκχυλισμάτων που βασίζεται στις απορροφήσεις των ομάδων $-\text{OH}$. Με τη χρήση αραιωμένων διαλυμάτων επιτεύχθηκε το ακόλουθο βελτιωμένο πειραματικό πρωτόκολλο ανάλυσης φυσικών εκχυλισμάτων:

- 1) Ρύθμιση του pH για ελαχιστοποίηση της ταχύτητας ανταλλαγής των ομάδων $-\text{OH}$.
- 2) Λήψη φάσματος ^1H - ^{13}C HMBC βελτιστοποιημένου για σταθερές σύζευξης στην περιοχή τιμών 6 με 10 Hz.
- 3) Λήψη φάσματος ^1H - ^{13}C HMBC βελτιστοποιημένου για τις ασθενείς σταθερές σύζευξης $^5J_{\text{HC}}$ στην περιοχή τιμών μικρότερης των 2.5 Hz.
- 4) Στην περίπτωση διευρυμένων απορροφήσεων ομάδων $-\text{OH}$, η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τη χρήση αραιωμένων διαλυμάτων του αρχικού δείγματος ανάλυσης.

Με τη μέθοδο των αραιών διαλυμάτων επιτεύχθηκε η λήψη φασμάτων υψηλής διακριτικής ικανότητας. Παρ' όλα αυτά στην περιοχή των απορροφήσεων των ομάδων OH(7) (10.5 - 11.5 ppm) δεν επιτεύχθηκε σαφής διάκριση των σημάτων συντονισμού και η λήψη των αντίστοιχων κορυφών διασταύρωσης στη δισδιάστατη φασματοσκοπία NMR. Κρίθηκε απαραίτητη, συνεπώς, η διερεύνηση και άλλων οξέων ως προς την επίτευξη φασμάτων υψηλής διακριτικής ικανότητας (βλέπετε κεφάλαιο 7).

Τα βήματα κατά σειρά που ακολουθήθηκαν, μέσω των φασμάτων ^1H - ^{13}C HMBC, για την ταυτοποίηση φλαβονοειδών, και συγκεκριμένα για τη περίπτωση της ναρινγενίνης στο παραπάνω ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης, έχουν ως εξής: αποτύπωση της σχηματικής πορείας ταυτοποίησης στο Σχήμα 6.4.6, τα βήματα προτεραιότητας στον Πίνακα 6.4.2 και η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης διαμέσου των ομάδων $-\text{OH}$ στο φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC του Σχήματος 6.4.7.

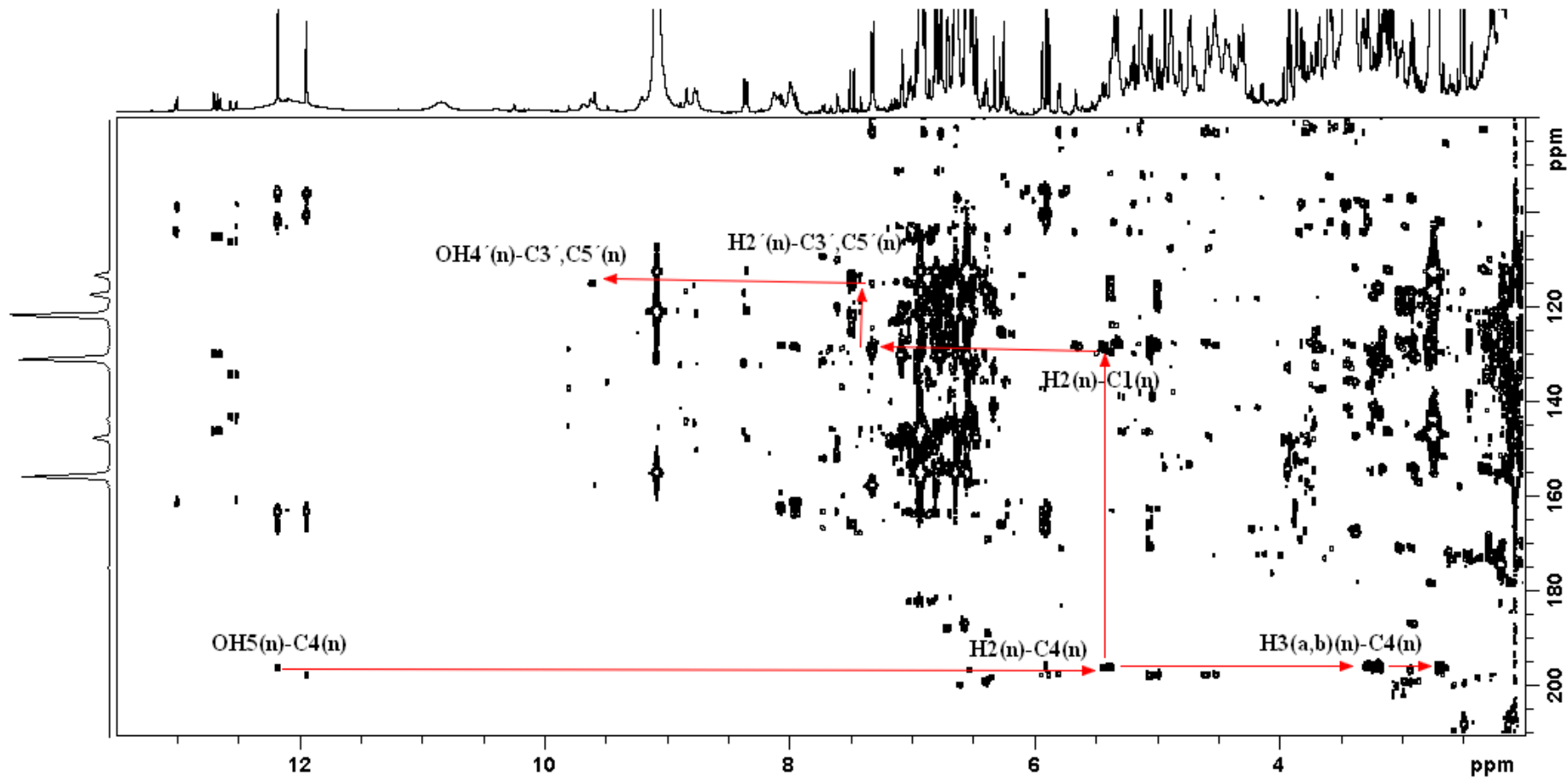
Στους πίνακες Π1-Π6 του Παραρτήματος παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του Σχήματος 6.4.3.



Σχήμα 6.4.6: Σχηματική απεικόνιση και βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης, διαμέσου των ομάδων $-OH$ της ναρινγενίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα $^1H-^{13}C$ HMBC.

Πίνακας 6.4.2: Βήματα προτεραιότητας για την ταυτοποίηση των κυριότερων κορυφών διασταύρωσης των ομάδων $-OH$ της ναρινγενίνης με τους αντίστοιχους άνθρακες, όπως προέκυψαν από το πείραμα $^1H-^{13}C$ HMBC.

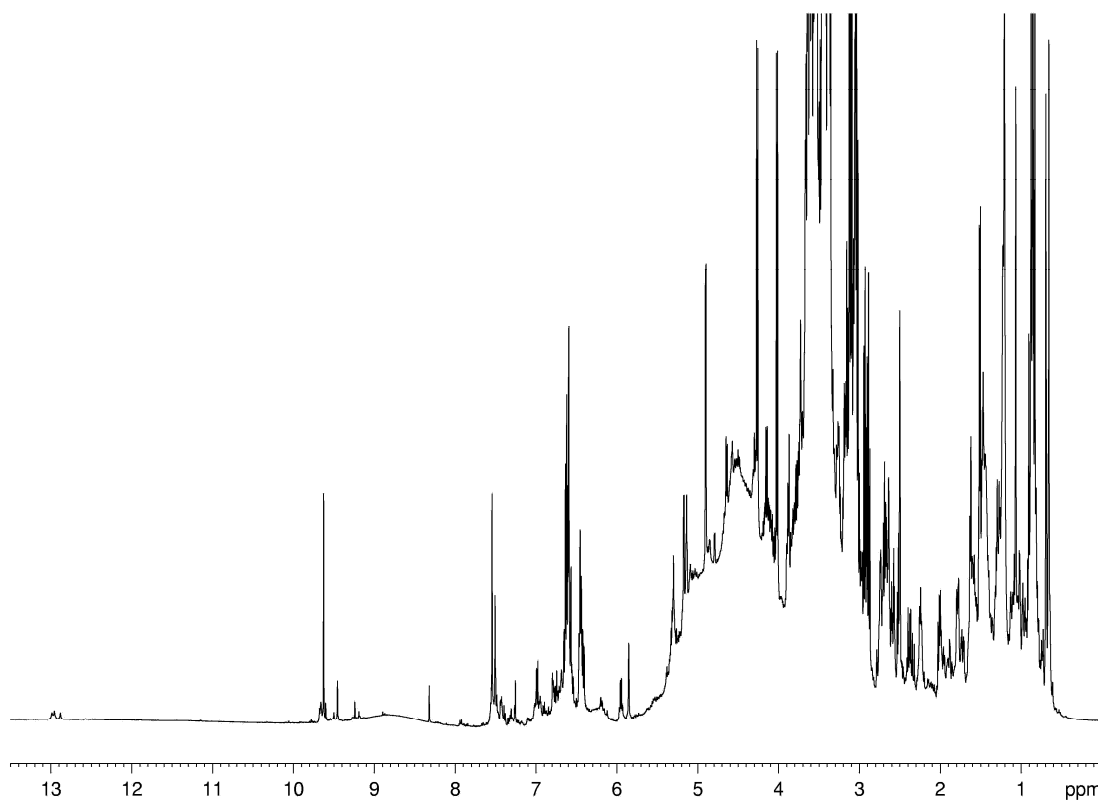
βήμα	κορυφή διασταύρωσης
(1)	OH(5) – C-4
(2)	C-4 – H-2
(3)	C-4 – H-3(a,b)
(4)	H-2 – C-1'
(5)	H-2' – C-(3', 5')
(6)	OH(4') – C-(3', 5')



Σχήμα 6.4.7: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR 500MHz ^1H - ^{13}C HMBC ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=292\text{K}$, $n_s=72$, $t_{\text{expt}}=14\text{h}$), και διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της ναρινγενίνης διαμέσου των ομάδων $-\text{OH}$ [Charisiadis *et al.*, 2010].

6.5 Εφαρμογή της Μεθοδολογίας Αραιών Διαλυμάτων σε Μεθανολικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς

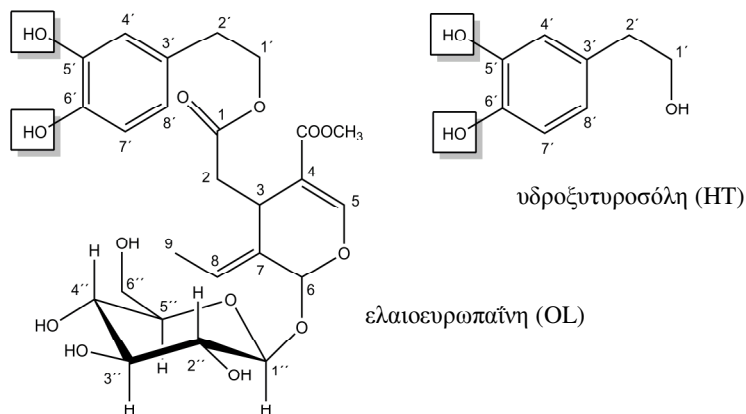
Τα φυτά της οικογένειας *Oleaceae* αποτελούν αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, καθώς σε αρκετά είδη της οικογένειας (*Chionanthus*, *Forestiera*, *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Nestegis*, *Olea*, *Osmanthus*, *Phillyrea*, *Syringa*) έχουν βρεθεί φλαβονοειδή και σεκοϊριδοειδή, με επαρκώς αποδεδειγμένες βιολογικές ιδιότητες [Nenadis & Tsimidou, 2009; Harborne & Green, 1980]. Για τα φύλλα της ελιάς (*Olea europaea* L., καλλιεργούμενη ελιά) έδειξαν έντονο ενδιαφέρον ειδικοί από τομείς της επιστήμης και της βιομηχανίας τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε υδροξυτυροσόλη και ελαιοευρωπαϊνή. Τα συστατικά αυτά έχουν σημαντικές βιοενεργές ιδιότητες, παραδείγματος χάριν στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών όπως καρδιοπαθειών, διαβήτη, παχυσαρκίας, διάφορων τύπων καρκίνου, οστεοπόρωσης, νευροεκφυλιστικών ασθενειών, καθώς και ευεργετικές δράσεις ενάντια στις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού stress [Sarkar, 2007; Boskou, 2006; Soler-Rivas *et al.*, 2000; Benavente-García *et al.*, 2000].



Σχήμα 6.5.1: Φάσμα 500 MHz NMR-¹H μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (80 mg) σε διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=1024, *t*_{exp}=2h).

Από το Σχήμα 6.5.1 είναι εμφανής η πολυπλοκότητα και η έντονη αλληλεπικάλυψη των σημάτων που παρουσιάζει το φάσμα NMR- ^1H στην περιοχή των αρωματικών και αλειφατικών απορροφήσεων (0 - 8 ppm). Στην περιοχή απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ (8 - 9 ppm) των κυρίαρχων συστατικών του εκχυλίσματος (ελαιοευρωπαϊνης, υδροξυτυροσόλης και παραγώγων αυτών) εντοπίζεται ισχυρή αλληλεπικάλυψη με την εμφάνιση ενός σύνθετου σήματος με εύρος ~ 300 Hz. Στην περιοχή των ~ 9.7 ppm εντοπίζονται οι απορροφήσεις των πρωτονίων των αλδεϋδικών παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης. Από την ένταση των απορροφήσεων και τις τιμές των αντίστοιχων ολοκληρωμάτων, συγκλίνουμε στο συμπέρασμα ότι τα αλδεϋδικά παράγωγα της ελαιοευρωπαϊνης στο εκχύλισμα βρίσκονται σε υψηλό ποσοστό (βλέπετε κεφάλαιο 7.5). Τέλος στην περιοχή απορροφήσεων των ομάδων $\text{OH}(5)$ των φλαβονοειδών (~ 13 ppm) που σχηματίζουν ισχυρούς ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, εντοπίζονται σήματα σχετικά διευρυμένα με εύρος ~ 6 Hz.

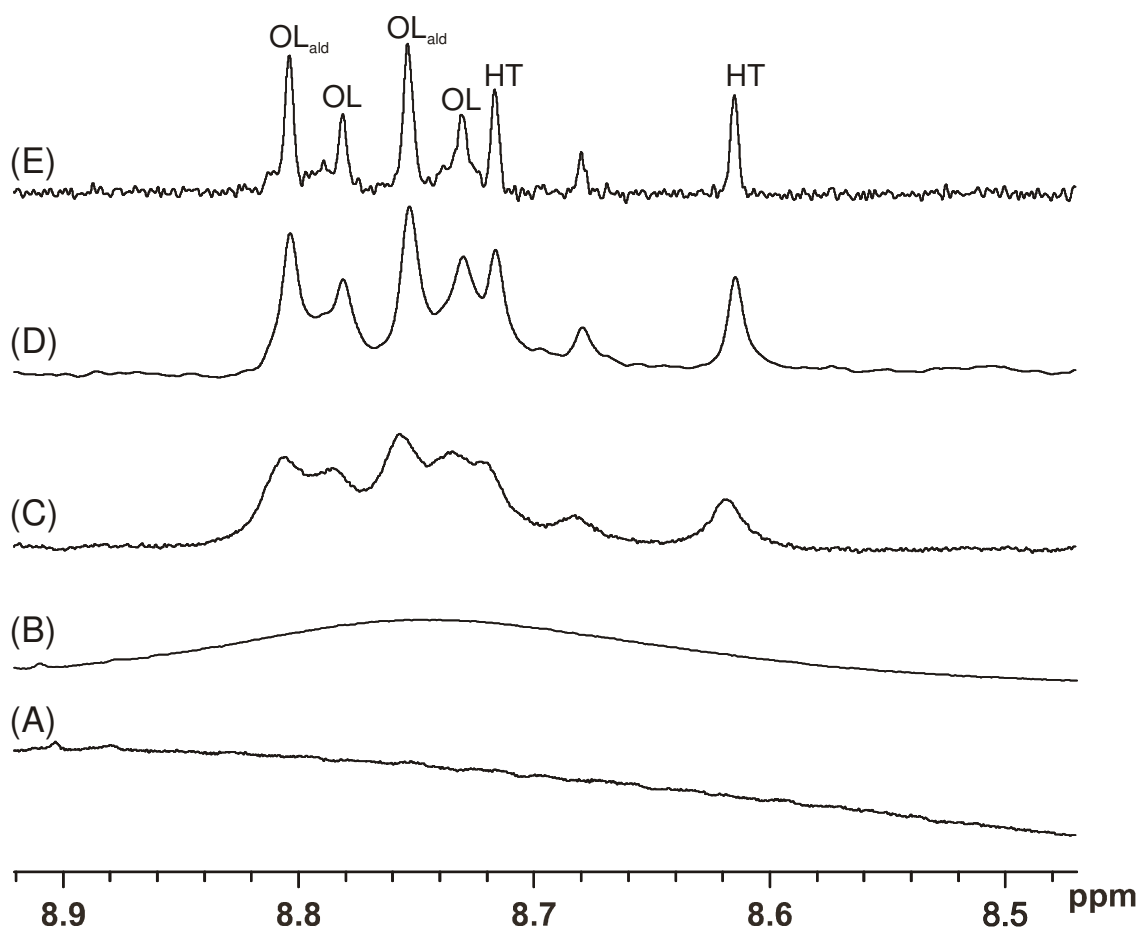
Με τη μεθοδολογία των αραιωμένων διαλυμάτων επιχειρήθηκε η αποσαφήνιση των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ των κυρίαρχων συστατικών του εκχυλίσματος (Σχήμα 6.5.2) και παραγώγων αυτών, αφού τα φλαβονοειδή υπολείπονται σημαντικά της συγκέντρωσης των παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης στο εκχύλισμα [Goulas *et al.*, 2009].



Σχήμα 6.5.2: Συντακτικοί τύποι των κυρίαρχων ενώσεων εκχυλίσματος φύλλων ελιάς: ελαιοευρωπαϊνη (OL) και υδροξυτυροσόλη (HT).

Η αραιώση του δείγματος προς μικρότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, 5 mg, 0.25 mg και 0.05 mg αντίστοιχα, έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα (Σχήμα 6.5.3). Το φάσμα NMR- ^1H εκχυλίσματος 0.05 mg σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ παρείχε φάσμα υψηλής διακριτικής ικανότητας, ενώ οι απορροφήσεις ομάδων $-\text{OH}$ του Σχήματος 6.5.2 εκλεπτύνθηκαν

σημαντικά, έτσι ώστε να προκύπτει σαφής διάκριση μεταξύ των ομάδων –OH (Σχήμα 5.5.4). Η εκλέπτυνση των κορυφών αποδίδεται στη μείωση της ταχύτητας διαμοριακής ανταλλαγής των πρωτονίων μεταξύ των διαφόρων ομάδων –OH.



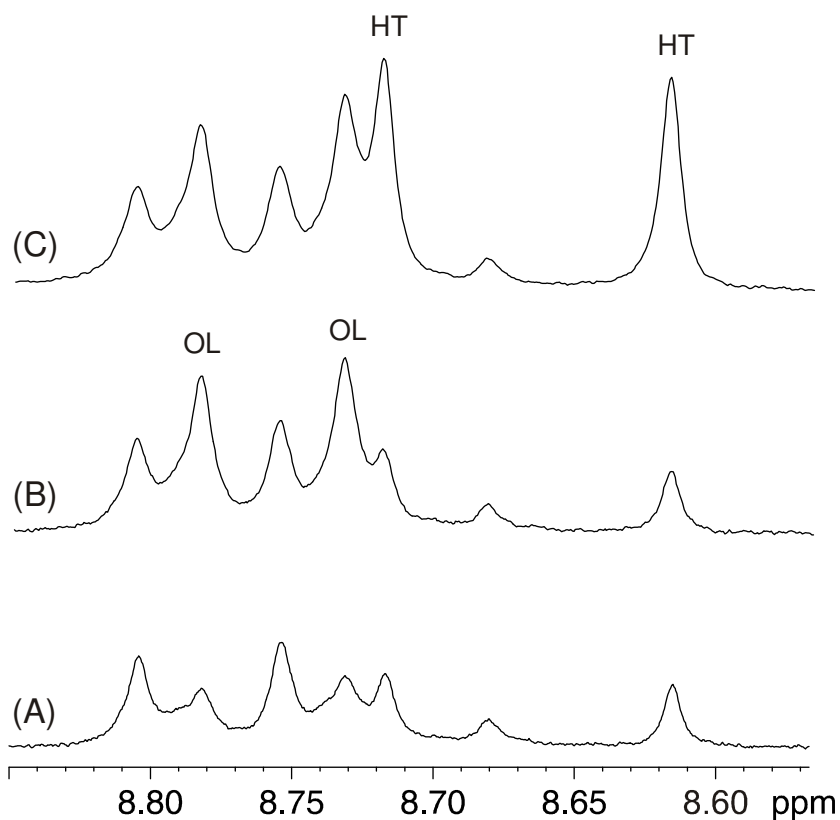
Σχήμα 6.5.3: Φάσμα 500 MHz NMR-¹H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH των κυρίαρχων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=292K). (A) 80 mg (ns=1024, *t*_{expt}=2h), (B) 5 mg (ns=1024, *t*_{expt}=2h), (C) 0.25 mg (ns=4096, *t*_{expt}=8h) και (D) 0.05 mg (ns=7168, *t*_{expt}=13.5h) εκχυλίσματος, αντίστοιχα. (E) το ίδιο φάσμα όπως το (D) μετά την εφαρμογή μετασχηματισμού Lorentz-Gauss, όπου οι απορροφήσεις των ενώσεων ελαιοευρωπαϊνή (OL), υδροξυτυροσόλη (HT) και αλδεϋδική μορφή της ελαιοευρωπαϊνής (OL_{ald}) υποδηλώνονται.

Το φάσμα του Σχήματος 6.5.3E είναι ιδιαίτερα αποκαλυπτικό όσον αφορά τις απορροφήσεις των ομάδων –OH. Με σύγκριση των απορροφήσεων των πρότυπων ενώσεων, οι απορροφήσεις στα 8.61 και 8.72 ppm, με $\Delta\nu_{1/2} \approx 2.0$ Hz, αποδίδονται στα πρωτόνια των

ομάδων –OH της υδροξυτυροσόλης, ενώ οι απορροφήσεις στα 8.73 και 8.78 ppm, με $\Delta\nu_{1/2} \approx 2.9$ Hz, αποδίδονται στα πρωτόνια των ομάδων –OH της ελαιοευρωπαΐνης. Οι δύο έντονες απορροφήσεις στα 8.75 και 8.80 ppm, με $\Delta\nu_{1/2} \approx 2.9$ Hz, αποδίδονται στα πρωτόνια των ομάδων –OH αλδεϋδικού παραγώγου της ελαιοευρωπαΐνης.

Η πολύ μικρή συγκέντρωση του εκχυλίσματος (0.05 mg) είναι αποτρεπτική για την επιτυχή εφαρμογή δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR και την ταυτοποίηση του αλδεϋδικού αυτού παραγώγου. Η παρουσία των φλαβονοειδών στο εκχύλισμα είναι πολύ μικρή σε σχέση με την υδροξυτυροσόλη, ελαιοευρωπαΐνη και παράγωγα αυτής [Charisiadis *et al.*, 2011; Goulas *et al.*, 2009], γεγονός που δεν επέτρεψε την ανίχνευση αυτών σε τόσο μικρή συγκέντρωση εκχυλίσματος. Όμως η εξαιρετική ευαισθησία των λαμβανομένων φασμάτων NMR- ^1H στην περιοχή των ομάδων –OH στα 8 - 9 ppm, επιτρέπει να εξαχθούν με ασφάλεια τα παραπάνω συμπεράσματα.

Για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης των εμφανιζόμενων απορροφήσεων των ομάδων –OH έγινε χρήση της μεθόδου της επιμόλυνσης με πρότυπες ενώσεις. Επιλέχθηκε δείγμα μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς συγκέντρωσης 0.1 mg, στο οποίο πραγματοποιήθηκε η προσθήκη γνωστών ποσοτήτων πρότυπων ενώσεων ελαιοευρωπαΐνης και υδροξυτυροσόλης.



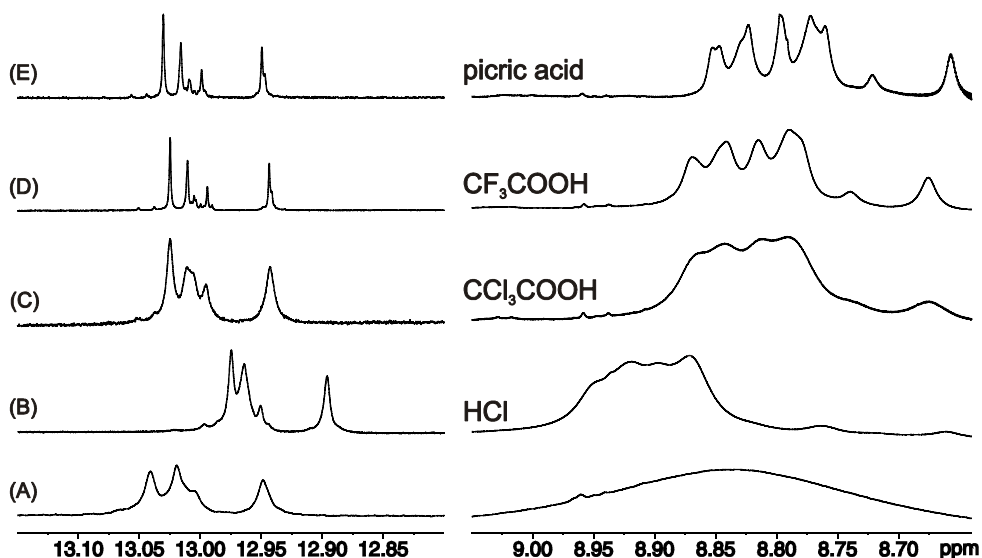
Σχήμα 6.5.4: Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$ των κυρίαρχων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, 0.1 mg σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=292\text{K}$, $n_s=7168$, $t_{\text{exp}}=13.5\text{h}$). (A) το εκχύλισμα ως έχει, (B) το (A) με προσθήκη 9.25 nmol ελαιοευρωπαϊνης, και (C) το (B) με προσθήκη 5.84 nmol υδροξυτυροσόλης. Οι απορροφήσεις των ενώσεων ελαιοευρωπαϊνη (OL) και υδροξυτυροσόλη (HT) υποδηλώνονται.

7. ΧΡΗΣΗ ΠΙΚΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

7.1 Σύγκριση Οξέων - Επιλογή Πικρικού Οξέος

Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας μείωσης της ταχύτητας ανταλλαγής πρωτονίων των ευκίνητων ομάδων –OH και τη λήψη φασμάτων NMR υψηλής διακριτικής ευκρίνειας οδηγηθήκαμε στη μελέτη και άλλων οξέων, εκτός του HCl οξέος, για την οξίνιση του DMSO-*d*₆. Η συγκριτική μελέτη περιλαμβάνει τα ακόλουθα οξέα: υδροχλωρικό οξύ (HCl pK_a -2.2), τριχλωροοξικό οξύ (CCl₃COOH pK_a 0.64), τριφθοροοξικό οξύ (CF₃COOH pK_a 0.23) και πικρικό οξύ (PA pK_a 0.25) [Lide, 2006-2007]. Για την μελέτη της επίδρασης της προσθήκης αυξανόμενων ποσοτήτων οξέων, επιλέχθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς, στο οποίο πραγματοποιήθηκε διάκριση των απορροφήσεων των ομάδων –OH με τη μέθοδο των αραιών διαλυμάτων (βλέπετε κεφάλαιο 6.5).

Στο Σχήμα 7.1.1 φαίνεται το βέλτιστο που επιτεύχθηκε σε κάθε περίπτωση για τη διάκριση των απορροφήσεων των ομάδων –OH.

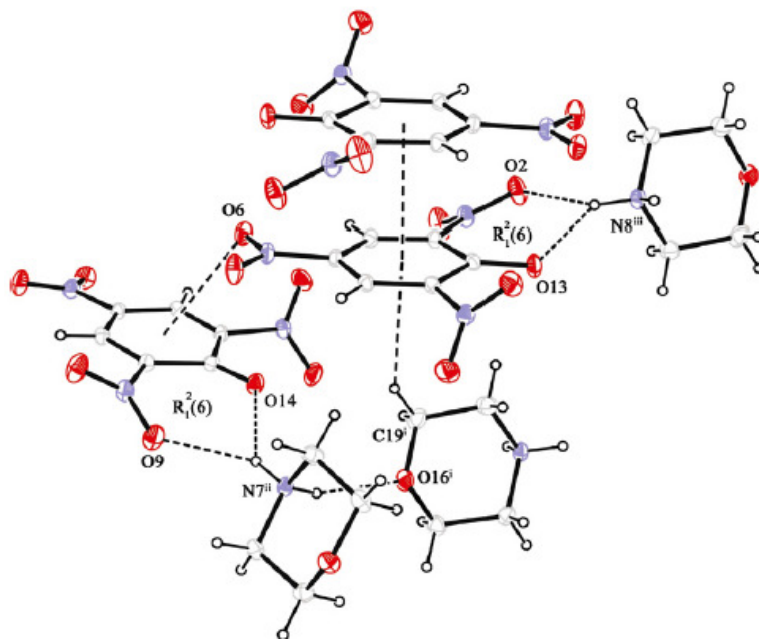


Σχήμα 7.1.1: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR-¹H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH των κυρίαρχων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, 20.0 mg σε διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{exp}=32min). (A) απουσία οξέων; (B) με λόγο μαζών [HCl]/[εκχύλισμα] = 6.5 x 10⁻³, (3.57 μmol HCl); (C) με λόγο μαζών [CCl₃COOH]/[εκχύλισμα] = 211.3 x 10⁻³, (25.86 μmol TCA); (D) με λόγο μαζών [CF₃COOH]/[εκχύλισμα] = 25.4 x 10⁻³, (4.45 μmol TFA); (E) με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 49.3 x 10⁻³, (4.30 μmol PA). Τα (B), (C) και (D) παρουσιάζουν τη βέλτιστη διακριτική ικανότητα που επιτεύχθηκε σε κάθε περίπτωση [Charisiadis *et al.*, 2011].

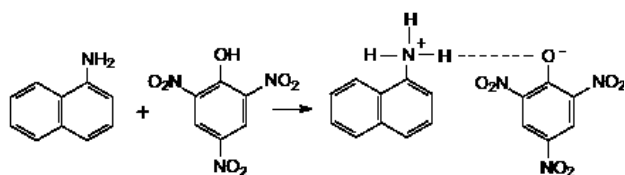
Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 6.5 στην περιοχή των 8 - 9 ppm απορροφούν οι ομάδες -OH των ενώσεων υδροξυτυροσόλη, ελαιοευρωπαϊνή και παραγώγων τους, ενώ στην περιοχή των ~ 13 ppm απορροφά η ομάδα OH(5) των φλαβονοειδών, λουτεολίνη, λουτεολίνη-4'-O-γλυκοζίτη και λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίτη, που σχηματίζει ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου [Charisiadis *et al.*, 2011].

Από το Σχήμα 7.1.1 είναι φανερό ότι το πικρικό οξύ παρουσιάζει πλεονεκτήματα για τη διάκριση των απορροφήσεων -OH σε σχέση με τα υπόλοιπα οξέα και στις δύο αυτές περιοχές του φάσματος NMR. Με τη χρήση του πικρικού οξέος λήφθηκαν απορροφήσεις ομάδων -OH με εύρη απορροφήσεων από 0.6 έως 1.5 Hz, σε σύγκριση με εύρη απορροφήσεων που κυμαίνονταν από 3 έως 6 Hz που λήφθηκαν με τη χρήση του HCl οξέος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το πικρικό οξύ παρουσιάζει επιπλέον το πλεονέκτημα ότι ως στερεό είναι πιο εύκολο στη χρήση σε σύγκριση π.χ. με το τριφθοροοξικό οξύ που είναι υγρό και ιδιαίτερα πτητικό.

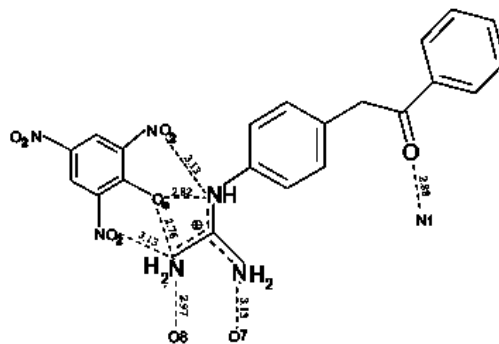
Το πικρικό οξύ (Σχήμα 7.2.1) είναι μία φαινόλη που φέρει τρεις νιτροομάδες σε 2, 4 και 6'-θέσεις στο δακτύλιο και χαρακτηρίζεται από χαμηλή τιμή pK_a (0.42) [Lide, 2006-2007]. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές ότι το πικρικό οξύ αλληλεπιδρά με αρωματικά συστήματα με τη δημιουργία δομών συσσωματωμάτων μέσω αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων (stacking modes) [Refat *et al.*, 2010; Bindya *et al.*, 2007] (Σχήμα 7.1.2), αλληλεπιδράσεων μέσω δεσμών υδρογόνου [Singh & Ahmad, 2010; Zeslawska *et al.*, 2007; Ilczyszyn & Ratajczak, 1995] (Σχήμα 7.1.3 και 7.1.4) καθώς και σχηματισμού συμπλόκων μεταφοράς φορτίου [Teleb & Gaballa, 2005] (Σχήμα 7.1.5). Η δυνατότητα, συνεπώς, του πικρικού οξέος να δρά όχι μόνο ως οξύ αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πιθανόν να έχει πλεονεκτήματα σε σχέση με τα υπόλοιπα μη - αρωματικά οξέα.



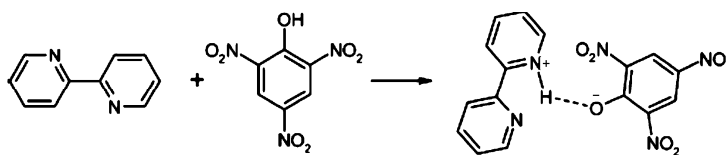
Σχήμα 7.1.2: Τμήμα κρυσταλλικής δομής της [(Hmorp)(pa)] (σύμπλοκο μορφολίνης με πικρικό οξύ) όπου υποδηλώνεται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου στο δακτύλιο $R_1^2(6)$, καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις π - π , NO- π και CH- π [Refat *et al.*, 2010].



Σχήμα 7.1.3: Αλληλεπίδραση μεταξύ 1-ναφθαλαμίνης και πικρικού οξέος [Singh & Ahmad, 2010].



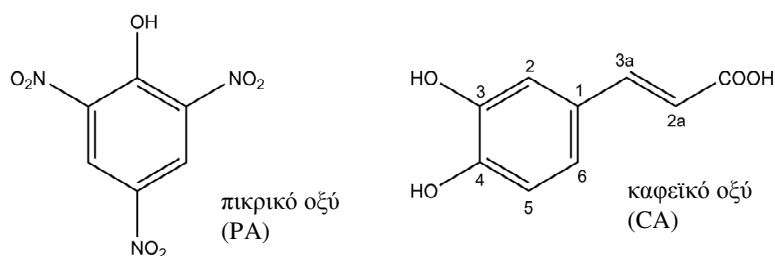
Σχήμα 7.1.4: Δεσμοί υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) κατά την αλληλεπίδραση της 2-(4-γουανιδυλοφαινυλο)-1-φαινυλο-αιθανόνης (GPPE) με πικρικό οξύ [Zeslawska *et al.*, 2007].



Σχήμα 7.1.5: Αλληλεπίδραση της 2,2-διπυριδίνης, ως δότη, και του πικρικού οξέος, ως δέκτη, προς σχηματισμό συμπλόκου άλατος με μοριακό λόγο 1:1 και ιοντικού δεσμού υδρογόνου [Teleb & Gaballa, 2005].

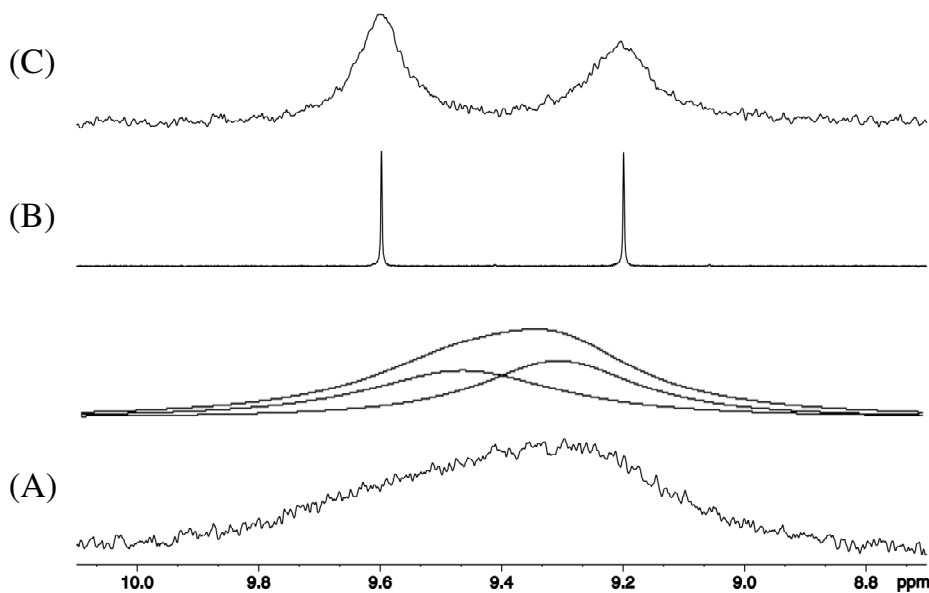
7.2 Εφαρμογή Πικρικού Οξέος σε Πρότυπη Ένωση

Το καφεϊκό οξύ (Σχήμα 7.2.1) είναι ένα φυσικό προϊόν, κατατάσσεται στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και απαντάται σε αρκετά εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων αυτούσιο, είτε ως εστέρας (ροσμαρινικό οξύ), είτε ως γλυκοζυλιωμένο παράγωγο.

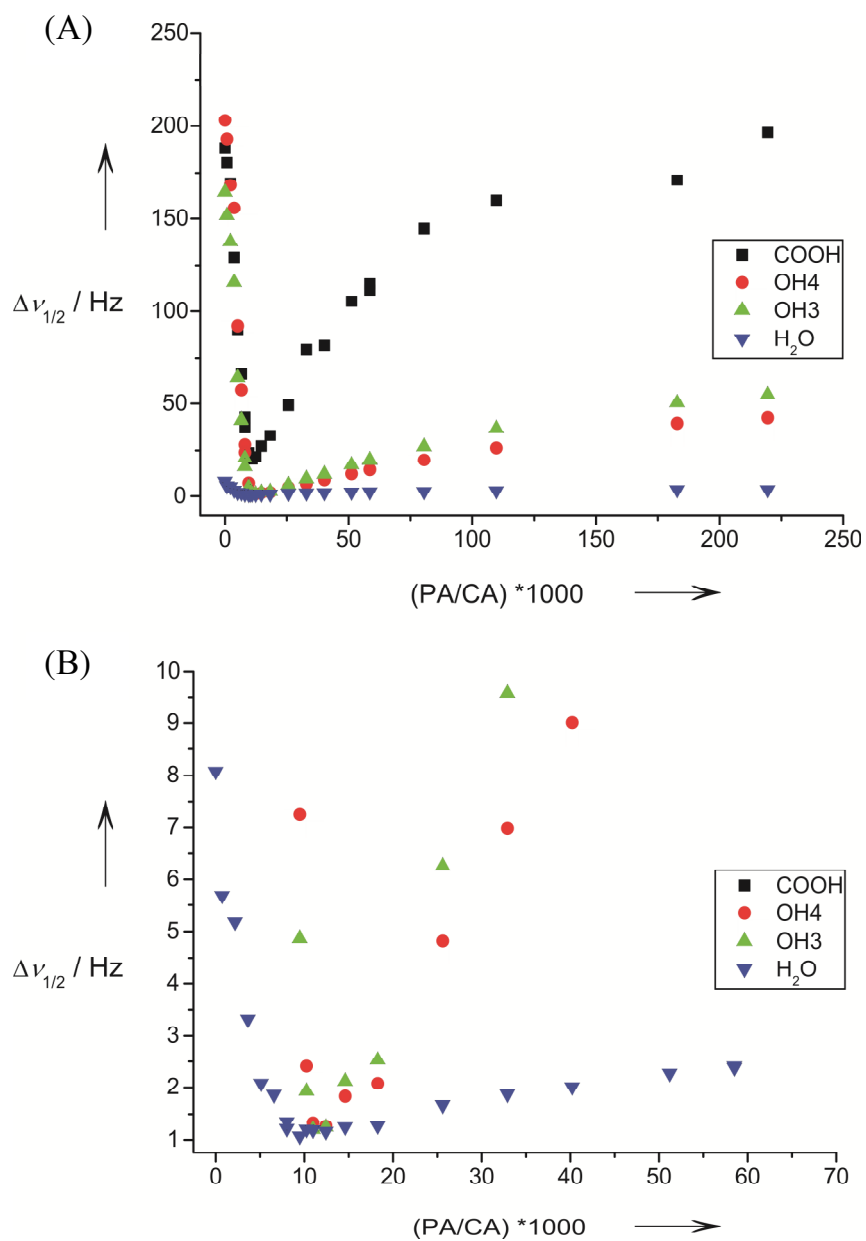


Σχήμα 7.2.1: Συντακτικοί τύποι πικρικού οξέος (PA) και καφεϊκού οξέος (CA).

Το φάσμα NMR- ^1H του καφεϊκού οξέος ($C = 5.7 \times 10^{-3} \text{ M}$) σε $\text{DMSO}-d_6$ εμφανίζει εξαιρετικά ευρείες και ισχυρά αλληλοεπικαλυπτόμενες απορροφήσεις των φαινολικών υδροξυλίων $\text{OH}(4)$ και $\text{OH}(3)$ με εύρος κορυφών 203 Hz και 164 Hz, αντίστοιχα (Σχήμα 7.2.2A). Με την προσθήκη προοδευτικά αυξανόμενης ποσότητας διαλύματος πικρικού οξέος συγκέντρωσης $2.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ σε $\text{DMSO}-d_6$ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του εύρους των απορροφήσεων (Σχήμα 7.2.2B). Με αναλογία συγκεντρώσεων πικρικού οξέος ως προς καφεϊκό οξύ $[\text{PA}]/[\text{CA}] \approx 12 \times 10^{-3}$, επιτεύχθηκε ελάχιστο στο εύρος των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$. Συγκεκριμένα για την ομάδα $\text{OH}(4)$ επιτεύχθηκε $\Delta\nu_{1/2} \approx 1.27 \text{ Hz}$ και για την $\text{OH}(3)$ $\Delta\nu_{1/2} \approx 1.25 \text{ Hz}$ με συνολική μείωση του εύρους των απορροφήσεων ήταν κατά ένα παράγοντα μεγαλύτερο του 100. Για την ίδια αναλογία συγκεντρώσεων $[\text{PA}]/[\text{CA}]$, επιτεύχθηκε και το ελάχιστο του εύρους των απορροφήσεων της ομάδας $-\text{COOH}$ ($\Delta\nu_{1/2} \approx 20 \text{ Hz}$) και του H_2O ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.5 \text{ Hz}$) (Σχήμα 7.2.3). Με την περαιτέρω προσθήκη διαλύματος πικρικού οξέος επέρχεται σημαντική διεύρυνση των απορροφήσεων αυτών των ομάδων (Σχήμα 7.2.2C).



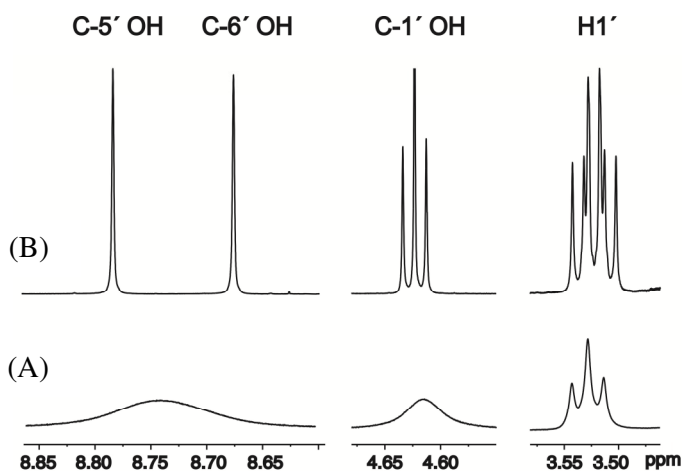
Σχήμα 7.2.2: Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H καφεϊκού οξέος περιοχής απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$ ($C = 5.7 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T=292\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{exp}}=4\text{min}$) (A) σε $\text{DMSO}-d_6$ (το επάνω τμήμα αποτελεί προσομοίωση των κορυφών του σύνθετου σήματος με δύο ευρείες απορροφήσεις $\Delta\nu_{1/2} \approx 203$ και $\Delta\nu_{1/2} \approx 164 \text{ Hz}$, αντίστοιχα), (B) και (C) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αναλογία συγκεντρώσεων $[\text{PA}]/[\text{CA}]$ 12×10^{-3} και 219×10^{-3} , αντίστοιχα [Charisiadis *et al.*, 2011].



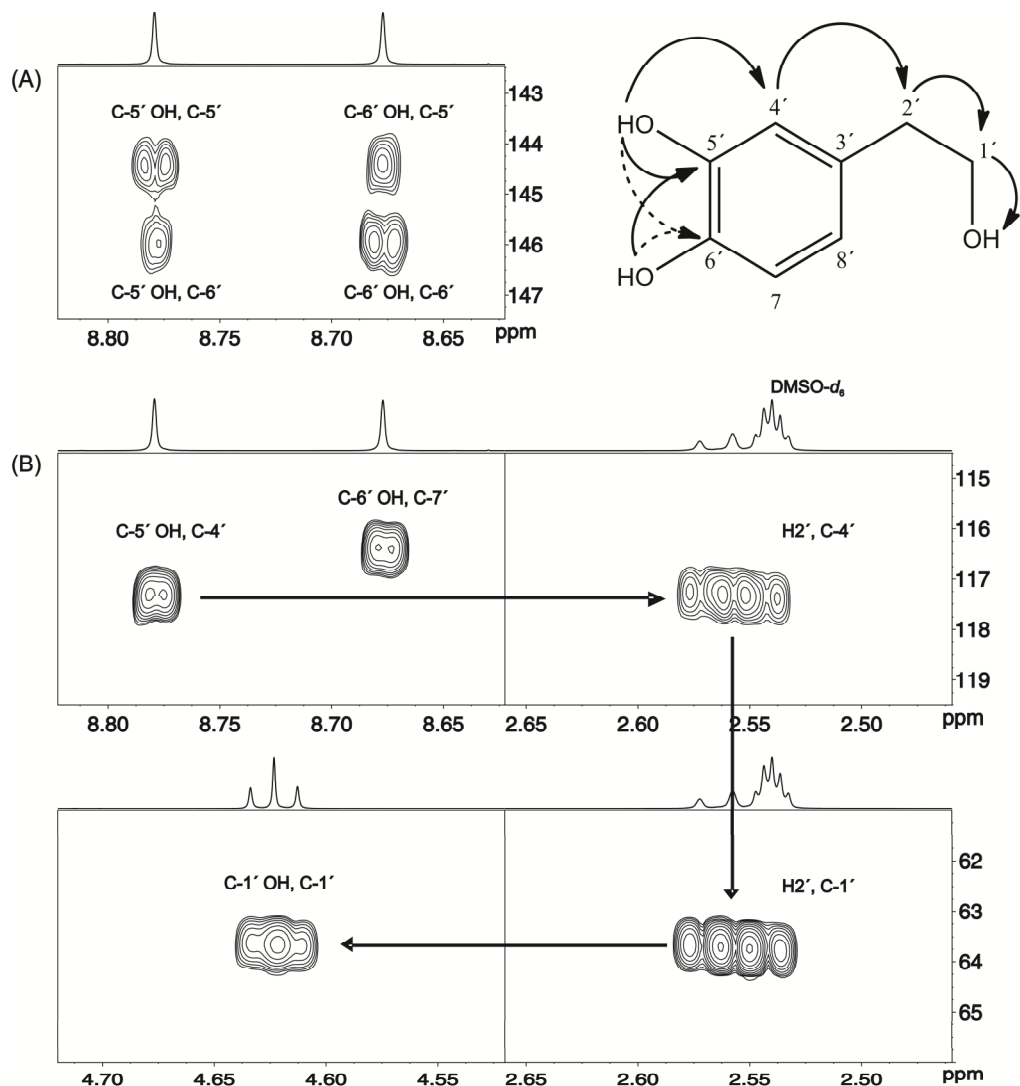
Σχήμα 7.2.3: Γραφική απεικόνιση του εύρους των απορροφήσεων, $\Delta\nu_{1/2}$, ως προς το λόγο συγκέντρωσης πικρικού οξέος προς καφεϊκό οξύ, $[\text{PA}]/[\text{CA}]$, των ομάδων OH(4), OH(3) και $-\text{COOH}$ του καφεϊκού οξέος και του H₂O, του διαλύματος του Σχήματος 7.2.2.

Εξίσου ενδιαφέροντα αποτελέσματα λήφθηκαν κατά την προσθήκη πικρικού οξέος στην πρότυπη ένωση υδροξυτυροσόλη (Σχήμα 6.5.2), η οποία αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα συστατικά του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς (βλέπετε κεφάλαιο 6.5).

Το φάσμα NMR- ^1H της υδροξυτυροσόλης ($C = 19.6 \times 10^{-3} \text{ M}$) σε $\text{DMSO}-d_6$ εμφανίζει μία ευρεία απορρόφηση της τάξης των 47.6 Hz που οφείλεται στις υδροξυλικές ομάδες $\text{OH}(5')$ και $\text{OH}(6')$ και μία ευρεία απορρόφηση των 18.5 Hz που οφείλεται στην ομάδα $-\text{CH}_2\text{OH}$ (Σχήμα 7.2.4A). Με τη προσθήκη προοδευτικά αυξανόμενης ποσότητας διαλύματος πικρικού οξέος συγκέντρωσης $2.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ σε $\text{DMSO}-d_6$ επιτεύχθηκε σημαντική μείωση του εύρους των απορροφήσεων (Σχήμα 7.2.4B). Με αναλογία συγκεντρώσεων πικρικού οξέος ως προς υδροξυτυροσόλη $[\text{PA}]/[\text{HT}] \approx 1.3 \times 10^{-3}$, επιτεύχθηκε ελάχιστο στο εύρος των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$, αλλά και σημαντική βελτίωση της απορρόφησης του πρωτονίου $\text{H}1'$. Οι εξαιρετικά λεπτές απορροφήσεις ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.0 \text{ Hz}$) επέτρεψαν την εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC, λαμβάνοντας σημαντικό αριθμό κορυφών διασταύρωσης των ομάδων $-\text{OH}$ στις θέσεις $5'$, $6'$ και $1'$. Για παράδειγμα, οι κοινές κορυφές διασταύρωσης $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ των ομάδων $\text{OH}(5')$ και $\text{OH}(6')$ με τους άνθρακες C- $6'$ and C- $5'$ υποδεικνύουν ότι οι δύο αυτές ομάδες $-\text{OH}$ βρίσκονται μεταξύ τους σε θέση *ortho* (Σχήμα 6.2.5A). Η κορυφή διασταύρωσης $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ της ομάδας $\text{OH}(5')$ με τον άνθρακα C- $4'$ είναι εξαιρετικής διαγνωστικής αξίας, διότι επιτρέπει την περαιτέρω διασύνδεση με το πρωτόνιο $\text{H}2'$, και μέσω της κορυφής διασταύρωσης $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ με τον άνθρακα C- $1'$ και στη συνέχεια με την απορρόφηση της ομάδας $\text{OH}(1')$ (Σχήμα 7.2.5B).



Σχήμα 7.2.4: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H υδροξυτυροσόλης ($C = 19.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T=288\text{K}$, $n_s=16$, $t_{\text{exp}}=2\text{min}$) (A) σε $\text{DMSO}-d_6$ και (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αναλογία συγκεντρώσεων $[\text{PA}]/[\text{HT}] = 1.3 \times 10^{-3}$ [Charisiadis *et al.*, 2011].

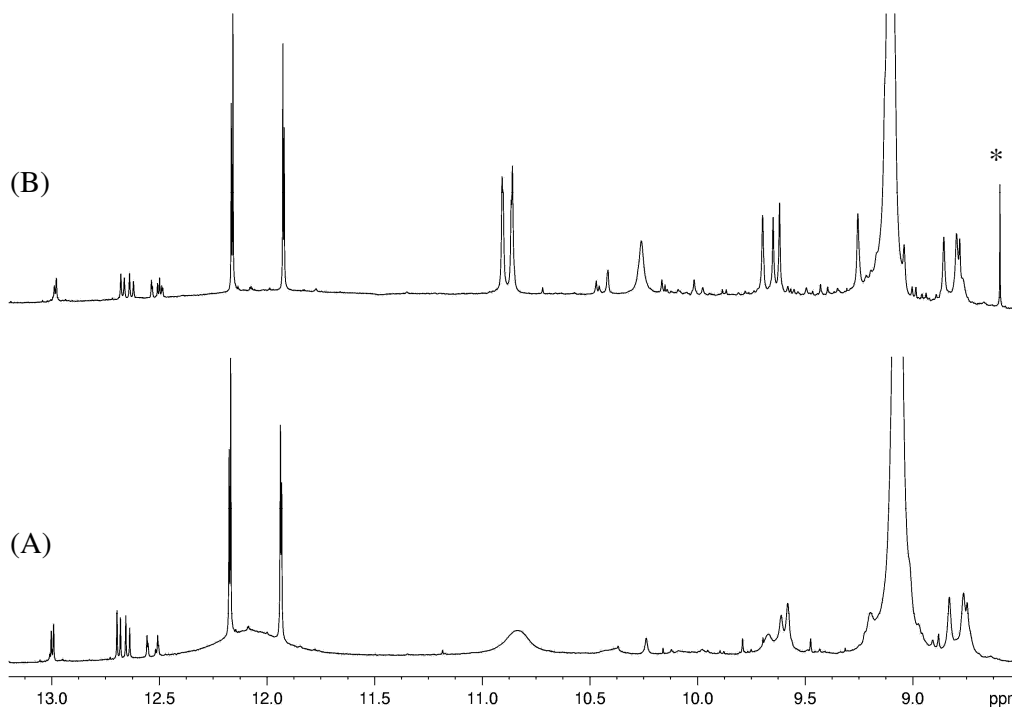


Σχήμα 7.2.5: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC NMR του διαλύματος του Σχήματος 7.2.4A ($C = 19.6 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T=288\text{K}$, $ns=8$, $t_{\text{expt}}=1\text{h}$) [Charisiadis *et al.*, 2011].

Το πικρικό οξύ, λόγω των εξαιρετικών αποτελεσμάτων στην εκλέπτυνση των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ σε πρότυπες ενώσεις, επιλέχθηκε περαιτέρω για την εφαρμογή της μεθοδολογίας σε εκχύλισμα φυσικού προϊόντος και συγκεκριμένα στο ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης.

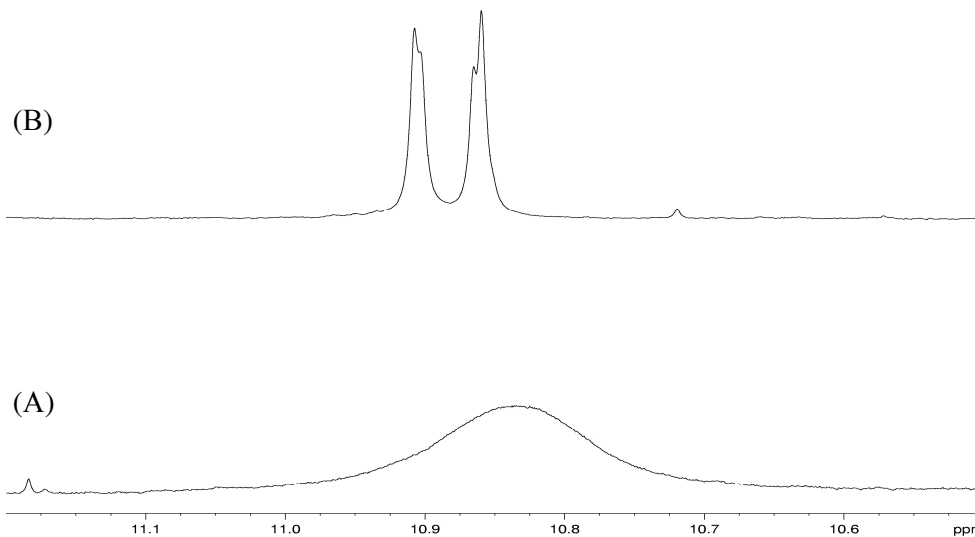
7.3 Εφαρμογή σε Ακετονικό Εκχύλισμα Ρίγανης - Επίδραση της Θερμοκρασίας

Για την εφαρμογή της μεθοδολογίας προσθήκης πικρικού οξέος επιλέχθηκε το ακετονικό εκχύλισμα ρίγανης ποσότητας 80 mg. Στο Σχήμα 7.3.1 απεικονίζεται το φάσμα NMR-¹H του εκχυλίσματος πριν και μετά τη προσθήκη του οξέος.

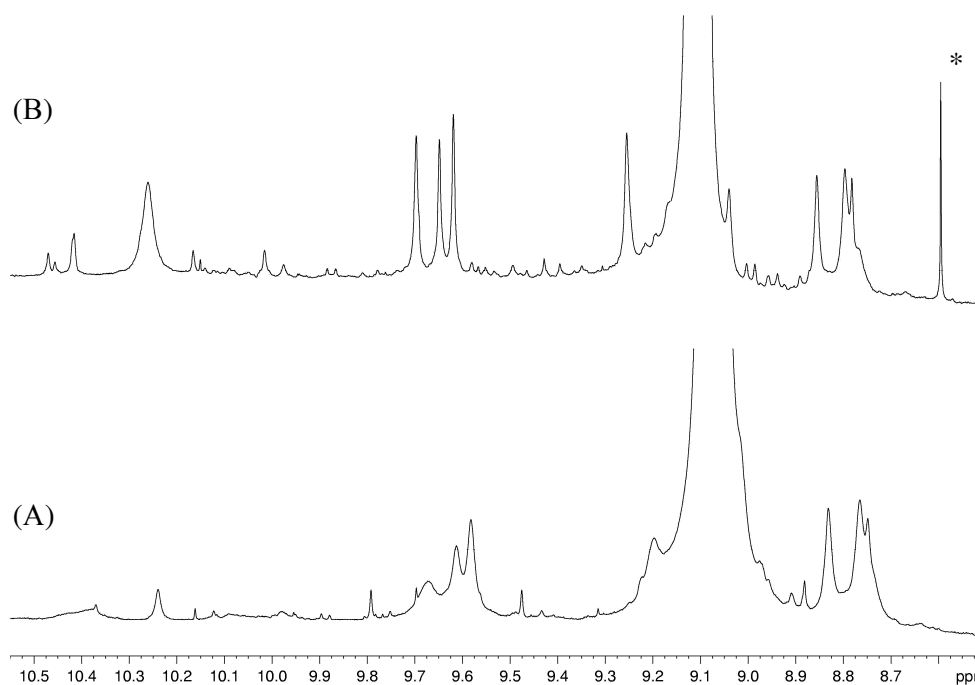


Σχήμα 7.3.1: Φάσμα 500 MHz NMR-¹H δείγματος 80 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{exp}=30min) (Επιδεικνύεται η περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH. (A) απουσία πικρικού οξέος, (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 0.6 x 10⁻³. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος.

Από το Σχήμα 7.3.1 γίνεται εμφανής η εκλέπτυνση των απορροφήσεων των ομάδων –OH και η σημαντική αύξηση της διακριτικής τους ικανότητας. Η σημαντικότερη βελτίωση παρατηρείται στην περιοχή των 10.5 - 11.5 ppm, που είναι η περιοχή των απορροφήσεων των ομάδων OH(7) των φλαβονοειδών (Σχήμα 7.3.2) καθώς επίσης και πλησίον της απορρόφησης της καρβακρόλης που αποτελεί κυρίαρχου συστατικού της ρίγανης, στα 9 ppm (Σχήμα 7.3.3).

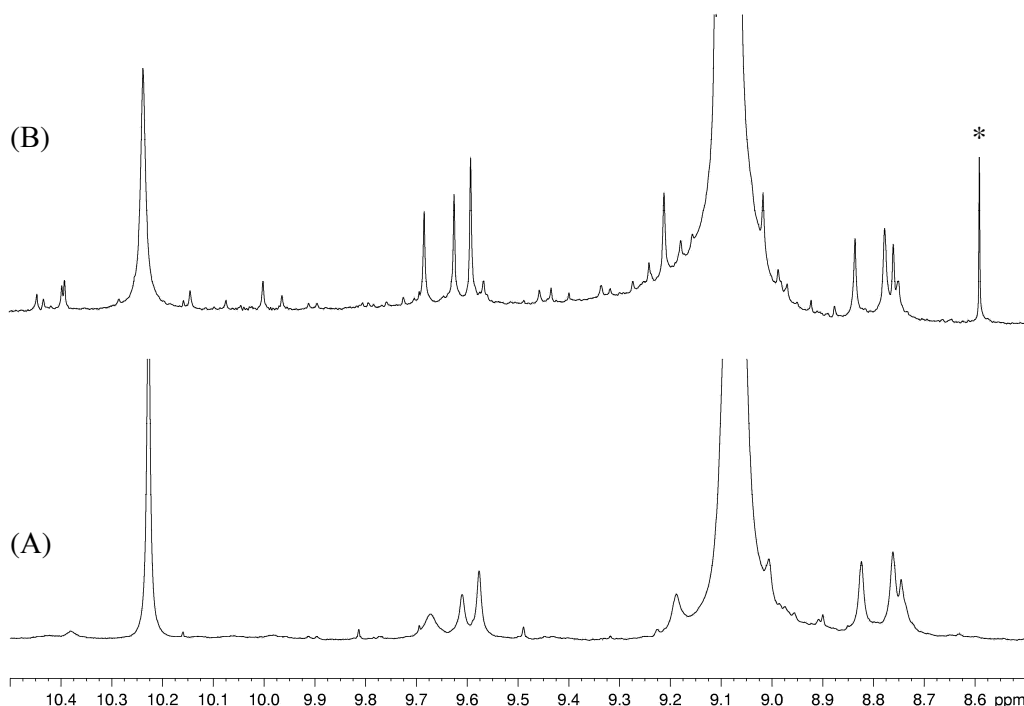


Σχήμα 7.3.2: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) φάσματος 500 MHz NMR- ^1H δείγματος 80 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO- d_6 ($T=292\text{K}$, $ns=256$, $t_{\text{exp}}=30\text{min}$). (A) Απουσία πικρικού οξέος, και (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών $[\text{PA}]/[\text{εκχύλισμα}] = 0.6 \times 10^{-3}$.



Σχήμα 7.3.3: Επιλεγμένη περιοχή απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$ φάσματος 500 MHz NMR- ^1H δείγματος 80 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO- d_6 ($T=292\text{K}$, $ns=256$, $t_{\text{exp}}=30\text{min}$). (A) Απουσία πικρικού οξέος, και (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών $[\text{PA}]/[\text{εκχύλισμα}] = 0.6 \times 10^{-3}$. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος.

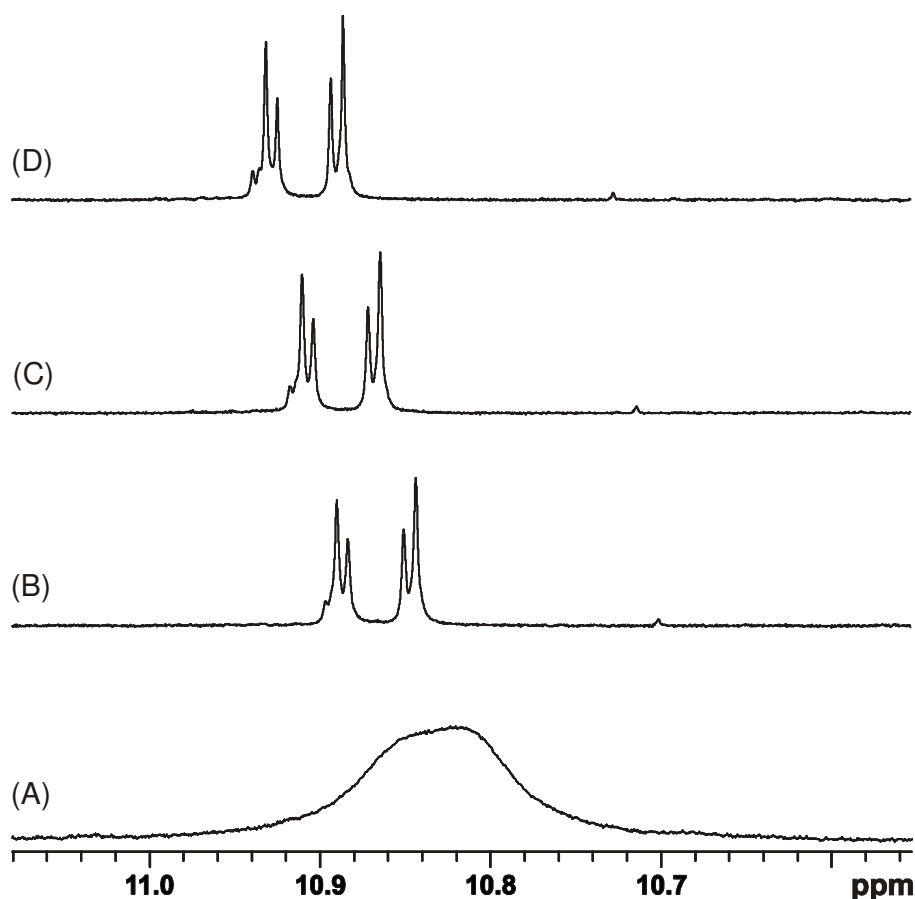
Η προσθήκη επιπλέον ποσότητας οξέος οδήγησε στη διεύρυνση των απορροφήσεων των ομάδων $-OH$. Για αυτό το λόγο και σύμφωνα με τη μεθοδολογία των αραιωμένων διαλυμάτων επιλέχθηκε δείγμα του ίδιου εκχυλίσματος μικρότερης ποσότητας (20 mg) για περαιτέρω μελέτη. Στα παρακάτω Σχήματα εμφανίζεται η επίδραση του πικρικού οξέος στην εκλέπτυνση των ομάδων $-OH$, αλλά και στην εμφάνιση απορροφήσεων, όπως αυτές των $OH(7)$. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και υπάρχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα των ομάδων $-OH$.



Σχήμα 7.3.4: Επιλεγμένη περιοχή απορρόφησης των ομάδων $-OH$ φάσματος 500 MHz NMR- 1H δείγματος 20 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε $DMSO-d_6$ ($T=292K$, $ns=256$, $t_{exp}=30min$). (A) Απουσία πικρικού οξέος, και (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών $[PA]/[εκχύλισμα] = 2.3 \times 10^{-3}$. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος.

Για τη περαιτέρω μείωση της ταχύτητας ανταλλαγής των ευκίνητων ομάδων $-OH$ λήφθηκαν φάσματα NMR σε σταδιακά ελαττούμενη θερμοκρασία. Η βελτίωση στα εύρη απορροφήσεων ήταν σημαντική και ιδιαίτερα στην περιοχή των απορροφήσεων των ομάδων $OH(7)$ (Σχήμα 7.3.5), γεγονός που οδηγεί στη περαιτέρω βελτίωση του πρωτοκόλλου εργασίας με τη λήψη φασμάτων στη χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το σημείο πήξεως του διαλύματος ($\sim 282 K$) είναι σαφώς χαμηλότερο του σημείου

πήξεως του καθαρού διαλύτη. Δεδομένου ότι η διαφορά αυτή είναι συνάρτηση τόσο της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος όσο και της ποσότητας του ύδατος που περιέχει το διάλυμα, σε κάθε περίπτωση έγινε προσεκτικός έλεγχος της πήξεως του διαλύματος με βάση την επίδραση του συστήματος σταθεροποίησης (locking) του οργάνου. Πήξη του διαλύματος επιφέρει απώλεια του συστήματος σταθεροποίησης.

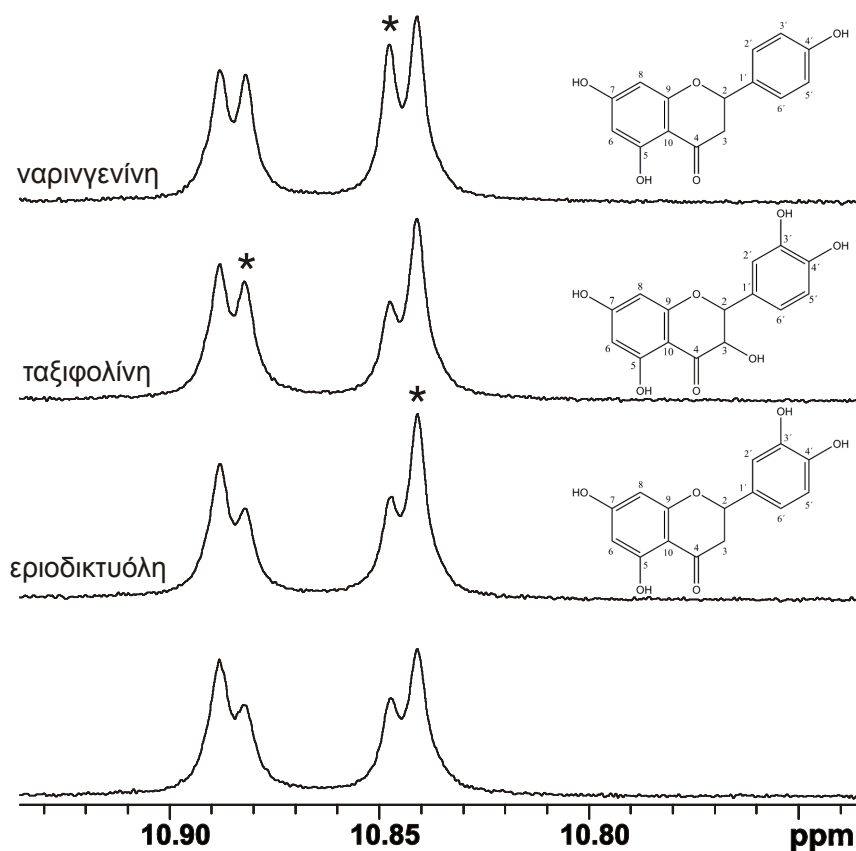


Σχήμα 7.3.5: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 20mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=256, t_{exp}=30min). (A) Απουσία πικρικού οξέος, (B) παρουσία πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 2.3 x 10⁻³, (C) όπως το (B) σε T=288K και (D) όπως το (B) σε T=284K.

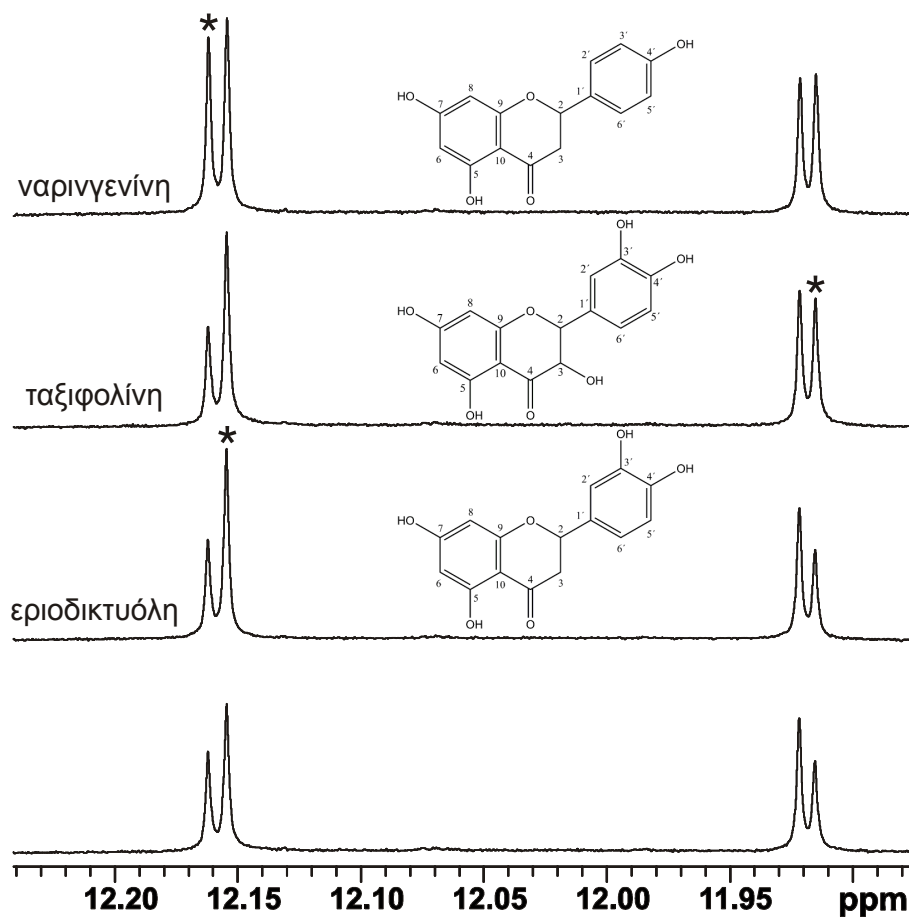
Η επίτευξη εξαιρετικής διακριτικής ικανότητας των απορροφήσεων των ομάδων OH(7) των φλαβονοειδών, με τη συνδυαστική χρήση προσθήκης πικρικού οξέος και ελάχιστης δυνατής χαμηλής θερμοκρασίας, επέτρεψε την ταυτοποίηση των εμφανιζόμενων απορροφήσεων των ομάδων –OH με χρήση της μεθόδου της επιμόλυνσης με πρότυπες ενώσεις (βλέπετε επόμενο υποκεφάλαιο).

7.4 Μέθοδος της Επιμόλυνσης (spiking) με Πρότυπες Ενώσεις

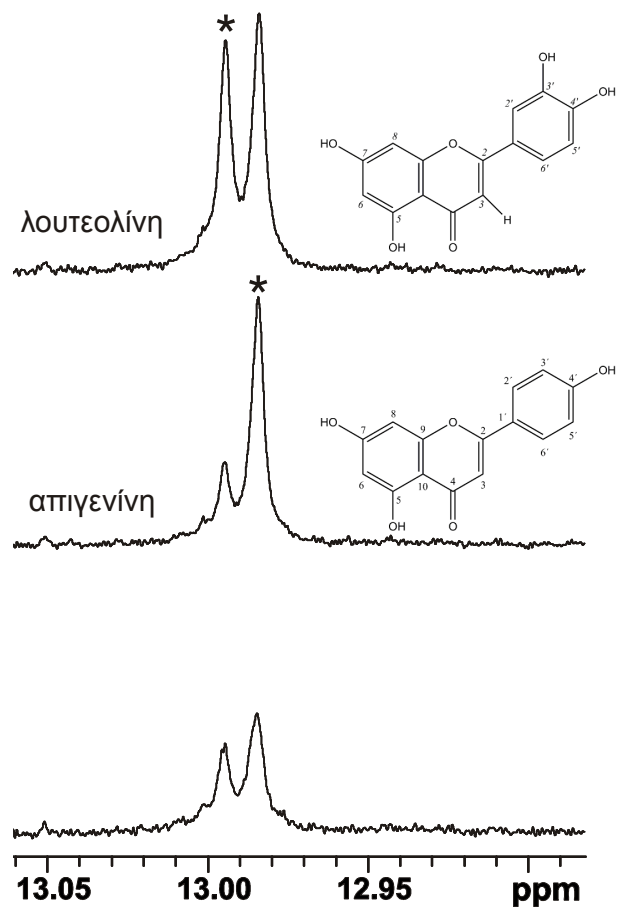
Για την επιβεβαίωση των εμφανιζόμενων απορροφήσεων των ομάδων –OH έγινε χρήση της μεθόδου της επιμόλυνσης με πρότυπες ενώσεις. Επιλέχτηκε δείγμα ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης στο οποίο πραγματοποιήθηκε η προσθήκη γνωστών ποσοτήτων πρότυπων ενώσεων.



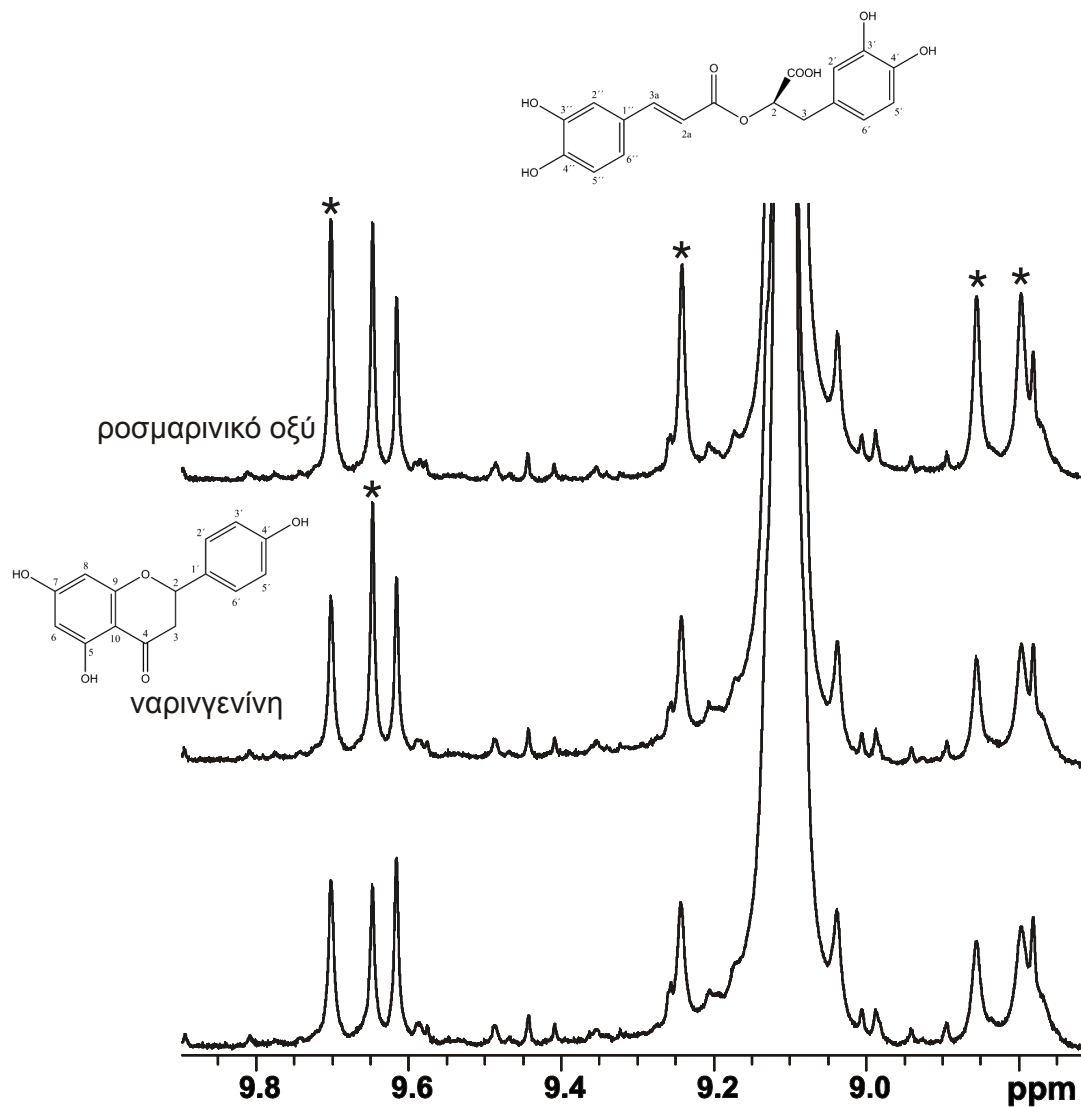
Σχήμα 7.4.1: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=32, *t*_{exp}=4min). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών: 0.17 μmol εριοδικτυόλης, 0.20 μmol ταξιφολίνης και 0.36 μmol ναρινγενίνης. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο.



Σχήμα 7.4.2: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) φάσματος 500 MHz NMR- ^1H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO- d_6 ($T=292\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{exp}}=4\text{min}$). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών: 0.17 μmol εριοδικτυόλης, 0.20 μmol ταξιφολίνης και 0.36 μmol ναρινγενίνης. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο.



Σχήμα 7.4.3: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) φάσματος 500 MHz NMR- ^1H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε $\text{DMSO}-d_6$ ($T=292\text{K}$, $ns=128$, $t_{\text{exp}}=16\text{min}$). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδών: 0.15 μmol απιγενίνης και 0.11 μmol λουτεολίνης. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο.



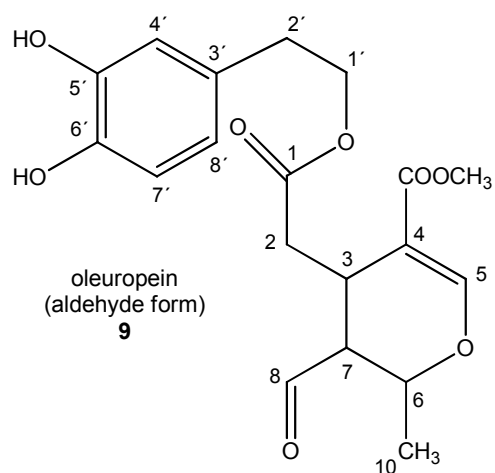
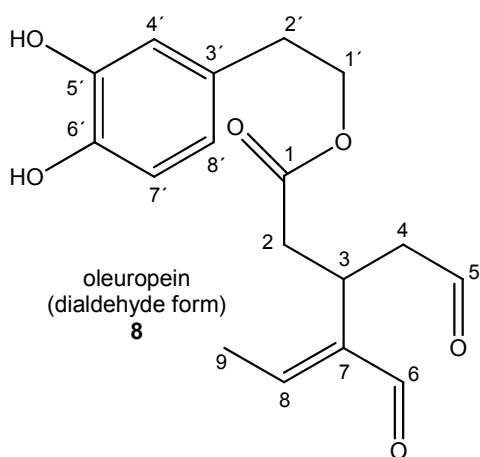
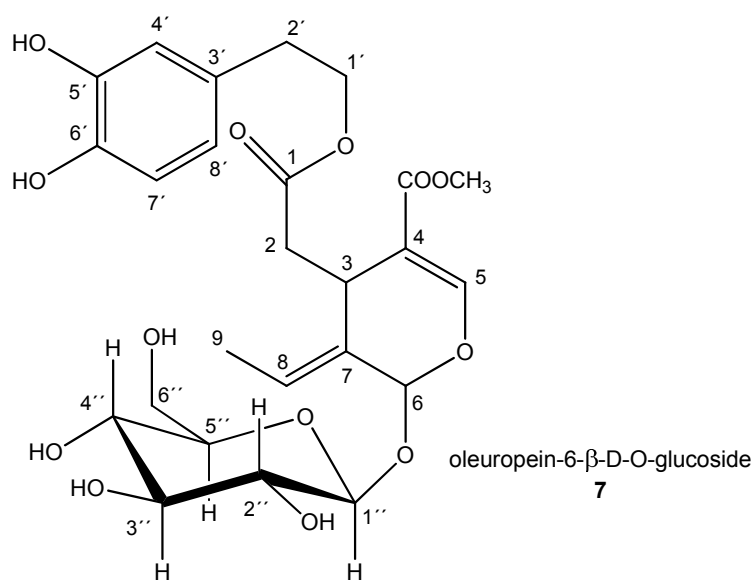
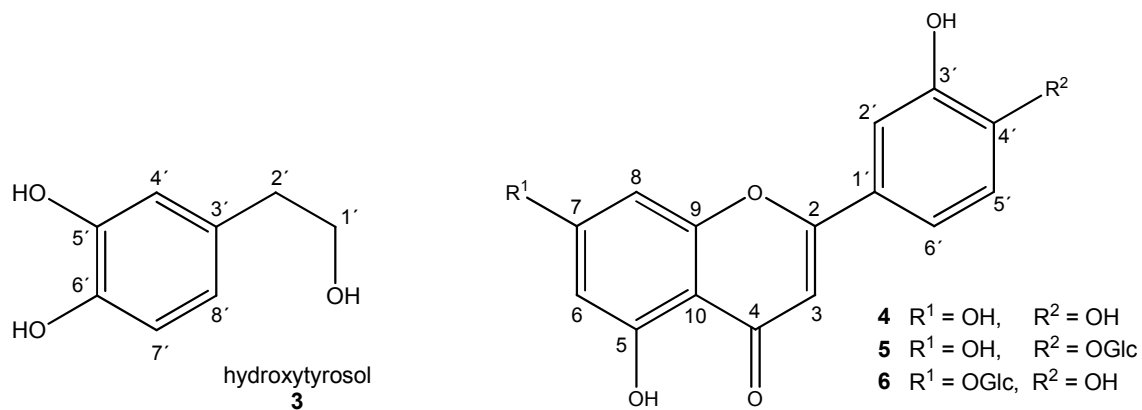
Σχήμα 7.4.4: Περιοχή απορρόφησης των ομάδων –OH φάσματος 500 MHz NMR-¹H δείγματος 40 mg ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε DMSO-*d*₆ (T=292K, ns=128, *t*_{exp}=16min). Διαδοχικές προσθήκες πρότυπων ενώσεων φλαβονοειδούς και φαινολικού οξέος: 0.36 μmol ναρινγενίνης και 0.53 μmol ροσμαρινικού οξέος. Οι αντίστοιχες απορροφήσεις υποδεικνύονται με αστερίσκο.

7.5 Εφαρμογή σε Μεθανολικό και Υδατικό Εκχύλισμα Φύλλων Ελιάς

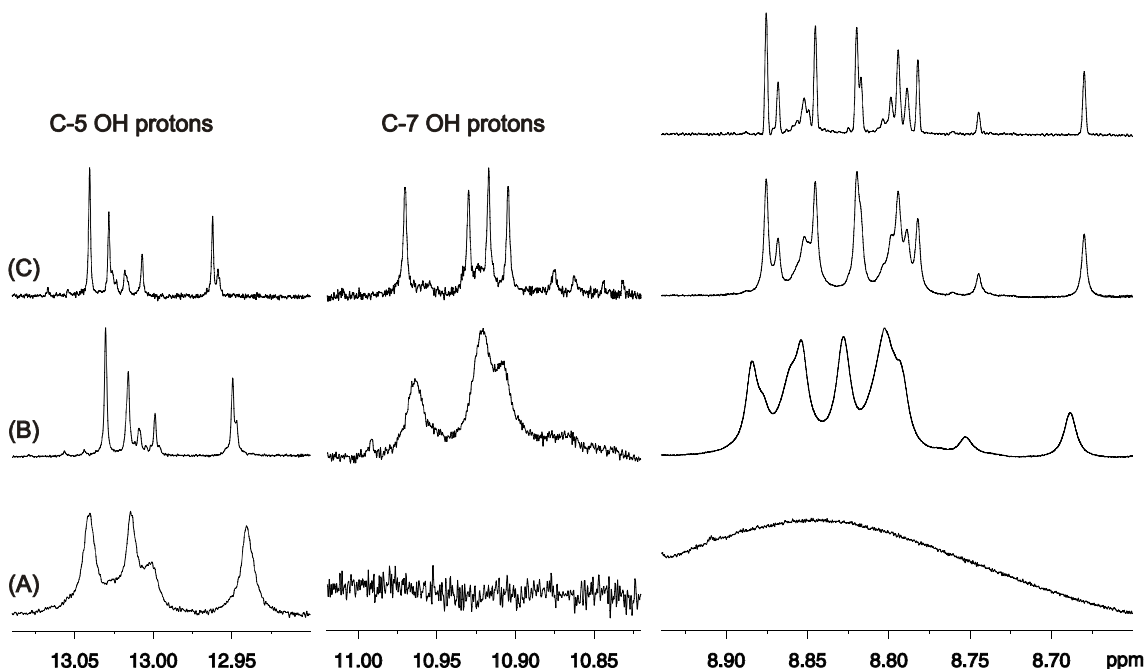
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν τόσο από την υποενότητα 6.4 όσο και από την 7.3, το πρωτόκολλο ανάλυσης φυσικών εκχυλισμάτων, εν κατακλείδι, λαμβάνει την παρακάτω τελική μορφή:

- 1) Καταγραφή φάσματος NMR- ^1H μίας διάστασης (1D) εκχυλίσματος, επιλογή περιοχής απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$ (8 - 14 ppm).
- 2) Προσθήκη πικρικού οξέος εντός του δείγματος NMR για την επίτευξη του ελαχίστου του εύρους απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$, το οποίο ανταποκρίνεται στο ελάχιστο της ταχύτητας ανταλλαγής αυτών.
- 3) Καθορισμός του βέλτιστου συνδυασμού θερμοκρασίας λήψης φάσματος και βέλτιστης συγκέντρωσης εκχυλίσματος μέσω σειράς φασμάτων 1D NMR- ^1H για τη περαιτέρω ελάττωση του εύρους απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$.
- 4) Λήψη φάσματος ^1H - ^{13}C HSQC υπό τις βέλτιστες συνθήκες.
- 5) Λήψη φάσματος ^1H - ^{13}C HMBC, υπό τις βέλτιστες συνθήκες, για σταθερές σύζευξης $^nJ_{\text{HC}}$ στην περιοχή τιμών 6 με 10 Hz, και για τις ασθενείς σταθερές σύζευξης $^5J_{\text{HC}}$ στην περιοχή τιμών $\leq$ των 2.5 Hz.

Το παραπάνω πρωτόκολλο εργασίας εφαρμόστηκε στο μεθανολικό και στο υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς με ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα δύο αυτά εκχυλίσματα παρουσιάζουν σχεδόν παρόμοια σύσταση [[Charisiadis *et al.*, 2011](#); [Goulas *et al.*, 2009](#)], διαφοροποιούνται κυρίως στην παρουσία διαφορετικών αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης. Οι κύριες ενώσεις που εντοπίζονται σε αυτά τα δύο εκχυλίσματα φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 7.5.1. Παρακάτω αναλύεται η εφαρμογή του πρωτοκόλλου στο μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς.



Σχήμα 7.5.1: Συντακτικοί τύποι ενώσεων που απαντώνται στο μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς [Charisiadis *et al.*, 2011].



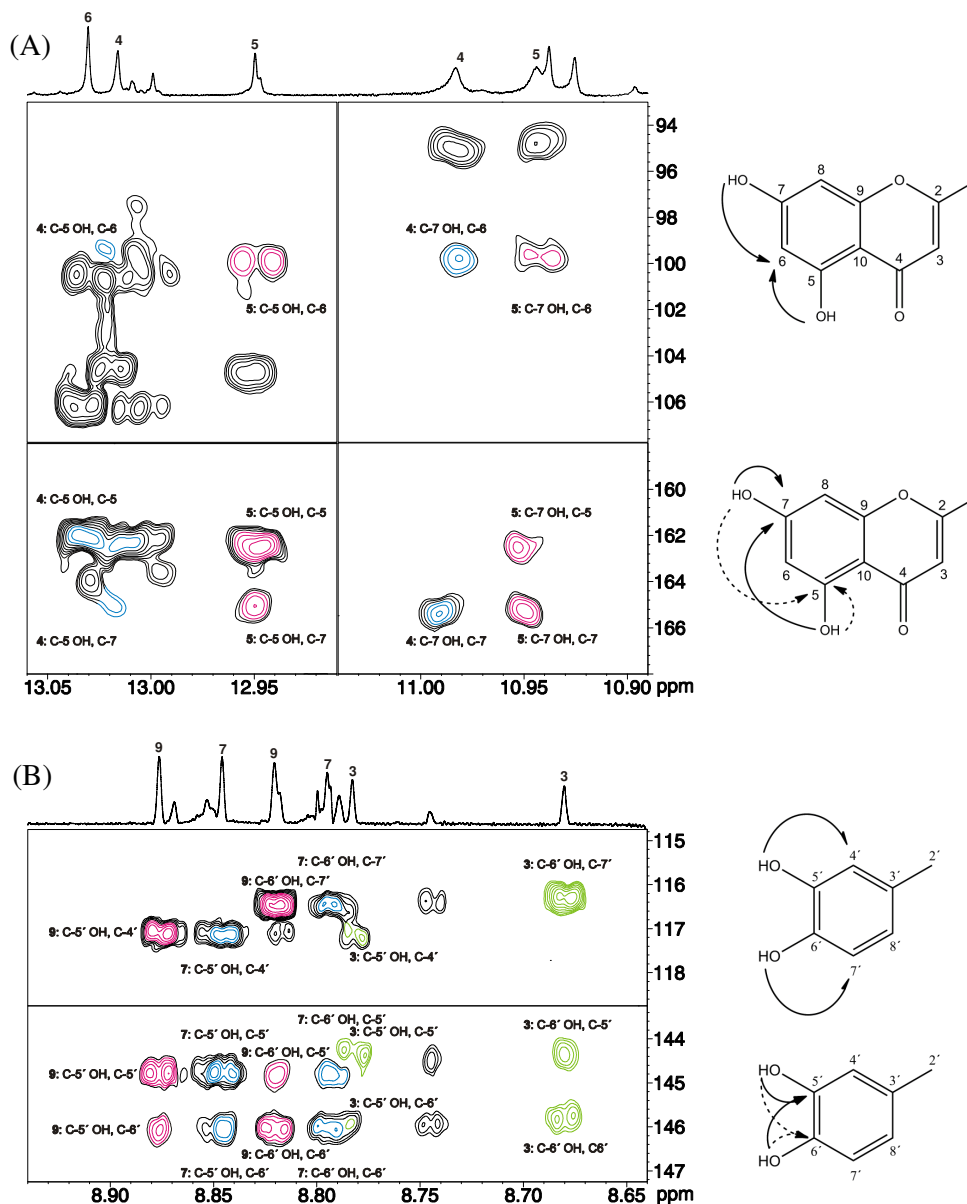
Σχήμα 7.5.2: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 1D NMR- ^1H 20 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 ($T=288\text{K}$). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών $[\text{PA}]/[\text{εκχυλίσμα}] = 49.3 \times 10^{-3}$ και (C) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αραίωση κατά ένα παράγοντα 4 και λόγο μαζών $[\text{PA}]/[\text{εκχυλίσμα}] = 49.4 \times 10^{-3}$ [Charisiadis *et al.*, 2011].

Στο Σχήμα 7.5.2A απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές φάσματος NMR- ^1H μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO- d_6 . Αρκετές διευρυμένες απορροφήσεις εντοπίζονται στην περιοχή πάνω από τα 12.5 ppm με εύρη απορροφήσεων μεταξύ 10.0 - 5.0 Hz. Οι απορροφήσεις αυτές αποδίδονται στα πρωτόνια των ομάδων OH(5) των φλαβονοειδών που συμμετέχουν σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο C-4. Στην περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων OH(7) (10.5 - 11.5 ppm) δεν παρατηρούνται απορροφήσεις. Στην περιοχή των 8.0 - 9.0 ppm παρατηρείται μία ισχυρή και ευρεία απορρόφηση ($\Delta\nu_{1/2} \approx 250$ Hz) στην οποία αποδίδονται οι απορροφήσεις των ομάδων -OH των ενώσεων των κύριων συστατικών του εκχυλίσματος (ελαιοευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη και παραγώγων αυτών). Προσθήκη πικρικού οξέος στο παραπάνω δείγμα (Σχήμα 7.5.2B) και περαιτέρω εφαρμογή της συνδυαστικής μεθόδου αραίωσης των διαλυμάτων και χρήση της ελάχιστης δυνατής θερμοκρασίας (συνήθως δύο βαθμούς πάνω από το σημείο πήξεως του διαλύματος) είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη φάσματος υψηλής διακριτικής ευκρίνειας για όλες τις απορροφήσεις των ομάδων -OH (Σχήμα 7.5.2C).

Συγκεκριμένα στην περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) παρατηρούνται τρεις κύριες κορυφές στα 13.03 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 0.7$ Hz), 13.02 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 0.7$ Hz) και στα 12.95 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 0.6$ Hz), καθώς επίσης και μερικές μικρής έντασης απορροφήσεις. Στην περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(7) παρατηρούνται τέσσερις κύριες κορυφές στα 10.97 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.1$ Hz), 10.93 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.1$ Hz), 10.92 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.1$ Hz) και στα 10.91 ppm ($\Delta\nu_{1/2} \approx 1.1$ Hz), οι οποίες πριν ήταν εξαιρετικά διευρυμένες και κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η επίδραση του πικρικού οξέος στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων είναι μικρή και βρέθηκε να είναι μικρότερη των 0.03 ppm.

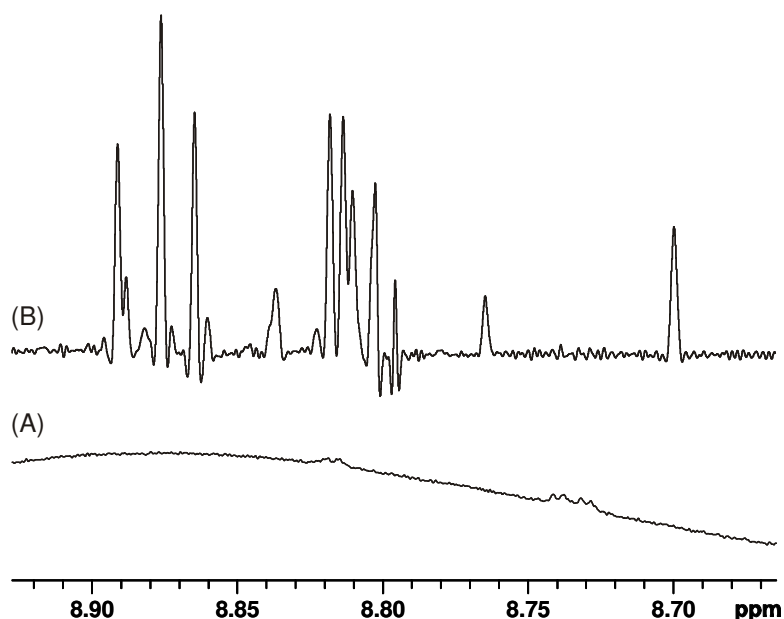
Με εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (Σχήμα 7.5.3a) προέκυψε σημαντικός αριθμός κορυφών διασταύρωσης ^1H , ^{13}C των C-5 και C-7 OH πρωτονίων τα οποία επέτρεψαν την ταυτοποίηση των ενώσεων **4** - **6** (Σχήμα 7.5.1). Οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6 (99.92 ppm), C-5 (162.55 ppm), και C-7 (165.05 ppm) της ένωσης λουτεολίνη-4'-O-γλυκοζίτης (**5**), και οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6 (99.42 ppm), C-5 (162.50 ppm) και C-7 (165.01 ppm) της λουτεολίνης (**4**) είναι ιδιαίτερης διαγνωστικής αξίας.

Με την προσθήκη πικρικού οξέος στο παραπάνω δείγμα (Σχήμα 7.5.2B) και περαιτέρω χρήση αραιωμένων διαλυμάτων (Σχήμα 7.5.2C) προέκυψε φάσμα υψηλής διακριτικής ευκρίνειας για όλες τις απορροφήσεις των ομάδων -OH της ελαιοευρωπαϊνης, της υδροξυτυροσόλης και παραγώγων αυτών, στην περιοχή 8.6 - 8.9 ppm. Με εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HSQC και ^1H - ^{13}C HMBC NMR (Σχήμα 7.5.3B) προέκυψε σημαντικός αριθμός κορυφών διασταύρωσης των ομάδων -OH, που επέτρεψε την πλήρη ταυτοποίηση του ανθρακικού σκελετού των ενώσεων **3**, **7** και **9** (Σχήμα 7.5.1). Οι απορροφήσεις στα 8.66 και 8.77 ppm αποδίδονται στα C-6' και C-5' OH πρωτόνια της υδροξυτυροσόλης (**3**), αντίστοιχα, αφού οι κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 116.28, 144.37, και 145.83 ppm και 117.22, 144.37, και 145.83 ppm, αντίστοιχα, ταυτίζονται με τις αντίστοιχες της πρότυπης ένωσης. Επιπροσθέτως τα C-6' και C-5' OH πρωτόνια εμφανίζουν κοινές κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες C-6' και C-5' στα 144.37 και 145.83 ppm, αντίστοιχα, οι οποίες είναι ιδιαίτερης διαγνωστικής σημασίας για την μεταξύ τους διάταξη σε θέση *ortho* (Σχήμα 7.5.3B). Παρόμοια, οι απορροφήσεις στα 8.80 και 8.85 ppm, και αυτές στα 8.82 και 8.88 ppm, αποδίδονται στα C-6' και C-5' OH πρωτόνια της ελαιοευρωπαϊνης (**7**) και της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (**9**), αντίστοιχα.



Σχήμα 7.5.3: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz $2\text{D } ^1\text{H}$ - ^{13}C HMBC NMR 10mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ με λόγο μαζών $[\text{PA}]/[\text{εκχυλίσμα}] = 49.3 \times 10^{-3}$ ($T=288\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). (A) Οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6, C-5, και C-7 της ένωσης λουτεολίνη-4'-Ο-γλυκοζίτη (5), και οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6 και C-7 της λουτεολίνης (4), υποδεικνύονται με κόκκινο και μπλέ χρώμα, αντίστοιχα. (B) Οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5' και C-6' OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-4' και C-7', αντίστοιχα, και οι κοινές κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες C-5' και C-6' υποδεικνύονται με μπλέ χρώμα για την ελαιοευρωπαΐνη (7), πράσινο για την υδροξυτυροσόλη (3) και κόκκινο για την αλδεϋδική μορφή της ελαιοευρωπαΐνης (9) [Charisiadis *et al.*, 2011].

Παρόμοια μεθοδολογία εφαρμόστηκε και για την ταυτοποίηση των ενώσεων **3**, **5** - **8** (Σχήμα 7.5.1) στο υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆. Ενδεικτικά στο παρακάτω Σχήμα 7.5.4 δείχνεται επιλεγμένη περιοχή (8.6 - 8.9 ppm) φάσματος 500MHz 1D NMR-¹H υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς πριν και μετά την προσθήκη πικρικού οξέος. Στον Πίνακα 7.5.1 συνοψίζονται τα ποσοτικά αποτελέσματα, όπως προέκυψαν από μετρήσεις NMR, των ενώσεων **3** - **9** (Σχήμα 7.5.1) και των δύο εκχυλισμάτων.



Σχήμα 7.5.4: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 1D NMR-¹H 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=288K). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) Με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 67.3 x 10⁻³.

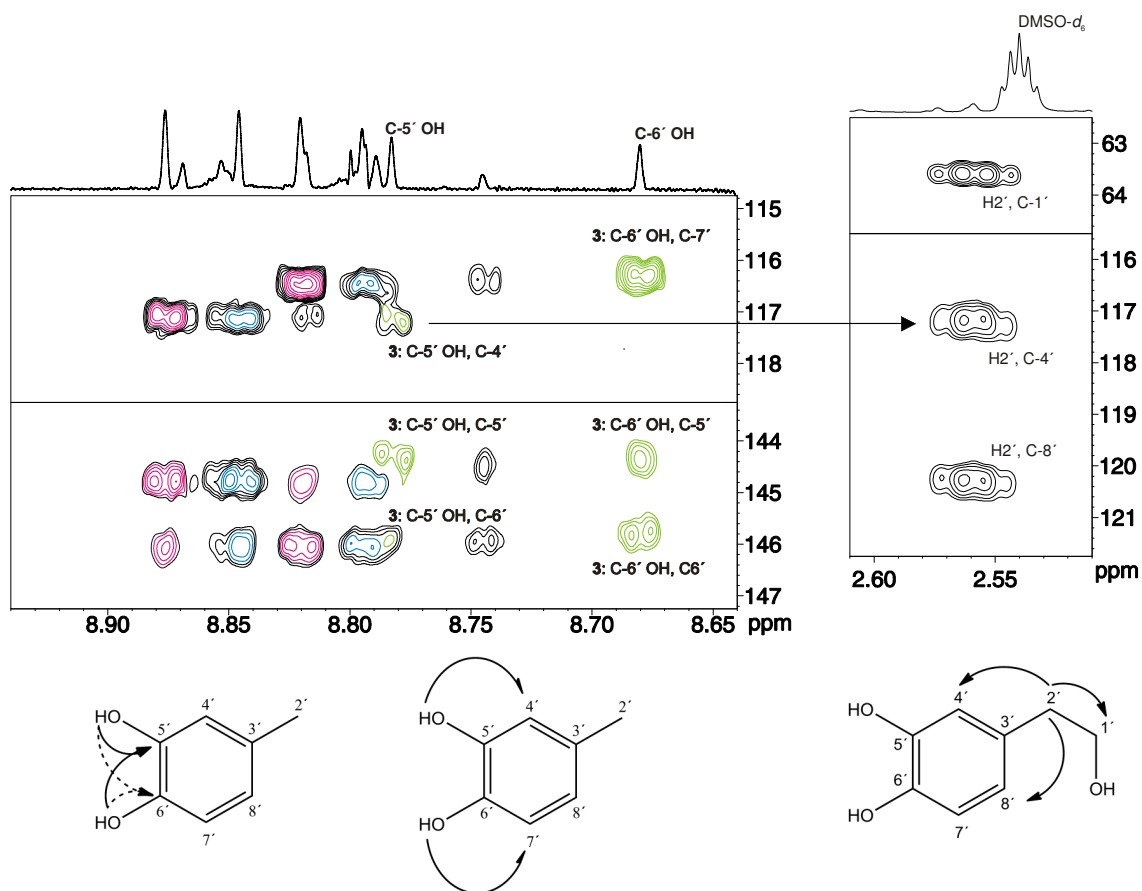
Πίνακας 7.5.1: Επίπεδα συγκεντρώσεων^{a,b} των ενώσεων **3** - **9** εκχυλίσματος φύλλων ελιάς [Charisiadis *et al.*, 2011].

εκχύλισμα	3	4	5	6	7	8	9
μεθανολικό	7.04 ± 0.39	1.55 ± 0.12	2.85 ± 0.28	3.40 ± 0.20	36.93 ± 3.04	ND ^c	32.94 ± 2.04
υδατικό	1.33 ± 0.12	ND ^c	0.18 ± 0.01	0.43 ± 0.03	9.17 ± 1.10	7.20 ± 0.19	ND ^c

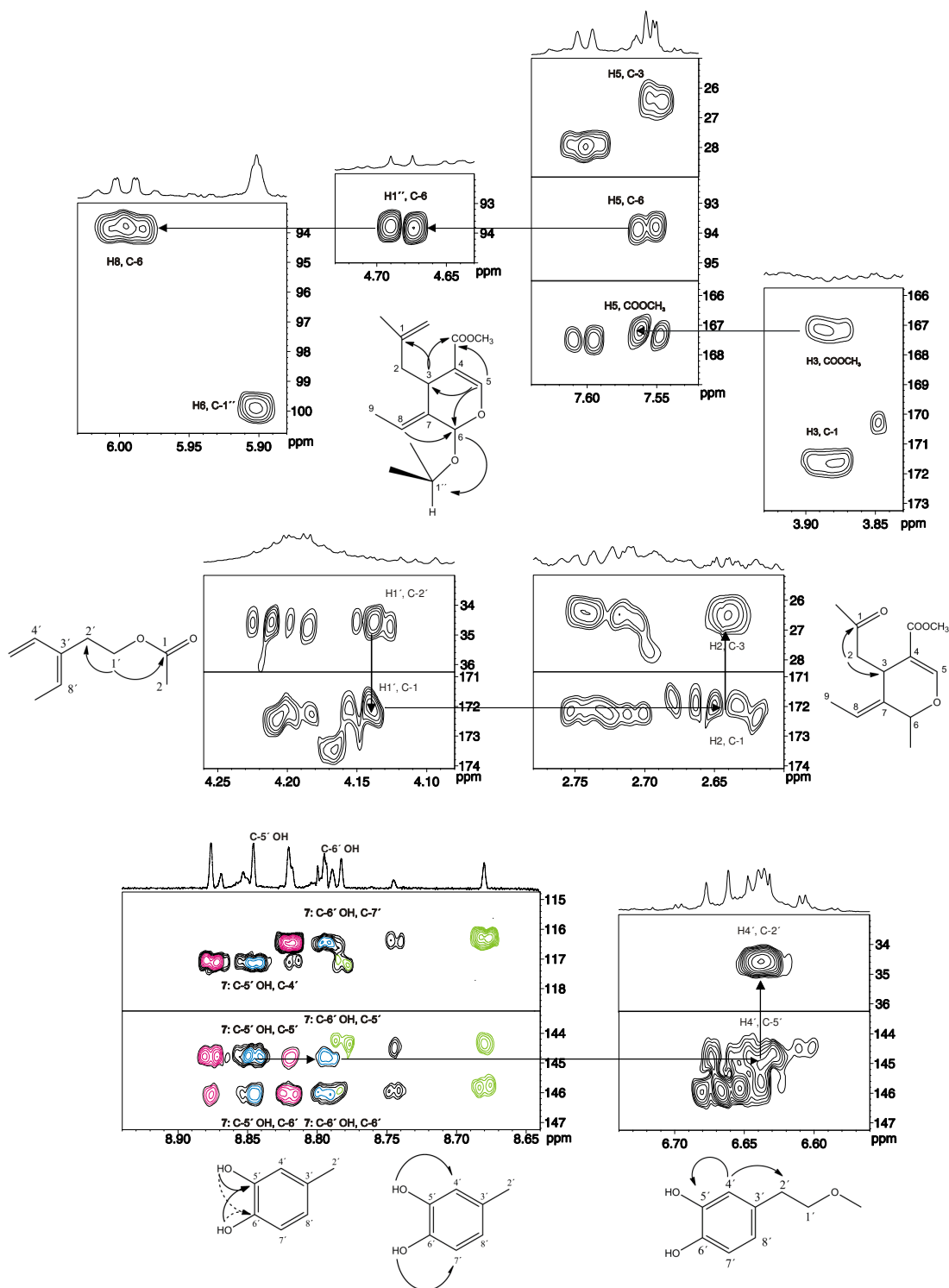
^amg g⁻¹ εκχυλίσματος. ^bΜέσος όρος τριών μετρήσεων σε τρία διαφορετικά δείγματα του ίδιου εκχυλίσματος ± S.D. (standard deviation). ^cND = μη ανιχνεύσιμα.

Στα επόμενα σχήματα παρατίθενται οι διαγραμματικές πορείες ταυτοποίησης των ενώσεων του Σχήματος 6.5.1, και συγκεκριμένα των ενώσεων **3**, **5**, **7** και **9** στο μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς και της ένωσης **8** στο υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς. Είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος το γεγονός ότι οι απορροφήσεις του ¹³C των ενώσεων **7**, **8** και **9** είναι σχεδόν ταυτόσημες ενώ αντίθετα οι απορροφήσεις των C-6' και C-5' OH πρωτονίων είναι διακριτές και διαφέρουν σημαντικά. Το ίδιο παρατηρείται και για τα φλαβονοειδή **4** - **6** (λουτεολίνη, λουτεολίνη-4'-O-γλυκοζίτης και λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίτης) όπου η χημική μετατόπιση του C-5 OH πρωτονίου είναι ευαίσθητη ακόμη και σε υποκατάσταση στη θέση C-4'. Αυτό υποδεικνύει την εξαιρετική ευαισθησία και διακριτική ικανότητα των απορροφήσεων των ομάδων -OH ακόμη και σε υποκαταστάσεις μακράς απόστασης.

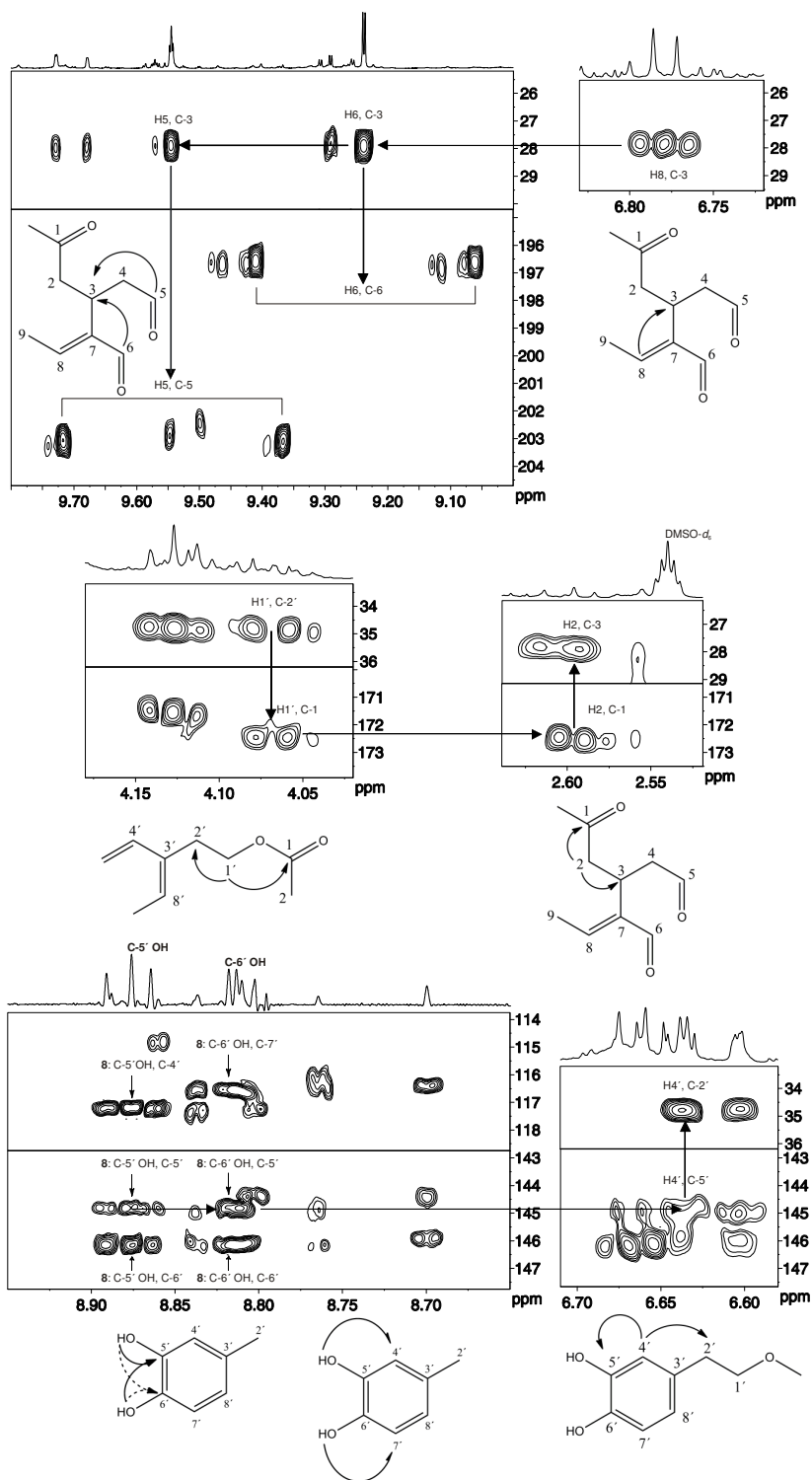
Στους πίνακες Π7-Π11 του Παραρτήματος παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του Σχήματος 7.5.1.



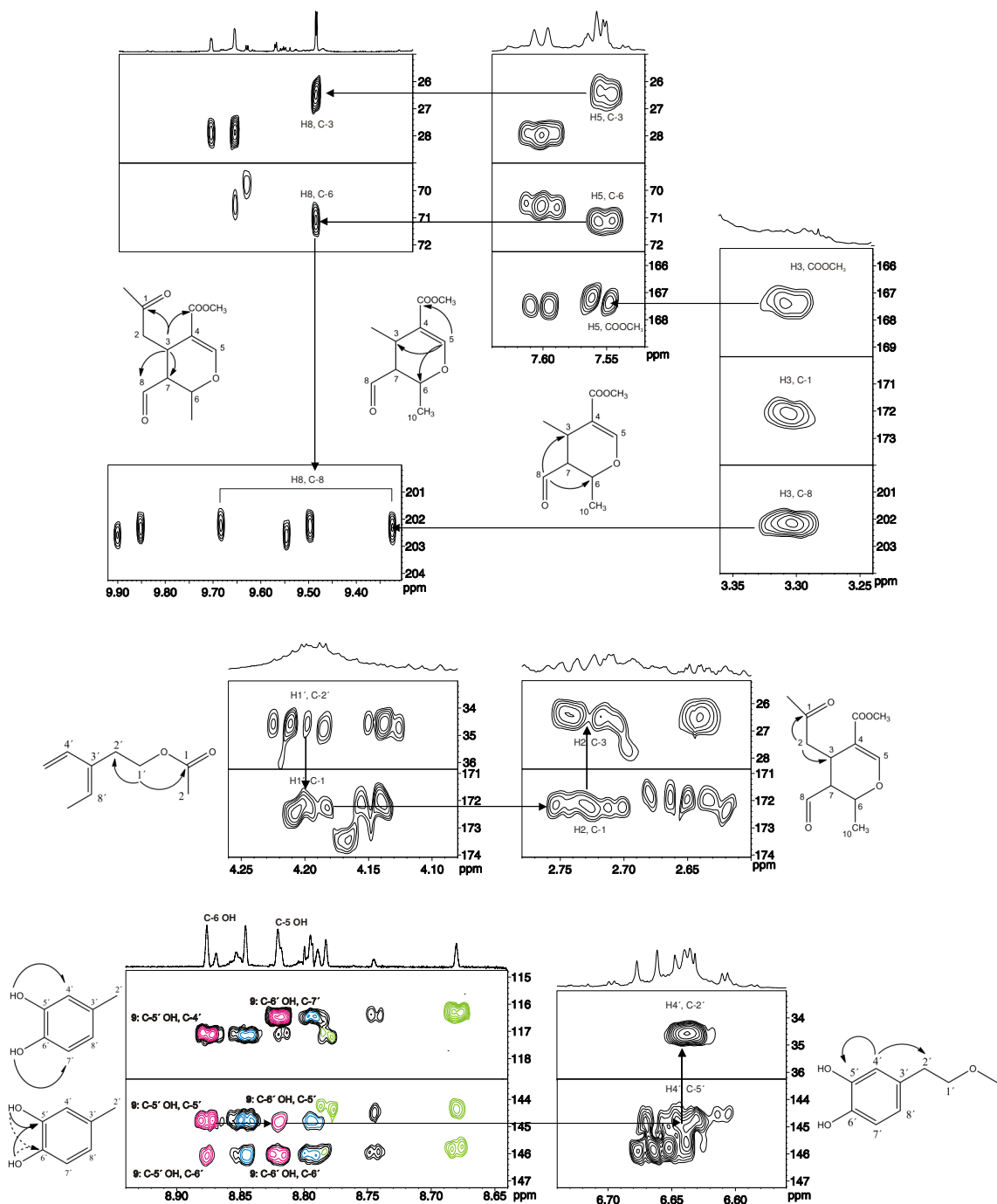
Σχήμα 7.5.5: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$ ($T=288\text{K}$, $ns=88$, $t_{\text{expt}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της υδροξυτυροσόλης (**3**) [Charisiadis *et al.*, 2011].



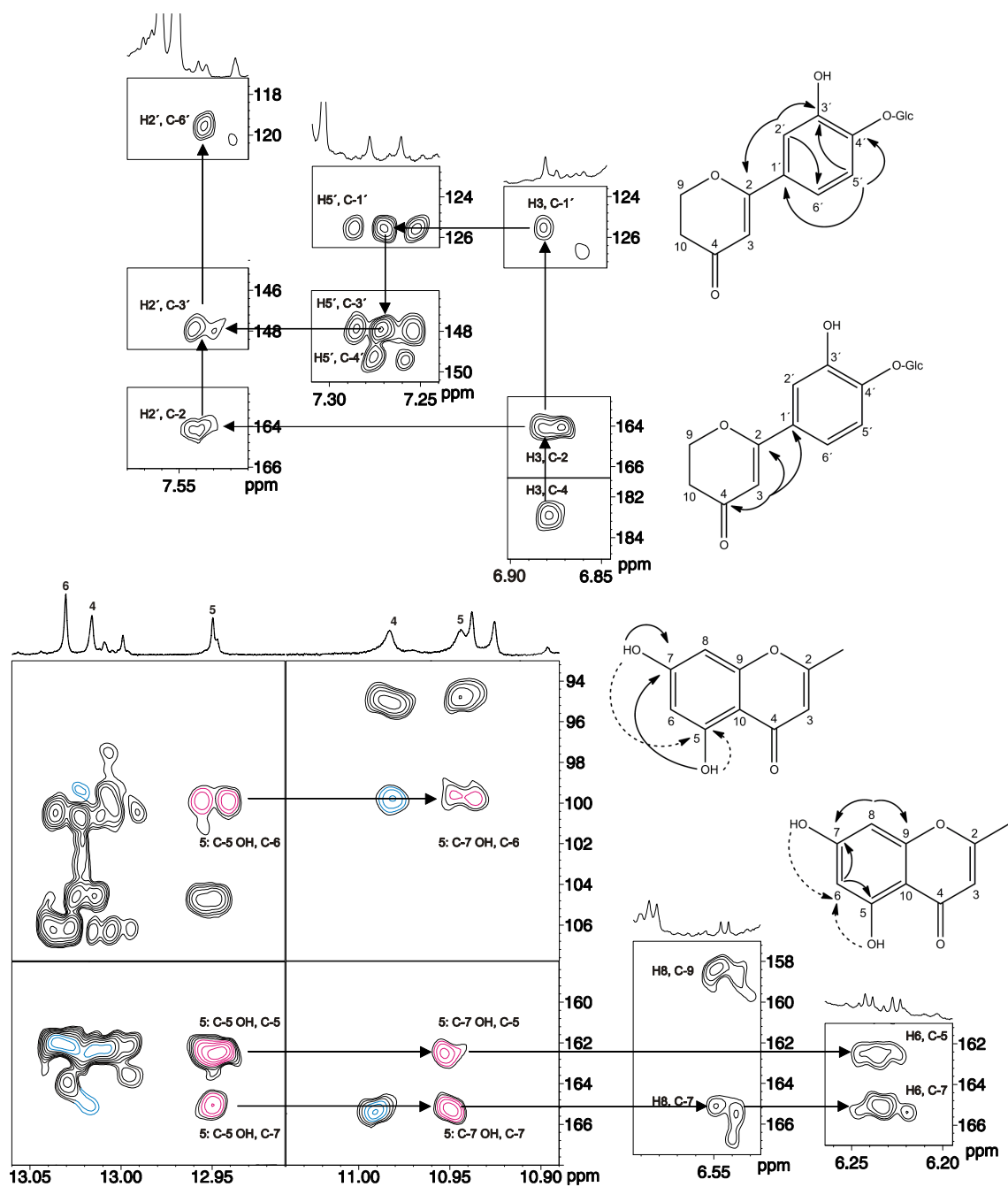
Σχήμα 7.5.6: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=88, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της ελαιοευρωπαϊνης (7) [Charisiadis *et al.*, 2011].



Σχήμα 7.5.7: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$ ($T=288\text{K}$, $ns=88$, $t_{\text{expt}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της διαλδευδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (8) [Charisiadis *et al.*, 2011].



Σχήμα 7.5.8: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz $2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=288\text{K}$, $ns=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (9) [Charisiadis *et al.*, 2011].

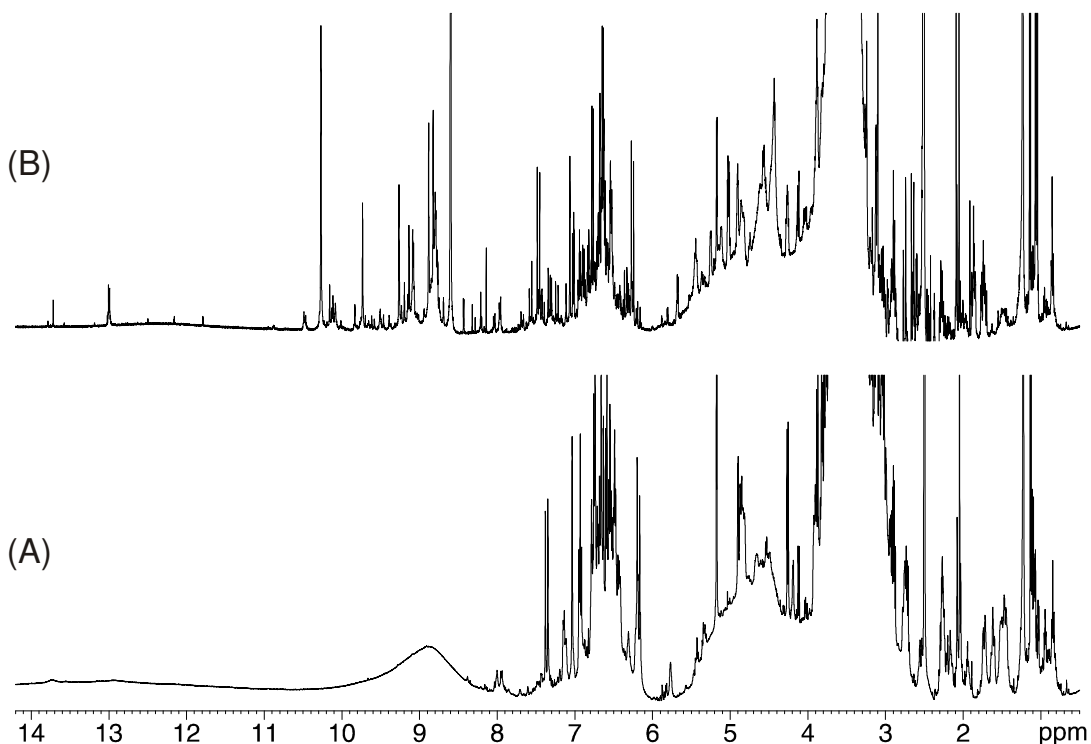


Σχήμα 7.5.9: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=288\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{expt}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύεται η διαγραμματική πορεία ταυτοποίησης της ένωσης λουτεολίνη-4'- O -γλυκοζίδης (**5**) [Charisiadis *et al.*, 2011].

7.6 Εφαρμογή της Μεθοδολογίας Πικρικού Οξέος σε Μεθανολικό και Υδατικό Εκχύλισμα Ρίγανης

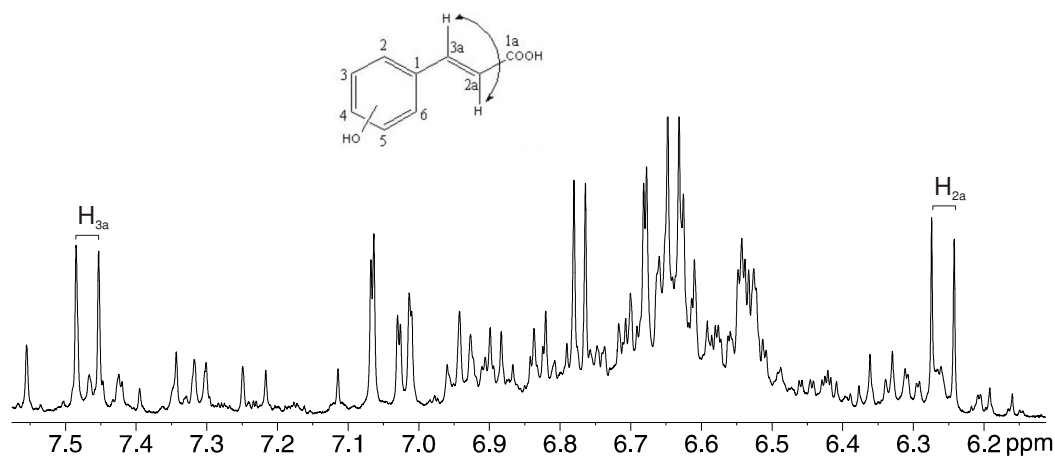
Στην περαιτέρω πορεία της διδακτορικής διατριβής, παρασκευάστηκε εκχύλισμα ρίγανης σε διαλύτη νερό (OAQ) και μεθανόλη (OME), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5.3. Η διαλυτότητα στο νερό είναι απαραίτητη προϋπόθεση ενός συστατικού που είναι πιθανό να αποτελέσει πρόδρομη ένωση για την παρασκευή φαρμακευτικού σκευάσματος [Wexler *et al.*, 2005; Morelock *et al.*, 1994]. Επιπλέον, τα υδατικά εκχυλίσματα προσομοιάζουν περισσότερο τα αφεψήματα, δηλαδή τον τύπο του εκχυλίσματος που καταναλώνεται από τον άνθρωπο. Σύμφωνα με τη κατάταξη κατά Snyder [Snyder *et al.*, 1979], το νερό διαθέτει τη μεγαλύτερη τιμή πολικότητας (10.2), ενώ η μεθανόλη βρίσκεται στη μέση της κλίμακας με τιμή (5.1) που είναι παραπλήσια με αυτή της ακετόνης.

Στο Σχήμα 7.6.1 παρατίθενται φάσματα 500 MHz 1D NMR-¹H εκχυλίσματος (OAQ) σε διαλύτη DMSO-*d*₆, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος.



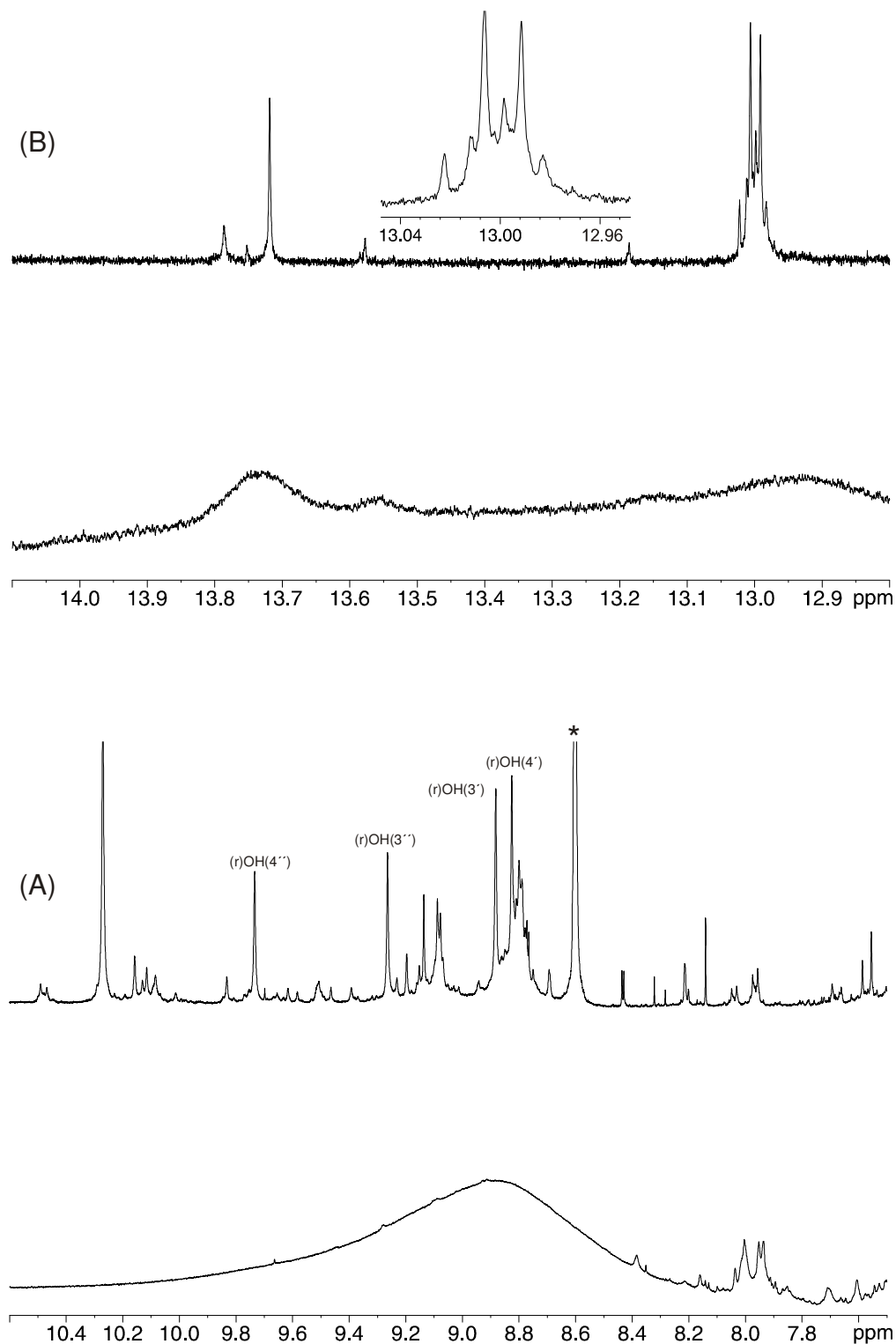
Σχήμα 7.6.1: Φάσμα 500 MHz NMR-¹H εκχυλίσματος 20 mg OAQ σε 0.6 mL DMSO-*d*₆ (T=288K, ns=256, *t*_{exp}=33min). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αραιώση κατά ένα παράγοντα 4 και με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών [PA]/[εκχύλισμα] = 286.5 x 10⁻³.

Από το φάσμα NMR- ^1H του Σχήματος 7.6.1 παρατηρείται η σημαντική βελτίωση στις απορροφήσεις των ομάδων $-\text{OH}$ στην περιοχή 8 - 10 και 13 - 14 ppm (Σχήμα 7.6.3) σε αντίθεση με την εξαιρετική πολυπλοκότητα που εμφανίζει το φάσμα στην αλειφατική περιοχή (0 - 6 ppm) καθώς και στην αρωματική περιοχή (6 - 8 ppm). Εξαιρέση αποτελούν οι απορροφήσεις στα ~ 6.2 και ~ 7.5 ppm (d, $J = 16$ Hz) (Σχήμα 7.6.2) που αποτελούν τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων [Gerothanassis *et al.*, 1998], όπως π.χ. καφεϊκού ή ροσμαρινικού οξέος.

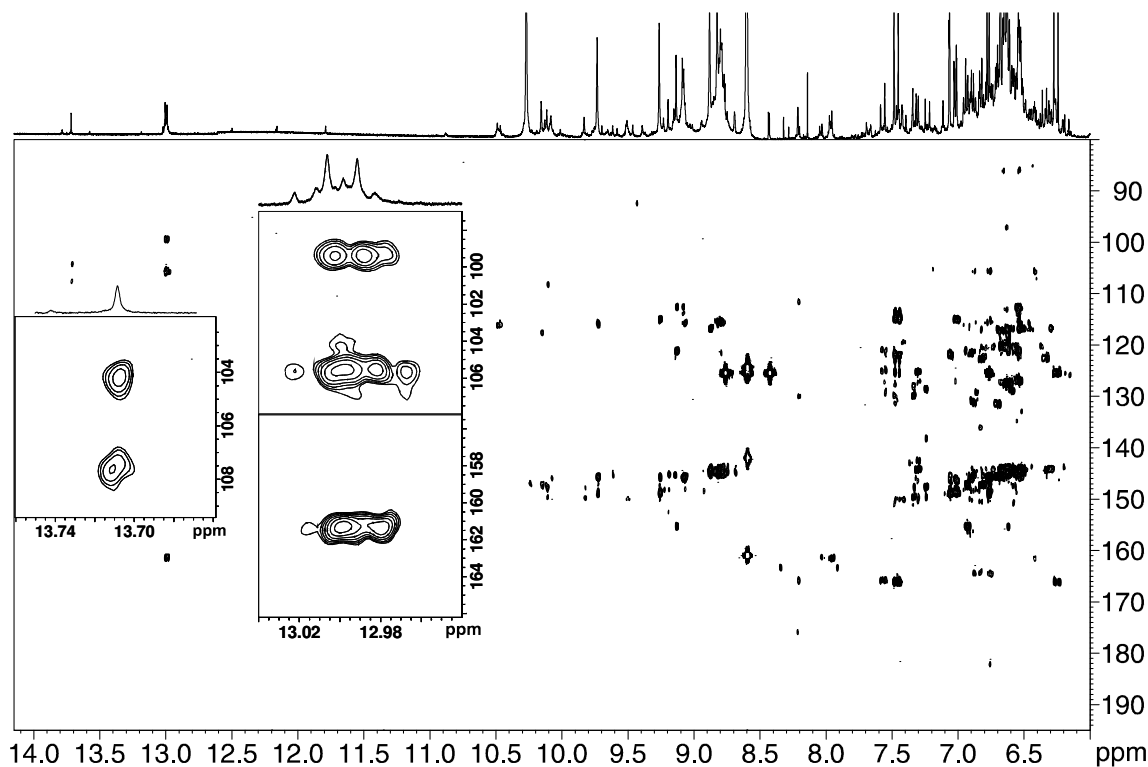


Σχήμα 7.6.2: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος του Σχήματος 7.6.1. Υποδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων.

Στο Σχήμα 7.6.3Α παρατηρείται πλήθος διακριτών απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ του εκχυλίσματος που εκλεπτύνθηκαν με τη προσθήκη του πικρικού οξέος. Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 9.73, 9.26, 8.88 και 8.83 ppm αποδίδονται στις ομάδες $-\text{OH}$ του ροσμαρινικού οξέος (βλέπετε Σχήμα 8.3.2). Στο Σχήμα 7.6.3Β παρατηρείται συστάδα απορροφήσεων στα 13 ppm και μία έντονη χαρακτηριστική απορρόφηση ομάδας $-\text{OH}$ στα 13.7 ppm. Στην περιοχή των ~ 13 ppm απορροφούν οι ομάδες $\text{OH}(5)$ φλαβονοειδών τύπου λουτεολίνης, όπου στη θέση 3 του δακτυλίου (C) υπάρχει ως υποκαταστάτης $-\text{H}$ (βλέπετε κεφάλαιο 6.3, Σχήμα 6.3.2). Στην περιοχή των ~ 14 ppm, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [Obmann *et al.*, 2011; El-Toumy *et al.*; 2011; Suzuki *et al.*, 2003] εντοπίζονται οι ομάδες $\text{OH}(5)$ τύπου φλαβονοειδών, με γλυκοζυλιωμένη υποκατάσταση στη θέση 6 του δακτυλίου (A).



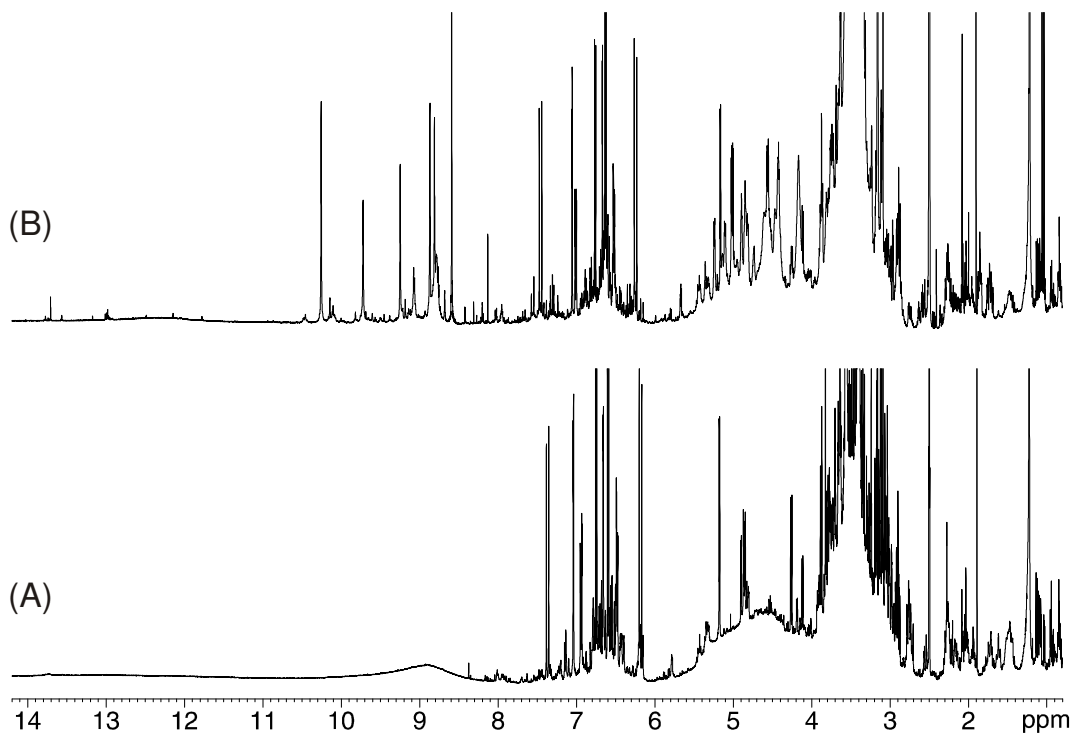
Σχήμα 7.6.3: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος του Σχήματος 7.6.1. (A) Η περιοχή των 7.8 -10.5 ppm, (B) η περιοχή των 12.8 - 14.1 ppm. Η κορυφή με αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος, ενώ με (r) υποδηλώνονται οι απορροφήσεις των ομάδων -OH του ροσμαρινικού οξέος.



Σχήμα 7.6.4: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, $n_s=76$, $t_{\text{exp1}}=10\text{h}$) του δείγματος του Σχήματος 7.6.1B.

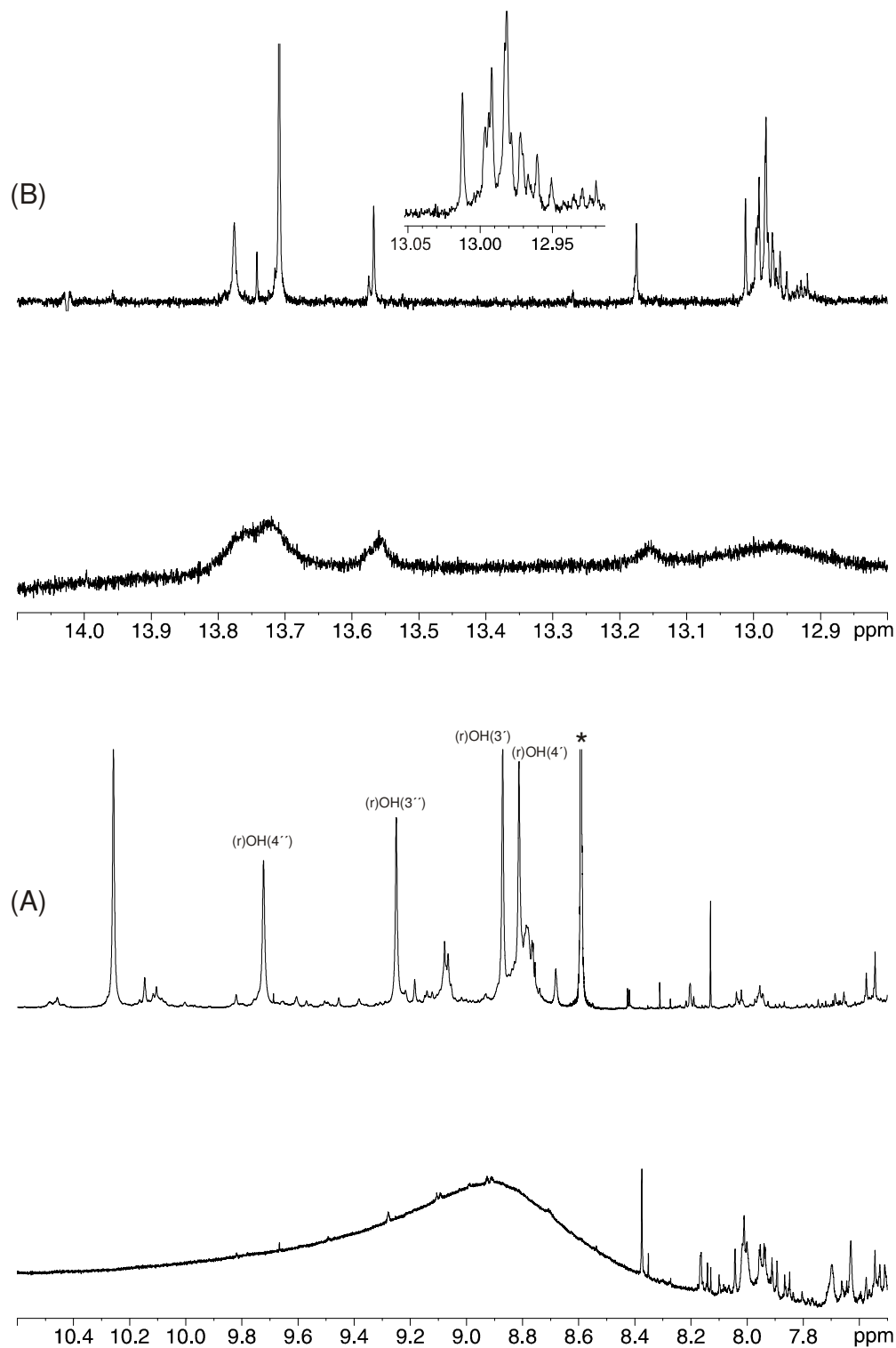
Στο Σχήμα 7.6.4 παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές διασταύρωσης 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR των ομάδων OH(5) στην περιοχή των 13 ppm με τους άνθρακες στα 99.45 ppm (C-6), 105.57 ppm (C-10) και 161.30 ppm (C-5). Η απορρόφηση στα 13.71 ppm εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 104.22 ppm (C-10) και 107.96 ppm (C-6) και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα αποδίδεται σε C-6 γλυκοζιλωμένο παράγωγο φλαβονοειδούς [Obmann *et al.*, 2011; El-Toumy *et al.*; 2011; Suzuki *et al.*, 2003]. Η μικρή ποσότητα της συγκεκριμένης ένωση που εντοπίζεται στο εκχύλισμα δεν επέτρεψε τη λήψη παραπάνω κορυφών διασταύρωσης για τη περαιτέρω ταυτοποίηση.

Στο Σχήμα 7.6.5 παρατίθενται φάσματα 500 MHz 1D NMR- ^1H εκχυλίσματος (OME) σε διαλύτη DMSO- d_6 , πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος.

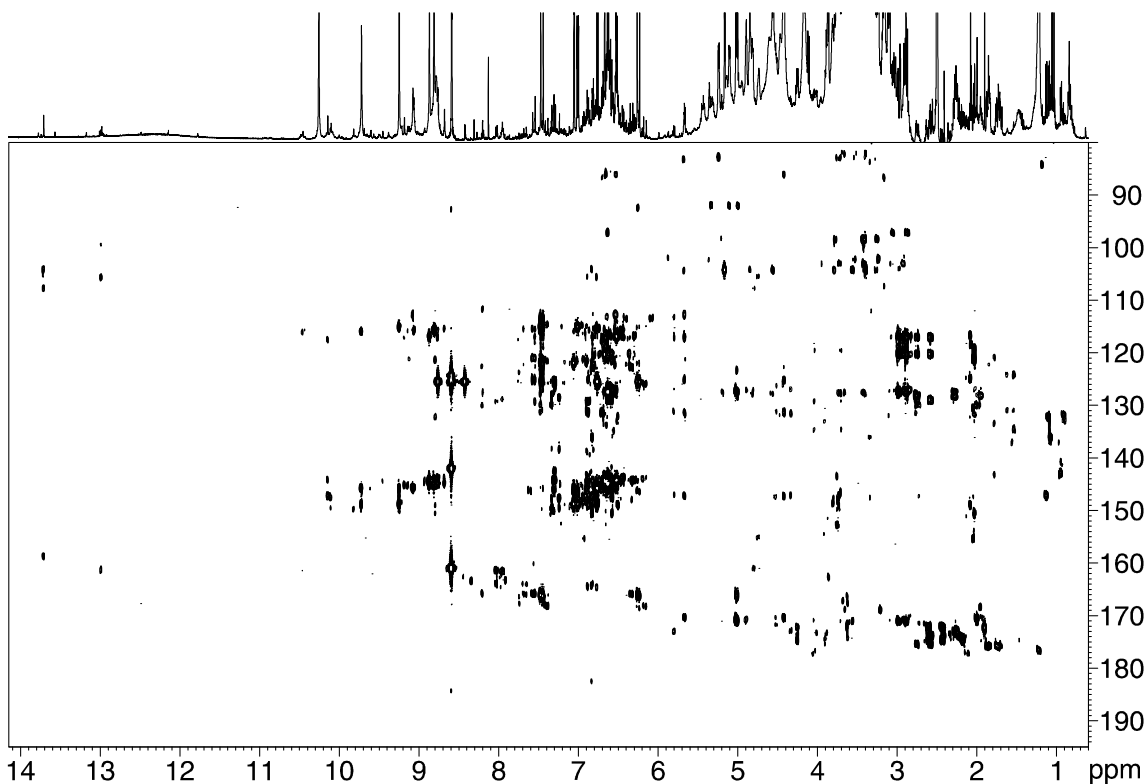


Σχήμα 7.6.5: Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H εκχυλίσματος 20 mg OME σε 0.6 mL DMSO- d_6 ($T=288\text{K}$, $n_s=256$, $t_{\text{expt}}=33\text{min}$). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αραιώση κατά ένα παράγοντα 2 και με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών $[\text{PA}]/[\text{εκχύλισμα}] = 225.7 \times 10^{-3}$.

Από τη σύγκριση των Σχημάτων 7.6.1 και 7.6.5 προκύπτει ότι τα δύο εκχυλίσματα έχουν σχεδόν ταυτόσημο αποτύπωμα. Και στο εκχύλισμα OEM παρατηρείται η σημαντική βελτίωση στις απορροφήσεις των ομάδων $-\text{OH}$ στην περιοχή 8 - 10 και 13 - 14 ppm (Σχήμα 7.6.6), και οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα ~ 6.2 και ~ 7.5 ppm (d, $J = 16$ Hz) των υδροξυκιναμωμικών οξέων [Gerothanassis *et al.*, 1998]. Παράλληλα εντοπίζονται και οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 9.72, 9.25, 8.87 και 8.81 ppm που αποδίδονται στις ομάδες $-\text{OH}$ του ροσμαρινικού οξέος, $\text{OH}(4'')$, $\text{OH}(3'')$, $\text{OH}(3')$ και $\text{OH}(4')$, αντίστοιχα. Περαιτέρω, από τη σύγκριση του Σχήματος 7.6.6 με το αντίστοιχο του υδατικού εκχυλίσματος (Σχήμα 7.6.3) διαπιστώνεται η παρουσία απορροφήσεων ομάδων $-\text{OH}$ με ταυτόσημες μετατοπίσεις με διαφοροποίηση μόνον ως προς την ένταση των απορροφήσεων και επομένως ως προς την ποσότητα αυτών. Με εφαρμογή φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR στο δείγμα του Σχήματος 7.6.5B, προέκυψε το φάσμα που παρατίθεται στο Σχήμα 7.6.7.

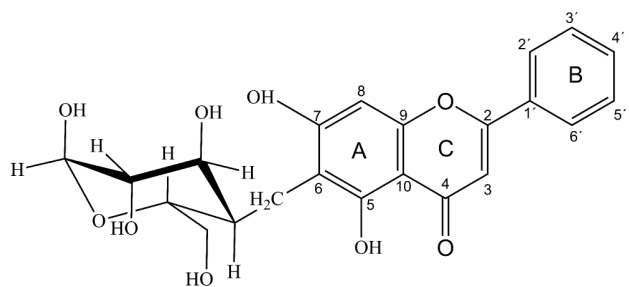
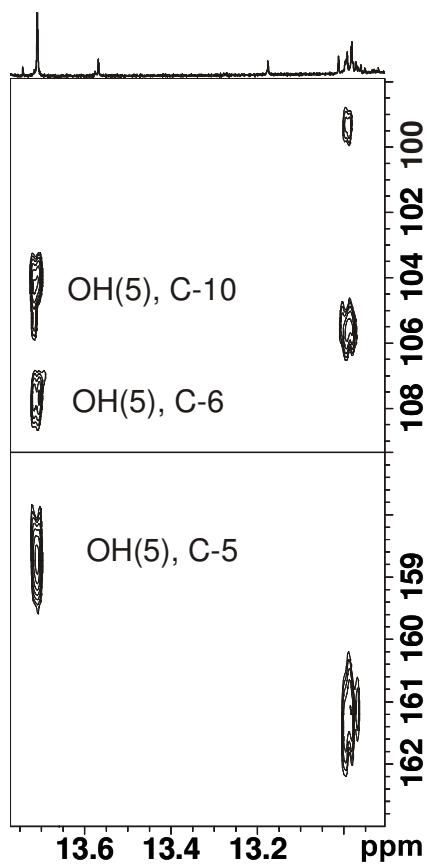


Σχήμα 7.6.6: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος του Σχήματος 7.6.5. (Α) Η περιοχή των 7.8 - 10.5 ppm, (Β) η περιοχή των 12.8 - 14.1 ppm. Η κορυφή με αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος, ενώ με (r) υποδηλώνονται οι απορροφήσεις των ομάδων -OH του ροσμαρινικού οξέος.



Σχήμα 7.6.7: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=288\text{K}$, $n_s=102$, $t_{\text{exp}}=13\text{h}$) του δείγματος του Σχήματος 7.6.5B.

Το αποτύπωμα του μεθανολικού εκχυλίσματος στο δισδιάστατο χάρτη, σχεδόν ταυτίζεται με αυτό του υδατικού. Για τα φλαβονοειδή στην περιοχή των ~ 13 ppm, λήφθηκαν παρόμοιες κορυφές διασταύρωσης. Για τα φλαβονοειδή στην περιοχή των ~ 14 ppm λήφθηκε μία παραπάνω κορυφή διασταύρωσης. Συγκεκριμένα η απορρόφηση στα 13.71 ppm εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης (Σχήμα 7.6.8) με τους άνθρακες στα 104.26 ppm (C-10), 107.72 ppm (C-6) και 158.81 ppm (C-5), και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα αποτελεί C-6-γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές [Hatano *et al.*, 1999].



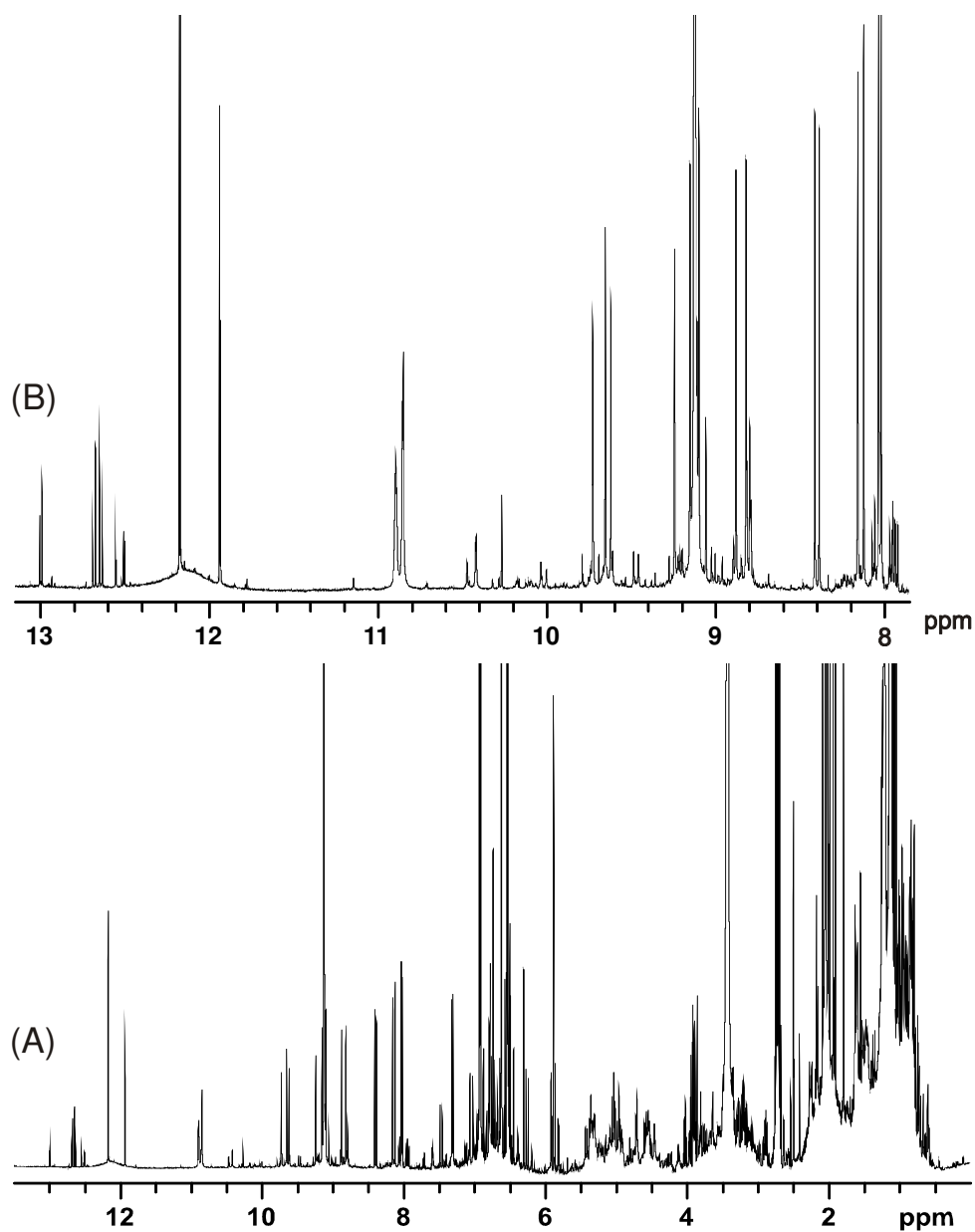
Σχήμα 7.6.8: Επιλεγμένη περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=102, t_{exp} =13h) του δείγματος του Σχήματος 7.6.5B.

8. ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR, LC-SPE-NMR ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

8.1 Φασματοσκοπία NMR μίας (1D) και δύο (2D) Διαστάσεων

Στην περαιτέρω πορεία της διδακτορικής διατριβής, παρασκευάστηκε εκχύλισμα ρίγανης σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (OET), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5.3. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ένας μετρίως πολικός διαλύτης, διαλυτός σε ύδωρ, με παραπλήσια τιμή πολικότητας, 4.3, με αυτής της ακετόνης, 5.4, σύμφωνα με τη κατάταξη κατά Snyder [Snyder *et al.*, 1979]. Στο Σχήμα 8.1.1 παρατίθενται φάσματα 500 MHz 1D NMR-¹H εκχυλίσματος (OET) σε διαλύτη DMSO-*d*₆, υπό τις βέλτιστες συνθήκες συγκέντρωσης και θερμοκρασίας για την επίτευξη του ελαχίστου του εύρους απορρόφησης των ομάδων –OH, λόγω ελαχιστοποίησης της ταχύτητας ανταλλαγής αυτών.

Με τις παραπάνω βελτιστοποιημένες συνθήκες λήφθηκε φάσμα NMR-¹H υψηλής διακριτικής ευκρίνειας των ομάδων –OH (Σχήμα 8.1.1B). Σε αυτό συντέλεσε και ο ρόλος του διαλύτη εκχύλισης, οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος πιθανόν δεν παρέλαβε ιόντα ή μέταλλα τα οποία υπάρχουν στο φυτικό υλικό και επηρεάζουν, λόγω του καταλυτικού τους ρόλου, την ταχύτητα ανταλλαγής των ενεργών πρωτονίων και ως εκ τούτου το εύρος απορρόφησης των ομάδων –OH. Η σύσταση του παραπάνω εκχυλίσματος είναι σχεδόν ταυτόσημη με αυτή του ακετονικού εκχυλίσματος. Χαρακτηριστικά μπορούν να συγκριθούν τα φάσματα NMR-¹H του εκχυλίσματος OET (Σχήμα 8.1.1) με αυτά του ακετονικού εκχυλίσματος (Σχήματα 6.4.2, 7.3.1 και 7.4.1 - 7.4.4).

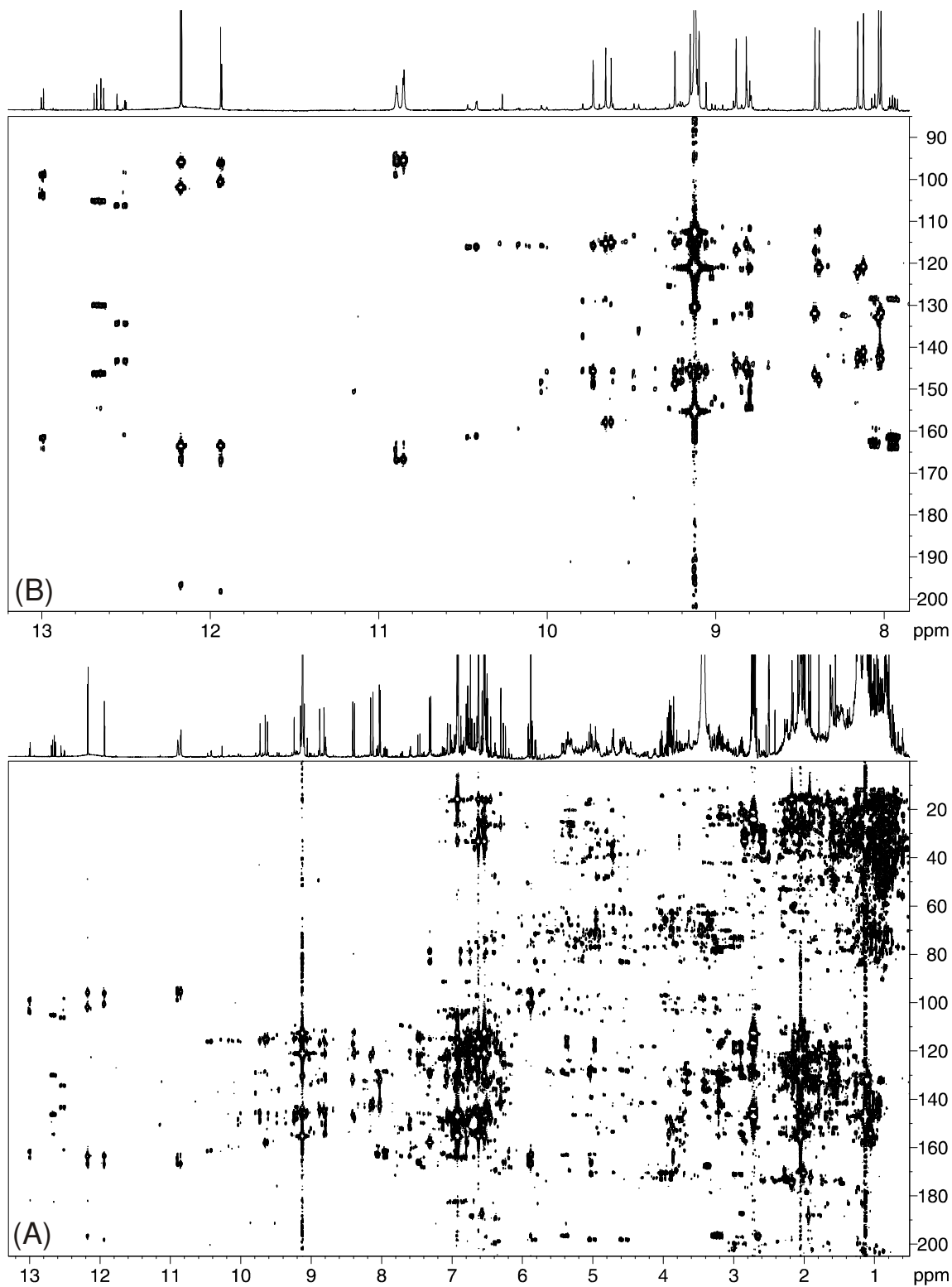


Σχήμα 8.1.1: (A) Φάσμα 500 MHz NMR- ^1H εκχυλίσματος 30.5 mg OET σε 0.6 mL $\text{DMSO-}d_6$ ($T=285\text{K}$, $n_s=512$, $t_{\text{exp}}=33\text{min}$). (B) Η περιοχή των 7.8 - 13.2 ppm.

Από το παραπάνω φάσμα του Σχήματος 8.1.1B, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί: α) η συστάδα τεσσάρων απορροφήσεων στα 12.6 - 12.7 ppm, όπου σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Goharia *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2007, Albach *et al.*, 2003] απορροφούν οι ομάδες $-\text{OH}(5)$ παραγώγων των φλαβονοειδών τα οποία στη θέση 6 του δακτυλίου (A) έχουν ως υποκαταστάτη ομάδα $-\text{OH}$ και στη θέση 7 είτε μέθοξυ είτε γλυκοζυλιωμένη υποκατάσταση, και β) οι απορροφήσεις στην περιοχή των 8.0 - 8.4 ppm. Θα

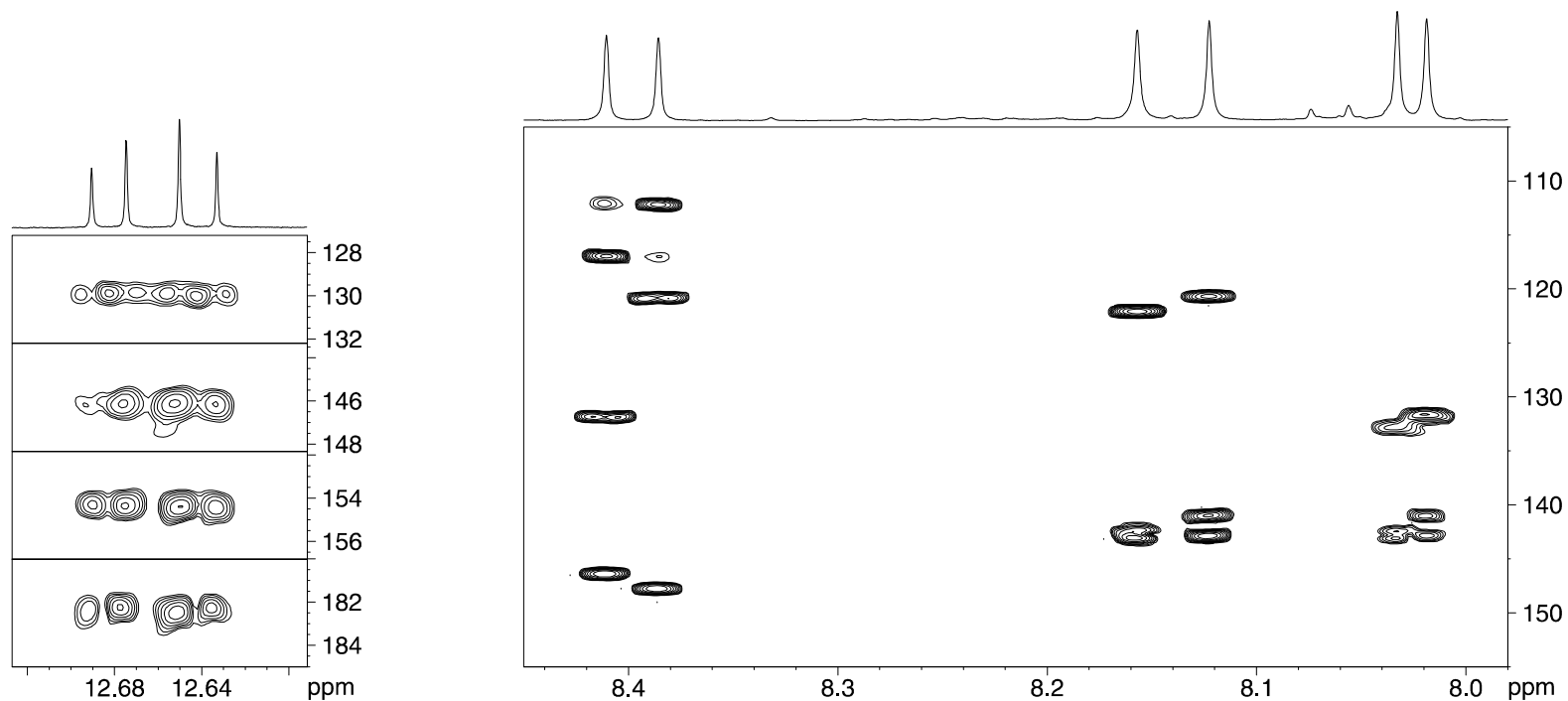
πρέπει να τονιστεί ότι είναι η πρώτη φορά, από όσων γνωρίζουμε, που εντοπίζεται απορρόφηση ομάδας –OH πλησίον των 8 ppm. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει τη μεγάλη διασπορά των απορροφήσεων των ομάδων –OH στη κλίμακα των ppm και το πολύ σημαντικό διαγνωστικό ρόλο που είναι δυνατόν να έχουν στην ανάλυση πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων. Είναι φανερό από το φάσμα του Σχήματος 7.1.1 ότι μπορεί να γίνει ταξινόμηση των απορροφήσεων των ομάδων –OH, ανάλογα με τη δομή που κατέχουν (βλέπετε κεφάλαιο 8.5).

Στο δείγμα του Σχήματος 8.1.1, εφαρμόστηκε δισδιάστατη φασματοσκοπία 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR που βελτιστοποιήθηκε για σταθερές σύζευξης $^nJ_{\text{HC}}$ στην περιοχή τιμών 6 έως 10 Hz, και για τις ασθενείς σταθερές σύζευξης $^5J_{\text{HC}}$ στην περιοχή τιμών $\leq$ των 2.5 Hz. Τα φάσματα που προέκυψαν επιδεικνύουν πληθώρα κορυφών διασταύρωσης (Σχήμα 8.1.2) μέσω των οποίων ταυτοποιήθηκαν όλες οι ενώσεις που απεικονίζονται στο Σχήμα 6.4.3.



Σχήμα 8.1.2: (A) Φάσμα 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 30.5 mg εκχυλίσματος OET σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=285\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). (B) Περιοχή απορρόφησης των ομάδων $-\text{OH}$.

Οι κορυφές διασταύρωσης που προέκυψαν από τις ομάδες –OH που απορροφούν στις περιοχές 12.6 - 12.7 ppm, και 8.0 - 8.4 ppm παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 8.1.3.

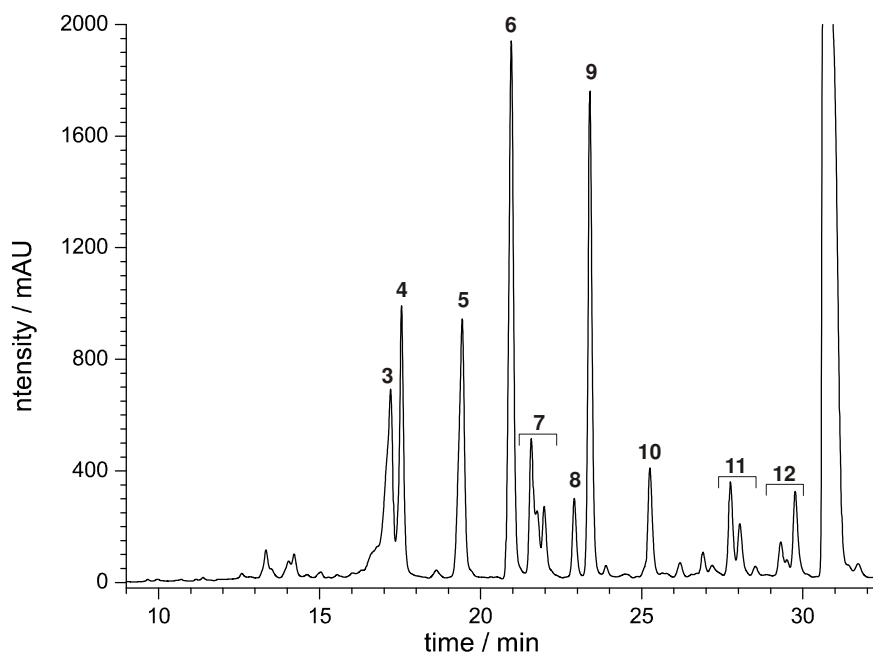


Σχήμα 8.1.3: Επιλεγμένες περιοχές κορυφών διασταύρωσης ομάδων –OH φάσματος 500 MHz 2D ¹H-¹³C HMBC NMR του Σχήματος 8.1.2.

Λόγω των σχεδόν ταυτόσημων μετατοπίσεων ¹³C και για τη περαιτέρω διερεύνηση αυτών των απορροφήσεων του εκχυλίσματος επιλέχθηκε η εφαρμογή της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR, που θα περιγραφεί στην επόμενη παράγραφο.

8.2 LC-SPE-NMR

Το χρωματογραφικό προφίλ του εκχυλίσματος OET που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των συστατικών με LC-SPE-NMR, κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στις μικροστήλες του συστήματος SPE, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.2.1, ενώ η σύσταση της κινητής φάσης βαθμιδωτής έκλουσης παρουσιάζεται στο Πίνακα 8.2.1.



Σχήμα 8.2.1: Χρωματογραφικά προφίλ του εκχυλίσματος OET στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκε για την παγίδευση των συστατικών με LC-SPE-NMR (ενέσιμος όγκος: 30 μ L διαλύματος 30 mg/mL).

Πίνακας 8.2.1: Σύσταση της κινητής φάσης για τη μελέτη του εκχυλίσματος OET με LC-SPE-NMR [Exarchou *et al.*, 2003].

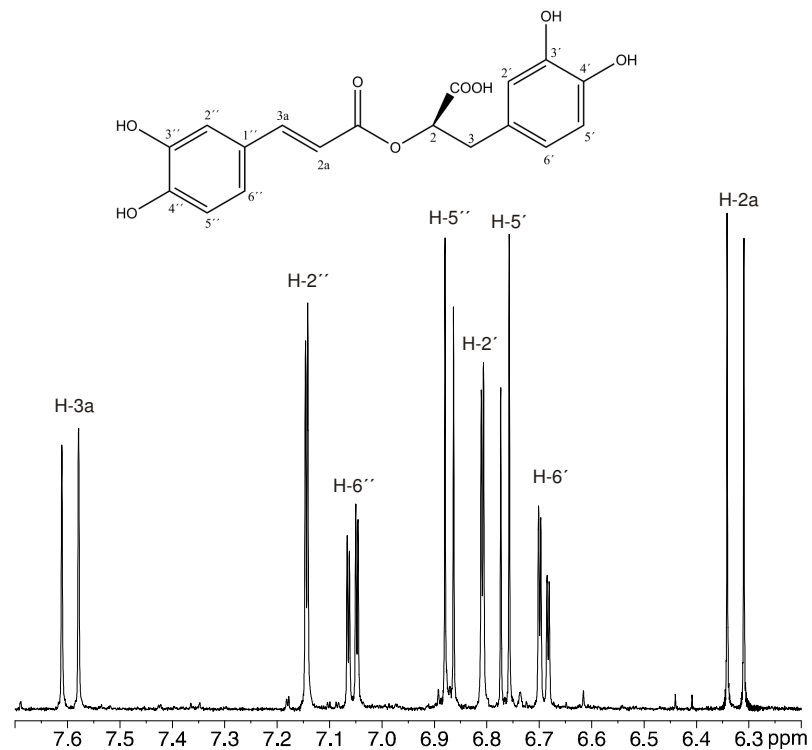
Χρόνος (min)	ACN (0.05 % μυρμηγκικό οξύ)	H ₂ O (0.05 % μυρμηγκικό οξύ)
0	5	95
25	30	70
29	35	65
30	40	60
33	70	30
37	100	0

Ενδεικτικό της σύστασης του OET εκχυλίσματος είναι ότι παρουσιάζει σχεδόν ταυτόσημο χρωματογραφικό προφίλ με αυτό του ακετονικού εκχυλίσματος της ρίγανης, όπως μελετήθηκε με LC-SPE-NMR σε προηγούμενη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας [Exarchou *et al.*, 2003]. Η έντονη απορρόφηση στα 31 min αποδίδεται στη καρβακρόλη, που είναι το κυρίαρχο συστατικό του εκχυλίσματος. Οι σχετικά έντονες απορροφήσεις που αντιστοιχούν στις κορυφές **3**, **4**, **5**, **6** και **9** αποδίδονται στις ενώσεις του Πίνακα 8.2.2.

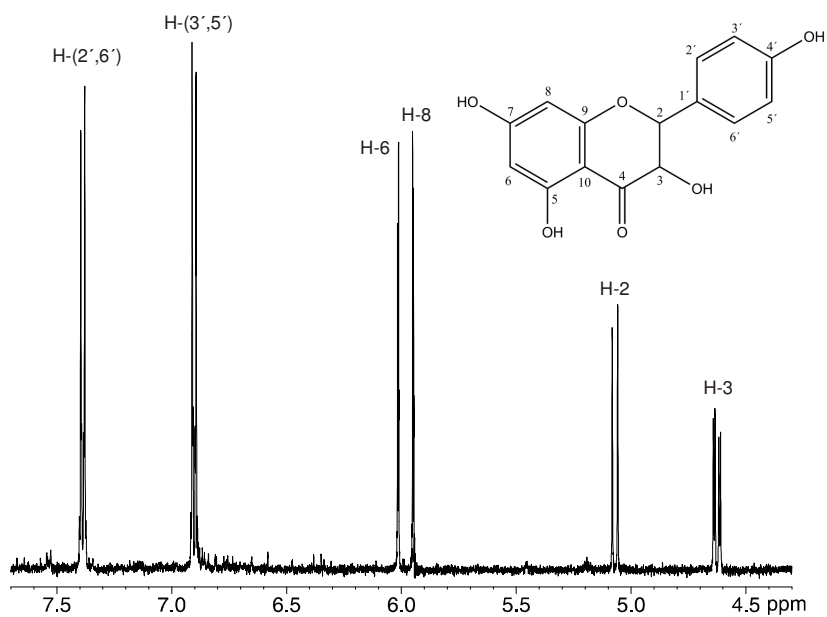
Πίνακας 8.2.2: Απόδοση κορυφών του χρωματογραφήματος του Σχήματος 7.2.1.

Κορυφή	Ένωση
3	ταξιφολίνη
4	ροσμαρινικό οξύ
5	αρομαδενδρίνη
6	εριοδικτυόλη
9	ναρινγενίνη - απιγενίνη

Ενδεικτικά, στο Σχήμα 8.2.2 παρατίθεται το φάσμα NMR-¹H της κορυφής **4**, όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE, και αντιστοιχεί στο ροσμαρινικό οξύ. Στο Σχήμα 8.2.3 παρατίθεται το φάσμα NMR-¹H της κορυφής **5**, υπό τις ίδιες συνθήκες, και αντιστοιχεί στο φλαβονοειδές αρομαδενδρίνη.



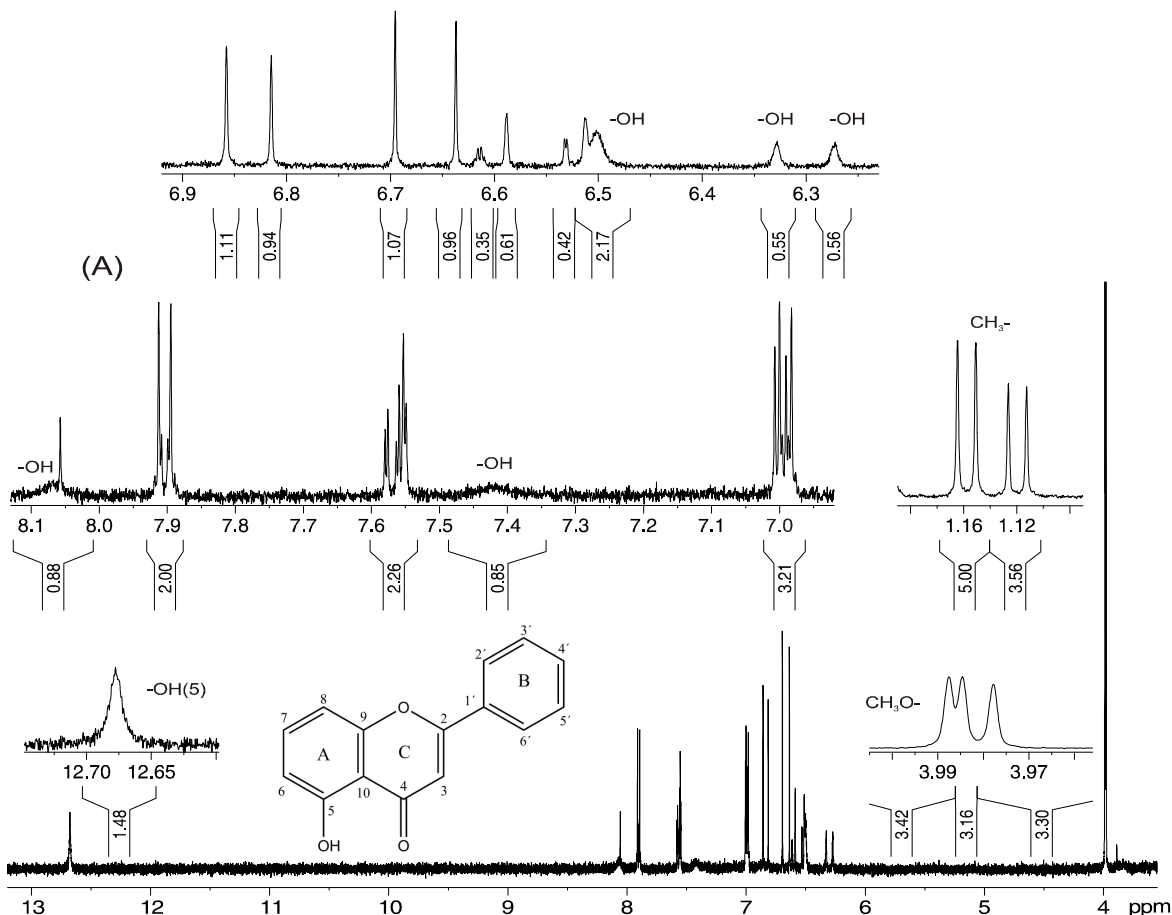
Σχήμα 8.2.2: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **4** (ροσμαρινικό οξύ) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{exp}}=2\text{m}$).



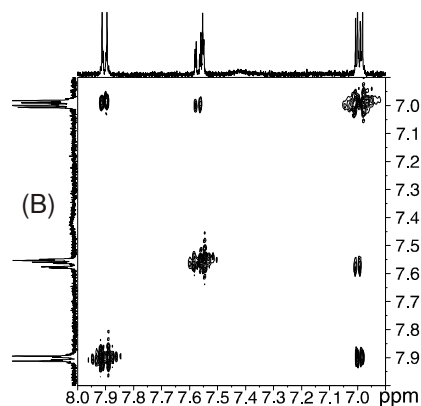
Σχήμα 8.2.3: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **5** (αρομαδενδρίνη) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=16$, $t_{\text{exp}}=1\text{m}$).

Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στις απορροφήσεις μικρής έντασης του χρωματογραφήματος που αντιστοιχούν στα εξής απομονωμένα κλάσματα - κορυφές: **7**, **8**, **10**, **11** και **12**.

Η κορυφή **7** αντιστοιχεί σε τρεις τουλάχιστον ενώσεις, όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα του Σχήματος 8.2.1. Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **7** παρατίθεται στο Σχήμα 8.2.4A.



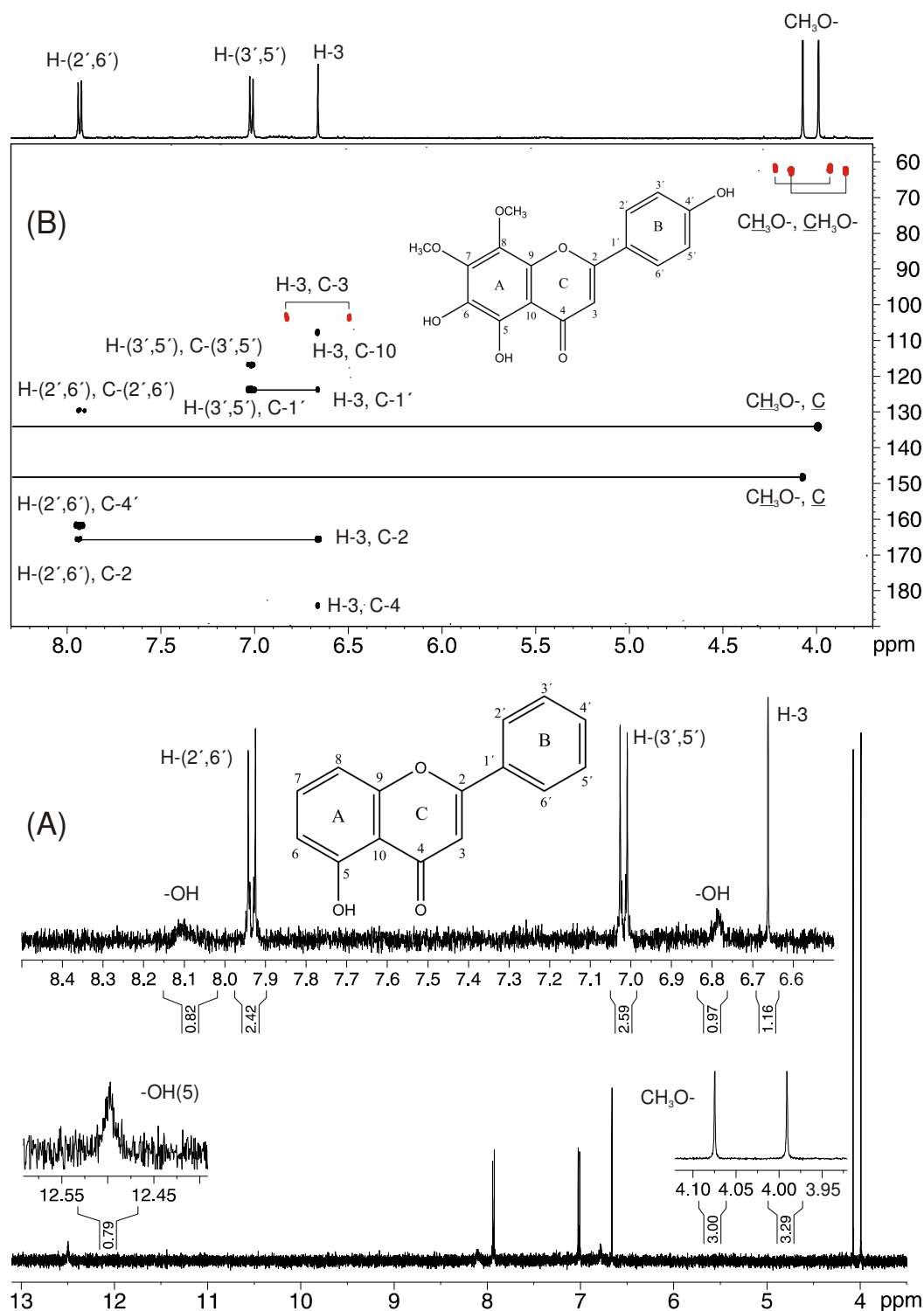
Σχήμα 8.2.4: (A) Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **7** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=256$, $t_{\text{exp}}=26\text{m}$). (B) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^1H COSY NMR ($T=298\text{K}$, $ns=8$, $t_{\text{exp}}=2\text{h}$). Επιδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των αρωματικών πρωτονίων του δακτυλίου (B) του φλαβονοειδούς.



Η απορρόφηση στα 12.68 ppm υποδηλώνει την παρουσία ομάδας OH(5) φλαβονοειδούς ενώ οι απορροφήσεις στην περιοχή των ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία τριών μεθόξυ ομάδων (CH₃O-) στο κλάσμα. Η αρωματική περιοχή (6 - 8 ppm) δεν είναι αρκετά ξεκάθαρη ώστε να μας επιτρέψει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για τις ενώσεις. Η ποσότητα, άλλωστε, του απομονωμένου κλάσματος δεν ήταν επαρκής για την εφαρμογή δισδιάστατης φασματοσκοπίας 2D ¹H-¹³C HMBC NMR, για τη περαιτέρω ανάλυση της δομής των ενώσεων στο κλάσμα - κορυφή 7.

Το φάσμα NMR-¹H της κορυφής 8, παρουσιάζει μοριακό ιόν 330.1 m/z, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.2.5A. Η απορρόφηση στα 12.50 ppm, υποδηλώνει την παρουσία ομάδας OH(5) φλαβονοειδούς, ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm δηλώνουν την παρουσία δύο μεθόξυ ομάδων (CH₃O-).

Οι απορροφήσεις στα 7.03 ppm (2H, d, *J* = 8.9 Hz) και 7.95 ppm (2H, d, *J* = 8.8 Hz) αποδίδονται στα πρωτόνια H-3', H-5', και H-2', H-6' αντίστοιχα, του δακτυλίου (B), τα οποία είναι κατανεμημένα συμμετρικά ως προς τον υποκαταστάτη του δακτυλίου σύμφωνα με την πολλαπλότητα που εμφανίζουν. Επισημαίνεται ότι τα πρωτόνια του δακτυλίου (B) παρουσιάζουν ισχυρότερο αρωματικό χαρακτήρα απ' ότι τα πρωτόνια του δακτυλίου (A). Η απορρόφηση στα 6.66 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3, καθώς εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης ²*J*_{HC} με το καρβονύλιο C-4 στα 184.18 ppm, όπως απεικονίζεται στο φάσμα 2D ¹H-¹³C HMBC NMR της κορυφής 8 (Σχήμα 8.2.5B). Οι ευρείες απορροφήσεις στα 8.10 και 8.78 ppm αποδίδονται σε ευκίνητες ομάδες -OH. Πέραν αυτών των απορροφήσεων, δεν εντοπίζεται άλλη απορρόφηση πρωτονίου στο φάσμα NMR-¹H.

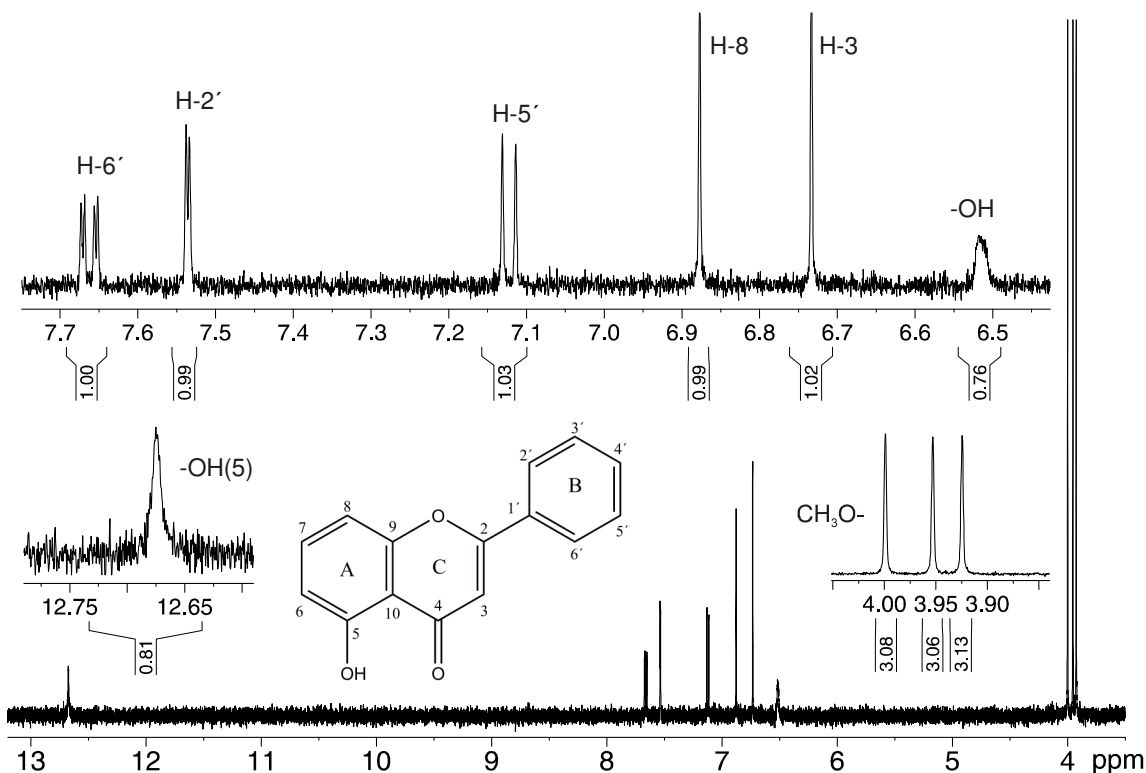


Σχήμα 8.2.5: (A) Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **8** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=32$, $t_{\text{expt}}=4\text{m}$). Επάνω τμήμα τυπική απεικόνιση φλαβονοειδούς. (B) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=298\text{K}$, $ns=60$, $t_{\text{expt}}=17\text{h}$).

Από το φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (Σχήμα 8.2.5B) διαπιστώνεται άμεσα η απουσία κοινών κορυφών διασταύρωσης μεταξύ των μεθόξυ ομάδων και των υπολοίπων πρωτονίων. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε *ortho* θέση ως προς τη μεθόξυ υποκατάσταση δεν εντοπίζεται πρωτόνιο. Οι μεθόξυ ομάδες στα 3.99 και 4.07 ppm, με τιμές άνθρακα-13 στα 62.52 και 61.84 ppm, αντίστοιχα, παρουσιάζουν κορυφές διασταύρωσης $^3J_{\text{HC}}$ στα 134.21 και 148.28 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H-3 (6.66 ppm) παρουσιάζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 107.68 ppm (C-10), 123.71 ppm (C-1'), 165.60 ppm (C-2) και 184.18 ppm (C-4). Η κοινή απορρόφηση των πρωτονίων H-(3',5') (7.03 ppm) παρουσιάζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 116.84 ppm (C-(3',5')) και 123.69 ppm (C-1'). Η κοινή απορρόφηση των πρωτονίων H-(2',6') (7.95 ppm) παρουσιάζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 129.58 ppm (C-(2',6')), 161.75 ppm (C-4') και 165.64 ppm (C-2). Σημειώνεται ότι λόγω συμμετρίας στο δακτυλίο (B), οι απορροφήσεις άνθρακα-13 των C-3' και C-6', και C-2' και C-6', αντίστοιχα, είναι ταυτόσημες. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2007a; 2007b; Moon *et al.*, 2006; 2005; Kim *et al.*, 2006].

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι ο υποκαταστάτης στη θέση 4' του δακτυλίου (B) είναι ομάδα -OH. Η δεύτερη ομάδα -OH εντοπίζεται στη θέση 6 του δακτυλίου (A) ενώ οι δύο μεθόξυ ομάδες ($\text{CH}_3\text{O}-$) εντοπίζονται στις θέσεις 7 και 8. Οι εξαιρετικά ευρείες απορροφήσεις των ομάδων -OH καθώς και η μικρή ποσότητα της απομονωμένου κλάσματος, δεν επέτρεψαν τη λήψη περαιτέρω κορυφών διασταύρωσης στο φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR. Κατά αυτόν τον τρόπο δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ακριβή υποκατάσταση του δακτυλίου (A).

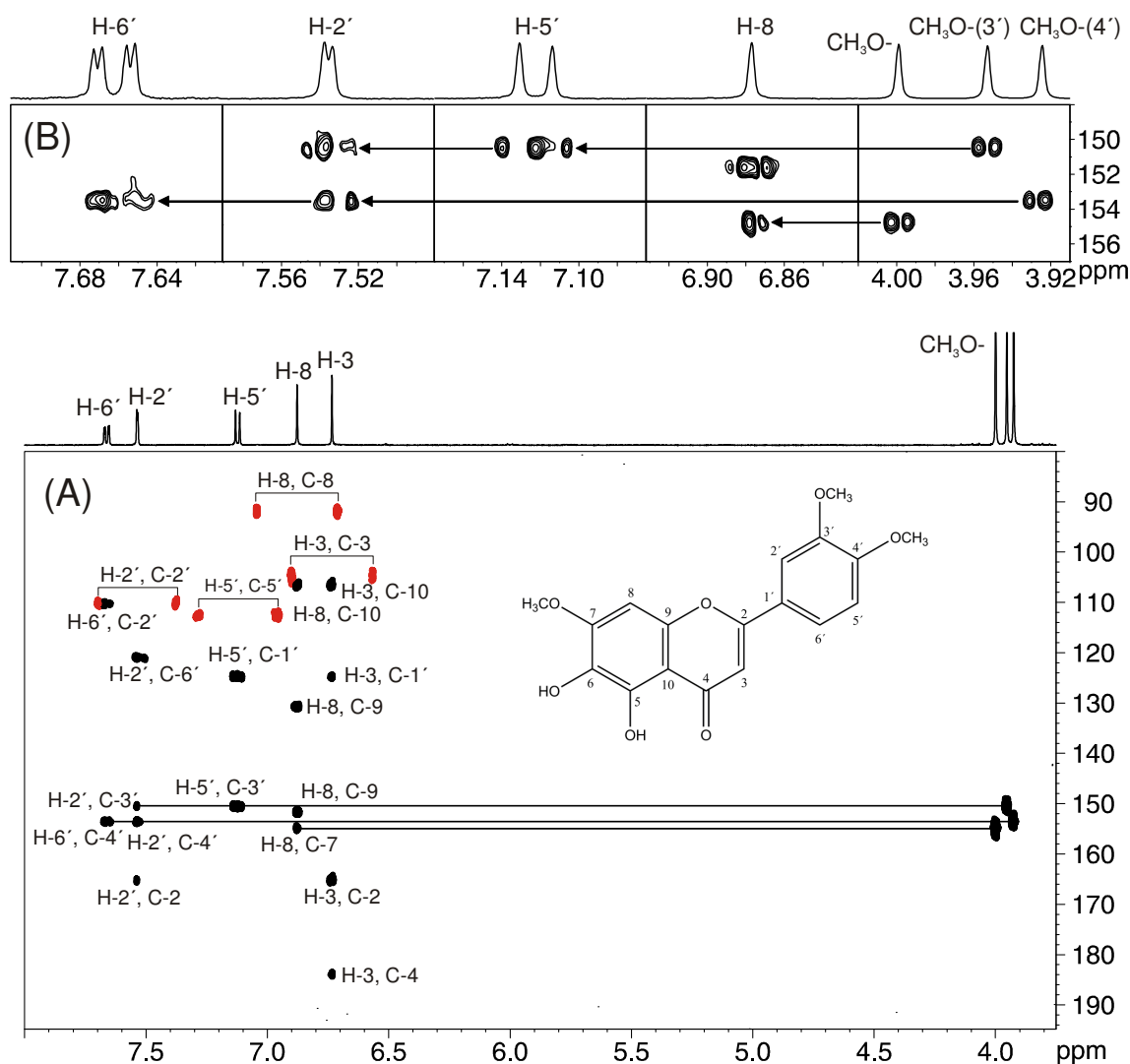
Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **10**, παρουσιάζει μοριακό ιόν 344.1 m/z, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.2.6. Η απορρόφηση στα 12.68 ppm, υποδηλώνει την παρουσία ομάδας OH(5) φλαβονοειδούς, ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία τριών μεθόξυ ομάδων ($\text{CH}_3\text{O}-$).



Σχήμα 8.2.6: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **10** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $n_s=32$, $t_{\text{expt}}=4\text{m}$).

Οι απορροφήσεις στα 7.12 ppm (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.54 ppm (1H, d, $J = 2.1$ Hz) και 7.66 ppm (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz) αποδίδονται στα πρωτόνια H-5' ($\delta_{\text{C}} = 112.65$ ppm), H-2' ($\delta_{\text{C}} = 110.22$ ppm) και H-6', αντίστοιχα, του δακτυλίου (B). Η απορρόφηση στα 6.73 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3 ($\delta_{\text{C}} = 104.69$ ppm), καθώς εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης $^2J_{\text{HC}}$ με το καρβονύλιο C-4 στα 183.15 ppm, όπως φαίνεται στο φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR της κορυφής **10** (Σχήμα 8.2.6B). Παρουσιάζει ακόμη κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 106.53 ppm (C-10), 124.73 ppm (C-1') και 165.17 ppm (C-2). Η απορρόφηση στα 6.88 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8 ($\delta_{\text{C}} = 91.84$ ppm) καθώς εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης στα 106.57 ppm (C-10), 151.65 ppm (C-9), 154.79 ppm (CH₃O-, C-7) και 130.69 ppm (C-6). Από τις κοινές κορυφές διασταύρωσης (Σχήμα 7.2.8) των μεθόξυ ομάδων με τα αντίστοιχα πρωτόνια προκύπτει ότι οι ομάδες CH₃O-(4') (3.92 ppm) και CH₃O-(3') (3.95 ppm) εντοπίζονται στο δακτύλιο (C), στις θέσεις 4' και 3', αντίστοιχα, ενώ η ομάδα CH₃O- (4.00 ppm) στη θέση 7 του δακτυλίου (A). Η ευρεία απορρόφηση στα 6.52 ppm, αποδίδεται σε ευκίνητη ομάδα και αποδίδεται στο OH(6) του

δακτυλίου (A). Πέραν αυτών των απορροφήσεων, δεν εντοπίζεται άλλη απορρόφηση στο φάσμα NMR- ^1H .



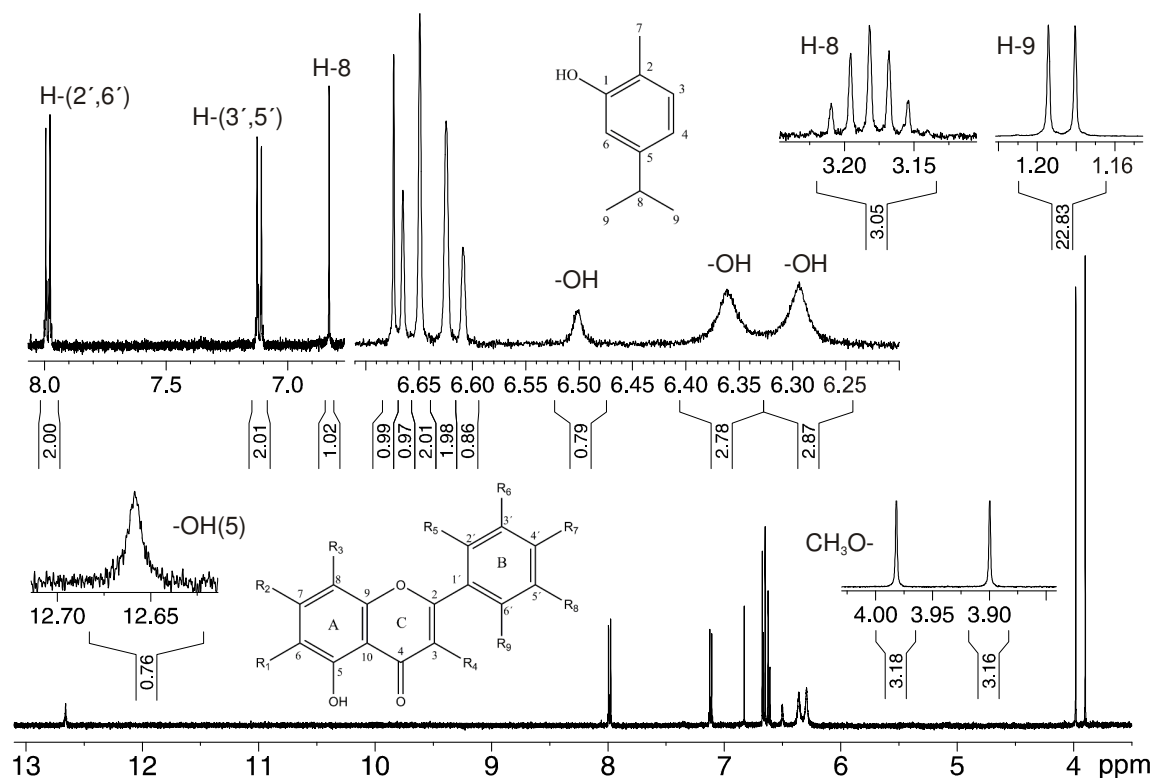
Σχήμα 8.2.7: (A) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR της κορυφής **10** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $n_s=60$, $t_{\text{exp}}=17\text{h}$). (B) Επιλεγμένες περιοχές του (A). Οι κοινές διασταύρωσης των μεθόξυ ομάδων με τα αντίστοιχα πρωτόνια επιδεικνύονται.

Από το φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR της κορυφής **10** (Σχήματα 8.2.7A και 8.2.7B) προκύπτει ότι το πρωτόνιο στα 7.12 ppm (H-5') εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 124.63 ppm (C-1') και 150.48 ppm (CH₃O-(3')). Το πρωτόνιο στα 7.54 ppm (H-2') εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 120.83 ppm (C-6'), 153.50

ppm ($\text{CH}_3\text{O}-(4')$), 150.42 ppm ($\text{CH}_3\text{O}-(3')$) και 165.27 ppm (C-2). Το πρωτόνιο στα 7.66 ppm (H-6') εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 110.18 ppm (C-2') και 153.54 ppm ($\text{CH}_3\text{O}-(4')$). Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006].

Οι εξαιρετικά ευρείες απορροφήσεις των ομάδων $-\text{OH}$ καθώς και η μικρή ποσότητα της απομονωμένου κλάσματος, δεν επέτρεψαν τη λήψη παραπάνω κορυφών διασταύρωσης στο φάσμα 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR.

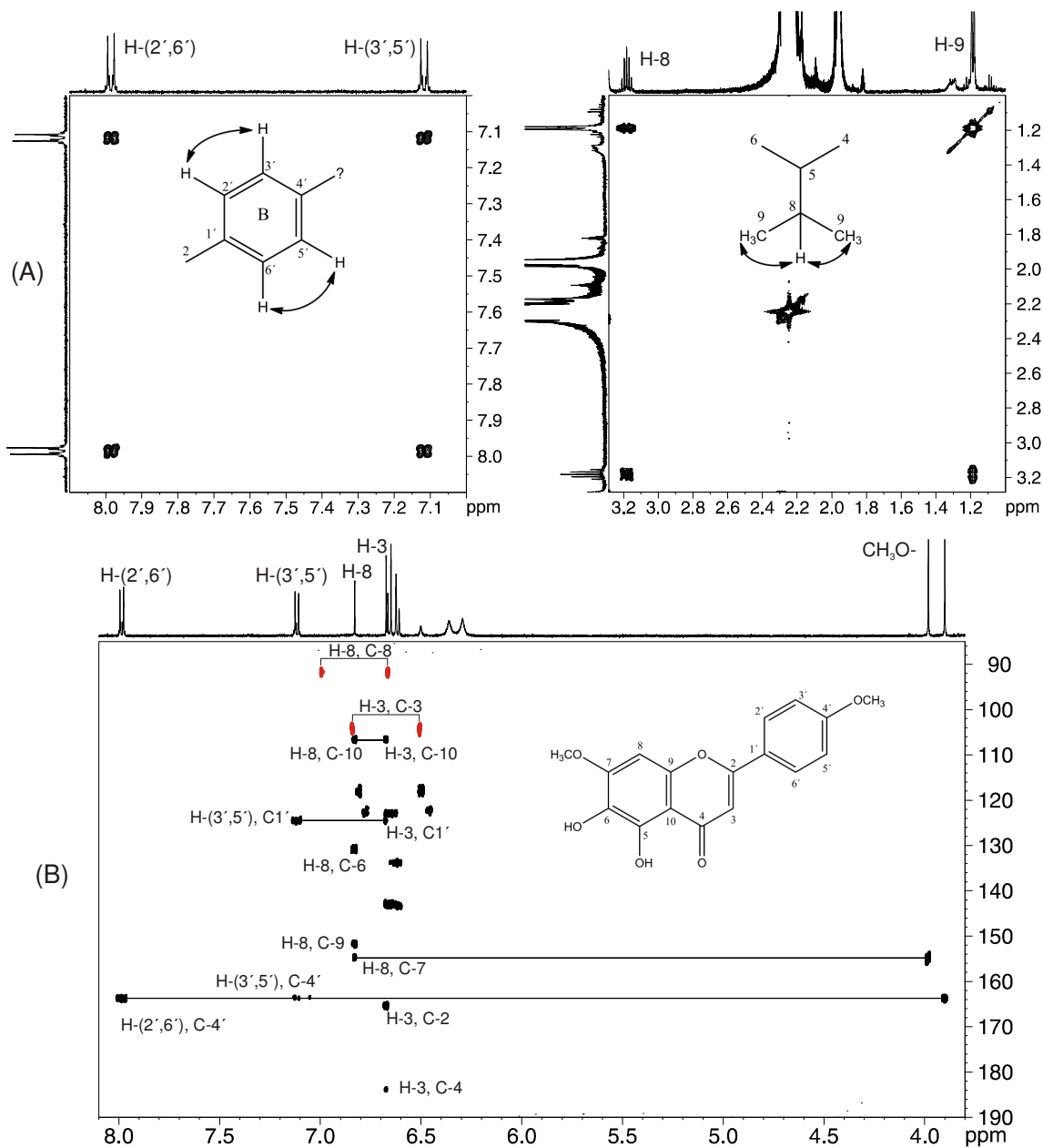
Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **11**, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.2.8. Από το χρωματογράφημα (Σχήμα 8.2.1) έπεται ότι η κορυφή **11** περιλαμβάνει δύο τουλάχιστον ενώσεις. Η απορρόφηση στα 12.66 ppm υποδηλώνει την παρουσία ομάδας $\text{OH}(5)$ φλαβονοειδούς, ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία δύο μεθοξυ ομάδων ($\text{CH}_3\text{O}-$).



Σχήμα 8.2.8: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **11** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE (T=298K, ns=128, $t_{\text{exp}}=14\text{m}$).

Από το φάσμα του Σχήματος 8.2.8 και σύμφωνα με τις ολοκληρώσεις των απορροφήσεων διαπιστώνεται η παρουσία φλαβονοειδούς και τουλάχιστον τριών ενώσεων παραγώγων της καρβακρόλης. Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 3.18 ppm (3H, m) και στα 1.19 ppm (~24H, d, $J = 6.9$ Hz) αποδίδονται στα πρωτόνια H-8 και H-9, αντίστοιχα, της ισοπρόπυλο ομάδας της καρβακρόλης, και πιθανόν να οφείλονται σε παράγωγα αυτής ή/και σε προϊόντα διμερισμού της. Οι απορροφήσεις στα 7.12 ppm (2H, d, $J = 9.0$ Hz) και 7.98 ppm (2H, d, $J = 9.0$ Hz) αποδίδονται στα πρωτόνια H-3', H-5', και H-2', H-6' αντίστοιχα, του δακτυλίου (B), κατανεμημένα συμμετρικά στο δακτύλιο ως προς τον υποκαταστάτη σύμφωνα με την πολλαπλότητα που εμφανίζουν. Από το φάσμα 2D ^1H - ^1H COSY NMR (Σχήμα 8.2.9A) επιβεβαιώνεται η παραπάνω ταυτοποίηση αυτών των απορροφήσεων.

Οι ευρείες απορροφήσεις στα 6.30 ppm, 6.36 ppm και 6.50 ppm, αποδίδονται σε ευκίνητες ομάδες -OH.



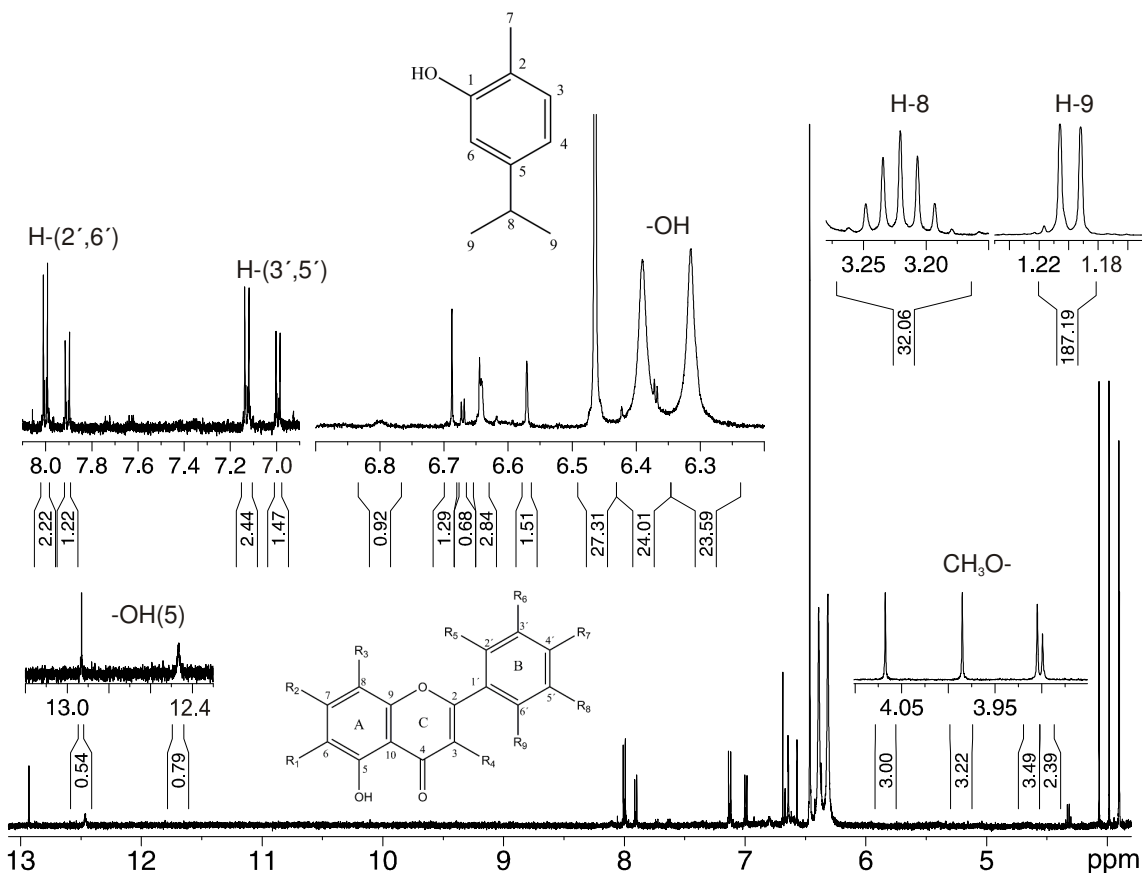
Σχήμα 8.2.9: (A) Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz ^1H - ^1H COSY NMR της κορυφής **11** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE ($T=298\text{K}$, $ns=8$, $t_{\text{exp}}=3\text{h}$). Επιδεικνύονται οι κορυφές διασταύρωσης των αρωματικών πρωτονίων του δακτυλίου (B) του φλαβονοειδούς και της ισοπρόπυλο ομάδας των παραγώγων της καρβακρόλης. (B) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=298\text{K}$, $ns=60$, $t_{\text{exp}}=17\text{h}$).

Από το φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR της κορυφής **11** (Σχήμα 8.2.9B) προκύπτει ότι η μεθόξυ ομάδα στα 3.98 ppm εμφανίζει κοινή κορυφή διασταύρωσης στα 163.73 ppm με τα πρωτόνια H-(2',6') και H-(3',5') και επομένως εντοπίζεται στο (B) δακτύλιο του

φλαβονοειδούς (θέση 4'). Η δεύτερη μεθόξυ ομάδα στα 3.90 ppm εμφανίζει κοινή κορυφή διασταύρωσης στα 154.70 ppm με πρωτόνιο που απορροφά στα 6.83 ppm. Η απορρόφηση αυτή αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8 (1H, s) ($\delta_C = 91.81$ ppm) του φλαβονοειδούς καθώς εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης και με τους άνθρακες στα 106.60 ppm (C-10), 130.80 ppm (C-6) και 151.70 ppm (C-9). Συνεπώς η δεύτερη μεθόξυ ομάδα εντοπίζεται στη θέση 7 του δακτυλίου (A). Η απορρόφηση στα 6.67 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3 ($\delta_C = 104.38$ ppm) καθώς εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης $^2J_{HC}$ με το καρβονύλιο C-4 στα 183.81 ppm, και με τους άνθρακες στα 106.70 ppm (C-10), 124.65 ppm (C-1') και 165.25 ppm (C-2). Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006].

Η συμμετρία που εμφανίζουν τα παράγωγα ή/και οι διμερείς μορφές της καρβακρόλης καθώς και οι εξαιρετικά ευρείες απορροφήσεις των ομάδων –OH δεν επέτρεψαν την περαιτέρω ταυτοποίηση των υπόλοιπων απορροφήσεων καθώς και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τα παράγωγα αυτά.

Το φάσμα NMR- 1H της κορυφής **12**, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.2.10. Από το χρωματογράφημα (Σχήμα 8.2.1) προκύπτει ότι η κορυφή 12 περιλαμβάνει τρεις τουλάχιστον ενώσεις. Οι απορροφήσεις στα 12.47 ppm και 12.93 ppm, OH(5), υποδηλώνουν την παρουσία δύο ενώσεων τύπου φλαβονοειδούς, ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία τεσσάρων μεθόξυ ομάδων (CH₃O-). Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα 3.22 ppm (32H, m) και στα 1.19 ppm (~187H, d, $J = 6.8$ Hz) αποδίδονται στα πρωτόνια H-8 και H-9, αντίστοιχα, της ισοπρόπυλο ομάδας της καρβακρόλης, και πιθανόν να οφείλονται σε παράγωγα αυτής ή/και σε προϊόντα διμερισμού της. Οι απορροφήσεις στα 7.13 ppm (2.4H, d, $J = 9.0$ Hz), 8.00 ppm (2.2H, d, $J = 9.0$ Hz) και 6.99 ppm (1.5H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.91 ppm (1.2H, d, $J = 9.0$ Hz), αποδίδονται στα πρωτόνια H-3', H-5', και H-2', H-6' αντίστοιχα, του δακτυλίου (B), των δύο φλαβονοειδών. Η ποσότητα, όμως, του απομονωμένου κλάσματος δεν ήταν επαρκής για την εφαρμογή δισδιάστατης φασματοσκοπίας και τη περαιτέρω ανάλυση της δομής των ενώσεων αυτών. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση της κορυφής **11**, η συμμετρία του εμφανίζουν τα παράγωγα ή/και οι διμερείς μορφές της καρβακρόλης καθώς και οι εξαιρετικά ευρείες απορροφήσεις των ομάδων –OH δεν επέτρεψαν την πλήρη ταυτοποίηση των υπόλοιπων απορροφήσεων.

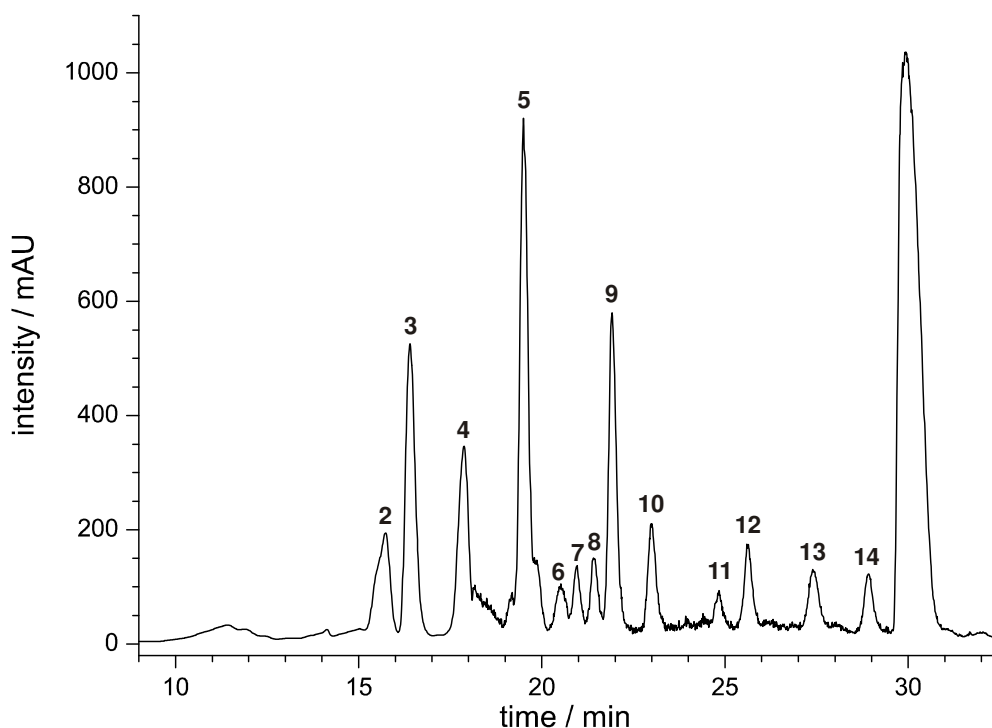


Σχήμα 8.2.10: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **12** σε διαλύτη ακετονιτρίλιο- d_3 , όπως προέκυψε κατόπιν πενταπλής παγίδευσης στο σύστημα SPE (T=298K, ns=256, t_{exp1} =28m).

Για τη περαιτέρω μελέτη αυτών των ενώσεων, στα απομονωμένα κλάσματα, έγινε προσπάθεια εφαρμογής της μεθοδολογίας με το πικρικό οξύ για την εκλέπτυνση των απορροφήσεων των ομάδων -OH. Έλαβε χώρα απομάκρυνση του διαλύτη και επαναδιάλυση σε DMSO- d_6 . Η διεργασία αυτή δεν ήταν επιτυχής, γεγονός που οφείλεται κατά κύριο λόγο στις μικρές ποσότητες των απομονωμένων κλασμάτων. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η εφαρμογή της παρασκευαστικής χρωματογραφίας. Με τη χρωματογραφία αυτή μπορεί να αυξηθεί κατά ένα μεγάλο παράγοντα η ποσότητα του αναλυόμενου εκχυλίσματος, και επομένως των απομονωμένων κλασμάτων, σε σχέση με την αναλυτική χρωματογραφία που εφαρμόστηκε, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτόν την λαμβανόμενη πληροφορία από τα φάσματα NMR.

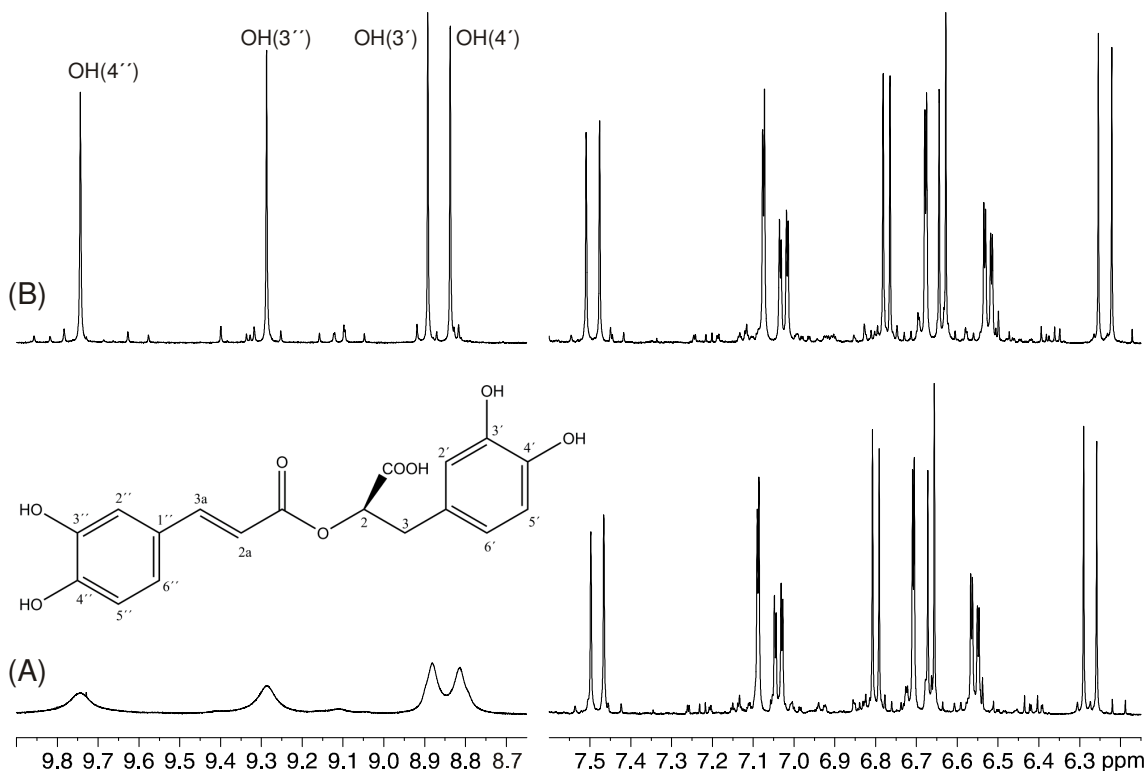
8.3 Απομόνωση Κλασμάτων - Χρήση Πικρικού Οξέος

Το χρωματογραφικό προφίλ του εκχυλίσματος OET που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κλασμάτων μέσω της παρασκευαστικής χρωματογραφίας απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.1. Η σύσταση της κινητής φάσης βαθμιδωτής έκλουσης παρουσιάζεται στο Πίνακα 8.2.1.



Σχήμα 8.3.1: Χρωματογραφικά προφίλ του εκχυλίσματος OET στα 280 nm που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κλασμάτων (ενέσιμος όγκος: 2.5 mL διαλύματος 27.2 mg/mL).

Το χρωματογραφικά προφίλ του Σχήματος 8.3.1 είναι σχεδόν ταυτόσημο με αυτό του Σχήματος 8.2.1. Η έντονη απορρόφηση στα 30.5 min αποδίδεται στη καρβακρόλη, που είναι το κυρίαρχο συστατικό του εκχυλίσματος. Τα απομονωμένα κλάσματα, κατόπιν απομακρύνσεως του συστήματος διαλυτών (ACN/H₂O), επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 0.5 mL διαλύτη DMSO-*d*₆ για τη λήψη φασμάτων NMR. Με τη προσθήκη πικρικού οξέος έλαβε χώρα εκλέπτυνση των απορροφήσεων των ομάδων –OH. Ενδεικτικά, στο Σχήμα 8.3.2 παρατίθεται το φάσμα NMR-¹H της κορυφής **4**, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος και αντιστοιχεί στο ροσμαρινικό οξύ.

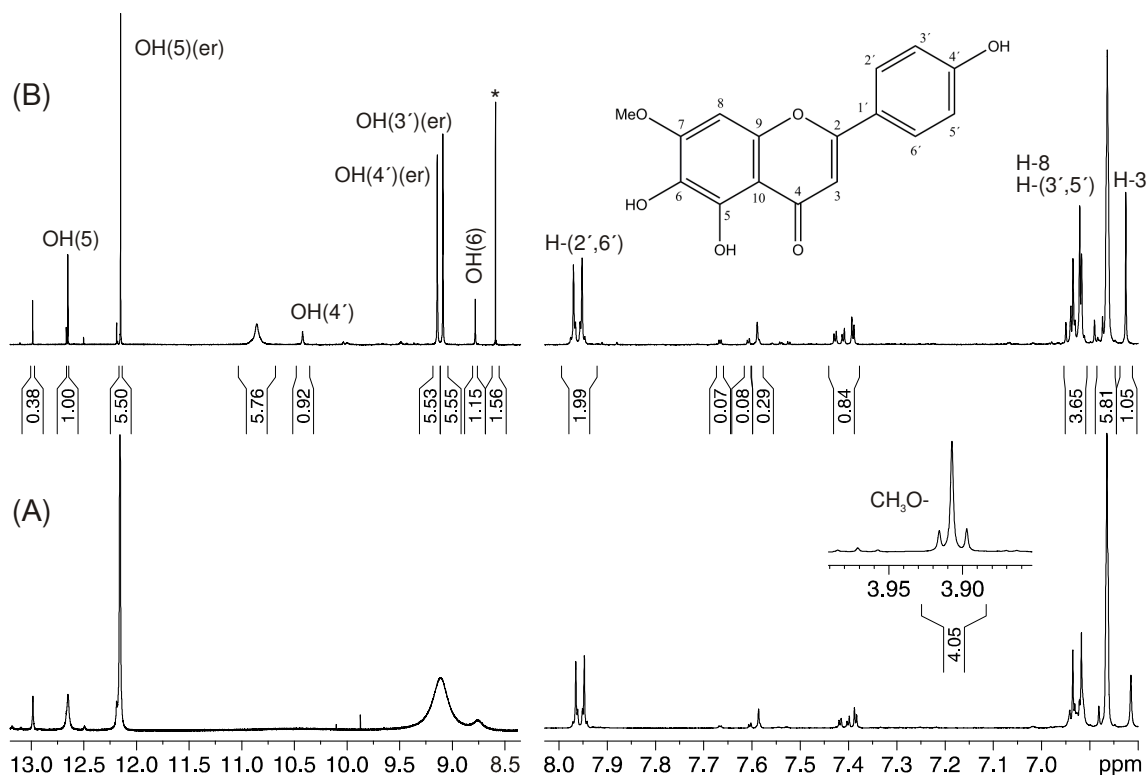


Σχήμα 8.3.2: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **4** (ροσμαρινικό οξύ) σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 ($T=292\text{K}$, $ns=64$, $t_{\text{exp}}=8\text{m}$). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 65 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος.

Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στις μικρές έντασης απορροφήσεις του χρωματογραφήματος που αντιστοιχούν στα εξής απομονωμένα κλάσματα - κορυφές: **6**, **7**, **10**, **12**, **13** και **14**. Όσον αφορά τις κορυφές **8** και **11**, πειραματικά σφάλματα κατά τη διαδικασία απομόνωσης, απομάκρυνσης του διαλύτη και επαναδιαλυτοποίησης σε DMSO- d_6 , δεν κατέστησαν δυνατή τη λήψη φασμάτων NMR.

Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **6**, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.3. Από τις απορροφήσεις στην περιοχή πάνω των 12 ppm υποδηλώνεται η παρουσία τριών ομάδων OH(5) ενώσεων φλαβονοειδών. Η έντονη απορρόφηση στα 12.15 ppm αποδίδεται στην εριοδικτυόλη, OH(5)(er), η απορρόφηση στα 12.65 ppm σε μέθοξυ παράγωγο φλαβονοειδούς (βλέπετε παρακάτω) ενώ η απορρόφηση στα 12.99 ppm σε μία άλλη ένωση φλαβονοειδής. Από τις απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνεται η παρουσία δύο μεθόξυ ομάδων ($\text{CH}_3\text{O}-$) με λόγο ολοκληρωμάτων 3:1. Πιθανόν η δεύτερη μεθόξυ ομάδα, όπως προκύπτει από τις σχετικές ολοκληρώσεις να

σχετίζεται με την απορρόφηση στα 12.99 ppm. Λόγω μικρής ποσότητας της συγκεκριμένης ένωσης δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα.

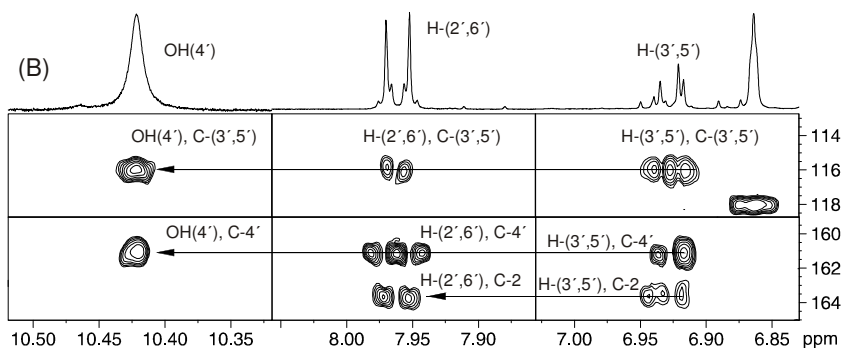
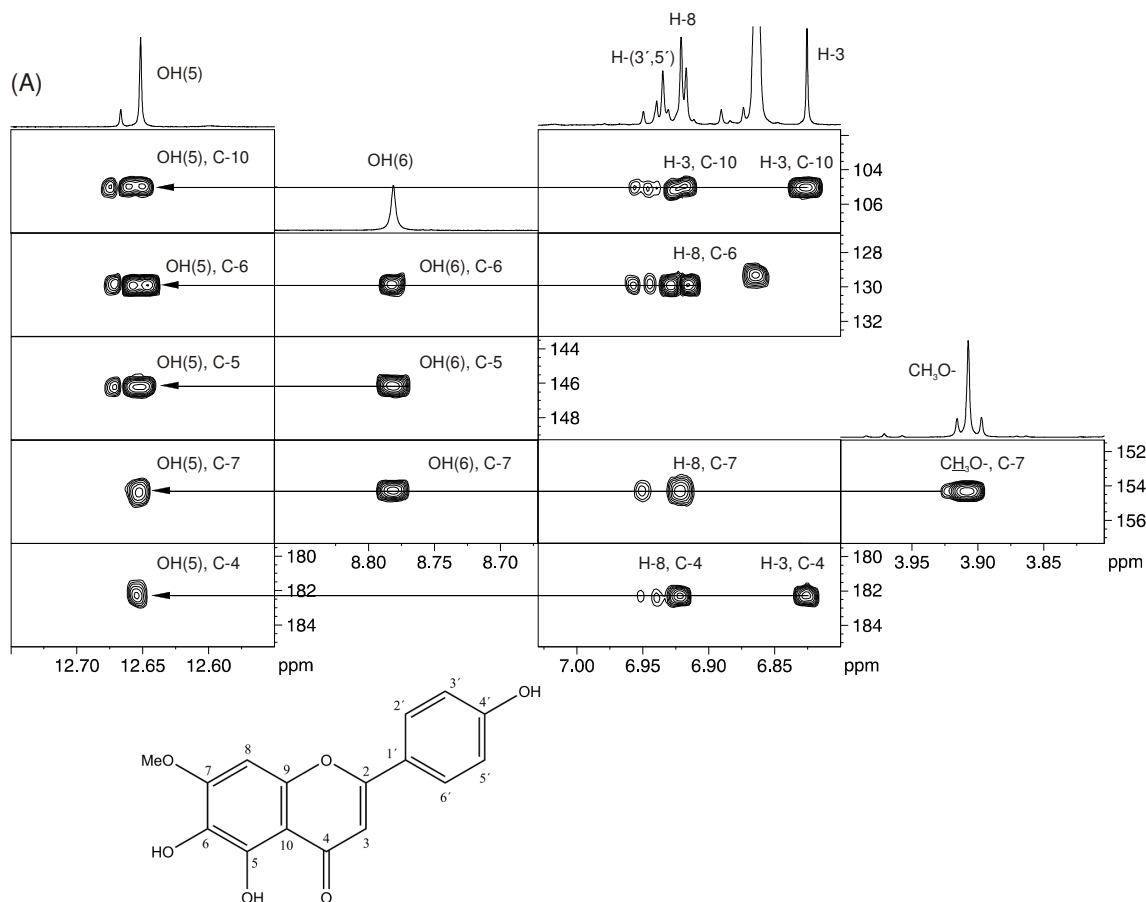


Σχήμα 8.3.3: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR-¹H της κορυφής **6** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=288K, ns=128, *t*_{expt}=17m. (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 36 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος.

Οι απορροφήσεις στα 6.93 ppm (2H, d, *J* = 8.9 Hz) (δ_C = 116.01 ppm) και 7.93 ppm (2H, d, *J* = 8.9 Hz) (δ_C = 128.45 ppm) αποδίδονται στα πρωτόνια H-3', H-5', και H-2', H-6' αντίστοιχα, του δακτυλίου (B). Η απορρόφηση στα 6.83 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3 (δ_C = 102.55 ppm), καθώς εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης με το καρβονύλιο C-4 στα 182.26 ppm. Η απορρόφηση στα 6.92 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8 (δ_C = 91.24 ppm). Οι κορυφές στα 8.78 και 10.42 ppm, που εκλεπτύνθηκαν κατόπιν προσθήκης του πικρικού οξέος, αποδίδονται στις ομάδες OH(6) και OH(4'), αντίστοιχα. Οι απορροφήσεις στα 9.09 ppm και 9.14 ppm, αποδίδονται στις ομάδες -OH του δακτυλίου (B) της εριοδικτυόλης, OH(3')(er) και OH(4')(er), αντίστοιχα.

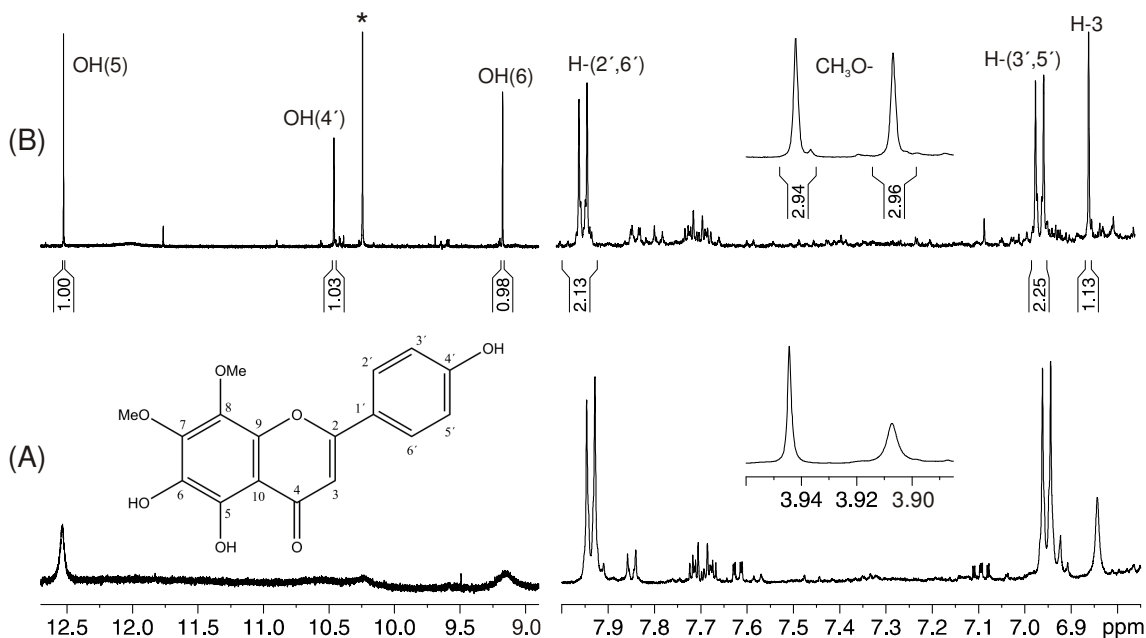
Από την εφαρμογή φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR προκύπτει ότι τα πρωτόνια H-(2',6') εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 115.93 ppm (C-(3',5')), 128.45 ppm (C-(2',6')), 161.10 ppm (C-4') και 163.64 ppm (C-2). Τα πρωτόνια H-(3',5') εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 115.96 ppm (C-(3',5')), 121.30 ppm (C-1') 161.23 ppm (C-4') και 163.64 ppm (C-2). Το πρωτόνιο H-3 εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 105.12 ppm (C-10), 121.41 ppm (C-1'), 146.01 ppm (C-5), 163.75 ppm (C-2) και 182.17 ppm (C-4). Το πρωτόνιο H-8 εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 105.02 ppm (C-10), 129.92 ppm (C-6), 149.64 ppm (C-9), και 154.31 ppm (C-7). Η ομάδα OH(5) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 105.00 ppm (C-10), 129.90 ppm (C-6), 146.12 ppm (C-5), 154.32 ppm (C-7) και 182.26 ppm (C-4). Η ομάδα OH(6) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 129.89 ppm (C-6), 146.09 ppm (C-5) και 154.27 ppm (C-7). Η ομάδα OH(4') εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 115.95 ppm (C-(3',5')) και 161.16 ppm (C-4').

Στο παρακάτω Σχήμα 8.3.4 παρατίθενται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης όπως προέκυψαν από φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR που επιβεβαιώνουν τη δομή της ένωσης ως μεθόξυ παράγωγο φλαβονοειδούς και βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006].



Σχήμα 8.3.4: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=288\text{K}$, $n_s=96$, $t_{\text{expt}}=12.5\text{h}$). της κορυφής **6** σε 0.5 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$, κατόπιν προσθήκης 36 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων $-\text{OH}$: (A) $\text{OH}(5)$ και $\text{OH}(6)$, και (B) $\text{OH}(4')$.

Το φάσμα $\text{NMR}-^1\text{H}$ της κορυφής **7**, παρουσιάζει μοριακό ιόν 330.1 m/z, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.5.



Σχήμα 8.3.5: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **7** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 ($T=290\text{K}$, $n_s=256$, $t_{\text{expt}}=34\text{m}$). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 37 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).

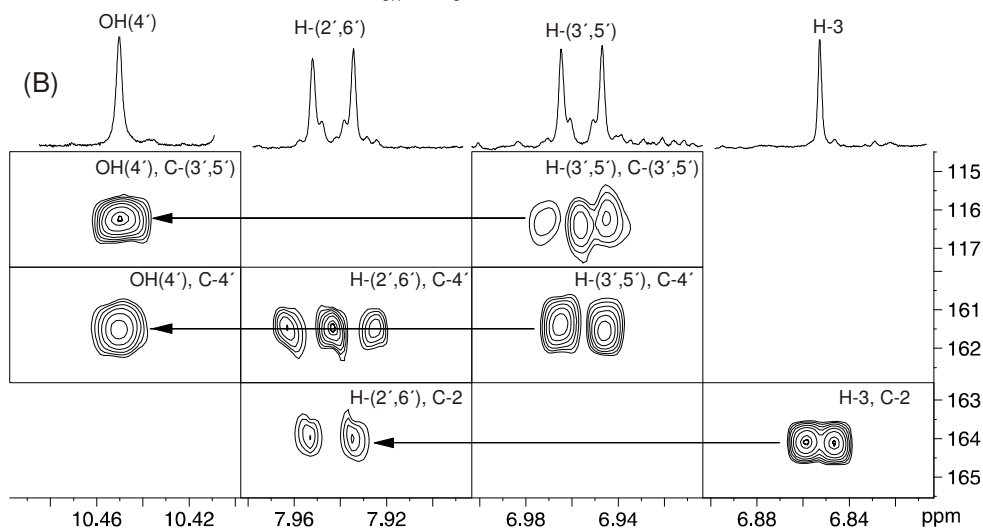
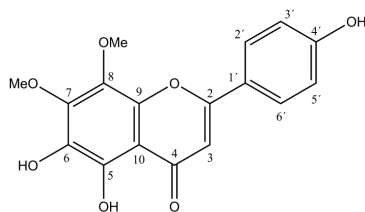
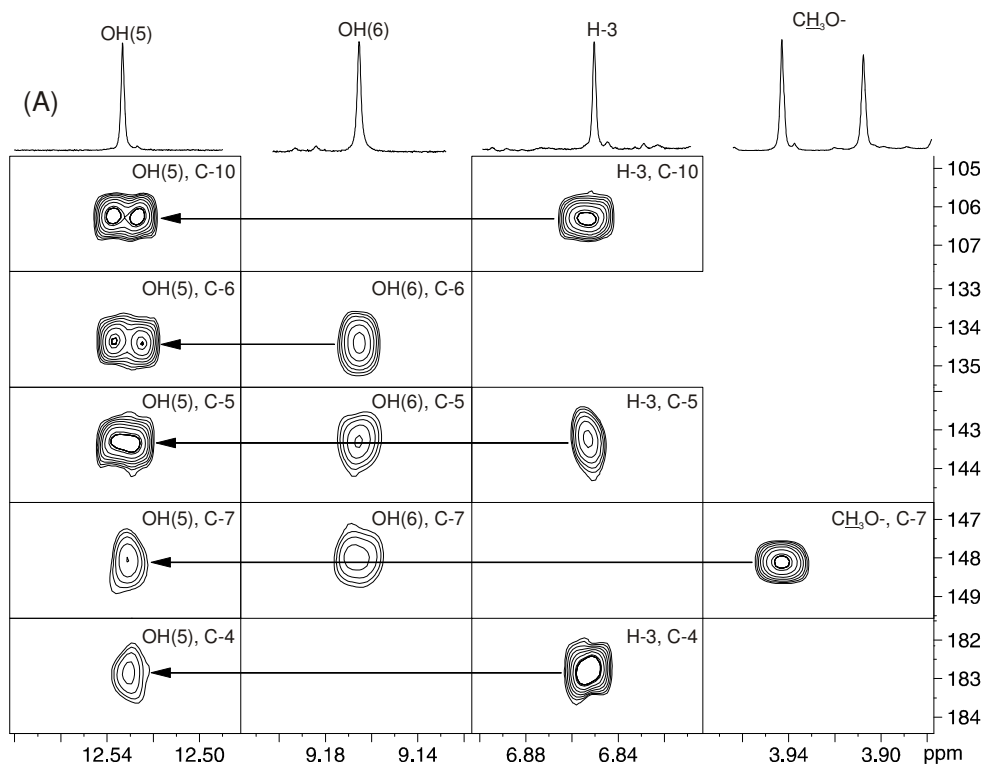
Η απορρόφηση στα 12.53 ppm υποδηλώνει την παρουσία ομάδας OH(5) φλαβονοειδούς ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία δύο μεθόξυ ομάδων ($\text{CH}_3\text{O}-$).

Οι απορροφήσεις στα 6.96 ppm (2H, d, $J = 8.8$ Hz) ($\delta_{\text{C}} = 116.34$ ppm) και 7.94 ppm (2H, d, $J = 8.7$ Hz) ($\delta_{\text{C}} = 128.73$ ppm) αποδίδονται στα πρωτόνια H-3', H-5', και H-2', H-6' αντίστοιχα, του δακτυλίου (B). Η απορρόφηση στα 6.85 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3 ($\delta_{\text{C}} = 102.58$ ppm), καθώς εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης με το καρβονύλιο C-4 στα 182.81 ppm. Οι κορυφές στα 9.17 και 10.45 ppm, που εκλεπτύνθηκαν κατόπιν προσθήκης του πικρικού οξέος, αποδίδονται στις ομάδες OH(6) και OH(4'), αντίστοιχα. Η έντονη κορυφή στα 10.25 ppm (υποδηλώνετε με αστερίσκο) αποδίδεται στην απορρόφηση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) [Pajunena *et al.*, 2008; Stephenson *et al.*, 2005] που εντοπίζεται σε εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων [Kiuchi *et al.*, 2002; Casteel, 1999]. Η μία μεθόξυ ομάδα στα 3.94 ppm εντοπίζεται στο δακτυλίου (A), θέση 7, καθώς εμφανίζει κοινή κορυφή διασταύρωσης στα 148.11 ppm (C-7) με τα υδροξύλια OH(5) και OH(6), ενώ η δεύτερη μεθόξυ ομάδα στα 3.91 ppm, εμφανίζει μόνο μία κορυφή διασταύρωσης στα 133.12 ppm (C-8), και εντοπίζεται στη θέση 8 του δακτυλίου (A).

Από την εφαρμογή φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR προκύπτει ότι τα πρωτόνια H-(2',6') εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 128.64 ppm (C-(2',6')), 161.47 ppm (C-4') και 163.95 ppm (C-2). Τα πρωτόνια H-(3',5') εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 116.29 ppm (C-(3',5')), 121.49 ppm (C-1') και 161.48 ppm (C-4'). Το πρωτόνιο H-3 εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 106.34 ppm (C-10), 121.44 ppm (C-1'), 143.23 ppm (C-5), 164.13 ppm (C-2) και 182.81 ppm (C-4). Η ομάδα OH(5) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 106.25 ppm (C-10), 134.41 ppm (C-6), 143.31 ppm (C-5), 148.13 ppm (C-7) και 182.87 ppm (C-4). Η ομάδα OH(6) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 134.40 ppm (C-6), 143.32 ppm (C-5) και 148.09 ppm (C-7) ενώ η ομάδα OH(4') με τους άνθρακες στα 116.24 ppm (C-(3',5')) και 161.54 ppm (C-4').

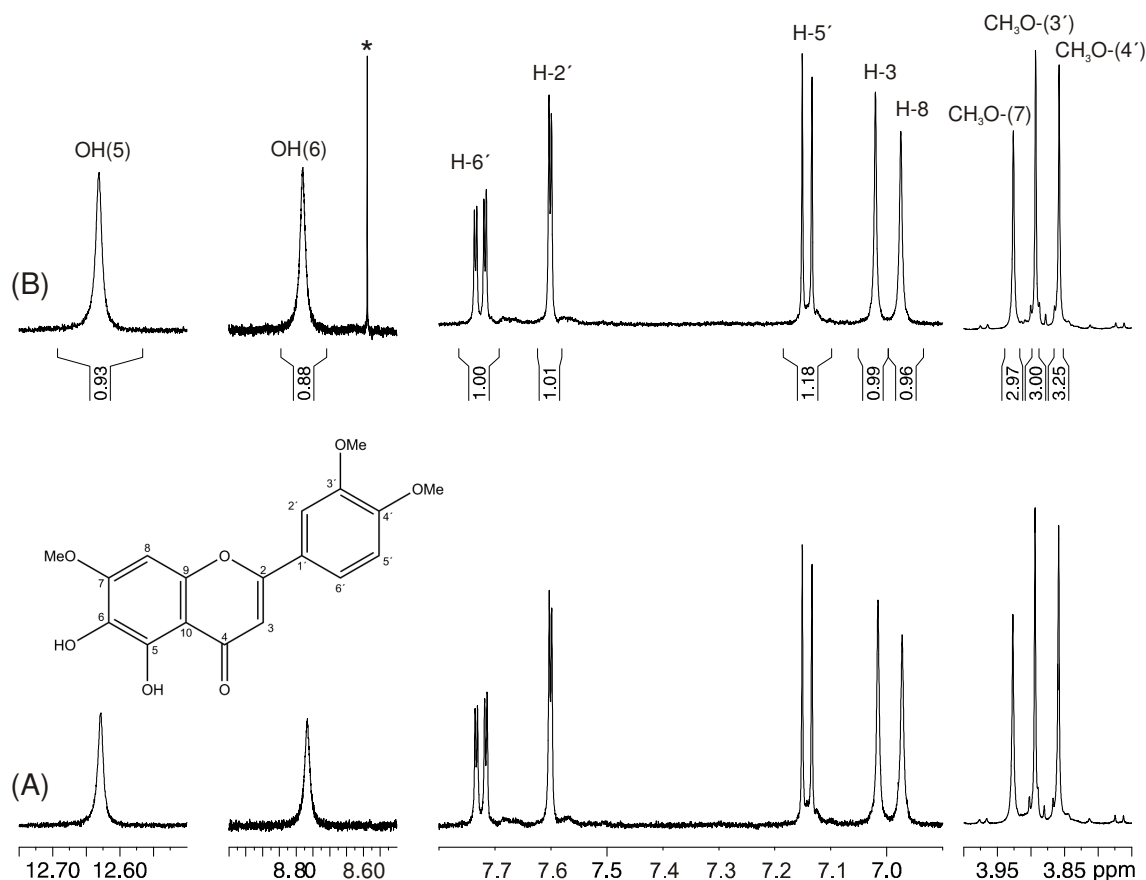
Στο παρακάτω Σχήμα 8.3.6 παρατίθενται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης όπως προέκυψαν από το φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR που επιβεβαιώνουν τη δομή της ένωσης ως μέθοξυ παράγωγο φλαβονοειδούς. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2007a; 2007b; Moon *et al.*, 2006; 2005; Kim *et al.*, 2006].

Αξίζει να σημειωθεί ότι με τη προσθήκη του πικρικού οξέος λήφθηκε φάσμα NMR υψηλής ευκρίνειας όχι μόνον των απορροφήσεων των ομάδων -OH αλλά και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H-O-O-H), ενώ επήλθε επίσης σημαντική βελτίωση και στις απορροφήσεις των πρωτονίων H-3 και CH₃O-. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του πρωτονίου H-3 της κορυφής **6** (Σχήμα 8.3.3) Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση του πικρικού οξέος με φλαβονοειδή μέσω αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων (stacking modes) [Refat *et al.*, 2010; Bindya *et al.*, 2007].



Σχήμα 8.3.6: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=288\text{K}$, $n_s=96$, $t_{\text{exp}}=12.5\text{h}$). της κορυφής **7** σε 0.5 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$, κατόπιν προσθήκης 36 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων $-\text{OH}$: (A) $\text{OH}(5)$ και $\text{OH}(6)$, και (B) $\text{OH}(4')$.

Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **10**, παρουσιάζει μοριακό ιόν 344.1 m/z, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.7. Στην περίπτωση αυτή η βελτίωση του φάσματος με τη προσθήκη πικρικού οξέος ήταν περιορισμένη διότι οι απορροφήσεις των OH(5) και OH(6) ήταν ήδη σχετικά λεπτές ($\Delta\nu_{1/2} \approx 5$ και 8 Hz, αντίστοιχα).



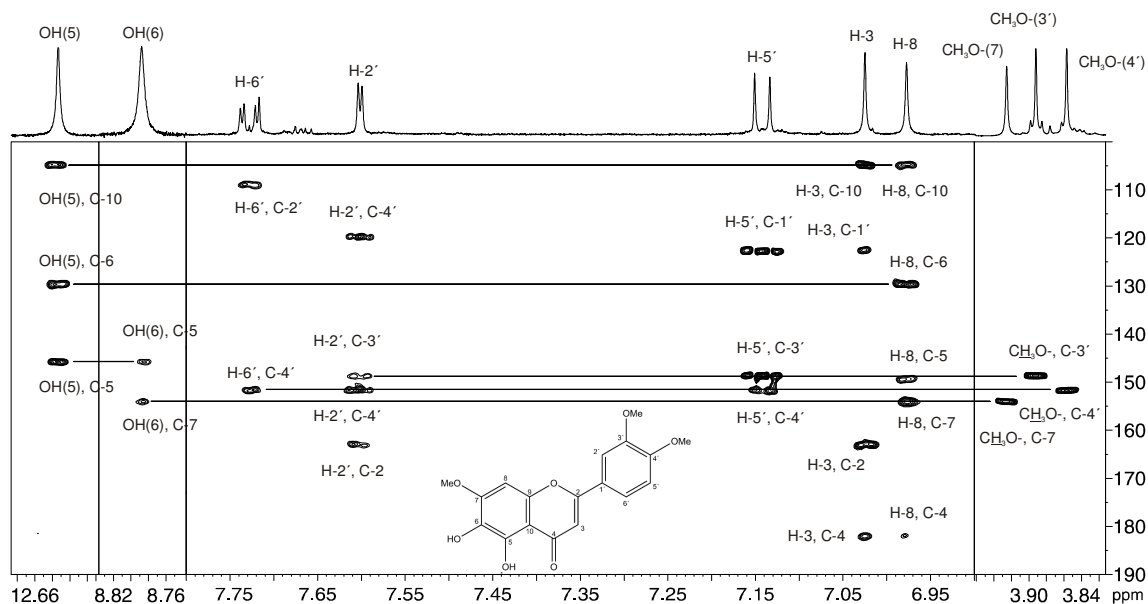
Σχήμα 8.3.7: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **10** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 (T=288K, ns=256, $t_{\text{expt}}=34\text{m}$). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 3 μL διαλύματος 2 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος.

Η απορρόφηση στα 12.63 ppm, υποδηλώνει την παρουσία ομάδας OH(5) φλαβονοειδούς, ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία τριών μεθόξυ ομάδων ($\text{CH}_3\text{O}-$).

Οι απορροφήσεις στα 7.14 ppm (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.60 ppm (1H, d, $J = 2.2$ Hz) και 7.72 ppm (1H, dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz) αποδίδονται στα πρωτόνια H-5' ($\delta_{\text{C}} = 111.30$ ppm), H-2'

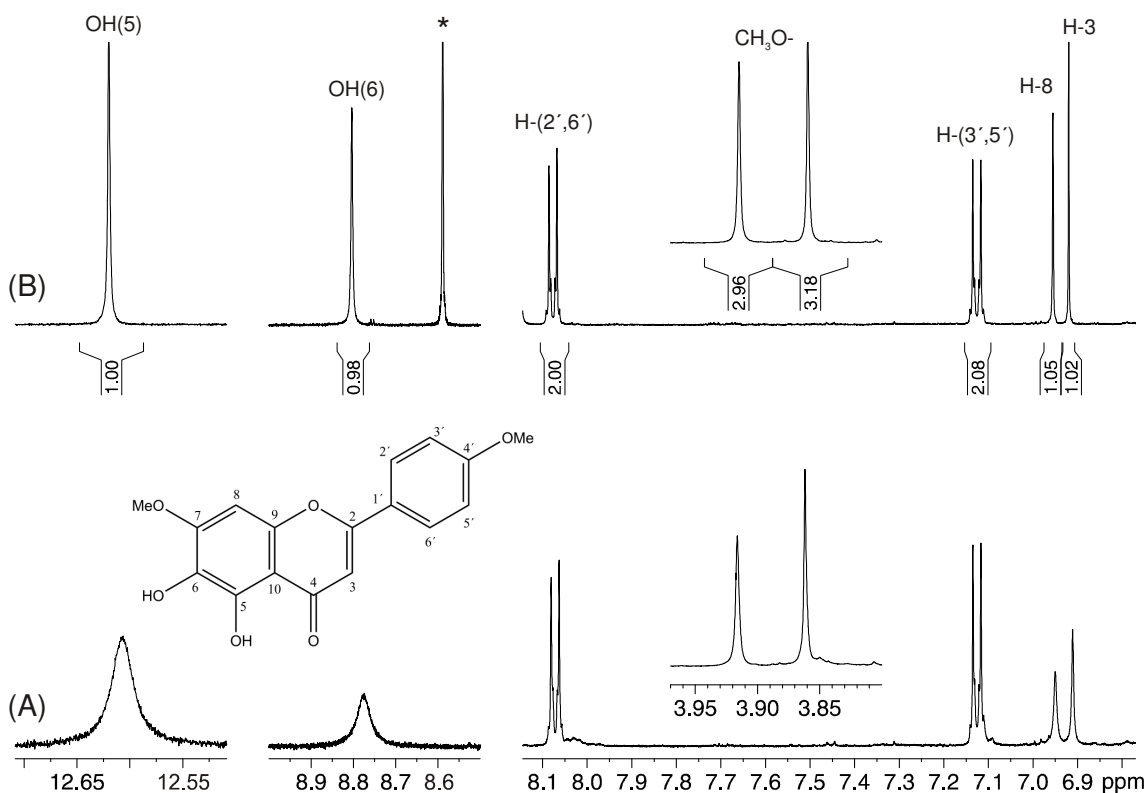
($\delta_C = 108.90$ ppm) και H-6' ($\delta_C = 119.65$ ppm), αντίστοιχα, του δακτυλίου (B). Η απορρόφηση στα 7.02 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3 ($\delta_C = 103.20$ ppm), καθώς εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης $^2J_{HC}$ με το καρβονύλιο C-4 στα 181.98 ppm. Η απορρόφηση στα 6.97 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8 ($\delta_C = 90.99$ ppm). Οι απορροφήσεις στα 12.63 ppm και 8.79 ppm αποδίδονται στις ομάδες OH(5) και OH(6), αντίστοιχα.

Από τις κοινές κορυφές διασταύρωσης (Σχήμα 8.3.8) των μεθόξυ ομάδων με τα αντίστοιχα πρωτόνια προκύπτει ότι οι ομάδες CH₃O-(4') (3.86 ppm) με κορυφή διασταύρωσης στα 151.64 ppm (C-4'), και CH₃O-(3') (3.89 ppm) με κορυφή διασταύρωσης στα 148.64 ppm (C-3') εντοπίζονται στο δακτύλιο (C), στις θέσεις 4' και 3', αντίστοιχα. Η ομάδα CH₃O- (3.93 ppm) με κορυφή διασταύρωσης στα 154.01 ppm (C-7) εντοπίζεται στη θέση 7 του δακτυλίου (A). Από το φάσμα 2D ¹H-¹³C HMBC NMR της κορυφής **10** προκύπτουν οι παρακάτω συσχετίσεις. Το πρωτόνιο H-3 εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 104.80 ppm (C-10), 122.50 ppm (C-1'), 163.20 ppm (C-2) και 181.98 ppm (C-4). Το πρωτόνιο H-8 εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 104.89 ppm (C-10), 129.64 ppm (C-6), 149.247 ppm (C-5) και 154.02 ppm (C-7). Το πρωτόνιο H-5' εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 122.07 ppm (C-1'), 148.63 ppm (C-3'), 151.63 ppm (C-4') και 162.90 ppm (C-2). Το πρωτόνιο H-2' εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 119.70 ppm (C-6'), 148.70 ppm (C-3') και 151.63 ppm (C-4'). Το πρωτόνιο H-6' εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 108.91 ppm (C-2') και 151.63 ppm (C-4'), η ομάδα OH(6) με τους άνθρακες 145.71 ppm (C-5) και 154.04 ppm (C-7) και η ομάδα OH(5) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 104.74 ppm (C-10), 129.62 ppm (C-6) και 145.69 ppm (C-5). Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006].



Σχήμα 8.3.8: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=120, $t_{\text{exp}}=16\text{h}$) της κορυφής **10** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 3 μL διαλύματος 2 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων -OH: (Α) OH(5) και OH(6), και (Β) των μεθόξυ ομάδων.

Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **12**, παρουσιάζει μοριακό ιόν 314.1 m/z, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.9.



Σχήμα 8.3.9: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **12** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 ($T=288\text{K}$, $n_s=256$, $t_{\text{exp}}=34\text{m}$). (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 27 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Η κορυφή με τον αστερίσκο υποδηλώνει την απορρόφηση του πικρικού οξέος.

Η απορρόφηση στα 12.61 ppm υποδηλώνει την παρουσία ομάδας OH(5) φλαβονοειδούς ενώ οι απορροφήσεις στα ~ 4 ppm υποδηλώνουν την παρουσία δύο μεθόξυ ομάδων ($\text{CH}_3\text{O}-$).

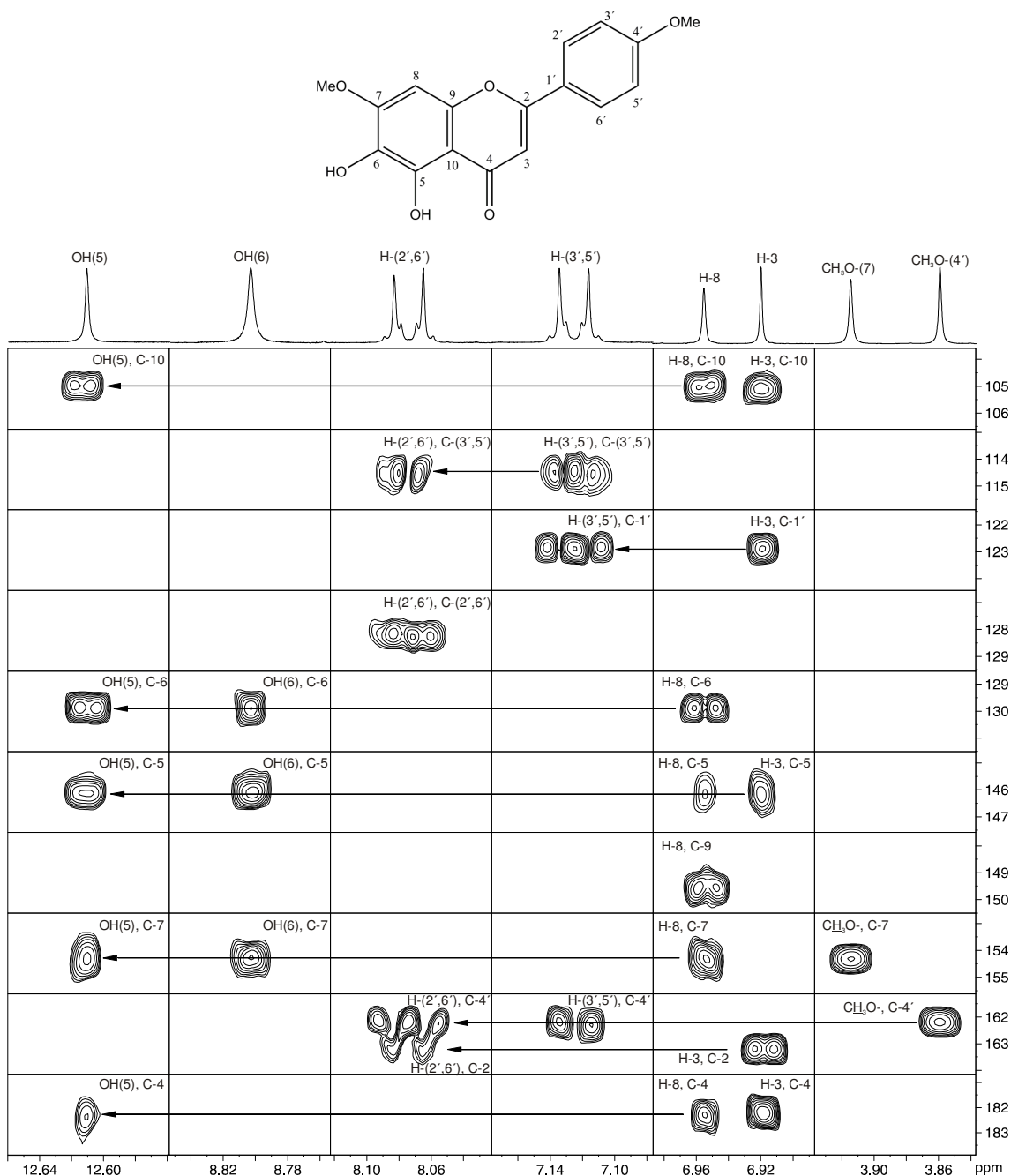
Οι απορροφήσεις στα 7.13 ppm (2H, d, $J = 9.0\text{ Hz}$) ($\delta_{\text{C}} = 114.99\text{ ppm}$) και 8.07 ppm (2H, d, $J = 9.0\text{ Hz}$) ($\delta_{\text{C}} = 128.66\text{ ppm}$) αποδίδονται στα πρωτόνια H-3', H-5', και H-2', H-6' αντίστοιχα, του δακτυλίου (B). Η απορρόφηση στα 6.92 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3 ($\delta_{\text{C}} = 103.56\text{ ppm}$), ενώ η απορρόφηση στα 6.96 ppm (1H, s) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8 ($\delta_{\text{C}} = 91.61\text{ ppm}$). Η κορυφή στα 8.80, που εκλεπτύνθηκε σημαντικά κατόπιν προσθήκης του πικρικού οξέος, αποδίδεται στην ομάδα OH(6). Η έντονη κορυφή στα 8.59 ppm (υποδηλώνετε με αστερίσκο) αποδίδεται στην απορρόφηση του πικρικού οξέος. Η μία

μεθόξυ ομάδα στα 3.92 ppm εντοπίζεται στο δακτυλίο (A), θέση 7, καθόσον εμφανίζει κοινή κορυφή διασταύρωσης στα 154.38 ppm (C-7) με τα υδροξύλια OH(5), OH(6) και το πρωτόνιο H-8. Η δεύτερη μεθόξυ ομάδα στα 3.86 ppm εντοπίζεται στη θέση 4' του δακτυλίου (B), καθόσον εμφανίζει κοινή κορυφή διασταύρωσης στα 162.17 ppm (C-4') με τα πρωτόνια H-(2,6') και H-(3,5').

Από την εφαρμογή φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR προκύπτει ότι τα πρωτόνια H-(2',6') εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 114.55 ppm (C-(3',5')), 128.26 ppm (C-(2',6')), 162.16 ppm (C-4') και 163.26 ppm (C-2). Τα πρωτόνια H-(3',5') εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 114.59 ppm (C-(3',5')), 122.89 ppm (C-1') και 162.13 ppm (C-4') και το πρωτόνιο H-3 με τους άνθρακες στα 105.07 ppm (C-10), 122.83 ppm (C-1'), 146.10 ppm (C-5), 163.22 ppm (C-2) και 182.10 ppm (C-4). Το πρωτόνιο H-8 εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 105.09 ppm (C-10), 129.88 ppm (C-6), 146.11 ppm (C-5), 149.62 ppm (C-9), 154.26 ppm (C-7) και 182.19 ppm (C-4). Η ομάδα OH(5) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 104.95 ppm (C-10), 129.89 ppm (C-6), 146.11 ppm (C-5), 154.34 ppm (C-7) και 182.30 ppm (C-4) και η ομάδα OH(6) με τους άνθρακες στα 129.90 ppm (C-6), 146.07 ppm (C-5) και 154.31 ppm (C-7).

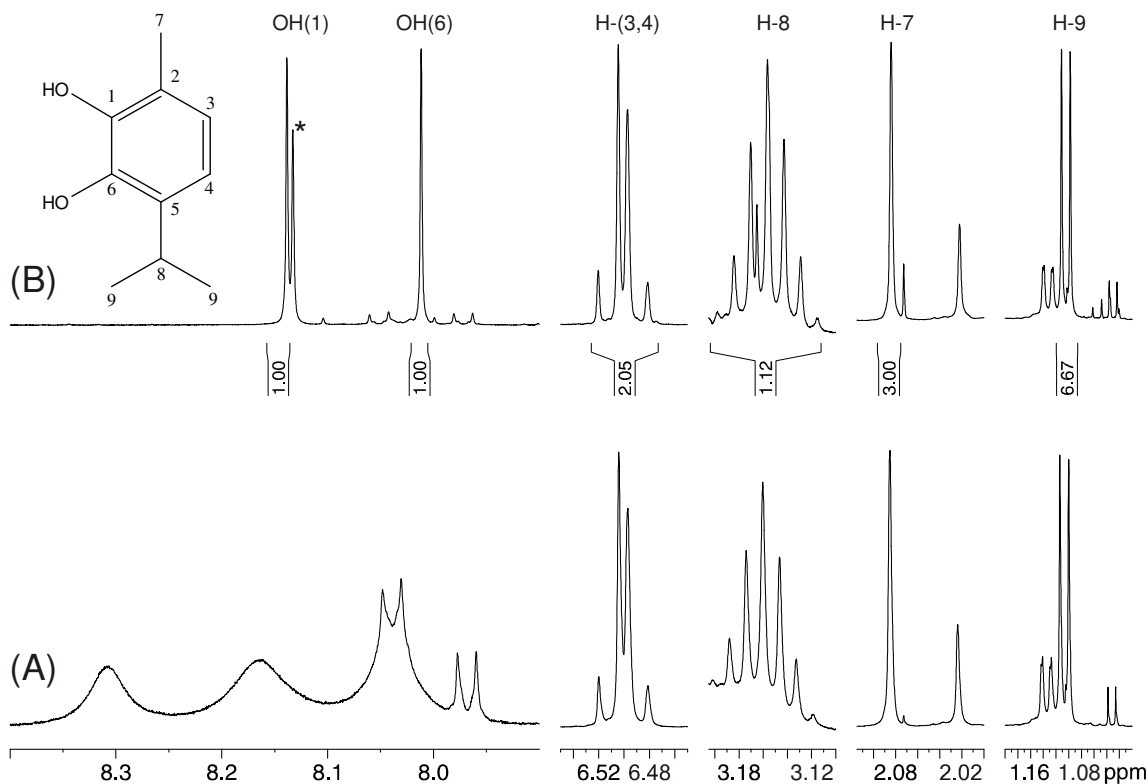
Στο Σχήμα 8.3.10 παρατίθενται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης όπως προέκυψαν από το φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR που επιβεβαιώνουν τη δομή της ένωσης ως μεθόξυ παράγωγο φλαβονοειδούς. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Yoon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006].

Σημειώνεται ότι με τη προσθήκη του πικρικού οξέος όχι μόνο εκλεπτύνθηκαν οι απορροφήσεις των ομάδων -OH και λήφθηκε φάσμα NMR υψηλής ευκρίνειας, αλλά ακόμη επήλθε σημαντική βελτίωση και στις απορροφήσεις των πρωτονίων H-3, H-8 και CH₃O-, όπως παρατηρήθηκε προηγουμένως.



Σχήμα 8.3.10: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=288K, ns=112, $t_{\text{exp1}}=15\text{h}$) της κορυφής **12** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 27 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των ομάδων OH(5) και OH(6), και των μεθόξυ ομάδων.

Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **13**, παρουσιάζει μοριακό ιόν 166.1 m/z, πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.11.

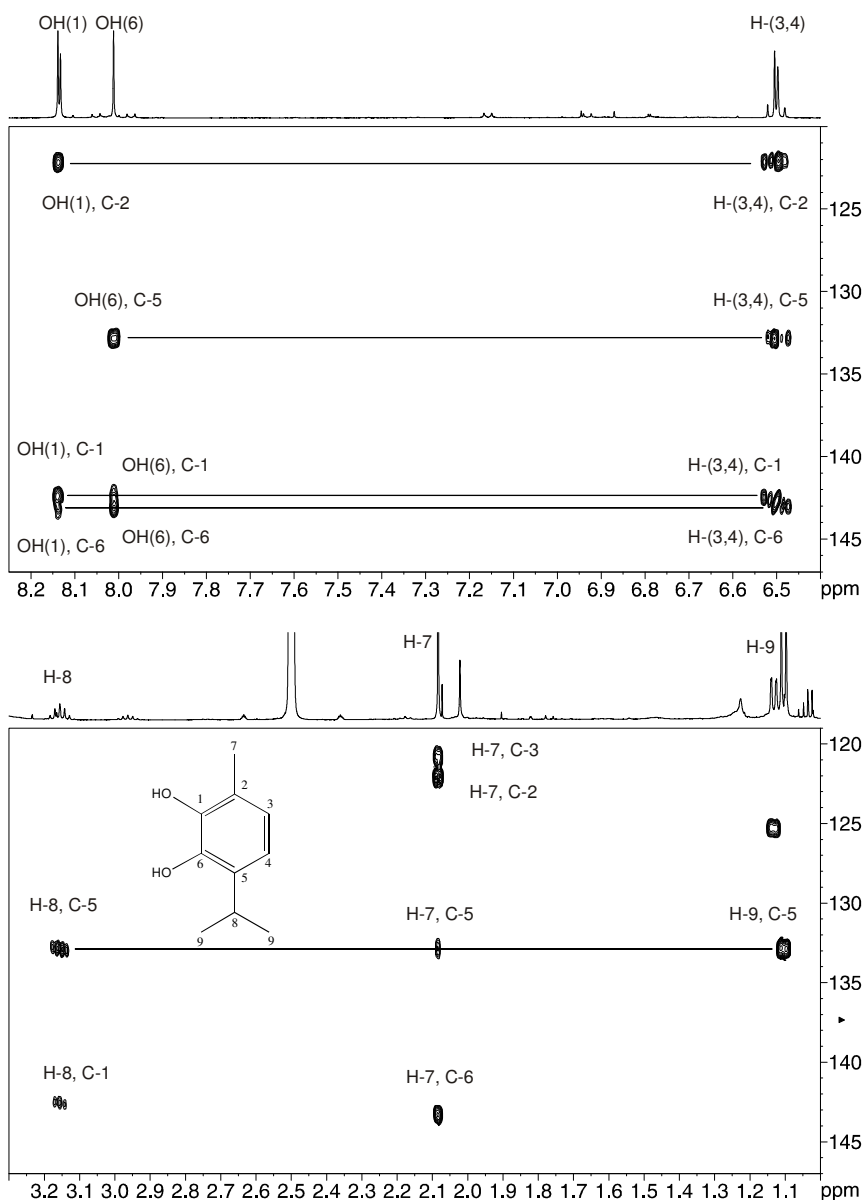


Σχήμα 8.3.11: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR-¹H της κορυφής **13** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO-*d*₆ (T=289K, ns=256, *t*_{exp}=34m). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 49 μ L διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος.

Από το Σχήμα 8.3.11 προκύπτει ότι η κορυφή στα 8.13 ppm (υποδεικνύεται με αστερίσκο), εκλεπτύνθηκε με τη προσθήκη πικρικού οξέος. Επιπλέον εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης στα $\delta_C = 162.92$ ppm, σε πείραμα ¹H-¹³C HSQC, ενώ δεν εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης κατά την εφαρμογή 2D ¹H-¹³C HMBC NMR. Παράλληλα, δεν υπάρχει άλλη απορρόφηση πρωτονίου που να εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης σε αυτή την τιμή άνθρακα. Κατά αυτόν τον τρόπο δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για αυτή την απορρόφηση.

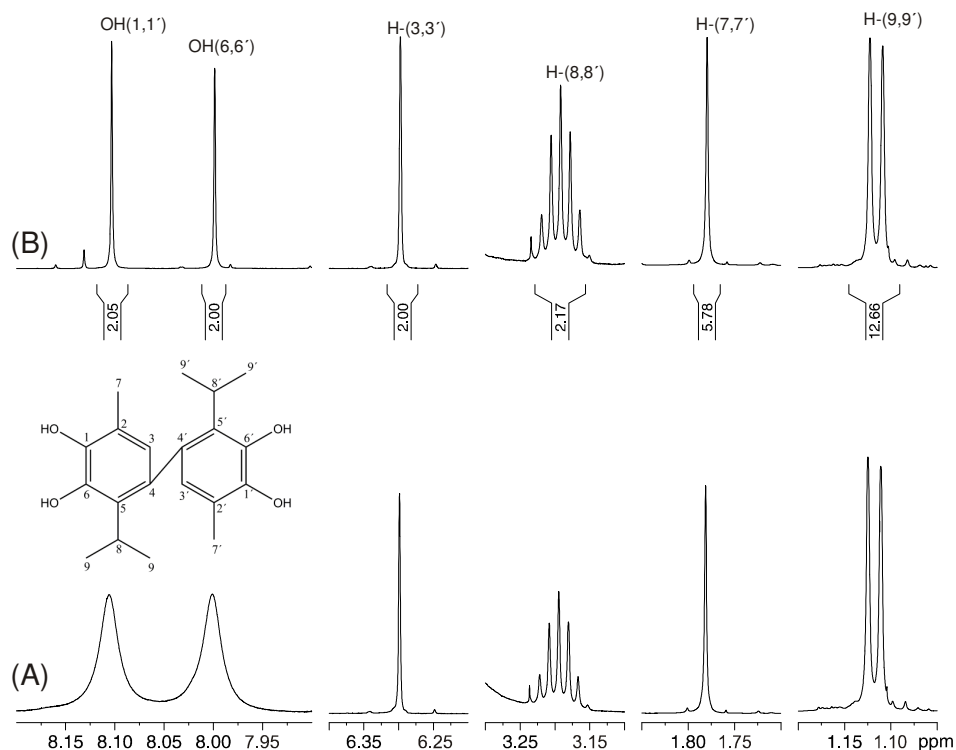
Οι απορροφήσεις στα 8.01 ppm και 8.14 ppm, που εκλεπτύνθηκαν με τη προσθήκη πικρικού οξέος, αποδίδονται στις ομάδες OH(6) και OH(1), σύμφωνα με τα αποτελέσματα 2D ¹H-¹³C HMBC NMR (Σχήμα 8.3.12). Η ομάδα OH(6) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 132.82 ppm (C-5), 142.35 ppm (C1) και 143.17 ppm (C-6). Η ομάδα OH(1) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 122.07 ppm (C-2), 142.39 ppm (C1) και 143.16 ppm (C-6). Η απορρόφηση στα 6.50 ppm (2H, d *J* = 7.8 Hz) ($\delta_C = 115.68$ ppm και 120.51 ppm) αποδίδεται στα πρωτόνια H-(3,4) τα οποία εμφανίζουν κορυφές

διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 122.09 ppm (C-2), 132.80 ppm (C-5), 142.66 ppm (C-1), 16.39 ppm (C-7) και 26.54 ppm (C-8). Η απορρόφηση στα 3.16 ppm (1H, m) ($\delta_C = 26.04$ ppm) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-8 διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 22.89 ppm (C-9), 116.14 ppm (C-4), 132.85 ppm (C-5), και 142.50 ppm (C-1). Η απορρόφηση στα 2.08 ppm (3H, s) ($\delta_C = 16.27$ ppm) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-7 διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 120.81 ppm (C-3), 122.11 ppm (C-2), 142.60 ppm (C-6), και 132.80 ppm (C-5) και 22.99 ppm (C-9). Η απορρόφηση στα 1.10 ppm (6H, s, d $J = 6.9$ Hz) ($\delta_C = 22.97$ ppm) αποδίδεται στο πρωτόνιο H-9 διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 26.44 ppm (C-8) και 132.80 ppm (C-5). Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Bitar *et al.*, 2008; Dapkevicius *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 1989].



Σχήμα 8.3.12: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR ($T=289\text{K}$, $ns=76$, $t_{\text{expt}}=10\text{h}$) της κορυφής **13** σε 0.5 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$, κατόπιν προσθήκης 49 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των μεταξύ των ομάδων OH(1) και OH(6), και των αντίστοιχων πρωτονίων.

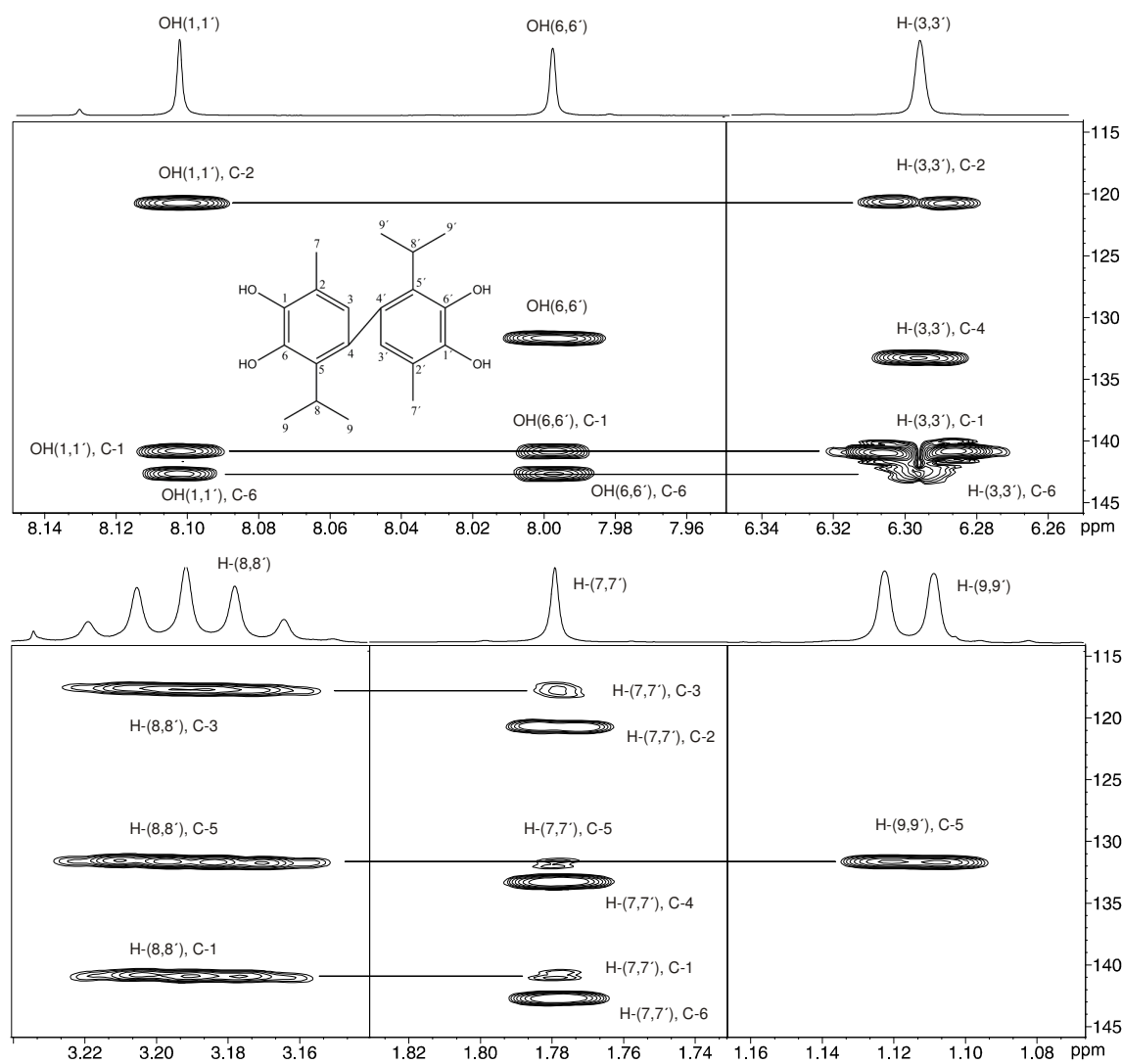
Το φάσμα NMR- ^1H της κορυφής **14**, παρουσιάζει μοριακό ιόν 330.2 m/z , πριν και μετά τη προσθήκη πικρικού οξέος, απεικονίζεται στο Σχήμα 8.3.13.



Σχήμα 8.3.13: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz NMR- ^1H της κορυφής **14** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 ($T=289\text{K}$, $ns=128$, $t_{\text{exp}}=17\text{m}$). (A) Χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη 13 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος.

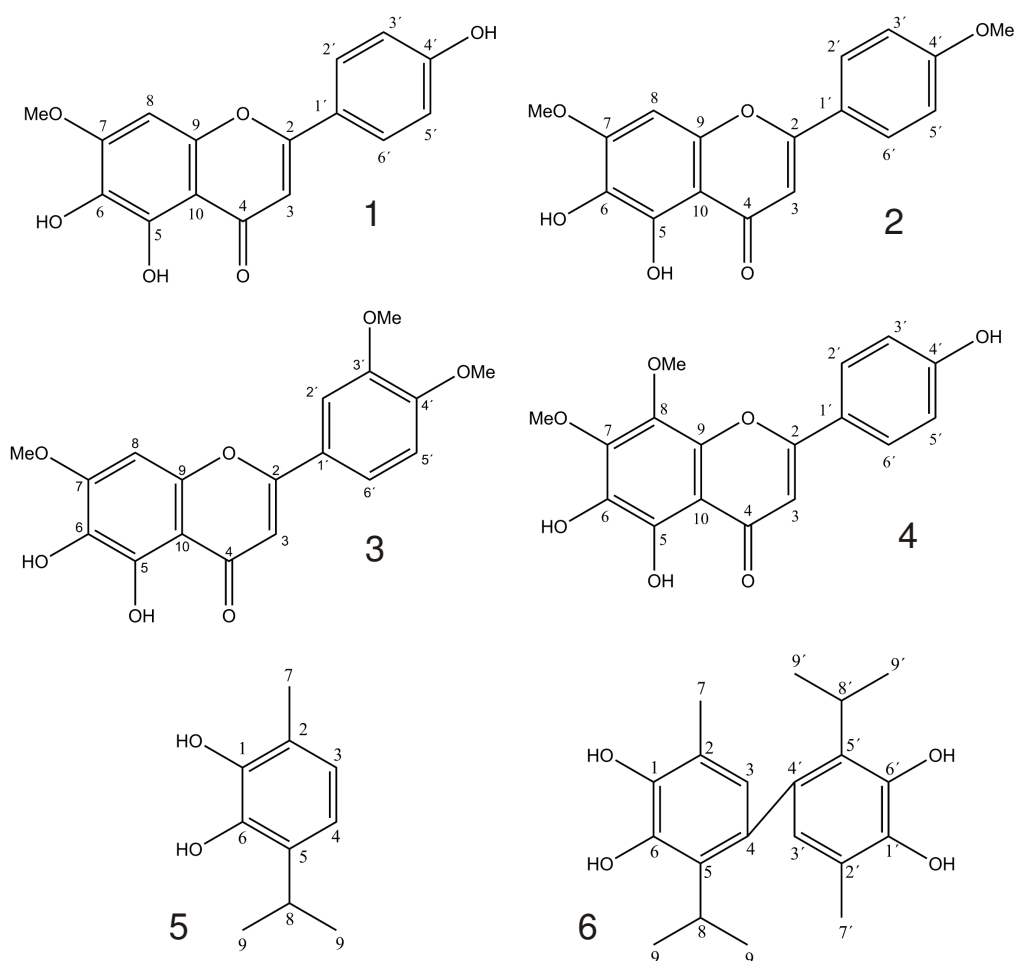
Οι απορροφήσεις στα 8.00 ppm και 8.10 ppm, που εκλεπτύνθηκαν με τη προσθήκη πικρικού οξέος αποδίδονται στις ομάδες OH(6) και OH(1). Με την εφαρμογή φασματοσκοπίας 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (Σχήμα 8.3.14) προέκυψαν οι ακόλουθες συσχετίσεις. Η ομάδα OH(6) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 131.68 ppm (C-5), 140.93 ppm (C1) και 142.79 ppm (C-6). Η ομάδα OH(1) εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 120.65 ppm (C-2), 140.95 ppm (C1) και 142.82 ppm (C-6). Η απορρόφηση στα 6.30 ppm (2H, d $J = 7.8$ Hz) ($\delta_{\text{C}} = 117.61$ ppm) αποδίδεται στα πρωτόνια H-(3,3') διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 120.69 ppm (C-2), 133.30 ppm (C-4), 141.03 ppm (C-1), 142.70 ppm (C-6), 13.48 ppm (C-7) και 26.38 ppm (C-8). Η απορρόφηση στα 3.19 ppm (2H, m) ($\delta_{\text{C}} = 26.36$ ppm) αποδίδεται στα πρωτόνια H-(8,8') διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 22.91 ppm (C-9), 117.57 ppm (C-3), 131.63 ppm (C-5), και 141.02 ppm (C-6). Η απορρόφηση στα 2.08 ppm (6H, s) ($\delta_{\text{C}} = 13.59$ ppm) αποδίδεται στα πρωτόνια H-(7,7') διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσεις με τους άνθρακες στα 117.70 ppm (C-3), 120.63 ppm (C-2), 133.27 ppm (C-

4), και 142.84 ppm (C-6) και 23.06 ppm (C-9). Η απορρόφηση στα 1.12 ppm (12H, s, d $J = 7.0$ Hz) ($\delta_C = 22.90$ ppm) αποδίδεται στα πρωτόνια H-(9,9') διότι εμφανίζει κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 26.48 ppm (C-8) και 131.65 ppm (C-5). Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [Bitar *et al.*, 2008; Dapkevicius *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 1989].

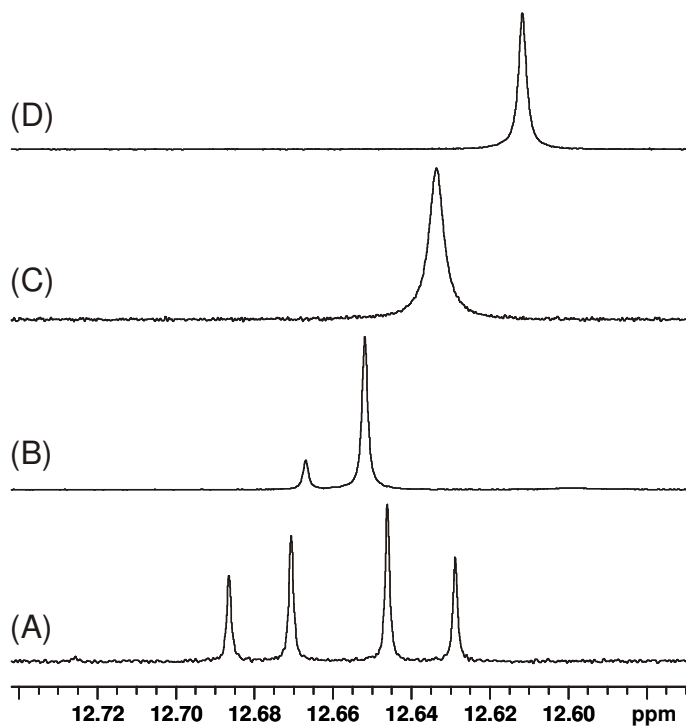


Σχήμα 8.3.14: Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR (T=289K, ns=76, t_{expt} =10h). της κορυφής **14** σε 0.5 mL διαλύτη DMSO- d_6 , κατόπιν προσθήκης 13 μL διαλύματος 10 mM πικρικού οξέος. Επιδεικνύονται οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των μεταξύ των ομάδων OH(1) και OH(6), και των αντίστοιχων πρωτονίων.

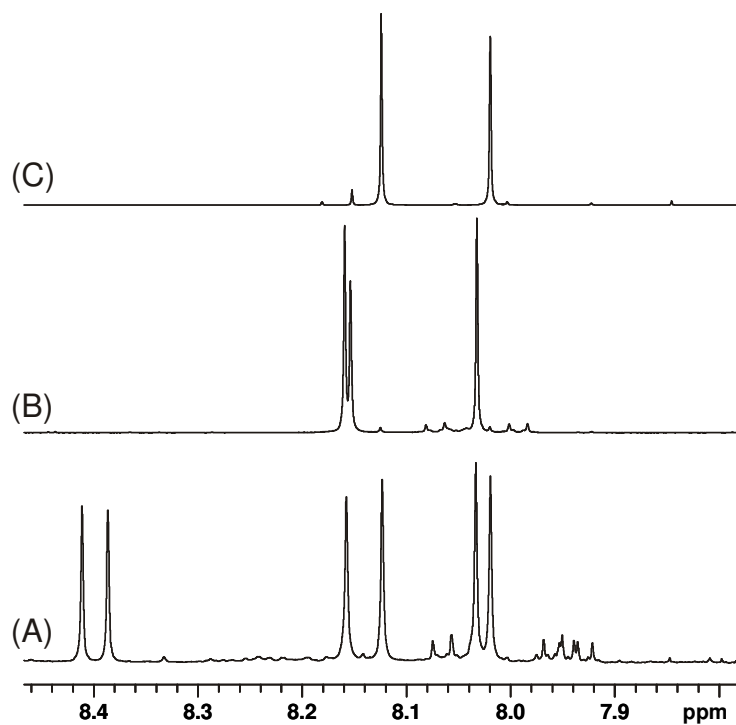
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι με την εφαρμογή της μεθοδολογίας LC-SPE-NMR και της παρασκευαστικής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την προσθήκη πικρικού οξέος σε απομονωμένα κλάσματα, για την εκλέπτυνση των απορροφήσεων των ομάδων $-OH$, επιτεύχθηκε σε μεγάλο βαθμό ο αρχικός στόχος της μελέτης. Συμπερασματικά οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.3.16. Από τη συστάδα των τεσσάρων απορροφήσεων στα 12.6 - 12.7 ppm επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός των τριών ενώσεων (Σχήμα 8.3.16). Όλες οι ενώσεις είναι μεθόξυ παράγωγα φλαβονοειδών, με υποκατάσταση στη θέση 6 του δακτυλίου (Α) με $-OH$, και διαφοροποιούνται ως προς την υποκατάσταση του δακτυλίου (Β). Επίσης αποσαφηνίστηκε η περιοχή απορρόφησης των 8.0 - 8.4 ppm η οποία περιλαμβάνει απορροφήσεις υδροξυλίων φαινολικού τύπου παραγώγων της καρβακρόλης. Από τις συνολικά έξι απορροφήσεις, βεβαιώθηκαν οι τέσσερις, ανά δύο ζεύγη απορροφήσεων (Σχήμα 8.3.17).



Σχήμα 8.3.15: Δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.



Σχήμα 8.3.16: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$. (A) εκχύλισμα OET (B) μεθόξυ παράγωγο **1**, (C) μεθόξυ παράγωγο **3** και (D) μεθόξυ παράγωγο **2**.



Σχήμα 8.3.17: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T = 288\text{ K}$). (A) εκχύλισμα OET, (B) παράγωγο **5**, (C) παράγωγο **6**.

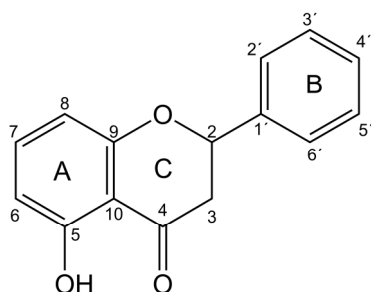
Στους πίνακες Π12-Π17 του Παραρτήματος παρατίθενται οι χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του Σχήματος 8.3.15.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά είναι εφικτή η ταξινόμηση των απορροφήσεων των ομάδων –OH των φλαβονοειδών και των παραγώγων της καρβακρόλης στη κλίμακα των ppm. Η ταξινόμηση γίνεται ως προς τη δομή που κατέχουν και το πώς επηρεάζεται η απορρόφηση των ομάδων –OH αναλόγως των υποκαταστάσεων των δακτυλίων των ενώσεων. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε όλα τα μεθόξυ παράγωγα η απορρόφηση της ομάδας OH(6) εντοπίζεται στα 8.80 ppm, με υποκαταστάτη μεθόξυ ομάδα στη θέση 7 του δακτυλίου (A). Παρατηρείται όμως χαρακτηριστική μετατόπιση της απορρόφησης αυτής προς υψηλότερα ppm, 9.17 ppm, με τη παρουσία και μιας δεύτερης μεθόξυ ομάδας στη θέση 8. Η ταξινόμηση θα αναλυθεί στο εκχύλισμα της ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα (OET) και περιγράφεται στο κεφάλαιο 9.

9. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ -OH ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ

Τα ερευνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν με την εφαρμογή της μεθοδολογίας του HCl και του πικρικού οξέος είτε σε πρότυπες ενώσεις (κεφάλαια 6.3 και 7.2) είτε σε εκχυλίσματα (κεφάλαια 6.4 - 6.5, 7.3, 7.5 - 7.6 και 8.1 - 8.4), προσέφεραν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα αποτύπωσης και κατηγοριοποίησης των απορροφήσεων των ομάδων -OH με βάση τις χημικές μετατοπίσεις.

Βασικό κριτήριο αποτελεί η χημική μετατόπιση της ομάδας OH(5) των φλαβονοειδών (Σχήμα 8.5.1). Η απορρόφηση της ομάδας OH(5), η οποία όπως αναλύθηκε διεξοδικά σε προηγούμενο κεφάλαιο, σχηματίζει ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο C-4, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε αλλαγές υποκατάστασης, ακόμα και σε απόσταση έντεκα δεσμών. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του μίγματος κερκετίνης - λουτεολίνης (Σχήμα 6.3.2) με διαφορετική υποκατάσταση στο δακτύλιο (C), η οποία επηρεάζει την απορρόφηση του OH(5). Σημαντικά μεγαλύτερη επίδραση στη χημική μετατόπιση ασκούν οι διαφορετικές υποκαταστάσεις στο δακτύλιο (A), όπως π.χ. στην περίπτωση των μεθόξυ παραγώγων, καθώς και στο δακτύλιο (C). Επιπροσθέτως, είναι εφικτή και η οριοθέτηση και των απορροφήσεων των ομάδων -OH των φλαβονοειδών, π.χ. OH(7) και OH(6).



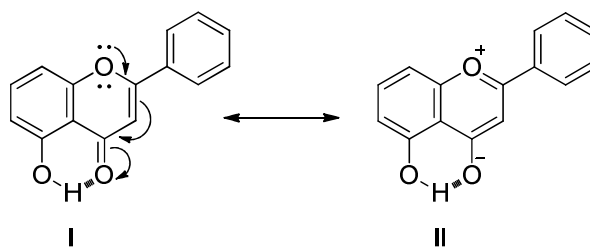
Σχήμα 9.1: Τυπική απεικόνιση δομής φλαβονοειδούς.

Η ταξινόμηση των απορροφήσεων μπορεί να γίνει με βάση το εκχύλισμα ρίγανης σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (OET), όπου λήφθηκε φάσμα NMR-¹H εξαιρετικά υψηλής διακριτικής ευκρίνειας με ιδιαίτερα οξείες απορροφήσεις των ομάδων -OH. Επιπροσθέτως έχουν ταυτοποιηθεί σχεδόν οι περισσότερες απορροφήσεις των ομάδων -OH, των κύριων

αλλά και δευτερευόντων από άποψη συγκέντρωσης συστατικών, που εντοπίζονται σε αυτό το εκχύλισμα. Επιπλέον θα κατηγοριοποιηθούν και οι απορροφήσεις των ομάδων –OH στα ~ 14 ppm, σύμφωνα με την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος ρίγανης (OME) στο κεφάλαιο 7.6.

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, τα κύρια δομικά κριτήρια που εισάγονται είναι: α) η ύπαρξη, ή όχι, διπλού δεσμού στη θέση C2-C3 και β) η υποκατάσταση στη θέση 3 του δακτυλίου (C), π.χ. ομάδα –OH ή –H. Στη συνέχεια περαιτέρω ομαδοποιήσεις των απορροφήσεων περιλαμβάνουν υποκαταστάσεις στο δακτύλιο (A), π.χ. ομάδα –OH ή γλυκοζυλιωμένο παράγωγο στη θέση 6 και ομάδα CH₃O- στη θέση 7.

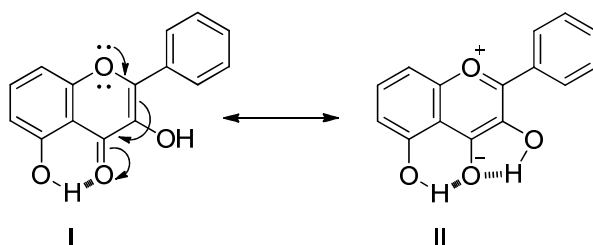
Η παρουσία διπλού δεσμού στη θέση C2-C3 του δακτυλίου (C) των φλαβονοειδών επηρεάζει σημαντικά τη χημική μετατόπιση τόσο του άνθρακα C-4 όσο και του πρωτονίου της ομάδας OH(5) λόγω του σχηματιζόμενου ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Τούτο οφείλεται στην αρωματοποίηση του δακτυλίου (C) (δομές συντονισμού I και II: Σχήμα 9.2), που επιφέρει ελάττωση του καρβονυλικού χαρακτήρα του CO(4) και ως εκ τούτου προστασία του C-4 και ισχυροποίηση του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου λόγω της παρουσίας κλάσματος αρνητικού φορτίου επί του οξυγόνου CO(4). Ως αποτέλεσμα ο άνθρακας C-4 μετατοπίζεται από τα ~ 196 ppm (απουσία διπλού δεσμού στη θέση C2-C3) στα ~ 182 ppm. Το αντίστροφο συμβαίνει με την απορρόφηση του πρωτονίου της ομάδας OH(5), η οποία μετατοπίζεται από τα ~ 12 ppm, σε τιμές > 12 ppm, λόγω σχηματισμού ισχυρότερου δεσμού υδρογόνου με αρνητικά φορτισμένο οξυγόνο στη θέση 4.



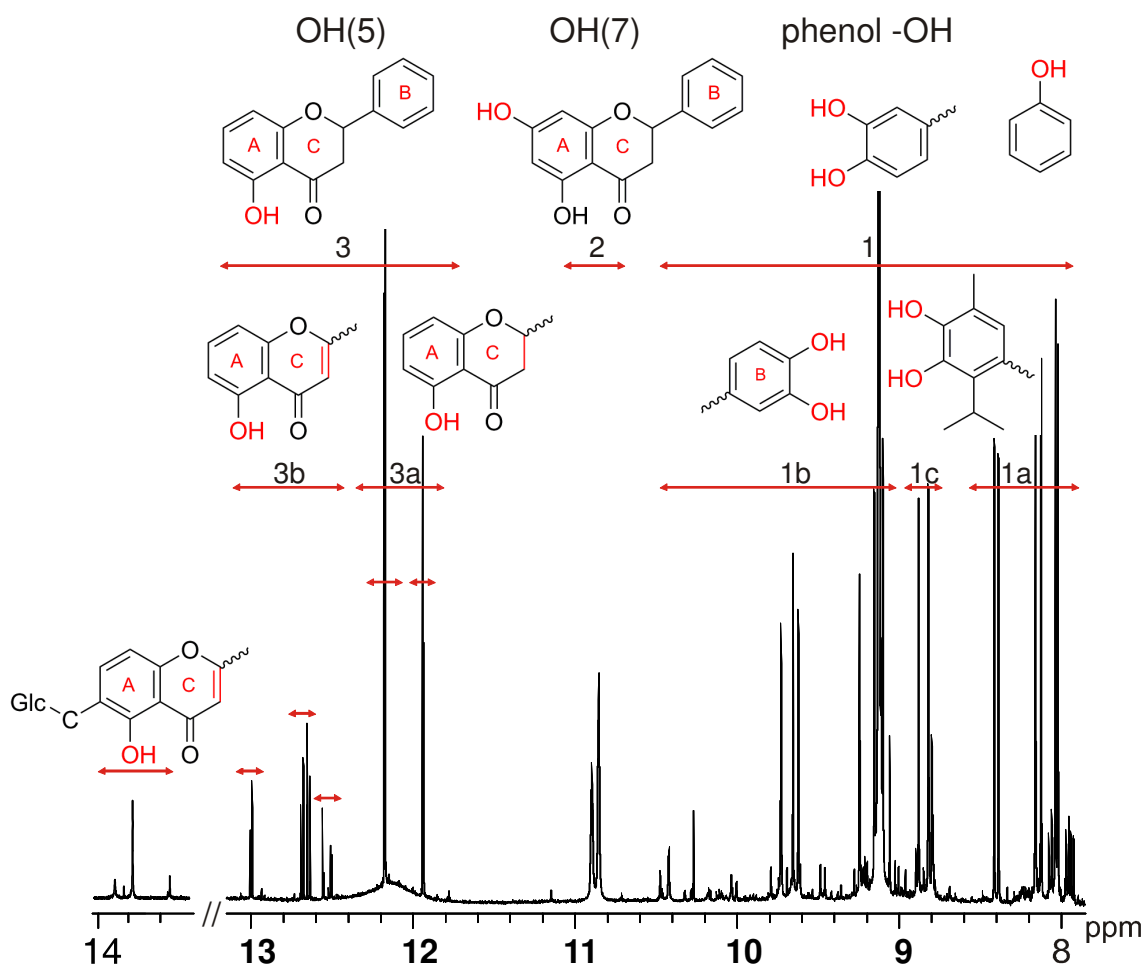
Σχήμα 9.2: Δομές συντονισμού I και II τυπικών φλαβονοειδών παρουσία διπλού δεσμού στη θέση C2-C3 του δακτυλίου (C).

Η παρουσία υποκαταστάτη ομάδας –OH στη θέση 3 του δακτυλίου (C) (π.χ. κερκετίνη), σε σχέση με την παρουσία υποκαταστάτη –H (π.χ. λουτεολίνη), επιφέρει μετατόπιση του άνθρακα C-4 από τα ~ 182 ppm (λουτεολίνη) σε χαμηλότερες τιμές ppm, στα ~ 176 ppm (κερκετίνη) λόγω της παρουσίας του O της θέσης 3. Η απορρόφηση της ομάδας

OH(5) μετατοπίζεται από τα ~ 13.0 ppm (λουτεολίνη), σε χαμηλότερες τιμές ppm, στα ~ 12.5 ppm (κερκετίνη), πράγμα που πάλι αποδίδεται στο φαινόμενο της αρωματοποίησης του δακτυλίου (C), δηλαδή στις δομές συντονισμού I και II (Σχήμα 9.3). Εδώ ο σχηματιζόμενος ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου OH(5) – CO(4) είναι λιγότερο ισχυρός, λόγω παρουσίας της ομάδας OH(3), η οποία συμμετέχει εν μέρει και αυτή σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το ίδιο οξυγόνο του καρβονυλίου CO(4). Δηλαδή το $-O^{\ominus}$ στη θέση 4 του δακτυλίου (C) σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά φαινολικά υδροξύλια, σχηματίζοντας ένα εξαμελή και ένα πενταμελή δακτύλιο. Συνεπώς η ηλεκτρονιακή πυκνότητα μοιράζεται σε δύο δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι σαφώς είναι λιγότερο ισχυροί από ότι ο ένας δεσμός του Σχήματος 9.2, και η σχετική μετατόπιση συγκριτικά είναι δικαιολογημένη.



Σχήμα 9.3: Δομές συντονισμού I και II τυπικών флаβονοειδών παρουσία υποκαταστάτη –OH στη θέση 3 του δακτυλίου (C).



Σχήμα 9.4: Ταξινόμηση απορροφήσεων ομάδων $-OH$ σε εκχύλισμα φυσικού προϊόντος, OET (εκχύλισμα ρίγανης σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα) και OME (μεθανολικό εκχύλισμα ρίγανης).

Η περιοχή απορρόφησης των ομάδων $-OH$, 8 - 14 ppm (Σχήμα 9.4), μπορεί να διακριθεί σε τρεις κύριες περιοχές, όπου κάθε μία από αυτές μπορεί περαιτέρω να υποκατηγοριοποιηθεί:

1) Στην περιοχή των 8 - 10.5 ppm, όπου απορροφούν οι ομάδες $-OH$ των απλών φαινολών, όπως π.χ. η καρβακρόλη, και οι ομάδες $-OH$ που βρίσκονται σε *ortho* θέση μεταξύ τους στο φαινολικό δακτύλιο, όπως π.χ. οι ομάδες $-OH$ του δακτυλίου (B) των φλαβονοειδών, των παραγώγων της καρβακρόλης και των υδροξυκιναμμομικών οξέων (ροσμαρινικού οξέος). Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερα ευρεία και μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε δύο υποπεριοχές:

α) 8.00 - 8.45 ppm, όπου εντοπίζονται τα παράγωγα της καρβακρόλης,

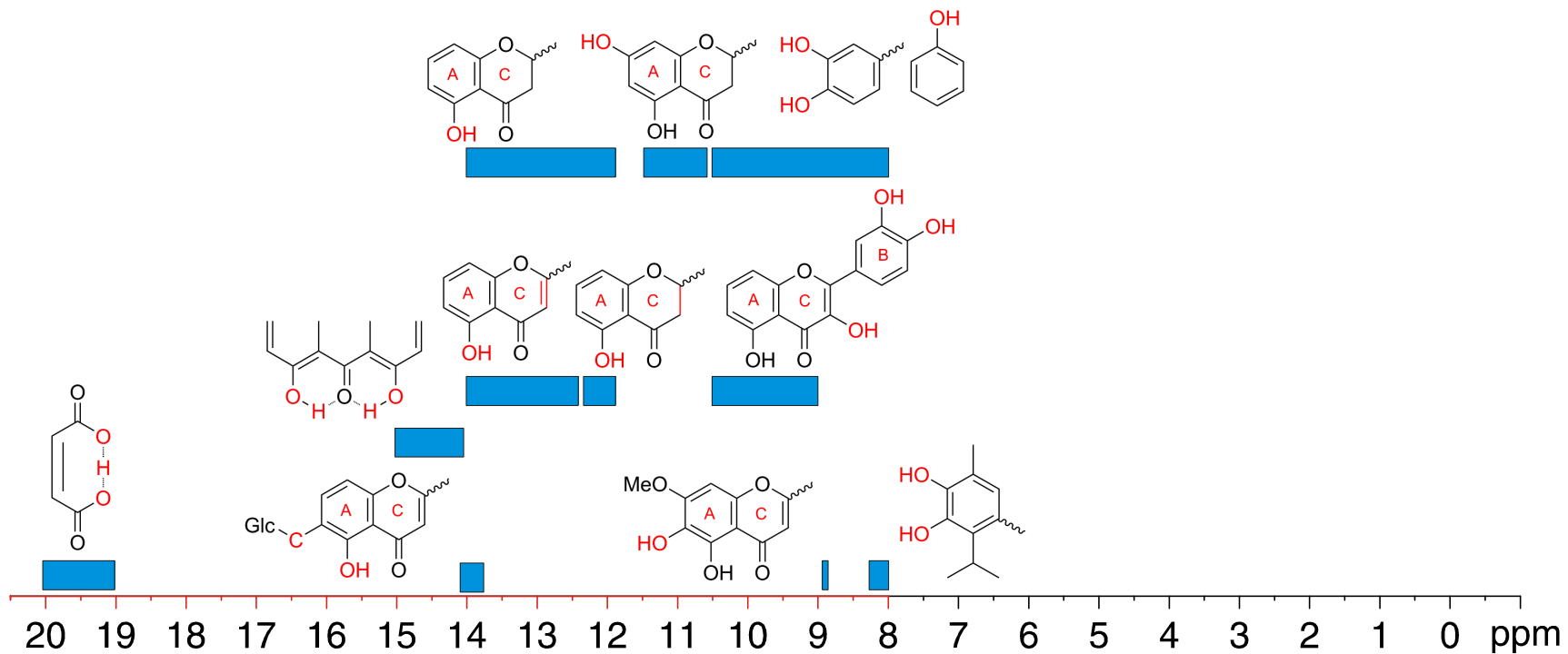
- b) ~8.80 ppm, όπου εντοπίζονται οι απορροφήσεις των ομάδων OH(6) των φλαβονοειδών με διπλό δεσμό στη θέση C2-C3 και υποκαταστάτη -H στη θέση 3 του δακτυλίου (C), CH₃O- στη θέση 7 και -H στη θέση 8, του δακτυλίου (A), αντίστοιχα.
- c) 9.00 – 10.50 ppm, όπου απορροφούν οι ομάδες OH(4'), OH(3') και OH(3) των φλαβονοειδών.
- 2) Στην περιοχή των 10.50 - 11.50 ppm, όπου απορροφούν οι ομάδες OH(7) των φλαβονοειδών και μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε δύο υποπεριοχές:
- a) 10.80 - 10.87 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή χωρίς διπλό δεσμό στη θέση C2-C3 και με υποκαταστάτη -H στη θέση 3 του δακτυλίου (C), και
- b) 10.87 - 10.95 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή χωρίς διπλό δεσμό στη θέση C2-C3 και με υποκαταστάτη -OH στη θέση 3 του δακτυλίου (C).
- 3) Στην περιοχή των 11.50 - 14.00 ppm, όπου απορροφούν οι ομάδες OH(5) των φλαβονοειδών. Σε αυτήν διακρίνονται δύο υποπεριοχές, όπου κάθε μία μπορεί να υποκατηγοριοποιηθεί:
- a) 11.50 - 12.35 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή χωρίς διπλό δεσμό στη θέση C2-C3. Η υποπεριοχή αυτή μπορεί να χωριστεί σε δύο τμήματα:
- i) 11.50 - 12.05 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με υποκαταστάτη -OH στη θέση 3 του δακτυλίου (C), και
- ii) 12.05 - 12.35 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με υποκαταστάτη -H στη θέση 3 του δακτυλίου (C).
- b) 12.35 - 14.00 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με διπλό δεσμό στη θέση C2-C3. Η υποπεριοχή αυτή μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα τμήματα:
- i) ~ 12.50 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με υποκαταστάτες -OH στη θέση 3 του δακτυλίου (C), και -H στη θέση 6, -OH στη θέση 7 και -H στη θέση 8, του δακτυλίου (A), αντίστοιχα, όπως π.χ. η κερκετίνη (Σχήμα 6.3.2),
- ii) 12.60 - 12.70 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με υποκαταστάτη -H στη θέση 3 του δακτυλίου (C), και -OH στη θέση 6, CH₃O- στη θέση 7 και -H στη θέση 8, του δακτυλίου (A), αντίστοιχα.
- iii) ~ 13.00 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με υποκαταστάτη -H στη θέση 3 του δακτυλίου (C), και -H στη θέση 6, -OH στη θέση 7 και -H στη θέση 8, του δακτυλίου (A), αντίστοιχα, όπως π.χ. η λουτεολίνη και
- iv) ~ 14.00 ppm, όπου εντοπίζονται τα φλαβονοειδή με γλυκοζυλιωμένη υποκατάσταση στη θέση 6 του δακτυλίου (A).

Στο Σχήμα 9.5 παρουσιάζεται η διαγραμματικά η περιοχή απορροφήσεων των ομάδων –OH καθώς και η επιμέρους κατηγοροποίηση με βάση την κλίμακα των ppm.

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη μεγάλη σημασία των απορροφήσεων των ομάδων –OH και το μεγάλο διαγνωστικό ρόλο που είναι δυνατόν να έχουν στην ανάλυση πολύπλοκων φυτικών εκχυλισμάτων, χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό των συστατικών.

Τόσο οι απορροφήσεις των ομάδων –OH, όσο και οι λαμβανόμενες κορυφές διασταύρωσης φασμάτων 2D ^1H - ^{13}C HMBC, μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την αυτοματοποιημένη, μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων, ανάλυση πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυτικών προϊόντων [Chignola *et al.*, 2011; Lopez-Perez *et al.*, 2007]. Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των ομάδων –OH σε συνδυασμό με τη μεγάλη ευαισθησία που παρουσιάζουν ως προς την υποκατάσταση, μπορούν να αποτελέσουν τον πλέον αδιαμφισβήτητο παράγοντα που μπορεί να συμβάλλει στην αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση μιας ένωσης σε εκχύλισμα. Τέτοιες μελέτες είναι σε εξέλιξη στο εργαστήριο μας σε συνεργασία με το Τμήμα Πληροφορικής.

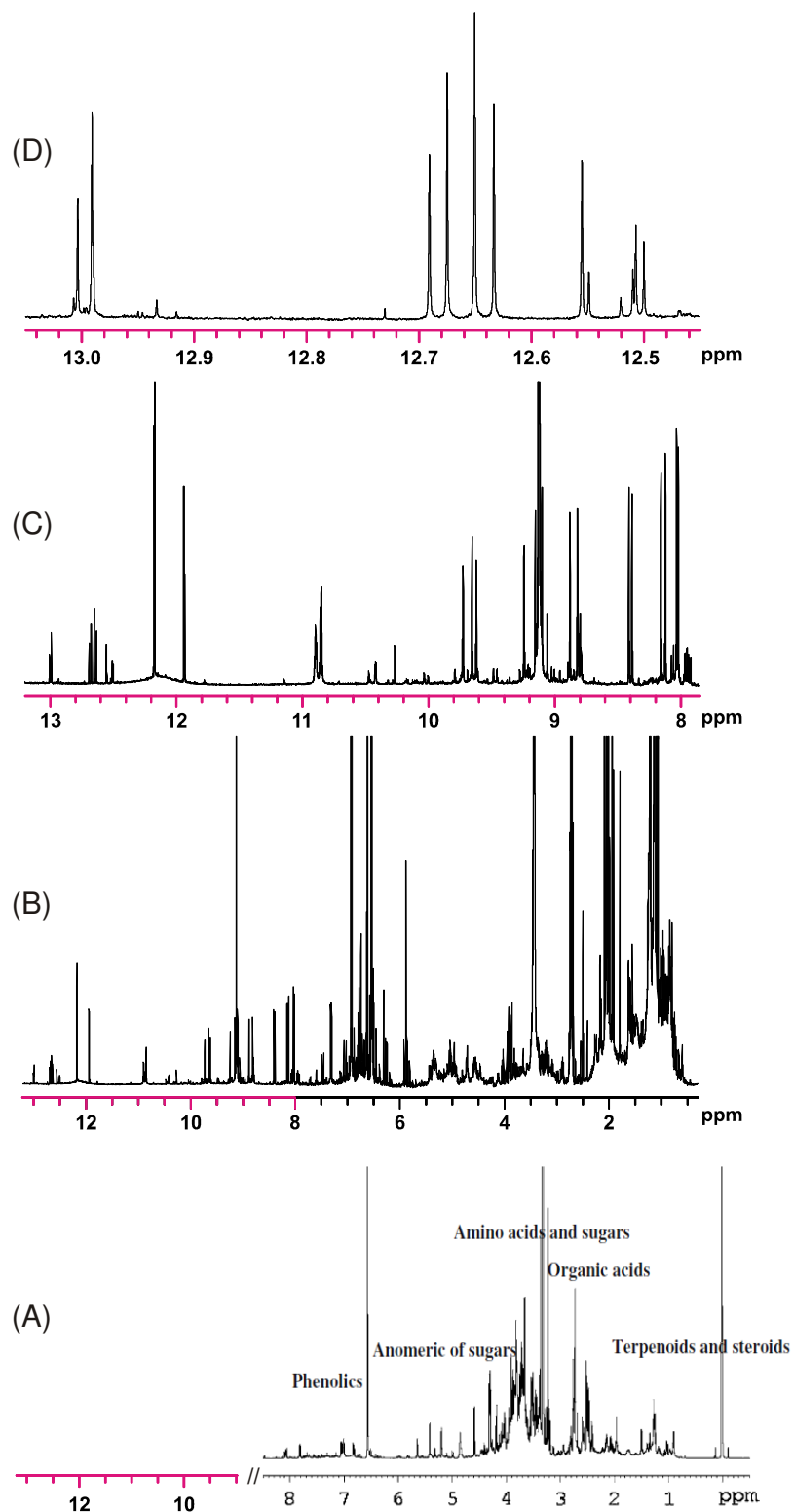
Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης των απορροφήσεων των ομάδων –OH αποτελεί το μεγάλο εύρος απορροφήσεων αλλά και η δυνατότητα κατηγοροποίησης των χημικών μετατοπίσεων. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η κλίμακα από 8 - 15 ppm (Σχήμα 9.4) σχεδόν διπλασιάζει την κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ^1H και είναι ίση με την κλίμακα των απορροφήσεων των αλειφατικών και αρωματικών πρωτονίων. Περαιτέρω ο βαθμός αλληλεπικάλυψης των κορυφών –OH είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με την περιοχή των αλειφατικών και αρωματικών πρωτονίων.



Σχήμα 9.5: Διαγραμματική αναπαράσταση των περιοχών απορρόφησης των ομάδων -OH στην κλίμακα των ppm.

Περαιτέρω εφαρμογή της μεθοδολογίας θα μπορούσε να αποτελέσει και η μεταβολομική (metabolomics) [Verpoorte *et al.*, 2008]. Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την σε βάθος ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών σε μεταβολικό επίπεδο. Αυτές οι μελέτες, που αναφέρονται ως μεταβολομική, δίνουν έμφαση στην εύρεση βιοδεικτών «biomarker» ή την κατάταξη ασθενειών και επικεντρώνονται συνήθως σε βιολογικά υγρά που δεν έχουν υποστεί κλασμάτωση, σε εκχυλίσματα ιστών και φυσικών προϊόντων. Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR στη μεταβολομική έχει πλεονεκτήματα αλλά και περιορισμούς. Στο φάσμα NMR-¹H παρατηρείται αναπόφευκτα επικάλυψη των σημάτων συντονισμού, επειδή υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός συστατικών που συνεισφέρουν (Σχήμα 9.6).

Στο παρακάτω Σχήμα 9.6A, παρατίθεται φάσμα από μεταβολομική μελέτη φυτού *Arabidopsis thaliana* [Kim *et al.*, 2010]. Η πολυπλοκότητα και η αλληλεπικάλυψη των κορυφών είναι εμφανής. Στα Σχήματα (9.6B-D) παρατίθενται φάσματα NMR-¹H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH, εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα, που υποδεικνύουν άμεσα τα σαφή πλεονεκτήματα της περιοχής αυτής της φασματοσκοπίας NMR-¹H. Μέχρι στιγμής στη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί μελέτη μεταβολομικής με χρήση των ομάδων –OH. Αυτό αποτελεί και μία πρόκληση για την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 9.6: (A) Φάσμα $\text{NMR}-^1\text{H}$ εκχυλίσματος *Arabidopsis* (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{KH}_2\text{PO}_4$ in D_2O , pH 6.0) [Kim *et al.*, 2010], (B) Φάσμα 500 MHz $\text{NMR}-^1\text{H}$ εκχυλίσματος ρίγανης οξικού αιθυλεστέρα σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$, (C) η περιοχή 8 - 13 ppm του B, και (D) η περιοχή 12.5 - 13 ppm του (B).

10. ΜΕΛΕΤΕΣ NMR ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

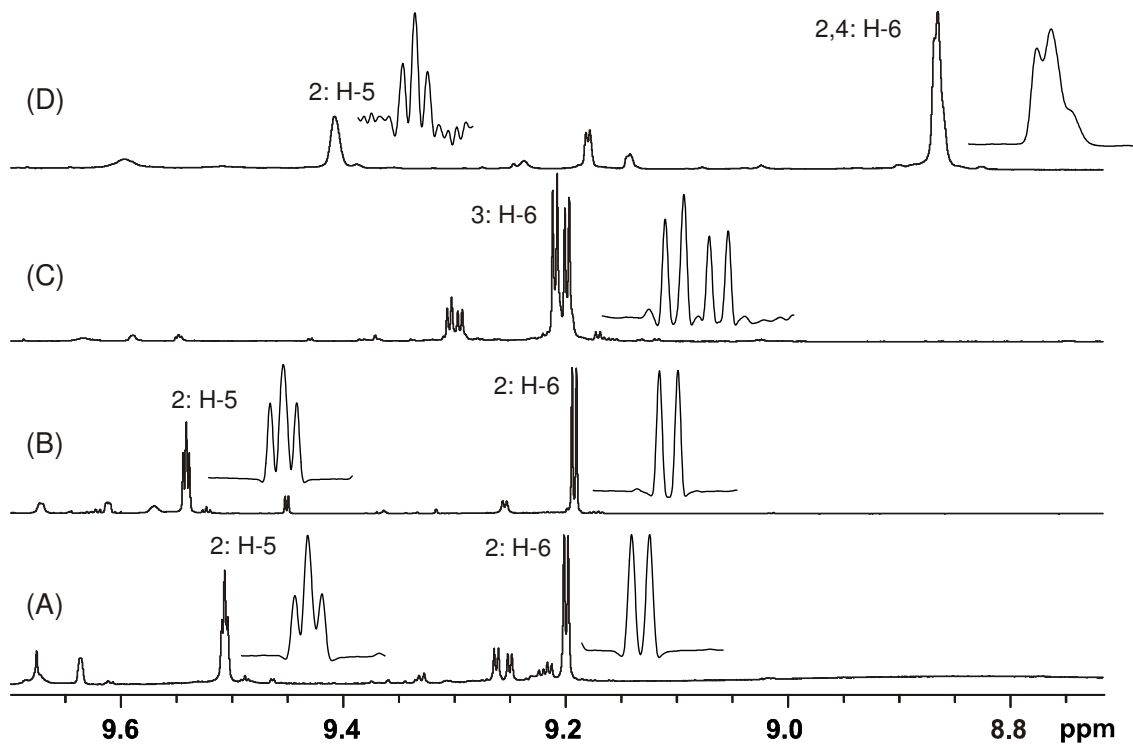
10.1 Εισαγωγή

Όπως αναλύθηκε λεπτομερώς σε πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης [Pauli *et al.*, 2005] η φασματοσκοπία NMR- ^1H καλύπτει μία ευρεία περιοχή εφαρμογών στο πεδίο των φυσικών προϊόντων, όπως: α) ποσοτικοποίηση πολύπλοκων μιγμάτων, β) πιστοποίηση προτύπων ενώσεων, γ) βιοσυνθετικές μελέτες, δ) μελέτες σταθερότητας και ε) μελέτες μηχανισμού και κινητικής αντιδράσεων. Οι περιπτώσεις δ) και ε), αποτελούν σημαντικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR- ^1H , τόσο στη φαρμακευτική βιομηχανία όσο και στη συνθετική χημεία. Όσον αφορά τα φυσικά προϊόντα, όμως, δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται πρωταρχικά αποτελέσματα της επίδρασης που ασκεί ο δευτεριωμένος διαλύτης και η θερμοκρασία στη σύσταση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς.

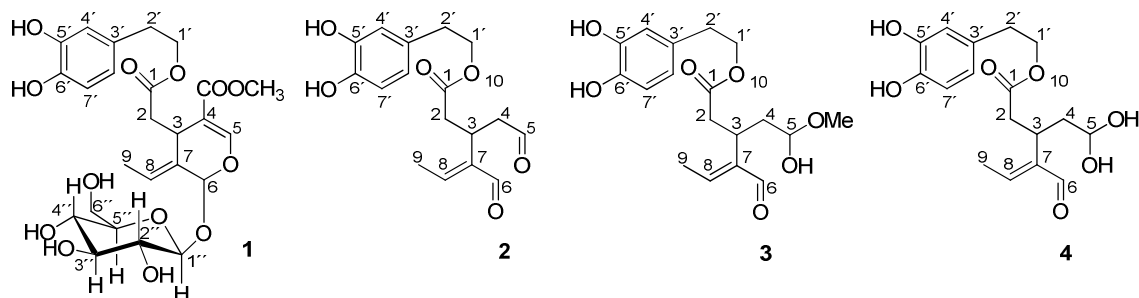
10.2 Επίδραση Δευτεριωμένου Διαλύτη

Στο Σχήμα 10.2.1 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- ^1H υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε τέσσερις διαφορετικούς δευτεριωμένους διαλύτες. Στην περιοχή αυτή απορροφούν κυρίως τα αλδευδικά πρωτόνια των αλδευδικών παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης (Σχήμα 10.2.2).

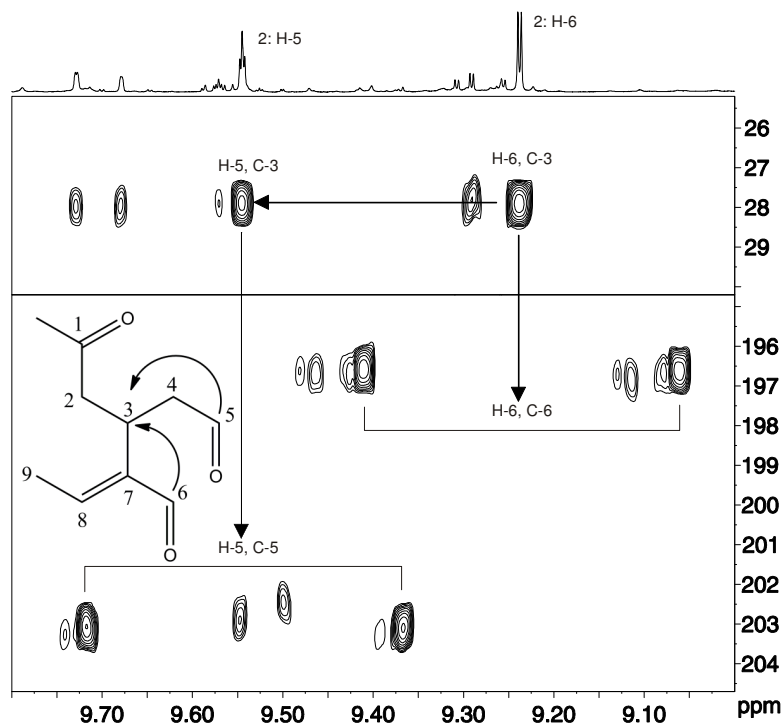


Σχήμα 10.2.1: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς ($T=298\text{K}$, $n_s=512$, $t_{\text{exp}}=1\text{h}$) σε 0.6 mL διαλύτη: (A) $\text{DMSO}-d_6$, (B) ακετονιτρίλιο- d_3 , (C) μεθανόλη- d_4 και (D) D_2O . Ως ένθετο παρατίθεται φάσμα αυξημένης διακριτικής ικανότητας μέσω μετασχηματισμού Lorentz-Gauss της κάθε αλδεϋδικής κορυφής.

Στην περίπτωση του $\text{DMSO}-d_6$ και του ακετονιτρίλιου- d_3 (Σχήμα 10.2.1 A και B) εντοπίζονται κατά κύριο λόγο οι χαρακτηριστικές κορυφές (διπλή και τριπλή) των H-6 και H-5 της διαλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (**2**) (Σχήμα 10.2.3).



Σχήμα 10.2.2: Συντακτικοί τύποι της ελαιοευρωπαϊνης και αλδεϋδικών παραγώγων της.

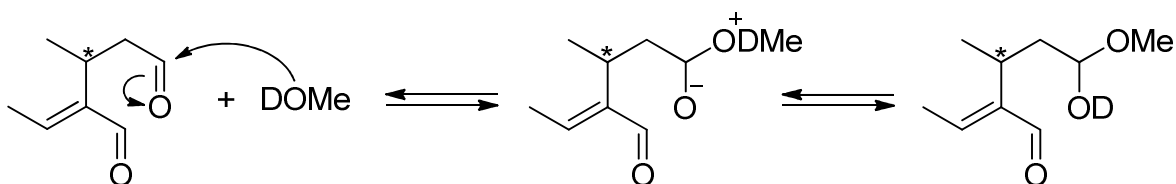


Σχήμα 10.2.3: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ ($T=288\text{K}$, $n_s=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων H-6 και H-5 της διαλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (**2**).

Το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-5 ($\delta_{\text{C}} = 202.94 \text{ ppm}$) εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή (t , $J = 1.4 \text{ Hz}$). Παρ'ότι ο άνθρακας C-3 είναι ασύμμετρος, τα πρωτόνια H-4 εμφανίζονται ως μαγνητικά ισοδύναμα. Το αλδεϋδικό πρωτόνιο H-6 ($\delta_{\text{C}} = 196.88 \text{ ppm}$) εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (d , $J = 1.9 \text{ Hz}$) λόγω σύζευξης με το πρωτόνιο H-3.

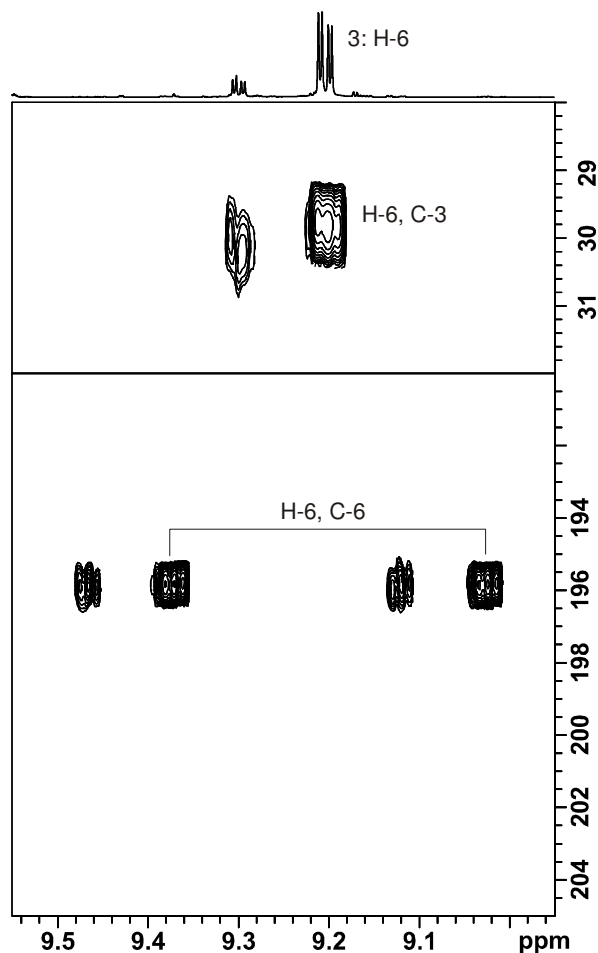
Στην περίπτωση της μεθανόλης- d_4 (Σχήμα 10.2.1C) προκαλείται σημαντική ελάττωση των απορροφήσεων στα $\sim 9.5 \text{ ppm}$ η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο $\text{HC}(5)\text{O}$. Τούτο

θεωρούμε ότι οφείλεται στην προσβολή του C=O της αλδεϋδικής ομάδας (C(5)=O) από τον πυρηνόφιλο διαλύτη μεθανόλη- d_4 υπό σχηματισμό της ημιακεταλικής μορφής (Σχήμα 10.2.4).



Σχήμα 10.2.4: Προτεινόμενη προσβολή της HC(5)O αλδεϋδικής ομάδας από μεθανόλη- d_4 με σχηματισμό ημιακεταλικής μορφής.

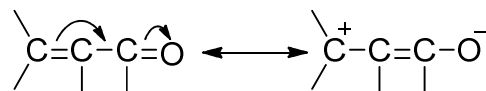
Στο φάσμα NMR- ^1H σε διαλύτη μεθανόλη- d_4 εντοπίζονται μόνο διπλές κορυφές ($\delta_{\text{C}} = \sim 195.86$ ppm) (d, $J = 2.0$ Hz), χαρακτηριστικές της μονο-αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (**3**) (Σχήμα 10.2.2) [Montedoro *et al.*, 1993; Bianco *et al.*, 1999a]. Η παρουσία διπλών κορυφών αποδίδεται στην ασυμμετρία του άνθρακα C-5 της αλδεϋδικής ομάδας μετά την προσβολή. Στη μία περίπτωση η προσβολή γίνεται από τη πάνω πλευρά του επιπέδου της αλδεϋδικής ομάδας, και στην άλλη περίπτωση από τη κάτω πλευρά, με αποτέλεσμα την ύπαρξη δύο διαστερομερών μορφών με διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Στο Σχήμα 10.2.5, παρατίθεται φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC του εκχυλίσματος σε διαλύτη μεθανόλη- d_4 , όπου εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές διασταύρωσης των αλδεϋδικών πρωτονίων. Τούτο οδηγεί στην αδιαμφίσβητη ταυτοποίηση των δύο διαστερομερών μορφών της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (**3**).



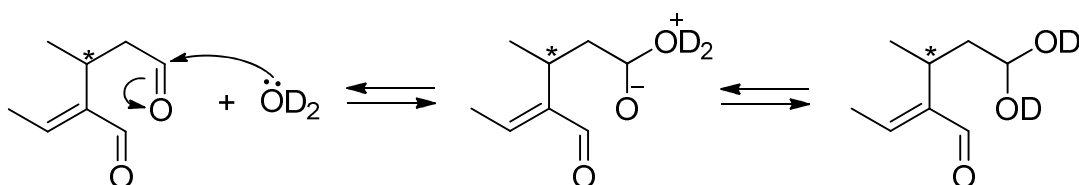
Σχήμα 10.2.5: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη μεθανόλη- d_4 ($T=292\text{K}$, $ns=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων H-6 της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης (**3**).

Στην περίπτωση του D_2O εντοπίζονται στο φάσμα και η διαλδεϋδική και η εφυδατωμένη μορφή του ενός καρβονυλίου της ελαιοευρωπαϊνης (Σχήμα 10.2.7, **2** και **4**). Οι αλδεϋδικές μορφές **2** και **4** [De Nino *et al.*, 2000; Obied *et al.*, 2007; Bianco *et al.*, 1999b] εμφανίζονται με διαφορετικές εντάσεις απορρόφησης. Από την ανάλυση φάσματος ^1H - ^{13}C HMBC προκύπτει ότι θέση προσβολής της εφυδατωμένης μορφής είναι πάλι η C(5)O και όχι η C(6)O. Τούτο θα μπορούσε να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι, όπως και στην περίπτωση πυρηνόφιλης προσβολής από μεθανόλη- d_4 του άνθρακα C-5, που αναλύθηκε προηγουμένως, η C(6)O αλδεϋδική ομάδα είναι σε συζυγιακή θέση ως προς τον διπλό δεσμό C8-C7 (έχει χαρακτήρα α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης) και ως εκ τούτου ο άνθρακας C-6 έχει

μειωμένο ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα (Σχήμα 10.2.6). Επίσης, ίσως στον άνθρακα C-6 εμφανίζεται μία σχετική στεreoχημική παρεμπόδιση λόγω της διακλάδωσης στον άνθρακα C-7.

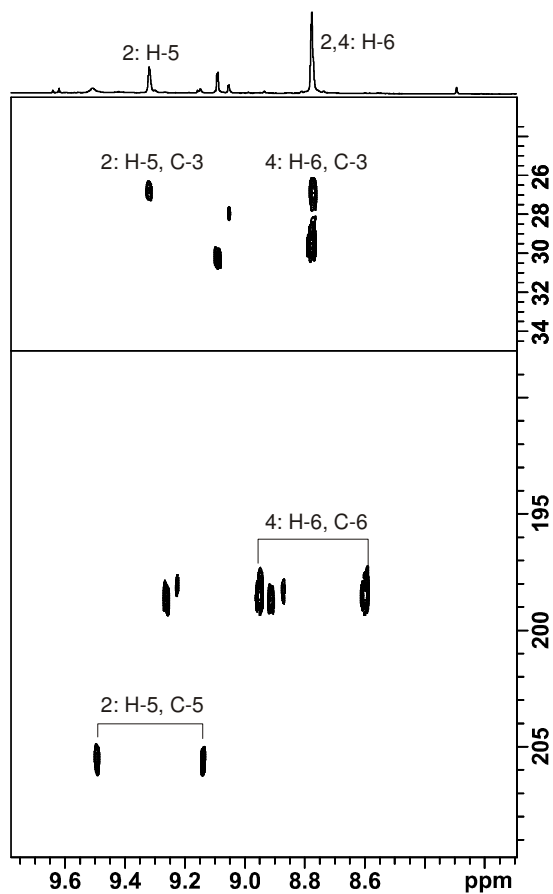


Σχήμα 10.2.6: Δομές συντονισμού α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης.



Σχήμα 10.2.7: Προτεινόμενη προσβολή της HC(5)O αλδευδικής ομάδας από D₂O με σχηματισμό της εφυδατωμένης μορφής.

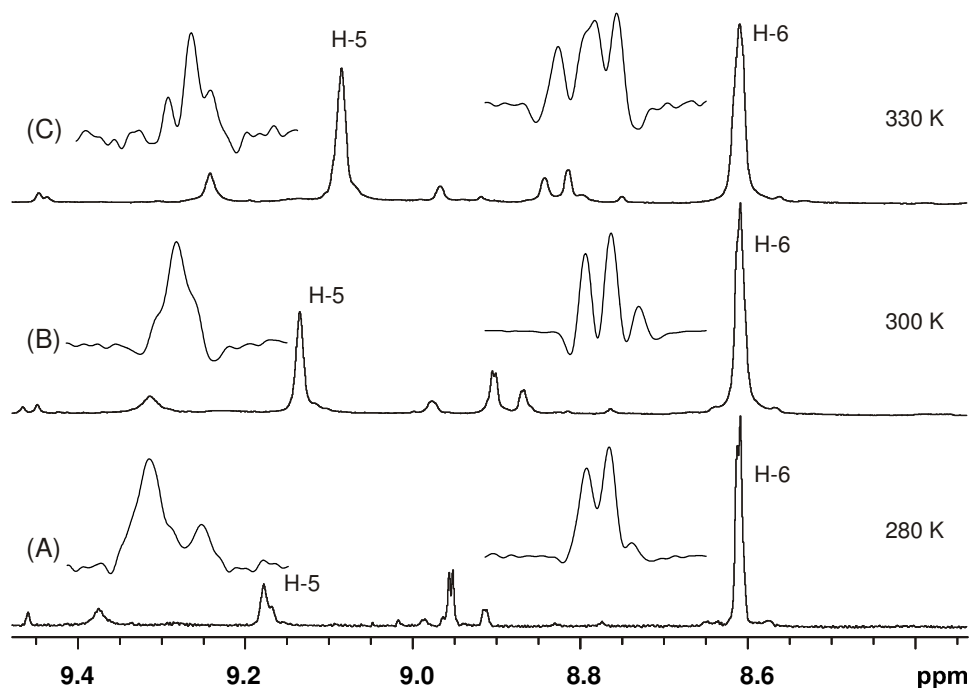
Είναι φανερό ότι η επιλογή του δευτεριωμένου διαλύτη επηρεάζει σημαντικά τις αλδεϋδικές μορφές της ελαιοευρωπαϊνης καθώς εντοπίζονται αλληλομετατροπές αυτών, ανάλογα με τις ιδιότητες του διαλύτη επιλογής.



Σχήμα 10.2.8: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη D_2O ($T=292\text{K}$, $ns=88$, $t_{\text{exp}}=11.5\text{h}$). Επιδεικνύονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αλδεϋδικών πρωτονίων των αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης (**2** και **4**).

10.3 Επίδραση της Θερμοκρασίας

Για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας επιλέχθηκε δείγμα υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη D_2O . Στο δείγμα αυτό εντοπίζονται η διαλδεϋδική (**2**) και η εφυδατωμένη μορφή (**4**) της ελαιοευρωπαϊνης τα σχετικά ολοκληρώματα των οποίων εξαρτώνται σημαντικά από τη θερμοκρασία.

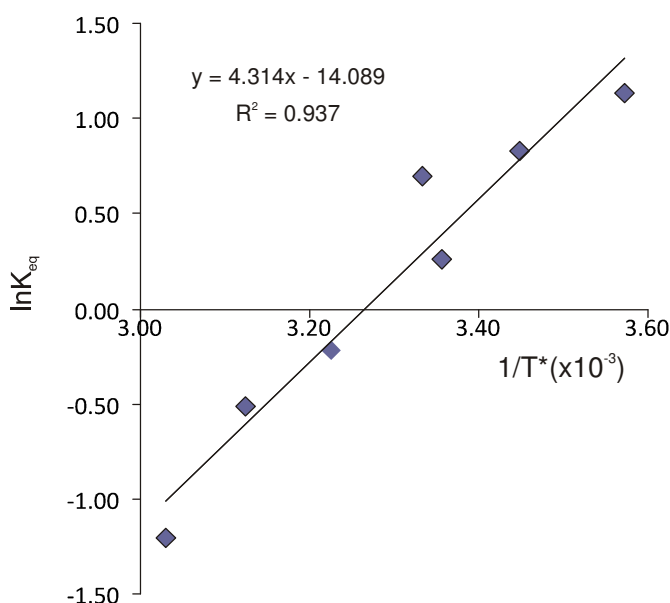


Σχήμα 10.3.1: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz NMR- ^1H 20 mg υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη 0.6 mL D_2O ($n_s=64$, $t_{\text{exp}}=9\text{m}$). (A) $T=280\text{ K}$, (B) $T=300\text{ K}$ και (C) $T=330\text{ K}$. Ως ένθετο παρατίθεται φάσμα αυξημένης διακριτικής ικανότητας μέσω μετασχηματισμού Lorentz-Gauss της κάθε αλδεϋδικής κορυφής.

Από το Σχήμα 10.3.1, και με σχετική ολοκλήρωση των κορυφών στα $\sim 8.6\text{ ppm}$ και $\sim 9.2\text{ ppm}$, προκύπτει ο παρακάτω Πίνακας 10.3.1 και το Σχήμα 10.3.2. Από τη γραφική παράσταση Van't Hoff: $\ln K_{eq} = -\Delta H^\circ/(RT) + \Delta S^\circ/R$, των δεδομένων του Πίνακα 10.3.1, προκύπτουν οι ακόλουθες θερμοδυναμικές παράμετροι: $\Delta H^\circ = 19.86 \pm 0.18\text{ (KJ mol}^{-1}\text{)}$, $\Delta S^\circ = 57.61 \pm 1.81\text{ (KJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{)}$ και $-T\Delta S = -17.17 \pm 1.05\text{ (KJ mol}^{-1}\text{)}$.

Πίνακας 10.3.1: Τιμές ελεύθερης ενέργειας ΔG και $\ln K_{eq}$ για διάφορες τιμές θερμοκρασίας T , όπου $\ln K_{eq}$ είναι ο λογάριθμος του λόγου των ολοκληρωμάτων των πρωτονίων H-6 της αλδεϋδικής μορφής (4) προς τη διαλδεϋδική μορφή (2).

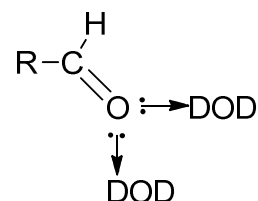
T	$\ln K_{eq}$	$1/T$ ($\times 10^{-3}$)	ΔG (KJ/mol)
280	1.13	3.57	-2.63
290	0.83	3.45	-2.01
298	0.26	3.36	-0.65
300	0.69	3.33	-1.73
310	-0.22	3.23	0.58
320	-0.51	3.13	1.36
330	-1.20	3.03	3.30



Σχήμα 10.3.2: Γραφική παράσταση Van't Hoff των δεδομένων του Πίνακα 10.3.1. Η ευθεία γραμμή αποτελεί τη βέλτιστη προσωμοίωση στην εξίσωση: $\ln K_{eq} = -\Delta H^\circ/(RT) + \Delta S^\circ/R$.

Η εφυδατωμένη μορφή (4) είναι θερμοδυναμικά ασταθής κατά $19.86 \pm 0.18 \text{ KJmol}^{-1}$ σε σύγκριση με την διαλδεϋδική μορφή (2), είναι όμως εντροπικά ευνοούμενη κατά $17.17 \pm 1.05 \text{ KJ mol}^{-1}$. Υποθετικά αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι στη διαλδεϋδική μορφή υφίστανται κυρίως δεσμοί υδρογόνου $D_2O \cdots D_2O$ και σε μικρότερο βαθμό διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου της αλδεϋδικής ομάδας με μόρια D_2O (Σχήμα 10.3.3), οι οποίοι οδηγούν σε μείωση της εντροπίας του συστήματος. Απεναντίας, στην εφυδατωμένη μορφή $-CH(OD)_2$ υφίστανται σε μικρότερο βαθμό διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου $D_2O \cdots D_2O$ λόγω της

προσθήκης ενός μορίου D₂O στην καρβονυλική ομάδα. Από όσο γνωρίζουμε στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει σχετική αναφορά για το σημαντικό ρόλο της εντροπίας σε αντιδράσεις αλδεϋδικών ενώσεων προς σχηματισμό εφυδατωμένων μορφών.



Σχήμα 10.3.3: Διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου καρβονυλικής ομάδας με μόρια D₂O.

Συμπερασματικά, η επιλογή του διαλύτη και της θερμοκρασίας επηρεάζει σημαντικά την ισορροπία των διαφόρων αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης. Στην επίδραση αυτή οφείλεται η πληθώρα των αλληλοσυγκρουόμενων συμπερασμάτων, ως προς τη σύσταση εκχυλισμάτων ελιάς, που εντοπίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών [Savournin *et al.*, 2001; Caruso *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 1999; Perri *et al.*, 1999; De Nino *et al.*, 1997].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κύριος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογιών φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Από τα αποτελέσματα της διατριβής προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα και μεθοδολογίες:

- Ανάπτυξη ενός πειραματικού πρωτοκόλλου εργασίας για την εκλέπτυνση των απορροφήσεων NMR- ^1H φαινολικών ομάδων $-\text{OH}$ σε πολύπλοκα εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων με τη συνδυαστική χρήση $\text{DMSO}-d_6$ ως διαλύτη, πικρικού οξέος, αραιωμένων διαλυμάτων και θερμοκρασίας πλησίον του σημείου πήξεως του διαλύματος.
- Εφαρμογή δισδιάστατης τεχνικής NMR $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC για την πλήρη ταυτοποίηση φυτικών αντιοξειδωτικών σε εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων, χωρίς τη χρήση πολύπλοκων και χρονοβόρων χρωματογραφικών τεχνικών απομόνωσης κάθε συστατικού χωριστά.
- Ταξινόμηση των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ στην κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων με βάση τη δομή των ενώσεων και τη φύση των υποκαταστατών. Βασικό πλεονέκτημα των απορροφήσεων των ομάδων $-\text{OH}$ αποτελεί η μεγάλη κλίμακα χημικών μετατοπίσεων (8 - 15 ppm), η εξαιρετική ευαισθησία σε υποκαταστάσεις ακόμη και σε απόσταση δώδεκα δεσμών και ο μικρός βαθμός αλληλεπικάλυψης των κορυφών $-\text{OH}$ σε σχέση με την περιοχή των αλειφατικών και αρωματικών πρωτονίων.
- Η επιλογή τόσο του διαλύτη όσο και της θερμοκρασίας επηρεάζουν σημαντικά την ισορροπία των διαφόρων αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης, η ταυτοποίηση των οποίων μπορεί να επιτευχθεί σε πολύπλοκα εκχυλίσματα χωρίς τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων.
- Οι απορροφήσεις των ομάδων $-\text{OH}$ και οι λαμβανόμενες κορυφές διασταύρωσης φασμάτων 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC, μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την αυτοματοποιημένη, μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων, ανάλυση πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυτικών προϊόντων. Περαιτέρω εφαρμογή της μεθοδολογίας θα μπορούσε να αποτελέσει και η μεταβολομική (metabolomics).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήθηκε η ανάπτυξη και η εφαρμογή μεθοδολογιών φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους.

Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής συνοψίζονται ως ακολούθως:

(α) Ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου εργασίας για την μελέτη των απορροφήσεων φαινολικών ομάδων –OH σε πολύπλοκα εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων. Η αύξηση της διακριτικής ικανότητας των απορροφήσεων των ομάδων –OH επιτεύχθηκε με τη συνδυαστική χρήση διαλύτη DMSO-*d*₆, πικρικού οξέος, αραιωμένων δειγμάτων και θερμοκρασίας πλησίον του σημείου πήξεως του διαλύματος που επιφέρουν σημαντική ελάττωση της ταχύτητας ανταλλαγής των πρωτονίων. Περαιτέρω, εφαρμόστηκε εκτενώς δισδιάστατη τεχνική ¹H-¹³C NMR για την πλήρη ταυτοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών σε εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων, χωρίς τη χρήση πολύπλοκων και χρονοβόρων χρωματογραφικών τεχνικών απομόνωσης κάθε συστατικού χωριστά.

(β) Η εξαιρετική ευαισθησία δ(¹H) των ομάδων –OH σε αλλαγές του ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος λόγω υποκατάστασης ακόμη και σε απόσταση δώδεκα δεσμών σε συνδυασμό με την αύξηση της διακριτικής ικανότητας των ομάδων –OH αποτελεί μία άριστη μεθοδολογία για την επίτευξη της πλήρους ταυτοποίησης, για παράδειγμα φλαβονοειδών, σε εκχυλίσματα, παρότι αρκετοί άνθρακες του δομικού των σκελετού έχουν παρόμοιες ή ταυτόσημες απορροφήσεις.

(γ) Τα ερευνητικά αποτελέσματα που προέκυψαν με την εφαρμογή της μεθοδολογίας προσέφεραν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα αποτύπωσης και κατηγοροποίησης των χημικών μετατοπίσεων των ομάδων –OH με βάση τη δομή της ένωσης και τη φύση των υποκαταστάσεων των δακτυλίων των ενώσεων. Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης των ομάδων –OH αποτελεί το μεγάλο εύρος απορροφήσεων αλλά και η δυνατότητα κατηγοροποίησης των χημικών μετατοπίσεων. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η κλίμακα απορροφήσεων των ομάδων –OH (8 - 15 ppm) αυξάνει σημαντικά την κλίμακα χημικών μετατοπίσεων ¹H και είναι ίση με το εύρος απορροφήσεων των αλειφατικών και αρωματικών πρωτονίων. Ως συνέπεια, ο βαθμός αλληλεπικάλυψης των κορυφών –OH είναι πολύ

μικρότερος σε σχέση με την περιοχή των αλειφατικών και αρωματικών πρωτονίων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη μεγάλη σημασία των απορροφήσεων των ομάδων $-OH$ και το μεγάλο διαγνωστικό ρόλο που είναι δυνατόν να έχουν στην ανάλυση πολύπλοκων φυτικών εκχυλισμάτων, χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό των συστατικών.

(δ) Από τη συγκριτική μελέτη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διάφορους διαλύτες και θερμοκρασίες προέκυψε ο σημαντικός ρόλος του διαλύτη και της θερμοκρασίας στη μεταβολή της ισορροπίας των διαφόρων αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης.

(ε) Τέλος, τόσο οι απορροφήσεις των ομάδων $-OH$, όσο και οι λαμβανόμενες κορυφές διασταύρωσης φασμάτων 2D 1H - ^{13}C HMBC, μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την αυτοματοποιημένη, μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων, ανάλυση πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυτικών προϊόντων. Περαιτέρω εφαρμογή της μεθοδολογίας θα μπορούσε να αποτελέσει και η μεταβολομική (metabolomics). Αυτό αποτελεί και μία πρόκληση για την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

SUMMARY

The main objectives of this PhD thesis was the development and implementation of methodologies of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in the identification of compounds in complex plant extracts without any previous chromatographic separation and isolation of the individual components. The main conclusions and methodologies of the present PhD thesis are as follows:

(a) A simple method for NMR observation of –OH groups in the solvent DMSO- d_6 was developed based on the combined use of picric acid, dilute solutions and temperatures near the freezing point of the solution. This results in a significant reduction in the exchange rate of protons and, thus, in the line widths of the individual phenol –OH groups. The implementation of two-dimensional ^1H - ^{13}C NMR resulted in the complete identification of natural antioxidants in extracts of natural products without the use of complex and time consuming chromatographic techniques for isolation of each individual component.

(b) The great sensitivity of $\delta(^1\text{H})$ of –OH groups to changes of the electronic environment in combination with increased resolution of the –OH groups is an excellent method to achieve the complete identification of e.g. flavonoids, although several carbons have similar or identical chemical shifts.

(c) The present research results provide important information about the potentialities to classify the absorptions of the –OH groups on the basis of the structure of the molecule and the nature of the substituents in the rings. This demonstrates also the important diagnostic role of the –OH groups which may have in the analysis of complex plant extracts, without prior chromatographic separation of the individual components. A key advantage of using the absorptions of the –OH groups is the wide ^1H shielding range and the possibility to classify chemical shifts. It is particularly interesting that the shielding range of the –OH absorptions (8 - 15 ppm) extends significantly the range of the ^1H chemical shifts of the aliphatic and aromatic protons. As a result, the degree of overlapping of the –OH resonances is much smaller than in the range of aliphatic and aromatic protons.

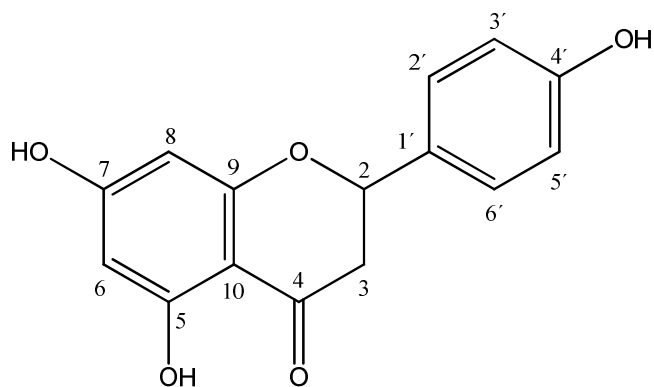
(d) A comparative study of an olive leaf extract in different solvents and temperatures demonstrated the importance of the solvent and temperature on the equilibrium constants of the various types of aldehyde forms of oleuropein.

(e) The absorptions of the –OH groups, and the cross peaks obtained from 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectra, can be useful tools for the automated via computer programs, analysis of complex extracts of natural products. Further application of the method could also be the area of metabolomics.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

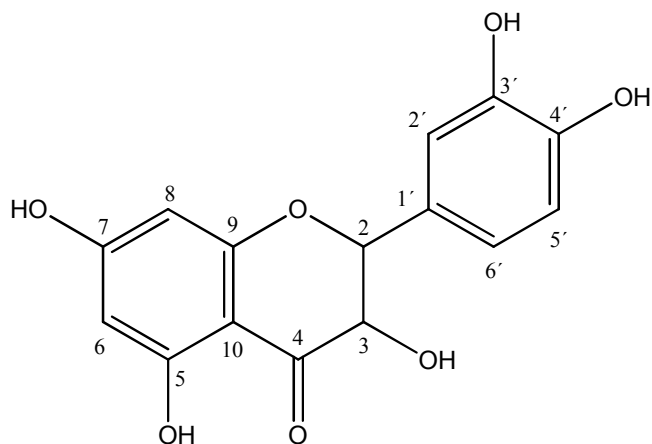
Πίνακας Π1: Χημικές μετατοπίσεις της ναρινγενίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
80.65	2	5.41	130.95	1'	–
45.11	3	2.65; 3.25	129.06	2'	7.31
196.51	4	–	115.44	3'	6.78
163.73	5	12.18	164.77	4'	9.62
96.12	6	5.83	115.44	5'	6.78
167.24	7	10.85	129.06	6'	7.31
98.25	8	5.82			
163.63	9	–			
102.21	10	–			



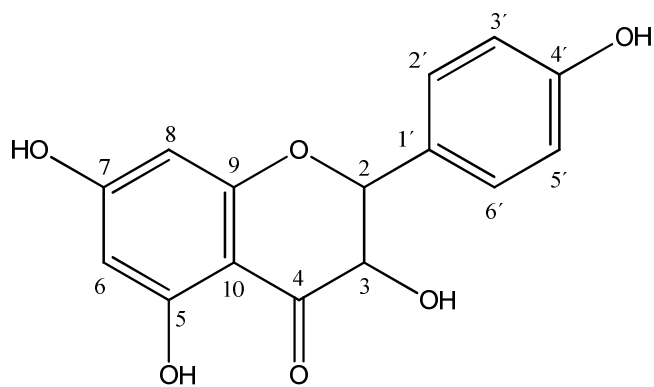
Πίνακας Π2: Χημικές μετατοπίσεις της ταξιφολίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
82.82	2	4.97	127.96	1'	–
71.32	3	H: 4.50 OH: 5.77	114.87	2'	6.74
			145.07	3'	9.05
198.62	4	–	145.52	4'	9.00
163.81	5	11.93	115.08	5'	6.87
96.23	6	5.91	119.16	6'	6.74
167.34	7	10.88			
94.73	8	5.82			
162.83	9	–			
100.91	10	–			



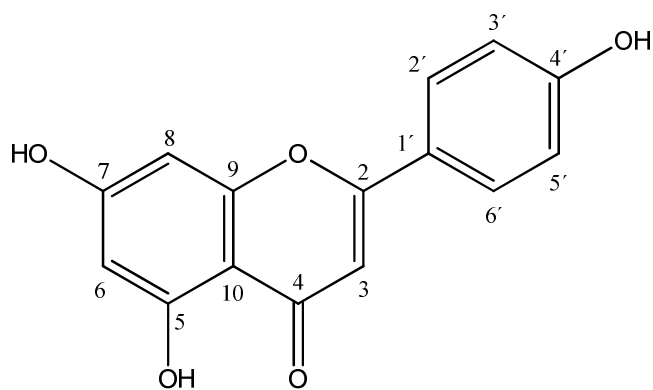
Πίνακας Π3: Χημικές μετατοπίσεις της αρομαδενδρίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
83.33	2	5.05	129.53	1'	–
71.90	3	H: 4.60 OH: 5.75	127.87	2'	7.31
			114.90	3'	6.78
198.05	4	–	157.85	4'	9.60
163.36	5	11.92	114.90	5'	6.78
95.47	6	5.85	127.87	6'	7.31
166.72	7	10.89			
96.40	8	5.91			
162.58	9	–			
100.47	10	–			



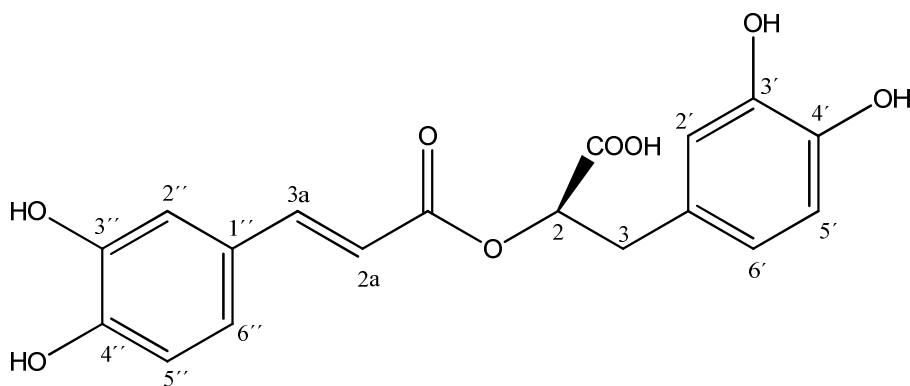
Πίνακας Π4: Χημικές μετατοπίσεις της απιγενίνης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
163.66	2	–	121.05	1'	–
103.63	3	6.79	128.49	2'	7.93
181.72	4	–	115.90	3'	6.92
161.91	5	12.99	161.14	4'	10.38
99.12	6	6.19	115.90	5'	6.92
164.08	7	10.87	128.49	6'	7.93
93.99	8	6.48			
157.45	9	–			
104.12	10	–			



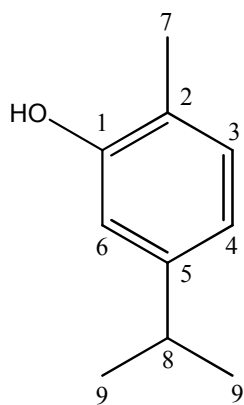
Πίνακας Π5: Χημικές μετατοπίσεις του ροσμαρινικού οξέος σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
171.06	CO	–	129.45	1'	–
73.26	2a	6.28	117.12	2'	6.71
73.22	2	5.03	144.72	3'	8.89
146.63	3a	7.50	144.73	4'	8.84
36.50	3	2.95	115.92	5'	6.67
128.37	1''	–	120.49	6'	6.56
115.37	2''	7.09			
145.78	3''	9.29			
148.75	4''	9.74			
116.21	5''	6.81			
122.05	6''	7.05			



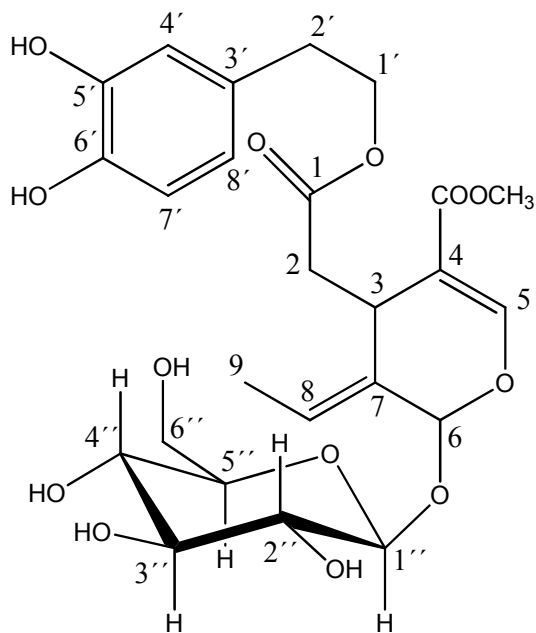
Πίνακας Π6: Χημικές μετατοπίσεις της καρβακρόλης σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H
155.63	1	9.07
121.41	2	–
131.44	3	6.92
116.43	4	6.54
147.11	5	–
112.83	6	6.62
15.49	7	2.05
32.85	8	2.72
23.86	9	1.13



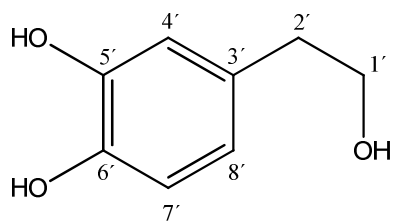
Πίνακας Π7: Χημικές μετατοπίσεις της ελαιοευρωπαϊνης σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
171.93	1	–	64.89	1'	4.13	99.71	1''	4.68
39.41	2	2.64	34.43	2'	2.68	73.03	2''	H: 3.08
26.78	3	3.87	128.42	3'	–			OH: 5.20
107.64	4	–	117.14	4'	6.63	76.30	3''	H: 3.19
153.18	5	7.55	144.91	5'	8.85			OH: 5.07
93.64	6	5.87	146.08	6'	8.80	69.65	4''	H: 3.07
129.05	7	–	116.38	7'	6.65			OH: 5.00
122.81	8	5.96	119.31	8'	6.47	76.99	5''	3.17
12.64	9	1.64			60.85		6''	H: 3.67
167.11	CO₂Me	–						OH: 4.52
51.01	CO₂Me	3.64						



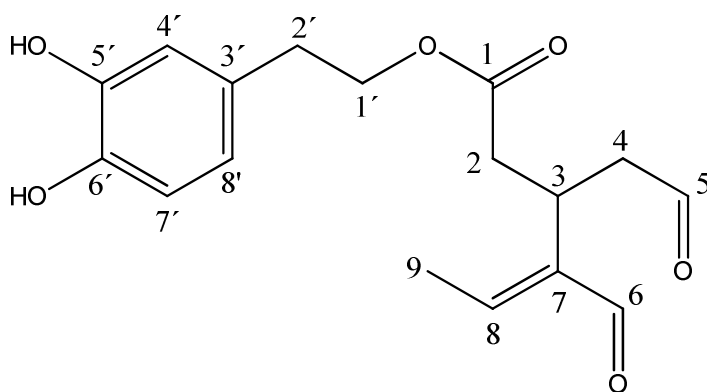
Πίνακας Π8: Χημικές μετατοπίσεις της υδροξυτυροσόλης σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H
62.61	1'	3.49
38.49	2'	2.56
130.09	3'	–
117.22	4'	6.66
144.37	5'	8.77
145.83	6'	8.57
116.28	7'	6.60
120.36	8'	6.42



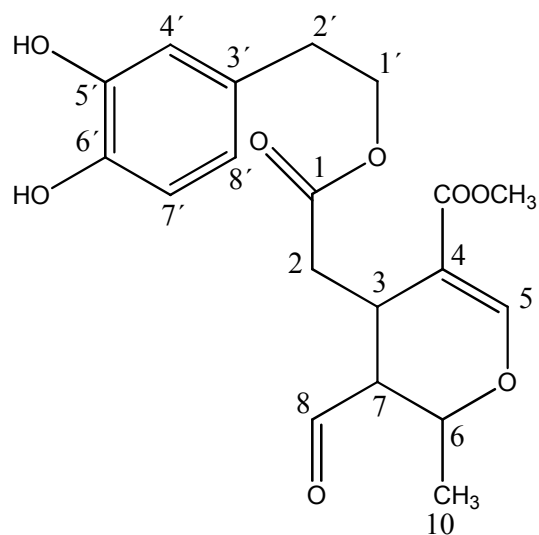
Πίνακας Π9: Χημικές μετατοπίσεις της διαλδευδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης σε υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
172.32	1	–	65.96	1'	4.07
37.63	2	2.60	34.85	2'	2.67
27.90	3	3.56	129.57	3'	–
46.67	4	2.76	117.32	4'	6.63
202.94	5	9.24	144.85	5'	8.88
196.58	6	9.55	146.18	6'	8.82
143.96	7	–	116.64	7'	6.66
155.43	8	6.79	120.47	8'	6.46
16.09	9	2.00			



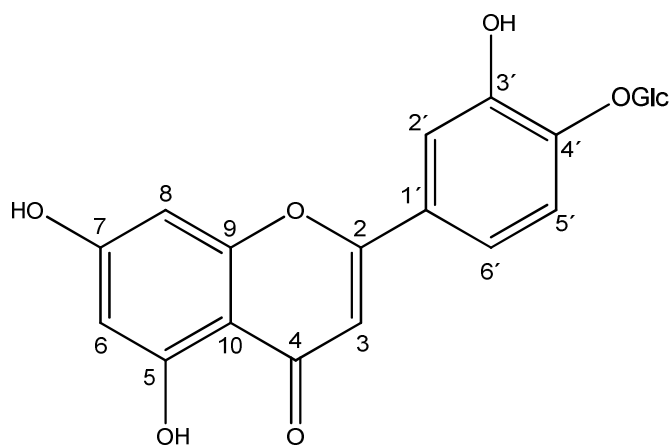
Πίνακας Π10: Χημικές μετατοπίσεις της αλδεϋδικής μορφής της ελαιοευρωπαϊνης σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
172.22	1	–	65.06	1'	4.20
38.63	2	2.70	34.85	2'	2.73
27.70	3	3.31	128.27	3'	–
108.05	4	–	117.12	4'	6.63
154.08	5	7.56	144.81	5'	8.88
71.10	6	4.55	146.14	6'	8.82
53.11	7	–	116.62	7'	6.66
202.05	8	9.49	122.17	8'	6.45
19.10	10	1.30			
167.27	<u>CO₂Me</u>	–			
52.01	<u>CO₂Me</u>	3.67			



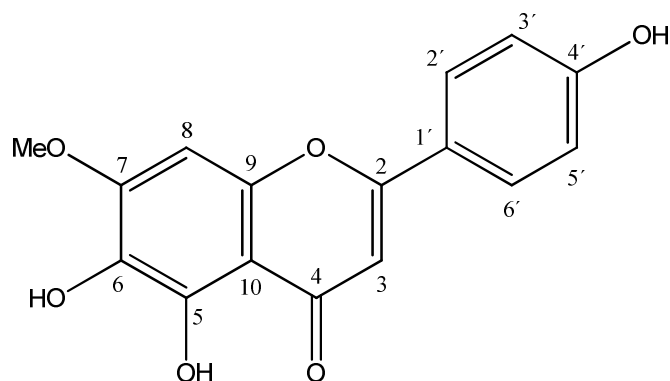
Πίνακας Π11: Χημικές μετατοπίσεις του λουτεολίνη-4'-*O*-γλυκοζίτη (**5**) σε μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
164.14	2	–	125.60	1'	–
103.57	3	6.87		2'	7.54
183.48	4	–	147.90	3'	
162.45	5	12.95	149.63	4'	–
99.80	6	6.24	113.10	5'	7.27
165.39	7	10.95	119.80	6'	
93.80	8	6.54			
158.40	9	–			
	10	–			



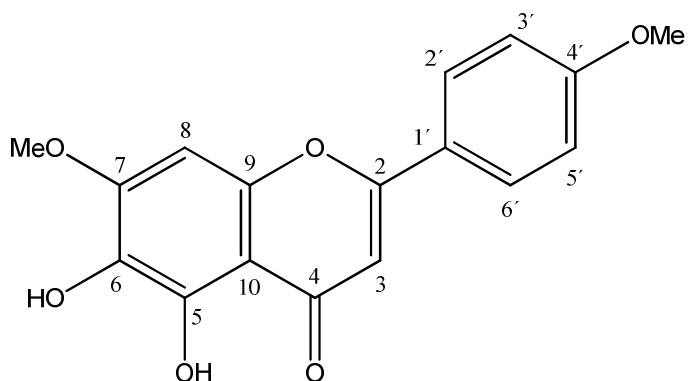
Πίνακας Π12: Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (1) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
163.64	2	–	121.30	1'	–
102.60	3	6.83	128.45	2'	7.96
182.26	4	–	116.00	3'	6.93
146.12	5	12.65	161.23	4'	10.42
129.90	6	8.78	116.00	5'	6.93
154.32	7	–	128.45	6'	7.96
91.24	8	6.92			
149.60	9	–			
105.00	10	–			
56.39	OMe(7)	3.91			



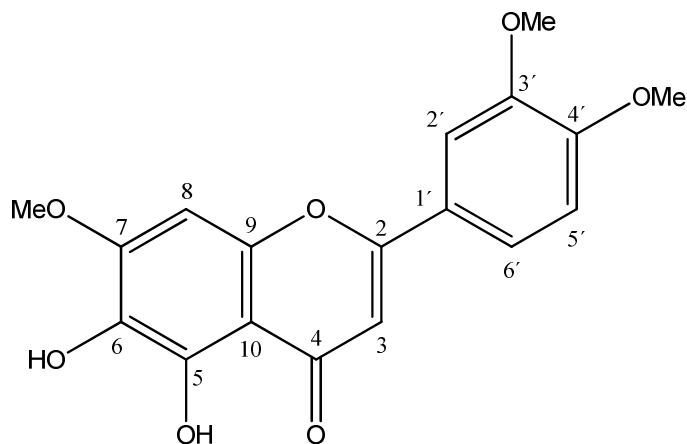
Πίνακας Π13: Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (**2**) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
163.26	2	–	122.89	1'	–
103.56	3	6.92	128.26	2'	8.07
182.30	4	–	114.99	3'	7.13
146.11	5	12.61	162.17	4'	–
129.89	6	8.80	114.99	5'	7.13
154.34	7	–	128.26	6'	8.07
91.99	8	6.96	56.01	OMe(4')	3.86
149.62	9	–			
105.09	10	–			
56.73	OMe(7)	3.92			



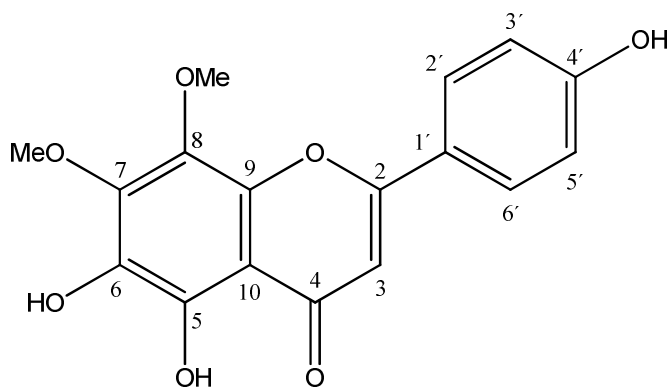
Πίνακας Π14: Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (**3**) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
163.20	2	–	122.50	1'	–
103.20	3	7.02	108.91	2'	7.60
181.98	4	–	148.64	3'	–
145.69	5	12.63	151.64	4'	–
129.62	6	8.79	111.30	5'	7.14
154.04	7	–	119.70	6'	7.72
90.99	8	6.97	55.58	OMe(3')	3.89
149.62	9	–	55.45	OMe(4')	3.89
104.74	10	–			
56.04	OMe(7)	3.93			



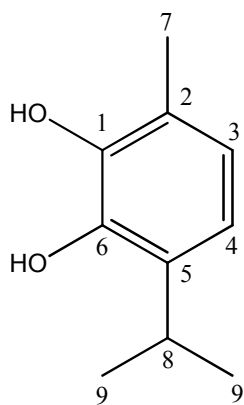
Πίνακας Π15: Χημικές μετατοπίσεις μεθόξυ παραγώγου (**4**) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H	¹³ C	αρίθμηση	¹ H
163.95	2	–	121.49	1'	–
102.58	3	6.85	128.73	2'	7.94
182.81	4	–	116.34	3'	6.96
143.31	5	12.53	161.54	4'	10.45
134.41	6	9.17	116.34	5'	6.96
148.11	7	–	128.73	6'	7.94
133.12	8	–			
	9	–			
106.25	10	–			
60.95	OMe(7)	3.94			
61.91	OMe(8)	3.91			



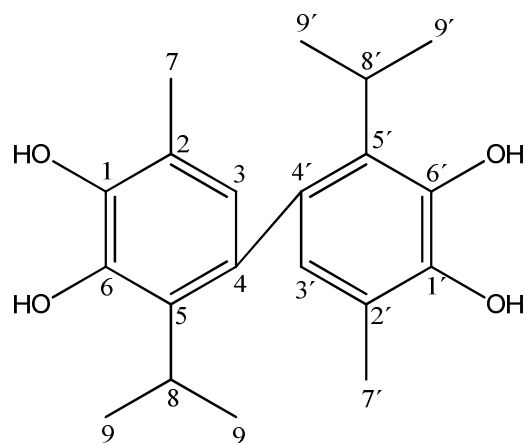
Πίνακας Π16: Χημικές μετατοπίσεις παραγώγου καρβακρόλης (**5**) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H
142.39	1	8.14
122.07	2	–
120.51	3	6.50
115.68	4	6.50
132.80	5	–
143.16	6	8.01
16.39	7	2.08
26.54	8	3.16
22.89	9	1.10



Πίνακας Π17: Χημικές μετατοπίσεις παραγώγου καρβακρόλης (**6**) σε εκχύλισμα ρίγανης σε οξικό αιθυλεστέρα σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹³ C	αρίθμηση	¹ H
140.95	1, 1'	8.10
120.65	2, 2'	–
117.57	3, 3'	6.30
133.30	4, 4'	–
131.65	5, 5'	–
142.70	6, 6'	8.00
13.47	7, 7'	1.78
26.36	8, 8'	3.19
22.90	9, 9'	1.12



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αλεξάνδρου Ν.Ε.**, *Γενική Οργανική Χημεία, Δομή- Φάσματα- Μηχανισμοί*, **1992**, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Βαλαβανίδης Α.Π.**, *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων*, **2006**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Γεροθανάσης Ι.Π.**, *Εργαστήριο Φασματοχημικών και Φυτικοχημικών Τεχνικών*, **1999**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Γεροθανάσης Ι.Π.**, *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων*, **1998**, Εκδόσεις Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα.
- Ιγνατιάδου - Ραγκούση Β.**, *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*, **2008**, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα.
- Τρογκάνης Α.Ν.**, *Φυτικοχημεία Βιολογικών Συστημάτων*, **2003**, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Akao Y.**, Itoh T., Ohguchi K., Iinuma M., Nozawa Y., Interactive Effects of Polymethoxy Flavones from Citrus on Cell Growth Inhibition in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2008**, 16, 2803-2810.
- Albach D.C.**, Grayer R.J., Jensen S.R., Ozgokce F., Veitch N.C., Acylated Flavone Glycosides from *Veronica*. *Phytochem.*, **2003**, 64, 1295-1301.
- Albert K.**, Kunst M., Bayer E., Spraul M., Bermel W., Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance On-Line Coupling with Solvent Non-Excitation. *J. Chromatogr. A*, **1989**, 463, 355-363.
- Andersen Ø.M.**, Markham K.R., *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, **2006**, ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL.

Balci M., *Basic ^1H - and ^{13}C -NMR Spectroscopy*, **2005**, Elsevier.

Bax A. & Subramanian S., Sensitivity-Enhanced Two-Dimensional Heteronuclear Shift Correlation NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson. (1969)*, **1986**, 67, 565-569.

Bax A. & Summers M.F., ^1H and ^{13}C Assignments from Sensitivity-Enhanced Detection of Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity by 2D Multiple Quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2093-2094.

Bax A., Grzesiek S., *ROESY*. In *Encyclopedia of NMR*, **1996**, Grant, D.M., Harris, R.K., Eds. Wiley, Chichester, U.K.

Bayer E., Albert K., Continuous-Flow Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, **1984**, 312, 91-97.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 6185-6205.

Bianco A.D., Muzzalupo I., Piperno A., Romeo G., Uccella N., Bioactive Derivatives of Oleuropein from Olive Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **1999a**, 47, 3531-3534.

Bianco A.D., Piperno A., Romeo G., Uccella N., NMR Experiments of Oleuropein Biomimetic Hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999b**, 47, 3665-3668.

Bindya S., Wong W.T., Ashok M.A., Yathirajana H.S., Rathorec R.S., Amitriptylinium Picrate: Conformational Disorder. *Acta Cryst.*, **2007**, C63, o546-o548.

Bitar A., Ghaddar T., Malek A., Haddad T., Toufeili I., Sensory Thresholds of Selected Phenolic Constituents from Thyme and their Antioxidant Potential in Sunflower Oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **2008**, 85, 641-646.

Black R.D., Early T.A., Roemer P.B., Mueller O.M., Mogro-Campero A., Turner L.G., Johnson, G.A., A High-Temperature Superconducting Receiver for Nuclear Magnetic Resonance Microscopy. *Science*, **1993**, 259(5096), 793-795.

Boskou D., *Sources of Natural Antioxidant Phenols*. In *Antioxidant Plant Phenols. Sources, Structure-Activity Relationship, Current Trends in Analysis and Characterization*, **2006**, Boskou D., Gerothanassis I.P., Kefalas P. (Eds), Research Signpost, Kerala, India.

Boue, S.M., Carter-Wientjes, C.H., Shih, B.Y., Cleveland, T.E., Identification of Flavone Aglycones and Glycosides in Soybean Pods by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 991, 61-68.

Bovey F.A., *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **1998**, 2nd ed., Academic Press, California.

Braun S., Kalinowski S., Berger S., *150 and More Basic NMR Experiments*, **1998**, Wiley-VCH, New York.

Breitmaier E., Voelter W., *Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution, Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*, **1990**, VCH, New York.

Caruso D., Colombo R., Patelli R., Giavarini F., Galli G., Rapid Evaluation of Phenolic Component Profile and Analysis of Oleuropein Aglycon in Olive Oil by Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry (APCI-MS). *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1182-1185.

Casteel D.A., Peroxy Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, 16, 55-73.

Charisiadis P., Exarchou V., Troganis A.N., Gerothanassis I. P., Exploring the “Forgotten” –OH NMR Spectral Region in Natural Products. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 3589-3591.

Charisiadis P., Primikyri A., Exarchou V., Tzakos A., Gerothanassis I.P., Unprecedented Ultra High-Resolution Hydroxy Group ^1H NMR Spectroscopic Analysis of Plant Extracts. *J. Nat. Prod.*, **2011**, accepted.

Chignola F., Mari S., Stevens T.J., Fogh R.H., Mannella V., Boucher W., Musco G., The CCPN Metabolomics Project: a fast protocol for metabolite identification by 2D-NMR. *BioInformatics*, **2011**, 27(6), 885-886

Christoforidou S., Dais P., Tseng, L.H., Spraul M., Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4667-4679.

Clarkson C., Staerk, D., Hansen S.H., Jaroszewski J.W., Hyphenation of Solid-Phase Extraction with Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance: Application of HPLC-DAD-SPE-NMR to Identification of Constituents of *Kanahia laniflora*. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 3547-3553.

Colquhoun L.J., Goodfellow B.J., *Spectroscopic Techniques for Food Analysis*, **1994**, Wilson, R.H (Ed.), VCH Publishers.

Damtoft S., Franzyk H., Jensen S.R., Biosynthesis of Secoiridoid Glucosides in *Oleaceae*. *Phytochem.*, **1993**, 34, 1291-1299.

Dapkevicius A., van Beek T.A., Lelyveld G.P., van Veldhuizen A., de Groot A., Linssen J.P.H., Venskutonis R., Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 892-896.

De Nino A., Mazzotti F., Perri E., Procopio A., Raffaelli A., Sindona G., Virtual Freezing of the Hemiacetal-Aldehyde Equilibrium of the Aglycones of Oleuropein and Ligstroside Present in Olive Oils from *Carolea* and *Coratina* Cultivars by Ion Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 461-467.

De Nino A., Lombardo A., Perri E., Procopio A., Raffaelli A., Sindona G., Direct Identification of Phenolic Glucosides from Olive Leaf Extracts by Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 533-541.

Eigen M., Proton Transfer, Acid-Base Catalysis, and Enzymatic Hydrolysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1964**, 3, 1-19.

El-Toumy S.A., Omara E.A., Nada S.A., Bermejo J., Flavone C-glycosides from *Montanoa bipinnatifida* Stems and Evaluation of Hepatoprotective Activity of Extract. *J. Med. Plants Res.*, **2011**, 5(8), 1291-1296.

Englander S.W., Kallenbach N.R., Hydrogen Exchange and Structural Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. *Quart. Rev. Biophys.*, **1984**, 16(4), 521-655.

Exarchou V., Knucker M., Van Beek T.A., Vervoort J., Gerothanassis I.P., Alber, K., LC-NMR Coupling Technology: Recent Advancements and Applications in Natural Products Analysis. *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 681-687.

Exarchou V., Godejohann M., Van Beek T.A., Gerothanassis I.P., Vervoort J., LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and Its Application to the Identification of Compounds Present in Greek Oregano. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6288-6294.

Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A., Boskou D., Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *J. Agric. Food Chem.*, **2002a**, 50, 5294-5299.

Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis I.P., Tsimidou M., Boskou D., Do Strong Intramolecular Hydrogen Bonds Persist in Aqueous Solution? Variable Temperature Gradient ^1H , ^1H - ^{13}C GE-HSQC and GE-HMBC NMR Studies of Flavonols and Flavones in Organic and Aqueous Mixtures. *Tetrahedron*, **2002b**, 58, 7423-7429.

Fernandes H., Konieczna M., Kolodziejczyk R., Bujacz G., Sikorski M., Jaskolski M., Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of Hyp-1, a St John's Wort Protein Implicated in the Biosynthesis of Hypericin. *Acta Cryst.*, **2008**, *F64*, 405-408.

Flynn P.F., Mattiello D.L., Hill H.D.W., Wand A.J., Optimal Use of Cryogenic Probe Technology in NMR Studies of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 4823-4824.

Frey P.A., Strong Hydrogen Bonding in Molecules and Enzymatic Complexes. *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, *39*, S190-S198.

Gerothanassis I.P., Troganis A., Exarchou V., Barbarossou K., Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and their Applications to Chemistry, Biology and Medicine. *Chem. Educ. Res. Pract. Eur.*, **2002**, *3*(2), 229-252.

Gerothanassis I.P., Exarchou V., Lagouri V., Troganis A., Tsimidou M., Boskou D., Methodology for Identification of Phenolic Acids in Complex Phenolic Mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to Methanolic Extracts of Two Oregano Species. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4185-4192.

Gerothanassis I.P., Kalodimos C.G., NMR Shielding and the Periodic Table. *J. Chem. Educ.*, **1996**, *73*(8), 801-804.

Goharia A.R., Saeidnia S., Malmira M., Hadjiakhoondia A., Ajanib Y., Flavones and Rosmarinic Acid from *Salvia limbata*. *Nat. Prod. Res.*, **2010**, *24*(20), 1902-1906.

Goulas V., Exarchou V., Troganis A., Psomiadou E., Briassoulis E., Fotsis T., Gerothanassis I.P., Phytochemicals in Olive-Leaf Extracts and their Antiproliferative Activity Against Cancer and Endothelial Cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *53*, 600-608.

Gragg G., Newman D., Snader K., Natural Products in Drug Discovery and Development. *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 52-60.

Gragg G., Newman D., Yang S., Natural Product Extracts of Plant and Marine Origin Having Antileukemia Potential. The NCI Experience. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 488-498.

Griffiths L., Horton R., Optimization of LC-NMR III - Increased Signal-to-Noise Ratio Through Column Trapping. *Magn. Reson. Chem.*, **1998**, 36, 104-109.

Gunther H., *NMR Spectroscopy. Basic Principle, Concepts, and Applications in Chemistry*, **1995**, John Wiley & Sons, Chichester.

Harborne J.B., Green P.S., A Chemotaxonomic Survey of Flavonoids in Leaves of the *Oleaceae*. *Bot. J. Linn. Soc.*, **1980**, 81, 155-167.

Hatano T., Mizuta S., Ito H., Yoshida T., C-Glycosidic Flavonoids from *Cassia occidentalis*. *Phytochem.*, **1999**, 52, 1379-1383.

Haw J.F., Glass T.E., Hausler D.W., Motell E., Dorn H.C., Direct Coupling of a Liquid Chromatograph to a Continuous Flow Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Detector for Analysis of Petroleum and Synthetic Fuels. *Anal. Chem.*, **1980**, 52(7), 1135-1140.

Hore P.J., *Nuclear Magnetic Resonance*, **1995**, Oxford University Press, Oxford.

Ilczyszyn M., Ratajczak H., Proton-Exchange Mechanisms in Phenol-Tertiary Amine-Aprotic Solvent Systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1995**, 91, 3859-3867.

Jameson C.J., Gutowsky H.S., Calculation of Chemical Shifts. I. General Formulation and the Z Dependence. *The Journal of Chemical Physics*, **1964**, 40(6), 1714-1724.

Jeffrey G.A., Saenger W., *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, 1991, Springer-Verlag, Pittsburgh, USA.

Johnson M.A., Jaudzems K., Wüthrich K., NMR Structure of the SARS-CoV Nonstructural Protein 7 in Solution at pH 6.5. *J. Mol. Biol.*, **2010**, 402, 619-628.

Justesen U., Collision-Induced Fragmentation of Deprotonated Methoxylated Flavonoids, Obtained by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36, 169-178.

Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R., NMR-based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protocol.*, **2010**, 5(3), 536-549.

Kim H., Moon B.-H., Ahn J.-H., Lim Y., Complete NMR Signal Assignments of Flavonol Derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, 44, 188-190.

Kingston D.I., Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *J. Nat. Prod.*, **2011**, 74, 496-511.

Kiuchi F., Itano Y., Uchiyama N., Honda G., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J., Takashi Aoki T., Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Chenopodium Ambrosioides*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 509-512.

Lambert M., Staerk D., Hansen S.H., Jaroszewski J.W., HPLC–SPE–NMR Hyphenation in Natural Products Research: Optimization of Analysis of *Croton membranaceus* Extract. *Magn. Reson. Chem.*, **2005a**, 43, 771-775.

Lambert M., Staerk D., Hansen S.H., Siarafianpour M., Jaroszewski J.W., Rapid Extract Dereplication Using HPLC-SPE-NMR: Analysis of Isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. *J. Nat. Prod.*, **2005b**, 68, 1500-1509.

Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A., in *Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants Against Fungal Pathogens and Insects*, **2006**, 23-67. *Phytochemistry: Advances in Research*, Imperato F., Research Signpost, Kerala, India.

Lee S., Moon B.-H., Park Y., Lee E., Hong S., Lim Y., Methyl Substitution Effects on ^1H and ^{13}C NMR Data of Methoxyflavones. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2008**, 29(9), 1793-1796.

Lide D.R., *Handbook of Chemistry and Physics*, **2006–2007**, 87th edition, CRC.

Lopez-Perez J.L., Theron R., del Olmo E., Diaz D., NAPROC-13: a Database for the Dereplication of Natural Product Mixtures in Bioassay-guided Protocols. *BioInformatics*, **2007**, 23(23), 3256-3257.

Ma Y.L., Vedernikova I., van den Heuvel H., Claeys M., Internal Glucose Residue Loss in Protonated *O*-Diglycosyl Flavonoids upon Low-Energy Collision-Induced Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, 11(2), 136-144.

Manthey J.A., Guthrie N., Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids Against Six Human Cancer Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5837-5843.

Mattina M.J.I., MacEachern G.J., Extraction, Purification by Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Taxanes from Ornamental *Taxus* Needles. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 679, 269-275.

Meinwald J., Natural Products as Molecular Messengers. *J. Nat. Prod.*, **2011**, 74, 305-309.

Miliauskas G., van Beek T.A., de Waard P., Venskutonis R.P., Sudholter E.J.R., Comparison of Analytical and Semi-Preparative Columns for High-Performance Liquid Chromatography–Solid-Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, 276-284.

Miliauskas G., van Beek T.A., de Waard P., Venskutonis R.P., Sudhölter E.J.R., Identification of Radical Scavenging Compounds in *Rhaponticum carthamoides* by Means of LC-DAD-SPE-NMR. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 168-172.

Miura K., Inagaki T., Nakatani N., Structure and Activity of New Deodorant Biphenyl Compounds from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37(7), 1816-1819.

Montedoro G., Servili J.M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchionii A., Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, 41, 2228-2234.

Moon B.-H., Lee Y., Ahn J.-H., Lim Y., Complete Assignment of ^1H and ^{13}C NMR Data of Dihydroxyflavone Derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **2006**, *44*, 99-101.

Moon B.-H., Lee Y., Ahn J.-H., Lim Y., Complete Assignment of ^1H and ^{13}C NMR Data of Some Flavonol Derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, *43*, 858-860.

Morelock M.M., Choi L.L., Bell G.L., Wright J.L., Estimation and Correlation of Drug Water Solubility with Pharmacological Parameters Required for Biological Activity. *J. Pharm. Sci.*, **1994**, *83*, 948-952.

Nenadis N., Tsimidou M.Z., Oleuropein and Related Secoiridoids. Antioxidant Activity and Sources other than *Olea europaea* L. (Olive Tree). *Recent Prog. Med. Plants*, **2009**, *25*(6), 53-74.

Neuhaus D., Williamson M.P. In *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, **2000**, 2nd ed., New York: Wiley-VCH, Inc.

Neuhaus D., Ismail I.M., Chung C.W., "FLIPSY"-A New Solvent-Suppression Sequence for Nonexchanging Solutes Offering Improved Integral Accuracy Relative to 1D NOESY. *J. Magn. Reson. A*, **1996**, *118*(2), 256-263.

Newman D.J., Cragg G.M., Natural Products as Sources of New Drugs Over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*(3), 461-477.

Nyberg N.T., Baumann H., Kenne L., Application of Solid-Phase Extraction Coupled to an NMR Flow-Probe in the Analysis of HPLC Fractions. *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, *39*, 236-240.

Obied H.K., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Chemical Screening of Olive Biophenol Extracts by Hyphenated Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *603*, 176-189.

Obmann A., Werner I., Presser A., Zehl M., Swoboda Z., Purevsuren S., Narantuya S., Kletter C., Glasl S., Flavonoid C- and O-glycosides from the Mongolian Medicinal Plant *Dianthus Versicolor* Fisch. *Carbohydrate Research*, **2011**, *in press*.

Pajunena T.I., Koskela H., Hasea T., Hopia A., NMR Properties of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Methyl Ester Hydroperoxides. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2008**, *154*, 105-114.

Park Y., Moon B.-H., Lee E., Lee Y., ^1H and ^{13}C -NMR Data of Hydroxyflavone Derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **2007a**, *45*, 674-679.

Park Y., Moon B.-H., Yang, H., Lee Y., Lee E., Yoongho Lim Y., Complete Assignments of NMR Data of 13 Hydroxymethoxyflavones. *Magn. Reson. Chem.*, **2007b**, *45*, 1072-1075.

Pauli G.F., Jaki B.U., Lankin D.C., Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 133-149.

Pavia D., Lampman G.M., Kriz G.S., *Introduction to Spectroscopy*, **2001**, Thomson Learning Inc., Washington, USA.

Perri E., Raffaelli A., Sindona, G., Quantitation of Oleuropein in Virgin Olive Oil by Ion Spray Mass Spectrometry-Selected Reaction Monitoring. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 4156-4160.

Pukalskas A., van Beek T.A., de Waard P., Development of a Triple Hyphenated HPLC–Radical Scavenging Detection–DAD–SPE–NMR System for the Rapid Identification of Antioxidants in Complex Plant Extracts. *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1074*, 81-88.

Rahman A., Choudhary M.I., *Solving Problems with NMR Spectroscopy*, **1996**, Academic Press, San Diego, California, USA.

Rawat P., Kumar M., Sharan K., Chattopadhyay N., Maurya R., Ulmosides A and B: Flavonoid 6-C-glycosides from *Ulmus wallichiana*, Stimulating Osteoblast Differentiation Assessed by Alkaline Phosphatase. *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **2009**, *19*, 4684-4687.

Refat M.S., El-Zayat L.A., Yesilel O.Z., Spectroscopic Characterization of Charge-Transfer Complexes of Morpholine with Chloranilic and Picric Acids in Organic Media: Crystal Structure of bis(morpholinium 2,4,6-trinitrocyclohexanolate). *Spectrochim. Acta, Part A*, **2010**, 75, 745-752.

Rubio S., Quintana J., López M., Eiroa J.L., Triana J., Estévez F., Phenylbenzopyrones Structure-activity Studies Identify Betuletol Derivatives as Potential Antitumoral Agents. *Eur. J. Pharm.*, **2006**, 548, 9-20.

Ryan D., Robards K., Prenzler P., Jardine D., Herlt T., Antolovich M., Liquid Chromatography with Electrospray Ionisation Mass Spectrometric Detection of Phenolic Compounds from *Olea europaea*. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 855, 529-537.

Sanders J.M.K., Hunter B.K., *Modern NMR Spectroscopy - A Guide for Chemists*, **1993**, Oxford University Press, Oxford.

Sarkar S., Functional Foods as Self-Care and Complementary Medicine. *Nutr. Food Sci.*, **2007**, 37(3), 160-167.

Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K., Balansard, G., Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 618-621.

Seger C., Godejohann M., Tseng L.H., Spraul M., Girtler A., Sturm S., Stuppner H., LC-DAD-MS/SPE-NMR Hyphenation. A Tool for the Analysis of Pharmaceutically Used Plant Extracts: Identification of Isobaric Iridoid Glycoside Regioisomers from *Harpagophytum procumbens*. *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 878-885.

Shahidi F.E., *Natural Antioxidants: Chemistry, Health, Effects and Applications*, **1997**, AOCS Press: Champaign, IL.

Singh N., Ahmad A., Spectrophotometric and Spectroscopic Studies of Charge Transfer Complex of 1-Naphthylamine as an Electron Donor with Picric Acid as an Electron Acceptor in Different Polar Solvents. *J. Mol. Struct.*, **2010**, 977, 197-202.

Slobodnik J., Groenewegen M.G.M., Brouwer E.R., Lingeman H., Brinkman U.A.T., Fully Automated Multi-Residue Method for Trace Level Monitoring of Polar Pesticides by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1993**, 642, 359-370.

Smallcombe S.H., Patt S.L., Keifer P.A., WET Solvent Suppression and Its Applications to LC NMR and High-Resolution NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson. A*, **1995**, 117, 295-303.

Snyder L.R., Kirkland J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, **1979**, John Wiley & Sons, New York, USA.

Soler-Rivas C., Espin J.C., Wichers H.J., Oleuropein and Related Compounds. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, 1013-1023.

Spraul M., Freund A.S., Nast R.E., Withers R.S., Maas W.E., Corcoran O., Advancing NMR Sensitivity for LC-NMR-MS Using a Cryoflow Probe: Application to the Analysis of Acetaminophen Metabolites in Urine. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1536-1546.

Spraul M., Hofmann M., Dvortsak P., Nicholson J.K., Wilson I.D., High-Performance Liquid Chromatography Coupled to High-Field Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to the Urinary Metabolites of Ibuprofen. *Anal. Chem.*, **1993**, 65(4), 327-330.

Stalikas C.D., Extraction, Separation, and Detection Methods for Phenolic Acids and Flavonoids. *J. Sep. Sc.*, **2007**, 30(18), 3268-3295.

Stephenson N.A., Bell A.T., Quantitative Analysis of Hydrogen Peroxide by ^1H NMR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 381, 1289-1293.

Styles P.S., Soffe N.F., Scott C.A., An Improved Cryogenically Cooled Probe for High-Resolution NMR. *J. Magn. Reson.*, **1989**, 84(2), 376-378.

Styles P.S., Soffe N.F., Scott C.A., Cragg D.A., Row R., White D.J., White P.C., A High-Resolution NMR Probe in Which the Coil and Preamplifier are Cooled with Liquid Helium. *J. Magn. Reson.*, **1984**, 60(3), 397-404.

Suzuki R., Okada Y., Okuyama T., Two Flavone C-Glycosides from the Style of *Zea mays* with Glycation Inhibitory Activity. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 564-565.

Tatsis E.C., Exarchou V., Troganis A.N., Gerothanassis I.P., ¹H NMR Determination of Hypericin and Pseudohypericin in Complex Natural Mixtures by the Use of Strongly Deshielded OH Groups. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 607, 219-226.

Teleb S.M., Gaballa A.S., Preparation and Spectroscopic Studies on Charge-Transfer Complexes of 2,2-bipyridine with Picric and Chloranilic Acids. *Spectrochim. Acta Part A*, **2005**, 62, 140-145.

Thurman E.M., Mills M.S., *Solid-Phase Extraction In Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Application*, **1998**, John Wiley, New York.

Toth E., Toth G., Mathe I., Blunden G., Martynoside, Forsythoside B, Ladanein and 7a-acetoxyroyleanone from *Ballota nigra* L. *Biochem. Sys. Ecol.*, **2007**, 35, 894-897.

Troganis A.N., Sicilia E., Barbarossou K., Gerothanassis I.P., Russo N., Solvation Properties of N-Substituted Cis and Trans Amides Are Not Identical: Significant Enthalpy and Entropy Changes Are Revealed by the Use of Variable Temperature ¹H NMR in Aqueous and Chloroform Solutions and ab Initio Calculations. *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 11878-11884.

Tzakos A.G., Fuchs P., van Nuland N.A.J., Troganis A., Tselios T., Deraos S., Matsoukas J., Gerothanassis I.P., Bonvin A.M.J.J., NMR and Molecular Dynamics Studies of an Autoimmune Myelin Basic Protein Peptide and its Antagonist. Structural Implications for the MHC II (I-Au)-Peptide Complex from Docking Calculations. *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271, 3399-3413.

Verpoorte R., Choi Y.H., Mustafa N.R., Kim H.K., Metabolomics: Back to Basics. *Phytochem Rev.*, **2008**, 7, 525-537.

Vokou D., Katradi K., Kokkini S., Ethnobotanical Survey of Zagori (Epirus, Greece), a Renowned Centre of Folk Medicine in the Past. *J. Ethnopharmacol.*, **1993**, 39(3), 187-196.

Wang J., Sporns P., MALDI-TOF MS Analysis of Food Flavonol Glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, **2000a**, 48, 1657-1662.

Wang J., Sporns P., MALDI-TOF MS Analysis of Isoflavones in Soy Products. *J. Agric. Food Chem.*, **2000b**, 48, 5887-5892.

Wang J., Sporns P., Analysis of Anthocyanins in Red Wine and Fruit Juice Using MALDI-MS. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2009-2015.

Wexler D.S., Gao L., Anderson F., Ow A., Nadasdi L., McAlorum A., Urfer R., Huang S.-G., Linking Solubility and Permeability Assays for Maximum Throughput and Reproducibility. *J. Biomol. Screening*, **2005**, 10, 383-390.

Wüthrich K., Protein Structure Determination in Solution by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Science*, **1989**, 243, 45-50.

Wüthrich K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, **1986**, Wiley, New York.

Xagorari A., Papapetropoulos A., Mauromatis A., Economou M., Fotsis T., Roussos C., Luteolin Inhibits an Endotoxin-Stimulated Phosphorylation Cascade and Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **2001**, 296(1), 181-187.

Yang Z., Online Hyphenated Liquid Chromatography–Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy–Mass Spectrometry for Drug Metabolite and Nature Product Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 40, 516-527.

Yoon H., Eom S, Hyun J., Jo G., Hwang D., Lee S., Yong Y., Park J.C., Lee Y.H., Lim Y., ^1H and ^{13}C NMR Data on Hydroxy/methoxy Flavonoids and the Effects of Substituents on Chemical Shifts. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2011**, 32(6), 2101-2104.

Zeslawska E., Sturzebecher J., Oleksyn B.J., Geometry of GPPE Binding to Picrate and to the Urokinase Type Plasminogen Activator. *Biorg. & Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 6212-6215.