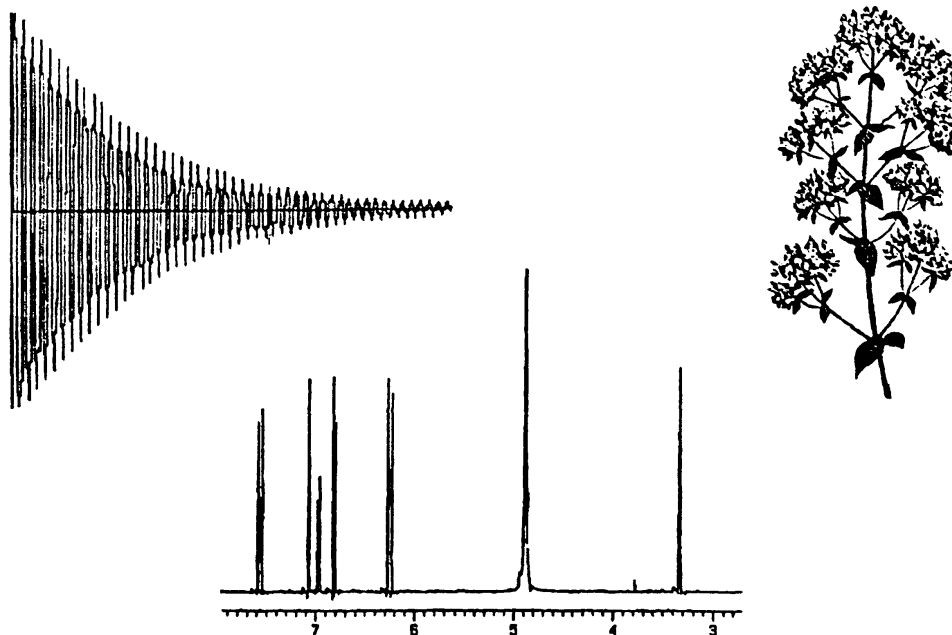




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
Τμήμα Χημείας  
Τομέας Οργανικής Χημείας & Βιοχημείας

**Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Πυρηνικού Μαγνητικού  
Συντονισμού (NMR) για το Χαρακτηρισμό Φαινολικών  
Αντιοξειδωτικών Ενώσεων σε Φυτικά Εκχυλίσματα**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Βασιλική Εξάρχου**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



826880348912



Αρ. ειλ.: 7 ..... 2003 4



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
Τμήμα Χημείας  
Τομέας Οργανικής Χημείας & Βιοχημείας

**Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Πυρηνικού Μαγνητικού  
Συντονισμού (NMR) για το Χαρακτηρισμό Φαινολικών  
Αντιοξειδωτικών Ενώσεων σε Φυτικά Εκχυλίσματα**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Βασιλική Εξάρχου**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003**



**ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ  
ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

της υποψήφιας διδάκτοραςκ. Βασιλικής Εξάρχου  
του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με το άρθρο 13 του Νόμου 2083/92 και υπ' αριθμό 501<sup>Α</sup>/28-06-2002 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Παν/μίου Ιωαννίνων, για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Βασιλικής Εξάρχου, συνήλθε σε συνεδρίαση σήμερα Τετάρτη 3 Ιουλίου 2002 και ώρα 18:00 στην αίθουσα σεμιναρίων του Τμήματος Χημείας (Χ3-230) στη Δουρούτη, και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής της υποψηφίας με τίτλο:

**«Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) για το Χαρακτηρισμό Φαινολικών Αντιοξειδωτικών Ενώσεων σε Φυτικά Ενχυλίσματα»**

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής έθεσαν ερωτήσεις στην υποψήφια σχετικές με το θέμα της διδακτορικής διατριβής. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση της του ακροατηρίου και της υποψηφίας ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.

Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι η παρούσα διατριβή είναι πρωτότυπη, προάγει την επιστήμη και ότι η προφορική παρουσίαση ήταν *αριστη.... και υ.ψηλ.ο.ύ.. επιπέδου.*

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε *ο.μ.ό.ψ.ω.γ.α.* ότι η διατριβή της κ. Βασιλικής Εξάρχου παρουσιάζει πρωτοτυπία και ότι αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, η δε υποψήφια απέκτησε τόσο τις γνώσεις όσο και την επιστημονική κατάρτιση ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού πεδίου.

Στη συνέχεια η επιτροπή αποφάσισε *ο.μ.ό.ψ.ω.γ.α.* να απονεμίσει το βαθμό *...άριστα*

1. Γεροθανάσης Ιωάννης, Καθηγητής Παν/μιου Ιωαννίνων  
(Επιβλέπων Καθηγητής)

2. Μπόσκου Δημήτριος, Καθηγητής Α.Π.Θ.  
(Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

3. Τσιμίδου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Α.Π.Θ.  
(Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής)

4. Ρόδιος Νέστορας,  
Καθηγητής Α.Π.Θ.

5. Πηλίδης Γεώργιος,  
Επίκουρος Καθηγητής Παν/μίου Ιωαννίνων

6. Βασιλική Θεοδώρα-Κασιούμη,  
Επίκουρος Καθηγήτρια Παν/μίου Ιωαννίνων

7. Αναστάσιος Τρογκάνης,  
Λέκτορας Παν/μίου Ιωαννίνων



ΕΠΙΧΡΕΩΣΗ

ΕΠΙΧΡΕΩΣΗ

στους γονείς μου  
Αθανασία και Ανέστη



**ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η διδακτορική διατριβή με θέμα «Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) για το Χαρακτηρισμό Φαινολικών Αντιοξειδωτικών Ενώσεων σε Φυτικά Εκχυλίσματα» που ακολουθεί, πραγματοποιήθηκε με Επιβλέποντα τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Ι.Π. Γεροθανάση. Την τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή απαρτίζουν ο Καθ. Ι.Π. Γεροθανάσης και οι Καθ. Δ. Μπόσκου και Αν. Καθ. Μ. Τσιμίδου του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Για τη διευκόλυνση στην κατανόηση του κειμένου, κρίθηκε αναγκαίος ο διαχωρισμός της διατριβής σε πέντε (5) επιμέρους κεφάλαια. Τα δύο πρώτα Κεφάλαια συνθέτουν το θεωρητικό μέρος της διδακτορικής διατριβής και αναφέρονται στα φυτικά προϊόντα και στις κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που απαντούν σε αυτά και κυρίως στις βασικές αρχές των τεχνικών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας και δύο διαστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Στα επόμενα τρία Κεφάλαια περιγράφεται ο συνδυασμός των μεθοδολογιών NMR που αναπτύχθηκε με σκοπό το χαρακτηρισμό φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους σε επιμέρους συστατικά. Οι συνδυασμένες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν αρχικά σε πρότυπες ενώσεις και σε μίγματα αυτών και τέλος σε φυτικά εκχυλίσματα. Η αρχική μελέτη των προτύπων ενώσεων και των μιγμάτων τους πραγματοποιήθηκε για τη εύρεση των κατάλληλων συνθηκών με τις οποίες επιτυγχάνεται διάκριση διαφόρων τάξεων των φαινολικών οξέων, με βάση τη διαγνωστική αξία των πληροφοριών που μπορούν να συλλεχθούν από τα φάσματα NMR μιας και δύο διαστάσεων. Επιπλέον, η σύσταση επιλεγμένων εκχυλισμάτων μελετήθηκε με υδροχρωματογραφικές τεχνικές για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και παράλληλα εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση. Το πειραματικό μέρος που αφορά τη φασματοσκοπία NMR πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και η εφαρμογή των υδροχρωματογραφικών τεχνικών καθώς και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθ. Ι.Π. Γεροθανάση, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πολύτιμη και συνεχή καθοδήγηση και συμπαράστασή του, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και για τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τη συγγραφή της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθ. Δ. Μπόσκου για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της



εκπόνησης της διατριβής, για τις σημαντικότερες υποδείξεις του κατά τη συγγραφή της και για τη φιλοξενία του και την απλόχερη παροχή των εγκαταστάσεων του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Αν. Καθ. Μ. Τσιμίδου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την καθοδήγηση και τη συμπαράστασή της, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε, για τις πάντα εύστοχες υποδείξεις της, τόσο κατά την πειραματική διαδικασία όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής και για το συνεχές ενδιαφέρον της και την αμεσότητα της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Λέκτορα του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Αν. Τρογκάνη για την πολύτιμη βοήθειά του χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής, καθώς και για τις γνώσεις που μου πρόσφερε σχετικά με το θεωρητικό υπόβαθρο του NMR, τη λήψη και ερμηνεία των φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ επίσης την Επ. Καθ. Β. Θεοδώρου, μέλος της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τις πολύτιμες υποδείξεις και διορθώσεις της, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας πριν την παρουσίαση της διδακτορικής διατριβής, για τις συμβουλές της και για τη γενικότερη φιλική και άμεση συνεργασία μας στην ερευνητική μας ομάδα.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, στον Καθ. Ν. Ρόδιο και στον Επικ. Καθ. Γ. Πηλίδη για τις υποδείξεις και διορθώσεις που πρότειναν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ και ιδιαίτερα την κ. Σοφία Σωτηροπούλου και τον κ. Νικόλαο Νενάδη για τη φιλική συνεργασία μας, καθώς και τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δρ. Χ. Καλοδήμο, κ. Κλημεντίνη Μπαρμπαρόσσου, κ. Κων/νο Κομπορόζο, κ. Ανδρέα Τζάκο, κ. Ευάγγελο Τάτση και ιδιαίτερα την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Πολυξένη Τζιόβα για τη συνεργασία και τη φιλία της.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερος τους γονείς μου Ανέστη και Αθανασία και την αδερφή μου Λύντια για την συνεχή υποστήριξη και ηθική συμπαράσταση που μου πρόσφεραν όλα αυτά χρόνια καθώς και όλους όσους ήταν κοντά μου.

Βασιλική Εξάρχου

Ιούνιος, 2002



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΩΣ ΠΗΓΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ</b>	<b>1</b>
1.1. Φυτικά εκχυλίσματα ως πηγές αντιοξειδωτικών ενώσεων. Μελέτη της σύστασης και εκτίμηση της δράσης τους	3
1.2. Κατηγορίες φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά- Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων.	6
1.3. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	10
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR) ΜΙΑΣ ΚΑΙ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ</b>	<b>11</b>
2.1. Βασικές έννοιες	13
2.2. Πυρηνικές πορείες αποδιέγερσης	17
2.3. Χημική Μετατόπιση	20
2.4. Σύζευξη Spin – Spin	28
2.5. Το φαινόμενο NOE	33
2.6. Δισδιάστατη Φασματοσκοπία NMR	37
2.6.1 Το πείραμα της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Homonuclear correlation spectroscopy, COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) και της συσχέτισης διπλού κβάντου $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Double Quantum Filter Correlated Spectroscopy-DQF-COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ).	41
2.6.2. Το πείραμα της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας ολικής συσχέτισης $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Total Correlation Spectroscopy, TOCSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ).	43
2.6.3. Το πείραμα NOESY-ROESY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy-Rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	45
2.6.4. Το πείραμα της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης πολλαπλού κβάντου $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), και συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , (Heteronuclear Multiple Bond Coherence HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).	48
2.7. Εφαρμογές NMR στην ανάλυση μιγμάτων	51





<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ NMR ΓΙΑ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ -ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΦΕΪΚΟΥ ΚΑΙ ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ DQF COSY <math>^1\text{H}</math>-<math>^1\text{H}</math>, HMQC <math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math> ΚΑΙ HMBC <math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math></b>	<b>53</b>
3.1. Εισαγωγή	55
3.2. Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε μίγμα γνωστής σύστασης	57
3.2.1. Τεχνική της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης (Homonuclear Correlated Spectroscopy, $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY).	63
3.2.2. Τεχνική της ολικώς συσχετιζόμενης φασματοσκοπίας (Total Correlated Spectroscopy, $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY)	66
3.2.3. Τεχνική της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης μέσω του φαινομένου NOE $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy, $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY)	68
3.3. Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε φυτικά εκχυλίσματα	71
3.3.1. Προεργασία φυτικών δειγμάτων	71
3.3.2. Εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ σε φυτικά εκχυλίσματα.	71
3.3.3. Εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας ROESY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ στο μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού <i>O. vulgare</i> .	76
3.4. Συμπεράσματα-Αξιολόγηση της προκαταρκτικής μελέτης των φυτικών εκχυλισμάτων με τη χρήση δισδιάστατων τεχνικών NMR.	78
3.5. Διάκριση καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με NMR	79
3.6. Χρήση NMR μεταβλητής θερμοκρασίας	83
3.6.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος.	83
3.6.2. Εφαρμογή της τεχνικής DQF-COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ μεταβλητής θερμοκρασίας στο διαχωρισμό του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος.	86
3.7. Εφαρμογή της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας μεταβλητής θερμοκρασίας	90
3.7.1. Μελέτη των προτύπων ενώσεων.	90
3.7.2. Εφαρμογή σε φυτικά εκχυλίσματα.	94
3.8. Εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με τη φασματοσκοπία NMR μεταβλητής θερμοκρασίας	97



<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ</b>	<b>99</b>
4.1. Εισαγωγή	101
4.2. Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)	102
4.2.1. Παραλαβή εκχυλισμάτων με εκχύλιση κατά Soxhlet.	102
4.2.2. Υγροχρωματογραφικές μέθοδοι	102
4.2.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση	107
4.3. Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση συνδυασμένων τεχνικών NMR.	114
4.4. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με επιταχυνόμενη οξείδωση λιποσωμάτων λεκιθίνης, παρουσία αλάτων χαλκού	120
4.4.1. Λιποσώματα λεκιθίνης ως υπόστρωμα για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών προϊόντων.	120
4.4.2. Πειραματικό μέρος.	122
4.4.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.	123
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ RP-HPLC ΚΑΙ NMR</b>	<b>129</b>
5.1. Εισαγωγή	131
5.2. Ταυτοποίηση φλαβονοειδών στα φυτικά εκχυλίσματα με υγροχρωματογραφικές μεθόδους	131
5.3. Ταυτοποίηση φλαβονοειδών με τη χρήση τεχνικών NMR	135
5.3.1. Μελέτη προτύπων ενώσεων	135
5.3.1.1. Ταυτοποίηση των υδροξυλικών πρωτονίων με τεχνικές NMR- Επίδραση ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου	135
5.3.1.2. Μελέτη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου OH(5)···CO(4) φλαβονών και φλαβονολών σε μίγματα οργανικών διαλυτών και ύδατος με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR- <sup>1</sup> H.	144
5.3.2. Ταυτοποίηση φλαβονοειδών στα φυτικά εκχυλίσματα με NMR	151
5.4. Κλασμάτωση εκχυλίσματος και ταυτοποίηση φλαβονοειδών με RP-HPLC και NMR.	160
5.4.1. Πειραματικό μέρος	160
5.4.2. Αποτελέσματα- Συζήτηση	161



<u>Παράρτημα - Αρωματικά φυτά της οικογένειας <i>Lamiaceae</i></u>	165
<u>Περίληψη</u>	169
<u>Βιβλιογραφία</u>	171



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

**ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΩΣ ΠΗΓΕΣ  
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ**



### 1.1. Φυτικά εκχυλίσματα ως πηγές αντιοξειδωτικών ενώσεων. Μελέτη της σύστασης και εκτίμηση της δράσης τους.

Είναι γνωστό εδώ και εκατοντάδες χρόνια ότι τα βότανα και τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνται όχι μόνο για τη βελτίωση της γεύσης, αλλά και για τις αντισηπτικές και θεραπευτικές ιδιότητές τους. Μεταξύ των βιοενεργών ενώσεων που απαντούν στα φυτά, τις οποίες χρησιμοποιούν για την προστασία των ιστών τους, περιλαμβάνονται και φαινολικές ενώσεις. Τα ευεργετικά αποτελέσματα, που προκύπτουν από την κατανάλωση ειδών φυτικής προέλευσης, αποδίδονται στην παρουσία τέτοιου είδους βιοενεργών ενώσεων. Πρόσφατες έρευνες τονίζουν την παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα διαφόρων αρτυμάτων και βοτάνων. Στον Πίνακα 1.1 συνοψίζονται μερικές από τις πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών (Shahidi, 1997).

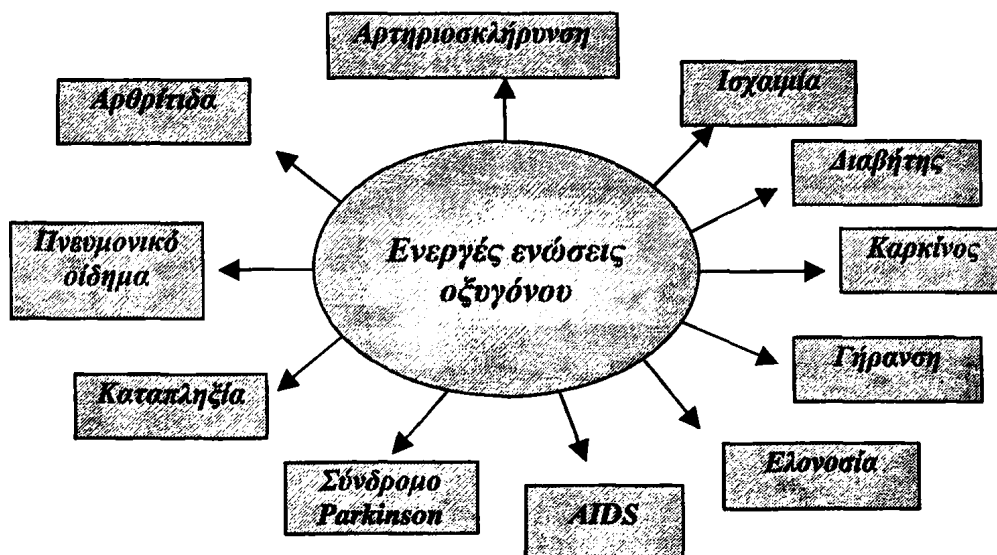
**Πίνακας 1.1.: Φυτικά προϊόντα ως πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών**

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΠΗΓΕΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ
Φλαβονοειδή	Φρούτα και λαχανικά, μούρα, καρπός ελιάς, αυγά, πιπέρι, λεμόνι, ντομάτες κρεμμύδια, κ.ά
Φαινολικά οξέα και παράγωγά τους	Καρπός ελιάς και έλαια, δημητριακά, κ.ά
Κατεχίνες	Πράσινο τσάι, μούρα, καρποί ελιάς, κ.ά
Διάφορες ενώσεις	Εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού, ρίγανης, δεντρολίβανου θυμαριού, βρώμης, φασκόμηλου κ.ά

Οι βιομηχανίες τροφίμων δείχνουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις αντιοξειδωτικές ενώσεις δεδομένου ότι η χρήση τους στα τρόφιμα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ποιότητάς τους. Οι πιο διαδεδομένες συνθετικές αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (μίγμα δύο ισομερών της 2-*t*-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης και 3-*t*-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλης, BHA) και το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (2,6-δι-*t*-βουτυλο-παρακρεσόλη, BHT) λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής σταθερότητας που τις χαρακτηρίζουν. Παράλληλα, όμως, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά επιδρούν σε ένζυμα διαφόρων οργάνων του ανθρώπινου οργανισμού και συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Ενδεικτικά αναφέρεται πως η συνθετική φαινόλη, βουτυλοϋδροξυανισόλη, έχει αφαιρεθεί από τον κατάλογο των ενώσεων που χαρακτηρίζονται με τον όρο «ασφαλείς για τον ανθρώπινο οργανισμό» και σε πολλές χώρες απαγορεύεται η χρήση της (Chen *et al.*, 1992). Έτσι η αντικατάστασή τους από φυσικά αντιοξειδωτικά είναι ενδεδειγμένη.



Εκτός όμως από τις βιομηχανίες τροφίμων, μεγάλο ενδιαφέρον για τις αντιοξειδωτικές ενώσεις έχει εκδηλωθεί από τους κλάδους των βιολόγων και των ιατρών, διότι η παρουσία τους είναι πιθανόν να συνεισφέρει στην προστασία του οργανισμού από ασθένειες που προέρχονται από την επίδραση ενεργών ειδών οξυγόνου. Τα ενεργά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) είναι ισχυρά οξειδωτικά μέσα, όπως οι υδροξυρίζες ( $\text{OH}^\cdot$ ), οι υπεροξυρίζες ( $\text{ROO}^\cdot$ ), αλλά και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) καθώς και το οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ). Πιστεύεται ότι οι ενώσεις αυτές σχετίζονται με πλήθος δυσλειτουργιών και ασθενειών του ανθρώπινου οργανισμού, όπως ασθενειών των πνευμόνων, των νεφρών, του ήπατος, παθήσεων του καρδιαγγειακού και γαστρεντερικού συστήματος κ.α. (Rice-Evans *et al.*, 1993, Auroma, 1994, Burr, 1994), (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: Ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού που πιθανόν να προκαλούνται από την επίδραση ενεργών ενώσεων οξυγόνου.

Κατά συνέπεια, η μελέτη των φυτικών εκχυλισμάτων που θεωρούνται πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, τόσο ως προς τη δράση τους, όσο και ως προς τη σύστασή τους και περιλαμβάνει συνήθως τα ακόλουθα στάδια:

- (α) Τη συλλογή, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση των χρήσιμων τμημάτων του φυτού.
- (β) Την αποθήκευσή τους.
- (γ) Την εκχύλιση με διάφορους διαλύτες για την απομόνωση του πολικού ή μη πολικού κλάσματος των συστατικών του φυτού και την απόσταξη με υδρατμούς, για την παραλαβή των πτητικών συστατικών (γνωστότερου και ως αιθερίου ελαίου).



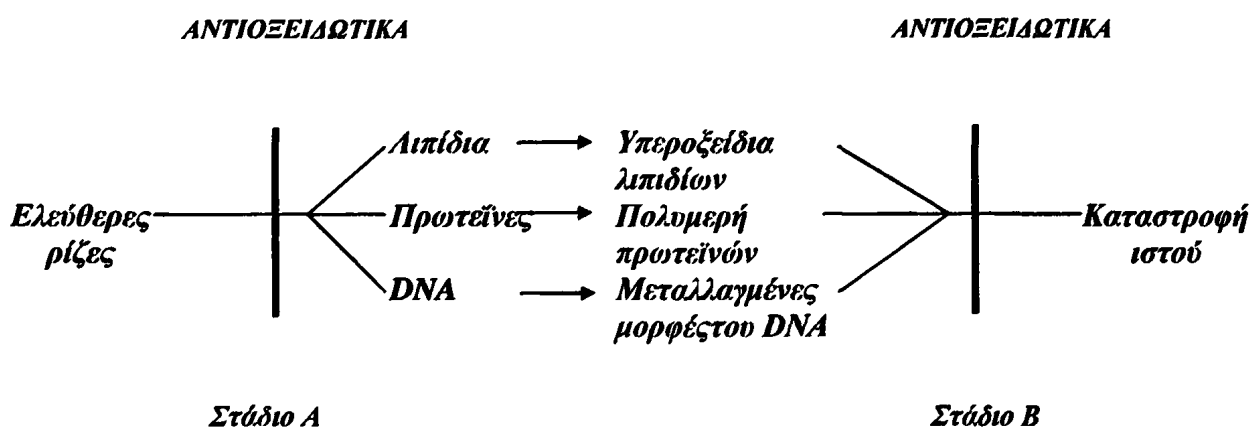
- (δ) Την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, τόσο στο ξηρό φυτό, όσο και στα εκχυλίσματά του με διάφορες μεθόδους, που στηρίζονται στη μέτρηση των προϊόντων της οξείδωσης ενός λιπιδικού υποστρώματος σε διάφορα στάδια αυτής. Τέτοιες μέθοδοι είναι οι ακόλουθες: μέθοδος Schaal (ή μέθοδος πυριαντηρίου), μέθοδος ενεργού οξυγόνου, δοκιμή Rancimat, δοκιμή Kneiss, προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων, προσδιορισμός του αριθμού θειοβαρβιτουρικού οξέος, προσδιορισμός του αριθμού καρβονυλίων, δοκιμή δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζιλίου (DPPH\*), μέθοδος επιταχυνόμενης οξείδωσης λιποσωμάτων λεκιθίνης, κ.α.
- (ε) Τη μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων που περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών των εκχυλισμάτων με χρωματογραφικές μεθόδους και το χαρακτηρισμό των επιμέρους συστατικών που απομονώθηκαν με φασματοσκοπικές μεθόδους.

Οι αναφορές στην αντιοξειδωτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων είναι πολυάριθμες, από τις οποίες προκύπτει πως ιδιαίτερα αποτελεσματική είναι η δράση των φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* (Madsen and Bertelsen, 1995, Cuvelier *et al.*, 1996, Tsimidou and Boskou, 1994). Αλλά και η σύσταση των φυτικών εκχυλισμάτων αποτελεί αντικείμενο πολλών επιστημονικών εργασιών και άρθρων ανασκόπησης. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των επιμέρους συστατικών είναι ιδιαίτερα δύσκολος, λόγω του μεγάλου αριθμού τους. Επιπλέον, οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών (κλιματολογικές συνθήκες, μορφολογία του εδάφους, εποχή συγκομιδής κ.α.) και επομένως τη βιοσύνθεση των περιεχόμενων ενώσεων είναι πολλαπλοί (Kokkini *et al.*, 1991, Kokkini *et al.*, 1994, Kokkini *et al.*, 1997). Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά στα οποία αναφέρεται η παρούσα διδακτορική διατριβή, απομονώνονται με εκχύλιση των φυτών με πολικούς διαλύτες.



## 1.2. Κατηγορίες φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων που απαντούν στα φυτά- Αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων.

Ο όρος αντιοξειδωτικά αναφέρεται στις χημικές ενώσεις οι οποίες, όταν προστεθούν σε ένα υποστρώμα σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, καθυστερούν ή αποτρέπουν την οξείδωσή του (Halliwell *et al.*, 1995). Η δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων σχετίζεται με τη δημιουργία ενός συστήματος άμυνας, τόσο κατά την προσβολή του υποστρώματος (λιπιδίων, πρωτεϊνών, DNA) από ελεύθερες ρίζες (Στάδιο A), όσο και μετά τη δημιουργία υπεροξειδίων των λιπιδίων, πολυμερών πρωτεϊνών και μεταλλαγμένων μορφών του DNA (Στάδιο B). Η διαδικασία απεικονίζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.2:



**Σχήμα 1.2:** Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών στην προστασία ενός υποστρώματος από την προσβολή ελευθέρων ριζών (Στάδια A και B).

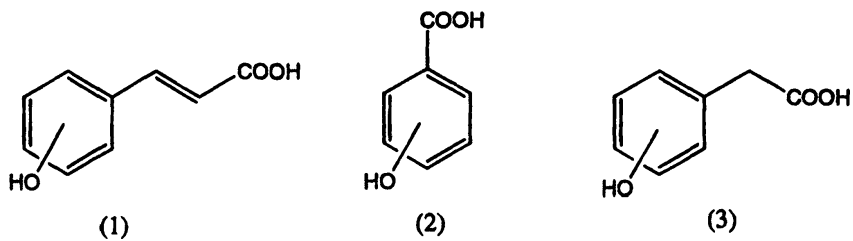
Γενικά, η αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης καθορίζεται από τους παρακάτω παράγοντες: α) Την ικανότητά της να δρα ως δότης ηλεκτρονίων ή υδρογόνου. β) Τη σταθερότητα της σχηματιζόμενης ρίζας μέσω δομών συντονισμού. γ) Την ικανότητά της να σχηματίζει σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση, όπως τα ιόντα των μετάλλων των στοιχείων μετάπτωσης. δ) Την ικανότητα της να δρα σε συνδυασμό με άλλα αντιοξειδωτικά, φαινόμενο που καλείται συνέργεια.

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά που απαντούν στα φυτά, μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

(Α) Φαινολικά οξέα, που είναι συνήθως υδροξυλιωμένα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (1), του βενζοϊκού οξέος (2) και του φαινυλοξικού οξέος (3) (Σχήμα 1.3).

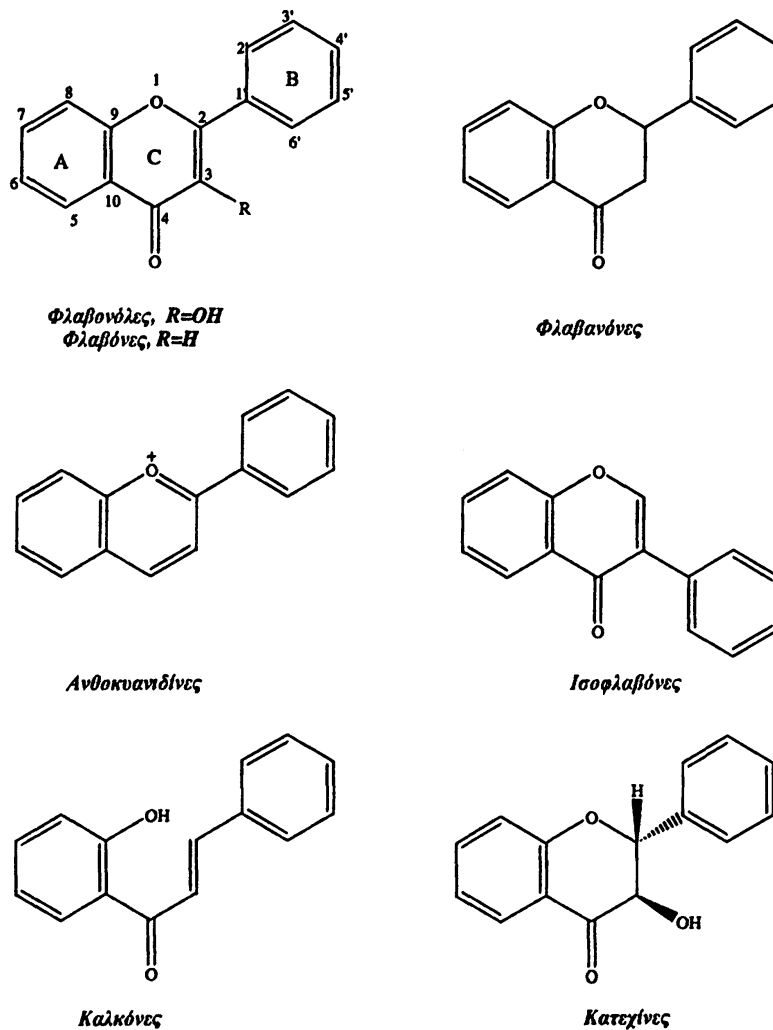






Σχήμα 1.3: Δομές υδροξυλιωμένων παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (1), του βενζοϊκού οξέος (2) και του φαινυλοξικού οξέος (3).

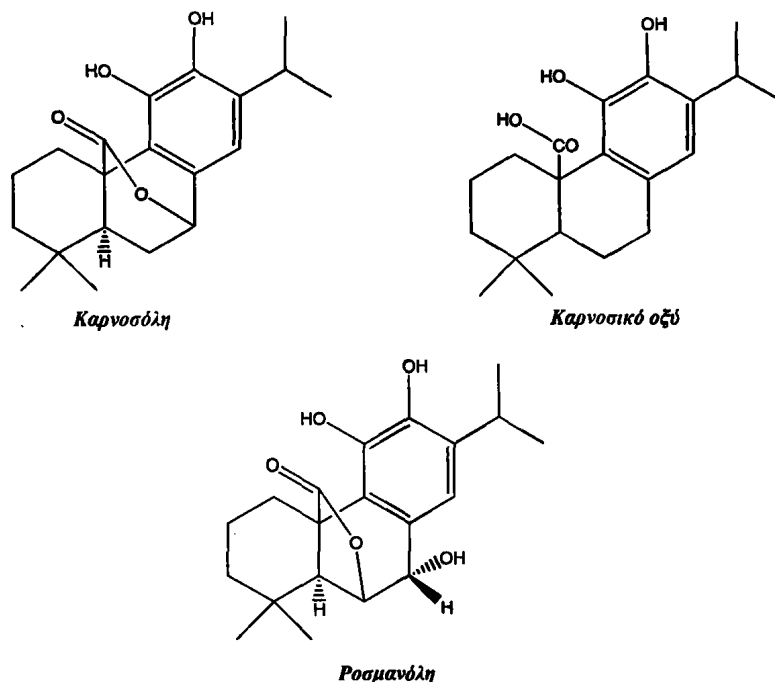
(B) Φλαβονοειδή, τα οποία αποτελούν μια πλούσια τάξη ενώσεων που περιλαμβάνει τις φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, κατεχίνες, ανθοκυανιδίνες και τις καλκόνες (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Δομές των κυριότερων εκπροσώπων της τάξης των φλαβονοειδών.



(Γ) Τερπένια και τερπενοειδή, που είναι ενώσεις με βασική δομική μονάδα το ισοπρένιο ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Τα διτερπένια (τέσσερις ισοπρενικές ομάδες), που είναι δραστικά και απαντούν συνήθως στα φυτά, είναι φαινολικής δομής (Σχήμα 1.5).

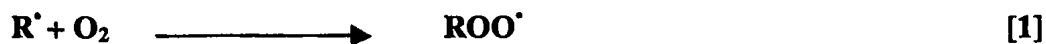


Σχήμα 1.5: Δομές εκπροσώπων της φαινολικών διτερπενίων που απαντούν στα φυτά.

Από τις παραπάνω τρεις κατηγορίες αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, οι φλαβονόλες και σε μικρότερο βαθμό οι φλαβόνες καθώς και παράγωγα τους (εστέρες και γλυκοζίτες) απαντώνται σε όλα σχεδόν τα φυτά (Harborne *et al.*, 1975, Hertrmann, 1976, Rice-Evans *et al.*, 1996). Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιλέχθηκε η μελέτη των φαινολικών οξέων.

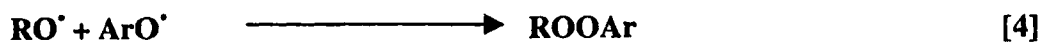
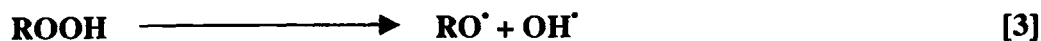
Τα φαινολικά οξέα είναι πιθανόν να εμποδίζουν την οξειδωση των λιπιδικών υποστρωμάτων με δύο μηχανισμούς:

A) Την παγίδευση της υπεροξειδικής ρίζας ( $\text{ROO}^\bullet$ ), που σχηματίζεται στο στάδιο της έναρξης της οξειδωσης, με άτομο υδρογόνου του φαινολικού υδροξυλίου, προς δημιουργία μιας φαινολικής ή γενικά αρυλοξυ-ρίζας (αντίδραση [2]) που είναι σταθερή.

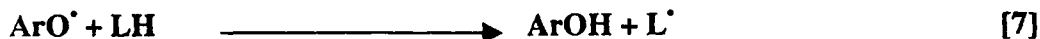


B) Την αντίδραση δύο ριζών προς σχηματισμό προϊόντων που δεν είναι ρίζες (αντίδραση [4]).





Η αρυλοξυ-ρίζα που σχηματίζεται είναι πιθανόν να δημιουργήσει νέες ελεύθερες ρίζες, όπως απεικονίζεται στις αντιδράσεις [5] και [7].



Επισημαίνεται ότι η ταχύτητα σχηματισμού των προϊόντων των αντιδράσεων [4] και [6], υπερέχει κατά πολύ των [5] και [7] με συνολικό αποτέλεσμα την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων (Pokorny, 1987, Shahidi, 1997).

Σε ότι αφορά στα μονοϋδροξυλιωμένα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος αναφέρεται πως η ικανότητα απόσπασης υδρογόνου είναι μικρή όταν το υδροξύλιο βρίσκεται σε *ο*- ή *π*-θέση ως προς το καρβοξύλιο. Αντίθετα τα *μ*- μονοϋδροξυλιωμένα παράγωγα εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση. Αυτό οφείλεται πιθανώς στη δυνατότητα του καρβοξυλίου να έλκει ηλεκτρόνια επηρεάζοντας την ηλεκτρονική πυκνότητα του αρωματικού δακτυλίου και ιδιαίτερα στις θέσεις *ο*- και *π*. Τα αντίστοιχα *ο*-, *μ*- και *π*- μονοϋδροξυλιωμένα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση λόγω της παρεμβολής της μεθυλενομάδας μεταξύ του δακτυλίου και του καρβοξυλίου (Rice-Evans *et al.*, 1996, Shahidi, 1997).

Η αντιοξειδωτική δράση των διϋδροξυλιωμένων παραγώγων του βενζοϊκού οξέος εξαρτάται και πάλι από τη θέση των υδροξυλομάδων στο δακτύλιο. Έτσι, όταν οι υδροξυλομάδες βρίσκονται σε *ο*- θέση μεταξύ τους παρατηρείται μεγαλύτερη δράση. Και πάλι τα αντίστοιχα διϋδροξυλιωμένα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος εμφανίζουν μεγαλύτερη έως σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική δράση, λόγω της μικρότερης επίδρασης της ομάδας του καρβοξυλίου. Η παρουσία τριών υδροξυλομάδων στο βενζοϊκό δακτύλιο αυξάνει την δράση του (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος είναι κατά κανόνα περισσότερο δραστικά από τα αντίστοιχα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (Cuvelier *et al.*, 1992, Natella, *et al.*, 1999), γεγονός που αποδίδεται στην ύπαρξη της ομάδας  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  στον αρωματικό δακτύλιο, η οποία σταθεροποιεί σε μεγαλύτερο βαθμό τη ρίζα  $\text{ArO}^\bullet$  μέσω δομών συντονισμού. Ακόμη μεγαλύτερη δράση εμφανίζουν τα υδροξυλιωμένα παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος (Dziedzic and Hudson, 1984).



Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των φαινολικών αντιοξειδωτικών σε φυσικά μίγματα, όπως αυτά των φυτικών εκχυλισμάτων, επιτυγχάνεται συνήθως με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών (Hakkinen *et al*, 1999). Πρόσφατα αναφέρεται και η εφαρμογή συνδυασμένων τεχνικών LC-MS και LC-NMR που οδηγεί στον ταυτόχρονο διαχωρισμό και ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων (Bringmann *et al*, 1999).

### 1.3. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων όπως τα φυτικά εκχυλίσματα παρέχει το πλεονέκτημα της παρατήρησης όλων σχεδόν των περιεχομένων ενώσεων όταν αυτές περιέχονται σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις. Το πλήθος των ενώσεων που μπορούν να μελετηθούν δεν περιορίζεται από ιδιότητες, όπως η παρουσία χρωμοφόρων ομάδων. Η μελέτη βέβαια τόσο πολύπλοκων μιγμάτων με τη φασματοσκοπία NMR δε μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση όλων των συστατικών του μίγματος, είναι όμως δυνατόν να οδηγήσει στην ταυτοποίηση ικανού αριθμού ενώσεων με τη μικρότερη δυνατή κατεργασία του μίγματος. Επιπλέον, μπορεί να δώσει και δομικές πληροφορίες για τις ενώσεις που ταυτοποιούνται συμβατικώς με χρωματογραφικές μεθόδους, καθώς δεν υπάρχουν στο εμπόριο και η τεχνική LC-MS δεν είναι ακόμη ευρέως διαδεδομένη.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη μεθοδολογιών Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic resonance, NMR), προκειμένου να χαρακτηριστεί το περιεχόμενο διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων σε φαινολικά αντιοξειδωτικά, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν συνδυαστικά προχωρημένες τεχνικές NMR που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2, στην προσπάθεια εύρεσης δομικών χαρακτηριστικών των φαινολικών αντιοξειδωτικών με πιθανή διαγνωστική αξία. Για την εύρεση των κατάλληλων παραμέτρων NMR εφαρμόστηκαν αρχικά τεχνικές NMR μιας και δύο διαστάσεων σε διαλύματα προτύπων ενώσεων, καθώς και σε μίγματα αυτών και ακολούθησε η εφαρμογή των μεθοδολογιών σε μια σειρά πραγματικών δειγμάτων.

Επιπλέον, δύο τύποι επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων μελετήθηκαν με υγροχρωματογραφικές τεχνικές, αλλά και με τεχνικές NMR, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Εκτός από την ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων σε φαινολικά αντιοξειδωτικά έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων αυτών και με τις δύο μεθόδους και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ  
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR) ΜΙΑΣ ΚΑΙ ΔΥΟ  
ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ**



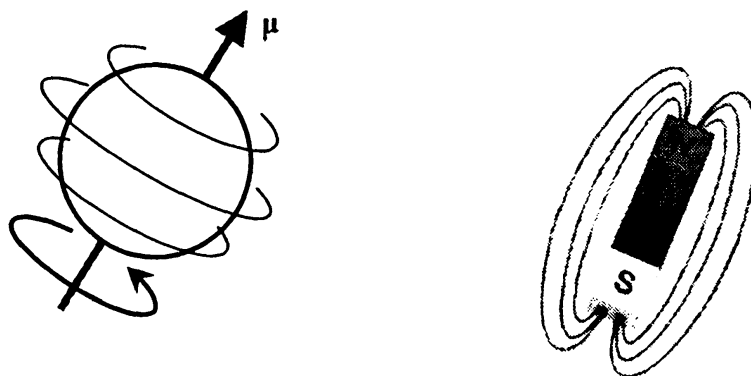
**2.1. Βασικές έννοιες**

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων. Ορισμένοι πυρήνες εκτός από την μάζα και το φορτίο τους έχουν μια χαρακτηριστική ιδιότητα που ονομάζεται πυρηνικό spin (**I**) και έχει ως αποτέλεσμα τη στροφορμή του πυρήνα (**P**) σύμφωνα με τη σχέση [1].

$$P = \hbar\sqrt{I(I + 1)} \tag{1}$$

Το πυρηνικό spin **I** λαμβάνει ακέραιες ή ημιπεριττές τιμές σε μονάδες  $\hbar$  (όπου  $\hbar = h/2\pi$  και  $h$  η σταθερά Planck) ανάλογα με τα χαρακτηριστικά κάθε πυρήνα. Η περιστροφή του πυρήνα γύρω από τον άξονά του σε συνδυασμό με το θετικό φορτίο του έχουν ως αποτέλεσμα να συμπεριφέρεται ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης, το μέγεθος του οποίου εκφράζεται με την πυρηνική μαγνητική ροπή  $\mu$  (Σχήμα 2.1). Η μαγνητική ροπή συνδέεται με το πυρηνικό spin μέσω του γυρομαγνητικού λόγου  $\gamma$ , που είναι χαρακτηριστικός για κάθε πυρήνα και εκφράζει την ευαισθησία του πυρήνα κατά την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου (Εξίσωση [2]).

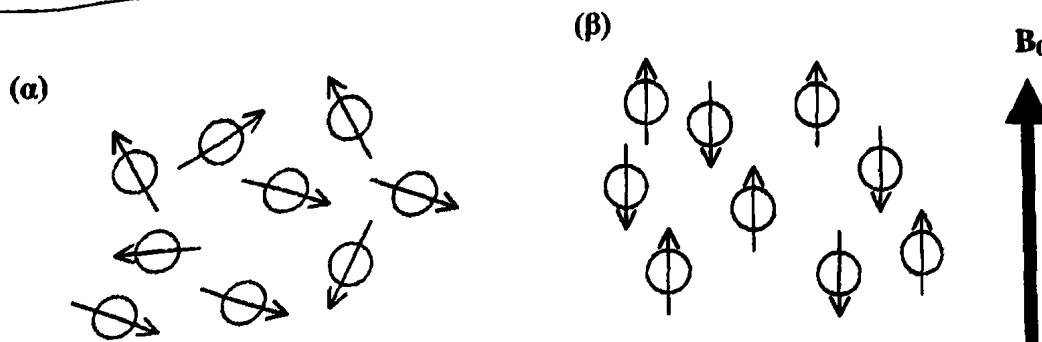
$$\mu = \gamma\hbar I \tag{2}$$



Σχήμα 2.1.: Πυρήνας με  $I \neq 0$  συμπεριφέρεται ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης εξαιτίας της μαγνητικής ροπής  $\mu$  (Gerothanassis et al., 2002).

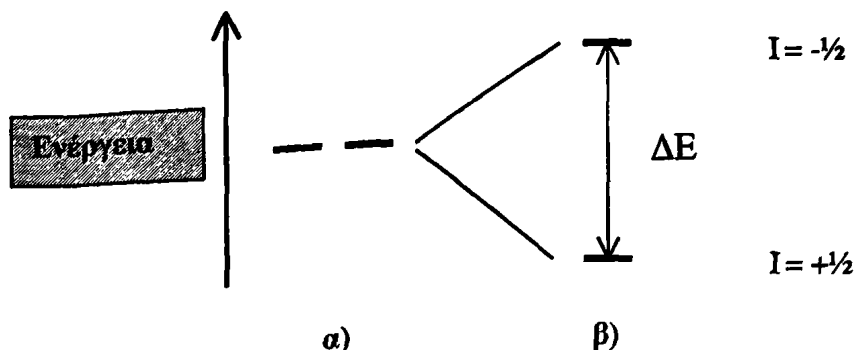
Εκτός μαγνητικού πεδίου το άνυσμα της μαγνητικής ροπής του πυρήνα, μπορεί να έχει οποιοδήποτε προσανατολισμό (εκφυλισμένες καταστάσεις). Εντός μαγνητικού πεδίου,  $B_0$ , οι προσανατολισμοί σε σχέση με την κατεύθυνση του πεδίου είναι ορισμένοι και έχουν πλήθος ίσο με  $(2I + 1)$  (Σχήμα 2.2).





Σχήμα 2.2.: (α) Τυχαίος προσανατολισμός των ανύσμάτων της μαγνητικής ροπής του πυρήνα με  $I=1/2$ , (β) Τα ανύσματα έχουν ορισμένη κατεύθυνση σε σχέση με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο  $B_0$

Στο Σχήμα 2.3 απεικονίζονται οι στάθμες ενέργειας ενός πυρήνα με πυρηνικό spin  $I=1/2$  παρουσία και απουσία του μαγνητικού πεδίου  $B_0$ .



Σχήμα 2.3.: Στάθμες ενεργειακών επιπέδων πυρήνα με  $I=1/2$ : α) απουσία μαγνητικού πεδίου και β) παρουσία μαγνητικού πεδίου.

Για τη διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  μεταξύ των δύο προσανατολισμών του spin και γενικότερα μεταξύ δύο γειτονικών σταθμών ενέργειας ισχύει η σχέση [3]:

$$\Delta E = h \nu = \mu B_0 / I = \gamma \hbar B_0 \quad [3]$$

όπου  $B_0$  η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Τα φάσματα NMR οφείλονται σε μεταβάσεις μεταξύ των ενεργειακών σταθμών με την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

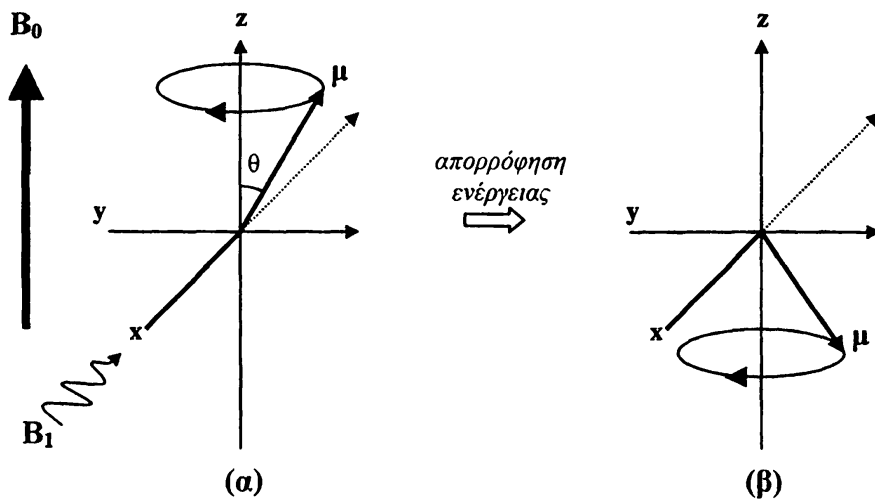
Αναλυτικά, χρησιμοποιώντας το σύστημα καρτεσιανών συντεταγμένων μπορεί να περιγραφεί η κίνηση του ανύσματος  $\mu$ , όταν αυτό βρίσκεται υπό την επίδραση του



εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$ . Αρχικά, το άνυσμα  $\mu$  σχηματίζει γωνία  $\theta$  με τον άξονα  $z$  που είναι η διεύθυνση του πεδίου  $B_0$  και εκτελεί μεταπτωτική κίνηση λόγω της τάσης του πεδίου να καταστήσει το  $\mu$  παράλληλο με τον άξονα  $z$  (Σχήμα 2.4α). Για τη γωνιακή ταχύτητα της μεταπτωτικής κίνησης, που καλείται συχνότητα περιστροφής Larmor,  $\omega$ , ισχύει η σχέση [4]:

$$\omega = 2\pi\nu_0 = |\gamma|B_0 \quad \text{ή} \quad \nu_0 = |\gamma|B_0/2\pi \quad [4]$$

Η γωνία  $\theta$  σύμφωνα με τη κβαντομηχανική μπορεί να πάρει τέτοιες τιμές ώστε η προβολή του ανύσματος  $\mu$  πάνω στον άξονα  $z$ , να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του  $\hbar$ . Για να προκληθεί διέγερση του πυρήνα θα πρέπει να μεταβληθεί η γωνία  $\theta$ , γεγονός που αντιστοιχεί στη μετάπτωση του πυρήνα από τη μία κατάσταση spin (βασική) σε άλλη διαφορετικής στάθμης ενέργειας (διεγερμένη). Αυτό γίνεται με τη βοήθεια ενός πηνίου ταλαντωτή που βρίσκεται σε άξονα κάθετο στο  $B_0$  και δημιουργεί ένα δεύτερο μαγνητικό πεδίο μικρότερης έντασης  $B_1$ . Αν το πεδίο  $B_1$  στρέφεται με την ίδια κατεύθυνση της μεταπτωτικής κίνησης του  $\mu$  και με την ίδια συχνότητα  $\nu_0$ , τότε το άνυσμα  $\mu$  παίρνει κατοπτρική θέση σε σχέση με τον άξονα  $z$  και εκτελεί νέα μεταπτωτική κίνηση σε σχέση με το πεδίο  $B_1$  (Σχήμα 2.4β). Στην περίπτωση αυτή έχουμε συντονισμό και για πυρηνικό spin  $I = 1/2$ , πυρήνες από τη βασική κατάσταση (+1/2) ανέρχονται στη διεγερμένη (-1/2) (αναστροφή του spin).



Σχήμα 2.4.: Μεταπτωτική κίνηση του ανύσματος  $\mu$  υπό την επίδραση (α) εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$  και (β) του μικρότερης έντασης μαγνητικού πεδίου  $B_1$ , που περιστρέφεται προς την ίδια κατεύθυνση της μεταπτωτικής κίνησης του  $\mu$  και με την ίδια συχνότητα  $\nu_0$ .

Στους σύγχρονους φασματογράφους NMR το πεδίο  $B_1$  εφαρμόζεται για μικρά χρονικά διαστήματα, της τάξης των  $\mu\text{sec}$  (ραδιοσυχνότητα παλμών). Στο Σχήμα 2.5

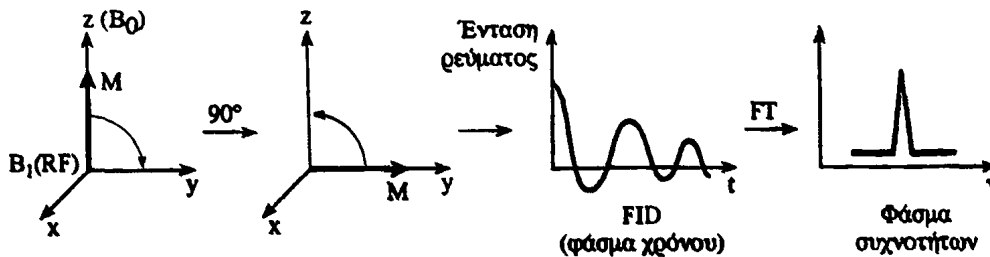




απεικονίζεται διαγραμματικά η λειτουργία ενός παλμικού φασματογράφου. Εξαιτίας της τυχαίας κατανομής των μαγνητικών ροπών  $\mu$  κατά την περιστροφή τους γύρω από τον άξονα του μαγνητικού πεδίου  $z$ , σε ισορροπία, οι τιμές των συνιστωσών  $M_x$  και  $M_y$  είναι μηδέν. Η πιο συνηθισμένη περίπτωση είναι η εφαρμογή ενός ηλεκτρομαγνητικού παλμού  $90^\circ$  κατά την οποία το άνυσμα της μαγνήτισης  $M_z$  (που είναι το άθροισμα των επιμέρους μαγνητικών ροπών των πυρήνων) μεταφέρεται στο επίπεδο  $xy$  και με την επίδραση του πεδίου  $B_0$  επανέρχεται στην αρχική του θέση, εκτελώντας φθίνουσα μεταπωτική κίνηση γύρω από το  $z$ . Στην πράξη εφαρμόζεται κατάλληλος παλμός που οδηγεί στην απόκλιση του ανύσματος  $M_z$  από τον άξονα  $z$  κατά ορισμένη γωνία  $\alpha$  (flip angle) που δίνεται από τη σχέση [5] (Bovey, 1988, Günther, 1995):

$$\alpha = \gamma B_1 t_p \quad [5]$$

όπου το γινόμενο  $\gamma B_1$  είναι η ισχύς του παλμού και  $t_p$  είναι η διάρκεια ή το πλάτος του παλμού που είναι συνήθως μερικά microseconds. Συγχρόνως παράγεται ηλεκτρικό σήμα, που ανιχνεύεται από το δέκτη και καλείται ελεύθερη επαγόμενη απόσβεση (Free Induction Decay, FID). Το σήμα FID ονομάζεται και φάσμα χρόνου και μετατρέπεται σε φάσμα συχνοτήτων μέσω μιας μαθηματικής διεργασίας που καλείται μετασχηματισμός Fourier (Αλεξάνδρου, 1992).



Σχήμα 2.5.: Παράσταση λειτουργίας του φασματογράφου παλμών (Pulsed FT-NMR) (Αλεξάνδρου, 1992).

Τα περισσότερα στοιχεία του περιοδικού πίνακα έχουν τουλάχιστον από ένα ισότοπο με  $I \neq 0$ . Οι πυρήνες του υδρογόνου (πρωτόνιο,  $^1H$ ) και του άνθρακα-13 ( $^{13}C$ ) είναι εκείνοι που μελετώνται συχνότερα. Η περιεκτικότητα του πρωτονίου στο φυσικό στοιχείο είναι 99.98 % και το πυρηνικό του spin έχει την τιμή  $\frac{1}{2}$ . Ο πυρήνας άνθρακα-13 έχει επίσης  $I = \frac{1}{2}$  αλλά η περιεκτικότητά του στο φυσικό στοιχείο είναι μόλις 1.11%.



## 2.2. Πυρηνικές πορείες αποδιέγερσης

Έστω ένα σύστημα spin που βρίσκεται υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $\mathbf{B}_0$ . Ακόμη και χωρίς την επίδραση του δευτερογενούς μαγνητικού πεδίου  $\mathbf{B}_1$ , λαμβάνει χώρα μεταφορά των spin από την υψηλότερη στην χαμηλότερη στάθμη ενέργειας και αντίστροφα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη ισορροπίας στην πληθυσμιακή κατανομή των δύο σταθμών ενέργειας, που πραγματοποιείται συνήθως στα διαλύματα μέσα σε λίγα μόλις δευτερόλεπτα (θερμική ισορροπία). Στα στερεά μπορεί να διαρκέσει ώρες. Η πληθυσμιακή κατανομή των spin καθορίζεται από την κατανομή κατά Boltzmann,

$$\frac{N_{+1/2}}{N_{-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{2\mu\mathbf{B}_0}{kT}} \quad [6]$$

όπου  $N_{-1/2}$  και  $N_{+1/2}$  είναι ο πληθυσμός του spin στην υψηλότερη και την χαμηλότερη στάθμη ενέργειας αντίστοιχα,

$k$  η σταθερά του Boltzmann (ίση με  $1,38066 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ) και

$T$  η απόλυτη θερμοκρασία των διανυσμάτων των spin.

Στη συνήθη θερμοκρασία ( $T = 300 \text{ K}$ ) και για  $\mathbf{B}_0 = 9.4 \text{ T}$  ισχύει  $\Delta E = 2,65 \cdot 10^{-25}$  και συνεπώς  $\Delta E/kT = 6.4 \cdot 10^{-5}$ . Για τέτοιες μικρές τιμές του όρου  $\Delta E/kT$ , η εξίσωση [6] απλοποιείται, χρησιμοποιώντας τη σχέση  $e^{-x} \approx 1-x$ , και προκύπτει:

$$\frac{N_{+1/2} - N_{-1/2}}{N_{+1/2} + N_{-1/2}} = \frac{\Delta E}{2kT} \quad [7]$$

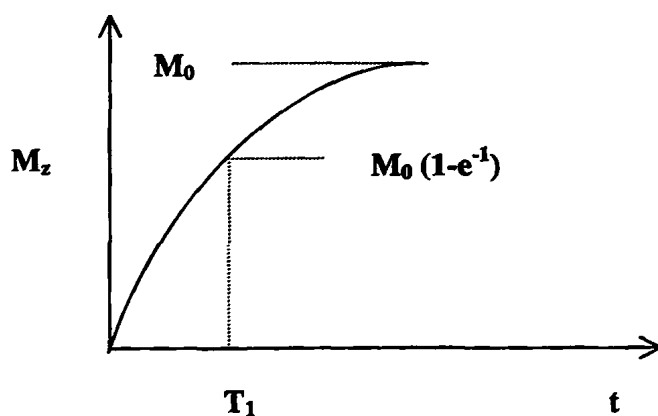
Προσδιορίζοντας την αριθμητική τιμή του δεύτερου όρου της εξίσωσης [7] παρατηρείται ότι η πληθυσμιακή διαφορά είναι ίση με  $3,2 \cdot 10^{-5}$  δηλαδή ένας (1) πυρήνας στους 31000 βρίσκεται επιπλέον στην βασική κατάσταση (Hore, 1995).

Η εφαρμογή του δευτερογενούς μαγνητικού πεδίου  $\mathbf{B}_1$  προκαλεί όπως προαναφέρθηκε μεταφορά των spin μεταξύ των δύο σταθμών ενέργειας, γεγονός που μπορεί σταδιακά να οδηγήσει στον κορεσμό του συστήματος, δηλαδή στην ίση πληθυσμιακή κατανομή των δύο σταθμών. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη θερμοκρασία spin και δεν είναι επιθυμητή διότι αποτρέπει την παρατήρηση του σήματος του συντονισμού. Θα πρέπει επομένως να υπάρχει δυνατότητα επαναφοράς του πυρήνα από τη διεγερμένη στη βασική κατάσταση, ώστε να διατηρείται μια μικρή περίσσεια σε όφελος της βασικής κατάστασης. Με άλλα λόγια προκειμένου να παρατηρήσουμε το σήμα συντονισμού θα πρέπει να μεταφερθεί ενέργεια από το σύστημα των spin στο περιβάλλον.



Επαναφορά των πυρήνων από τη διεγερμένη στη βασική κατάσταση γίνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας και περιλαμβάνει δύο πορείες αποδιέγερσης: την αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$  και την αποδιέγερση  $spin - spin$ . Κατά την πρώτη πορεία, η ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης μεταφέρεται ως θερμική στο σύστημα των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, που αποτελούν το λεγόμενο «πλέγμα», με σύγχρονη επάνοδο του πυρήνα στη βασική του κατάσταση. Η θερμική αυτή ενέργεια χρησιμοποιείται για την αύξηση της ενέργειας μεταφοράς και περιστροφής των μορίων του «πλέγματος». Πιο συγκεκριμένα στην κατάσταση ισορροπίας η μαγνήτιση  $\mathbf{M}$  έχει την κατεύθυνση του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου,  $\mathbf{B}_0$  και συμβολίζεται ως  $\mathbf{M}_0$ . Στην κατάσταση αυτή ισχύει  $M_0 = M_z$  και  $M_x = M_y = 0$  όπου  $M_z$ ,  $M_x$ ,  $M_y$  οι συνιστώσες της μαγνήτισης στους άξονες  $z$ ,  $x$ ,  $y$  αντίστοιχα. Με τη εφαρμογή παλμού  $90^\circ$  κατά τον άξονα  $x$  η μαγνήτιση μεταφέρεται στον άξονα  $y$ . Η αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$  εκφράζεται με το χρόνο αποδιέγερσης  $T_1$  που είναι το μέτρο της ταχύτητας με την οποία η μαγνήτιση επιστρέφει στη θέση ισορροπίας, με την επίδραση του πεδίου  $\mathbf{B}_0$ . Για το λόγο αυτό η αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$  ονομάζεται επιμήκης αποδιέγερση (longitudinal relaxation). Η εξίσωση [8] περιγράφει την αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$  ως συνάρτηση του χρόνου ενώ στο Σχήμα 2.6 απεικονίζεται η αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$ . Ο χρόνος αποδιέγερσης  $T_1$  εξαρτάται από τους γυρομαγνητικούς λόγους των πυρήνων του συστήματος, από το ιξώδες του συστήματος και από τους χρόνους μοριακής περιστροφής (<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>).

$$M_z = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad [8]$$



Σχήμα 2.6.: Η αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$  ως συνάρτηση του χρόνου.

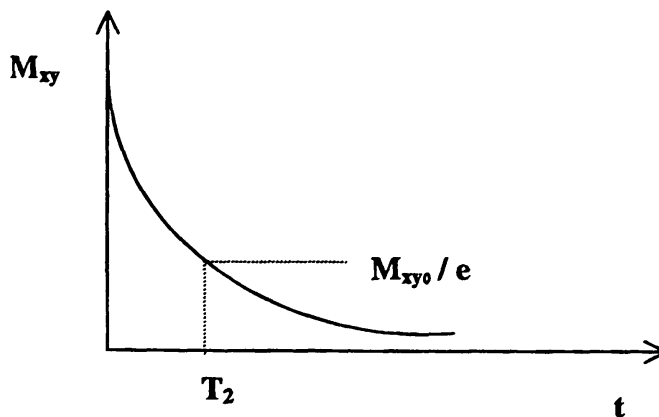
Ο πιο σημαντικός μηχανισμός για την αποδιέγερση  $spin - πλέγματος$  είναι η αλληλεπίδραση του ανύσματος ενός μαγνητικού διπόλου με το άνυσμα γειτονικού



μαγνητικού διπόλου και ονομάζεται αποδιέγερση διπόλου – διπόλου. Άλλος αποτελεσματικός μηχανισμός αποδιέγερσης που οδηγεί σε σημαντική μείωση του χρόνου  $T_1$  είναι η αλληλεπίδραση πυρηνικών spin με spin ηλεκτρονίων. Στην περίπτωση αυτή έχουμε σύζευξη μεταξύ των ανυσμάτων του πυρηνικού  $I$  και ηλεκτρονικού spin  $S$  η οποία παρατηρείται παρουσία παραμαγνητικών κέντρων.

Κατά τη δεύτερη πορεία αποδιέγερσης spin – spin, ο πυρήνας αποδιεγείρεται με μεταφορά της ενέργειάς του σε άλλο πυρήνα που βρίσκεται στη βασική κατάσταση. Αναλυτικά, κατά την εφαρμογή ενός παλμού  $90^\circ$  κατά τον άξονα  $x$  σε ένα σύστημα spin, μεταφέρεται η μαγνήτιση στον άξονα  $y$  και αρχίζει να περιστρέφεται στο επίπεδο  $xy$ . Ο χρόνος  $T_2$  εκφράζει ποσοτικά την αποδιέγερση spin – spin ή αλλιώς την εγκάρσια αποδιέγερση (transverse relaxation) κατά την οποία η συνιστώσα του ανύσματος της μαγνήτισης στο επίπεδο  $xy$  ( $M_{xy}$ ) θα γίνει ίση με το 0, που είναι η θέση ισορροπίας, (εξίσωση [9], Σχήμα 2.7). Η αποδιέγερση της εγκάρσιας μαγνήτισης οφείλεται στην απώλεια της συνοχής της φάσης μεταξύ των περιστρεφόμενων πυρηνικών spin, δηλαδή στην αύξηση της εντροπίας του συστήματος (<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>).

$$M_{xy} = M_{xy0} e^{-\frac{t}{T_2}} \quad [9]$$



Σχήμα 2.7.: Η αποδιέγερση spin – spin ως συνάρτηση του χρόνου

Τα φαινόμενα της αποδιέγερσης εκτός από τη διατήρηση του σήματος συντονισμού, καθορίζουν και το πλάτος της καμπύλης συντονισμού, δεδομένου ότι το πλάτος  $\Delta\nu$  είναι αντιστρόφως ανάλογο του μέσου χρόνου που παραμένει το σύστημα στη διεγερμένη κατάσταση. Έτσι σύμφωνα με την αρχή της απροσδιοριστίας του Heisenberg ισχύει:

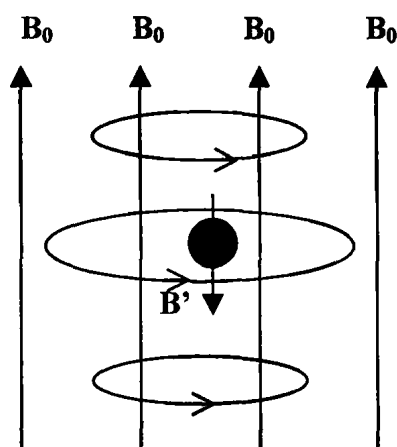
$$\Delta E \Delta t \sim h / 2\pi \quad \text{ή} \quad \Delta\nu \sim h / 2\pi \Delta t \quad [10]$$

Μεγάλος χρόνος  $\Delta t$  (βραδεία αποδιέγερση) συνεπάγεται μικρό πλάτος της καμπύλης συντονισμού (Bovey, 1988).



### 2.3. Χημική Μετατόπιση

Η συχνότητα συντονισμού των πυρήνων στις διάφορες χημικές ενώσεις δεν είναι σταθερή αλλά εξαρτάται από το ηλεκτρονικό περιβάλλον. Η εφαρμογή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$  προκαλεί κυκλοποίηση του ηλεκτρονικού νέφους που περιβάλλει τον πυρήνα έτσι ώστε, σύμφωνα με το νόμο του Lenz, να παράγεται μαγνητική ροπή που αντιτίθεται στο μαγνητικό πεδίο  $B_0$ . Επομένως, ένας πυρήνας πρωτονίου δέχεται την επίδραση ενός μαγνητικού πεδίου που είναι μικρότερο από αυτό που εφαρμόζεται εξωτερικά (Σχήμα 2.8).



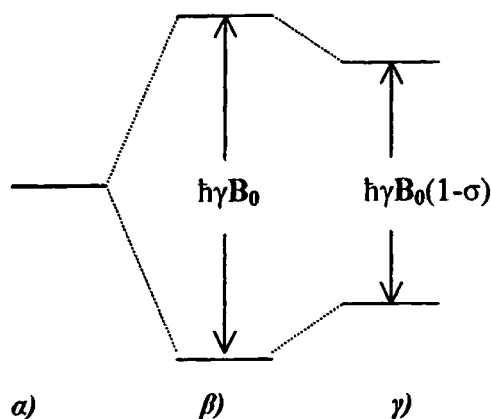
Σχήμα 2.8. Η ηλεκτρονική προστασία του πυρήνα (Hore, 1995).

Αν  $B_0$  είναι η ένταση του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται στον ελεύθερο πυρήνα, η ένταση,  $B_{\text{eff}}$  που πραγματικά εφαρμόζεται στον πυρήνα ενός ατόμου είναι ίση με:

$$B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \sigma) \quad [11]$$

όπου  $\sigma$  είναι η σταθερά προάσπισης του ατόμου ή παράγοντας χημικής μετατόπισης και έχει τιμές της τάξης του  $10^{-6}$ . Κάθε πυρήνας σε ένα μόριο βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον και επομένως προστατεύεται σε διαφορετικό βαθμό, με αποτέλεσμα την ανίχνευση διαφορετικού σήματος για κάθε πυρήνα. Στο Σχήμα 2.9 παριστάνεται διαγραμματικά η επίδραση της ηλεκτρονικής προστασίας στις στάθμες ενέργειας των πυρήνων.





Σχήμα 2.9.: Στάθμες ενεργειακών επιπέδων πυρήνα με  $I=1/2$ : α) απουσία μαγνητικού πεδίου, β) "απομονωμένου" πυρήνα σε μαγνητικό πεδίο και γ) πυρήνα ενός ατόμου σε μαγνητικό πεδίο.

Στην περίπτωση σφαιρικής κατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας, όπως για παράδειγμα στο άτομο του υδρογόνου, η κίνηση φορτίου οδηγεί σε ένα καθαρά διαμαγνητικό αποτέλεσμα. Η σταθερά προστασίας,  $\sigma$ , μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο του Lamb με βάση την ηλεκτρονική πυκνότητα  $\rho(r)$  που περιβάλλει τον πυρήνα:

$$\sigma = \frac{\mu_0 e^2}{3m_e} \int_0^\infty r \rho(r) dr \quad [12]$$

όπου  $\mu_0$  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 ηλεκτρονική κατανομή γύρω από τον πυρήνα δεν είναι σφαιρική και η κυκλοποίηση των ηλεκτρονίων, λόγω της επίδρασης του μαγνητικού πεδίου  $B_0$ , είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Στην περίπτωση αυτή η κυκλοποίηση των ηλεκτρονίων γύρω από τους δεσμούς μειώνει το διαμαγνητικό αποτέλεσμα. 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 ίδιας με εκείνη του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (παραμαγνητικό αποτέλεσμα) (Hore, 1995).

Επισημαίνεται ότι στην πράξη η φασματοσκοπία NMR ασχολείται με τις μεταβολές της σταθεράς προστασίας μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους πυρήνα με διαφορετικό



ηλεκτρονιακό περιβάλλον. Η θέση συντονισμού ενός πυρήνα δίνεται από την εξίσωση [11] και, συνεπώς, εξαρτάται από την ένταση του πεδίου  $B_0$ . Για τη δημιουργία κλίμακας που είναι ανεξάρτητη από την ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου καθορίστηκε η παράμετρος  $\delta$  (ppm, parts per million), που ορίζεται ως η διαφορά της συχνότητας συντονισμού,  $\nu$  μεταξύ του υπό μελέτη πυρήνα και ενός πυρήνα που χρησιμοποιείται ως αναφορά ( $\nu_{ref}$ ):

$$\delta = 10^6 (\nu - \nu_{ref}) / \nu_{ref} \quad [13]$$

Η παράμετρος  $\delta$  (αδιάστατο μέγεθος) είναι ανεξάρτητη του μαγνητικού πεδίου και, συνεπώς η χημική μετατόπιση ενός ορισμένου πυρήνα είναι πάντα η ίδια, ανεξάρτητα από το μαγνητικό πεδίο που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

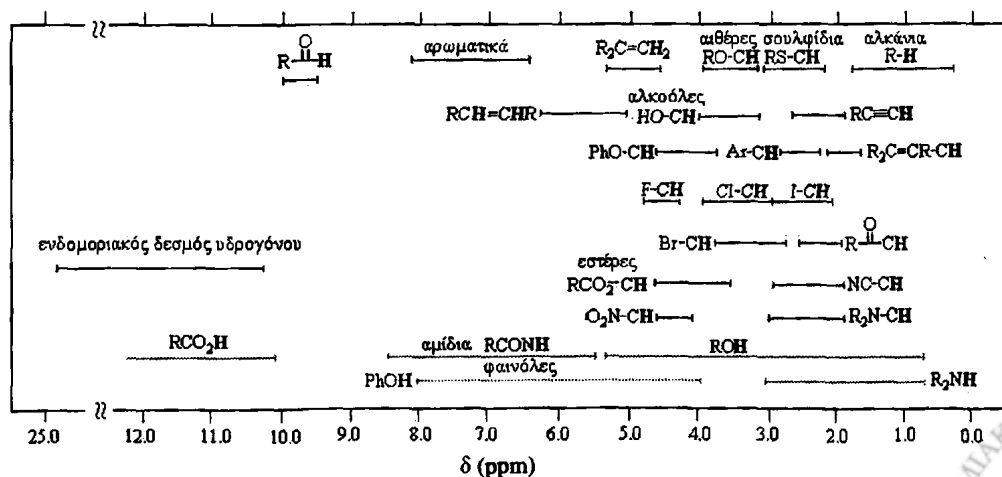
Στην πραγματικότητα η σταθερά  $\sigma$  είναι το άθροισμα της διαμαγνητικής και της παραμαγνητικής συνιστώσας που προκύπτουν από την κίνηση των ηλεκτρονίων.

$$\sigma = \sigma_d (\text{διαμαγνητική}) + \sigma_p (\text{παραμαγνητική}) \quad [14]$$

Σημειώνουμε πως ο όρος παραμαγνητικός 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, 1988):

*α) 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 (Gerothanassis and Kalodimos, 1996). Ο παράγοντας αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία στην κλίμακα χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου. Στο Σχήμα 2.10 παρουσιάζεται το εύρος των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου διαφόρων ενώσεων.



Σχήμα 2.10.: Εύρος των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου διαφόρων ενώσεων.



Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων  $^1\text{H}$  εκτείνεται σε μια περιοχή  $\sim 20$  ppm που μπορεί να χωριστεί σε μικρότερα τμήματα όπως αυτά των αλειφατικών πρωτονίων, των ολεφινικών, των ακετυλενικών, των πρωτονίων αρωματικού δακτυλίου 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 εξηγείται με βάση τη μαγνητική ανισοτροπία των χημικών δεσμών που αναλύεται στη συνέχεια. Υποκαταστάτες που είναι δέκτες ηλεκτρονίων (H-X) προκαλούν μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε μεγαλύτερες συχνότητες και, κατ'επέκταση στους δεσμούς H-Y, όπου Y δότης ηλεκτρονίων, το πρωτόνιο συντονίζεται σε μικρότερες τιμές συχνοτήτων. Τέλος, τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων των ομάδων -OH, -NH, -COOH χρίζουν ιδιαίτερης μελέτης, διότι εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του δείγματος, το διαλύτη και τη θερμοκρασία (Günther, 1995). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χημική μετατόπιση του υδροξυλικού πρωτονίου εξαιτίας της ικανότητας της ομάδας αυτής να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου, περίπτωση που αναλύεται στη συνέχεια.

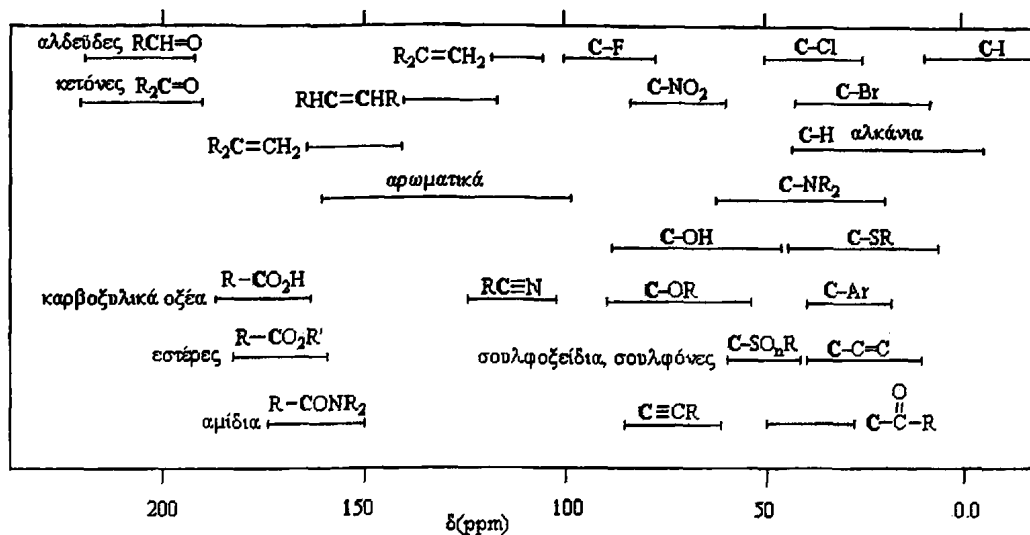
**β) Τοπική παραμαγνητική προστασία.** Η τοπική παραμαγνητική προστασία εξαρτάται από το αντίστροφο του κύβου της ακτίνας των τοπικών ηλεκτρονίων σθένους, δηλαδή τον όρο  $\langle 1/r^3 \rangle$ , τη μέση ενέργεια διέγερσης των ηλεκτρονίων  $\Delta E$ , και τους παράγοντες πυκνότητας φορτίου ( $Q_{AA}$ ) και κλάσματος δεσμού των τροχιακών p (ή d) ( $\sum Q_{AB}$ ) (εξίσωση [15]).

$$\sigma_p = e^2 h / 8\pi^2 m_e^2 c^2 \Delta E \langle 1/r^3 \rangle_{2p} [Q_{AA} + \sum_{A \neq B} Q_{AB}] \quad [15]$$

Συγκεκριμένα, μεγάλες τιμές του όρου  $\langle 1/r^3 \rangle$ , προκαλούν μεγάλες μεταβολές στην πυρηνική προστασία (Jameson and 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 προστασίας. Τέλος είναι εύκολο να αντιληφθεί κανείς ότι η συνεισφορά της παραμαγνητικής προστασίας στη χημική μετατόπιση είναι ανάλογη της πολλαπλότητας του δεσμού  $[Q_{AA} + \sum Q_{AB}]$ . Ο παράγοντας αυτός έχει καθοριστική σημασία στις χημικές μετατοπίσεις ετεροπυρήνων όπως του άνθρακα-13 (Σχήμα 2.11).





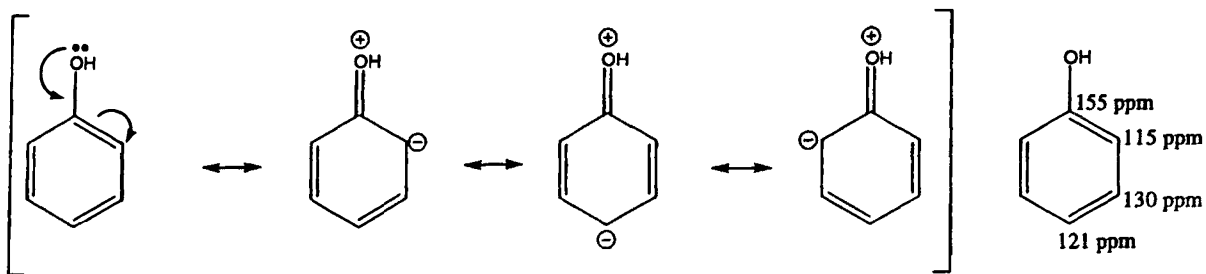


Σχήμα 2.11.: Εύρος των χημικών μετατοπίσεων άνθρακα -13 διαφόρων ενώσεων.

Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων  $^{13}\text{C}$  τυπικών οργανικών λειτουργικών ομάδων εκτείνεται σε μια περιοχή 250 ppm, δηλαδή τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του  $^1\text{H}$ . Γενικά, η συχνότητα συντονισμού  $^{13}\text{C}$  σε σχέση με τον υβριδισμό του άνθρακα μειώνεται κατά τη σειρά  $C_{sp^2} > C_{sp} > C_{sp^3}$ . Τη μεγαλύτερη χημική μετατόπιση παρουσιάζει, όπως αναμένεται, ο καρβονυλικός άνθρακας, κυρίως λόγω του παράγοντα  $\Delta E$  της εξίσωσης [15], δεδομένου ότι η μετάβαση  $n \rightarrow \pi^*$  συνοδεύεται από μικρότερη μεταβολή του  $\Delta E$  συγκριτικά με τις μεταβάσεις  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \rightarrow \pi^*$ ,  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \sigma^*$ . Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα η σημαντικότερη συνεισφορά στην παραμαγνητική προστασία του  $^{13}\text{C}$  είναι εκείνη του όρου  $\langle 1/r^3 \rangle_{2p_z}$ , που μπορεί να συνδυαστεί με την πυκνότητα φορτίου. Έτσι, αυξημένη πυκνότητα αρνητικού φορτίου συνεπάγεται αύξηση της ακτίνας των τοπικών ηλεκτρονίων σθένους (επέκταση του τροχιακού) και κατά συνέπεια μείωση του όρου  $\sigma_p$ . Αυξημένη πυκνότητα θετικού φορτίου οδηγεί στο αντίθετο φαινόμενο της συστολής του τροχιακού και της αύξησης της τιμής του  $\sigma_p$  (Günther, 1995).

Υποκαταστάτες που είναι δέκτες ηλεκτρονίων ( $X-C_\alpha-C_\beta-C_\gamma$ ) προκαλούν σημαντική αποπροστασία στον  $\alpha\text{-C}$  και σε μικρότερο βαθμό στον  $\beta\text{-C}$ . Σημαντική είναι και η επίδραση του φαινομένου της μεσομέρειας στη χημική μετατόπιση του  $^{13}\text{C}$  στα υποκατεστημένα αρωματικά συστήματα. Για παράδειγμα, όταν ο υποκαταστάτης διαθέτει ασύζευκτο ζεύγος  $e^-$  (πχ.  $-\text{OH}$ ) προκαλείται αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στις θέσεις  $o\text{-}$  και  $\pi\text{-}$  και επομένως προστασία των  $^{13}\text{C}$ . Αυτό εξηγείται από τις ακόλουθες δομές συντονισμού:





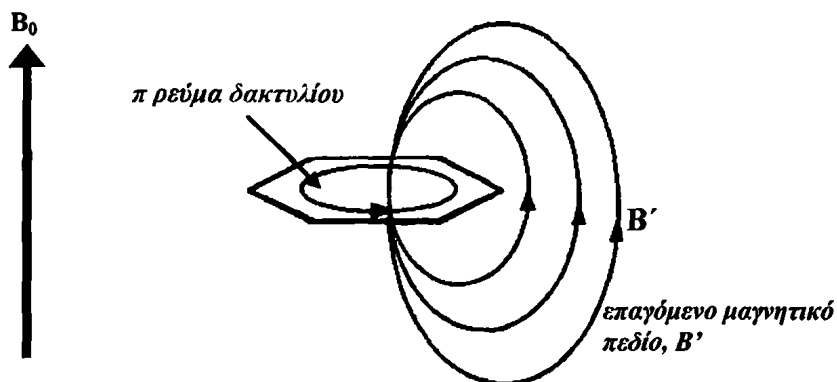
Έτσι εξηγείται η χημική μετατόπιση των ανθράκων του αρωματικού δακτυλίου των φαινολών σε σχέση με εκείνη του βενζολίου (128 ppm). Σημειώνεται ότι η χημική μετατόπιση  $^{13}\text{C}$  στην  $\mu$ - θέση παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη (Breitmaier and Voelter, 1989). Αντίθετα, όταν ο υποκαταστάτης του αρωματικού συστήματος είναι δέκτης  $e^-$  προκαλείται μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στις θέσεις  $o$ - και  $\pi$ - και επομένως αποπροστασία των  $^{13}\text{C}$  στις θέσεις αυτές. Επισημαίνεται ότι η μεσομέρεια επηρεάζει με ανάλογο τρόπο και τη χημική μετατόπιση  $^1\text{H}$  στα αρωματικά συστήματα.

Σύγκριση των ευρών των χημικών μετατοπίσεων των καρβοξυλικών οξέων με εκείνο των εστέρων και των αμιδίων, αποκαλύπτει ότι η αποπροστασία του καρβονυλικού  $^{13}\text{C}$  είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση των οξέων. Αυτό οφείλεται στη μείωση ή την έλλειψη των δεσμών υδρογόνου στους εστέρες και τα αμίδια, και εξαρτάται από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, η αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας προκαλεί αποπροστασία του σήματος συντονισμού του  $^{13}\text{C}$  μέσω της δημιουργίας ηλεκτρικών πεδίων, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά παρακάτω:



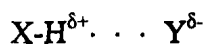
γ) Προστασία οφειλόμενη σε γειτονικά ηλεκτρονιακά ρεύματα. Ο τρίτος παράγοντας της σταθεράς προστασίας, που έχει ιδιαίτερη σημασία σε πυρήνες  $^1\text{H}$ , περιλαμβάνει την επίδραση των ηλεκτρονίων που περιστρέφονται γύρω από γειτονικούς πολλαπλούς δεσμούς. Τα ηλεκτρόνια δηλαδή των γειτονικών δεσμών με την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου δημιουργούν επαγόμενα μαγνητικά πεδία τα οποία έχουν ανισότροπη κατανομή σε σχέση με τον άξονα δεσμού και συνεπώς είναι κατά περιοχές διαμαγνητικά ή παραμαγνητικά (μαγνητική ανισοτροπία των χημικών δεσμών). Ενδεικτικά αναφέρεται η σημαντική μαγνητική ανισοτροπία που παρουσιάζει το μόριο του βενζολίου και γενικότερα ενώσεων φαινολικού τύπου, όπως οι ενώσεις που μελετώνται στη παρούσα διατριβή. Σύμφωνα με τον παράγοντα αυτό με την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $\mathbf{B}_0$ , δημιουργείται από την κίνηση των  $\pi$  ηλεκτρονίων το λεγόμενο « $\pi$  ρεύμα δακτυλίου» (Σχήμα 2.12). Η

κατεύθυνση του ρεύματος αυτού είναι τέτοια ώστε το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο  $B'$  να έχει φορά παράλληλη προς το  $B_0$ . Συνεπώς, τα πρωτόνια του δακτυλίου αντιλαμβάνονται την ύπαρξη του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $B_0$  ενισχυμένη από το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο  $B'$ , με αποτέλεσμα την αποπροστασία τους, δηλαδή το συντονισμό τους σε μεγαλύτερες συχνότητες (Harris, 1983).

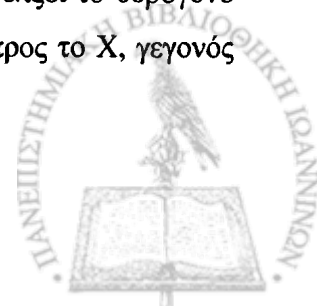


**Σχήμα 2.12.: π-ρεύμα δακτυλίου και δυναμικές γραμμές του επαγόμενου μαγνητικού πεδίου στο μόριο του βενζολίου και γενικότερα σε ενώσεις φαινολικού τύπου (Harris, 1983).**

δ) Επίδραση διαλύτη και δεσμών υδρογόνου. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερά προστασίας, περιλαμβάνει επιδράσεις του διαλύτη, φαινόμενα ηλεκτρικού πεδίου, δεσμούς υδρογόνου, κ.τ.λ. 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 προστασίας του πυρήνα του πρωτονίου. Ας θεωρήσουμε για παράδειγμα το δεσμό  $O-H \cdots O$ , στον οποίο το πρωτόνιο βρίσκεται ανάμεσα στο ηλεκτρονιακό νέφος των δύο ατόμων οξυγόνου, αφού η απόσταση  $O, O$  είναι συνήθως μικρότερη από το άθροισμα των ακτίων van der Waals των ατόμων οξυγόνου. Θα μπορούσε, συνεπώς, να υποθεθεί ότι επέρχεται αύξηση στην ηλεκτρονική πυκνότητα του πυρήνα του υδρογόνου που αναμένεται να προκαλέσει αύξηση του διαμαγνητικού όρου της σταθεράς προστασίας (Εξίσωση [14]). 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  $Y$ :

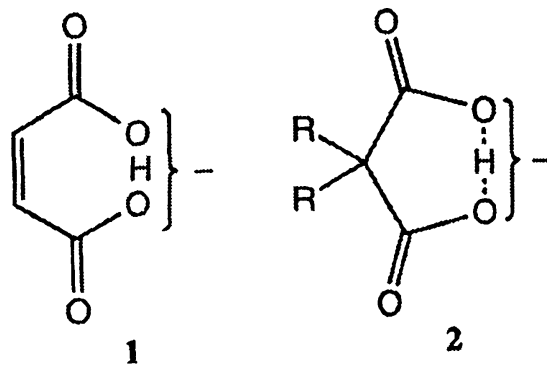


Θεωρείται ότι το ηλεκτροστατικό πεδίο του δεσμού υδρογόνου τείνει να έλξει το υδρογόνο προς το  $Y$  και να απομακρύνει τα δεσμικά ηλεκτρόνια του δεσμού  $X-H$  προς το  $X$ , γεγονός



που συνεπάγεται τη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του υδρογόνου και επομένως την αποπροστασία του (Bovey, 1988).

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 στη στερεά φάση καθώς και σε κατάσταση διαλύματος σε μη πρωτικούς διαλύτες με τη φασματοσκοπία NMR. Ενδεικτικά αναφέρεται η περίπτωση του μηλεϊνικού και του διμεθυλομηλονικού ανιόντος στα οποία το πρωτόνιο που συμμετέχει στον ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζεται στα 20 και 19 ppm, αντίστοιχα (Σχήμα 2.13) (Frey *et al.*, 1994, Perrin and Nielson, 1997). Η ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση φλαβονοειδών ενώσεων, όπως θα αναλυθεί διεξοδικά στο Κεφάλαιο 5.

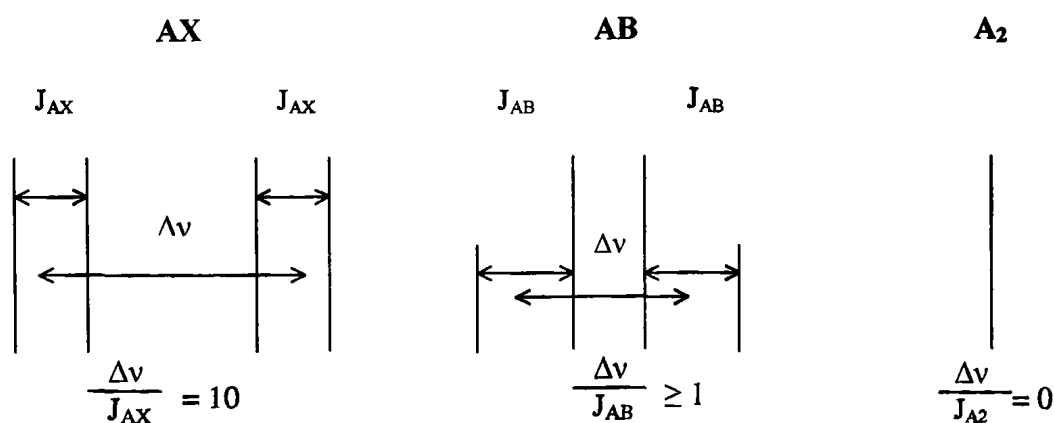


Σχήμα 2.13.: Ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου του μηλεϊνικού (1) και του διμεθυλομηλονικού ανιόντος (2). Τα πρωτόνια που συμμετέχουν στον ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζονται στα 20 και 19 ppm, αντίστοιχα.

## 2.4. Σύζευξη Spin – Spin

Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών με ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα των σημάτων συντονισμού (λεπτή υφή του φάσματος) καλείται spin – spin σύζευξη (spin – spin coupling) και 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. Συνεπώς, ο πυρήνας υφίσταται μια ποικιλία πεδίων με αποτέλεσμα την πολλαπλότητα ενός σήματος συντονισμού (Αλεξάνδρου, 1992).

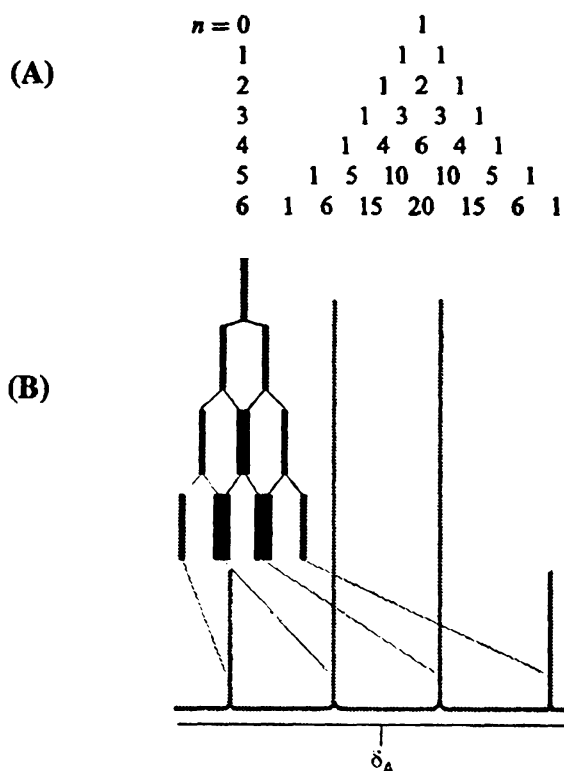
Ο τύπος του φάσματος είναι συνάρτηση της διαφοράς της συχνότητας συντονισμού,  $\Delta\nu$ , μεταξύ των δύο πυρήνων που συζεύγγονται και του μεγέθους της σταθεράς  $J$ . Οι πυρήνες που διαφέρουν σημαντικά στη χημική μετατόπιση σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης,  $J$ , συμβολίζονται με ακραία γράμματα του λατινικού αλφαβήτου AMX ή AX ( $\Delta\nu \gg J$ ). Οι πυρήνες που δε διαφέρουν σημαντικά στη χημική μετατόπιση σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης,  $J$ , συμβολίζονται με γειτονικά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου ABC ή AC ( $\Delta\nu \geq J$ ). Τα φάσματα του τύπου AX χαρακτηρίζονται από συμμετρία, σε σχέση με τις εντάσεις των πολλαπλών κορυφών, σε αντίθεση με τα φάσματα τύπου AB που είναι περισσότερο πολύπλοκα. Στο Σχήμα 2.14 απεικονίζονται οι δύο τύποι φασμάτων που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων.



Σχήμα 2.14.: Τύποι φασμάτων NMR που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων (Αλεξάνδρου, 1992).



Στα φάσματα του τύπου AX η πολλαπλότητα και οι επιμέρους εντάσεις των κορυφών απορρόφησης μπορούν να προβλεφθούν από το τρίγωνο του Pascal (Σχήμα 2.15 A). Συνεπώς, σε ένα σύστημα AX<sub>3</sub>, η κορυφή απορρόφησης του πυρήνα A αποτελείται από μια τετραπλή κορυφή με σχετική ένταση των επιμέρους κορυφών 1:3:3:1 (Σχήμα 2.15 B) (Atkins, 1998).



Σχήμα 2.15. (A) Το τρίγωνο του Pascal, με τη χρήση του οποίου η πολλαπλότητα και οι επιμέρους εντάσεις των κορυφών απορρόφησης μπορούν να προβλεφθούν (όπου  $n$  το πλήθος των πυρήνων που προκαλούν τη σχάση). (B) Η προέλευση της τετραπλής κορυφής του πυρήνα A σε ένα σύστημα πυρήνων AX<sub>3</sub> (Atkins, 1998).

Η σταθερά σύζευξης ( $J$  coupling) είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου  $B_0$  και 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  $J$  ποικίλει και ελαττώνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των δεσμών που παρεμβαίνουν μεταξύ των υπό σύζευξη πυρήνων. Σε ότι αφορά στην τιμή της σταθεράς σύζευξης που παρατηρείται μεταξύ πρωτονίων που απέχουν μεταξύ τους τρεις δεσμούς ( $^3J_{HH}$ ), αυτή εξαρτάται από τη διαμόρφωση και ειδικότερα από τη διεδρη γωνία ( $\varphi$ ), που σχηματίζουν τα υπό σύζευξη πρωτόνια σύμφωνα με την εξίσωση Karplus (Εξίσωση [16]) (Σχήμα 2.16).

$$J = A + B\cos\varphi + C\cos 2\varphi$$

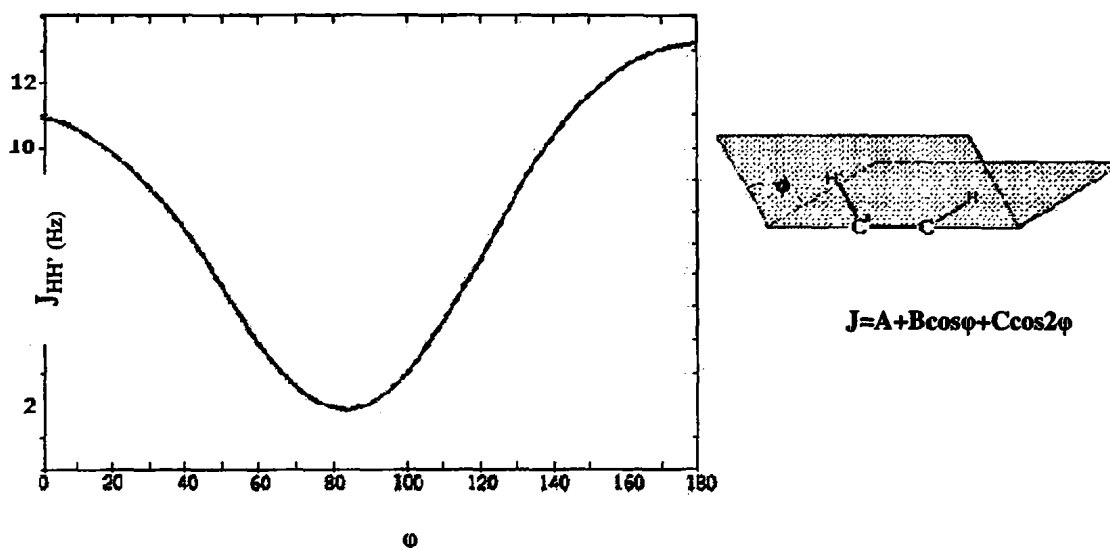
[16]



όπου A, B και C είναι σταθερές με τιμές περίπου + 7 Hz, - 1 Hz, + 5 Hz αντίστοιχα. Συνεπώς, η τιμή της  ${}^3J_{\text{HH}}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της διαμόρφωσης ενός μορίου. Πειραματικά δεδομένα για μια σειρά ενώσεων οδήγησαν στις εξισώσεις [17] και [18] που συνδέουν την  ${}^3J_{\text{HH}}$  με τη diedρη γωνία  $\varphi$ :

$${}^3J_{\text{HH}} = 8.5\cos^2\varphi - 0.28 \text{ (Hz)} \quad 0^\circ \leq \varphi \leq 90^\circ \quad [17]$$

$${}^3J_{\text{HH}} = 9.5\cos^2\varphi - 0.28 \text{ (Hz)} \quad 90^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ \quad [18]$$

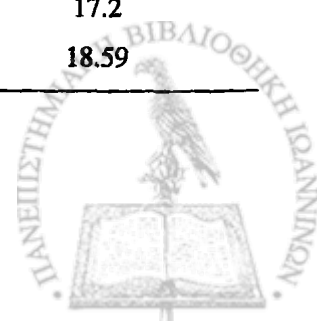


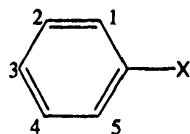
Σχήμα 2.16.: Εξάρτηση της  ${}^3J_{\text{HH}}$  από τη diedρη γωνία  $\varphi$ , σύμφωνα με την εξίσωση Karplus (Gerothanassis et al., 2002).

Από τις εξισώσεις [17] και [18] προκύπτει ότι για  $\varphi=90^\circ$  η  ${}^3J_{\text{HH}}=-0.28$ , ενώ για  $\varphi=0^\circ$  και  $\varphi=180^\circ$  προκύπτουν αντίστοιχα οι τιμές  ${}^3J_{\text{HH}}=8.2$  και  ${}^3J_{\text{HH}}=9.2$  Hz. Οι παραπάνω εξισώσεις μπορούν να εφαρμοστούν και στα αιθυλικά 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 2.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται τιμές της σταθεράς σύζευξης των πρωτονίων επιλεγμένων ενώσεων που βρέθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία (Günther, 1995).

Πίνακας 2.1.: Τιμές της σταθεράς σύζευξης των πρωτονίων επιλεγμένων αιθυλικών και αρωματικών ενώσεων (Günther, 1995).

	X	$J_{\text{cis}}$ (Hz)	$J_{\text{trans}}$ (Hz)
	COOH	10.2	17.2
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	11.48	18.59

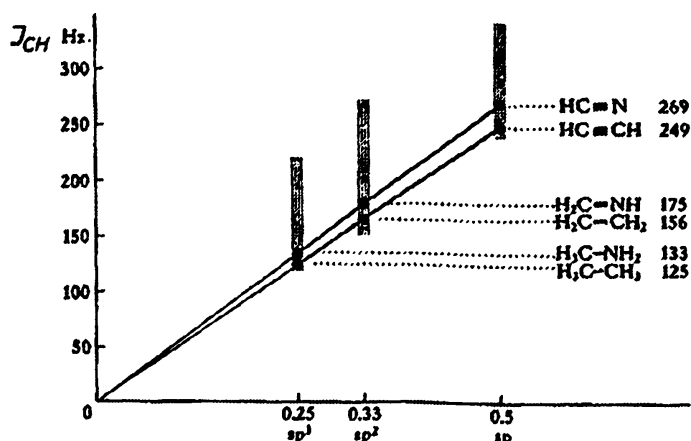




X	$J_{(1,2)}$ (Hz)	$J_{(1,3)}$ (Hz)	$J_{(1,4)}$ (Hz)	$J_{(1,5)}$ (Hz)	$J_{(2,3)}$ (Hz)	$J_{(2,4)}$ (Hz)
H	7.54	1.37	0.66	1.37	7.54	1.37
COOH	7.86	1.35	0.63	1.79	7.49	1.31
OH	8.17	1.09	0.49	2.71	7.40	1.74
OCH <sub>3</sub>	8.30	1.03	0.44	2.94	7.36	1.76

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1 η σύζευξη πρωτονίου-πρωτονίου έχει μη μηδενική τιμή ακόμη και όταν παρεμβαίνουν τέσσερις ( $^4J$ ) δεσμοί σε ορισμένα συστήματα. Η πληροφορία της σύζευξης μπορεί να μεταφερθεί διαμέσου τεσσάρων ή πέντε δεσμών στα αρωματικά συστήματα όπου τα  $\pi$  ηλεκτρόνια παίζουν σαφώς σημαντικό ρόλο. Συζεύξεις μακράς αλυσίδας γίνονται εμφανείς όταν μεταφέρονται μέσω σειράς πολλαπλών δεσμών (πχ. αλλυλικά συστήματα) (Bovey, 1988).

Σε ότι αφορά στη σύζευξη μεταξύ πυρήνων πρωτονίου και άνθρακα-13, η μεγαλύτερη τιμή  $J$  παρατηρείται μεταξύ  $^1J_{CH}$  (120 – 320 Hz). Οι τιμές  $^2J_{CH}$  (0 – 10 Hz) είναι σημαντικά μικρότερες. Η τιμή  $^3J_{CH}$  παρουσιάζει παρεμφερή εξάρτηση από τη διεδρη γωνία  $\phi$  που αναφέρθηκε στην περίπτωση της  $^3J_{HH}$  (Σχήμα 2.16). Όταν η πληροφορία της σύζευξης μεταδίδεται μέσω σειράς  $\sigma$  δεσμών μειώνεται τουλάχιστον κατά μια τάξη μεγέθους για κάθε ενδιάμεσο δεσμό. Τα δομικά χαρακτηριστικά που αυξάνουν την τιμή της  $^nJ_{CH}$  είναι κυρίως το ποσοστό του  $s$  χαρακτήρα στο υβριδισμένο τροχιακό του άνθρακα του δεσμού C-H και η παρουσία ομάδων που απομακρύνουν  $e^-$  από τον υπό μελέτη άνθρακα. Στο Σχήμα 2.17 παρουσιάζεται η εξάρτηση της τιμής  $J_{CH}$  από το ποσοστό του  $s$  χαρακτήρα στο υβριδισμένο τροχιακό του άνθρακα στο δεσμό C-H.



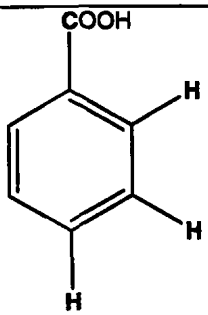
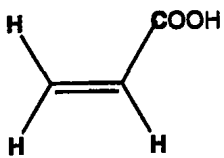
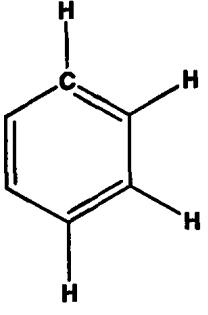
Σχήμα 2.17.: Εξάρτηση της  $J_{CH}$  από το ποσοστό του  $s$  χαρακτήρα στο υβριδισμένο τροχιακό του άνθρακα στο δεσμό C-H (Breitmaier and Voelter, 1989).





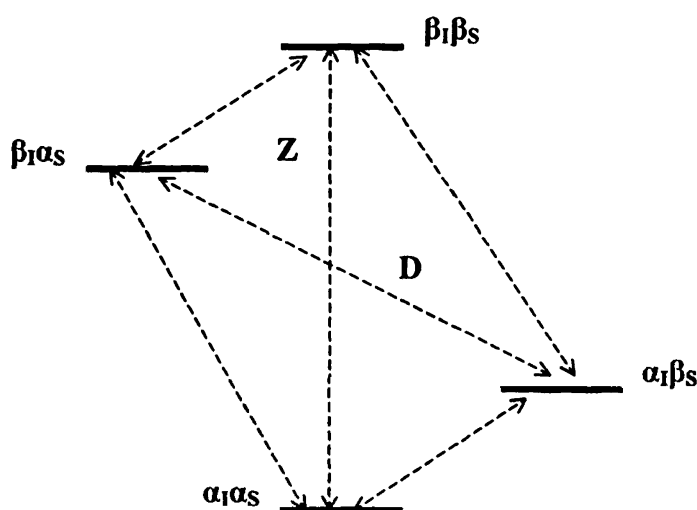
Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται τιμές της σταθεράς σύζευξης  ${}^nJ_{\text{CH}}$  επιλεγμένων ενώσεων που βρέθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία (Breitmaier and Voelter, 1989).

Πίνακας 2.2. Τιμές της σταθεράς σύζευξης  ${}^nJ_{\text{CH}}$  επιλεγμένων ενώσεων (Breitmaier and Voelter, 1989).

	$J_{\text{CH}}$ (Hz)
	${}^3J_{\text{CH}}=4.1$ ${}^4J_{\text{CH}}=1.1$ ${}^5J_{\text{CH}}=0.5$
	${}^2J_{\text{CH}}=4.1$ ${}^3J_{\text{CHcis}}=7.6$ ${}^3J_{\text{CHtrans}}=14.1$
	$J_{\text{CH}}=158-165$ ${}^2J_{\text{CH}}=0-5$ ${}^3J_{\text{CH}}=6-11$ ${}^4J_{\text{CH}}=0.5-2$

### 2.5. Το φαινόμενο NOE

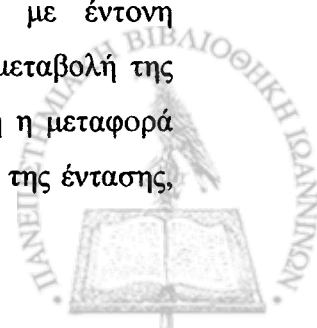
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μια από τις βασικές προϋποθέσεις για την παρατήρηση του σήματος συντονισμού ενός πυρήνα είναι η δυνατότητα επαναφοράς του από τη διεγερμένη στη βασική κατάσταση (αποδιέγερση) και ο πιο σημαντικός μηχανισμός για την αποδιέγερση spin – πλέγματος είναι η αλληλεπίδραση διπόλου – διπόλου. Το φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE) παρέχει πληροφορίες για την αλληλεπίδραση διπόλου – διπόλου. Έστω δύο πυρήνες I και S, που βρίσκονται αρκετά κοντά μέσω χώρου ο ένας με τον άλλο, ώστε να αλληλεπιδρούν. Η παρουσία του δεύτερου πυρήνα εισάγει δύο ακόμη ενεργειακές στάθμες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.18.



Σχήμα 2.18.: Ενεργειακό διάγραμμα των πιθανών μεταπτώσεων των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων I και S ( $\alpha$  = βασική κατάσταση,  $\beta$  = διεγερμένη κατάσταση). Οι πιθανές μεταπτώσεις των δύο πυρήνων παριστάνονται με τα βέλη.

Παρατηρείται ότι υπάρχουν μεταπτώσεις που συνοδεύονται από μεταβολή του μαγνητικού κβαντικού αριθμού και των δύο πυρήνων. Αυτές είναι οι μεταπτώσεις  $\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\beta$  and  $\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$ , που συνοδεύονται από μεταβολή του μαγνητικού κβαντικού αριθμού κατά  $\Delta m = \pm 2$  (μετάβαση διπλού κβάντου, D) και  $\Delta m = 0$  (μετάβαση μηδενικού κβάντου, Z) αντίστοιχα. Οι μεταπτώσεις D και Z είναι απαγορευμένες, αλλά είναι θεμελιώδεις για το φαινόμενο NOE γιατί σε αυτές ακριβώς οφείλεται η ύπαρξή του. Αν και είναι απαγορευμένες, λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της αποδιέγερσης.

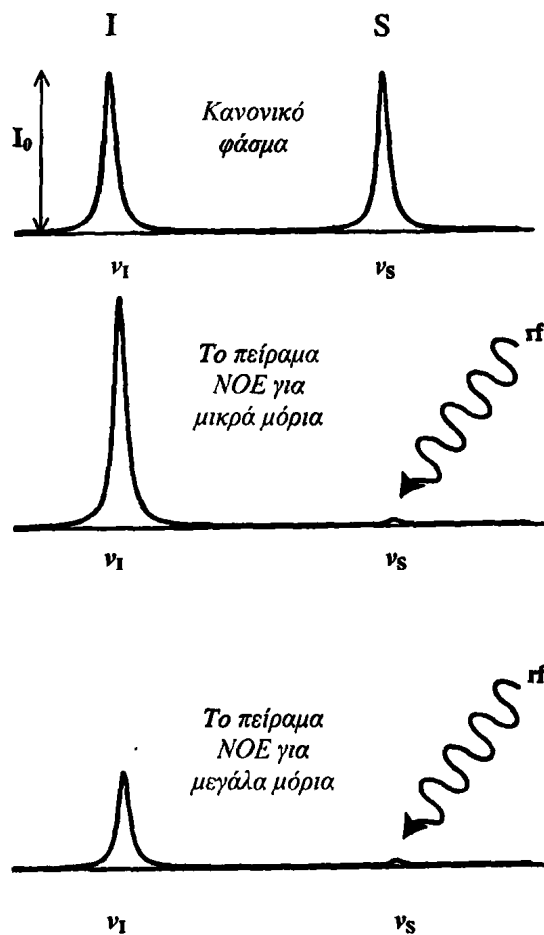
Έτσι, όταν μεταξύ δύο γειτονικών πυρήνων ο ένας διεγερθεί με έντονη ραδιοσυχνότητα ώστε να βρεθεί σε κατάσταση κορεσμού, τότε προκαλείται μεταβολή της έντασης του σήματος συντονισμού του δεύτερου πυρήνα (Σχήμα 2.19). Αυτή η μεταφορά ενέργειας από τον έναν πυρήνα στον άλλο, που εκδηλώνεται με την μεταβολή της έντασης,



$f_I\{S\}$ , του σήματος συντονισμού του πυρήνα I, όταν ο πυρήνας S διεγερθεί με έντονη ραδιοσυχνότητα, καλείται φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE) και δίνεται από τη σχέση [19]:

$$f_I\{S\} = \frac{\gamma_S \sigma_{IS}}{\gamma_I \rho_I} \quad [19]$$

όπου  $\sigma_{IS}$  είναι η ταχύτητα αποκατάστασης οφειλόμενη στην αλληλεπίδραση των πυρήνων I και S και  $\rho_I$  η ταχύτητα αποκατάστασης του πυρήνα I.

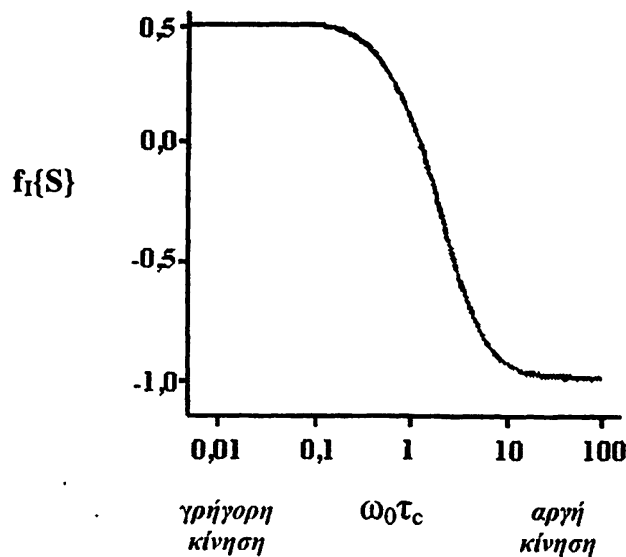


Σχήμα 2.19.: Το πείραμα NOE (Gerothanassis et al., 2002)

Επισημαίνεται ότι η ενίσχυση του σήματος επιτυγχάνεται με την αποδιέγερση διπόλου – διπόλου που λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω του χώρου. Η ενίσχυση αυτή είναι συνάρτηση της απόστασης των πυρήνων στο χώρο ( $\propto 1/r^6$ ) και, συνεπώς οι γειτονικοί πυρήνες προς εκείνον που ακτινοβολείται θα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενίσχυση του σήματος συντονισμού. Η παρατήρηση, συνεπώς, του φαινομένου NOE αποτελεί ένδειξη για την απόσταση δύο πυρήνων μεταξύ τους. Αν η απόσταση μεταξύ τους είναι μικρότερη των 5 Å τότε κατά τη διεγερση του ενός πυρήνα με έντονη ραδιοσυχνότητα ώστε να βρεθεί σε κατάσταση κορεσμού, μεταβάλλεται η ένταση του σήματος συντονισμού του άλλου πυρήνα.

Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η συλλογή δομικών πληροφοριών των μορίων, αφού η απόσταση των πυρήνων στο χώρο μπορεί να μελετηθεί σε κατάσταση διαλύματος (Neuhaus and Williamson, 2000, Roberts, 2000).

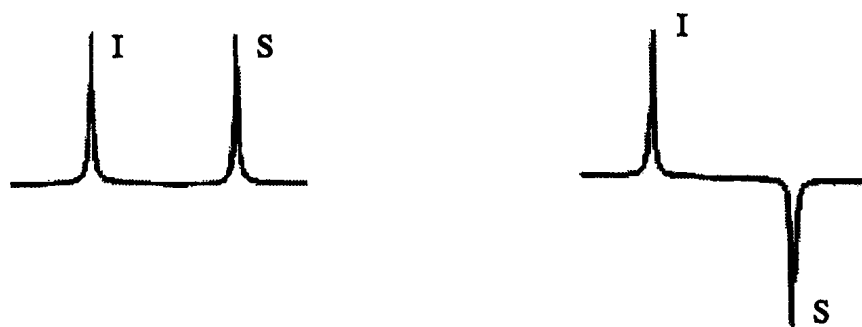
Επιπλέον, η μεταβολή της έντασης του σήματος  $f_I\{S\}$  εξαρτάται και από το γινόμενο  $\omega_0\tau_c$ , όπου,  $\omega_0$  είναι η συχνότητα περιστροφής Larmor του πυρήνα και  $\tau_c$  ο χρόνος συσχέτισης των πυρήνων που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου (δηλαδή ο χρόνος κατά τον οποίο μεταβάλλεται ο προσανατολισμός τους). Πρακτικά, η τιμή του όρου  $f_I\{S\}$  είναι θετική όταν η κίνηση του μορίου είναι γρήγορη και αρνητική όταν είναι αργή (Hore, 1995) (Σχήμα 2.20).



Σχήμα 2.20.: Εξάρτηση της έντασης του σήματος  $f_I\{S\}$  από το γινόμενο  $\omega_0\tau_c$ . Σημειώνεται πως ο οριζόντιος άξονας είναι λογαριθμικός (Hore, 1995).

Τα πειράματα NOE διακρίνονται σε δύο τύπους. Ο πρώτος είναι αυτός που περιγράφεται στο Σχήμα 2.19 και αφορά στην εκλεκτική *συνεχή* ακτινοβολήση ενός πυρήνα και την αλληλεπίδραση των πυρήνων I και S κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης (steady-state NOE). Σύμφωνα με το δεύτερο τύπο, αρχικά το σύστημα διαταράσσεται, για παράδειγμα με την εφαρμογή ενός παλμού (ή κατάλληλης σειράς παλμών) που εκλεκτικά μεταφέρει τη μαγνήτιση του ενός πυρήνα S στον άξονα  $-z$  και στη συνέχεια λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση των πυρηνικών spin I και S απουσία παλμού ραδιοσυχνότητας, και το σήμα καταγράφεται μετά την εφαρμογή του παλμού ανίχνευσης (transient NOE) (Neuhaus and Williamson, 2000) (Σχήμα 2.21).





**Σχήμα 2.21.:** Τύπος πειράματος NOE κατά τον οποίο με την εφαρμογή ενός παλμού (ή κατάλληλης σειράς παλμών), η μαγνήτιση του ενός πυρήνα *S* μεταφέρεται στον άξονα  $-z$  και στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας από τον πυρήνα *S* στον *I* χωρίς την επίδραση παλμού (*transient NOE*).

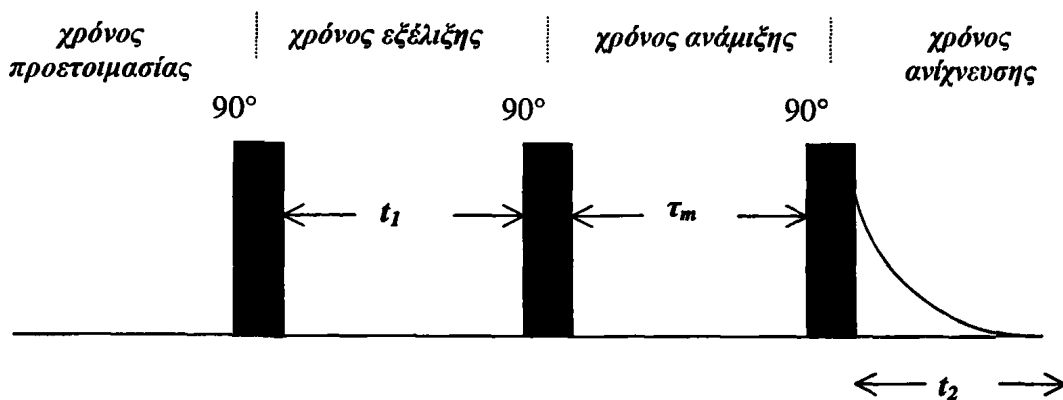
Σε αυτόν τον τύπο πειραμάτων βασίζεται η δισδιάστατη φασματοσκοπία NOESY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  με την οποία θα ασχοληθούμε στη συνέχεια.

## 2.6. Δισδιάστατη Φασματοσκοπία NMR

Στα πειράματα NMR μιας διάστασης, η καταγραφή του φάσματος του χρόνου (FID) λαμβάνει χώρα αμέσως μετά την εφαρμογή του παλμού. Αν το ηλεκτρικό σήμα δεν καταγραφεί αμέσως μετά τον παλμό αλλά μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα ( $t_1$ ), είναι εφικτή η αλληλεπίδραση των πυρήνων μεταξύ τους κατά τη διάρκεια αυτού του χρόνου με ποικίλους τρόπους, που καθορίζονται από τις παλμικές ακολουθίες που εφαρμόζονται. Στη δισδιάστατη φασματοσκοπία συλλέγονται δεδομένα σε σειρές χρόνων  $t_1$  και  $t_2$  κατά την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικών παλμών. Ο χρόνος  $t_2$  είναι ο καθορισμένος χρόνος συλλογής δεδομένων (FID), ενώ ο  $t_1$ , που καλείται χρόνος εξέλιξης (evolution time), είναι μεταβαλλόμενος και παριστάνει το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο παλμών στο οποίο γίνεται η αλληλεπίδραση των διαφόρων μαγνητικών πυρήνων μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα είναι η συλλογή ποικιλίας σημάτων FID, που αντιστοιχούν σε μεταβαλλόμενους χρόνους  $t_1$ . Η διαφορά μεταξύ των πειραμάτων NMR μιας και δύο διαστάσεων είναι ουσιαστικά η εισαγωγή της δεύτερης παραμέτρου του χρόνου δηλαδή του χρόνου εξέλιξης  $t_1$  και η εφαρμογή δύο ή περισσότερων παλμών αντί του ενός (ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική). Τα φάσματα που συλλέγονται εξαρτώνται από δύο μεταβλητές χρόνου ( $t_1$ ,  $t_2$ ). Απαιτούνται επομένως δύο μετασχηματισμοί Fourier ως προς το χρόνο  $t_2$  και στη συνέχεια ως προς το χρόνο  $t_1$ , για την μετατροπή του φάσματος χρόνου σε φάσμα συχνοτήτων οπότε προκύπτει ένα δισδιάστατο φάσμα σε δύο άξονες συχνοτήτων ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ).

Στο Σχήμα 2.22 απεικονίζεται η πορεία λήψης ενός δισδιάστατου φάσματος NMR. Ο άξονας του χρόνου της παλμικής ακολουθίας μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα μέρη: α) στο χρόνο προετοιμασίας, κατά τον οποίο οι μαγνητικοί πυρήνες φτάνουν στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας, β) στο χρόνο εξέλιξης,  $t_1$ , όπου οι μαγνητικοί πυρήνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, γ) στο χρόνο ανάμιξης,  $\tau_m$ , όπου λαμβάνει χώρα ανακατανομή της μαγνήτισης των spin και δ) στο χρόνο ανίχνευσης,  $t_2$ , κατά τη διάρκεια του οποίου γίνεται η καταγραφή του φάσματος του χρόνου (FID).

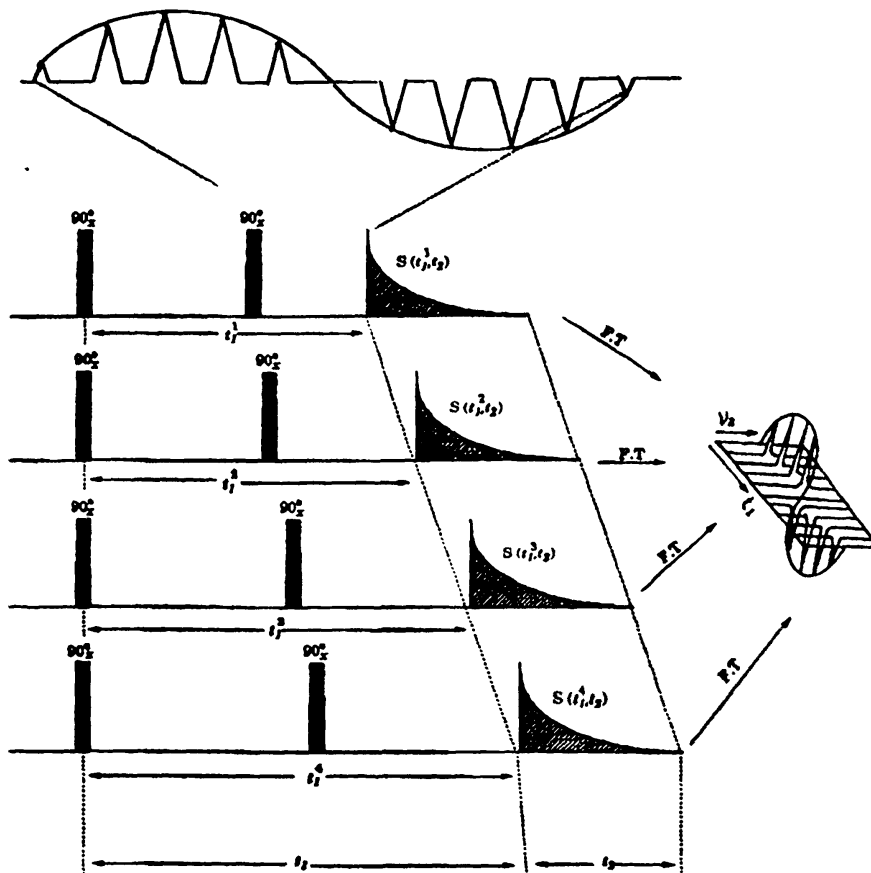




**Σχήμα 2.22:** Παράσταση της χρονικής πορείας ενός δισδιάστατου φάσματος NMR. Ο χρόνος μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα μέρη: α) στο χρόνο προετοιμασίας, κατά τον οποίο οι μαγνητικοί πυρήνες φτάνουν στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας, β) στο χρόνο εξέλιξης,  $t_1$ , όπου οι μαγνητικοί πυρήνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, γ) στο χρόνο ανάμιξης,  $t_m$ , όπου λαμβάνει χώρα ανακατανομή της μαγνήτισης των spin και δ) στο χρόνο ανίχνευσης,  $t_2$ , κατά τη διάρκεια του οποίου γίνεται η καταγραφή του φάσματος (FID).

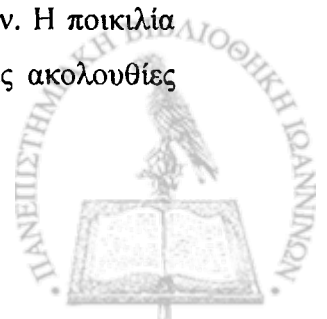
Πιο αναλυτικά το χρονικό διάστημα  $t_1$ , μετά την εφαρμογή του πρώτου παλμού, αυξάνεται συστηματικά και προκύπτουν διαφορετικές FID για κάθε χρονικό διάστημα  $t_1$ . Η δεύτερη μεταβλητή του χρόνου,  $t_2$ , που παριστάνει το χρόνο συλλογής δεδομένων δε μεταβάλλεται. Η πρώτη σειρά μετασχηματισμών Fourier εφαρμόζεται σε κάθε μία από τις FID που συλλέχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους  $t_1$  (σειρές). Όταν τα φάσματα συχνοτήτων που προέκυψαν τοποθετηθούν σε χρονική σειρά, η εικόνα που προκύπτει είναι μια σειρά φασμάτων συχνοτήτων που εξαρτώνται από το χρόνο και προσομοιάζουν μια νέα «FID» (Σχήμα 2.23). Είναι επομένως απαραίτητο να εφαρμοστεί ένας δεύτερος μετασχηματισμός Fourier που θα μετατρέψει την «FID», σε φάσμα συχνοτήτων με αποτέλεσμα τη δημιουργία της δεύτερης διάστασης (στήλες) (Rahman and Choudhary, 1996).





Σχήμα 2.23.: Ο μηχανισμός της δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR (Rahman and Choudhary, 1996).

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR είναι η εύρεση του τρόπου σύνδεσης (connectivity) μεταξύ των μαγνητικών πυρήνων. Ανάλογα με την αλληλουχία των παλμών και τους χρόνους εξέλιξης και ανάμιξης των μαγνητικών πυρήνων που έχουν επιλεγεί, είναι δυνατή η συλλογή ενός πλήθους πληροφοριών για τους τρόπους σύζευξης των πυρήνων μεταξύ τους. Κατά τη διάρκεια του χρόνου εξέλιξης,  $t_1$ , (Σχήμα 2.22) αναπτύσσονται οι συνιστώσες της μαγνήτισης στους άξονες  $x$ ,  $y$ , ως αποτέλεσμα όλων των δυνατών μαγνητικών αλληλεπιδράσεων των πυρήνων. Ως περιβάλλον του πυρήνα ορίζεται κάθε δυνατή αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα όταν τοποθετηθεί το δείγμα στο μαγνήτη. Επισημαίνεται ότι υπάρχει η δυνατότητα αυστηρού καθορισμού και επιλογής αυτού του περιβάλλοντος μέσω της εφαρμογής παλμικών ακολουθιών. Η ποικιλία των πειραμάτων πολυδιάστατου NMR οφείλεται στον τρόπο που οι παλμικές ακολουθίες





διαμορφώνουν το περιβάλλον του πυρήνα κατά τη διάρκεια του χρόνου προετοιμασίας, ανάμιξης και κυρίως του χρόνου εξέλιξης.

Η δισδιάστατη φασματοσκοπία NMR μπορεί να διακριθεί στις παρακάτω κύριες κατηγορίες ανάλογα με το περιβάλλον που επιλέγεται για τους υπό μελέτη πυρήνες μέσω των παλμικών ακολουθιών (Croasmun and Carlson, 1994):

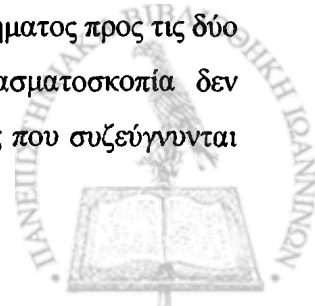
α) Φασματοσκοπία ανάλυσης-J (J-resolved spectroscopy) στην οποία οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται στη μία διάσταση ( $F_2$ ) ενώ στη δεύτερη διάσταση ( $F_1$ ) απεικονίζονται οι συζεύξεις των πυρήνων μέσω δεσμών. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός αλληλεπικαλυπτόμενων πολλαπλών κορυφών.

β) Φασματοσκοπία συσχέτισης η οποία αποκαλύπτει τους πυρήνες που βρίσκονται σε σύζευξη μέσω δεσμών (Correlated spectroscopy-COSY, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence-HMQC, Heteronuclear Multiple Bond Coherence-HMBC), ή διαδοχικών συζεύξεων όλου του συστήματος των spin ενός μορίου (Total Correlated Spectroscopy-TOCSY).

γ) Φασματοσκοπία διπολικής συσχέτισης στην οποία αποκαλύπτονται συζεύξεις μεταξύ πυρήνων που βρίσκονται αρκετά κοντά ώστε να αλληλεπιδρούν μέσω χώρου. Τέτοιες τεχνικές πετυχαίνουν την μελέτη των φαινομένων NOE σε όλους τους πυρήνες ενός μορίου ταυτόχρονα (Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy-NOESY).

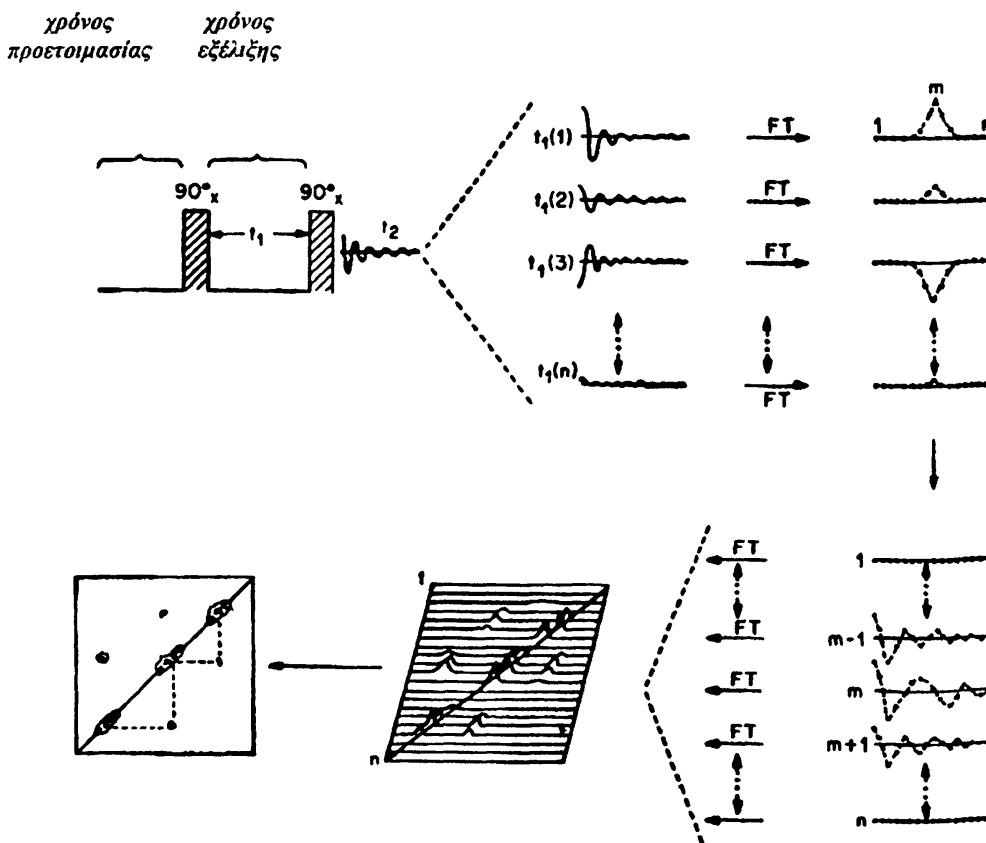
Επιπλέον η δισδιάστατη φασματοσκοπία NMR μπορεί να διακριθεί στην ομοπυρηνική, στην οποία αποκαλύπτεται ο τρόπος σύνδεσης μεταξύ ομοειδών μαγνητικών πυρήνων (πχ.  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ), και στην ετεροπυρηνική στην οποία είναι δυνατή η παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης μεταξύ διαφορετικών μαγνητικών πυρήνων (πχ.  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ).

Ο δισδιάστατος χάρτης, από τη μελέτη του οποίου προκύπτουν συμπεράσματα για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων σε ένα μόριο, είναι ένας χάρτης με ισούψείς γραμμές (contour plot) στον οποίο οι συζευγμένοι πυρήνες παριστάνονται με διασταυρούμενες κορυφές (cross peaks). Συγκεκριμένα, στην ομοπυρηνική φασματοσκοπία κάθε πυρήνας που δε συζεύγνυται έχει μετά την εφαρμογή των παλμών την ίδια συχνότητα μετάπτωσης με την αρχική του και εμφανίζεται πάνω στη διαγώνιο του δισδιάστατου χάρτη. Οι συζευγμένοι πυρήνες έχουν διαφορετική συχνότητα περιστροφής από την αρχική με αποτέλεσμα την εμφάνιση διασταυρούμενων κορυφών εκτός διαγωνίου. Κάθε σήμα εκτός διαγωνίου παριστάνει διπλή ή πολλαπλή κορυφή και μέσω του αντίστοιχου σήματος της διαγωνίου βρίσκεται ο άλλος πυρήνας με τον οποίο συζεύγνυται. Η συχνότητα συντονισμού εξάλλου ενός σήματος βρίσκεται φέρνοντας κάθετες ευθείες με αφετηρία το ίδιο το σημείο του σήματος προς τις δύο διαστάσεις. Είναι προφανές ότι στην ετεροπυρηνική δισδιάστατη φασματοσκοπία δεν υπάρχει διαγώνιος και κάθε σήμα θα αντιστοιχεί σε μαγνητικούς πυρήνες που συζεύγνυται



μεταξύ τους. Στη συνέχεια περιγράφονται οι τεχνικές της δισδιάστατης φασματοσκοπίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

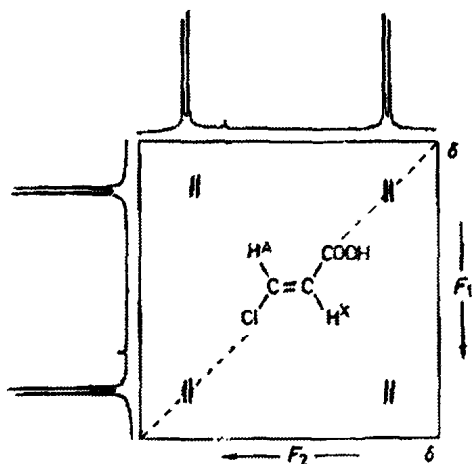
2.6.1 Το πείραμα της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (Homonuclear correlation spectroscopy, COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) και της συσχέτισης φίλτρου διπλού κβάντου (Double Quantum Filter Correlated Spectroscopy-DOF-COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ). Στο Σχήμα 2.24 παρουσιάζεται η παλμική ακολουθία και ο τρόπος σχηματισμού του δισδιάστατου χάρτη στην ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης (COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ). Στο πείραμα αυτό οι παρατηρούμενες κορυφές διασταύρωσης οφείλονται στη μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ συζευγμένων συστημάτων μέσω δεσμών.



Σχήμα 2.24. Σχηματική αναπαράσταση της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (COSY,  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) (Bovey, 1988).

Σε ένα σύστημα spin τύπου AX, ο δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  αποτελείται από τις κορυφές που βρίσκονται στη διαγώνιο και έχουν συνιστώσες συχνοτήτων





Σχήμα 2.25.: Φάσμα COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  ενός συστήματος spin τύπου AX (Günther, 1995).

κατά τον άξονα  $x$ , η μαγνήτιση,  $M$  του πυρήνα μεταφέρεται από τον άξονα  $z$  στο άξονα  $y$ . Μετά τη διέλευση του χρόνου εξέλιξης  $t_1$ , η συνιστώσα της μαγνήτισης  $M$  στον άξονα  $y$  μεταφέρεται στον άξονα  $-z$  υπό την επίδραση του δεύτερου παλμού  $90^\circ_x$ , ενώ η αντίστοιχη συνιστώσα στον άξονα  $x$  παραμένει στο επίπεδο  $xy$  και καταγράφεται. Η ένταση του σήματος που καταγράφεται εξαρτάται από τον προσανατολισμό του ανύσματος  $M$  στο τέλος της περιόδου εξέλιξης, ο οποίος καθορίζεται από τη συχνότητα μετάπτωσης  $Larmor$ ,  $\nu_A$ . Η παραπάνω διαδικασία συνεχίζεται για διάφορες τιμές του  $t_1$  και με συλλογή των δεδομένων, ενώ το πλάτος του σήματος διαμορφώνεται ανάλογα με το μεταβαλλόμενο χρόνο  $t_1$ . Τέλος με την εφαρμογή δύο μετασχηματισμών Fourier προκύπτει η διαγώνιος κορυφή που αντιστοιχεί σε συχνότητα  $\nu_A$ , και στις δύο διαστάσεις του χάρτη.

Στην περίπτωση μελέτης του συστήματος spin AX, ο δεύτερος παλμός  $90^\circ_x$  επηρεάζει όχι μόνον τη συνιστώσα της μαγνήτισης  $M$  στον άξονα  $y$ , αλλά και την πληθυσμιακή κατανομή των διαφόρων μεταπτώσεων του συστήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων A και X που βρίσκονται σε σύζευξη και, τελικά την εμφάνιση της διασταυρούμενης κορυφής που αντιστοιχεί σε συχνότητες  $\nu_{AX}$  και  $\nu_{XA}$  στις δύο διαστάσεις του χάρτη (Günther, 1995).

Σε ένα τυπικό παράδειγμα λήψης ενός τέτοιου φάσματος, λαμβάνονται μετρήσεις σε 1024 διαφορετικά  $t_1$  (increments) που αυξάνουν από 3  $\mu\text{s}$  έως 500 ms. Η FID είναι διαφορετική για καθένα από τα 1024 βήματα (Bovey, 1988).

Με βάση όσα περιγράφηκαν παραπάνω, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι πυρήνες με παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις που συζεύγνυται μεταξύ τους, δίνουν διασταυρούμενες κορυφές κοντά στη διαγώνιο. Για την απλοποίηση ενός ιδιαίτερα πολύπλοκου δισδιάστατου φάσματος συσχέτισης, έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές με σκοπό τη μείωση των έντονων

στους δύο άξονες του χάρτη  $\nu_{AX}$  και  $\nu_{XA}$ , καθώς και τις εκτός διαγωνίου διασταυρούμενες κορυφές με συνιστώσες  $\nu_{AX}$  και  $\nu_{XA}$ . Η εμφάνιση των διασταυρούμενων κορυφών οδηγεί στη διαπίστωση της σύζευξης του πυρήνα A με τον X (Σχήμα 2.25).

Αναλυτικά, η παλμική ακολουθία του πειράματος αποτελείται από δύο παλμούς  $90^\circ$ . Έστω ένας πυρήνας, A που δε συζεύγνυται και αποτελείται από μια απλή κορυφή απορρόφησης στο φάσμα μιας διάστασης.

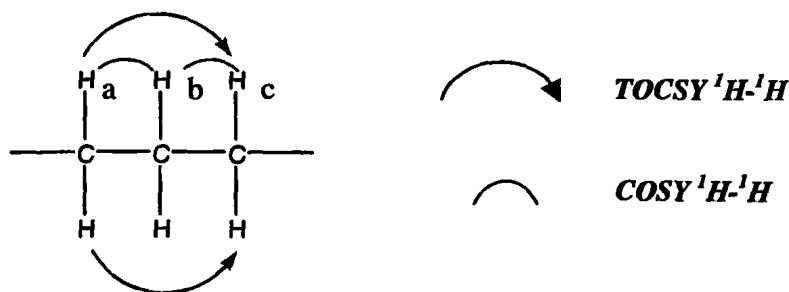
Κατά την εφαρμογή του πρώτου παλμού  $90^\circ$

κορυφών της διαγωνίου με αποτέλεσμα την αποκάλυψη διασταυρούμενων κορυφών που επικαλύπτονται από τη διαγώνιο. Μία από αυτές τις τεχνικές είναι η φασματοσκοπία συσχέτισης διπλού κβάντου (Double Quantum Filter Correlated Spectroscopy-DQF-COSY). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή προστίθεται ένας επιπλέον παλμός στην παλμική ακολουθία της τεχνικής COSY. Δηλαδή, μετά την εφαρμογή των παλμών  $90^\circ$  που διαφέρουν χρονικά μεταξύ τους κατά χρονικό διάστημα  $t_1$ , ακολουθεί ένας τρίτος παλμός  $90^\circ$  και συλλέγονται τα δεδομένα ( $t_2$ ).

Αναλυτικά, το σήμα συντονισμού σε ένα τυπικό φάσμα NMR προκύπτει από τη μετάβαση απλού κβάντου του πυρήνα ( $\Delta m = \pm 1$ ) μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων. Κατά την περιγραφή του φαινομένου NOE αναφέρθηκε η ύπαρξη των μεταπτώσεων μηδενικού Z και διπλού κβάντου D, που είναι απαγορευμένες και δε μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα. Ας θεωρήσουμε ότι οι πυρήνες I και S (με πυρηνικό spin  $1/2$ ) στο Σχήμα 2.18 συζεύγγονται μεταξύ τους με σταθερά σύζευξης J μέσω δεσμών. Η τεχνική DQF-COSY μετατρέπει τις απαγορευμένες μεταβάσεις Z και D σε επιτρεπτές κατά τρόπο έμμεσο (μέσω της μετάβασης απλού κβάντου) εξαφανίζοντας ταυτόχρονα τις μεταβάσεις απλού κβάντου, με αποτέλεσμα την αισθητή μείωση της έντασης των κορυφών της διαγωνίου. Η τεχνική αυτή ενδείκνυται σε περιπτώσεις ανάλυσης πολύπλοκων μιγμάτων όπου η διαγώνιος είναι ιδιαίτερα μεγάλης έντασης και απλοποιεί το δισδιάστατο χάρτη, ενώ παράλληλα αναδεικνύονται διασταυρούμενες κορυφές που λόγω της επικάλυψής τους από τις κορυφές της διαγωνίου είναι πρακτικώς αδύνατο να παρατηρηθούν.

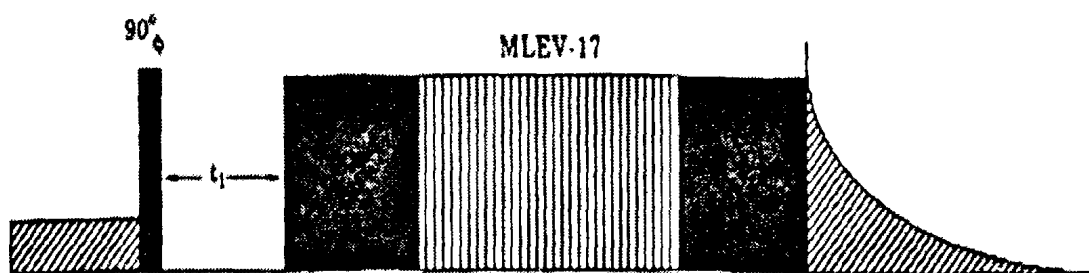
2.6.2. Το πείραμα της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας ολικής συσχέτισης (Total Correlation Spectroscopy, TOCSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται εναλλακτικά ή και σε συνδυασμό με την ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης COSY. Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται στη φασματοσκοπία TOCSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  αποκαλύπτει συσχετίσεις πυρήνων μέσω δεσμών, που δεν συζεύγγονται άμεσα αλλά συζεύγγονται από κοινού με έναν τρίτο πυρήνα, όπως φαίνεται παρακάτω. Έτσι στο Σχήμα 2.26 παρατηρείται πως με τη φασματοσκοπία COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  αποκαλύπτεται η σύζευξη μεταξύ των γειτονικών πυρήνων Ha, Hb καθώς και Hb και Hc, ενώ μέσω της τεχνικής COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  είναι δυνατή η παρατήρηση σήματος μεταξύ Ha και Hc που συζεύγγονται από κοινού με τον πυρήνα Hb.





Σχήμα 2.26.: Σύγκριση των πληροφοριών που αποκαλύπτουν οι τεχνικές  $\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$  και  $\text{TOCSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ .

Η συσχέτιση αυτή μπορεί, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, να επεκταθεί σε όλα τα πρωτόνια μιας αλυσίδας και για το λόγο αυτό αποκαλείται ολική.



Σχήμα 2.27. Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για την καταγραφή του φάσματος  $\text{TOCSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$  (Rahman and Choudhary, 1996).

Η παλμική ακολουθία του πειράματος  $\text{TOCSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$  (Σχήμα 2.27) αποτελείται από ένα παλμό  $90^\circ$  και μετά τη παρέλευση του χρόνου εξέλιξης,  $t_1$  εφαρμόζεται ο λεγόμενος παλμός «κλειδώματος» των spin (spin locking pulse). Κατά τη διάρκεια του παλμού αυτού οι πυρήνες αντιλαμβάνονται την ύπαρξη μόνο του πεδίου  $B_1$  ως αποτελεσματικού πεδίου και οι διαφορές των χημικών μετατοπίσεων γίνονται αμελητέες (Braun et al, 1998). Υπό τις συνθήκες αυτές η μαγνήτιση ενός πυρήνα διαχέεται στους γειτονικούς πυρήνες που συνδέονται μεταξύ τους μέσω δεσμών. Η «επικοινωνία» των πυρήνων εξαρτάται από τη διάρκεια του παλμού «κλειδώματος» των spin. Μικρή διάρκεια παλμού (της τάξης των 30 ms) δίνει συνήθως τον ίδιο βαθμό πληροφοριών με το φάσμα  $\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ . Μεγάλη διάρκεια του παλμού «κλειδώματος» των spin έχει ως αποτέλεσμα την επιθυμητή ολική συσχέτιση.

Στην πράξη πραγματοποιείται η λήψη φασμάτων  $\text{TOCSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$  με διάφορες τιμές διάρκειας παλμού από 20 έως 120 ms και ερμηνεύονται οι εμφανιζόμενες διασταυρούμενες κορυφές (Rahman and Choudhary, 1996, Croasmun and Carlson, 1994).



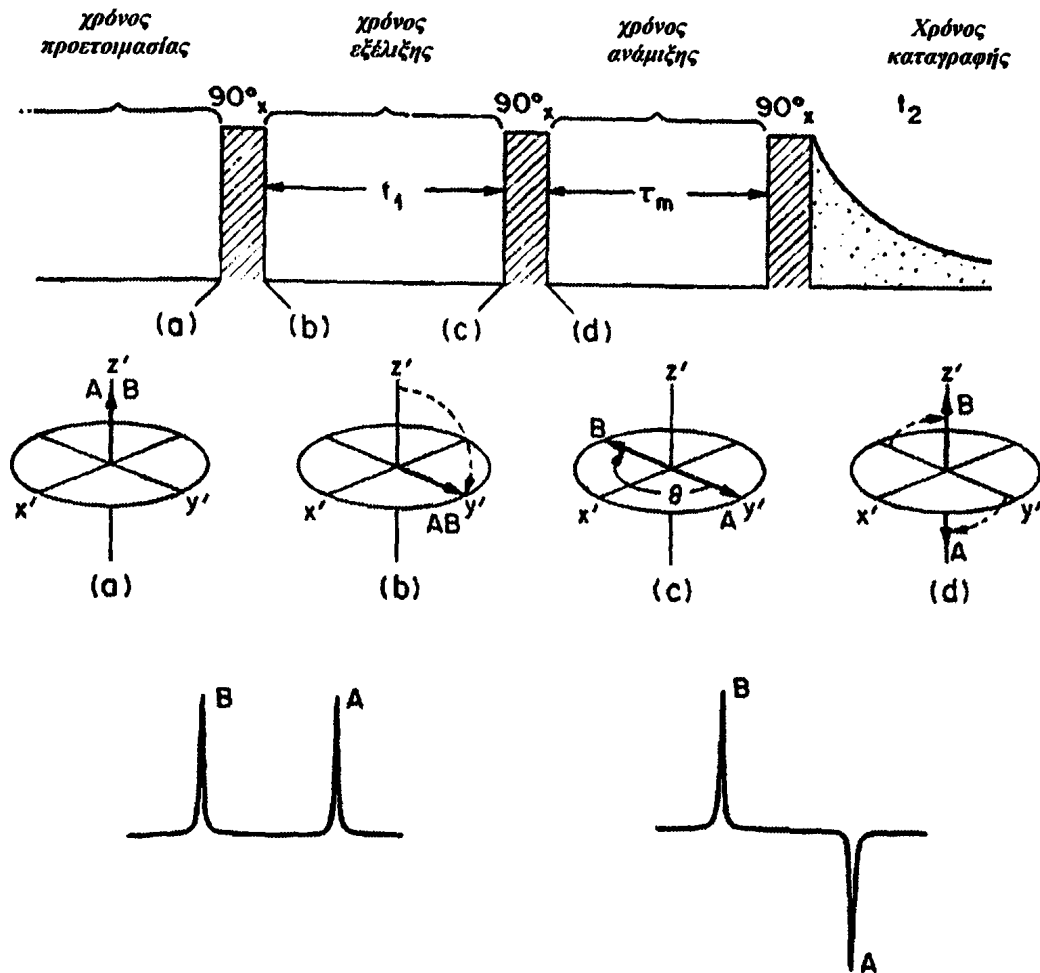
2.6.3 Το πείραμα NOESY-ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy-Rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) Στο πείραμα NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , οι διασταυρούμενες κορυφές οφείλονται στην ανταλλαγή μαγνήτισης λόγω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μέσω του χώρου. Πρόκειται για μια σημαντική τεχνική, γιατί με τη χρήση της είναι δυνατή η συλλογή πληροφοριών σχετικά με τις αποστάσεις των πυρήνων στο χώρο. Στο Σχήμα 2.28 απεικονίζεται η παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  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  $90^\circ$  εφαρμόζεται μετά την περίοδο προετοιμασίας και μετατρέπει την μαγνήτιση M των δύο spin A και B σε παρατηρούμενη μαγνήτιση (μεταφορά στον άξονα y) (Σχήμα 2.28 b). Κατά τη διάρκεια του χρόνου  $t_1$  τα ανύσματα της μαγνήτισης των δύο πυρήνων αφήνονται να εξελιχθούν (Σχήμα 2.28 c). Ακολουθεί παλμός  $90^\circ$  ο οποίος μεταφέρει τη μαγνήτιση στον άξονα z (Σχήμα 2.28 d). Κατά τη διάρκεια του χρόνου μίξης,  $t_m$ , λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων A και B που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου (dipolar coupled), η οποία εξαρτάται από τη διαφορά των αντίστοιχων συνιστωσών μαγνήτισης στον άξονα z. Μετά το χρόνο  $t_m$ , ακολουθεί η εφαρμογή ενός τρίτου παλμού  $90^\circ$  (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, 1988, Braun *et al.*, 1998).

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

- (1) Σήμα που οφείλεται στη συχνότητα περιστροφής του πυρήνα A, το οποίο δεν έχει ανταλλάξει μαγνήτιση με τον πυρήνα B.
- (2) Ένα δεύτερο σήμα οφειλόμενο στον πυρήνα A, που ανταλλάσσει μαγνήτιση με τον πυρήνα B.
- (3) Σήμα που οφείλεται στη συχνότητα περιστροφής του πυρήνα B, το οποίο δεν έχει ανταλλάξει μαγνήτιση 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, 1988).





Σχήμα 2.28.: Η παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  και η συμπεριφορά των ανυσμάτων μαγνήτισης των δύο spin  $A$  και  $B$  (Bovey 1988).

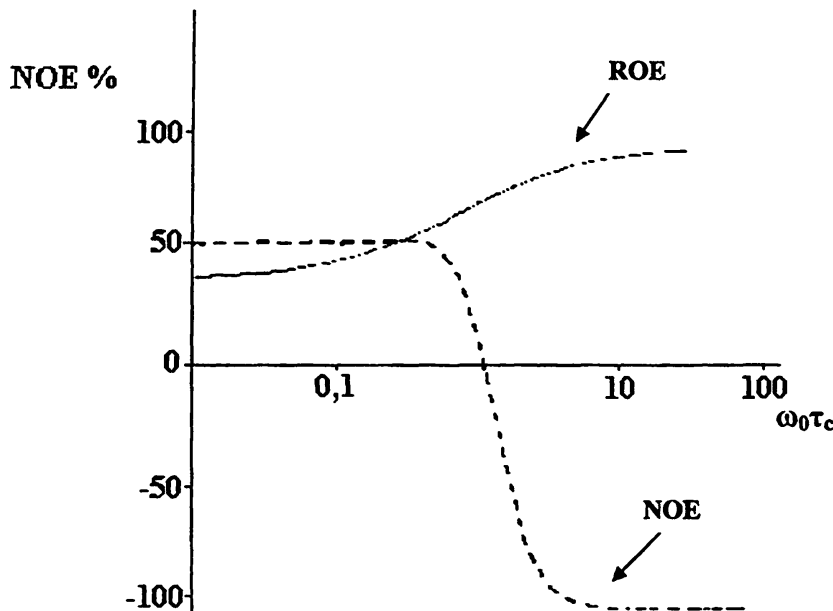
Η ένταση των σημάτων εξαρτάται από το ποσοστό ανταλλαγής μαγνήτισης των πυρήνων  $A$  και  $B$  και τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης των spin ( $\tau_m$ ). Όταν ο χρόνος ανάμιξης είναι περίπου ίσος με το μικρότερο χρόνο αποδιέγερσης ( $T_1$ ) των υπό αλληλεπίδραση πυρήνων, τότε παρατηρείται η μέγιστη ένταση των διασταυρούμενων κορυφών (Bovey, 1988).

Η φασματοσκοπία NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  βρίσκει σημαντική εφαρμογή στη μελέτη δομικών χαρακτηριστικών διαφόρων μακρομορίων όπως πεπτιδίων και πρωτεϊνών, δίνοντας πληροφορίες για την τριτοταγή διαμόρφωσή τους. Με τη χρήση της αποκαλύπτονται πυρήνες που απέχουν μεταξύ τους μέχρι  $5 \text{ \AA}$  και είναι δυνατός ο υπολογισμός των αποστάσεων των πυρήνων στο χώρο με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (Wüthrich, 1989, Gerotheranassis, 2002).

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

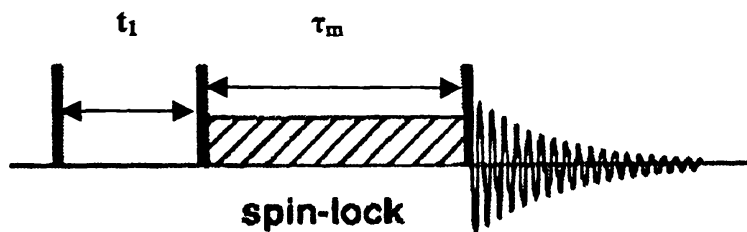


του φαινομένου NOE από το γινόμενο  $\omega_0\tau_c$ , όπου,  $\omega_0$  είναι η συχνότητα περιστροφής Larmor του πυρήνα και  $\tau_c$  ο χρόνος συσχέτισης των πυρήνων που αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου (δηλαδή ο χρόνος κατά τον οποίο μεταβάλλεται ο προσανατολισμός τους. Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις 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  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Bax and Grzesiek, 1996). Στο Σχήμα 2.29 απεικονίζεται η εξάρτηση του φαινομένου NOE/ROE από το γινόμενο  $\omega_0\tau_c$ . Παρατηρείται πως στο περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς η τιμή του NOE είναι πάντα θετική.



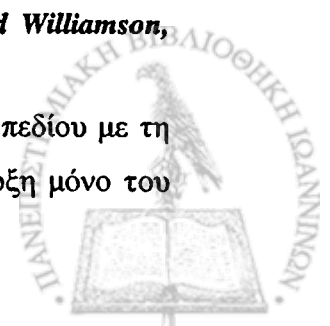
Σχήμα 2.29.: Εξάρτηση του φαινομένου NOE/ROE από το γινόμενο  $\omega_0\tau_c$ .

Στο Σχήμα 2.30 παρουσιάζεται η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται κατά τη λήψη του φάσματος ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .



Σχήμα 2.30.: Η παλμική ακολουθία του πειράματος ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Neuhaus and 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



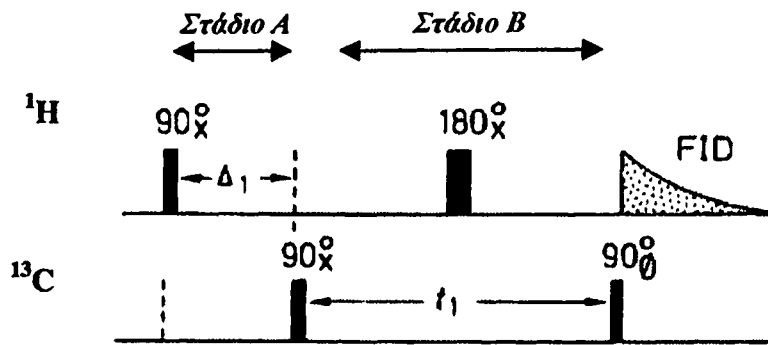


πεδίου  $B_1$  ως αποτελεσματικού πεδίου και περιστρέφονται συγχρόνως στο επίπεδο  $xy$ . Όταν τα ανύσματα της μαγνήτισης των δύο πυρήνων περιστραφούν με την ίδια συχνότητα, λαμβάνει χώρα ανταλλαγή της μαγνήτισης.

2.6.4. Το πείραμα της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπία συσχέτισης πολλαπλού κβάντου  $^1H-^{13}C$ , (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC  $^1H-^{13}C$ ), και συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών  $^1H-^{13}C$  (Heteronuclear Multiple Bond Coherence HMBC  $^1H-^{13}C$ ). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως με τη χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης είναι δυνατή η παρατήρηση 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 και η μικρή τιμή του γυρομαγνητικού του λόγου που έχουν ως συνέπεια τη μειωμένη ευαισθησία του. 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 (Sanders and Hunder, 1993, Griesinger *et al.*, 1996, Günther, 1995). Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται στα πειράματα HMQC και HMBC  $^1H-^{13}C$ , η παλμική ακολουθία των οποίων παρουσιάζεται στα Σχήματα 2.31 και 2.33.

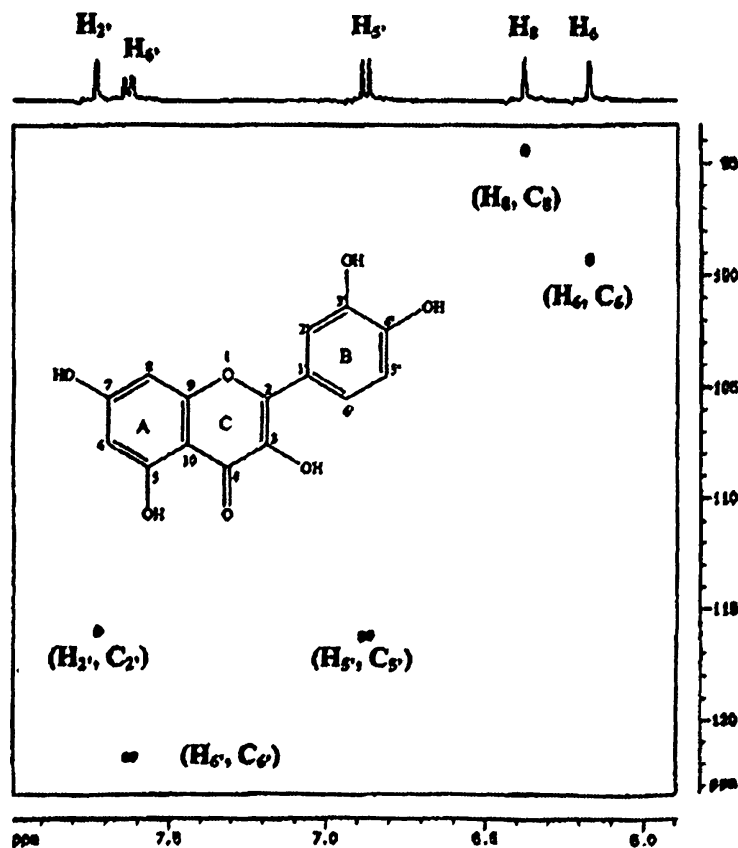
Η φασματοσκοπία HMQC  $^1H-^{13}C$  συσχετίζει πυρήνες ανθράκων- $^{13}$  που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με πυρήνες πρωτονίου ( $^1J_{CH}$ ). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC  $^1H-^{13}C$  (Σχήμα 2.31) μπορεί αυθαίρετα να διακριθεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (Στάδιο A) λαμβάνει χώρα μεταφορά ενέργειας από τον πυρήνα του πρωτονίου στον πυρήνα του άνθρακα- $^{13}$ , μέσω της εφαρμογής παλμών  $90^\circ$  και στους δύο πυρήνες. Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα και η καταστολή των σημάτων συντονισμού των πυρήνων πρωτονίου που δε συζεύγνυνται με πυρήνες άνθρακα- $^{13}$ . Στο δεύτερο στάδιο (Στάδιο B) η ενέργεια 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  $^1J_{CH}$  (Günther, 1995).





Σχήμα 2.31.: Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  (Günther, 1995).

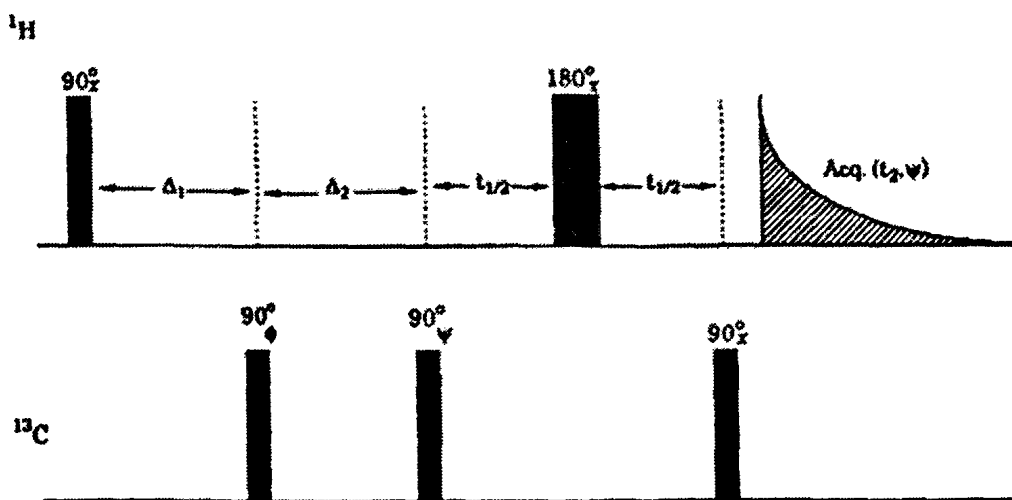
Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας, δηλαδή η εμφάνιση της άμεσης αλληλεπίδραση των πυρήνων  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  ( $^1J_{\text{CH}}$  σύζευξη) απεικονίζονται στο Σχήμα 2.32.



Σχήμα 2.32.: Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HMQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  της κερκετίνης σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{OD}$  όπου οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στη σύζευξη  $^1J_{\text{CH}}$  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 ( $\text{H}_8, \text{C}_8$ ).



Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία HMQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , η τεχνική HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων ανθράκα-13 που συζεύγνυνται με πυρήνες πρωτονίου οι οποίοι απέχουν από δύο έως τέσσερις δεσμούς ( $^{2-4}J_{\text{CH}}$ ). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  (Σχήμα 2.33) περιλαμβάνει αρχικά ένα παλμό  $90^\circ$  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  $^{2-4}J_{\text{CH}}$ . Ο δεύτερος παλμός  $90^\circ$   $^{13}\text{C}$  δημιουργεί μεταπτώσεις μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται με την επίδραση του παλμού  $^1\text{H}$   $180^\circ$  που ακολουθεί. Τέλος με την εφαρμογή του παλμού  $90^\circ$   $^{13}\text{C}$  και την καταγραφή του φάσματος, προκύπτει ο δισδιάστατος χάρτης της τεχνικής HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  (Rahman and Choudhary, 1996).



Σχήμα 2.33.: Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  (Rahman and Choudhary, 1996).

Τροποποίηση των παλμικών ακολουθιών των δύο τεχνικών που αναφέρθηκαν οδηγούν σε διάφορους τύπους πειραμάτων ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Έτσι, εναλλακτικά της τεχνικής HMQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης απλού κβάντου  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , (Heteronuclear Single Quantum Coherence, HSQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ), 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,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , GE-HSQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) με αποτέλεσμα την εμφάνιση διασταυρούμενων κορυφών που οφείλονται σε ασθενείς συζεύξεις (Marek, *et al.*, 1997, Parella and Belloc, 2001).



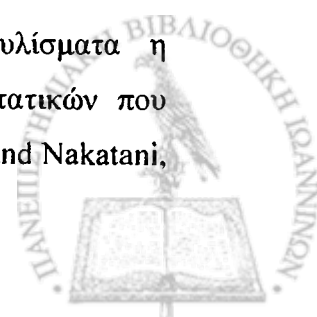
## 2.7. Εφαρμογές NMR στην ανάλυση μιγμάτων

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως, η φασματοσκοπία NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της σύστασης ενός πολύπλοκου μίγματος, εξαιτίας του πλήθους των πληροφοριών που παρέχει η εφαρμογή των διαφόρων τεχνικών της. Οι χημικές μετατοπίσεις και οι συζεύξεις spin-spin είναι χαρακτηριστικές για συγκεκριμένες ενώσεις και μπορούν να αποδειχθούν πολύ χρήσιμες για την ταυτοποίησή τους σε ένα μίγμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη της σύστασης βιολογικών υγρών, όπως αίματος και ούρων, αιωρημάτων κυττάρων ακόμη και ιστών (Bock, 1982, Nicholson *et al.*, 1989, Fan, 1996). Οι διαρκώς αυξανόμενες ανάγκες σε εξειδικευμένες αναλύσεις μεγάλης διαγνωστικής σημασίας για τη θεραπεία των ασθενών, καθιστούν αναγκαία τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR με σκοπό την αποτελεσματικότητα, τη μικρότερη δυνατή κατεργασία του δείγματος και την ταχύτητα ανάλυσης. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα εφαρμογής της φασματοσκοπίας NMR στην ανάλυση βιολογικών υγρών, έγκειται στο ότι, σε μία και μόνο μέτρηση είναι δυνατή η ανάλυση σχεδόν όλων των οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτά σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις. Επιτρέπει δηλαδή, τον ακριβή και ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό σχεδόν όλων των μεταβολιτών που υπάρχουν στο προς μελέτη δείγμα, μέσα σε μερικά λεπτά, ενώ παράλληλα μεγιστοποιεί και την πιθανότητα να αναγνωριστούν σημαντικοί αλλά μη αναμενόμενοι ή ακόμη και άγνωστοι μεταβολίτες (Bairaktari *et al.*, 1998).

Σε ότι αφορά την ανάλυση φυσικών προϊόντων έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR- $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  στη μελέτη της σύστασης και της ποιότητας του ελαιόλαδου (Vlahov, 1999, Fauhl *et al.*, 2000), καθώς και η εφαρμογή του NMR- $^{31}\text{P}$  για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς του σε μονο- και δι-γλυκερίδια (Spyros and Dais, 2000). Ο Limioli και οι συνεργάτες του (1996) μελέτησαν το περιεχόμενο των υδατοδιαλυτών συστατικών διαφόρων ποικιλιών ελιάς με NMR- $^1\text{H}$ . Επιπλέον, αναφέρεται η χρήση δισδιάστατων τεχνικών NMR στην μελέτη φαινολικών ενώσεων στα διάφορα μέρη του καρπού της ελιάς (Servili *et al.*, 1999). Εκτενής είναι η χρήση του NMR στη μελέτη της σύστασης των χυμών φρούτων (Fuleki, *et al.*, 1994, Belton *et al.*, 1998), αλλά και της νοθείας τους (Brause and Raterman, 1982), καθώς και της παλαιότητας και αυθεντικότητας των οίνων (Belton, *et al.*, 1995).

Σχετικά με την ανάλυση φαινολικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα η φασματοσκοπία NMR περιορίζεται στη μελέτη της δομής αγνώστων συστατικών που απομονώνονται μετά από την εφαρμογή χρωματογραφικών μεθόδων (Kikuzaki and Nakatani,



1989, Cuvelier *et al.*, 1994, Kanazawa *et al.*, 1995, Duve and White, 1991, Schwarz and Ernst, 1996).

The following text is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a list of references or a detailed discussion of NMR applications in mixture analysis, consistent with the header and the first line of text. The text is mostly obscured by noise and low contrast.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ NMR ΓΙΑ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ  
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΜΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΕ  
ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ -ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΑΦΕΪΚΟΥ ΚΑΙ  
ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ  
ΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ DQF COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$   
ΚΑΙ HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$**



### 3.1. Εισαγωγή

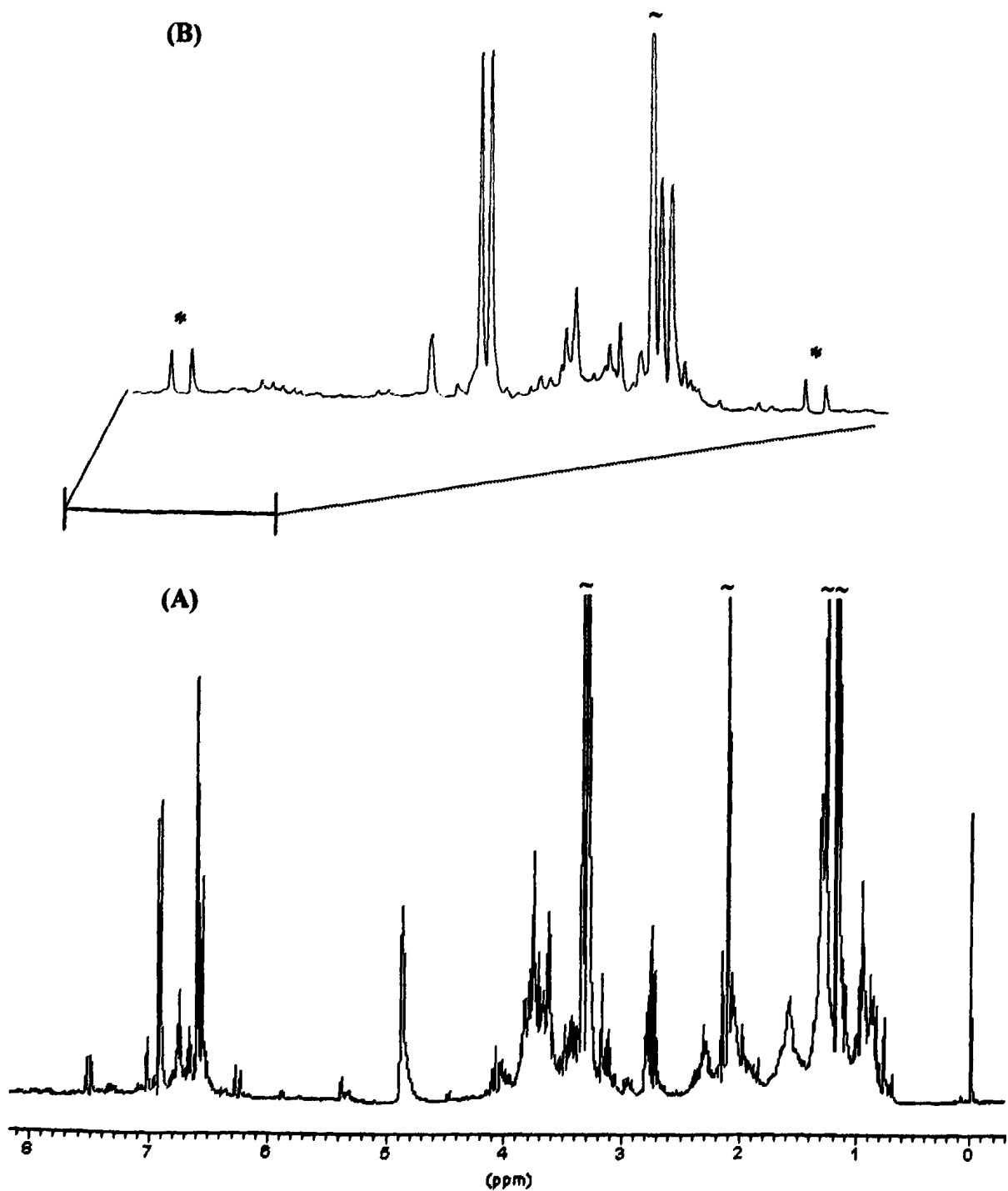
Στην προκαταρκτική μελέτη εξετάστηκε η δυνατότητα της φασματοσκοπίας NMR-<sup>1</sup>H μιας διάστασης για το χαρακτηρισμό αντιοξειδωτικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Στο Σχήμα 3.1 απεικονίζεται το φάσμα NMR-<sup>1</sup>H αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum vulgare* το οποίο χαρακτηρίζεται από εξαιρετική πολυπλοκότητα, ιδιαίτερα στην αρωματική περιοχή του φάσματος. Παρότι είναι δυνατή η διάκριση των διπλών κορυφών απορρόφησης στα 7.5 και 6.2 ppm, που υποδηλώνονται με αστερίσκο και οι οποίες είναι ιδιαίτερης διαγνωστικής σημασίας για την περίπτωση παραγώγων του κινναμωμικού οξέος όπως θα αναλυθεί παρακάτω, παρουσιάστηκαν πολλές δυσκολίες στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων συστατικών. Τούτο οφείλεται στην έντονη αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού στην περιοχή αυτή του φάσματος.

Έτσι, έγινε επιτακτική η ανάγκη εφαρμογής συνδυασμένων δισδιάστατων τεχνικών NMR, προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων που πιθανώς ανήκουν σε αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού δισδιάστατων τεχνικών NMR, πραγματοποιήθηκαν πρωταρχικά, πειράματα NMR μιας και δύο διαστάσεων σε πρότυπες ενώσεις αλλά και σε μίγματα αυτών. Οι πρότυπες ενώσεις επιλέχθηκαν με βάση την πιθανότητα παρουσίας τους στα φυτά και την αντιοξειδωτική τους δράση, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Από τη μελέτη των φασμάτων των προτύπων ενώσεων μπορούν να προσδιοριστούν οι συνθήκες εκείνες που επιτρέπουν την εφαρμογή μεθοδολογιών NMR στο χαρακτηρισμό αντιοξειδωτικών συστατικών στα υπό μελέτη φυτικά εκχυλίσματα, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια του κεφαλαίου. Στο Παράρτημα παραθέτονται πληροφορίες σχετικά με τα φυτά που μελετήθηκαν.

Η λήψη των φασμάτων NMR μιας και δύο διαστάσεων που μελετώνται στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και σε φασματογράφο τύπου AMX-400 της Brüker. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού UXNMR και WIN-NMR της Brüker.





**Σχήμα 3.1.:** (A) Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare* σε δευτεριωμένη μεθανόλη,  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $NS=128$ ,  $T= 295\text{ K}$ ). (B) Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος. Οι χαρακτηριστικές διπλές κορυφές απορρόφησης στα 7.5 και 6.2 ppm με πιθανή διαγνωστική αξία υποδηλώνονται με αστερίσκο.



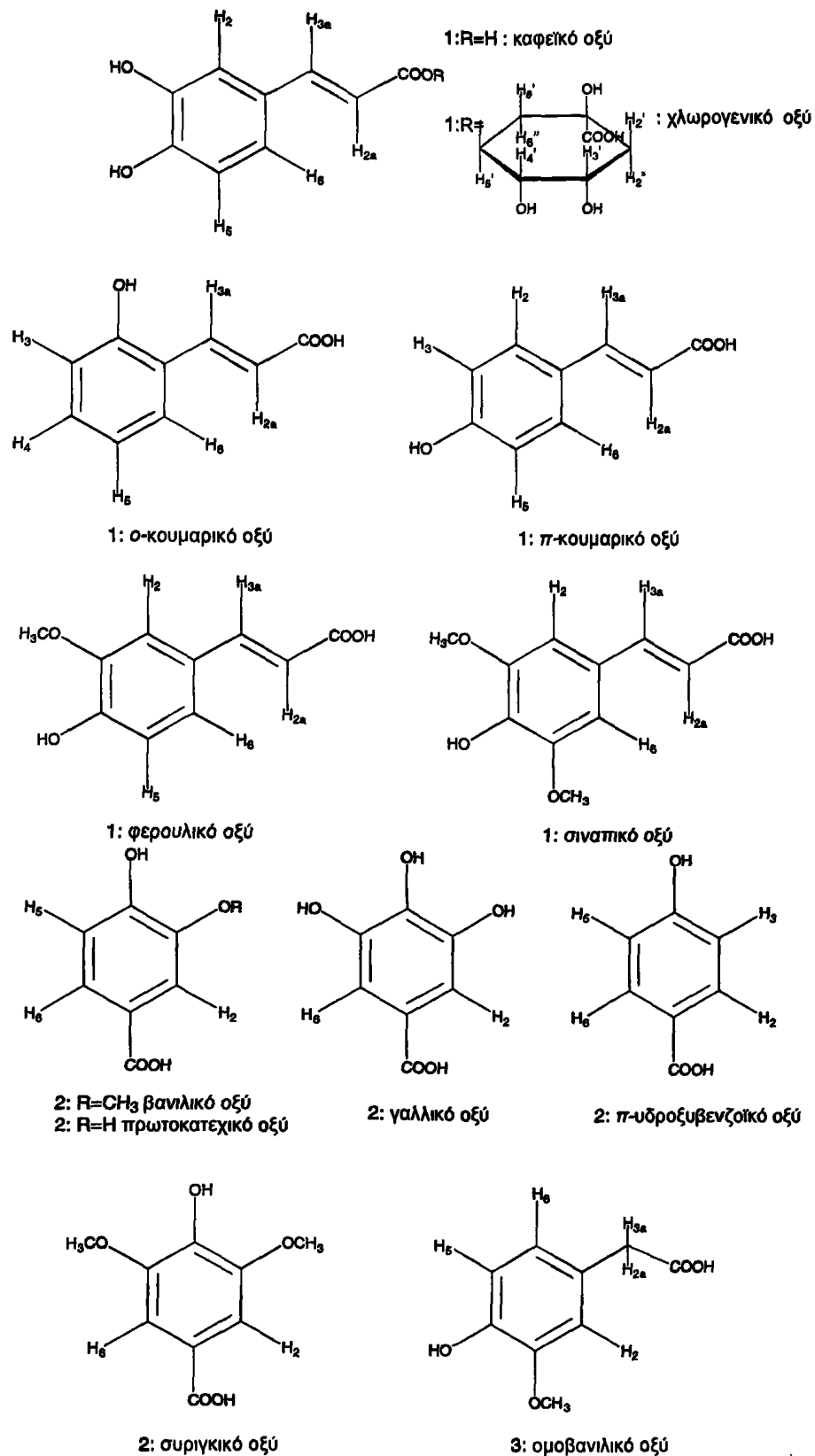


### 3.2. Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε μίγμα γνωστής σύστασης

Η φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H εφαρμόστηκε αρχικά σε δώδεκα επιλεγμένα φαινολικά οξέα, που είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (1), του βενζοϊκού οξέος, (2) και του φαινυλοξικού οξέος, (3), (Σχήμα 3.2). Η μελέτη αυτή έγινε με σκοπό την ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού της κάθε ένωσης σε διάλυμα ολικώς δευτεριωμένης μεθανόλης, CD<sub>3</sub>OD. Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται το φάσμα NMR-<sup>1</sup>H του καφεϊκού οξέος σε CD<sub>3</sub>OD που περιέχει ως ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσιλυλοπροπιονικό άλας του Na (TMS-*d*<sub>4</sub>). Το σύστημα των spin των αρωματικών πρωτονίων του καφεϊκού οξέος είναι τύπου AMX, δηλαδή η αλληλεπίδρασή τους είναι ασθενής σε σχέση με τη διαφορά των χημικών μετατοπίσεων και το φάσμα που προκύπτει είναι πρώτου βαθμού, με χαρακτηριστική συμμετρία ως προς τις εντάσεις των κορυφών. Η ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού έγινε με βάση τη χημική τους μετατόπιση, την πολλαπλότητα, την ένταση και τις τιμές των ολοκληρωμάτων τους. Η πιο σημαντική αλληλεπίδραση θεωρήθηκε αυτή μεταξύ των πρωτονίων H<sub>3a</sub> και H<sub>2a</sub> με σταθερά σύζευξης J=15.8 Hz που υποδηλώνει την παρουσία του *trans*- ισομερούς. Το σύστημα αυτό χαρακτηρίζει όλα τα παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος με μικρές διαφορές στην τιμή της σταθεράς σύζευξης.

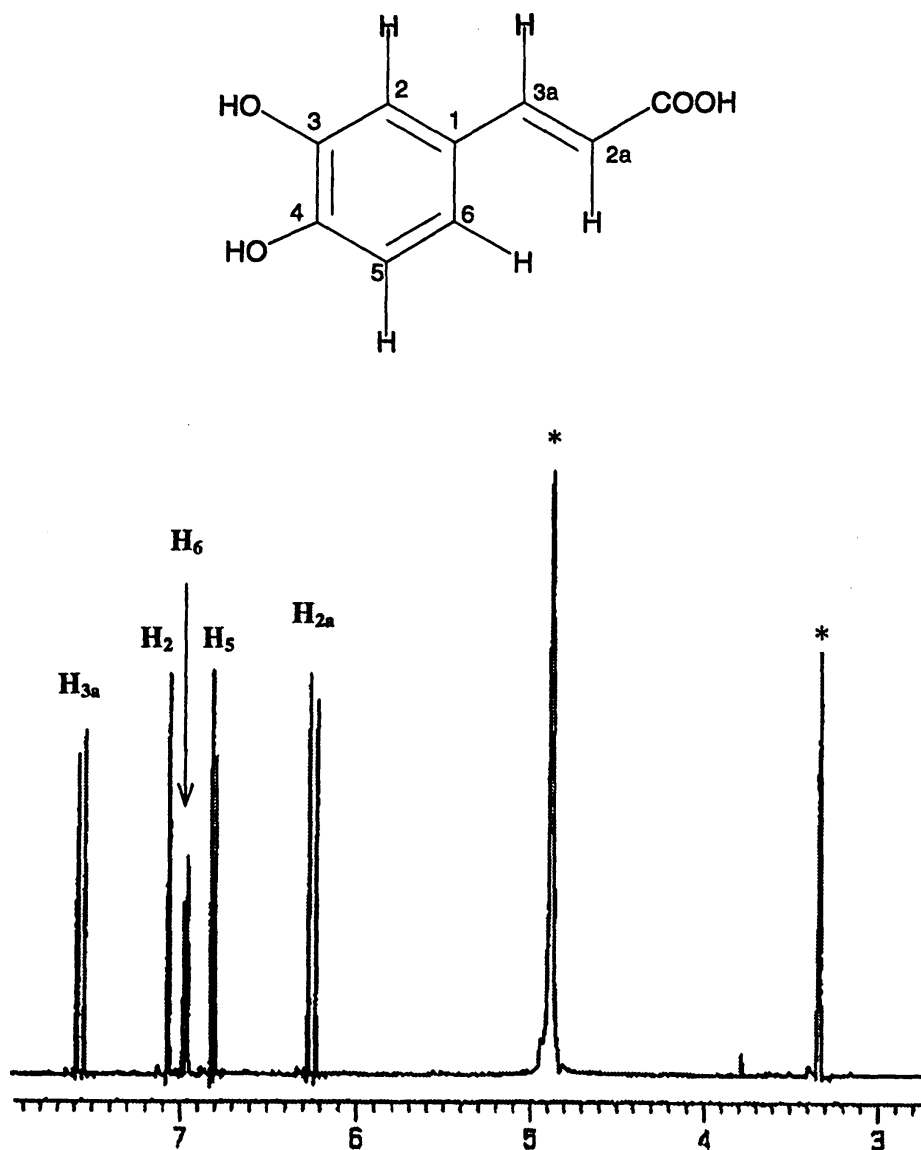
Από τη λήψη των φασμάτων των δώδεκα προτύπων ενώσεων προέκυψε ο Πίνακας 3.1, στον οποίο αναγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των δώδεκα φαινολικών ενώσεων σε διάλυμα δευτεριωμένης μεθανόλης και η πολλαπλότητα των απορροφήσεων συντονισμού των.





Σχήμα 3.2.: Δομές των φαινολικών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ενώσεις και είναι παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος, 1, του υδροξυβενζοϊκού οξέος, 2, και του φαινολοξικού οξέος, 3.





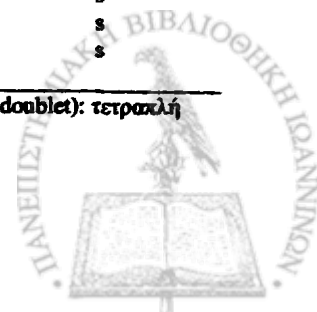
Σχήμα 3.3.: Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  του καφεϊκού οξέος σε δευτεριωμένη μεθανόλη,  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $T=295\text{ K}$ ,  $NS=16$ ). Με αστερίσκο υποδηλώνονται οι απορροφήσεις του διαλύτη.



**Πίνακας 3.1: Ταυτοποίηση των πρωτονίων των φαινολικών οξέων που επιλέχθηκαν ως πρότυπες ενώσεις σε δευτεριωμένη μεθανόλη.**

Φαινολικό οξύ	Συμβολισμός	Πρωτόνιο	Χημική μετατόπιση (ppm)	Πολλαπλότητα κορυφής*
ο-κουμαρικό οξύ	c <sub>o</sub>	H <sub>3</sub>	7.44	d
		H <sub>4</sub>	6.86	t
		H <sub>5</sub>	6.72	t
		H <sub>6</sub>	6.72	d
		H <sub>3a</sub>	7.96	d
		H <sub>2a</sub>	6.53	d
p-κουμαρικό οξύ	c <sub>p</sub>	H <sub>2</sub>	7.43	d
		H <sub>3</sub>	6.85	d
		H <sub>5</sub>	6.85	d
		H <sub>6</sub>	7.41	d
		H <sub>3a</sub>	7.53	d
		H <sub>2a</sub>	6.24	d
φερονικό οξύ	f	H <sub>2</sub>	7.14	s
		H <sub>5</sub>	6.85	d
		H <sub>6</sub>	7.04	d
		H <sub>3a</sub>	7.60	d
		H <sub>2a</sub>	6.30	d
		OCH <sub>3</sub>	3.92	s
σιναιπικό οξύ	s	H <sub>2</sub>	6.89	s
		H <sub>6</sub>	6.89	s
		H <sub>3a</sub>	7.58	d
		H <sub>2a</sub>	6.34	d
		OCH <sub>3</sub>	3.87	s
		H <sub>2</sub>	7.05	s
καφεϊκό οξύ	c	H <sub>5</sub>	6.81	d
		H <sub>6</sub>	6.95	d
		H <sub>3a</sub>	7.52	d
		H <sub>2a</sub>	6.20	d
		H <sub>2</sub>	7.02	s
		H <sub>5</sub>	6.80	d
χλωρογενικό οξύ	ch	H <sub>6</sub>	6.96	d
		H <sub>3a</sub>	7.54	d
		H <sub>2a</sub>	6.24	d
		H <sub>2'</sub>	2.15	m
		H <sub>2''</sub>	2.05	m
		H <sub>3'</sub>	4.15	m
		H <sub>4'</sub>	3.60	dd
		H <sub>5'</sub>	5.33	m
		H <sub>6'</sub>	2.20	m
		H <sub>6''</sub>	2.06	m
		H <sub>2</sub>	7.56	s
		H <sub>5</sub>	6.83	d
πρωτοκατεχικό οξύ	p	H <sub>6</sub>	7.56	d
		OCH <sub>3</sub>	3.92	s
		H <sub>2</sub>	7.48	s
		H <sub>5</sub>	6.80	d
γαλλικό οξύ	g	H <sub>6</sub>	7.48	d
		H <sub>2,6</sub>	7.01	s
		H <sub>2,6</sub>	7.86	d
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	b	H <sub>3,5</sub>	6.82	d
		H <sub>2,6</sub>	7.32	s
συργικό οξύ	sy	OCH <sub>3</sub>	3.91	s
		H <sub>2</sub>	6.84	s
ομοβανιλλικό οξύ	o	H <sub>5</sub>	6.72	d
		H <sub>6</sub>	6.72	d
		H <sub>3a</sub>	3.48	s
		H <sub>2a</sub>	3.48	s
		OCH <sub>3</sub>	3.90	s

\*s (singlet): απλή κορυφή, d (doublet): διπλή κορυφή, t (triplet): τριπλή κορυφή, dd (doublet of a doublet): τετραπλή κορυφή, m (multiplet): πολλαπλή κορυφή.



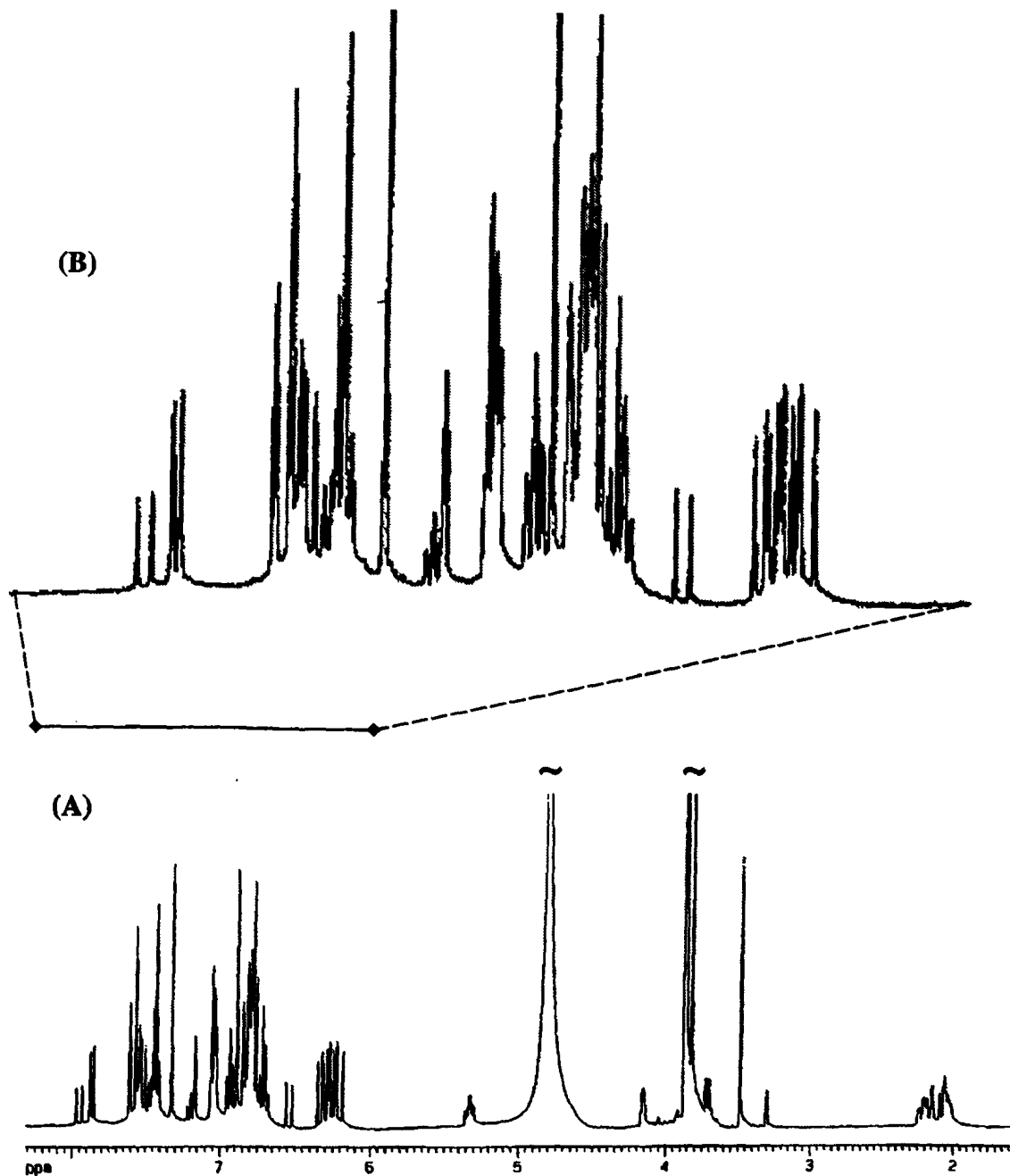
Παρατηρείται ότι οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των φαινολικών οξέων που ανήκουν στη ίδια κατηγορία, βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους. Για παράδειγμα, η χημική μετατόπιση των  $H_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκιναμωμικού οξέος κυμαίνεται μεταξύ 6.20-6.33 ppm, με εξαίρεση το *o*-κουμαρικό οξύ του οποίου το  $H_{2a}$  συντονίζεται στα 6.54 ppm. Το ίδιο ισχύει και για τα φαινολικά οξέα που ανήκουν στις άλλες δύο κατηγορίες. Η παραπάνω διαπίστωση οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων των φαινολικών οξέων αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους, γεγονός που δυσχεραίνει την ταυτοποίησή τους στο φυτικό εκχύλισμα.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η δυνατότητα ταυτοποίησης των φαινολικών οξέων στα φυτικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ισομοριακό μίγμα των δώδεκα φαινολικών οξέων του Πίνακα 3.1. Το γνωστής σύστασης μίγμα παρότι δεν προσομοιάζει επακριβώς, τουλάχιστον από ποσοτική άποψη, το περιεχόμενο ενός φυτικού εκχυλίσματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση των καταλληλότερων συνθηκών ταυτοποίησης των φαινολικών οξέων.

Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζεται το πρωτονιακό φάσμα του μίγματος των δώδεκα προτύπων ενώσεων σε διάλυμα δευτεριωμένης μεθανόλης. Παρατηρείται ότι στην περιοχή του φάσματος από 6.00 έως 8.00 ppm (Σχήμα 3.4.B), η αλληλεπικάλυψη των κορυφών συντονισμού είναι τέτοια ώστε η ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων να καθίσταται δύσκολη. Ειδικότερα, αν ληφθεί υπόψη πως στο πραγματικό δείγμα του φυτικού εκχυλίσματος η σύσταση είναι άγνωστη και οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων που πιθανόν να περιέχει είναι δυνατό να διαφέρουν κατά τάξεις μεγέθους, γίνεται εύκολα αντιληπτό πως η εφαρμογή της πρωτονιακής φασματοσκοπίας μιας διάστασης δεν επαρκεί. Επισημαίνεται επίσης πως με βάση τον Πίνακα 3.1 τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων  $H_{2a}$  των υδροξυκιναμωμικών οξέων εμφανίζονται σε μια περιοχή που απέχει κατά ~4.5 ppm, από εκείνη που εμφανίζονται οι κορυφές απορρόφησης των πρωτονίων των δακτυλίων.

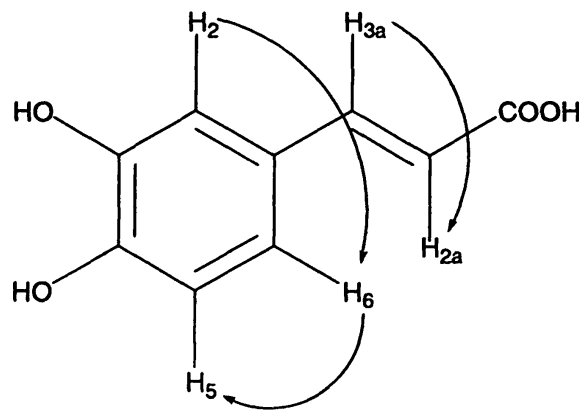
Έτσι, εφαρμόστηκε συνδυασμός δισδιάστατων τεχνικών στην ανάλυση του μίγματος των δώδεκα αντιοξειδωτικών συστατικών. Ο στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν η βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του φάσματος με την εισαγωγή της δεύτερης διάστασης. Όπως περιγράφεται αναλυτικά στο θεωρητικό μέρος της διδακτορικής διατριβής, όλα τα είδη πρωτονίων του προς ανάλυση δείγματος βρίσκονται πάνω στη διαγώνιο του δισδιάστατου χάρτη της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας, ενώ εκτός διαγώνιου βρίσκονται μόνο τα πρωτόνια που βρίσκονται σε αλληλεπίδραση. Το είδος της αλληλεπίδρασης καθορίζεται από την παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται και ο κατάλληλος συνδυασμός μεθοδολογιών δισδιάστατου NMR υποδεικνύει την κάθε είδους αλληλεπίδραση των spin και επομένως το σύστημα spin των πρωτονίων των φαινολικών οξέων.





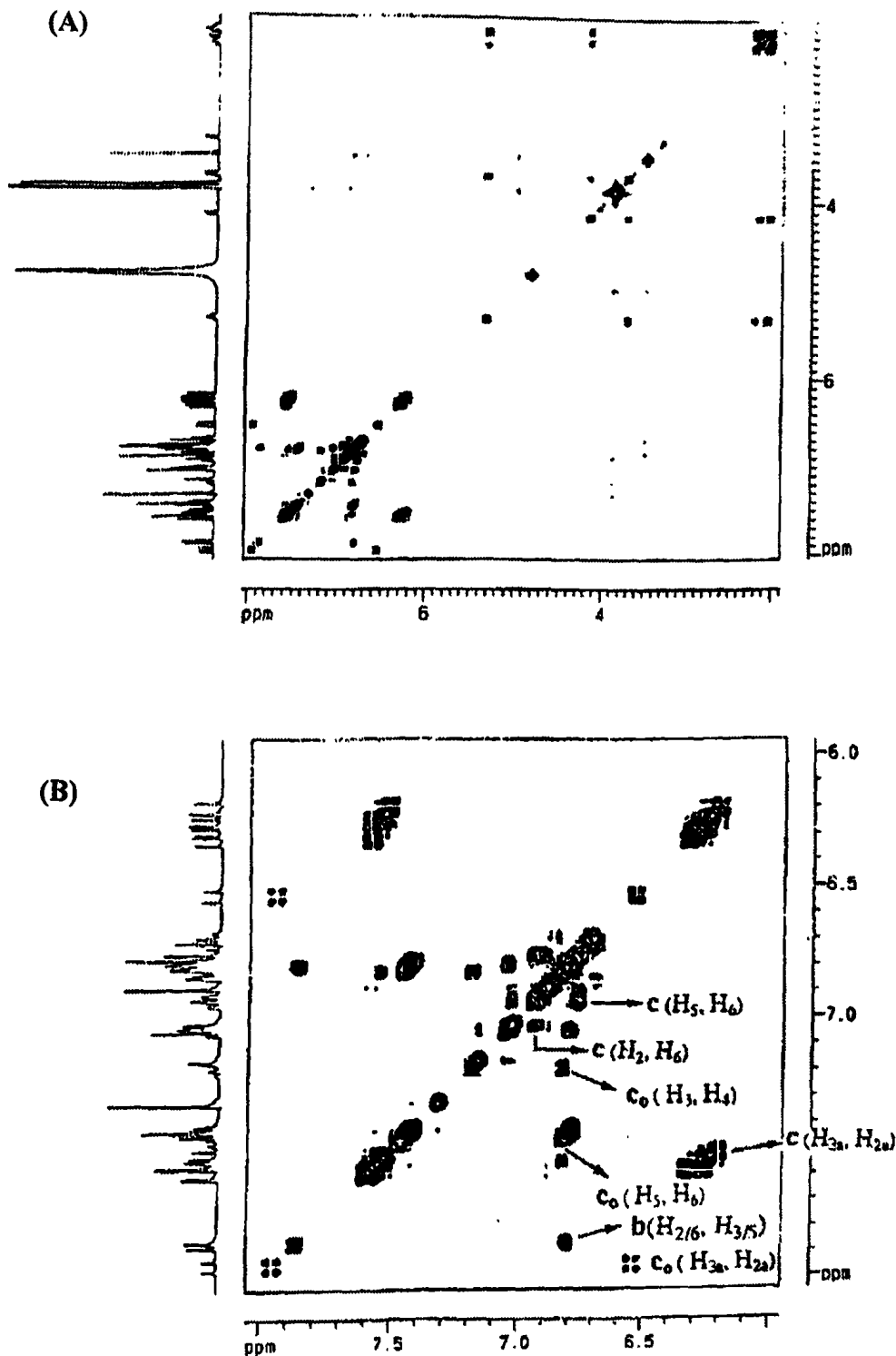
Σχήμα 3.4.: (A) Φάσμα  $NMR -^1H$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών ενώσεων του Πίνακα 3.1 σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη,  $CD_3OD$ . (B) Επιλεγμένη περιοχή από 6.00 έως 8.00 ppm του ίδιου φάσματος ( $NS=16$ ,  $T=295$  K).

**3.2.1. Τεχνική της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Homonuclear Correlated Spectroscopy, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ).** Η τεχνική που εφαρμόστηκε πρωταρχικά στο μίγμα των δώδεκα προτύπων ενώσεων ήταν η ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Homonuclear Correlated Spectroscopy,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY). Στην περίπτωση αυτή ο διδιάστατος χάρτης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα πρωτόνια που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών λόγω σταθεράς σύζευξης. Για παράδειγμα οι αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών των πρωτονίων του καφεϊκού οξέος μπορούν να παρασταθούν στο Σχήμα 3.5. Επισημαίνεται ότι παρότι σταθερές σύζευξης  $^5\text{J}$  σε αρωματικά συστήματα έχουν παρατηρηθεί με τιμές 0.4-0.7 Hz (Πίνακας 2.1) δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξή τους στην παρούσα μελέτη. Τούτο πιθανόν να οφείλεται στο ότι η τιμή των  $^5\text{J}$  είναι μικρότερες των τιμών του Πίνακα 2.1.



**Σχήμα 3.5.:** Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων λόγω σταθερών σύζευξης των πρωτονίων του καφεϊκού οξέος με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Τα βέλη παριστάνουν τους πυρήνες που βρίσκονται σε σύζευξη μέσω δεσμών και επομένως δίνουν σήματα (διασταυρούμενες κορυφές) εκτός διαγωνίου.

Στο Σχήμα 3.6 παρουσιάζεται ο διδιάστατος χάρτης COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών οξέων σε διάλυμα δευτεριωμένης μεθανόλης. Επισημαίνεται πως οι συχνότερες συντονισμούς των υπό σύζευξη πυρήνων βρίσκονται φέρνοντας κάθετες ευθείες με αφετηρία τη διασταυρούμενη κορυφή προς τις δύο διαστάσεις. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται το σύστημα spin των πρωτονίων του κάθε φαινολικού οξέος, όπως ενδεικτικά παρουσιάζεται για το *p*-υδροξυβενζοϊκό (b), *o*-κουμαρικό (c<sub>o</sub>) και καφεϊκό οξύ (c).

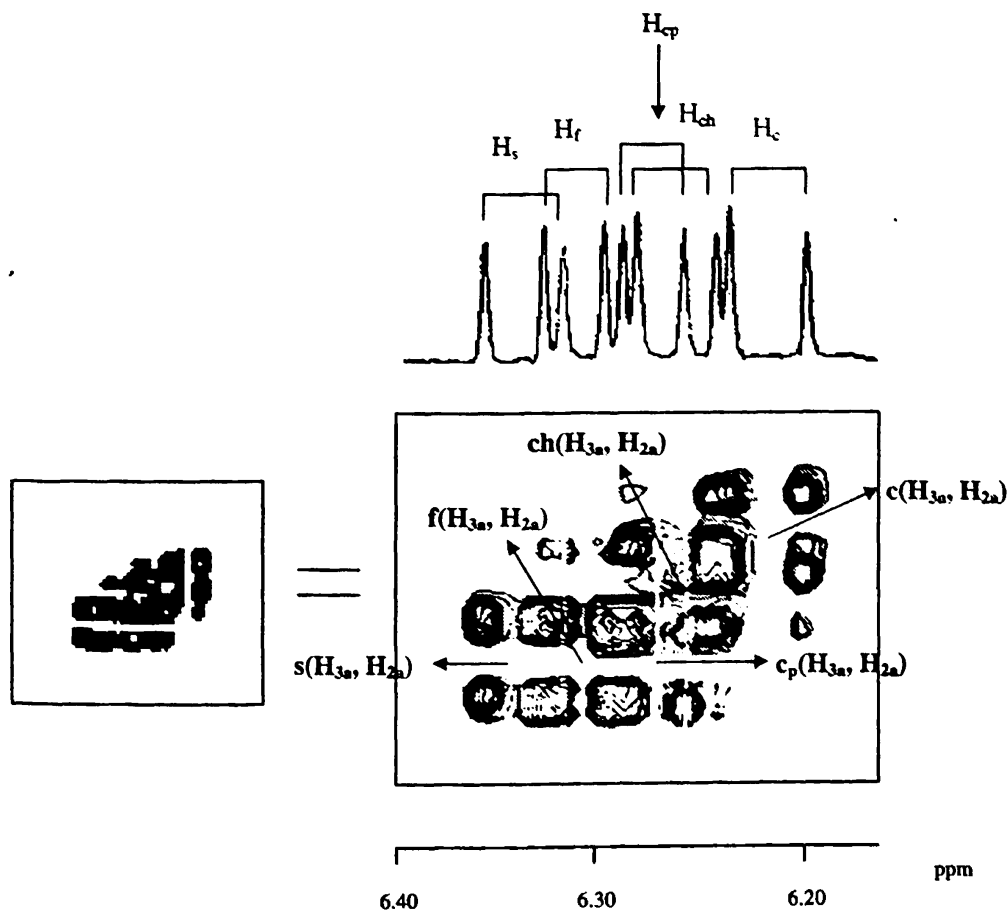


Σχήμα 3.6.: (A) Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών ενώσεων σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη,  $\text{CD}_3\text{OD}$ . (B) Επιλεγμένη περιοχή από 6.00 έως 8.00 ppm του ίδιου φάσματος. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διασταυρούμενες κορυφές του συστήματος spin του *p*-υδροξυβενζοϊκού (b), *o*-κουμαρικού ( $c_o$ ) και του καφεϊκού οξέος (c) ( $NS=48$ ,  $T=295$  K, χρόνος πειράματος  $t_{exp}=4,6$  h) (Gerothanassis et al., 1998).





Αναλυτικότερα, εστιάζοντας το ενδιαφέρον στην περιοχή από 6.20 έως 6.40 ppm, στην οποία εμφανίζονται τα πρωτόνια  $H_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκιναμωμικού οξέος, παρατηρήθηκε ότι με την εισαγωγή της δεύτερης διάστασης είναι δυνατή η ταυτοποίηση των  $H_{2a}$  όλων των παραγώγων. Γενικά, δύο διασταυρούμενες κορυφές συμπίπτουν μόνο στην περίπτωση που τα πρωτόνια, τα οποία βρίσκονται σε σύζευξη μεταξύ τους, έχουν τις ίδιες ακριβώς χημικές μετατοπίσεις. Έτσι, ενώ στο μονοδιάστατο φάσμα οι χημικές μετατοπίσεις των  $H_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκιναμωμικού οξέος κυμαίνονται στη στενή περιοχή των 0.1 ppm, στο διδιάστατο χάρτη είναι εφικτή η διάκρισή τους ώστε να μπορούν πλέον να ταυτοποιηθούν. Αυτό συνεπάγεται και την ταυτοποίηση των πρωτονίων  $H_{3a}$  με τα οποία συζεύγνυνται. Στο Σχήμα 3.7 παρουσιάζεται ένα τμήμα του διδιάστατου χάρτη που περιλαμβάνει τις διασταυρούμενες κορυφές των ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ) του καφεϊκού (c), χλωρογενικού (ch), p-κουμαρικού (cp), φερούλικού (f) και σιναλικού (s) οξέος.

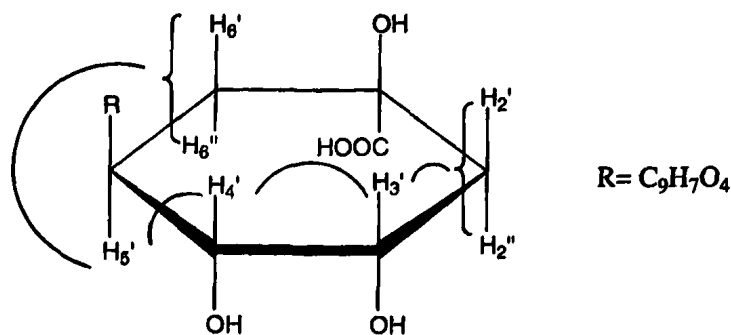


Σχήμα 3.7.: Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος COSY  $^1H$ - $^1H$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών ενώσεων όπου παρουσιάζεται η ταυτοποίηση των διασταυρούμενων κορυφών των ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ) του καφεϊκού (c), χλωρογενικού (ch), p-κουμαρικού (cp), φερούλικού (f) και σιναλικού (s) οξέος.

Είναι φανερό πως η εισαγωγή της δεύτερης διάστασης επιφέρει την αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας και μειώνει κατά πολύ την αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού. Η τεχνική αυτή μπορεί, συνεπώς, να αποτελέσει μια πολύ καλή αρχή για την ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων σε ένα πολύπλοκο μίγμα όπως αυτό των φυτικών εκχυλισμάτων χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους στα επιμέρους συστατικά.

### 3.2.2. Τεχνική της ολικώς συσχετιζόμενης φασματοσκοπίας $^1\text{H}-^1\text{H}$ (Total Correlated Spectroscopy, TOCSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ ).

Μία τεχνική που μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά ή και σε συνδυασμό με την ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης, είναι η ολικώς συσχετιζόμενη φασματοσκοπία  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (Total Correlated Spectroscopy, TOCSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ). Όπως αναλύθηκε διεξοδικά στο Κεφάλαιο 2 η τεχνική αυτή αποκαλύπτει συσχετίσεις πυρήνων μέσω δεσμών που δεν συνδέονται άμεσα αλλά συζεύγγονται από κοινού με έναν τρίτο πυρήνα. Η τεχνική TOCSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως τεχνική για την μελέτη πεπτιδίων και πρωτεϊνών, εξαιτίας του πλεονεκτήματός της να αποκαλύπτει αλληλεπιδράσεις μεταξύ «απομακρυσμένων» πυρήνων (Wuthrich, 1989). Στην περίπτωση των πυρήνων των φαινολικών οξέων και επιλέγοντας και πάλι ως παράδειγμα το καφεϊκό οξύ στο Σχήμα 3.5, θα παρατηρούσαμε στο δισδιάστατο χάρτη της τεχνικής TOCSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  την εκτός διαγωνίου διασταυρούμενη κορυφή μεταξύ των πυρήνων  $\text{H}_2$  και  $\text{H}_5$ . Μία τέτοιου είδους αλληλεπίδραση μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί το σύστημα spin του δακτυλίου του καφεϊκού οξέος έχει περιορισμένο αριθμό συζεύξεων δύο πυρήνων ως προς τρίτο πυρήνα λόγω της ύπαρξης των υδροξυλομάδων. Ένα πιο ενδεικτικό παράδειγμα για τη χρήση της τεχνικής αυτής περιγράφεται στο Σχήμα 3.8 και αφορά το χλωρογενικό οξύ.

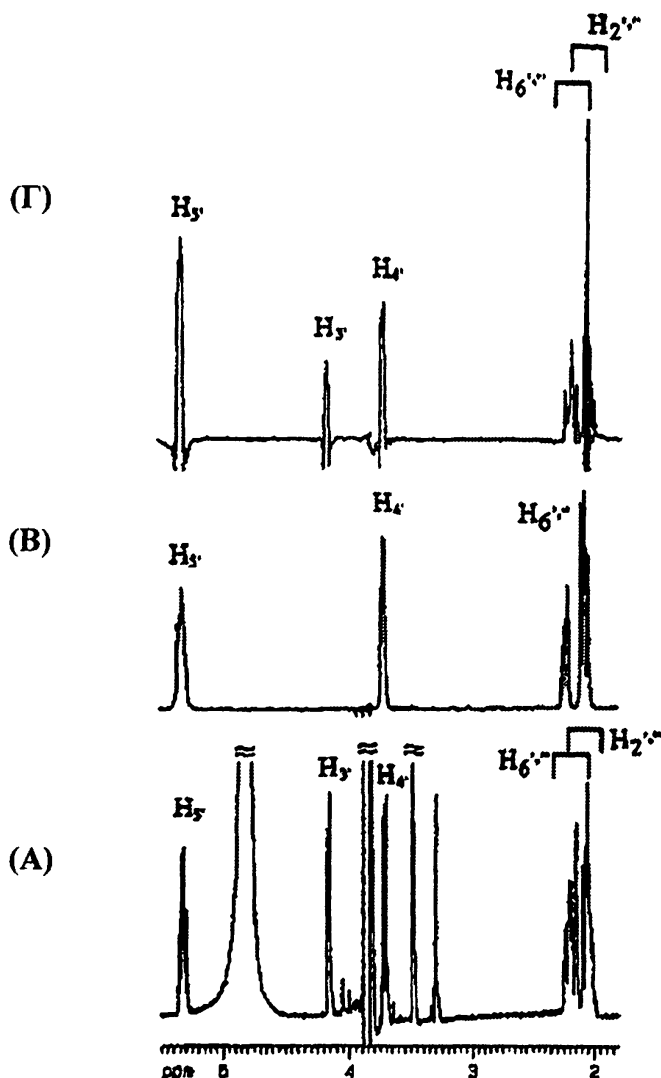


**Σχήμα 3.8.:** Σχηματική απεικόνιση των προβλεπόμενων αλληλεπιδράσεων των πρωτονίων του κυκλικού τμήματος του χλωρογενικού οξέος μέσω της φασματοσκοπίας TOCSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ . Με τη χρήση της μεθοδολογίας αυτής η αλληλεπίδραση των πυρήνων επεκτείνεται από το  $\text{H}_{6',6''}$  στο  $\text{H}_{2',2''}$  μέσω των  $\text{H}_3', \text{H}_4'$  και  $\text{H}_5'$ .



Με την τεχνική της φασματοσκοπίας TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  αποκαλύπτεται η αλληλεπίδραση των πυρήνων  $\text{H}_{6,\delta}$  με τον πυρήνα  $\text{H}_4$  μέσω του πυρήνα  $\text{H}_5$ . Η αλληλεπίδραση συνεχίζει να επεκτείνεται με τελικό αποτέλεσμα την «επικοινωνία» των spin των  $\text{H}_{6,\delta}$  και  $\text{H}_2$ . Η εκτεταμένη αυτή αλληλεπίδραση μέσω διαδοχικών δεσμών δεν μπορεί, φυσικά, να παρατηρηθεί με την τεχνική COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

Για να συγκριθούν όμως καλύτερα τα μέχρι τώρα αποτελέσματα από τη χρήση των μονοδιάστατων και δισδιάστατων τεχνικών NMR παρατίθεται το Σχήμα 3.9 που αφορά στην αλληλεπίδραση του συστήματος spin του χλωρογενικού οξέος (Σχήμα 3.2).

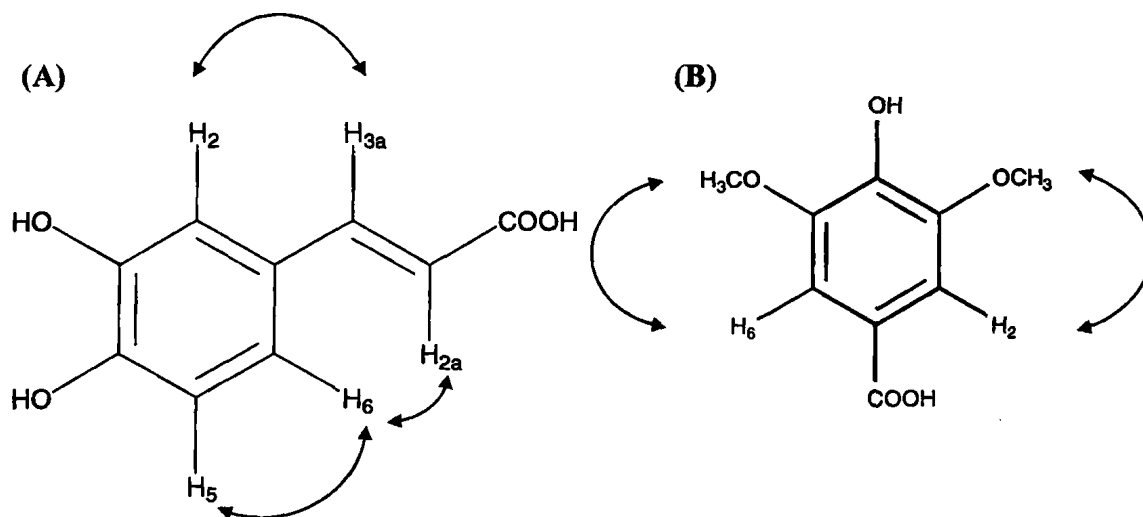


Σχήμα 3.9.: (A) Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος NMR  $^1\text{H}$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών ενώσεων στην οποία εμφανίζονται οι κορυφές συντονισμού του κυκλικού τμήματος του χλωρογενικού οξέος. (B) Η αντίστοιχη διατομή  $f_1$  του δισδιάστατου φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  στην οποία παρατηρείται η συσχέτιση των γειτονικών πυρήνων ( $\text{H}_{6,\delta}$ ,  $\text{H}_5$ ) καθώς και ( $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_4$ ). (C) Η αντίστοιχη διατομή  $f_1$  του φάσματος TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  με εμφανή την αλληλεπίδραση όλων των πρωτονίων του κυκλικού τμήματος του χλωρογενικού οξέος (διάρκεια παλμού «κλειδώματος» των spin (spin locking pulse) = 100 ms,  $T=295\text{ K}$ ,  $NS=48$ ,  $t_{exp}=4,5\text{ h}$ ) (Gerothanassis et al., 1998).



Με ανάλογο τρόπο μπορούν να ταυτοποιηθούν όλα τα φαινολικά οξέα του υπό μελέτη μίγματος με βάση την αλληλεπίδραση των spin των πυρήνων τους μέσω δεσμών. Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι προαναφερόμενες τεχνικές είναι ικανές να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων σε μίγμα αυτών παρά την αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων τους.

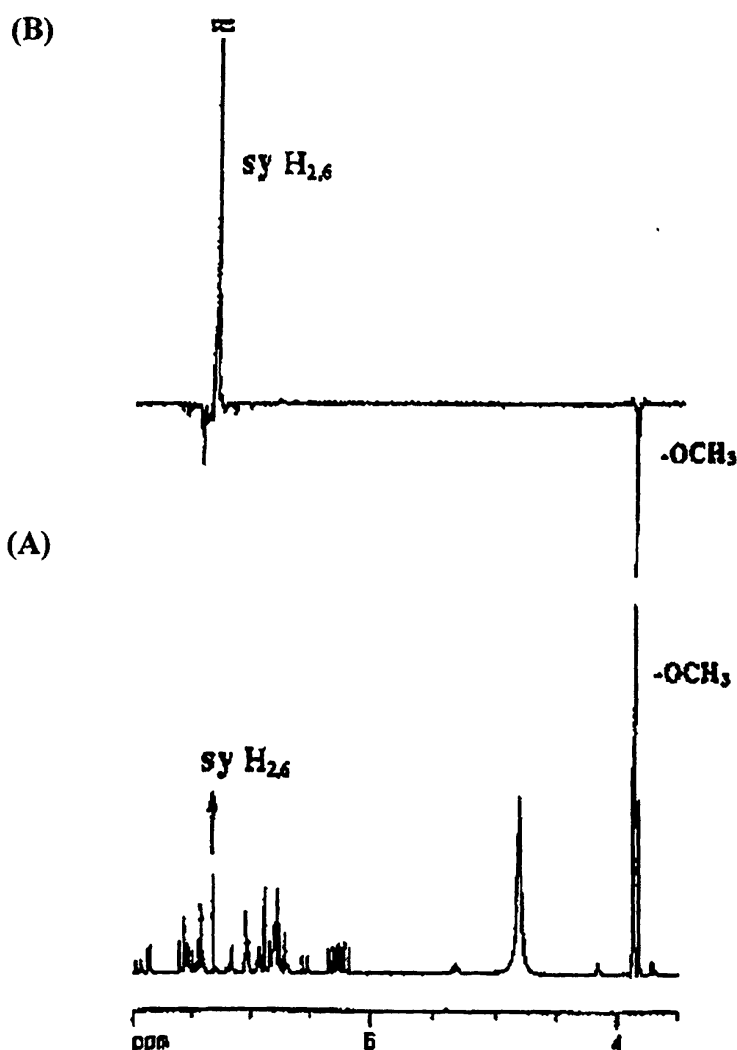
3.2.3. Τεχνική της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης μέσω του φαινομένου NOE  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy, NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ). Η τρίτη τεχνική δύο διαστάσεων που χρησιμοποιήθηκε στην ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων σε μίγμα αυτών, στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των spin των πυρήνων μέσω του χώρου, όπως αναλύθηκε διεξοδικά στο θεωρητικό Κεφάλαιο 2. Πρακτικά, η τεχνική NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  χρησιμοποιείται προκειμένου να διαπιστωθεί η προσέγγιση των πρωτονίων μέσω του χώρου, πληροφορία που δεν εξάγεται από τις τεχνικές COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  και TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  που αναφέρονται στην μέσω δεσμών αλληλεπίδραση. Η τεχνική NOESY ή ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , σε συνδυασμό με τις δύο προηγούμενες τεχνικές μπορεί να οδηγήσει στην σύνδεση των επιμέρους συστημάτων των spin με συνέπεια την ταυτοποίηση ολόκληρου του μορίου. Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων, η κύρια χρήση της μεθοδολογίας αυτής έγκειται στη σύνδεση των ομάδων  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  και  $-\text{OCH}_3$  με τα πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου, που είναι αδύνατο να επιτευχθεί με άλλο τρόπο. Στο Σχήμα 3.10 παριστάνεται ο πιθανός τρόπος σύνδεσης των πρωτονίων του καφεϊκού και συριγγικού οξέος με βάση τα φαινόμενα NOE/ROE.



Σχήμα 3.10.: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων NOE (επιδεικνύονται με τα βέλη) των πρωτονίων (A) του καφεϊκού οξέος και (B) του συριγγικού οξέος.

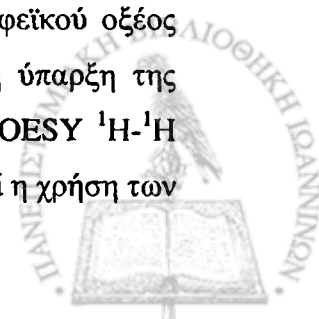


Στο Σχήμα 3.11 που ακολουθεί παρουσιάζεται η εφαρμογή της μεθοδολογίας στο μίγμα των δώδεκα φαινολικών ενώσεων, με έμφαση στο σύστημα spin του συριγγικού οξέος.

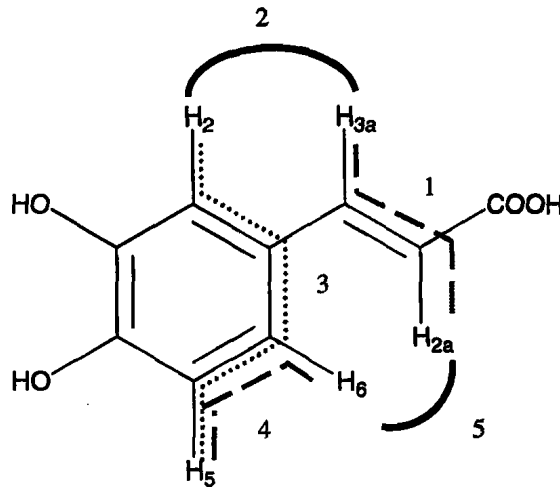


Σχήμα 3.11.: (A) Συμβατικό φάσμα NMR  $^1\text{H}$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών ενώσεων, (B) επιλεγμένη διατομή  $f_1$  του φάσματος ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μίγματος των δώδεκα φαινολικών ενώσεων που δείχνει τη διασταυρούμενη κορυφή μεταξύ των πρωτονίων  $-H_{2,6}$  και  $-OCH_3$  του συριγγικού οξέος ( $T=295\text{ K}$ ,  $NS=96$ ,  $t_{exp}=9.3\text{ h}$ ) (Gerothanassis et al., 1998).

Ανακεφαλαιώνοντας τα όσα αναλύθηκαν πιο πάνω, ο κατάλληλος συνδυασμός των τριών τεχνικών αποκαλύπτει το σύστημα των spin ολόκληρου του μορίου χρησιμοποιώντας εναλλάξ τις μεθοδολογίες NOESY/ROESY και COSY/TOCSY (Gerothanassis et al., 1998). Για παράδειγμα η ταυτοποίηση του συστήματος spin των πρωτονίων του καφεϊκού οξέος ξεκινά με την ανάλυση του φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , όπου διαπιστώνεται η ύπαρξη της διασταυρούμενης κορυφής  $c(H_{3a}, H_{2a})$ . Στη συνέχεια αναλύοντας το φάσμα ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  παρατηρούνται οι διασταυρούμενες κορυφές  $c(H_{3a}, H_2)$  και  $c(H_{2a}, H_6)$ . Ακολουθεί η χρήση των



τεχνικών COSY και TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  για την εύρεση των συσχετίσεων μεταξύ  $c(\text{H}_5, \text{H}_6)$  και  $c(\text{H}_2, \text{H}_6)$  αντίστοιχα και ολοκληρώνεται η ταυτοποίηση του καφεϊκού οξέος όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.12.



**Σχήμα 3.12.:** Ταυτοποίηση του συστήματος spin των πρωτονίων του καφεϊκού οξέος, όπου οι στικτές γραμμές υποδεικνύουν τις επιμέρους συσχετίσεις μεταξύ των πυρήνων: 1  $c(\text{H}_{3a}, \text{H}_{2a})$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (— —), 2  $c(\text{H}_{3a}, \text{H}_2)$  ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (—), 3  $c(\text{H}_2, \text{H}_6)$  TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (· · · · ·), 4  $c(\text{H}_5, \text{H}_6)$  COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (—), και 5  $c(\text{H}_{2a}, \text{H}_6)$ .  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (—).

Με ανάλογο τρόπο μπορούν να ταυτοποιηθούν τα συστήματα spin και των δώδεκα φαινολικών οξέων. Έτσι ο συνδυασμός των ομοπυρηνικών διαστάσεων τεχνικών COSY/TOCSY και NOESY/ROESY αποτελεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στην ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε μίγμα γνωστής σύστασης.

### 3.3. Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε φυτικά εκχυλίσματα

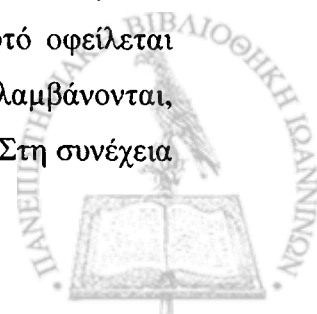
Σκοπός του τμήματος αυτού του κεφαλαίου είναι η εφαρμογή των τριών τεχνικών δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR που αναλύθηκαν προηγουμένως, στην ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε φυτικά εκχυλίσματα. Η πρωταρχική τεχνική όπως τονίστηκε προηγουμένως, είναι η φασματοσκοπία COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  και, συνεπώς, χρησιμοποιήθηκε ευρύτερα σε σχέση με τις άλλες στη μελέτη των φυτικών εκχυλισμάτων. Επίσης, η πιο σημαντική αλληλεπίδραση θεωρήθηκε αυτή μεταξύ των πρωτονίων  $\text{H}_{3a}$  και  $\text{H}_{2a}$  των παραγώγων του υδροξυκιναμωμικού οξέος που έχει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία, δεδομένου ότι τα οξέα αυτά απαντώνται σε όλα σχεδόν τα φυτά.

3.3.1. Προεργασία φυτικών δειγμάτων. Τα φυτικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* και είναι τα ακόλουθα: *O. vulgare*, *O. onites*, *S. thymbra*, *C. capitatus*, και *O. dictamnus*. Όλα τα δείγματα εκχυλίστηκαν διαδοχικά με διαλύτες αυξανόμενης κάθε φορά πολικότητας που ήταν κατά σειρά: εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη (Λάγουρη, 1998).

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

3.3.2. Εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  σε φυτικά εκχυλίσματα. Τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *O. vulgare*, *O. onites*, *S. thymbra*, *C. capitatus*, και *O. dictamnus* διαλύθηκαν σε δευτεριωμένη μεθανόλη που περιείχε ως ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσυλλοπροπιονικό άλας του Na, (TMS- $\text{d}_4$ ), και το κάθε διάλυμα (0.5 mL) τοποθετήθηκε σε κατάλληλο σωληνάριο NMR. Ακολούθησε η λήψη φασμάτων μιας και δύο διαστάσεων καθώς και η αποτίμησή τους.

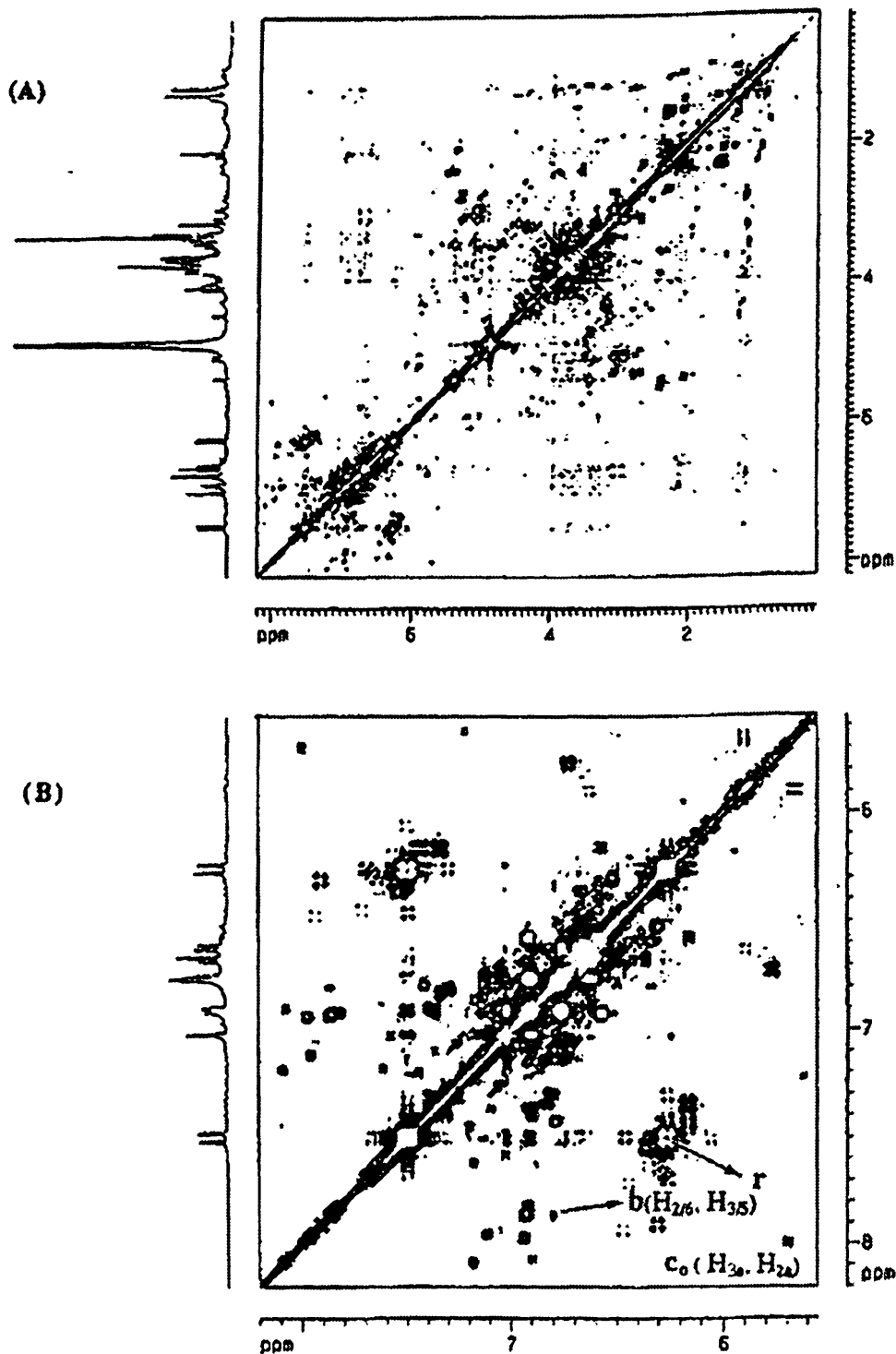
Στο Σχήμα 3.13 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές του φάσματος COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare* στις οποίες διακρίνονται τα συστήματα spin των φαινολικών οξέων π-υδροξυβενζοϊκού και ο-κουμαρικού. Αξίζει να σημειωθεί πως, ενώ στο φάσμα μιας διάστασης ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (S/N) είναι αρκετά μικρός, στο δισδιάστατο χάρτη εμφανίζονται εξαιρετικά έντονες κορυφές. Αυτό οφείλεται στον τρόπο λήψης των φασμάτων δύο διαστάσεων, σύμφωνα με τον οποίο λαμβάνονται, αρχικά, φάσματα μιας διάστασης με διαφορετικό χρόνο εξέλιξης,  $t_1$ , το καθένα. Στη συνέχεια



ακολουθεί μετασχηματισμός Fourier και συλλογή των φασμάτων στην κλίμακα συχνοτήτων, τα οποία έχουν μικρό σχετικά λόγο S/N. Ο δεύτερος μετασχηματισμός Fourier συνδυάζει την ενέργεια του σήματος κάθε κορυφής απορρόφησης από όλα τα φάσματα που λήφθηκαν για διαφορετικούς χρόνους  $t_1$ , με αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονων κορυφών που προκύπτουν ακριβώς από αυτόν τον συνδυασμό (Bax, 1985). Για παράδειγμα στο Σχήμα 3.13 (B) και ειδικότερα στο μονοδιάστατο φάσμα δεν εμφανίζεται σήμα συντονισμού για το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Αντίθετα, στο δισδιάστατο χάρτη το σύστημα  $sp^{11}$  του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος διακρίνεται εμφανώς. Η πιο έντονη διασταυρούμενη κορυφή στην αρωματική περιοχή του φάσματος του φυτού *O. vulgare*, αντιστοιχεί στο σύστημα  $sp^{11}$  του τύπου του καφεϊκού οξέος και συγκεκριμένα στη συσχέτιση των ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ).



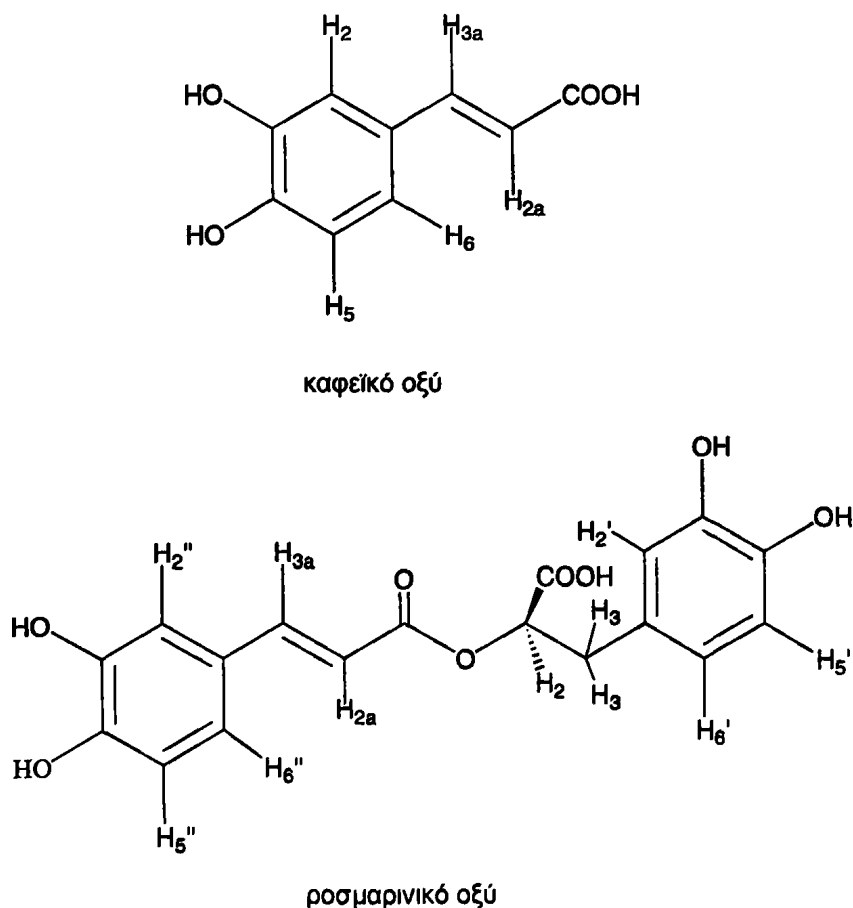




Σχήμα 3.13.: (A) Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare*. (B) Αρωματική περιοχή του ίδιου φάσματος. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διασταυρούμενες κορυφές του συστήματος spin του π-υδροξυβενζοϊκού (b), ο-κουμαρικού (c<sub>0</sub>) και ροσμαρινικού οξέος (r) (NS=64, T=295 K, t<sub>exp</sub>=11,5 h) (Gerothanassis et al., 1998).



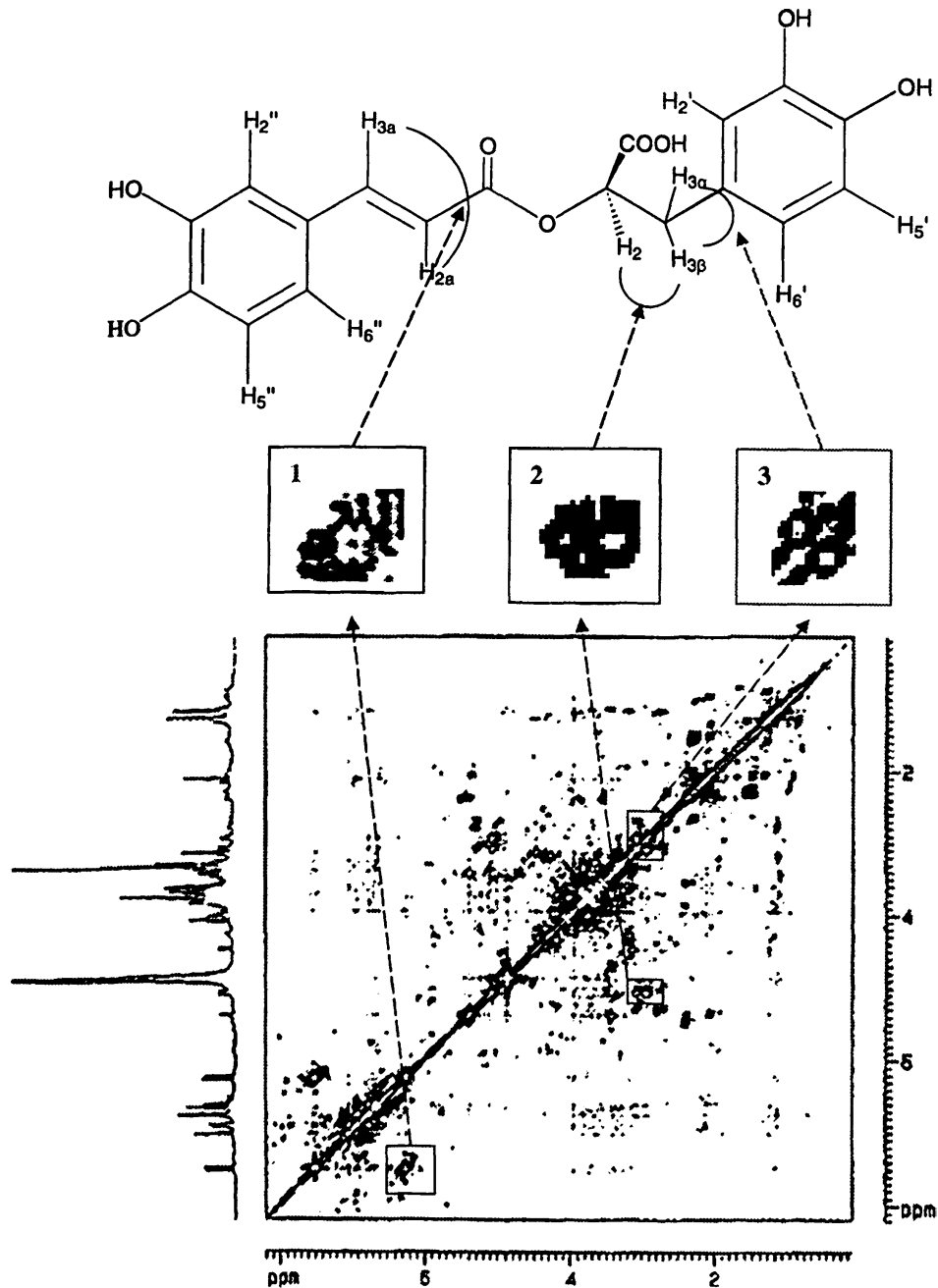
Η παραπάνω προκαταρκτική μελέτη (Gerothanassis *et al.*, 1998) αναφέρθηκε σε προηγούμενη διδακτορική διατριβή, ως συμπληρωματική της μελέτης φαινολικών οξέων στα φυτικά εκχυλίσματα *O.vulgare* και *O. onites*, με χρωματογραφικές μεθόδους (Λάγουρη, 1998). Τα πειράματα NMR επαναλήφθηκαν για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων και επεκτάθηκαν και για άλλα εκχυλίσματα. Η μελέτη των χρωματογραφημάτων των φυτών, στα οποία η ταυτοποίηση του καφεϊκού οξέος έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης και το φάσμα υπεριώδους, υπέδειξε την παρουσία καφεϊκού οξέος σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Λάγουρη, 1998). Προηγούμενες μελέτες των ερευνητών Kikuzaki και Nakatani (1989) όμως, έδειξαν την ύπαρξη ενός εστέρα του καφεϊκού οξέος, του ροσμαρινικού οξέος, που απομονώθηκε σε μεγάλες ποσότητες από μεθανολικά εκχυλίσματα του ίδιου φυτού. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η βιοσύνθεση του ροσμαρινικού οξέος πραγματοποιείται μέσω του καφεϊκού οξέος (Cuppert, 1998). Στο Σχήμα 3.14 φαίνονται συγκριτικά οι δομές του καφεϊκού και του παραγώγου του ροσμαρινικού οξέος.



Σχήμα 3.14.: Σύγκριση των δομών του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος.



Η ύπαρξη της εξίσου έντονης διασταυρούμενης κορυφής μεταξύ σημάτων στην περιοχή (2.97, 3.11) καθώς και των σημάτων στα (5.12, 3.11) και (5.12, 2.97) υποδεικνύει πως το σύστημα spin ανήκει πιθανώς όχι μόνο στο καφεϊκό οξύ αλλά και σε παράγωγά του, δεδομένου ότι τα φαινολικά οξέα μπορεί να συνυπάρχουν σε ένα εκχύλισμα τόσο στην ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένες μορφές (εστέρες, γλυκοζίτες). Στο Σχήμα 3.15 παρουσιάζονται οι διασταυρούμενες κορυφές που παρατηρούνται στο φάσμα COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare* σε αντιστοιχία με το συντακτικό τύπο του ροσμαρινικού οξέος.

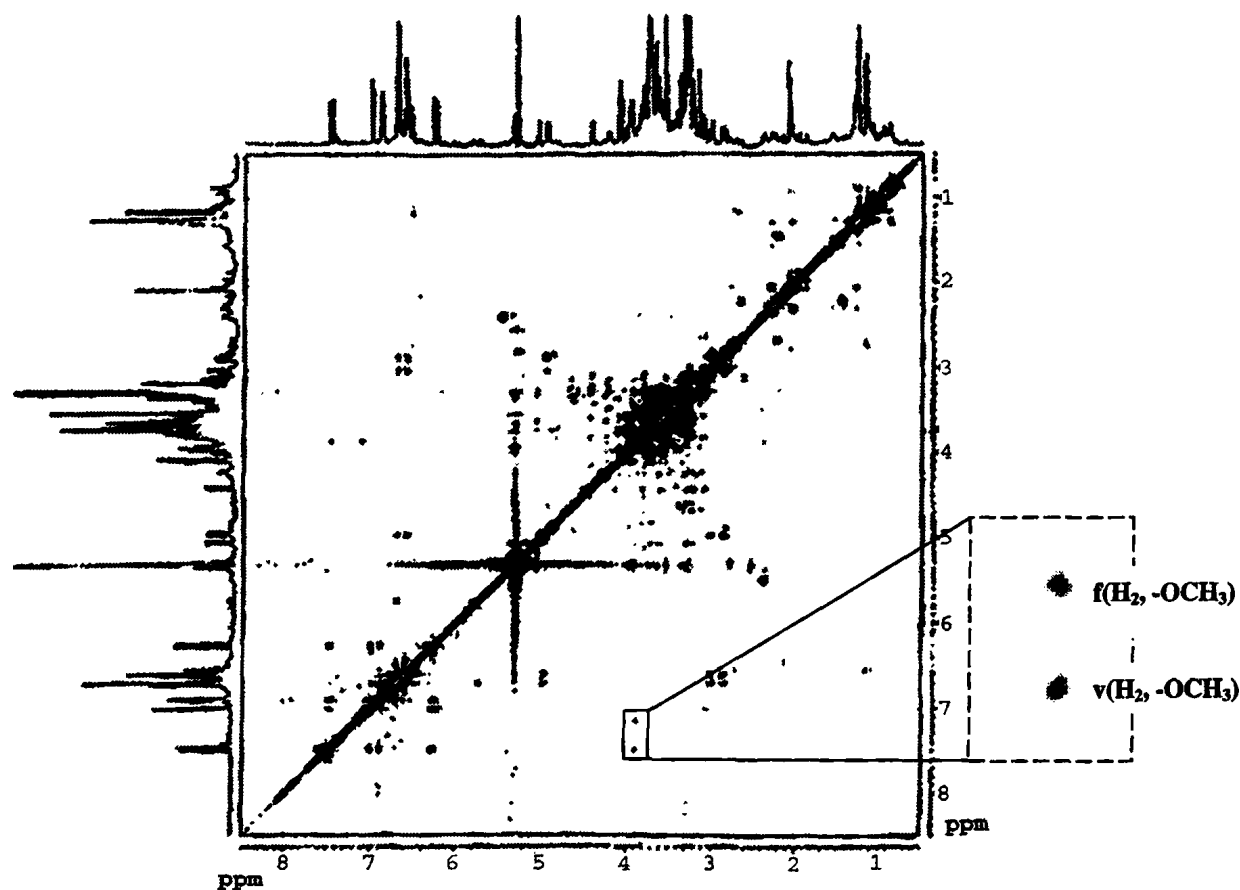


Σχήμα 3.15.: Ταυτοποίηση του συστήματος spin του ροσμαρινικού οξέος στο φάσμα COSY

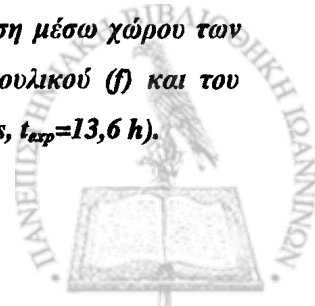
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare*. 1: ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ), 2: ( $H_2$ ,  $H_{3a,\beta}$ ), 3: ( $H_{3a}$ ,  $H_{3\beta}$ ).

Τα φαινολικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  στο μεθανολικό εκχύλισμα της Ελληνικής ρίγανης (*O.vulgare*) ήταν το *o*-κουμαρικό οξύ, το φερούλικό οξύ, το καφεϊκό/ροσμαρινικό οξύ, καθώς και το *π*-υδροξυβενζοϊκό και το βανιλικό οξύ. Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των παραπάνω οξέων στο εκχύλισμα εφαρμόστηκε και η τεχνική ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

**3.3.3. Εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  στο μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *O.vulgare*.** Στο Σχήμα 3.16 παρουσιάζεται ο δισδιάστατος χάρτης της φασματοσκοπίας ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare*.



**Σχήμα 3.16.:** Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare*. Τα βέλη υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση μέσω χώρου των πρωτονίων της μεθόξυ ομάδας με τα πρωτόνια  $\text{H}_2$  του φερούλικού (f) και του βανιλικού (v) οξέος ( $T=295\text{ K}$ ,  $NS=128$ , χρόνος αναμίξης=400 ms,  $t_{exp}=13,6\text{ h}$ ).



Οι διασταυρούμενες κορυφές που υποδεικνύονται με τα βέλη αντιστοιχούν στην μέσω χώρου αλληλεπίδραση των πρωτονίων της μεθοξυομάδας με τα πρωτόνια  $H_2$  του φερουλικού και του βανιλικού οξέος και με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται η ύπαρξή τους στο μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *O.vulgare*. Διαπιστώνεται επίσης η παρουσία των διασταυρούμενων κορυφών ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ), ( $H_{2a}$ ,  $H_6$ ) του καφεϊκού ή/και ροσμαρινικού οξέος που είναι και τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος. Επίσης, παρατηρείται η αλληλεπίδραση μέσω χώρου των πρωτονίων  $H_{3a}$ ,  $H_{3\beta}$  και  $H_5$  που συντονίζονται στα 2.97, 3.11 και 5.12 ppm με τα αρωματικά πρωτόνια  $H_2$  και  $H_6$ .

Με τον ίδιο τρόπο μελετήθηκαν και τα υπόλοιπα εκχυλίσματα και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 που ακολουθεί.

Πίνακας 3.2.: Ταυτοποίηση φαινολικών οξέων σε φυτικά εκχυλίσματα

Φυτικό εκχύλισμα	Φαινολικά οξέα
<i>O. vulgare</i>	ο-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, καφεϊκό/ροσμαρινικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ
<i>O. onites</i>	φερουλικό οξύ, καφεϊκό/ροσμαρινικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ
<i>S. thymbra</i>	καφεϊκό/ροσμαρινικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ
<i>C. capitatus</i>	καφεϊκό/ροσμαρινικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλικό οξύ
<i>O. dictamnus</i>	καφεϊκό/ροσμαρινικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ



### 3.4. Συμπεράσματα-Αξιολόγηση της προκαταρκτικής μελέτης των φυτικών εκχυλίσμάτων με τη χρήση ομοπυρηνικών δισδιάστατων τεχνικών NMR $^1\text{H}-^1\text{H}$

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της ομοπυρηνικής μεθοδολογίας COSY/TOCSY και NOESY/ROESY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  τόσο στο πρότυπο μίγμα των φαινολικών οξέων όσο και στα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπό μελέτη φυτών, είναι πως η παραπάνω μεθοδολογία μπορεί να αποτελέσει ένα πρωταρχικό σημαντικό βήμα στην ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων χωρίς τον προηγούμενο αναλυτικό διαχωρισμό τους. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι κυρίως:

- (α) Η δυνατότητά της να αποκαλύπτει τα επιμέρους συστήματα spin των πρωτονίων των φαινολικών οξέων αλλά και να τα συνδέει μεταξύ τους, ώστε να προκύπτει ολόκληρο το σύστημα spin του μορίου.
- (β) Τα αξιόπιστα αποτελέσματα που λαμβάνονται σε σχετικά μικρό πειραματικό χρόνο και με τη μικρότερη δυνατή κατεργασία του δείγματος.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η αδυναμία της να διαχωρίσει στο δισδιάστατο χάρτη τα φαινολικά οξέα από τα παράγωγα τους όταν αυτά έχουν πολύ μικρές διαφορές χημικών μετατοπίσεων. Έτσι, για παράδειγμα, διαπιστώθηκε η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος χωρίς να μπορεί να γίνει σαφής διαχωρισμός των διασταυρούμενων κορυφών ( $\text{H}_{3a}$ ,  $\text{H}_{2a}$ ) του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος. Επιπλέον, με την ομοπυρηνική φασματοσκοπία δε μπορούν να συνδεθούν τα επιμέρους συστήματα spin των πρωτονίων όταν διακόπτονται από ετεροάτομα και δεν αλληλεπιδρούν μέσω χώρου. Ενδεικτικά αναφέρεται η περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος, το σύστημα spin του οποίου διακόπτεται από την εστερομάδα.

Ένα δεύτερο σημείο που θα πρέπει να τονιστεί είναι πως ο συνδυασμός των τεχνικών εφαρμόστηκε σε εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη διαδοχική εκχύλιση με τέσσερις διαλύτες, γεγονός που σημαίνει πως η σύστασή του έχει απλοποιηθεί σημαντικά. Το ερώτημα λοιπόν που μπορεί να τεθεί είναι κατά πόσον ο παραπάνω συνδυασμός τεχνικών NMR θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε εκχυλίσματα που λαμβάνονται με ένα μόνο διαλύτη και, συνεπώς, είναι αρκετά πιο πολύπλοκα. Ένα δεύτερο ερώτημα αφορά στην ικανότητα εφαρμογής των μεθοδολογιών NMR στον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών οξέων που περιέχονται σε ένα εκχύλισμα.

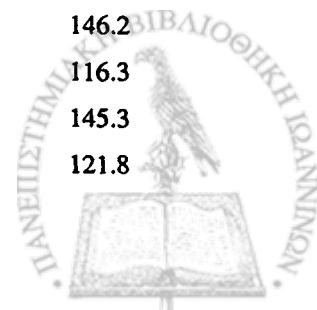


### 3.5. Διάκριση καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με τη χρήση τεχνικών NMR

Σε προηγούμενη ενότητα διαπιστώθηκε η αδυναμία διαχωρισμού του ροσμαρινικού από το καφεϊκό οξύ με την τεχνική COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Τα δύο οξέα, παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και αποτελούν σημαντικά συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων. Σύμφωνα με τις μελέτες του Nardini και των συνεργατών του, όταν το καφεϊκό οξύ υπάρχει στα κύτταρα δεν παρατηρούνται φαινόμενα τοξικότητας αλλά αυξημένης αντοχής στην οξείδωση (Nardini *et al.*, 1995, Nardini *et al.*, 1998). Επιπλέον, το ροσμαρινικό οξύ είναι δραστική ένωση κατά του ιού του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος τύπου I (HIV-1) (Mazumder *et al.*, 1997). Το ροσμαρινικό οξύ, λόγω της παρουσίας δύο φαινολικών δακτυλίων του τύπου του καφεϊκού οξέος, παρουσιάζει τις ίδιες σχεδόν χημικές μετατοπίσεις με το καφεϊκό οξύ τόσο στη φασματοσκοπία NMR- $^1\text{H}$  όσο και στη φασματοσκοπία NMR- $^{13}\text{C}$ . Στον Πίνακα 3.3 αναγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις των δύο ενώσεων σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη που περιέχει ως ένωση αναφοράς το τετραμεθυλοσιλυλοπροπιονικό άλας του Na (TMSP- $d_4$ ).

Πίνακας 3.3.: Χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) NMR- $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη

Καφεϊκό οξύ				Ροσμαρινικό οξύ			
Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	$\delta$ (ppm)	Πρωτόνιο	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	$\delta$ (ppm)
H <sub>3a</sub>	7.51	C <sub>1</sub>	127.3	H <sub>3a</sub>	7.53	C <sub>1'</sub>	127.9
H <sub>2a</sub>	6.20	C <sub>2</sub>	114.8	H <sub>2a</sub>	6.24	C <sub>2'</sub>	115.3
H <sub>2</sub>	7.02	C <sub>3</sub>	147.0	H <sub>2'</sub>	7.02	C <sub>3'</sub>	146.7
H <sub>5</sub>	6.76	C <sub>5</sub>	116.7	H <sub>5'</sub>	6.76	C <sub>5'</sub>	116.5
H <sub>6</sub>	6.92	C <sub>4</sub>	149.8	H <sub>6'</sub>	6.94	C <sub>4'</sub>	149.5
		C <sub>6</sub>	123.0	H <sub>2</sub>	5.12	C <sub>6'</sub>	123.0
		C <sub>1a</sub>	171.4	H <sub>3a</sub>	2.97	C <sub>1a</sub>	168.7
		C <sub>2a</sub>	115.7	H <sub>3β</sub>	3.11	C <sub>2a</sub>	115.1
		C <sub>3a</sub>	145.6	H <sub>2'</sub>	6.73	C <sub>3a</sub>	142.8
				H <sub>5'</sub>	6.67	C <sub>1</sub>	173.5
				H <sub>6'</sub>	6.59	C <sub>2</sub>	75.0
						C <sub>3</sub>	38.0
						C <sub>1'</sub>	129.2
						C <sub>2'</sub>	117.6
						C <sub>3'</sub>	146.2
						C <sub>5'</sub>	116.3
						C <sub>4'</sub>	145.3
						C <sub>6'</sub>	121.8

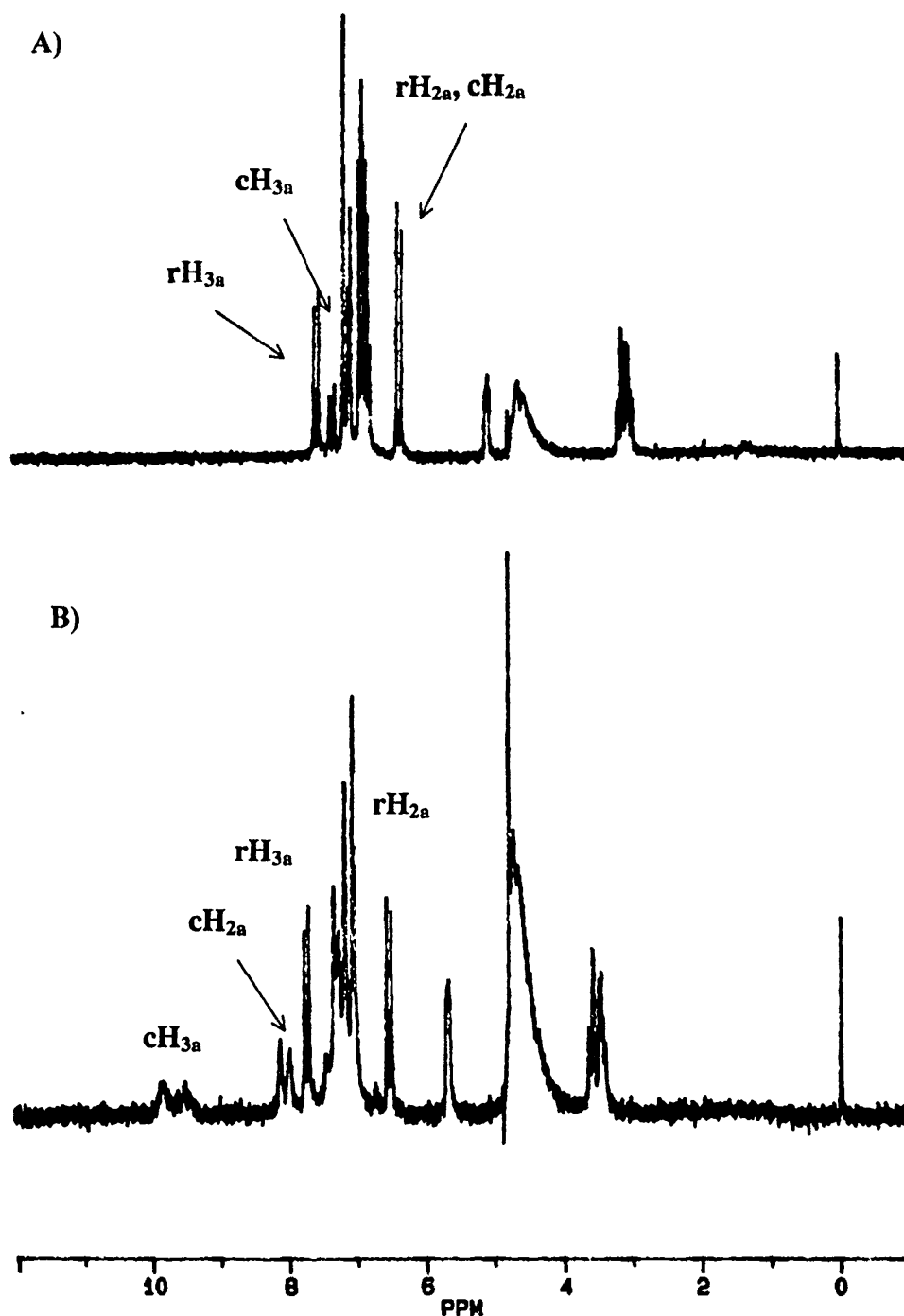


Από τον Πίνακα 3.3 γίνεται φανερό πως ο διαχωρισμός του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος είναι δύσκολος με τις συνήθεις τεχνικές της φασματοσκοπίας NMR, εξαιτίας της σύμπτωσης, σε μεγάλο βαθμό, των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων και των ανθράκων τους. Ειδικότερα στην περίπτωση που η συγκέντρωση του ενός από τα δύο συστατικά είναι κατά πολύ μεγαλύτερη του άλλου, ο διαχωρισμός των διασταυρούμενων κορυφών καθίσταται ακόμη πιο δύσκολος. Τέτοιες διαφορές ως προς τη συγκέντρωση είναι δυνατό να υπάρχουν, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 3.13 από τις έντονες διασταυρούμενες κορυφές που αποδίδονται στην παρουσία του ροσμαρινικού οξέος.

Ένας τρόπος ταυτοποίησης των δύο οξέων με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR είναι η χρήση λανθανιδίων ως αντιδραστηρίων μετατόπισης (Shift Reagents, SR). Η συμπλοκοποίηση ενός παραμαγνητικού μεταλλικού ιόντος με κάποιον υποκαταστάτη έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και, συνεπώς, τη μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού των πυρήνων που βρίσκονται σε γειτνίαση με το ιόν του μετάλλου (Allinger and Eliel, 1976). Η μελέτη της συμπεριφοράς των δύο οξέων σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό παρουσία του αντιδραστηρίου χημικής μετατόπισης χλωριούχου πρασεοδυμίου,  $\text{PrCl}_3$ , σε διάφορες συγκεντρώσεις έδειξε πως το ιόν  $\text{Pr}^{+3}$  συμπλέκεται εκλεκτικώς με την αποπρωτονιωμένη καρβοξυλομάδα του καφεϊκού οξέος, σε αντίθεση με εκείνη του ροσμαρινικού οξέος. Το παραπάνω υποδεικνύεται από τη χημική μετατόπιση των κορυφών απορρόφησης των  $\text{cH}_{3a}$ ,  $\text{cH}_{2a}$ ,  $\text{rH}_{3a}$ , και  $\text{rH}_{2a}$  που γειτνιάζουν με τη θέση της συμπλοκοποίησης και κατά συνέπεια αντιλαμβάνονται τη διαφοροποίηση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Στο Σχήμα 3.17 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR  $^{-1}\text{H}$  του μίγματος των δύο οξέων χωρίς την επίδραση του αντιδραστηρίου μετατόπισης (Σχήμα 3.17(A)) και παρουσία του  $\text{PrCl}_3$ , με αναλογία συγκέντρωσης του αντιδραστηρίου μετατόπισης προς συγκέντρωση του υποκαταστάτη  $[\text{SR}]/[\text{L}] = 1$  (Σχήμα 3.17(B)). Με την παραπάνω μεθοδολογία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων ακόμη και στο φυτικό εκχύλισμα με τη βοήθεια της τεχνικής COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , η οποία αποκαλύπτει πως οι διασταυρούμενες κορυφές των  $\text{c}(\text{H}_{3a}, \text{H}_{2a})$  και  $\text{r}(\text{H}_{3a}, \text{rH}_{2a})$  απέχουν πλέον κατά 1,5 ppm ((Εξάρχου, 2000).

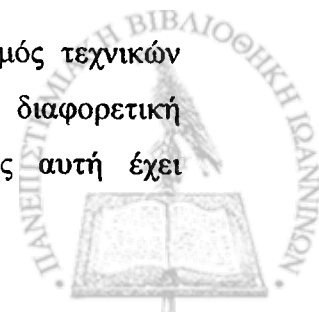




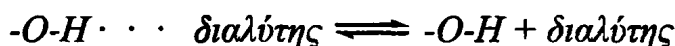
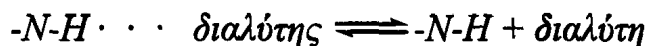


Σχήμα 3.17.: Φάσματα NMR  $^1\text{H}$  ισομοριακού μίγματος καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος: A) χωρίς την προσθήκη του αντιδραστηρίου μετατόπισης, B) με αναλογία συγκέντρωσης του αντιδραστηρίου μετατόπισης προς συγκέντρωση του υποκαταστάτη  $[\text{SR}]/[\text{L}] = 1$ . Σημειώνεται ότι δεν παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών απορρόφησης του ροσμαρινικού οξέος σε αντίθεση με του καφεϊκού οξέος που μετατοπίζονται σημαντικά (Εξάρχου, 2000).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε ένας άλλος συνδυασμός τεχνικών διάκρισης σχεδόν ταυτόσημων χημικών μετατοπίσεων, που στηρίζεται στη διαφορετική εξάρτηση των χημικών μετατοπίσεων από τη θερμοκρασία. Η μέθοδος αυτή έχει

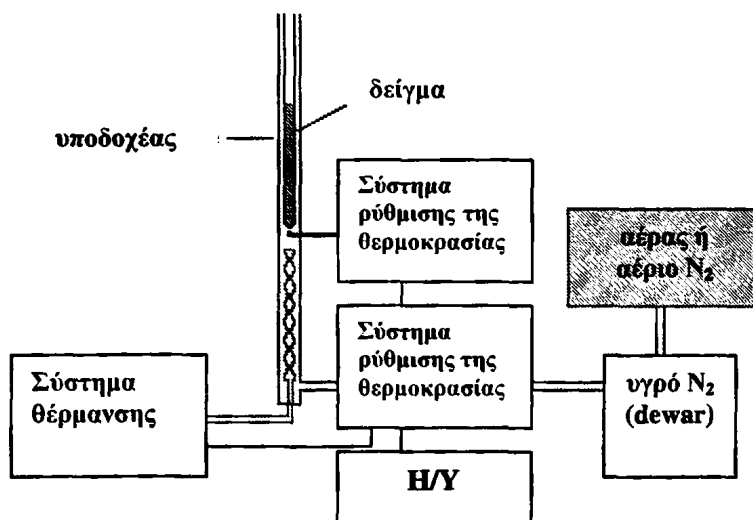


χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του βαθμού έκθεσης των χαρακτηριστικών ομάδων της διαλυμένης ένωσης στο διαλύτη με σκοπό το διαχωρισμό των αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών συντονισμού, κυρίως στην περίπτωση πεπτιδίων, πρωτεϊνών και σακχάρων (Deslaurier and Smith, 1980, Gagnaire, *et al.*, 1982, Wishart, *et al.*, 1991, Andersen, *et al.*, 1997, Baxter, *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα, η μεταβολή της θερμοκρασίας επηρεάζει την ισορροπία του τύπου:



και κατ'επέκταση τη χημική μετατόπιση της κορυφής συντονισμού των -N-H και -O-H. Με την τεχνική της μεταβλητής θερμοκρασίας εξάγονται πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, την ταχύτητα ανταλλαγής πρωτονίων, την ύπαρξη ενδιάμεσων προϊόντων που είναι ασταθή στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, κ.α.

Οι σύγχρονοι φασματογράφοι είναι εξοπλισμένοι με ειδικό σύστημα μεταβολής της θερμοκρασίας που επιτρέπει τη λήψη φασμάτων σε θερμοκρασίες από  $-150$  έως  $+200$  °C. Για την επίτευξη τέτοιων θερμοκρασιών είναι απαραίτητη η διοχέτευση αζώτου στον υποδοχέα (probe) του οργάνου σε συνδυασμό με ένα ηλεκτρονικό σύστημα θέρμανσης, ρύθμισης και σταθεροποίησης της θερμοκρασίας (Σχήμα 3.18).



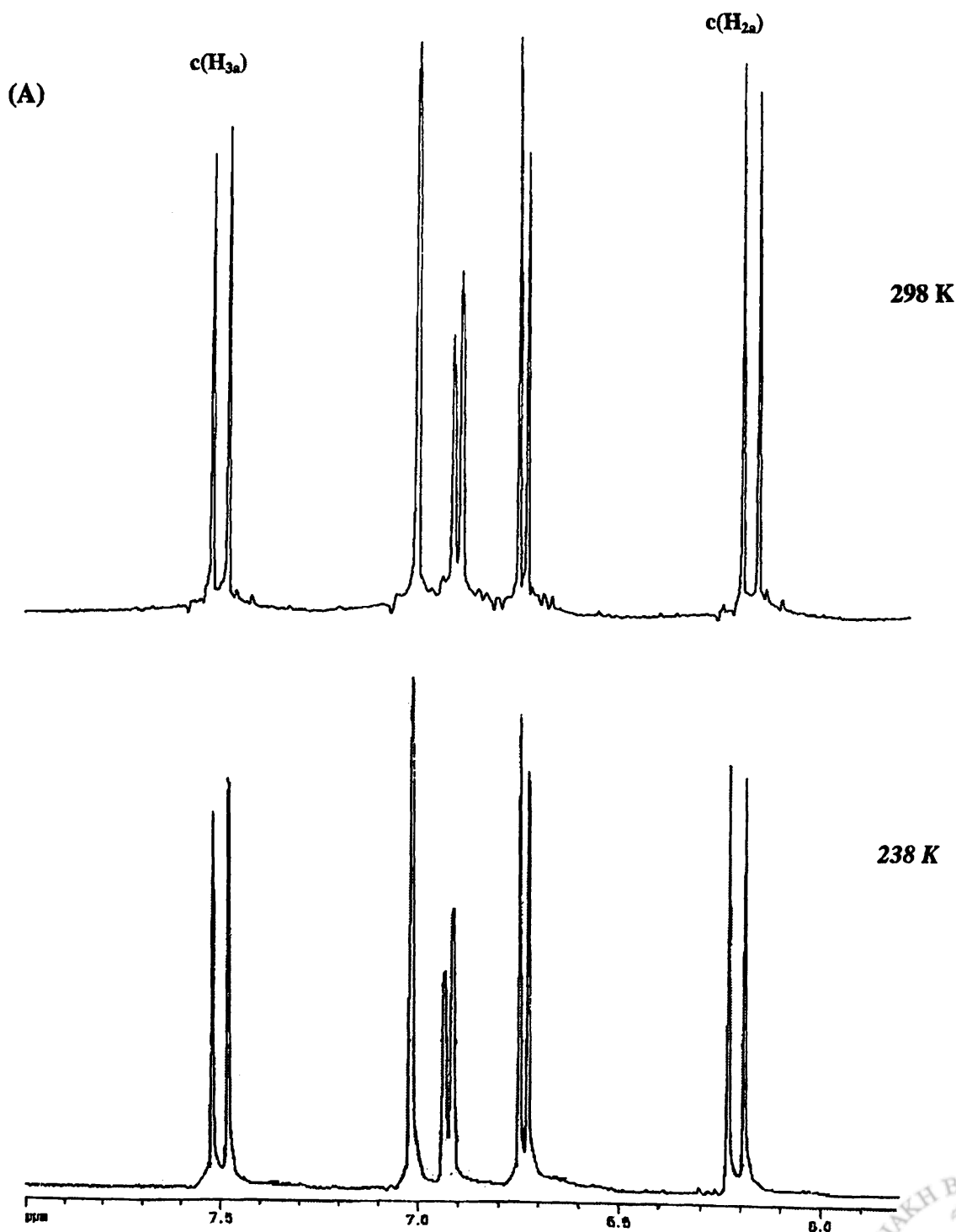
Σχήμα 3.18.: Σχηματική παράσταση του συστήματος μεταβλητής θερμοκρασίας του φασματογράφου NMR.

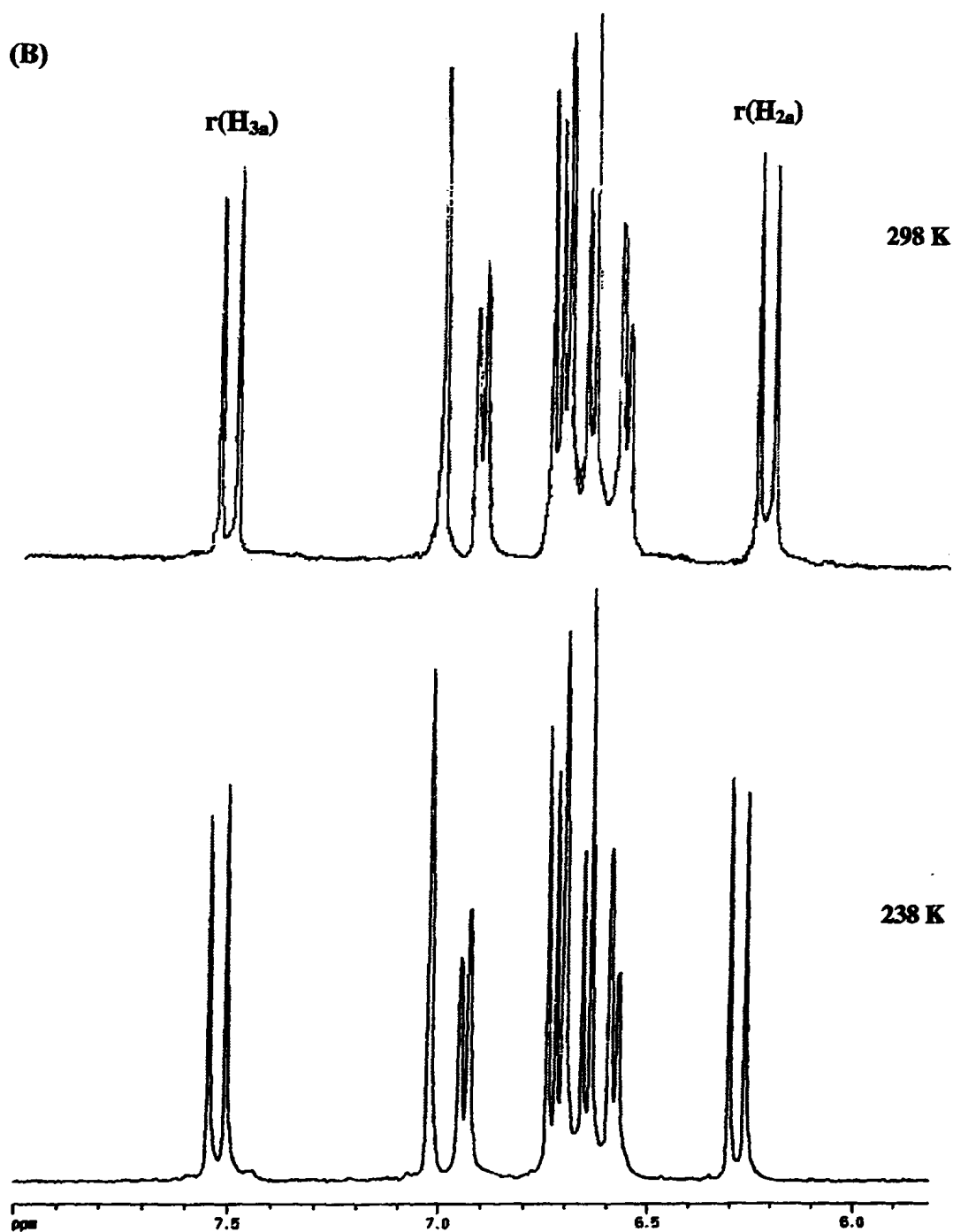
Παρόλο που η μεταβλητή θερμοκρασία στη δισδιάστατη φασματοσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη μελέτη βιομορίων (πεπτιδίων, πρωτεϊνών), δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ανάλογη εφαρμογή για την ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων.



### 3.6. Χρήση NMR μεταβλητής θερμοκρασίας

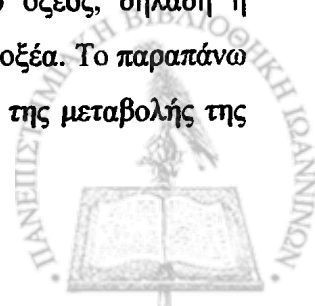
3.6.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος. Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος, πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων NMR- $^1\text{H}$  των δύο ενώσεων σε δευτεριωμένη μεθανόλη και σε διάφορες θερμοκρασίες, από 298 έως 228 K ανά 10 K (Σχήμα 3.19).



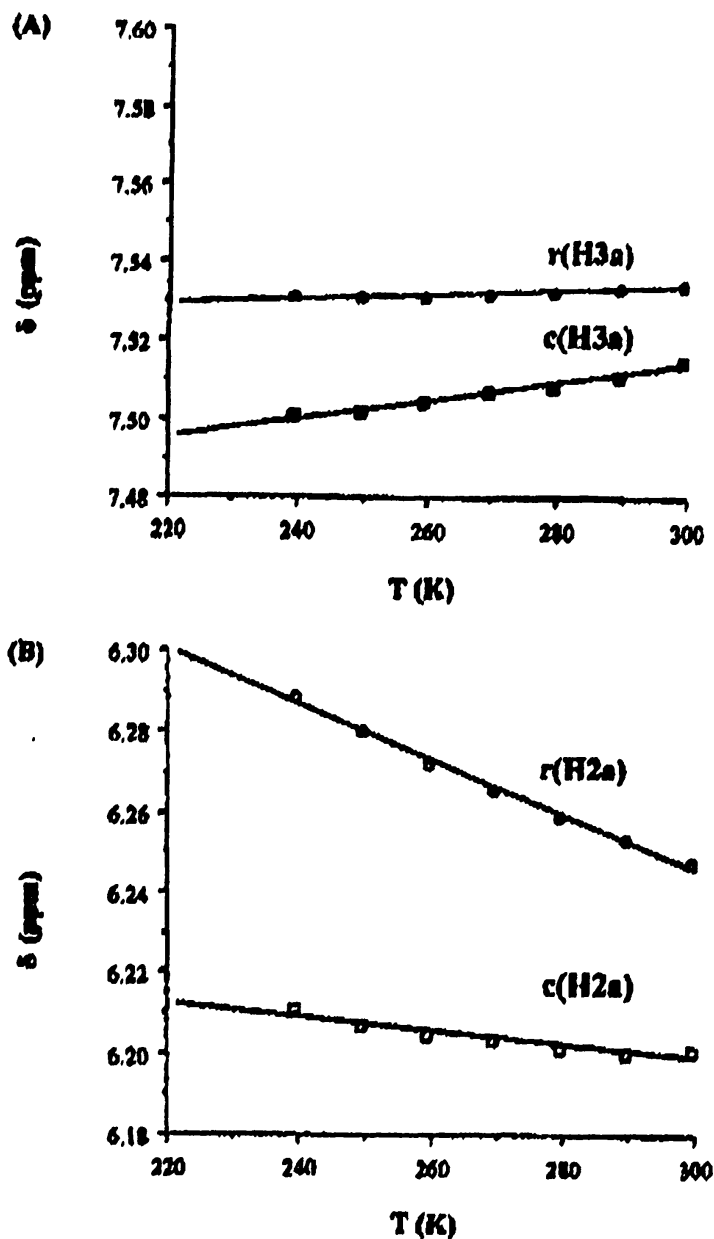


**Σχήμα 3.19.:** Φάσματα NMR- $^1\text{H}$ : (A) του καφεϊκού οξέος στους 298 K και 238 K και (B) του ροσμαρινικού οξέος στους 298 K και 238 K. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων είναι 20 mM οξέος σε  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Παρατηρείται πως με τη μείωση της θερμοκρασίας τα πρωτόνια  $\text{H}_{2a}$  του ροσμαρινικού οξέος, μετατοπίζονται περισσότερο από τα αντίστοιχα του καφεϊκού οξέος, δηλαδή η εξάρτηση της χημικής μετατόπισης των  $\text{H}_{2a}$  είναι διαφορετική για τα δύο οξέα. Το παραπάνω συμπέρασμα γίνεται ευκολότερα αντιληπτό, με την γραφική παράσταση της μεταβολής της



χημικής μετατόπισης,  $\delta$  (ppm), των πρωτονίων  $H_{3a}$  και  $H_{2a}$  των δύο οξέων ως συνάρτηση της θερμοκρασίας,  $T$ , (K) (Σχήμα 3.20).



Σχήμα 3.20.: Μεταβολή της χημικής μετατόπισης, ( $\delta$  (ppm)), των πρωτονίων (A)  $H_{3a}$  και (B)  $H_{2a}$  του καρβεικού (c) και του ροσαρινικού οξέος (r) ως συνάρτηση της θερμοκρασίας,  $T$ , (K). Η συγκέντρωση των διαλυμάτων είναι 20 mM οξέος σε  $CD_3OD$ .



Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.20, οι κλίσεις των ευθειών που περιγράφουν την εξάρτηση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων  $H_{3a}$  και  $H_{2a}$  από τη θερμοκρασία,  $\Delta\delta/\Delta T$ , είναι διαφορετικές για τα δύο οξέα (Πίνακας 3.4).

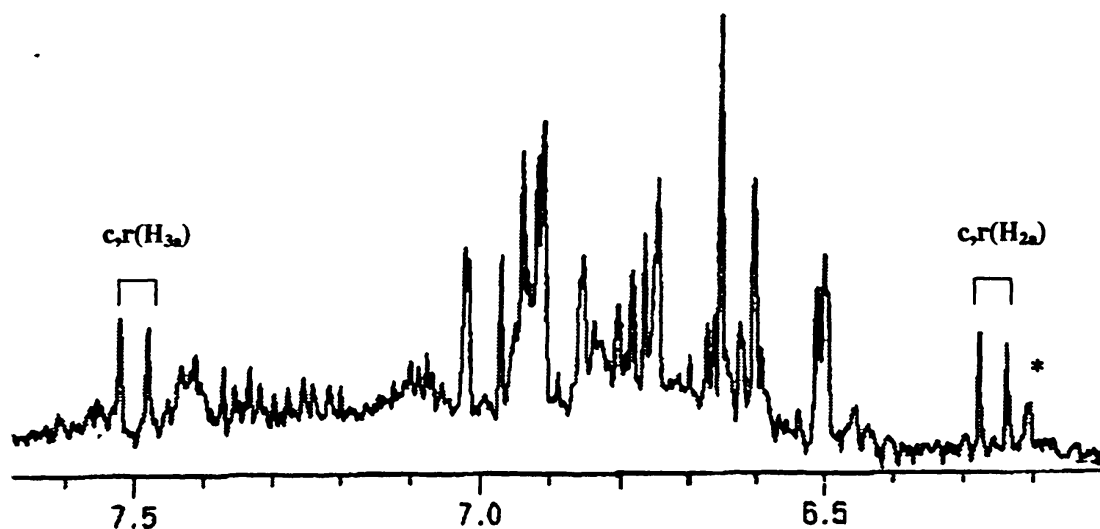
Πίνακας 3.4. Εξάρτηση της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος από τη θερμοκρασία.

Καφεϊκό οξύ		Ροσμαρινικό οξύ	
Πρωτόνιο	$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K)	Πρωτόνιο	$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K)
$H_{3a}$	0.23	$H_{3a}$	0.03
$H_{2a}$	-0.17	$H_{2a}$	-0.70
$H_2$	0.11	$H_{2''}$	-0.06
$H_5$	0.40	$H_{5''}$	0.39
$H_6$	-0.01	$H_{6''}$	-0.09

Έτσι, ενώ τα περισσότερα πρωτόνια του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος έχουν παραπλήσια εξάρτηση χημικών μετατοπίσεων από τη θερμοκρασία, η τιμή του συντελεστή  $\Delta\delta/\Delta T$  για το πρωτόνιο  $H_{2a}$  του ροσμαρινικού οξέος διαφέρει αρκετά από του αντιστοίχου πρωτονίου του καφεϊκού οξέος. Αναμένεται, συνεπώς, ότι με την εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας μεταβλητής θερμοκρασίας, οι διασταυρούμενες κορυφές ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ) των δύο οξέων θα διαχωριστούν.

3.6.2. Εφαρμογή της τεχνικής DQF-COSY  $^1H$ - $^1H$  μεταβλητής θερμοκρασίας στο διαχωρισμό του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος. Για την αξιολόγηση της μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκε αρχικά το φυτικό δείγμα *O.onites*, που εκχυλίστηκε με μια σειρά διαλύτων, όπως περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα. Εφαρμογή της μεθοδολογίας COSY  $^1H$ - $^1H$  υποδεικνύει την ύπαρξη της έντονης διασταυρούμενης κορυφής που αντιστοιχεί στο σύστημα spin του τύπου του καφεϊκού οξέος και συγκεκριμένα στη συσχέτιση των ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ). Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του εκχυλίσματος *O.vulgare* του Σχήματος 3.15, εξίσου έντονες διασταυρούμενες κορυφές παρατηρούνται και στην περιοχή (2.97, 3.11), (5.12, 3.11) και (5.12, 2.97) ppm. Στο Σχήμα 3.21 παρουσιάζεται το φάσμα NMR- $^1H$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.onites* στους 298 K.



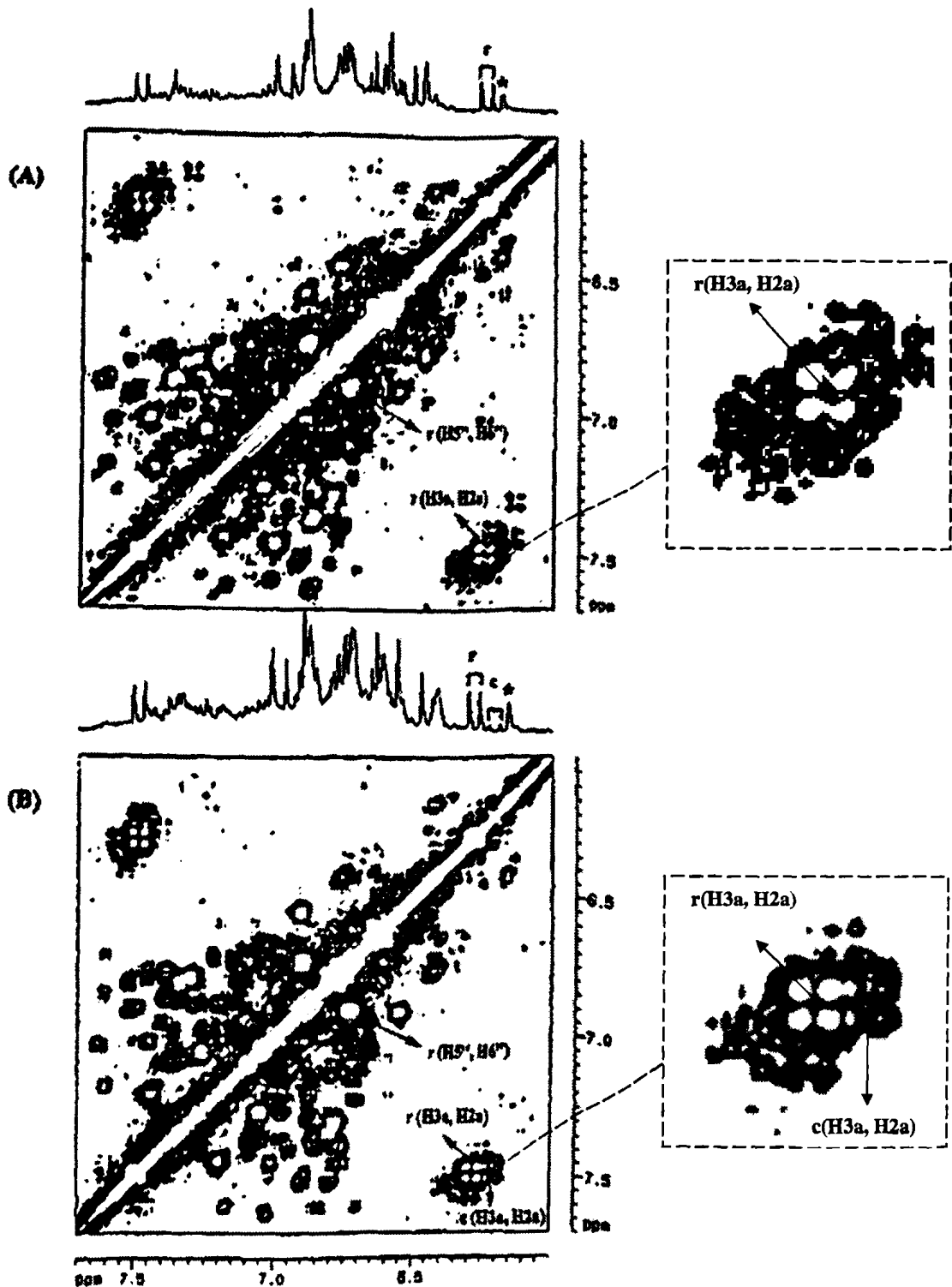


Σχήμα 3.21.: Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $NMR-^1H$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.opites* σε  $CD_3OD$ . Επισημαίνεται η ύπαρξη των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων  $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$  που αντιστοιχούν στο σύστημα spin του τύπου του καφεϊκού οξέος. Ο αστερίσκος υποδηλώνει άγνωστη κορυφή ( $T=298\text{ K}$ ,  $NS=32$ ).

Είναι φανερό πως στη θερμοκρασία λήψης του φάσματος (298 K), η διάκριση του ροσμαρινικού από το καφεϊκό οξύ δεν είναι εφικτή, και επιπλέον η ύπαρξη της άγνωστης κορυφής συντονισμού που υποδηλώνεται με τον αστερίσκο, δυσχεραίνει την ταυτοποίηση. Περισσότερες πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν με την εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας μεταβλητής θερμοκρασίας.

Στο Σχήμα 3.22 που ακολουθεί παρουσιάζεται το δισδιάστατο φάσμα DQF-COSY  $^1H-^1H$  του εκχυλίσματος, στη θερμοκρασία των 298 και 243 K. Όπως αναλύθηκε στο θεωρητικό τμήμα η τεχνική αυτή ενδείκνυται σε περιπτώσεις ανάλυσης πολύπλοκων μιγμάτων, όπου η διαγώνιος περιλαμβάνει απορροφήσεις απλού κβάντου ιδιαίτερα μεγάλης έντασης. Είναι προφανές ότι στη θερμοκρασία των 298 K είναι ανέφικτη η διάκριση των δύο οξέων. Στο ίδιο φάσμα όμως της θερμοκρασίας των 243 K, η διασταυρούμενη κορυφή των πρωτονίων ( $H_{3a}$ ,  $H_{2a}$ ) του καφεϊκού οξέος είναι προφανής, παρότι η συγκέντρωσή του είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ (Σχήμα 3.22.B). Η διάκριση των δύο οξέων είναι μάλιστα εφικτή ακόμη και στο φάσμα μιας διάστασης (Exarchou *et al*, 2001).





Σχήμα 3.22: Δισδιάστατος χάρτης της επιλεγμένης περιοχής (7.7-6.0 ppm) του φάσματος DQF-COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. onites* (A) στους 298 K ( $NS=32$ ,  $t_{exp}=5$  h) και (B) στους 243 K. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διασταυρούμενες κορυφές των πρωτονίων ( $\text{H}_{3a}$ ,  $\text{H}_{2a}$ ) του ροσμαρινικού (r) και του καφεϊκού οξέος (c). Ο αστερίσκος υποδηλώνει άγνωστη κορυφή ( $NS=24$ ,  $t_{exp}=5$  h) (Exarchou, et al., 2001).



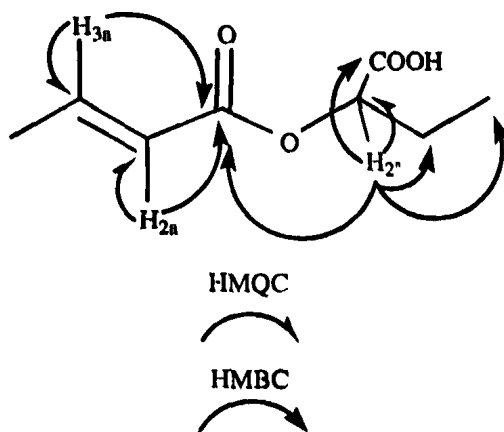


Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η εξάρτηση της χημικής μετατόπισης από τη θερμοκρασία μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας ικανής να επιλύσει το πρόβλημα των αλληλεπικαλυπτόμενων διασταυρούμενων κορυφών και να διαχωρίσει τις κορυφές συντονισμού πρωτονίων με παραπλήσια χημική μετατόπιση. Αξίζει να σημειωθεί πως ο διαχωρισμός των κορυφών συντονισμού επιτυγχάνεται ακόμη κι όταν τα προς μελέτη συστατικά διαφέρουν αρκετά ως προς τη συγκέντρωση.



### 3.7. Εφαρμογή της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ΗΜQC και $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ΗΜBC μεταβλητής θερμοκρασίας

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον ίδιο σκοπό οι τεχνικές της δισδιάστατης ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  συσχετίσης πολλαπλού κβάντου, (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ΗΜQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) και της φασματοσκοπίας συσχετίσης μέσω πολλαπλών δεσμών (Heteronuclear Multiple Bond Coherence, ΗΜBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Οι δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται εναλλάξ και υποδηλώνουν, όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2, πυρήνες ανθράκων που συζεύγνυνται άμεσα με πυρήνες πρωτονίου (ΗΜQC) και πυρήνες ανθράκων που συζεύγνυνται με πυρήνες πρωτονίου μέσω δύο έως τεσσάρων δεσμών (ΗΜBC) (Sanders and Hunder 1993, Griesinger *et al* 1996, Günther, 1995). Οι τεχνικές αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες γιατί με τη χρήση τους συνδέονται μεταξύ τους επιμέρους συστήματα spin πρωτονίων που διακόπτονται από τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Η συμπληρωματική φύση των δύο ετεροπυρηνικών τεχνικών δισδιάστατης φασματοσκοπίας και οι πληροφορίες που συλλέγονται μπορούν να παρασταθούν στο Σχήμα 3.23:



Σχήμα 3.23.: Συμπληρωματικότητα των τεχνικών της δισδιάστατης ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας ΗΜQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  και ΗΜBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

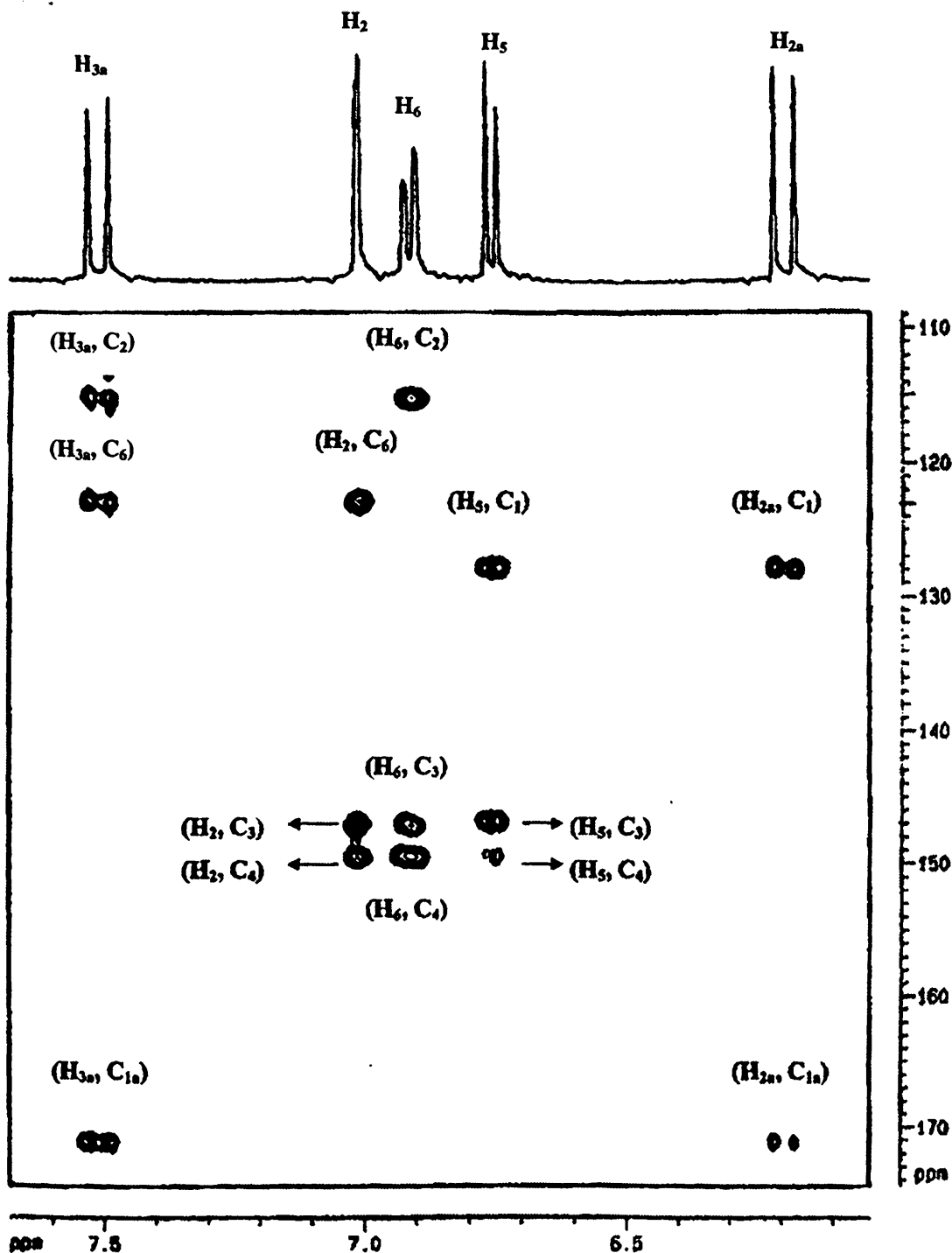
Θα πρέπει να αναφερθεί ότι για τη λήψη των φασμάτων ΗΜQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  και ΗΜBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία βαθμίδωσης πεδίου (field gradient) (Marek *et al.*, 1997, Parella *et al.*, 2001).

3.7.1. Μελέτη των προτύπων ενώσεων. Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Έτσι, στο δισδιάστατο χάρτη της τεχνικής ΗΜQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  του καφεϊκού οξέος αναμένεται να αποκαλυφθούν οι

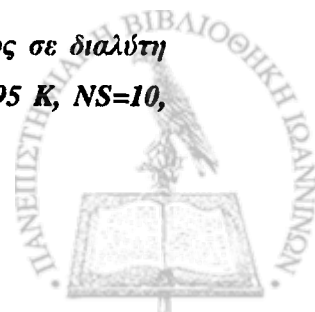


διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ των πυρήνων ( $H_2, C_2$ ), ( $H_5, C_5$ ), ( $H_6, C_6$ ), ( $H_{2a}, C_{2a}$ ) και ( $H_{3a}, C_{3a}$ ).

Στο Σχήμα 3.24 παρουσιάζεται το φάσμα HMBC  $^1H-^{13}C$  του καφεϊκού οξέος σε διαλύτη  $CD_3OD$  και η αποτίμηση των διασταυρούμενων κορυφών.



Σχήμα 3.23.: Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος HMBC  $^1H-^{13}C$  του καφεϊκού οξέος σε διαλύτη  $CD_3OD$ . Η συγκέντρωση του οξέος στο διάλυμα είναι 20 mM ( $T=295$  K,  $NS=10$ , χρόνος αναμίξεως=90 ms,  $t_{exp}=50$  min).



Τα πρωτόνια  $H_{3a}$  και  $H_{2a}$  συζεύγγονται μέσω τριών και δύο δεσμών αντίστοιχα με τον καρβονυλικό άνθρακα  $C_{1a}$  που συντονίζεται στα 171.4 ppm. Το πρωτόνιο  $H_{3a}$  συζεύγγεται επίσης με τους πυρήνες  $C_2$  και  $C_6$  μέσω δύο και τριών δεσμών αντίστοιχα και το  $H_{2a}$  συζεύγγεται με τον άνθρακα  $C_1$  του αρωματικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια  $H_2$ ,  $H_5$ , και  $H_6$  συζεύγγονται με τους πυρήνες  $C_3$  και  $C_4$ . Επιπλέον, το  $H_6$  συζεύγγεται με τον άνθρακα  $C_2$ , το  $H_2$  με τον άνθρακα  $C_6$  και το  $H_5$  με τον  $C_1$ . Με τη μελέτη των φασμάτων  $HMQC$   $^1H$ - $^{13}C$  και  $HMBC$   $^1H$ - $^{13}C$  αποκαλύπτονται όλες οι αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων και ανθράκων που συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με αποτέλεσμα την πλήρη εικόνα του συστήματος spin του μορίου.

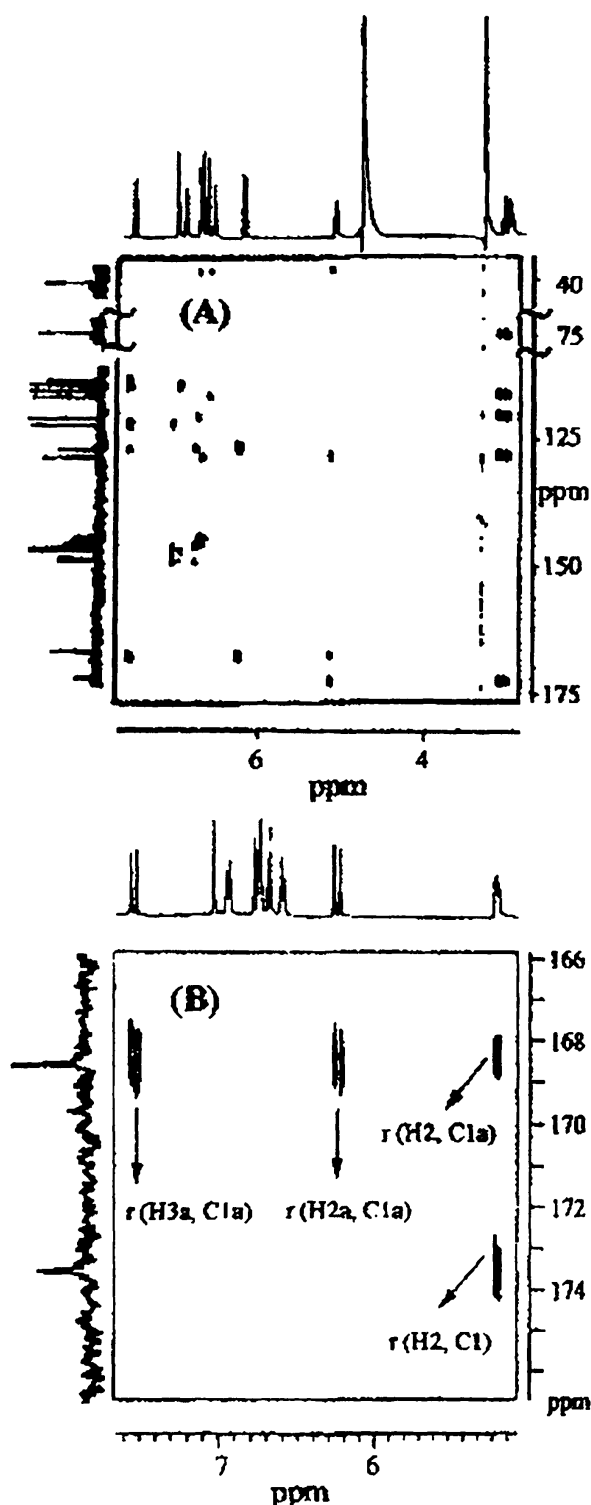
Το φάσμα  $HMBC$   $^1H$ - $^{13}C$  του ροσμαρινικού οξέος παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.24. Τα πρωτόνια  $H_{3a}$  και  $H_{2a}$  συνδέονται με τον εστερικό άνθρακα  $C_{1a}$  του ροσμαρινικού οξέος που συντονίζεται στα 168.7 ppm ο οποίος επιδεικνύει επίσης μια διασταυρούμενη κορυφή με το πρωτόνιο  $H_2$  που συντονίζεται στα 5.12 ppm. Το πρωτόνιο  $H_2$  επιδεικνύει τρεις ακόμη διασταυρούμενες κορυφές: με τον άνθρακα  $C_1$ , που συντονίζεται στα 173.5 ppm, τον άνθρακα  $C_3$ , στα 38 ppm και τον άνθρακα  $C_1'$ , στα 129.2 ppm. Έτσι, με την εφαρμογή των τεχνικών  $HMQC$   $^1H$ - $^{13}C$  και  $HMBC$   $^1H$ - $^{13}C$  είναι δυνατή η μελέτη ολόκληρου του συστήματος spin των πυρήνων του ροσμαρινικού οξέος, παρόλο που διακόπτεται από το άτομο του οξυγόνου της εστερικής ομάδας.

Από τη μελέτη των δύο οξέων με τις τεχνικές  $HMQC$   $^1H$ - $^{13}C$  και  $HMBC$   $^1H$ - $^{13}C$  γίνεται φανερό ότι ο διαχωρισμός τους στα φυτικά εκχυλίσματα μπορεί να στηριχθεί:

α) στην ταυτοποίηση των διασταυρούμενων κορυφών  $\epsilon$  ( $H_{2a}$ ,  $C_{2a}$ ) και  $\gamma$  ( $H_{2a}$ ,  $C_{2a}$ ) στο φάσμα  $HMQC$   $^1H$ - $^{13}C$  του εκχυλίσματος σε χαμηλή θερμοκρασία και

β) στη διαφορά των χημικών μετατοπίσεων του εστερικού και του καρβονυλικού άνθρακα  $C_{1a}$  των δύο οξέων και στις διασταυρούμενες κορυφές  $\epsilon$  ( $H_{2a}$ ,  $C_{1a}$ ) και  $\gamma$  ( $H_{2a}$ ,  $C_{1a}$ ) αλλά και  $\epsilon$  ( $H_{3a}$ ,  $C_{1a}$ ) και  $\gamma$  ( $H_{3a}$ ,  $C_{1a}$ ).





Σχήμα 3.24.: (A) Φάσμα HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  του ροσμαρινικού οξέος σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{OD}$ . (B) Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος. Τα βέλη υποδηλώνουν τις διασταυρούμενες κορυφές των πυρήνων ( $\text{H}_{2\alpha}$   $\text{C}_{1\alpha}$ ), ( $\text{H}_{3\alpha}$   $\text{C}_{1\alpha}$ ), ( $\text{H}_2$ ,  $\text{C}_{1\alpha}$ ) και ( $\text{H}_2$ ,  $\text{C}_1$ ). Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η μελέτη ολόκληρου του συστήματος spin των πυρήνων του ροσμαρινικού οξέος, παρόλο που διακόπτεται από το άτομο του οξυγόνου ( $T=295\text{ K}$ ,  $NS=10$ , χρόνος ανάμιξης= $90\mu\text{ ms}$   $t_{exp}=50\text{ min}$ ) (Exarchou et al., 2001).

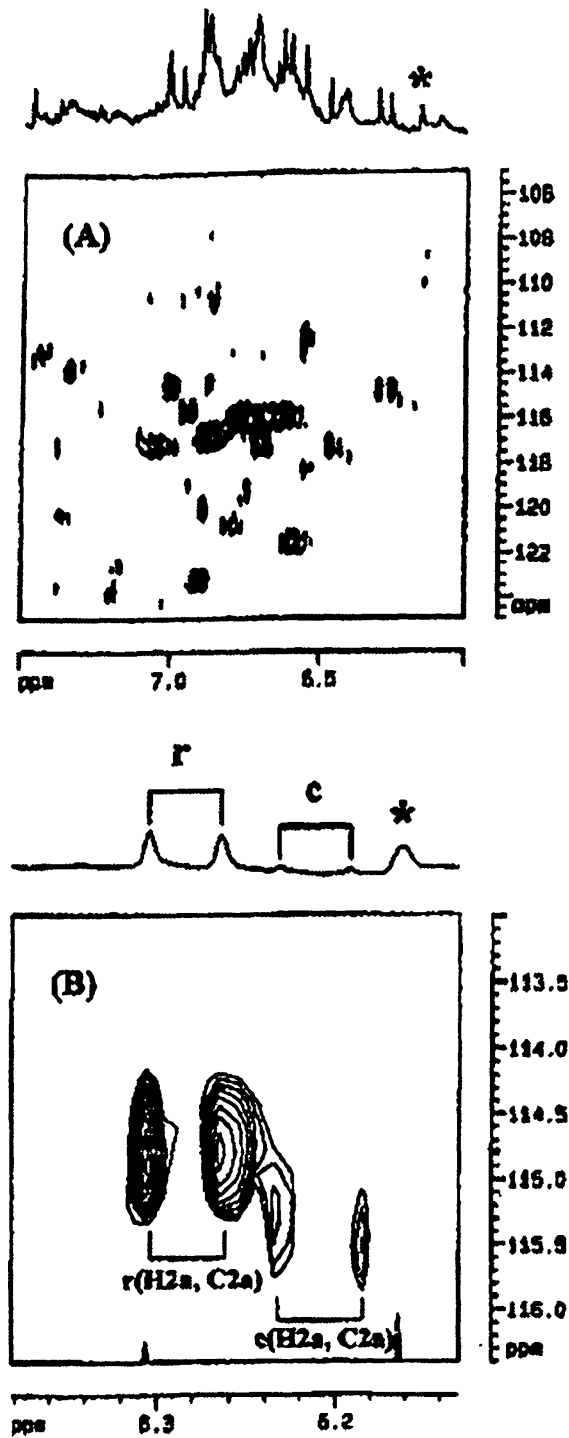


3.7.2. Εφαρμογή σε φυτικά εκχυλίσματα. Από τα φυτικά δείγματα που μελετήθηκαν το *O. onites* εκχυλίστηκε διαδοχικά με μια σειρά διαλυτών ενώ τα δείγματα *S. hortensis*, *O. vulgare*, *S. thymbra* και *S. triloba* εκχυλίστηκαν με έναν μόνο διαλύτη (αιθανόλη). Στο Σχήμα 3.25 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές του φάσματος ΗΜQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.onites* στους 243 Κ. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διασταυρούμενες κορυφές  $c$  ( $\text{H}_{2a}$ ,  $\text{C}_{2a}$ ) και  $r$  ( $\text{H}_{2a}$ ,  $\text{C}_{2a}$ ). Εξαιτίας της διαφοράς στη χημική μετατόπιση των  $\text{H}_{2a}$  των οξέων κατά 0.06 ppm και των  $\text{C}_{2a}$  κατά 0.6 ppm τα δύο οξέα διαχωρίζονται μεταξύ τους στο φυτικό εκχύλισμα, παρόλη τη διαφορά ως προς τη συγκέντρωσή τους.

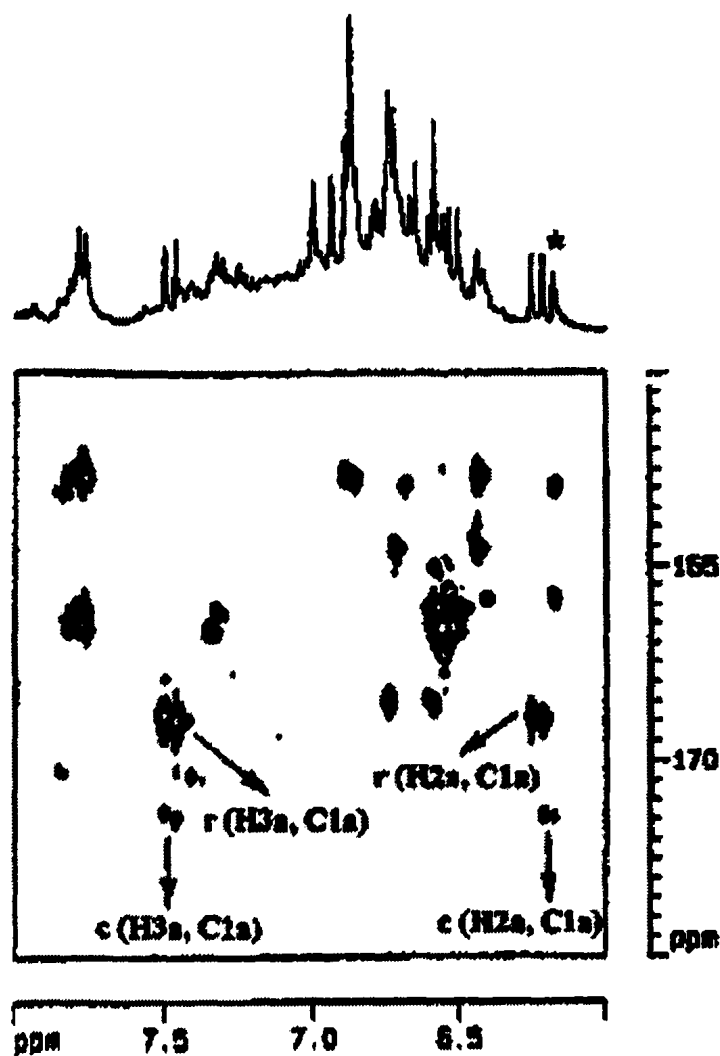
Στο Σχήμα 3.26 παρουσιάζεται επιλεγμένη περιοχή του φάσματος ΗΜQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.onites*. Παρατηρείται πως η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων του εστερικού και του καρβονυλικού άνθρακα  $\text{C}_{1a}$  των δύο οξέων κατά ~ 3 ppm, επιφέρει τη σαφή διάκριση των διασταυρούμενων κορυφών  $c$  ( $\text{H}_{2a}$ ,  $\text{C}_{1a}$ ) και  $r$  ( $\text{H}_{2a}$ ,  $\text{C}_{1a}$ ) αλλά και  $c$  ( $\text{H}_{3a}$ ,  $\text{C}_{1a}$ ) και  $r$  ( $\text{H}_{3a}$ ,  $\text{C}_{1a}$ ), ακόμη και στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Οι τεχνικές DQF-COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , ΗΜQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  μεταβλητής θερμοκρασίας και ΗΜBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  εφαρμόστηκαν επιτυχώς και στα υπόλοιπα εκχυλίσματα φυτών για τη διάκριση του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος.





Σχήμα 3.25.: (A) Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. spites* στους 243 K (B) Περιοχή του φάσματος (A) που υποδεικνύει τις διασταυρούμενες κορυφές των ( $\text{H}_{2a}$ ,  $\text{C}_{2a}$ ) του ροσμαρινικού (r), και του καφεϊκού οξέος (c). Ο αστερίσκος υποδηλώνει άγνωστη κορυφή (NS=102, χρόνος ανάμιξης= 90 ms,  $t_{\text{exp}}= 13,5$  h) (Exarchou et al., 2001).



Σχήμα 3.26.: Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος  $HMBC\ ^1H-^{13}C$  του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. opites*. Τα βέλη υποδεικνύουν τις διασταυρούμενες κορυφές των ( $H_{2a}\ C_{1a}$ ) και ( $H_{3a}\ C_{1a}$ ) του ροσμαρινικού (*r*), και του καφεϊκού οξέος (*c*). Ο διαχωρισμός των οξέων επιτυγχάνεται ακόμη και στη θερμοκρασία περιβάλλοντος ( $NS=316$ , χρόνος ανάμιξης =  $90\ ms$ ,  $t_{exp}=28\ h$ ) (Exarchou et al., 2001).



### 3.8. Εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με τη φασματοσκοπία NMR μεταβλητής θερμοκρασίας

Όπως είναι γνωστό η ένταση των σημάτων συντονισμού στη φασματοσκοπία NMR είναι ανάλογη του αριθμού των πυρήνων στα οποία αντιστοιχούν. Η μέτρηση των εντάσεων, δηλαδή του εμβαδού των κορυφών, γίνεται με τη χρήση ηλεκτρονικών ολοκληρωτών. Η ολοκλήρωση των κορυφών ενός φάσματος παρέχει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για την ταυτοποίηση μιας ένωσης όσο και για την ποσοτική εκτίμησή της. Για τη σωστή ολοκλήρωση των απορροφήσεων, όμως, θα πρέπει οι συνθήκες λήψης του φάσματος να είναι τέτοιες ώστε να έχει επιτευχθεί η πλήρης αποκατάσταση μέσω πορειών αποδιέγερσης όλων των πυρήνων των οποίων οι απορροφήσεις πρόκειται να ολοκληρωθούν. Επιπλέον, οι προς ολοκλήρωση κορυφές θα πρέπει να διαχωρίζονται σαφώς αν και υπάρχει δυνατότητα υπολογισμού των ολοκληρωμάτων αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών με τη μαθηματική μεθοδολογία της ανέλιξης (deconvolution).

Η εκτίμηση των επιπέδων συγκέντρωσης των δύο οξέων στα φυτικά εκχυλίσματα πραγματοποιείται με την απευθείας ολοκλήρωση των διαχωρισμένων κορυφών συντονισμού των οξέων, σε σχέση με το ολοκλήρωμα της κορυφής του TMSP-d<sub>4</sub> γνωστής συγκέντρωσης (0.2 mM) που χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς. Για την ποσοτική εκτίμηση χρησιμοποιήθηκε το ολοκλήρωμα του πρωτονίου H<sub>2a</sub> του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος, λόγω του εμφανούς διαχωρισμού του σε χαμηλή θερμοκρασία. Εκτός από την φασματοσκοπία μιας διάστασης, για την ποσοτική εκτίμηση των δύο οξέων στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε και η δισδιάστατη φασματοσκοπία, στην οποία επίσης τα ολοκληρώματα των διαχωρισμένων διασταυρούμενων κορυφών μπορούν να υπολογιστούν και να αποτιμηθούν ποσοτικά. Για παράδειγμα, η ποσοτική εκτίμηση του καφεϊκού οξέος γίνεται σε σχέση με την ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος στο δισδιάστατο χάρτη της τεχνικής DQF-COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H στους 243 K, αρκεί να έχει υπολογιστεί προηγουμένως η συγκέντρωση του ροσμαρινικού στο φάσμα 1D (τα πρωτόνια του TMSP-d<sub>4</sub> ως μαγνητικά ισοδύναμα δεν εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή).

Τα αποτελέσματα της ποσοτικής εκτίμησης του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος στα υπό μελέτη εκχυλίσματα αναγράφονται στον Πίνακα 3.5.



Πίνακας 3.5.: Ποσοτική εκτίμηση του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος στα υπό μελέτη μεθανολικά εκχυλίσματα με τη φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H.

Μεθανολικό εκχύλισμα	Περιεκτικότητα σε καφεϊκό οξύ* (mg/100g εκχυλίσματος) <sup>a</sup>	Περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ* (mg/100g εκχυλίσματος) <sup>a</sup>
<i>O. vulgare</i>	19 ± 2	904 ± 74
<i>S. hortensis</i>	39 ± 4	2517 ± 21
<i>O. onites</i>	78 ± 7	1812 ± 152
<i>S. thymbra</i>	-	4144 ± 356
<i>S. triloba</i>	-	2740 ± 226

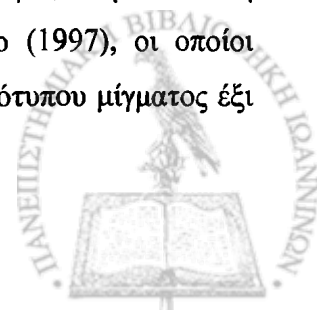
<sup>a</sup>Οι τιμές που αναγράφονται προκύπτουν από τους μέσους όρους 5 μετρήσεων (± η τυπική απόκλιση).

\*όριο ανίχνευσης 20 μM.

Παρατηρείται πως το ροσμαρινικό οξύ περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα στα υπό μελέτη εκχυλίσματα. Επιπλέον, το ροσμαρινικό οξύ περιέχεται στα εκχυλίσματα *O. onites*, *S. hortensis* και *O. vulgare* σε συγκέντρωση που είναι κατά μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από εκείνη του καφεϊκού οξέος. Στα εκχυλίσματα, *S. thymbra* και *S. triloba* δεν ταυτοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ. Αυτό υποδηλώνει πως η ποσότητα του καφεϊκού οξέος είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της τεχνικής DQF-COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (≤ 20 μM).

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.3 βρίσκονται σε σχετική συμφωνία με αυτά που προέκυψαν από την ολοκλήρωση των διασταυρούμενων κορυφών οι οποίες εμφανίζονται στο δισδιάστατο χάρτη της φασματοσκοπίας HMQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C και HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C των εκχυλισμάτων. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί, πως οι τιμές των ολοκληρωμάτων των διασταυρούμενων κορυφών της φασματοσκοπίας HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C, δε θεωρούνται ιδιαίτερα αξιόπιστες, διότι οι συζεύξεις <sup>2</sup>J<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H και <sup>3</sup>J<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H δεν έχουν σταθερή τιμή αλλά, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 2, εξαρτώνται από τη δομή και διαμόρφωση του μορίου. Η σύζευξη <sup>2</sup>J<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H εξαρτάται μερικώς από το ποσοστό του s χαρακτήρα των τροχιακών σε αντίθεση με τη σύζευξη <sup>3</sup>J<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H για την οποία δεν έχει παρατηρηθεί ανάλογη συμπεριφορά. Η σύζευξη <sup>3</sup>J<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H εξαρτάται από τη διεδρη γωνία των C-H που απέχουν μεταξύ τους κατά τρεις δεσμούς (Bovey, 1988).

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί πως η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στο κεφάλαιο αυτό (Exarchou *et al.*, 2001), δεν έχει χρησιμοποιηθεί, στη διεθνή βιβλιογραφία, στην ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων, με εξαίρεση τη μελέτη των Lin and Shapiro (1997), οι οποίοι χρησιμοποίησαν συνδυασμό HMBC και TOSCY στην ανάλυση ενός πρότυπου μίγματος έξι εστέρων.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ  
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ  
ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ**



#### 4.1. Εισαγωγή

Οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο εφαρμόστηκαν στη συνέχεια στο χαρακτηρισμό των αντιοξειδωτικών ενώσεων εκχυλισμάτων φυτών με εμπορικό ενδιαφέρον. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν είναι το *Origanum vulgare* (Ελληνική ρίγανη), *Salvia fruticosa* (Ελληνικό φασκόμηλο) και *Satureja hortensis* (Summer Savory). Τα φυτά *O. vulgare*, και *S. hortensis* έχουν ήδη αναφερθεί ως πηγές ροσμαρινικού οξέος και άλλων φαινολικών συστατικών (Kubátová, *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2001, <http://www.medusa.maich.gr>) αλλά δεν έχουν μελετηθεί σε τέτοιο βαθμό όπως το φυτό *Rosmarinus officinalis*. Το Ελληνικό φασκόμηλο μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως πηγή του ροσμαρινικού οξέος αλλά δεν έχει μελετηθεί εκτενώς σε σύγκριση με το συγγενές του *Salvia officinalis*. Τα ακετονικά και αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών εξετάστηκαν προηγούμενα ως προς το περιεχόμενο τους σε ολικές φαινόλες (χρωματογραφικός προσδιορισμός ολικώς φαινολών-Folin Ciocalteu) και την αντιοξειδωτική τους δράση με διάφορες μεθόδους στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Α.Π.Θ, στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος σχετικά με την προσθήκη νέων συστατικών στα εδάδιμα λίπη και έλαια με στόχο τη σταθεροποίησή τους και τη βελτίωση της ποιότητάς τους.

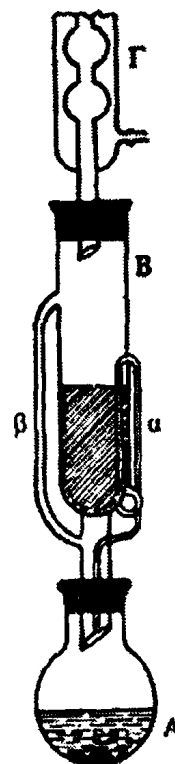
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή των διαφόρων μεθοδολογιών NMR εξετάστηκαν συγκριτικά με εκείνα που προέκυψαν από τον υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό και προσδιορισμό των υπό μελέτη φαινολικών οξέων στα εκχυλίσματα. Επίσης έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί η σχετική αξία τους ως πηγών φυσικών αντιοξειδωτικών.



#### 4.2. Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC).

Ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός αντιοξειδωτικών συστατικών των εκχυλισμάτων, στα οποία πιθανότατα οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση τους έγινε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την RP-HPLC συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της συνδυαστικής μεθοδολογίας μεταβλητής θερμοκρασίας DQF COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  και HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR, που αναλύονται στο 4.3.

4.2.1. Παραλαβή εκχυλισμάτων με εκχύλιση κατά Soxhlet. Αρχικά κάθε φυτικό δείγμα υπόκειται σε λειοτρίβηση, στη συνέχεια περνά από κόσκινο διαμέτρου 0,4 mm και φυλάσσεται σε γυάλινα δοχεία, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Για την εκχύλιση των φυτών χρησιμοποιήθηκε η συσκευή συνεχούς λειτουργίας τύπου Soxhlet με την οποία εκχυλίζονται μεγάλες ποσότητες δείγματος με μικρή ποσότητα διαλύτη (Σχήμα 4.1). Για το λόγο αυτό ζυγίζεται δείγμα 10 g και μεταφέρεται ποσοτικά σε ειδική φύσιγγα από διηθητικό χαρτί. Το δείγμα καλύπτεται με βαμβάκι και η φύσιγγα τοποθετείται σε εκχυλιστήρα Soxhlet. Σε προζυγισμένη, εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη που φέρει πέτρες βρασμού, προστίθεται επαρκής ποσότητα διαλύτη εκχύλισης (~200 ml). Η φιάλη με το διαλύτη θερμαίνεται, οπότε ο διαλύτης αποστάζει (η θέρμανση γίνεται σε υδρόλουτρο). Οι ατμοί του διαλύτη περνούν από το 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 τις 6 ώρες.



Σχήμα 4.1.: Συσκευή συνεχούς εκχύλισης τύπου Soxhlet.

4.2.2. Υγροχρωματογραφικές μέθοδοι: Προκαταρκτική ανάλυση των αιθανολικών και ακετονικών εκχυλισμάτων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin



Layer Chromatography, TLC). Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm και πάχους 0.25 mm που περιείχαν ως προσροφητικό υλικό silica gel (F<sub>254</sub>, Riedel de Haën GmbH & Co. KG (Seelze, Germany)). Οι πλάκες TLC ενεργοποιήθηκαν για 1 h στους 105 °C. Παρασκευάστηκαν δύο σειρές διαλυμάτων προτύπων φαινολικών ενώσεων: σε αιθανόλη και σε ακετόνη. Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, κερκετίνη, ρουτίνη, απιγενίνη και καμπφερόλη, που είναι εμπορικά διαθέσιμες. Τα διαλύματα των προτύπων ενώσεων και εκχυλισμάτων τοποθετήθηκαν με τη μορφή κηλίδας στις πλάκες TLC. Ο διαχωρισμός των συστατικών των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των παρακάτω συστημάτων διαλυτών ανάπτυξης:

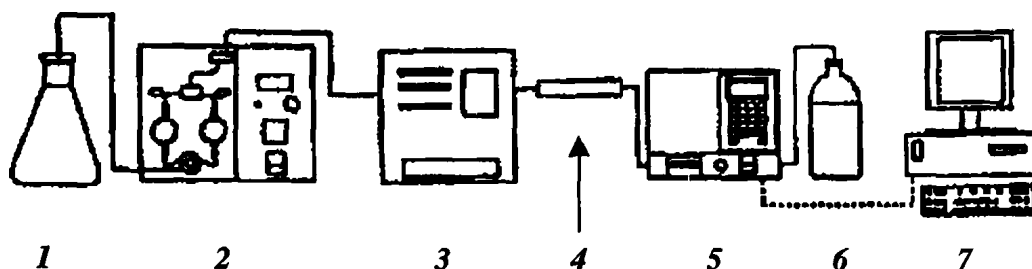
(α) CH<sub>3</sub>COOEt - MeOH - H<sub>2</sub>O (77:13:10 v/v/v), που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι κατάλληλος για το διαχωρισμό φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών και γλυκοζιτών τους (Montedoro, 1992).

(β) CHCl<sub>3</sub>- CH<sub>3</sub>COOEt-HCOOH (5:4:1 v/v/v).

Για την ταυτοποίηση της τάξης στην οποία ανήκουν τα συστατικά που διαχωρίστηκαν, οι πλάκες παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φως προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή απορρόφηση και ψεκάστηκαν: (i) με διάλυμα τριχλωριούχου αργιλίου, AlCl<sub>3</sub>, 1% σε αιθανόλη, που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κίτρινου φθορισμού στο υπεριώδες φως στα 5-υδροξυλιωμένα φλαβονοειδή με καρβονύλιο στη θέση 4. (ii) Με διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου, FeCl<sub>3</sub>, 2% σε αιθανόλη, ή (iii) με διάλυμα τριχλωριούχου αντιμονίου, SbCl<sub>3</sub>, 10% σε χλωροφόρμιο (Schulz and Herrmann, 1980).

Την παραπάνω προκαταρκτική ανάλυση ακολούθησε η εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός δείγματος με την RP-HPLC, βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Στο Σχήμα 4.2 παρουσιάζεται διαγραμματικά η διάταξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

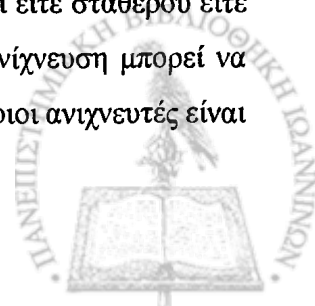




**Σχήμα 4.2.: Διάταξη HPLC.** 1. μονάδα διαλυτών (κινητή φάση),  
2. αντλία προώθησης διαλυτών,  
3. μονάδα εισαγωγής του δείγματος,  
4. στήλη διαχωρισμού (στατική φάση),  
5. ανιχνευτής,  
6. απόβλητα,  
7. μονάδα επεξεργασίας δεδομένων.

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται από τη βαλβίδα εισαγωγής (3) και ο όγκος του εισαγόμενου δείγματος κυμαίνεται από 5 έως 25  $\mu\text{l}$ . Το δείγμα προωθείται στη στήλη διαχωρισμού (4) όπου βρίσκεται η στατική φάση. Η στήλη διαχωρισμού αποτελείται από σωλήνα ανοξείδωτου χάλυβα που πληρώνεται, υπό πίεση, με τη στατική φάση η οποία αποτελείται από μικρόκοκκο υλικό. Η κίνηση του δείγματος από τη στήλη στο σύστημα ανίχνευσης γίνεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Η κινητή φάση είναι υγρή (1) και διοχετεύεται συνεχώς με πίεση μέσα στη στήλη με τη βοήθεια αντλιών (2). Η κινητή φάση είναι συνήθως μίγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών με ή χωρίς την προσθήκη μικρών ποσοτήτων πρόσθετων ενώσεων. Η έκλυση των προς διαχωρισμό ενώσεων μπορεί να γίνει είτε με σταθερή σύσταση διαλυτών (ισοκρατικά), είτε με βαθμιαία μεταβολή της σύστασης των διαλυτών οι οποίοι αντλούνται από διαφορετικά δοχεία (συνήθως υπάρχουν δύο έως τέσσερα δοχεία διαλυτών). Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται επιτρέπουν ταχύτητες ροής μέχρι 10 mL/min και οι πιέσεις που αναπτύσσονται είναι μέχρι 5000 psi αλλά εξαρτώνται κάθε φορά από τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και τις στήλες. Μετά την έξοδό τους από τη στήλη τα διαχωριζόμενα συστατικά ανιχνεύονται περνώντας από κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης (5). Το σύστημα αυτό μπορεί να αποτελείται από ανιχνευτές ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας, φθορισμομετρικούς ανιχνευτές, ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές, δείκτη διάθλασης, φασματομετρίας μάζας, κ.α. (Κιοσέογλου *et al.*, 2000, Robards *et al.*, 1994).

Οι ανιχνευτές ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας χρησιμοποιούνται ευρύτατα και στηρίζουν την εκλεκτικότητά τους στο ότι ανιχνεύουν μόνον τις διαλυμένες ενώσεις που απορροφούν στην ορατή ή υπεριώδη περιοχή του φωτός. Μπορεί να είναι είτε σταθερού είτε μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. Οι τελευταίοι πλεονεκτούν διότι η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε περισσότερα από ένα μήκη κύματος την ίδια χρονική στιγμή. Τέτοιοι ανιχνευτές είναι



οι ανιχνευτές σειράς φωτοδιόδων (diode array detectors). Η ανάλυση ενός δείγματος με HPLC ολοκληρώνεται με την επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλο λογισμικό (7) ενώ το δείγμα καταλήγει στο δοχείο αποβλήτων (6).

Μεταξύ των πολλών τύπων υγρής χρωματογραφίας, η χρωματογραφία δεσμευμένης και αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Bonded Chromatography) είναι ιδιαίτερα σημαντική για το διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων (Pomeranz and Meloan, 1994, Martinez-Ortega *et al.*, 2001, Schieber, *et al.*, 2001, Chen, *et al.*, 2001, Zuo, *et al.*, 2002). Στη χρωματογραφία αυτή, η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή με αποτέλεσμα τα πιο πολικά συστατικά του δείγματος να εκλύονται πρώτα, ενώ η έκλυση μιας λιγότερο πολικής ένωσης είναι δυνατή μόνον όταν μειώνεται η πολικότητα της κινητής φάσης.

Η παράμετρος που περιγράφει το χρόνο έκλυσης ενός συστατικού σε ένα δείγμα είναι ο χρόνος συγκράτησης (Retention Time,  $t_R$ ) και ορίζεται ως ο χρόνος που μεσολαβεί από την έγχυση του δείγματος στη στήλη, μέχρι τη στιγμή της εμφάνισης του μεγίστου της αντίστοιχης χρωματογραφικής κορυφής.

Προκειμένου να αναλυθεί ένα δείγμα με υγρή χρωματογραφία θα πρέπει να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα διαλυτών, που θα αποτελέσει την κινητή φάση, η κατάλληλη στήλη που αποτελεί τη στατική φάση, καθώς και ένα πρόγραμμα βαθμιαίας μεταβολής της σύστασης των διαλυτών. Μετά την επιλογή των συνθηκών λειτουργίας της υγρής χρωματογραφίας, το σύστημα ετοιμάζεται κατάλληλα (καθαρισμός στήλης και διαλυτών που θα χρησιμοποιηθούν) και γίνεται η εισαγωγή του δείγματος.

Ο διαχωρισμός των φαινολικών οξέων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης είναι δυνατόν να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ένα σύστημα διαλυτών νερού-μεθανόλης ή νερού-ακετονιτριλίου. Μικρότεροι χρόνοι συγκράτησης καθώς και βελτίωση στη συμμετρία των κορυφών επιτυγχάνονται με έλεγχο του pH με την προσθήκη οξικού ή μυρμηκικού οξέος 1-3 % στο σύστημα της κινητής φάσης, η οποία αποτρέπει τη διάσπαση των οξέων (McMaster, 1994, Synder, and Kirkland, 1997)

Με βάση τα παραπάνω και έπειτα από κατάλληλη βιβλιογραφική μελέτη, έγιναν δοκιμές με διάφορες στατικές φάσεις και συστήματα διαλυτών έκλυσης. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες διαχωρισμού είναι οι εξής:

**Στήλη διαχωρισμού (στατική φάση):** η στατική φάση περιλαμβάνει τη στήλη διαχωρισμού Nucleosil 188-5 C<sub>18</sub>, (μήκος x εξωτερική διάμετρο x εσωτερική διάμετρο: 125 x 8 x 4 mm) με μέγεθος πόρων του υλικού, με το οποίο είναι πληρωμένη η στήλη, 5 μm (Macherey-Nagel, Dören, Germany).

**Κινητή φάση:** Το σύστημα έκλυσης αποτελείται από δύο διαλύτες:





διαλύτης A: 1% υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος (Riedel de Haën: Seelze, Germany).

διαλύτης B: ακετονιτρίλιο (Baker: Deventer, The Netherlands).

**Βαθμιαία μεταβολή της σύστασης των διαλυτών:** Η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης των διαλυτών αναγράφεται στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί (Häkkinen *et al.*, 1999). Σημειώνεται ότι οι διαλύτες και τα προς ανάλυση δείγματα υποβάλλονται σε καθαρισμό πριν από τη χρήση τους με διέλευση από ειδικά φίλτρα. Ο καθαρισμός αυτός είναι απαραίτητος για την αποφυγή ανεπιθύμητων παραπλανητικών κορυφών στα χρωματογραφήματα των υπό εξέταση δειγμάτων.

**Πίνακας 4.1.:Βαθμιαία μεταβολή της σύστασης των διαλυτών**

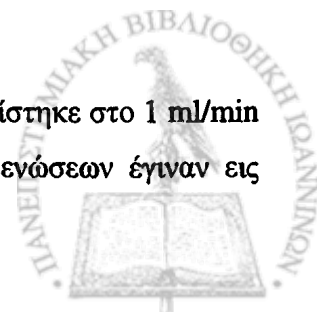
Χρόνος (min)	% Β στο Α
0	10
10	13
25	70
29	70
30	10
40	10

**Αντλία προώθησης της κινητής φάσης:** Χρησιμοποιήθηκε αντλία P4000, Spectra System (Thermoseparation Products, Riviera Beach, Fl. USA). Η μέγιστη πίεση που παρατηρήθηκε κατά τη λειτουργία της HPLC, ήταν 2500 psi.

**Ανιχνευτής:** Τα συστατικά που εξέρχονται από τη στήλη ανιχνεύονται με τη βοήθεια ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (diode array) Spectra System UV6000LP (Thermoseparation Products, Riviera Beach, Fl. USA).

**Μονάδα επεξεργασίας δεδομένων:** Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια ειδικών λογισμικών προγραμμάτων όπως το EZChrom (Scientific Software Inc. San Ramon, CA) και το Chromquest Spectral Analysis (ThermoQuest Inc., San Jose, CA).

Επιπλέον στοιχεία της ανάλυσης είναι η ταχύτητα ροής που ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και ο ενέσιμος όγκος που ήταν 25 μl. Οι αναλύσεις των προτύπων ενώσεων έγιναν εις



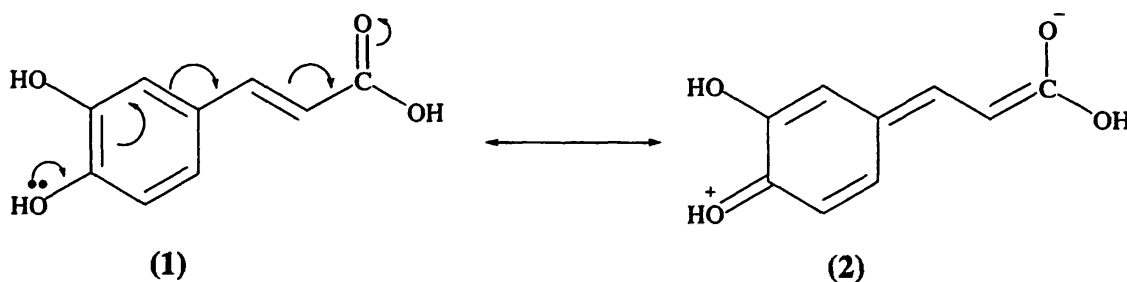
διπλούν ενώ των εκχυλισμάτων εις τριπλούν. Οι παραπάνω υγροχρωματογραφικές τεχνικές πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ.

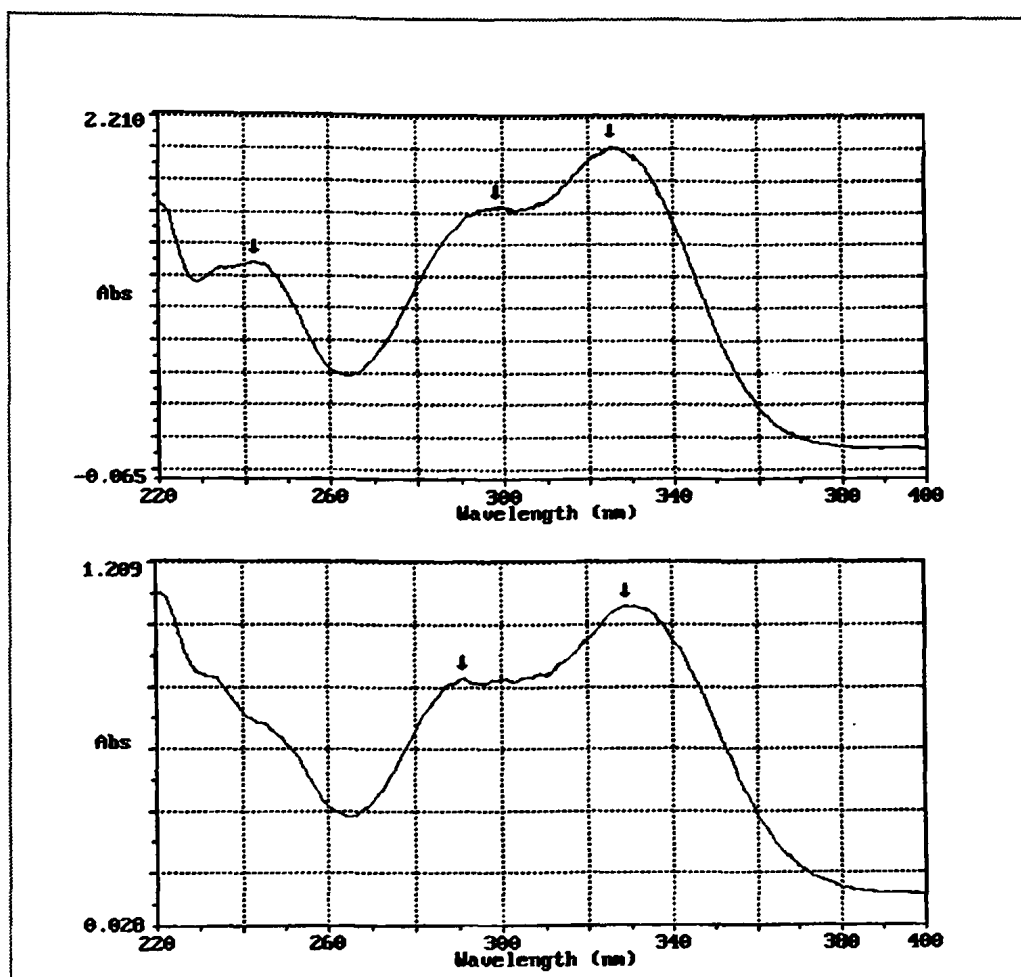
#### 4.2.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Παρασκευάστηκαν δύο τύποι εκχυλισμάτων, αιθανολικά και ακετονικά από τα τρία προαναφερόμενα φυτά. Η αιθανόλη επιλέχθηκε ως πολικός μη τοξικός διαλύτης που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη βιομηχανία και η ακετόνη ως λιγότερο πολικός διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση βιοενεργών φαινολικών συστατικών από τα φυτά (Bracco, *et al.*, 1981, Darkevicious, *et al.*, 1998, Pokorny and Korczak, 2001).

Τα αιθανολικά και ακετονικά εκχυλίσματα καθώς και οι πρότυπες ενώσεις τοποθετήθηκαν σε πλάκες πηκτής silica. Με τη βοήθεια της TLC διαπιστώθηκε η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος σε όλα τα εκχυλίσματα. Αντίθετα το καφεϊκό οξύ ανιχνεύθηκε μόνο στα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *O. vulgare* και *S.hortensis*. Διαπιστώθηκε επίσης η παρουσία διαφόρων τύπων φλαβονοειδών, τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και με τη μορφή γλυκοζιτών. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία, ένα σύστημα διαλυτών που ήταν κατάλληλο όχι μόνο για την έκλυση φαινολικών οξέων αλλά και φλαβονοειδών.

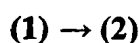
Τα πρότυπα δείγματα που μελετήθηκαν αρχικά με την βοήθεια της RP-HPLC ήταν διαλύματα καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος σε μεθανόλη, με διάφορες συγκεντρώσεις από 15 έως 100  $\mu\text{g/ml}$ . Η επεξεργασία όλων των χρωματογραφημάτων έγινε στα 326 nm που είναι το μέγιστο της απορρόφησης του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος (Σχήμα 4.3). Το μέγιστο αυτό οφείλεται στη διέγερση μεταφοράς φορτίου που λαμβάνει χώρα σε αρωματικές ενώσεις με εκτεταμένη συζυγία. Στο καφεϊκό οξύ η βασική κατάσταση περιγράφεται κυρίως με τις κλασσικές δομές Kekulé (1), ενώ η διεγερμένη κυρίως με την πολική (2):





Σχήμα 4.3.: Φάσμα υπεριώδους A) του καφεϊκού και B) του ροσμαρινικού οξέος.

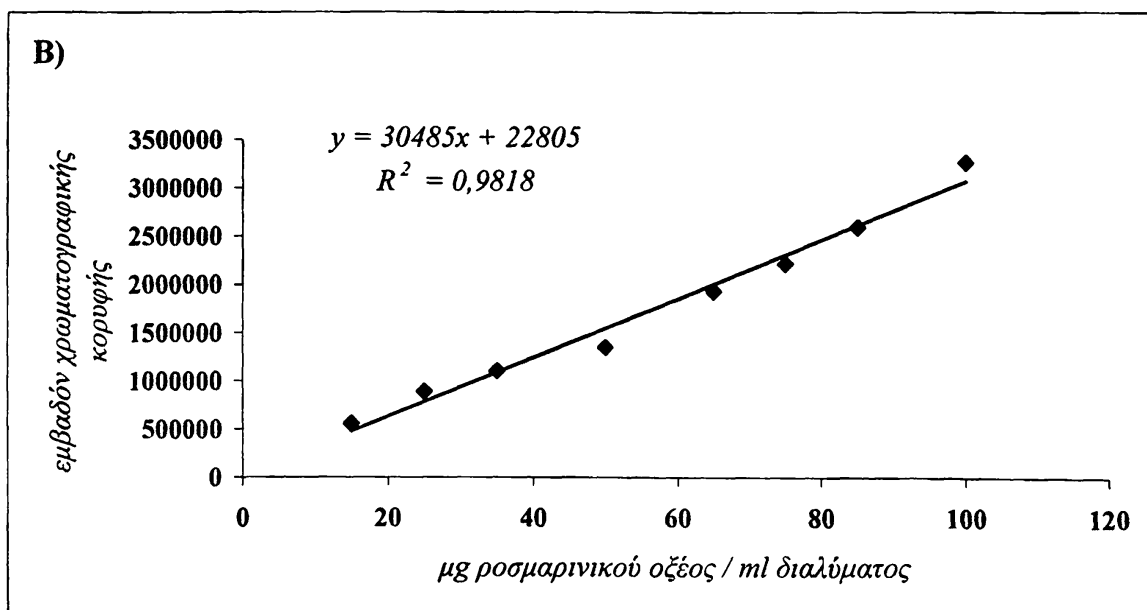
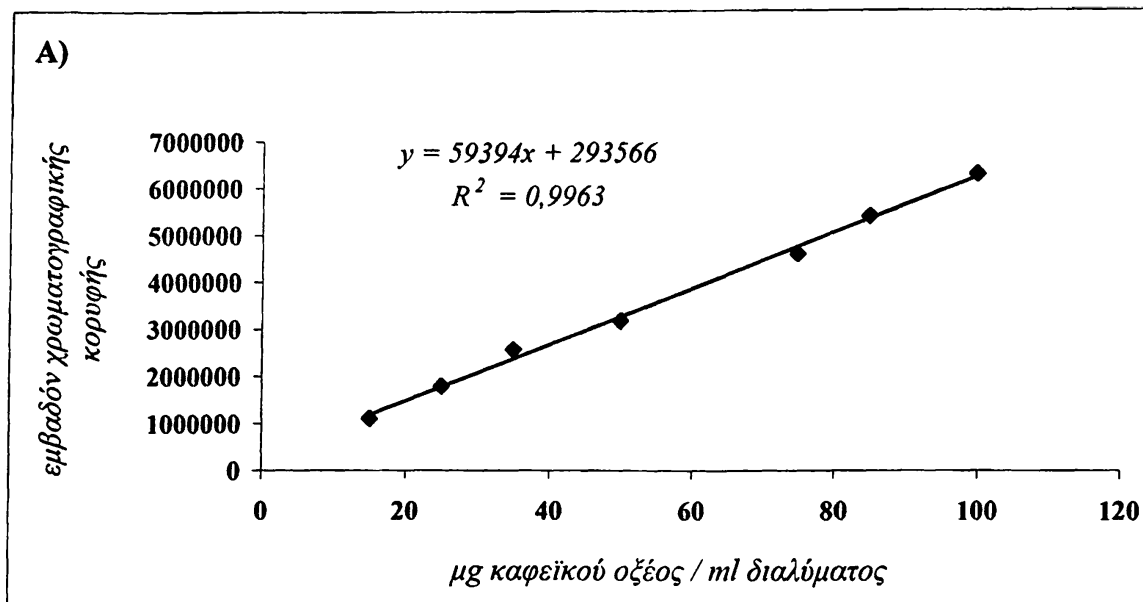
Συνεπώς, η απορρόφηση του καφεϊκού οξέος σε  $\lambda_{\max} \sim 326$  nm περιγράφεται ως διέγερση τύπου μεταφοράς φορτίου



και εξαιτίας της σημαντικής διαφοράς στην πολικότητα μεταξύ της δομής (1) και της (2) η απορρόφηση είναι έντονη (Γεροθανάσης, 1998).

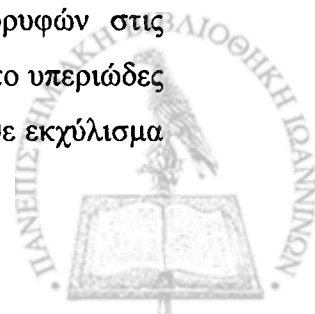
Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος με χρόνους συγκράτησης (retention time,  $t_R$ ) 5.05 και 14.85 min αντίστοιχα. Οι εξισώσεις που περιγράφουν τις καμπύλες αναφοράς αναγράφονται στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις.

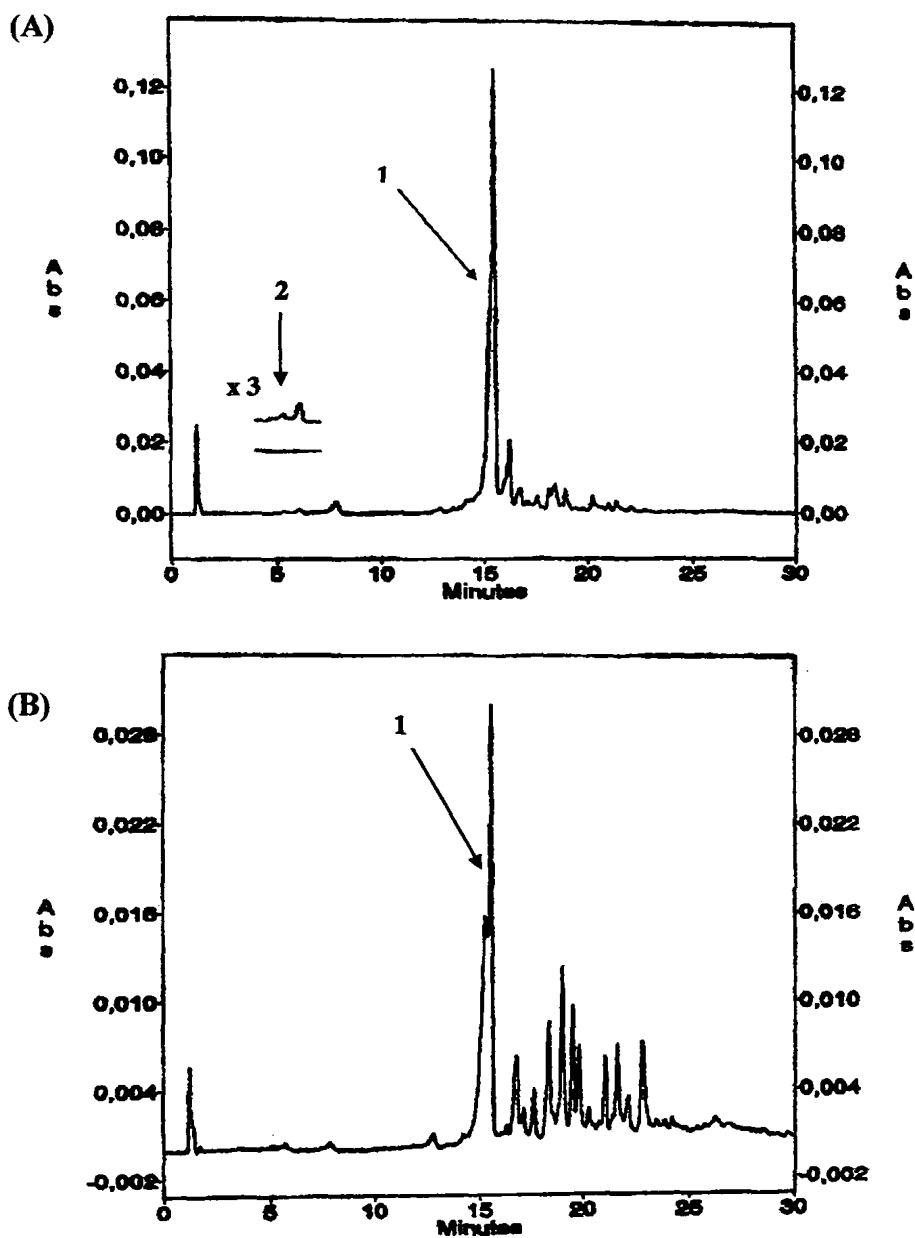




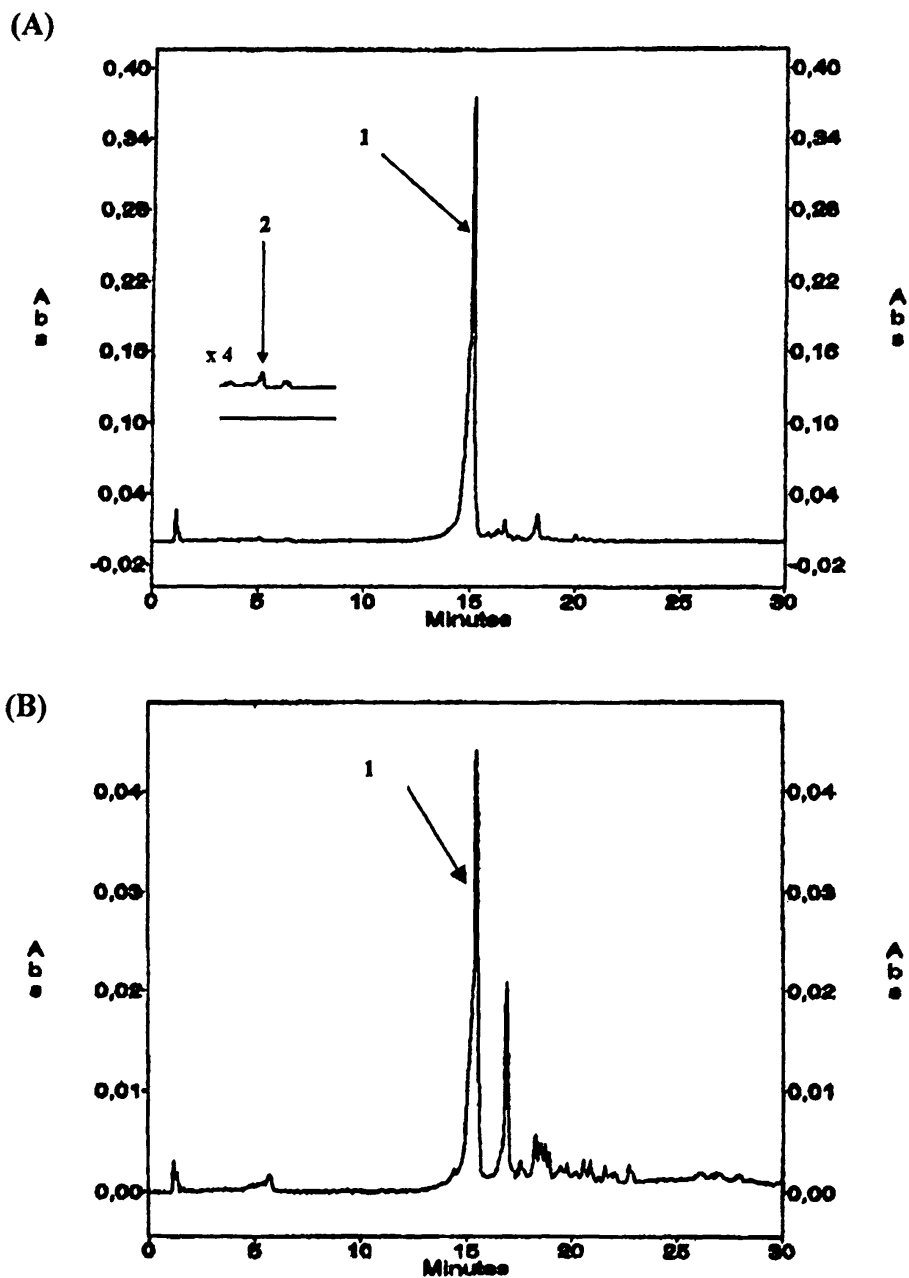
Σχήμα 4.4: Καμπύλες αναφοράς: (A) του καφεϊκού και (B) του ροσμαρινικού οξέος

Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του αιθανολικού και ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare* στα 326 nm. Η κύρια κορυφή των δύο χρωματογραφήματων αποδίδεται στο ροσμαρινικό οξύ (1). Η κορυφή που αντιστοιχεί στο καφεϊκό οξύ, (2), είναι κατά πολύ μικρότερη σε εμβαδόν συγκριτικά με την κορυφή του ροσμαρινικού οξέος. Στα Σχήματα 4.6 και 4.7 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα του αιθανολικού και ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *S.hortensis* και *S.fruticosa* αντίστοιχα, τα οποία είναι επίσης πλούσια σε ροσμαρινικό οξύ. Η απόδοση των κορυφών στις αντίστοιχες ενώσεις έγινε με βάση τους χρόνους συγκράτησης, το φάσμα τους στο υπεριώδες (UV) και τη σταθερή προσθήκη μικρών ποσοτήτων προτύπων ενώσεων στο κάθε εκχύλισμα (μέθοδος spiking).



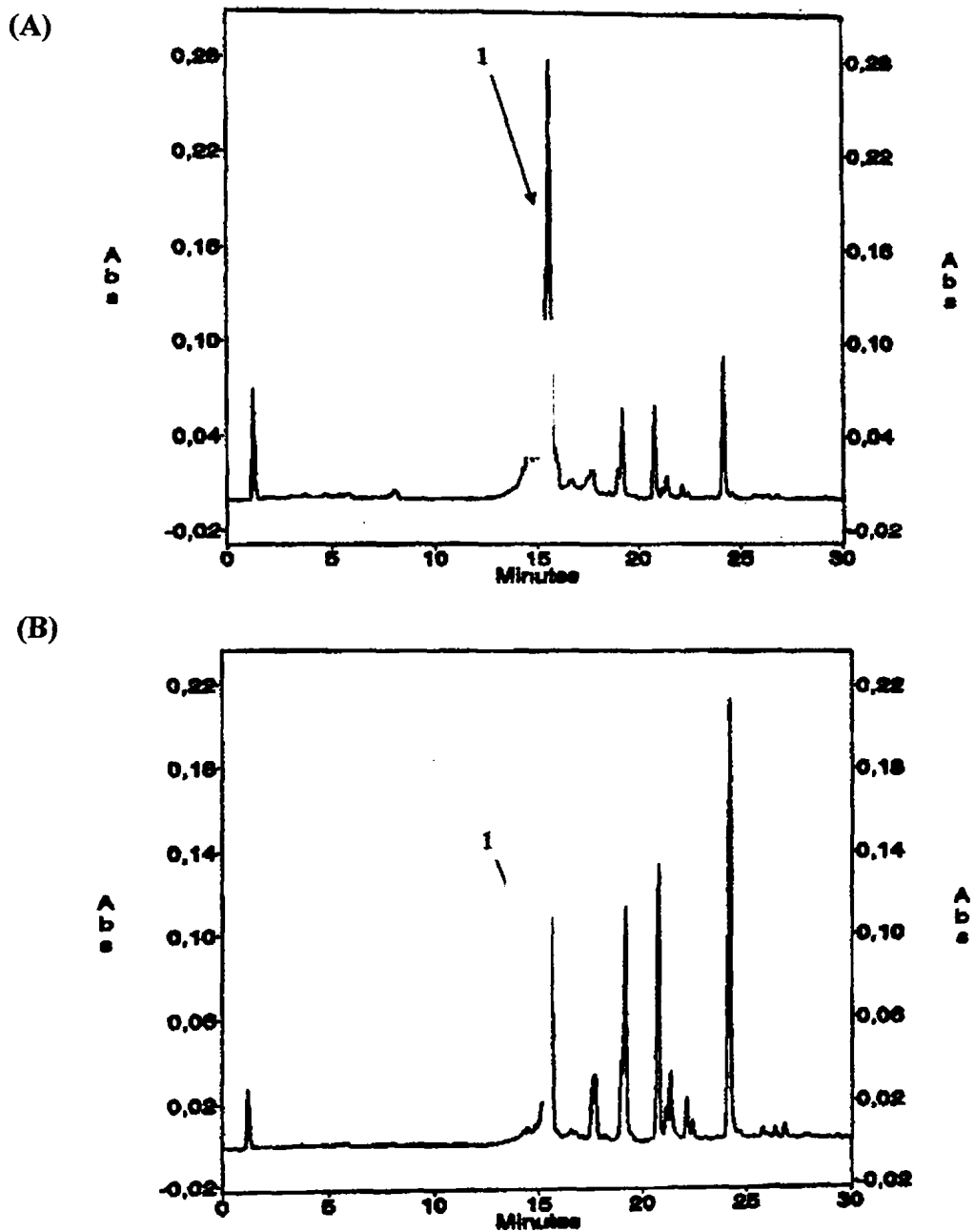


Σχήμα 4.5.: Χρωματογραφήματα: (A) αιθανολικού και (B) ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare*. Οι κορυφές που υποδηλώνονται με τα βέλη αποδίδονται στο ροσμαρινικό οξύ, 1 και καφεϊκό οξύ, 2.



Σχήμα 4.6.: Χρωματογραφήματα: (A) αιθανολικού και (B) ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *S. hortensis*. Οι κορυφές που υποδηλώνονται με τα βέλη αποδίδονται αποδίδονται στο ροσμαρινικό οξύ 1 και καφεϊκό οξύ 2.





Σχήμα 4.7.: Χρωματογραφήματα: (A) αιθανολικού και (B) ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *S. fruticosa*. Η κορυφή που υποδηλώνεται με το βέλος αποδίδεται στο ροσμαρινικό οξύ, 1.

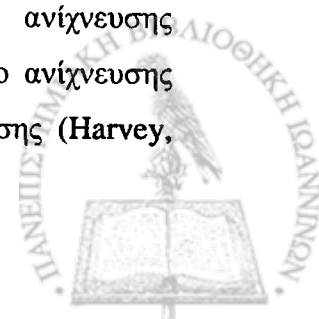
Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με την RP-HPLC στα 326 nm. Η συγκέντρωση των οξέων εκφράζεται σε mg οξέος/ 100 g εκχυλίσματος.

Πίνακας 4.2.: Ποσοτικός προσδιορισμός του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με την RP-HPLC στα 326 nm.

Φυτικό εκχύλισμα	καφεϊκό οξύ mg/100g εκχυλίσματος	Ροσμαρινικό οξύ mg/100g εκχυλίσματος <sup>a</sup>
αιθανολικό εκχύλισμα <i>O. vulgare</i>	ίχνη	1271±115
ακετονικό εκχύλισμα <i>O. vulgare</i>	-	231±15
αιθανολικό εκχύλισμα <i>S. hortensis</i>	ίχνη	2137±223
ακετονικό εκχύλισμα <i>S. hortensis</i>	-	249±11
αιθανολικό εκχύλισμα <i>S. fruticosa</i>	-	1483±154
ακετονικό εκχύλισμα <i>S. fruticosa</i>	-	556±53

<sup>a</sup>Οι τιμές που αναγράφονται προκύπτουν από τους μέσους όρους 3 μετρήσεων (± η τυπική απόκλιση).

Παρατηρείται ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της υγρής χρωματογραφίας, το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *S. hortensis* είναι πιο πλούσιο σε ροσμαρινικό οξύ από ότι τα υπόλοιπα εκχυλίσματα και ακολουθούν τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *S. fruticosa* και *O. vulgare*. Επίσης, τα ακετονικά εκχυλίσματα περιέχουν ροσμαρινικό οξύ σε ποσότητα που είναι κατά μία τάξη μεγέθους μικρότερη από την ποσότητα των αντίστοιχων αιθανολικών εκχυλισμάτων. Η κατάταξή τους σχετικά με τη συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος που ταυτοποιήθηκε δεν είναι ίδια με εκείνη των αιθανολικών εκχυλισμάτων. Έτσι, το πλουσιότερο σε ροσμαρινικό οξύ ακετονικό εκχύλισμα ανήκει στο φυτό *S. fruticosa* το οποίο περιέχει διπλάσια ποσότητα ροσμαρινικού οξέος συγκριτικά με τα άλλα δύο εκχυλίσματα. Το καφεϊκό οξύ ταυτοποιήθηκε μόνον στα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *S. hortensis* και *O. vulgare* σε μικρές ποσότητες, που βρίσκονται εκτός της καμπύλης αναφοράς του Σχήματος 5.6(A) και συνεπώς ήταν μικρότερες από το ποσοτικό όριο ανίχνευσης (quantitative detection limit, QDL), δηλαδή <0.1 μg/25μL. Ως ποσοτικό όριο ανίχνευσης λαμβάνεται τριπλάσια ποσότητα εκείνης που καταγράφεται ως όριο ανίχνευσης (Harvey, 2000).





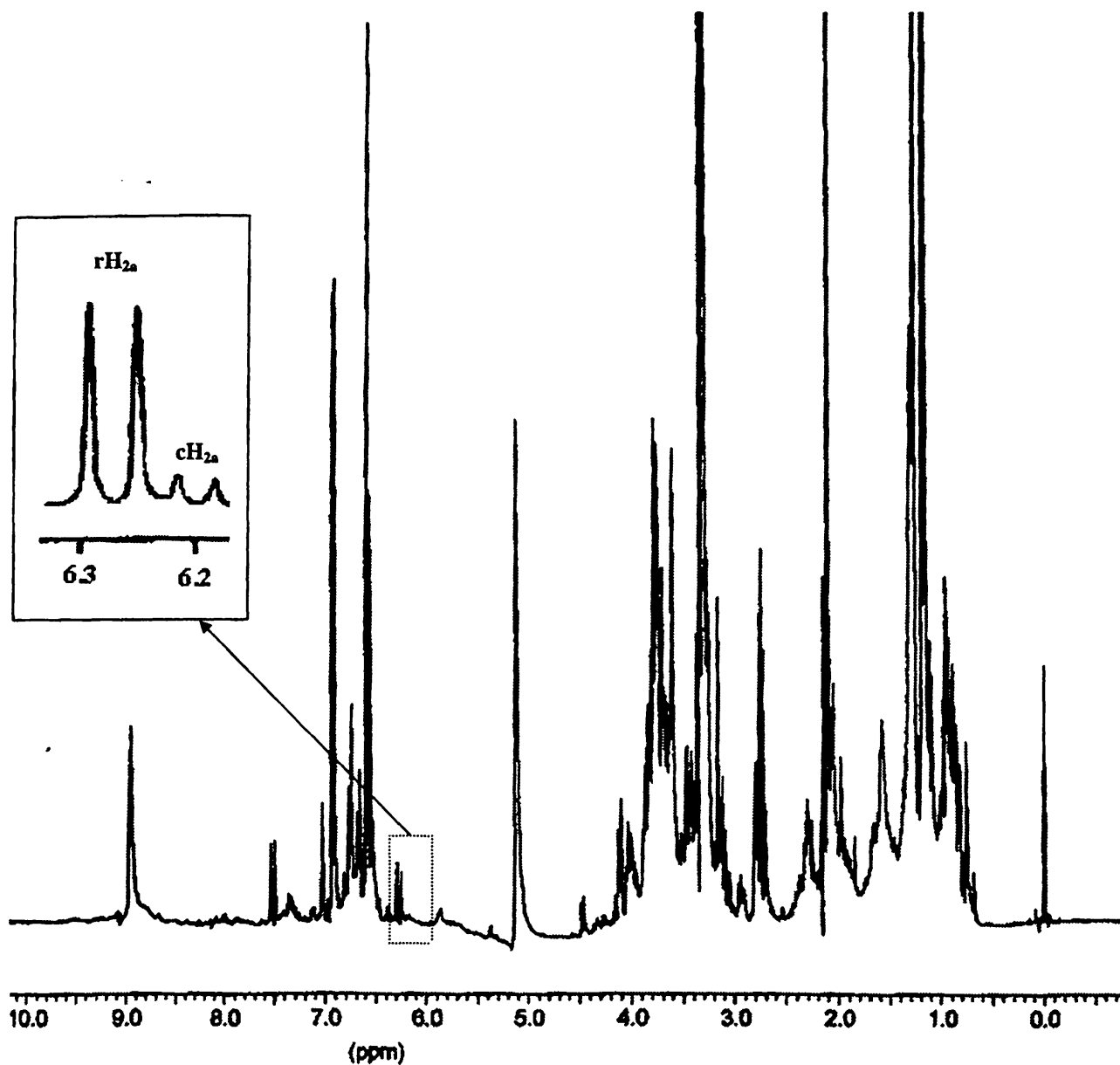
#### 4.3. Μελέτη της σύστασης των εκχυλισμάτων με τη χρήση συνδυασμένων τεχνικών NMR.

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 3, η ταυτοποίηση του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος στα φυτικά εκχυλίσματα είναι εφικτή με τη συνδυαστική μεθοδολογία μεταβλητής θερμοκρασίας DQF COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  και HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό των εκχυλισμάτων στα επιμέρους συστατικά τους. Η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμόστηκε στα αιθανολικά και ακετονικά εκχυλίσματα των φυτών *O. vulgare*, *S. hortensis* και *S. fruticosa* και ακολούθησε η ολοκλήρωση των κορυφών απορρόφησης του πρωτονίου  $\text{H}_2\text{a}$  του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος, που στηρίχθηκε κυρίως στα φάσματα μιας διάστασης των εκχυλισμάτων τους στη θερμοκρασία των 243 K.

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε μερικώς δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OH}$ ) και τα ακετονικά σε δευτεριωμένη ακετόνη ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ). Οι χημικές μετατοπίσεις υπολογίστηκαν σε σχέση με τη μετατόπιση της εσωτερικής ένωσης αναφοράς 3-τριμεθυλοσιλυλο-3,3,2,2 -τετραδευτεριωμένο προπιονικό άλας νατρίου (TMSP- $\text{d}_4$   $\delta=0.000$ ) για τα αιθανολικά εκχυλίσματα, και τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS,  $\delta=0.000$ ) για τα ακετονικά εκχυλίσματα. Το TMSP- $\text{d}_4$  και το TMS, που ήταν καθορισμένης συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκαν και για την ολοκλήρωση των κορυφών απορρόφησης κατά τη διαδικασία του ποσοτικού προσδιορισμού. Για τη λήψη των φασμάτων σε μερικώς δευτεριωμένη μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία βαθμίδωσης πεδίου (field gradient). Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού UXNMR της Bruker.

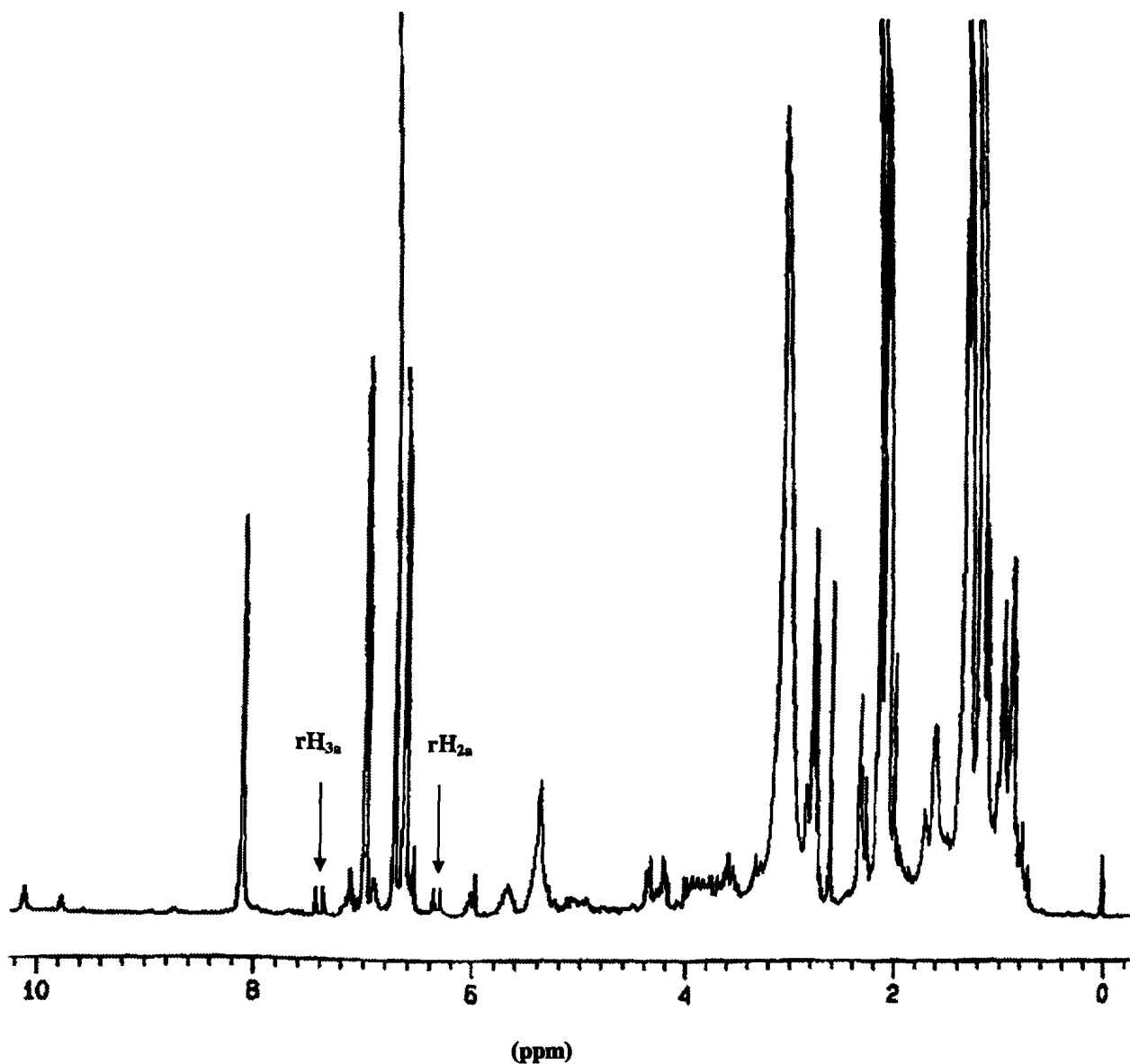
Στο Σχήμα 4.8 παρουσιάζεται το φάσμα NMR  $^1\text{H}$  του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare* στη θερμοκρασία των 243 K.





Σχήμα 4.8.: Φάσμα  $\text{NMR-}^1\text{H}$  αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare* σε μερικώς δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OH}$ ) με τη μεθοδολογία βαθμίδωσης πεδίου (*field gradient*), στη θερμοκρασία των 243 K. Στην επιλεγμένη περιοχή διαχωρίζονται σαφώς τα πρωτόνια  $\text{H}_{2a}$  του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος ( $\text{NS}=1280$ ).

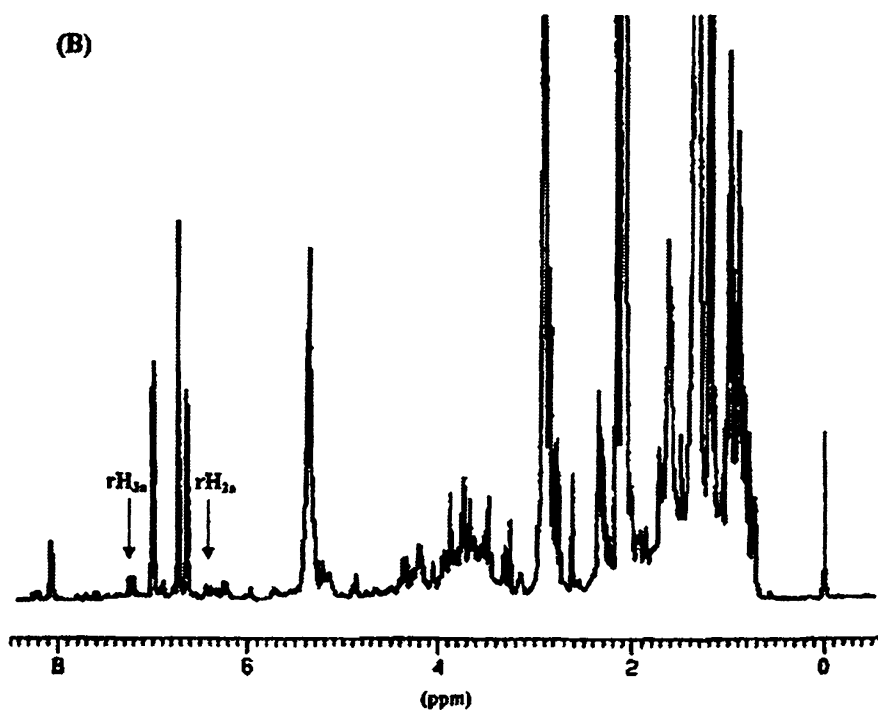
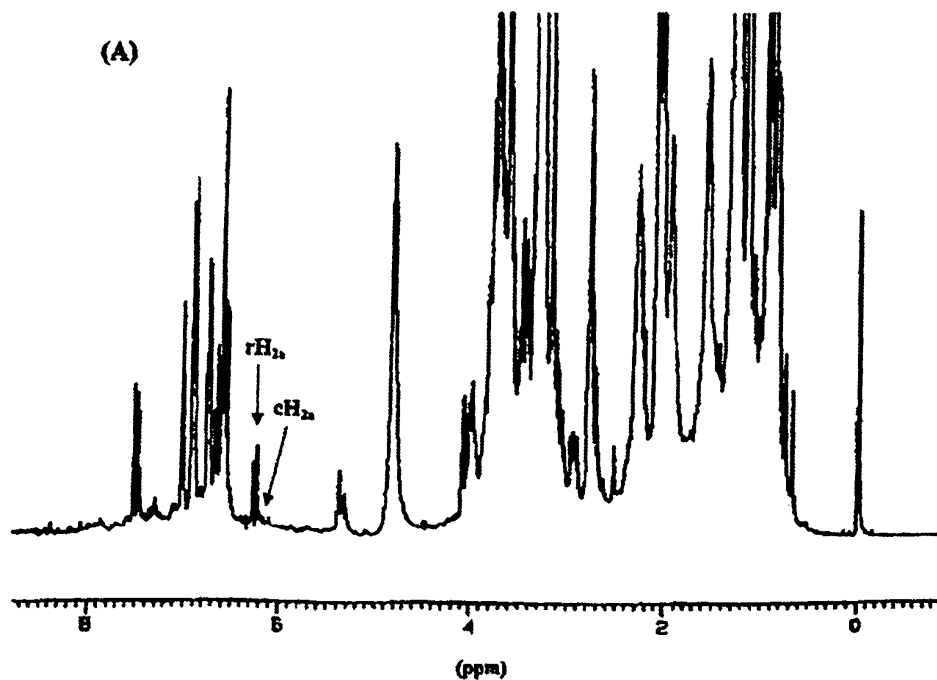
Στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζεται το φάσμα NMR- $^1\text{H}$  του ακετονικού εκχυλίσματος του ίδιου φυτού, σε διαλύτη δευτεριωμένη ακετόνη στους 243 K.



Σχήμα 4.9.: Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare* σε δευτεριωμένη ακετόνη ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) στη θερμοκρασία των 243 K. Τα βέλη υποδηλώνουν τα πρωτόνια  $\text{H}_{3a}$  και  $\text{H}_{2a}$  του ροσμαρινικού οξέος (NS= 2000).

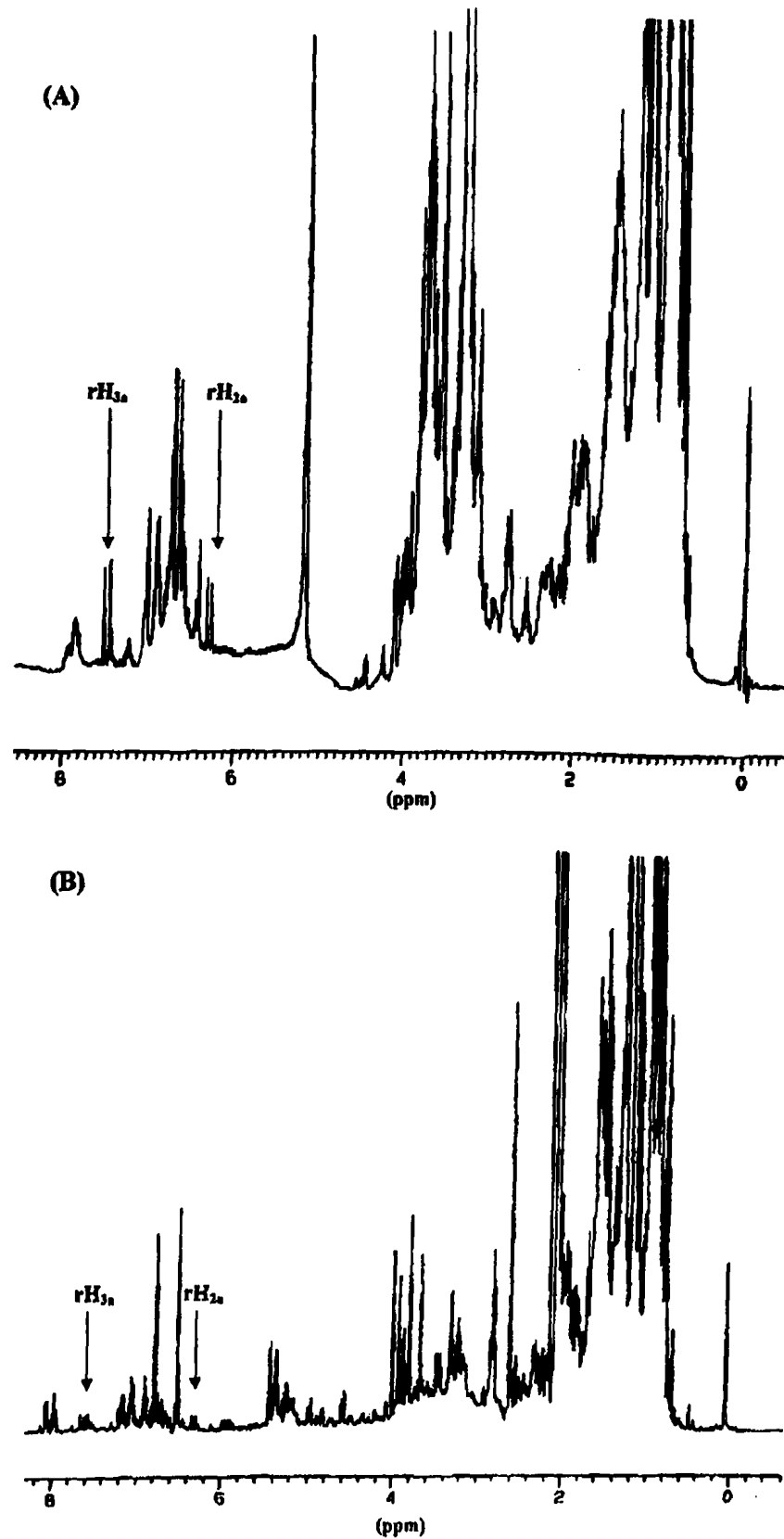
Ομοίως στα Σχήματα 4.10 και 4.11 παρουσιάζονται φάσματα NMR- $^1\text{H}$  των αιθανολικών και ακετονικών εκχυλισμάτων των φυτών *S.hortensis* και *S.fruticosa* αντίστοιχα.



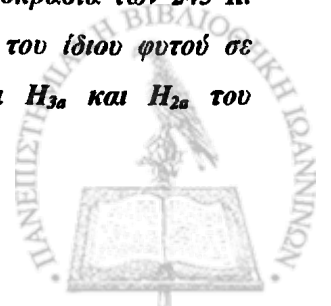


Σχήμα 4.10.: (A) Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *S.hortensis* σε  $\text{CD}_3\text{OH}$  με τη μεθοδολογία βαθμίδωσης πεδίου (field gradient), στη θερμοκρασία των 243 K. Τα βέλη υποδηλώνουν τα πρωτόνια  $\text{H}_{2a}$  του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος ( $\text{NS}=2500$ ). (B) Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  του ακετονικού εκχυλίσματος του ίδιου φυτού σε  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  στη θερμοκρασία των 243 K. Τα βέλη υποδηλώνουν τα πρωτόνια  $\text{H}_{3a}$  και  $\text{H}_{2a}$  του ροσμαρινικού οξέος ( $\text{NS}=3000$ ).





Σχήμα 4.11.: (A) Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *S. fruticosa* σε CD<sub>3</sub>OH με τη μεθοδολογία βαθμίδωσης πεδίου (field gradient), στη θερμοκρασία των 243 K. (NS=1280). (B) Φάσμα NMR-<sup>1</sup>H ακετονικού εκχυλίσματος του ίδιου φυτού σε CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> (243 K). Τα βέλη υποδηλώνουν τα πρωτόνια H<sub>3a</sub> και H<sub>2a</sub> του ροσμαρινικού οξέος (NS= 3000).



Από τα φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των αιθανολικών και ακετονικών εκχυλισμάτων γίνεται σαφές ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα είναι πλούσια σε ροσμαρινικό οξύ σε αντίθεση με τα ακετονικά που περιέχουν πολύ μικρότερες ποσότητες του οξέος. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος. Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας NMR, σε ότι αφορά την ταυτοποίηση του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος στα εκχυλίσματα, είναι σε άριστη συμφωνία με εκείνα των υδροχρωματογραφικών τεχνικών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως με τη φασματοσκοπία NMR επιτυγχάνεται ικανοποιητικός ποσοτικός προσδιορισμός.

**Πίνακας 4.3.: Ποσοτικός προσδιορισμός του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος με τη φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H.**

Φυτικό εκχύλισμα	καφεϊκό οξύ mg/100g εκχυλίσματος	Ροσμαρινικό οξύ mg/100g εκχυλίσματος <sup>a</sup>
<i>O. vulgare</i> αιθανολικό εκχύλισμα	ίχνη	904±74
<i>O. vulgare</i> ακετονικό εκχύλισμα	-	173±12
<i>S. hortensis</i> αιθανολικό εκχύλισμα	ίχνη	2517±215
<i>S. hortensis</i> ακετονικό εκχύλισμα	-	267±17
<i>S. fruticosa</i> αιθανολικό εκχύλισμα	-	1185±83
<i>S. fruticosa</i> ακετονικό εκχύλισμα	-	359±29

<sup>a</sup>Οι τιμές που αναγράφονται προκύπτουν από τους μέσους όρους 4 μετρήσεων (± η τυπική απόκλιση).



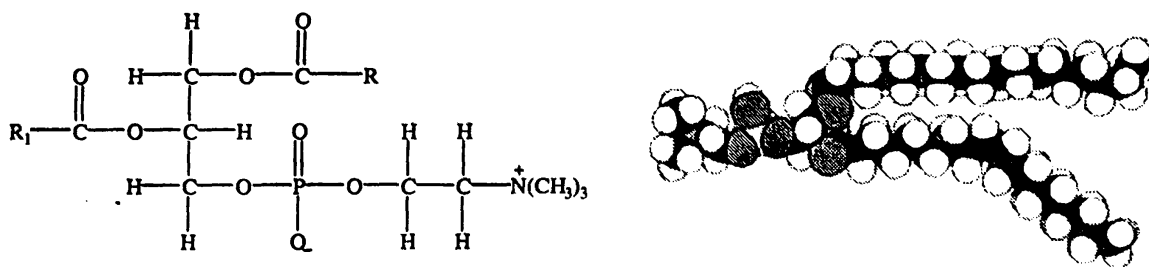
#### 4.4. Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων με επιταχυνόμενη οξείδωση λιποσωμάτων λεκιθίνης, παρουσία αλάτων χαλκού

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες που σχετίζονται τόσο με τις πειραματικές συνθήκες της οξείδωσης (συνήθως επιταχυνόμενης) όσο και με τα προϊόντα που προσδιορίζονται (πρωτογενή και δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης). Η ποικιλία των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι μεγάλη. Για παράδειγμα, όταν για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιείται ένα υπόστρωμα που βρίσκεται σε ελαιώδη μορφή ή σε μορφή γαλακτώματος θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα φαινόμενα των διεπιφανειακών αλληλεπιδράσεων (Frankel *et al.*, 1994). Σε ετερογενή συστήματα υποστρωμάτων, σημαντική είναι η επίδραση των φυσικών ιδιοτήτων του υποστρώματος όπως η λιποφιλικότητα, η διαλυτότητα, η πολικότητα και η κατανομή μεταξύ υδατικής και λιπαρής φάσης (Yi, *et al.*, 1997). Σήμερα γίνεται δεκτό ότι πολικές ενώσεις είναι πιο δραστικές σε μη πολικά υποστρώματα και αντιστρόφως (Frankel, *et al.*, 1996, Heinonen, *et al.* 1998).

Μεταξύ των μεθόδων που απαντώνται στη βιβλιογραφία για την αποτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων, ορισμένες αναφέρονται σε βιολογικά συστήματα. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα η ανθρώπινη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Human Low Density Lipoprotein, LDL) καθώς και λιποσώματα της λεκιθίνης που προσομοιάζουν κυτταρικές μεμβράνες (Frankel, *et al.*, 1996, Yi, *et al.*, 1997, Satué-García, *et al.*, 1997, Heinonen, *et al.*, 1998).

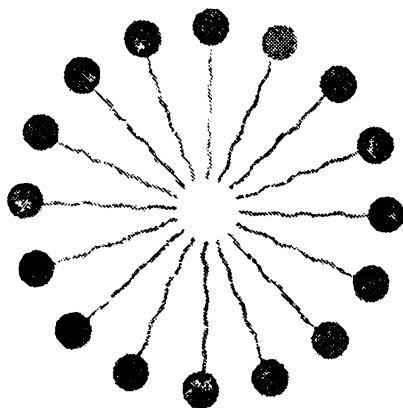
4.4.1. Λιποσώματα λεκιθίνης ως υπόστρωμα για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών προϊόντων. Τα λιποσώματα αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν τα κύρια συστατικά των βιολογικών μεμβρανών. Η λεκιθίνη είναι εστέρας του φωσφατιδικού οξέος με την αζωτούχο ένωση χολίνη (φωσφατιδυλοχολίνη) (Σχήμα 4.12). Από τη μελέτη του χωροπληρωτικού μοντέλου της λεκιθίνης (Σχήμα 4.12) παρατηρείται πως το περίγραμμά της είναι κατά προσέγγιση ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο. Οι δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων, είναι σχεδόν παράλληλες η μία προς την άλλη ενώ η ομάδα της φωσφορυλοχολίνης είναι προσανατολισμένη προς την αντίθετη κατεύθυνση (η κάμψη της μιας από τις δύο υδρογονοανθρακικές αλυσίδες οφείλεται στην *cis* ισομέρεια του διπλού δεσμού του ελαϊκού οξέος). Όταν τα φωσφολιπίδια βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον είναι σαφές πως θα πάρουν τέτοια χωροδιάταξη, ώστε να ικανοποιηθούν τόσο οι υδρόφιλες όσο και οι υδρόφοβες ιδιότητές τους.



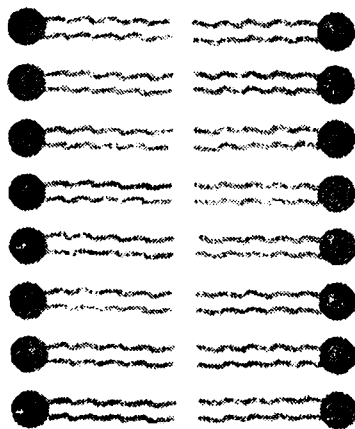


Σχήμα 4.12.: Η δομή και το χωροπληρωτικό μοντέλο της λεκιθίνης

Οι διατάξεις που πληρούν τις παραπάνω ιδιότητες είναι ο σχηματισμός μικκυλίων (Σχήμα 4.13) ή ο σχηματισμός διαμοριακού λεπτού φύλλου (Σχήμα 4.14). Για τα περισσότερα φωσφολιπίδια, η πιο ευνοούμενη θερμοδυναμικά δομή σε υδατικό περιβάλλον είναι αυτή του λεπτού διαμοριακού φύλλου εξαιτίας του μεγάλου όγκου που καταλαμβάνουν οι δύο αλυσίδες λιπαρών οξέων. Αυθόρμητος σχηματισμός μικκυλίων λαμβάνει χώρα όταν υπάρχει μόνο μία αλυσίδα λιπαρού οξέος στο μόριο του φωσφολιπιδίου.



Σχήμα 4.13: Διάγραμμα της διατομής ενός μικυλίου



Σχήμα 4.14: Διάγραμμα της διατομής μιας μεμβρανικής διπλοστοιβάδας η οποία έχει σχηματιστεί από μόρια φωσφολιπιδίου



Η διάταξη των φωσφολιπιδίων στις βιολογικές μεμβράνες έχει μεγάλη βιολογική σημασία. Ο ρόλος των βιολογικών μεμβρανών, άλλωστε, δεν περιορίζεται μόνον στη μεταφορά ενώσεων μέσα στα κύτταρα, αλλά και στην ίδια τη λειτουργία του κυττάρου. Στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, για παράδειγμα, βρίσκονται οι λιποπρωτεΐνες που είτε τη διαπερνούν τελείως, είτε είναι δεσμευμένες στην επιφάνεια της μεμβράνης (Stryer, 1997).

Με βάση τα παραπάνω είναι σαφές ότι η χρήση των λιποσωμάτων λεκιθίνης αποτελεί ένα κατάλληλο υπόστρωμα για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αν και η απουσία πρωτεϊνών αποτρέπει την *in vivo* μελέτη.

4.4.2. Πειραματικό μέρος. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης, αρχικά προετοιμάζεται κατάλληλα το υπόστρωμα. Ζυγίζονται 3 g λεκιθίνης και διασπείρονται σε 50 ml δις-απιονισμένου νερού με τη βοήθεια μιας ράβδου πεπλατυσμένης στο ένα άκρο της. Ακολουθεί ανάμιξη με συσκευή υπερήχων συνολικού χρόνου 12 min (10 ml για 2,5 min) και μέτρηση του pH (~ 4). Από το προς μελέτη εκχύλισμα ζυγίζεται τόση ποσότητα ώστε το τελικό μεθανολικό διάλυμα (10 ml) να περιέχει φαινολικά συστατικά με συγκέντρωση 20 μM. Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών στο δείγμα έγινε χρωματομετρικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Σωτηροπούλου, 2000). Σε εσφυρισμένες κωνικές φιάλες των 100 ml προστίθενται με πιπέτα ακριβείας 0.5 mL του διαλύματος που περιέχει το αντιοξειδωτικό, 4 ml λιποσώματος και 25,5 mL δις-απιονισμένου νερού (με προχοΐδα), ώστε ο συνολικός όγκος του διαλύματος να είναι 30 mL. Το μίγμα αναμιγνύεται για 2 min σε λουτρό υπερήχων. Στη συνέχεια ζυγίζεται 0,1 g του παραπάνω διαλύματος και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 5 ml όπου συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη και μετράται η απορρόφηση των σχηματιζομένων συζυγών διενίων στα 234 nm (μέτρηση σε χρόνο ίσο με το μηδέν). Ακολουθεί προσθήκη 30 μL υδατικού διαλύματος οξικού χαλκού 3 μM, με τη βοήθεια μικροσύριγγας, έτσι ώστε να επιταχυνθεί η οξείδωση και το διάλυμα τοποθετείται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα (100 rpm, 37<sup>o</sup> C). Λαμβάνονται μετρήσεις της απορρόφησης του δείγματος στα 234 nm (όπως περιγράφηκε προηγουμένως), κάθε 24 περίπου ώρες, για 3 μέρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για δείγμα μάρτυρα (χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικού), και για δείγμα που περιείχε καφεϊκό οξύ ως αντιοξειδωτικό, για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Όλες οι μετρήσεις έγιναν δύο φορές (Yi *et al.*, 1997, Heinonen *et al.*, 1998).



Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $\mu\text{moles}$  υδροϋπεροξειδίων/kg φωσφατιδυλοχολίνης. Με βάση το νόμο Lambert-Beer, υπολογίζεται η συγκέντρωση των υπεροξειδίων σε  $\text{mole/l}$ :

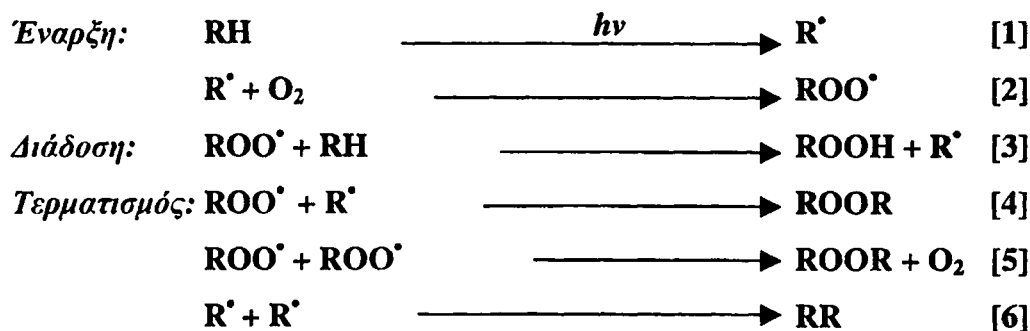
$$A = \epsilon b C$$

όπου  $\epsilon = 26000 \text{ lt/cm.mol}$  (Yi *et al.*, 1997, Frankel *et al.*, 1994) και

$$b = 1 \text{ cm}$$

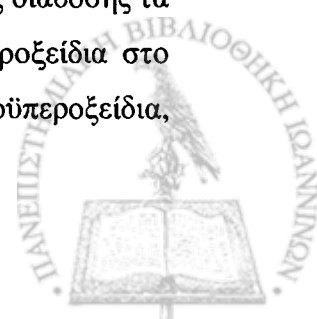
και ακολουθεί η μετατροπή των αποτελεσμάτων σε  $\mu\text{moles/kg}$  φωσφατιδυλοχολίνης.

**4.4.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.** Όπως είναι γνωστό, η οξείδωση ενός λιπιδικού υποστρώματος (δηλαδή η αντίδρασή του με το οξυγόνο) μπορεί να γίνει κυρίως μέσω δύο διεργασιών: της αυτοοξείδωσης και της φωτοοξείδωσης. Θεωρείται ότι η αυτοοξείδωση είναι μια αυτοκαταλύομενη αλυσιδωτή αντίδραση που χωρεί με το μηχανισμό ελευθέρων ριζών. Έχει τρία στάδια, την έναρξη (*initiation*), τη διάδοση (*propagation*) και τον τερματισμό (*termination*), τα οποία μπορούν να παρασταθούν με τις παρακάτω αντιδράσεις:

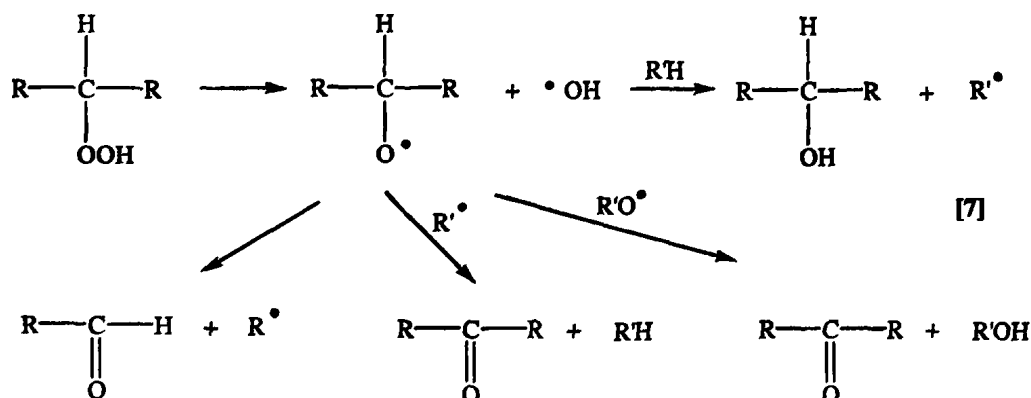


Στο στάδιο της έναρξης (αντιδράσεις [1] και [2]) το λιπαρό οξύ, RH, σχηματίζει την ελεύθερη ρίζα, R<sup>•</sup>, η οποία αντιδρά με το οξυγόνο και σχηματίζει την υπεροξειδική ρίζα, ROO<sup>•</sup>. Η αντίδραση [3] αποτελεί το στάδιο της διάδοσης του φαινομένου κατά το οποίο η υπεροξειδική ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο λιπαρού οξέος και μετατρέπεται σε υδροϋπεροξειδίο με ταυτόχρονη δημιουργία νέας ρίζας. Στις αντιδράσεις τερματισμού, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους και έτσι συμπληρώνεται ένας κύκλος οξείδωσης.

Τα υδρογόνα στην  $\alpha$ - θέση ως προς το διπλό δεσμό των λιπαρών οξέων, είναι πιο ευπαθή λόγω της ηλεκτρονικής κατανομής στο δεσμό αυτό. Έτσι, στο στάδιο της διάδοσης τα υδρογόνα αυτά αφαιρούνται εύκολα και σχηματίζονται δευτεροταγή υδροϋπεροξειδία στο άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε  $\alpha$ - θέση ως προς το διπλό δεσμό. Από τα υδροϋπεροξειδία,

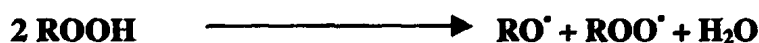


ή τα άλλα ενδιάμεσα προϊόντα, σχηματίζεται ένα πλήθος οργανικών ενώσεων όπως οξέα χαμηλού μοριακού βάρους, αλκοόλες, αλδεύδες και κετόνες (αντιδράσεις [7]).



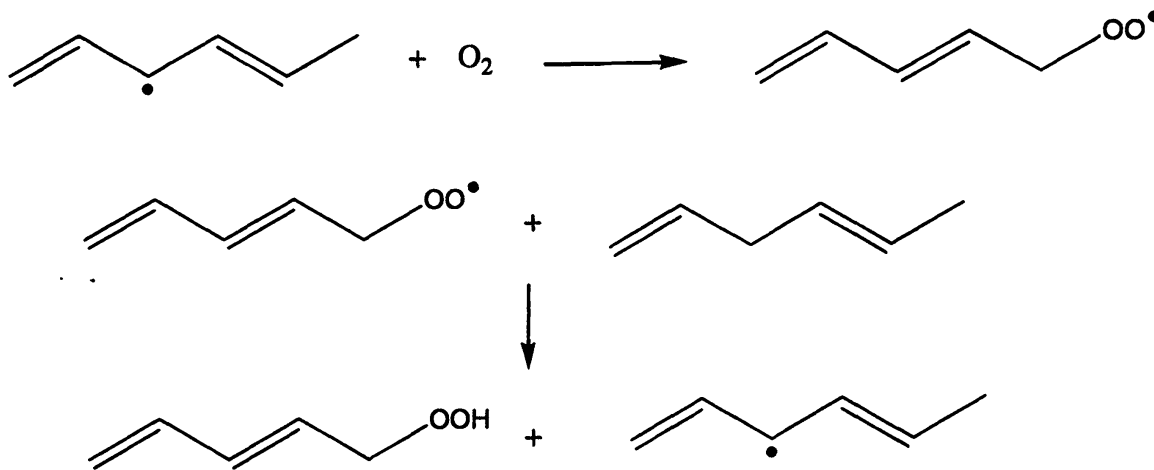
Από τις ενώσεις αυτές, οξέα χαμηλού μοριακού βάρους και αλδεύδες συμβάλλουν στην εμφάνιση δυσάρεστης οσμής.

Μέταλλα όπως ο χαλκός και ο σίδηρος επιταχύνουν την οξείδωση προκαλώντας το σχηματισμό νέων ριζών, όπως φαίνεται παρακάτω (Μπόσκου, 1989):



Η μέθοδος της επιταχυνόμενης οξείδωσης λιποσωμάτων λεκιθίνης, παρουσία αλάτων χαλκού παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της πορείας της οξείδωσης παρακολουθώντας το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων. Αναμένεται πως αν ένα εκχύλισμα παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, τότε η παρουσία του θα καθυστερήσει το σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων. Ο σχηματισμός αυτός ελέγχεται, με τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 234 nm, κάθε 24 περίπου ώρες. Η παρατηρούμενη απορρόφηση οφείλεται στη διέγερση  $\pi \rightarrow \pi^*$  του συζυγούς διενίου. Αναλυτικά, τα συζυγή διένια σχηματίζονται όπως φαίνεται παρακάτω.





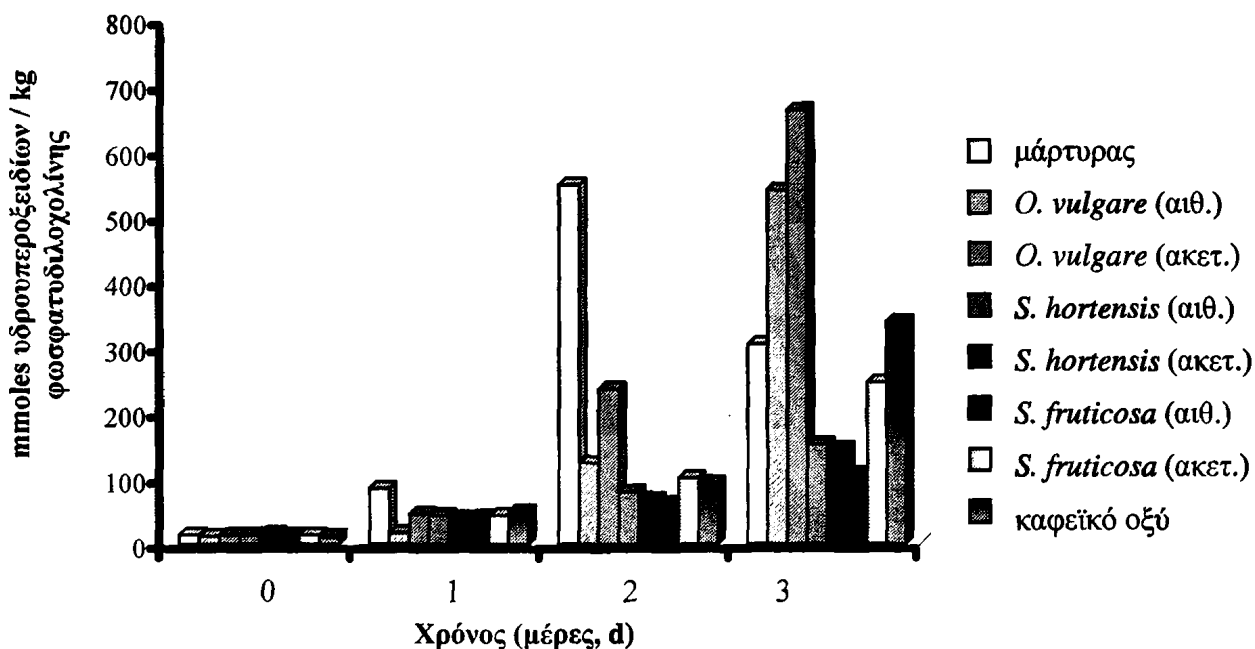
Στον Πίνακα 4.4 που ακολουθεί, αναγράφονται οι τιμές των σχηματιζόμενων υδροϋπεροξειδίων κατά την οξείδωση των λιποσωμάτων λεκιθίνης παρουσία ή μη των εκχυλισμάτων.

**Πίνακας 4.4.:** Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος της ρίγανης με τη μέθοδο της επιταχυνόμενης οξείδωσης λιποσωμάτων παρουσία αλάτων χαλκού.

Δείγμα	nmoles υδροϋπεροξειδίων / kg φωσφατιδυλοχολίνης			
	Χρόνος (ώρες)			
	$t = 0$	$t = 24$	$t = 45$	$t = 68$
μάρτυρας	14	85	550	306
<i>O.vulgare</i> αιθανολικό εκχύλισμα	12	17	124	542
<i>O.vulgare</i> ακετονικό εκχύλισμα	14	46	237	665
<i>S. hortensis</i> αιθανολικό εκχύλισμα	14	44	80	162
<i>S. hortensis</i> ακετονικό εκχύλισμα	16	40	69	146
<i>S. fruticosa</i> αιθανολικό εκχύλισμα	14	42	63	107
<i>S. fruticosa</i> ακετονικό εκχύλισμα	14	44	101	247
Καφεϊκό οξύ	12	50	94	340



Στο Σχήμα 4.15 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση σχηματισμού υδροϋπεροξειδίων σε συνάρτηση με το χρόνο, η οποία μας επιτρέπει να έχουμε μια αξιολόγηση του βαθμού οξείδωσης του υποστρώματος υπό τις συνθήκες που αναφέρθηκαν.



Σχήμα 4.15.: Γραφική παράσταση της μεταβολής του σχηματισμού των υδροϋπεροξειδίων σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία ή μη αντιοξειδωτικού (Exarchou et al., 2002a).

Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των υδροϋπεροξειδίων που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία της επιταχυνόμενης οξείδωσης, η οποία αναμένεται να φτάνει ένα μέγιστο και στη συνέχεια να μειώνεται εξαιτίας της κατανάλωσης των υδροϋπεροξειδίων προς στο σχηματισμό νέων ριζών και τη μετατροπή τους σε αλδεΐδες, οξέα, αλκοόλες, κετόνες και άλλες ενώσεις (αντίδραση [7]).

Από τη μελέτη της γραφικής παράστασης του Σχήματος 4.15, προκύπτει πως όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση καθυστερώντας το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων. Αυτό γίνεται κατανοητό από το γεγονός ότι, ενώ στο δείγμα μάρτυρα η μέγιστη συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων παρατηρείται τη δεύτερη μέρα του πειράματος, στα δείγματα παρουσία εκχυλίσματος ή καφεϊκού οξέος η μέγιστη συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων λαμβάνει χώρα την τρίτη μέρα. Σημειώνεται πως σύμφωνα με τις αντιδράσεις των τριών σταδίων της οξείδωσης ενός λιπιδικού υποστρώματος, ο μέγιστος σχηματισμός των υδροϋπεροξειδίων αντιστοιχεί στο στάδιο της διάδοσης της οξείδωσης (αντίδραση [3]).



Ένα ακόμη στοιχείο που προκύπτει από τη γραφική παράσταση του Σχήματος 4.15 είναι πως τα αιθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των αντίστοιχων ακετονικών εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *O. vulgare* παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση υδροϋπεροξειδίων κατά την τρίτη μέρα, σε σχέση με το αντίστοιχο ακετονικό εκχύλισμα. Το ίδιο ισχύει και για τα εκχυλίσματα των φυτών *S. hortensis* και *S. fruticosa*. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική σύσταση των αιθανολικών και ακετονικών εκχυλισμάτων.

Με βάση τις τιμές του Πίνακα 4.4 και το Σχήμα 4.15 η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων στις συνθήκες του πειράματος ακολουθεί τη σειρά:

***S. fruticosa* (αιθ.) > *S.hortensis* (ακετ.) > *S.hortensis* (αιθ.) > *S. fruticosa* (ακετ.) >  
*O. vulgare* (αιθ.) > *O. vulgare* (ακετ.)**

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων του *S. fruticosa* πιθανώς να σχετίζεται με την παρουσία καρνοσόλης, καρνοσικού οξέος και συγγενών τερπενικών ενώσεων.

Είναι φανερό ότι η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων του *S.hortensis* δεν οφείλεται στα ίδια συστατικά με εκείνα της *S. fruticosa*. Ομοιότητες παρατηρήθηκαν στα χρωματογραφήματα των *O. vulgare* και *S. hortensis*. Με βάση το μεγάλο χρόνο συγκράτησης, τις πληροφορίες από τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας καθώς και τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, επεκτείναμε τη μελέτη και σε άλλες κατηγορίες αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων όπως π.χ. των φλαβονοειδών ( βλέπετε Κεφάλαιο 5).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΙΚΑ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΜΕ RP-HPLC ΚΑΙ NMR**

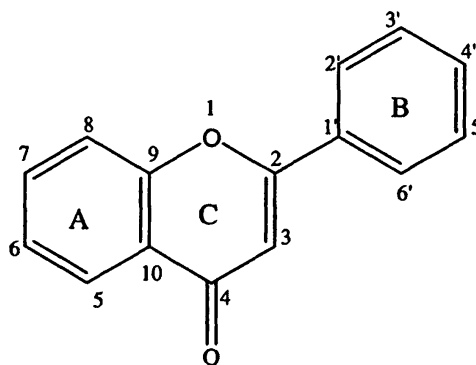


### 5.1. Εισαγωγή

Η βιβλιογραφία σχετικά με την ταυτοποίηση φλαβονοειδών (Σχήμα 1.4) στα υπό μελέτη εκχυλίσματα είναι γενικά περιορισμένη. Η παρουσία παραγώγων της απιγενίνης και της κερκετίνης (Σχήμα 5.1) έχει διαπιστωθεί σε διάφορα είδη ρίγανης (Vekiarī *et al.*, 1993, Kanazawa *et al.*, 1995) και τα φλαβονοειδή λουτεολίνη και κερκετίνη έχουν ταυτοποιηθεί σε υδατικά εκχυλίσματα του φυτού *Salvia officinalis* (Karakaya *et al.*, 1999). Το περιεχόμενο των φυτών *S. hortensis* και *S. fruticosa* σε φλαβονοειδή δεν είναι γνωστό.

Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλίων που φέρουν στο μόριό τους καθώς και από άλλα δομικά χαρακτηριστικά. Οι Rice-Evans *et al.*, (1997) μελέτησαν διεξοδικά την αντιοξειδωτική δράση διαφόρων φλαβονοειδών και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η μέγιστη δράση παρατηρείται κατά την ύπαρξη των παρακάτω δομικών χαρακτηριστικών :

- 1) Δύο υδροξυ-ομάδων σε θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου B (π.χ. κερκετίνη, λουτεολίνη)
- 2) Δύο υδροξυ-ομάδων σε θέσεις 5, 7 του δακτυλίου A (π.χ. καιμπερόλη, απιγενίνη)
- 3) Διπλού δεσμού στη θέση 2 του δακτυλίου C, σε συνδυασμό με την καρβονυλομάδα στη θέση 4 και την υδροξυλομάδα στη θέση 3 του ίδιου δακτυλίου (π.χ. κερκετίνη) και την παρουσία των υδροξυλίων σε *o*-θέση στο δακτύλιο B.



Επισημάναν επίσης πως η αλλαγή στη θέση των υδροξυλομάδων, η υποκατάσταση τους καθώς και η γλυκοζυλίωση, μειώνουν την αντιοξειδωτική δράση.

Σε ότι αφορά στη συμπλοκοποίηση των φλαβονοειδών με μεταλλικά ιόντα που εμφανίζουν προοξειδωτική δράση αναφέρεται ότι οι πιθανές θέσεις δέσμευσης του μετάλλου είναι οι δύο *ortho*-υδροξυλομάδες στις θέσεις 3' και 4' στο δακτύλιο B, και οι 4 κετο- και 3 υδροξυ- ομάδες του δακτυλίου C ή 4 κετο- και 5 υδροξυ- του δακτυλίου A.

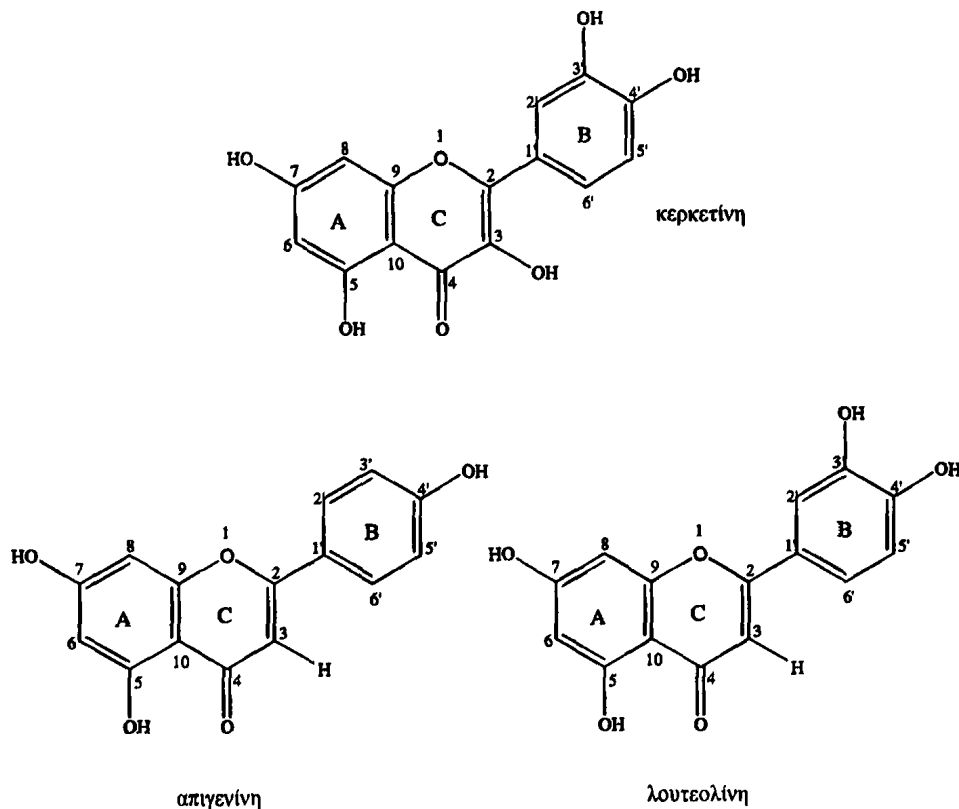
### 5.2. Ταυτοποίηση φλαβονοειδών στα φυτικά εκχυλίσματα με υγροχρωματογραφικές μεθόδους

Η χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας υπέδειξε την παρουσία διαφόρων τύπων φλαβονοειδών, τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και με τη μορφή γλυκοζιτών. Στη





συνέχεια, κατά τη μελέτη των υδροχρωματογραφημάτων των εκχυλισμάτων (Σχήματα 4.5-4.7), διαπιστώθηκε η ύπαρξη κορυφών που έχουν χρόνους συγκράτησης ( $t_R$ ) που αντιστοιχούν στα φλαβονοειδή κερκετίνη ή λουτεολίνη και απιγενίνη (Σχήμα 5.1).

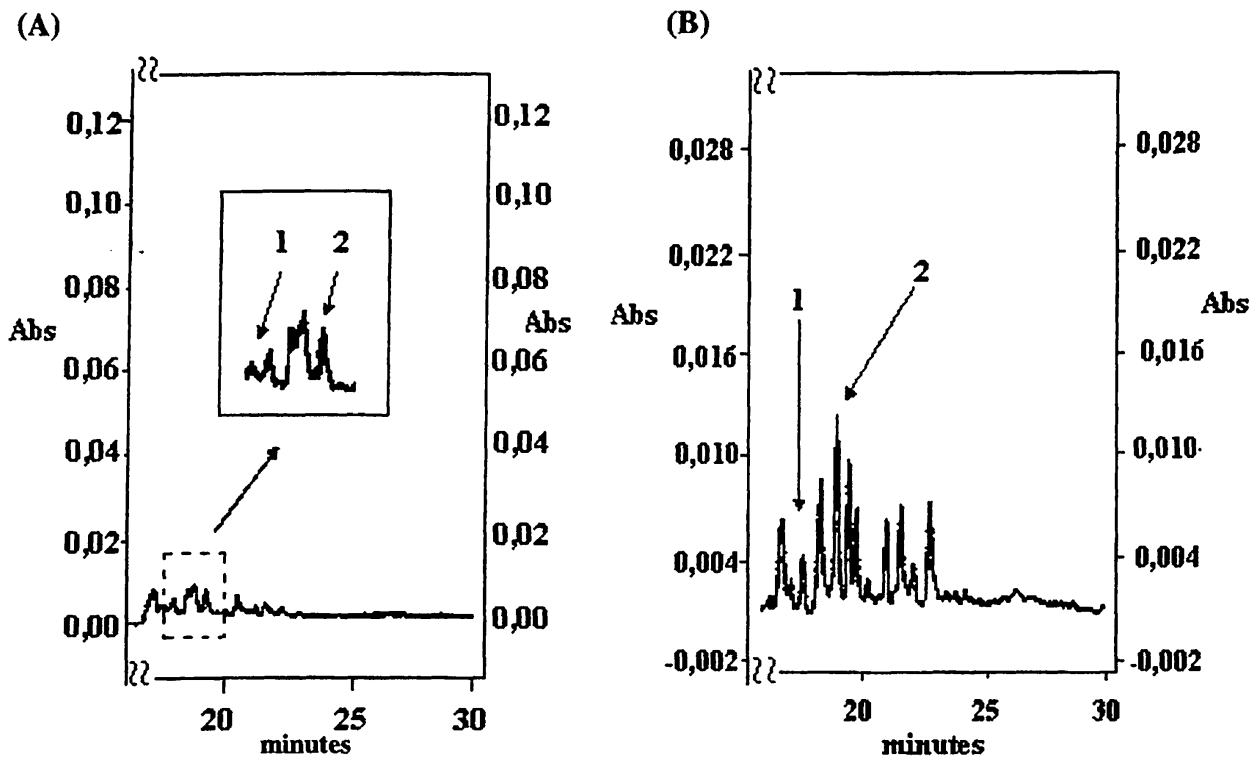


Σχήμα 5.1.: Δομές της φλαβονόλης κερκετίνης και των φλαβονών απιγενίνης και λουτεολίνης.

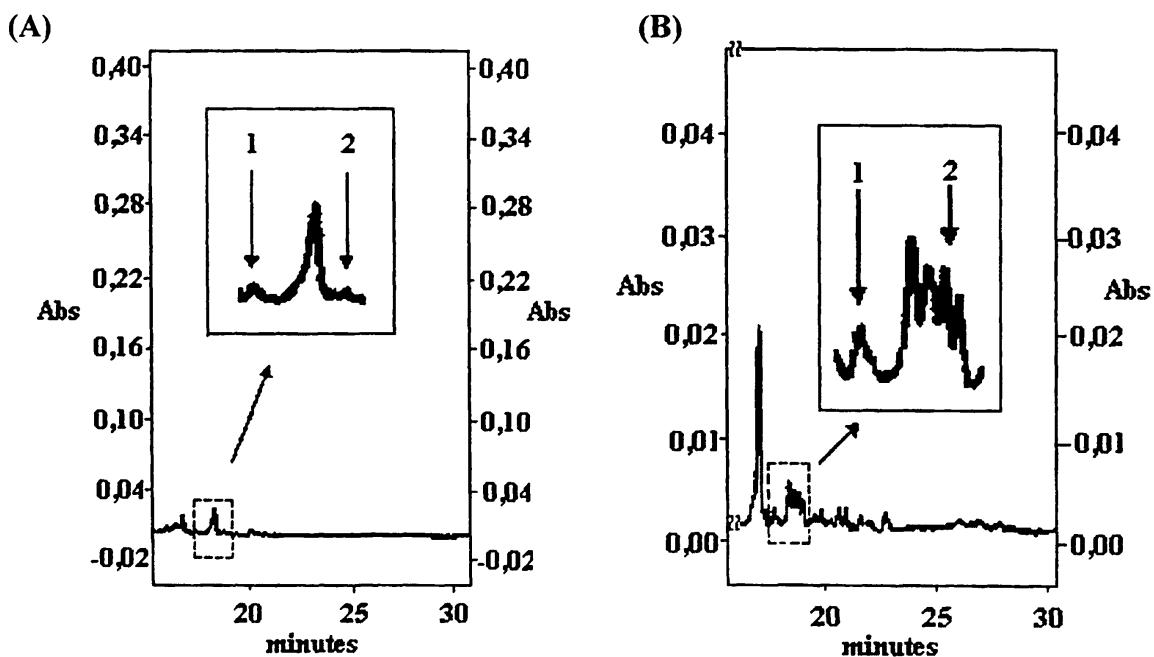
Αναλυτικά, η κερκετίνη και η λουτεολίνη έχουν παραπλήσιο χρόνο συγκράτησης, 17.70 min, και παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος 255 nm στις πειραματικές συνθήκες που προαναφέρθηκαν (η θέση τους στα χρωματογραφήματα υποδηλώνεται με το βέλος που αντιστοιχεί στον αριθμό 1 στα Σχήματα 5.2-5.4). Η απιγενίνη, που υποδηλώνεται με το βέλος που αντιστοιχεί στον αριθμό 2 (Σχήματα 5.2-5.4), έχει χρόνο συγκράτησης 19.15 min και παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης σε μήκος κύματος στα 334 nm.

Η ταυτοποίηση των κορυφών των αντίστοιχων ενώσεων στα χρωματογραφήματα έγινε με βάση τους χρόνους συγκράτησης, το φάσμα υπεριώδους (UV) και την προσθήκη συγκεκριμένων μικρών ποσοτήτων προτύπων ενώσεων για την ενίσχυση του σήματος στο κάθε εκχύλισμα (μέθοδος spiking). Στα Σχήματα 5.2 έως 5.4 παρουσιάζονται επιλεγμένες περιοχές των χρωματογραφημάτων στα 334 nm που υποδεικνύουν τη θέση στην οποία εμφανίζονται η κερκετίνη/λουτεολίνη και η απιγενίνη.



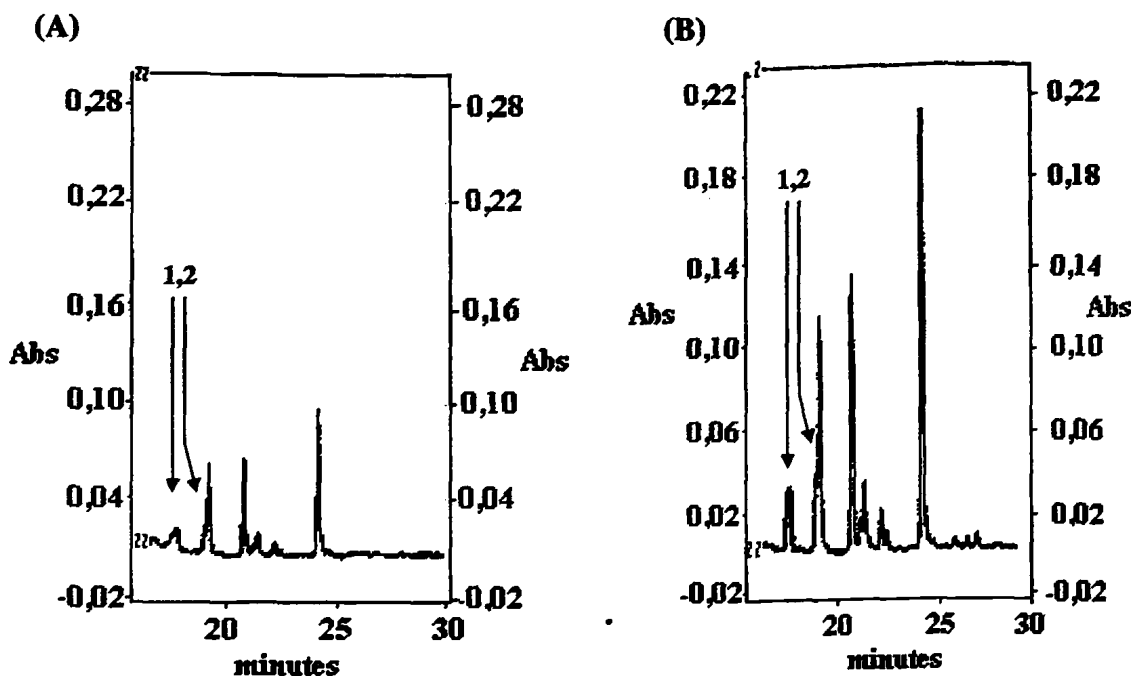


Σχήμα 5.2.: Επιλεγμένη περιοχή χρωματογραφημάτων του αιθανολικού (A) και του ακετονικού (B) εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare* στα 334 nm. Τα βέλη υποδεικνύουν την παρουσία της κερκετίνης/λουτεολίνης, 1, και της απιγενίνης, 2.



Σχήμα 5.3.: Επιλεγμένη περιοχή χρωματογραφημάτων του αιθανολικού (A) και του ακετονικού (B) εκχυλίσματος του φυτού *S. hortensis* στα 334 nm. Τα βέλη υποδεικνύουν την παρουσία της κερκετίνης/λουτεολίνης, 1, και της απιγενίνης, 2.





Σχήμα 5.4.: Επιλεγμένη περιοχή χρωματογραφημάτων του αιθανολικού (A) και του ακετονικού (B) εκχυλίσματος του φυτού *S. fruticosa* στα 334 nm. Τα βέλη υποδεικνύουν την παρουσία της κερκετίνης/λουτεολίνης, 1, και της απιγενίνης, 2.

Στην προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού των φλαβονοειδών κερκετίνης ή λουτεολίνης και απιγενίνης στα αιθανολικά και ακετονικά εκχυλίσματα, διαπιστώθηκε πως η συγκέντρωσή τους ήταν χαμηλότερη από το ποσοτικό όριο ανίχνευσης (quantitative detection limit, QDL), δηλαδή  $<0.1 \mu\text{g}/25\mu\text{L}$ . Ανάλογες τιμές των ορίων ανίχνευσης έχουν παρατηρηθεί κατά την μελέτη φλαβονοειδών άλλων φυτών, υπό τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης (Hakkinen, *et al.*, 1999). Κατά τη μελέτη των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο με HPLC-UV, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες ανάλυσης, παρατηρήθηκε μικρότερο όριο ανίχνευσης ( $0,01 \mu\text{g}/25\mu\text{L}$  για το καφεϊκό οξύ) (Tsimidou *et al.*, 1992).

Προκειμένου να διευκρινισθεί κατά πόσο οι σημειούμενες κορυφές αντιστοιχούσαν στα συγκεκριμένα φλαβονοειδή, τα ίδια εκχυλίσματα εξετάστηκαν με τεχνικές NMR, που παρουσιάζονται στη συνέχεια.



### 5.3. Ταυτοποίηση φλαβονοειδών με τη χρήση τεχνικών NMR

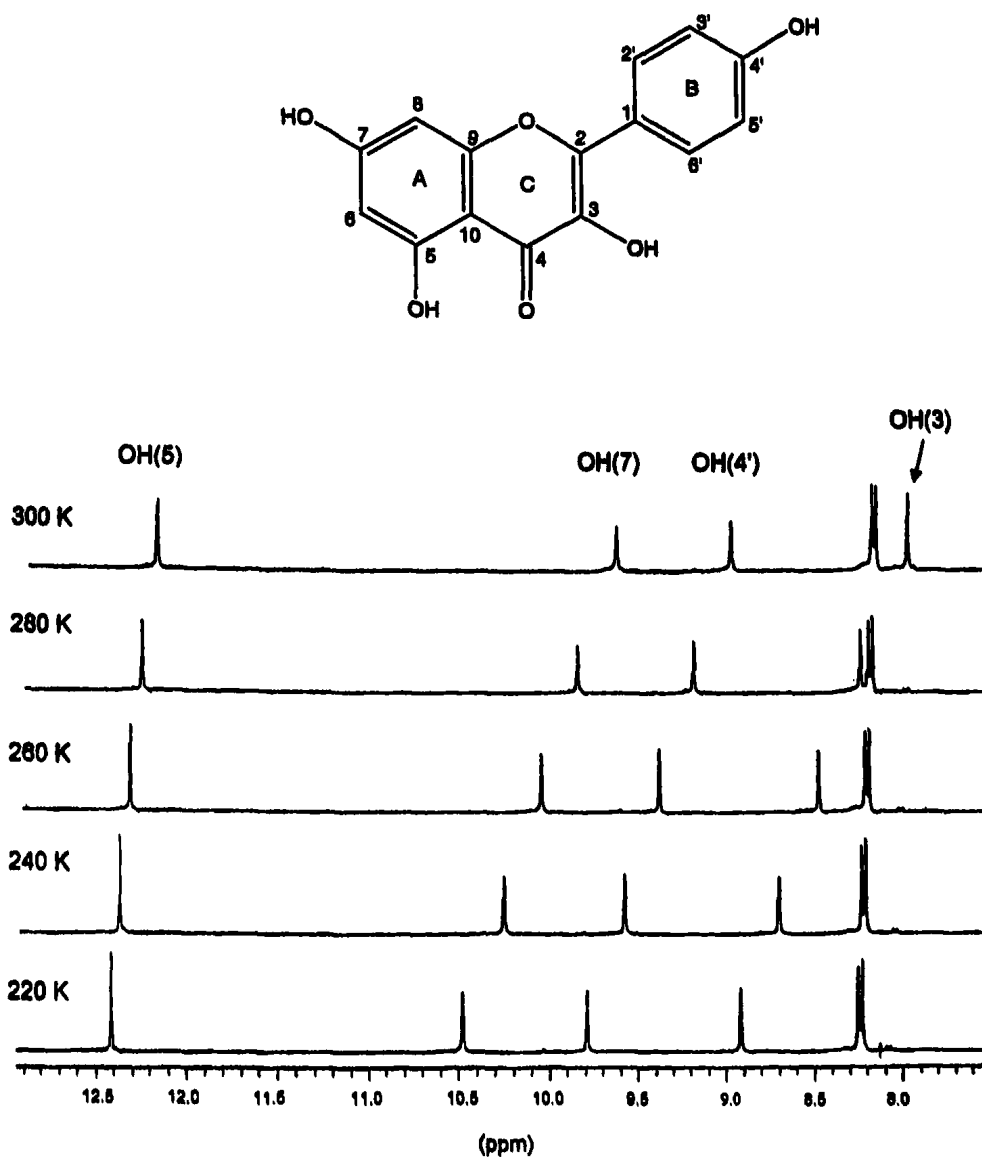
#### 5.3.1. Μελέτη προτύπων ενώσεων

Η φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H εφαρμόστηκε αρχικά σε πρότυπες ενώσεις φλαβονολών και φλαβονών με σκοπό την ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού τους σε διάλυματα CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> και CD<sub>3</sub>OH.

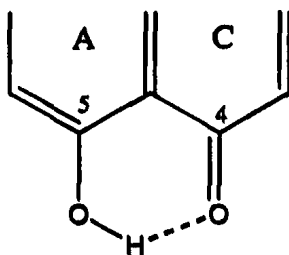
5.3.1.1. Ταυτοποίηση υδροξυλικών πρωτονίων με τεχνικές NMR – Επίδραση ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Γενικά, στη φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H οι απορροφήσεις συντονισμού των υδροξυλικών πρωτονίων εμφανίζονται διευρυμένες στη θερμοκρασία δωματίου, ιδιαίτερα όταν το φάσμα ληφθεί σε πρωτικό διαλύτη. 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 του φάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων και οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται οξείες.

Στο Σχήμα 5.5 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR-<sup>1</sup>H μεταβλητής θερμοκρασίας της καιμπερόλης σε διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>. Παρατηρείται πως τα σήματα συντονισμού των -OH πρωτονίων εμφανίζονται ως οξείες κορυφές ακόμη και στη θερμοκρασία δωματίου. Το υδροξυλικό πρωτόνιο με τη μεγαλύτερη συχνότητα συντονισμού είναι το OH(5) που συμμετέχει σε, ιδιαίτερης διαγνωστικής σημασίας, ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο στη θέση 4 του δακτυλίου C (Σχήμα 5.6). Ως συνέπεια το πρωτόνιο αποπροστατεύεται ισχυρά και το σήμα συντονισμού του πρωτονίου μετατοπίζεται στην περιοχή του φάσματος πάνω από τα 11 ppm. Το υδροξυλικό πρωτόνιο με τη μικρότερη συχνότητα συντονισμού είναι το OH(3), το οποίο μπορεί επίσης να συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο CO(4). Κατά τη δημιουργία ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ OH(5)···OC(4) όμως σχηματίζεται εξαμελής δακτύλιος που φαίνεται να υπερισχύει του δεσμού OH(3)···OC(4).



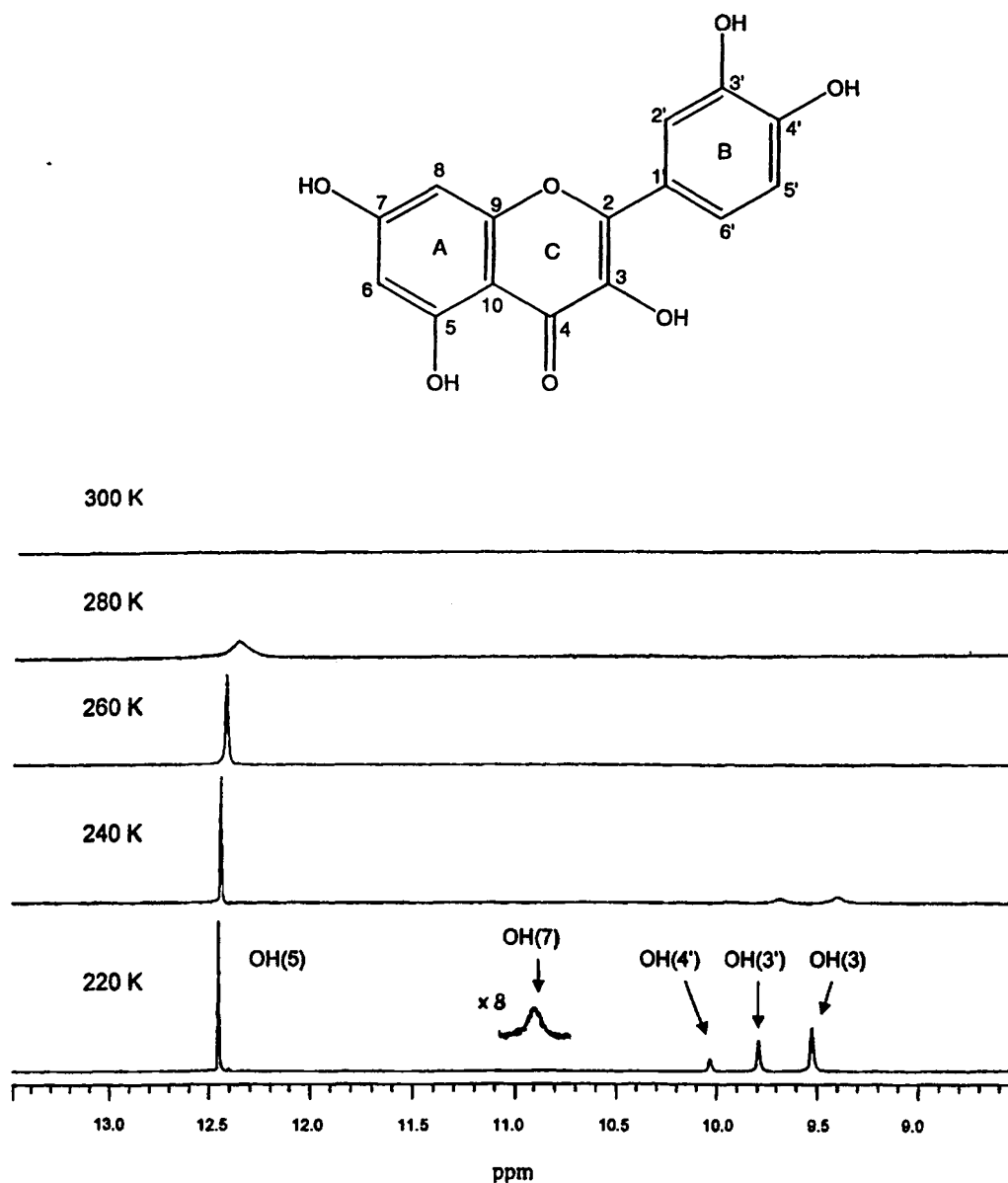


**Σχήμα 5.5.:** Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων  $\text{NMR-}^1\text{H}$  μεταβλητής θερμοκρασίας της καιμπερόλης σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ . Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10 mM (NS=32) (Exarchou et al., 2002).



**Σχήμα 5.6.:** Σχηματισμός ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλικού πρωτονίου OH(5) του δακτυλίου A με το καρβονυλικό CO(4) του δακτυλίου C φλαβονοειδών.

Στο Σχήμα 5.7 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR- $^1\text{H}$  μεταβλητής θερμοκρασίας της κερκετίνης σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{OH}$ .



Σχήμα 5.7.: Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων NMR- $^1\text{H}$  μεταβλητής θερμοκρασίας της κερκετίνης σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{OH}$ . Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10 mM (NS=32) (Exarchou et al., 2002).

Στην περίπτωση αυτή το σήμα συντονισμού του πρωτονίου OH(5) αρχίζει να εμφανίζεται σε θερμοκρασία περίπου 280 K, ενώ τα σήματα συντονισμού των υπολοίπων υδροξυλικών πρωτονίων εμφανίζονται ως ευρείες απορροφήσεις σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (< 240 K). Η παραπάνω συμπεριφορά υποδεικνύει πως το πρωτόνιο OH(5) είναι το λιγότερο ευκίνητο και δεκτικό στο διαλύτη, πράγμα που φανερώνει την ικανότητά του να σχηματίζει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου.

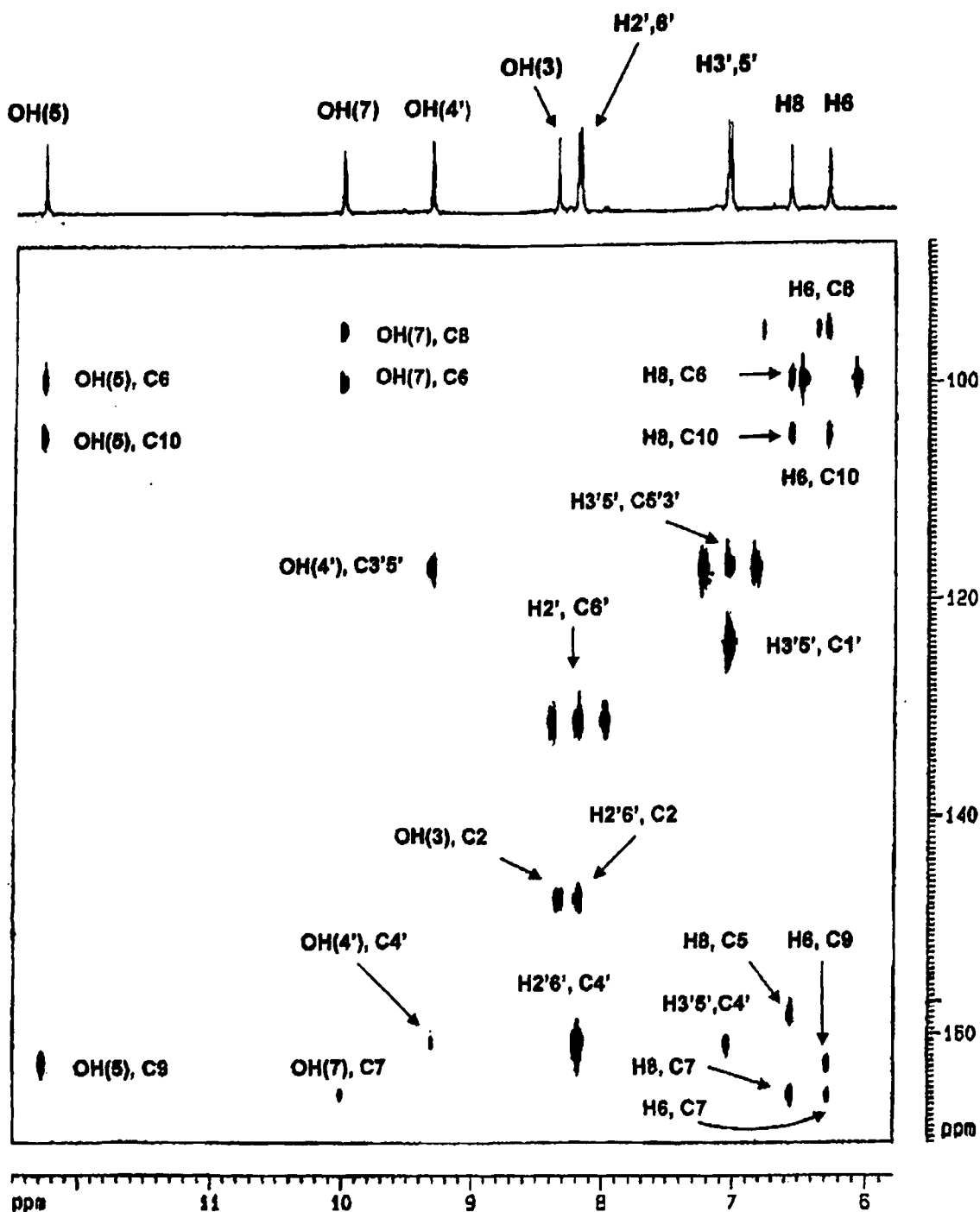


Σημειώνεται ότι η μελέτη των χημικών μετατοπίσεων των υδροξυλικών πρωτονίων των φλαβονοειδών σε πρωτικό διαλύτη αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία (Exarchou *et al.*, 2002, υπό εκτύπωση) και οφείλεται στη χρήση ειδικής παλμικής ακολουθίας (WATERGATE) που εφαρμόζεται στη μεθοδολογία βαθμίδωσης πεδίου (field gradient) (Hurd and John, 1991, Norwood, 1994). Παρόμοια συμπεριφορά στους δύο διαλύτες εμφανίζουν και άλλα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν όπως η μυρισετίνη, η ακακετίνη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και η ρουτίνη.

Για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης των υδροξυλικών πρωτονίων θεωρήθηκε απαραίτητη η εφαρμογή διδιάστατων τεχνικών της φασματοσκοπίας NMR, κατάλληλων να αποκαλύψουν τις συζεύξεις των πρωτονίων αυτών μέσω δεσμών με γειτονικούς άνθρακες. Πρόκειται για το συνδυασμό των τεχνικών GE-HSQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  και GE-HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  που περιγράφονται στο θεωρητικό μέρος και χρησιμοποιήθηκαν στο Κεφάλαιο 3. Το φάσμα GE-HSQC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των πυρήνων των ανθράκων και στη συνέχεια εφαρμόστηκε η τεχνική GE-HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μέσω πολλαπλών δεσμών των υδροξυλικών πρωτονίων με τους πυρήνες των ανθράκων-13. Στο Σχήμα 5.8 απεικονίζεται το φάσμα GE-HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  της καιμπερόλης σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ . Η μελέτη του φάσματος αποκαλύπτει τη σύζευξη του πρωτονίου OH(5), που συντονίζεται στα 12.3 ppm, με τους πυρήνες C(6), C(10), και C(9), του πρωτονίου OH(7), που συντονίζεται στα 10 ppm, με τους πυρήνες C(8), C(6), and C(7) και του πρωτονίου OH(3), στα 8.3 ppm, με τον πυρήνα C(2). Επιπλέον παρατηρείται το πρωτόνιο OH(4'), στα 9.3 ppm, που συζεύγνυται με τους πυρήνες C(3'5'), C(4').

Οι παραπάνω τεχνικές εφαρμόστηκαν και στην περίπτωση άλλων φλαβονοειδών και τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την προηγούμενη ταυτοποίηση των υδροξυλικών πρωτονίων. Δηλαδή, σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν το πρωτόνιο OH(5) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνότητα συντονισμού και το πρωτόνιο OH(3), στις φλαβονόλες που φέρουν στο μόριο τους την ομάδα -OH στη θέση 3, τη μικρότερη. Η συχνότητα συντονισμού των υπολοίπων υδροξυλικών πρωτονίων κυμαίνεται μεταξύ των δύο αυτών ακραίων περιπτώσεων.



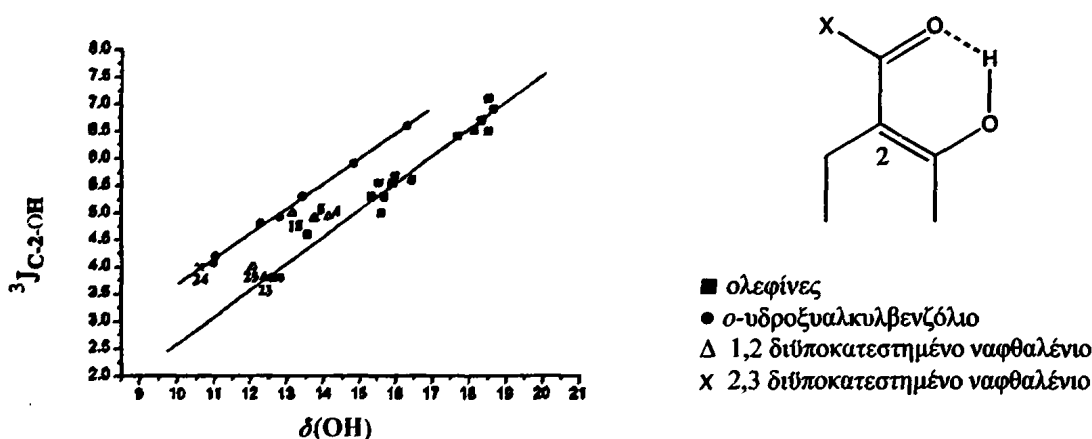


Σχήμα 5.8.: Επιλεγμένη περιοχή φάσματος HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  της καιμπερόλης σε διαλύτη  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , όπου υποδεικνύονται οι αλληλεπιδράσεις μέσω πολλαπλών δεσμών των υδροξυλικών πρωτονίων με τους πυρήνες των ανθράκων-13. Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 10 mM ( $T=243\text{ K}$ ,  $NS=16$ , χρόνος ανάμιξης=60 ms,  $t_{\text{exp}}=1,4\text{ h}$ ) (Exarchou et al., 2002).





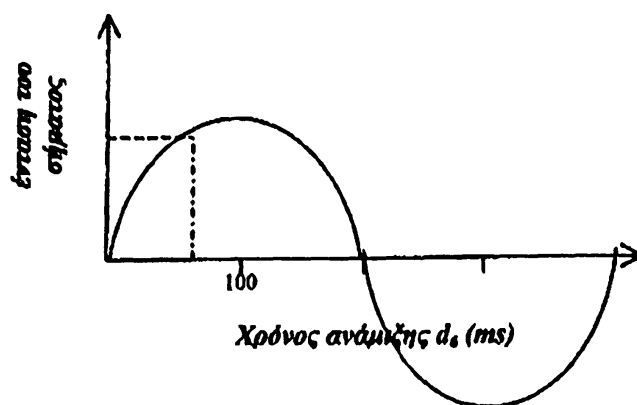
Επισημαίνεται ότι για την εύρεση του κατάλληλου χρόνου ανάμιξης (60ms), από την τιμή του οποίου καθορίζεται η ένταση των διασταυρούμενων κορυφών που οφείλονται σε σύζευξη  $^3J_{C-OH}$ , χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα, ο Borisov και οι συνεργάτες του (Borisov *et al.*, 1998), μελέτησαν τις τιμές των σταθερών σύζευξης  $^3J_{C-OH}$ , με την τεχνική SELJRES (Bax and Freeman, 1982, Borisov and Agrawal, 1994) για μια σειρά ενώσεων, στις οποίες σχηματίζεται ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου. Από τη γραφική παράσταση μεταβολής της  $^3J_{C-OH}$  ως συνάρτηση της χημικής μετατόπισης του υδροξυλικού πρωτονίου που συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου (Σχήμα 5.9) προκύπτει ότι οι τιμές  $^3J_{C-OH}$  των OH(5) φλαβονοειδών βρίσκονται στην περιοχή από 4 έως 5 Hz.



Σχήμα 5.9.: Γραφική παράσταση συσχέτισης των τιμών της σταθεράς σύζευξης  $^3J_{C-2-OH}$  με τη χημική μετατόπιση του υδροξυλικού πρωτονίου  $\delta(OH)$ . Οι τιμές αναφέρονται σε μια σειρά παραγώγων των ενώσεων που παρουσιάζεται δεξιά της γραφικής παράστασης (οι γραμμές τοποθετήθηκαν για την καθοδήγηση του ματιού) (Borisov *et al.*, 1998).

Με βάση τον τύπο υπολογισμού του χρόνου ανάμιξης, ( $\tau_m = 1/(2^3J_{C-OH})$ ), ο βέλτιστος χρόνος για την εμφάνιση διασταυρούμενων κορυφών οφειλόμενων στη σύζευξη  $^3J_{C-OH}$  των φλαβονοειδών είναι ~100 ms. Στο φάσμα GE-HMBC  $^1H-^{13}C$  της καιμπερόλης χρησιμοποιήθηκε χρόνος ανάμιξης των spin ίσος με 60 ms. Αν και η προαναφερόμενη τιμή δεν είναι η βέλτιστη, ο χρόνος αυτός ήταν ικανός να αποκαλύψει το 80 % της μέγιστης τιμής των διασταυρούμενων κορυφών λόγω σύζευξης  $^3J_{C-OH}$  στο μόριο των φλαβονοειδών. Αυτό οφείλεται στην τριγωνομετρική συνάρτηση που συνδέει την ένταση της διασταυρούμενης κορυφής με το χρόνο ανάμιξης όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στο Σχήμα 5.10.





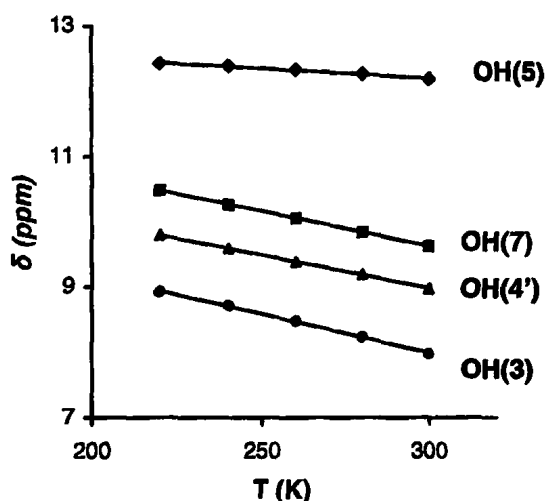
Σχήμα 5.10.: Γραφική παράσταση της τριγωνομετρικής συνάρτησης που συνδέει την ένταση της διασταυρούμενης κορυφής με το χρόνο ανάμιξης. Η διακεκομμένη γραμμή αναφέρεται σε χρόνο ανάμιξης ίσο με 60 ms με τον οποίο επιτυγχάνεται ένταση σήματος ~ 80 % της μέγιστης τιμής.

Η εξάρτηση της χημικής μετατόπισης του πρωτονίου από τη θερμοκρασία μπορεί επίσης να αποτελέσει σημαντικό κριτήριο για την μελέτη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στη διεθνή βιβλιογραφία για τη μελέτη πεπτιδικών πρωτονίων πεπτιδίων και πρωτεϊνών και υδροξυλικών πρωτονίων υδατανδράκων. Ο συντελεστής της εξάρτησης της χημικής μετατόπισης από τη θερμοκρασία,  $\Delta\delta/\Delta T$ , των αμιδικών πρωτονίων πεπτιδίων σε υδατικά διαλύματα με δομή τυχαίου σπειράματος αναμένεται να έχει τιμές -6 έως -10 ppb/K. Τιμές του συντελεστή  $\Delta\delta/\Delta T$  μικρότερες από -4 ppb/K υποδεικνύουν την πιθανή συμμετοχή των πρωτονίων σε ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου (Urry and Ohnishi, 1970, Deslaurier and Smith, 1980, Wishart *et al.*, 1991, Andersen, *et al.*, 1997, Baxter *et al.*, 1998). Παρόμοιες τιμές του συντελεστή  $\Delta\delta/\Delta T$  έχουν παρατηρηθεί και για τα υδροξυλικά πρωτόνια της αμιλόζης (St-Jacques *et al.*, 1976), της κυταρίνης (Gagnaire, *et al.*, 1982) και της β-σιτοβιόζης (Nardin and Vincendon, 1988) σε διαλύματα μη πρωτικών διαλυτών, που ερμηνεύθηκαν σε όρους σχηματισμού ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Παρότι δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία πειραματικά δεδομένα των τιμών των συντελεστών  $\Delta\delta/\Delta T$  των υδροξυλικών πρωτονίων των φλαβονοειδών, οι τιμές  $\Delta\delta/\Delta T$  των υδροξυλικών πρωτονίων των υδατανδράκων θεωρούνται ως ασφαλές κριτήριο για τη μελέτη ύπαρξης ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου.

Στο Σχήμα 5.11 παρουσιάζεται γραφική παράσταση μεταβολών των χημικών μετατοπίσεων,  $\delta$  (ppm), των υδροξυλικών πρωτονίων της καιμπερόλης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας,  $T$ , (K). Στον Πίνακα 5.1 αναγράφονται οι τιμές των συντελεστών  $\Delta\delta/\Delta T$  των υδροξυλικών πρωτονίων της καιμπερόλης, κερκετίνης και της λουτεολίνης όπως



υπολογίστηκαν από τα πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας των φλαβονοειδών σε  $CD_3COCD_3$  και  $CD_3OH$ .



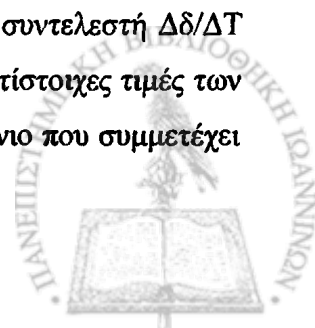
Σχήμα 5.15.: Εξάρτηση της χημικής μετατόπισης,  $\delta$  (ppm), των υδροξυλικών πρωτονίων της καιμπερόλης σε διάλυμα  $CD_3CO CD_3$  από τη θερμοκρασία,  $T$ , (K) (Exarchou et al., 2002).

Πίνακας 5.1.: Μεταβολή της χημικής μετατόπισης των υδροξυλικών πρωτονίων των φλαβονολών κερκετίνης και καιμπερόλης και της φλαβόνης λουτεολίνης από τη θερμοκρασία ( $\Delta\delta/\Delta T$ ) (Exarchou et al., 2002).

	$\Delta\delta/\Delta T^a$					
	καιμπερόλη		κερκετίνη		λουτεολίνη	
	$CD_3COCD_3$	$CD_3OH$	$CD_3COCD_3$	$CD_3OH$	$CD_3COCD_3$	$CD_3OH$
OH(5)	-3.1	-0.5	-2.9	-0.5	-2.3	0.5
OH(7)	-10.7	-4.3	-11.1	-4.5	-17.2	-4.4
OH(4')	-10.1	-3.8	-11.2	-5.5	-15.0	-5.0
OH(3')	-	-	-8.4	-5.8	-14.9	-4.2
OH(3)	-11.8	-6.3	-11.6	-6.4	-	-

<sup>a</sup> Ο συντελεστής  $\Delta\delta/\Delta T$  εκφράζεται σε μέρη ανά δισεκατομμύριο ανά K (ppb/K)

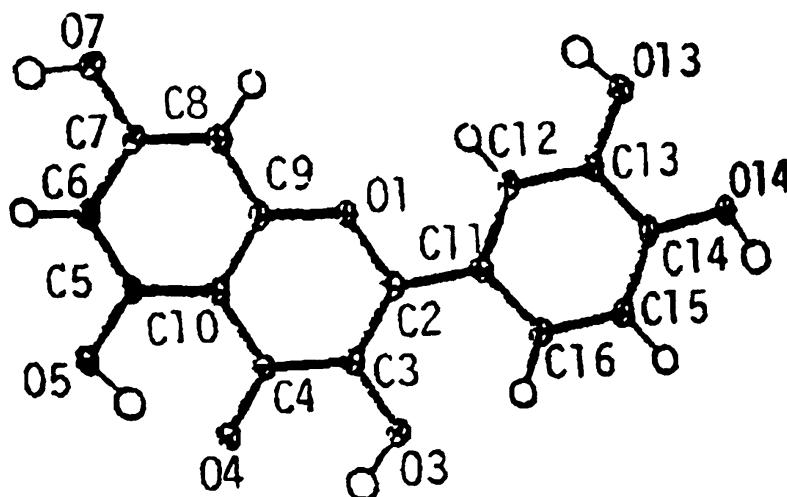
Σύγκριση των τιμών του Πίνακα 5.1 υποδεικνύει πως η τιμή του συντελεστή  $\Delta\delta/\Delta T$  του πρωτονίου OH(5) είναι μικρότερη κατά μία τάξη μεγέθους από τις αντίστοιχες τιμές των άλλων υδροξυλικών πρωτονίων. Έτσι, αποδεικνύεται πως το μόνο πρωτόνιο που συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου είναι το OH(5).



Ανακεφαλαιώνοντας, η παραπάνω μελέτη των φλαβονοειδών με τη φασματοσκοπία NMR μεταβλητής θερμοκρασίας αποδεικνύει τη συμμετοχή του πρωτονίου OH(5) σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με βάση τα εξής πειραματικά δεδομένα:

- α) μεγάλη συχνότητα συντονισμού,
- β) μικρή ταχύτητα ανταλλαγής με τα πρωτόνια του διαλύτη και
- γ) μικρή εξάρτηση της χημικής μετατόπισης από τη θερμοκρασία.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Οι Jin *et al.*, (1990), αναφέρουν πως σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική δομή της κερκετίνης (Σχήμα 5.12, ο βενζοπυρανικός και ο φαινολικός δακτύλιος βρίσκονται σχεδόν στο ίδιο επίπεδο σχηματίζοντας διεδρη γωνία  $\sim 9^\circ$ . Οι συμπυκνωμένοι δακτύλιοι σχηματίζουν διεδρη γωνία  $6^\circ$ . Το μήκος του δεσμού C(4)-C(10) (1.423 Å) είναι μικρότερο και του C(4)-O(4) (1.269 Å) μεγαλύτερο από τους μέσους όρους των τιμών των μηκών των αντίστοιχων δεσμών σε πρότυπες ενώσεις που δεν εμφανίζουν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη δημιουργία ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ -OH(5) και -CO(4) με σχηματισμό εξαμελούς δακτυλίου στην περίπτωση της κερκετίνης.



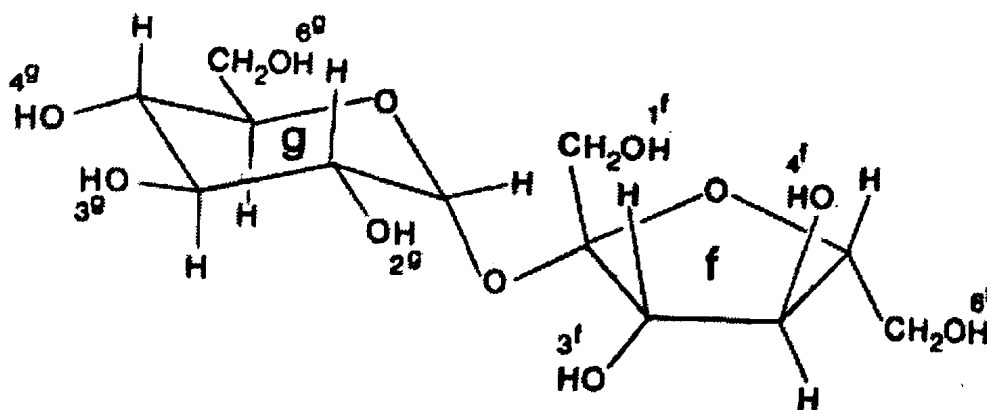
Σχήμα 5.12.: Κρυσταλλική δομή της κερκετίνης (Jin *et al.*, 1990).

Στην ίδια μελέτη υποστηρίζεται η ύπαρξη ενός δεύτερου ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ των OH(3) και CO(4) με ταυτόχρονη δημιουργία πενταμελούς δακτυλίου. Το συμπέρασμα αυτό δεν είναι σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα NMR που αποδεικνύουν πως το πρωτόνιο OH(3) εκτίθεται και στους δύο διαλύτες, αφού παρουσιάζει



μικρότερη συχνότητα συντονισμού και μεγαλύτερη εξάρτηση της χημικής του μετατόπισης από τη θερμοκρασία, συγκριτικά με το πρωτόνιο OH(5).

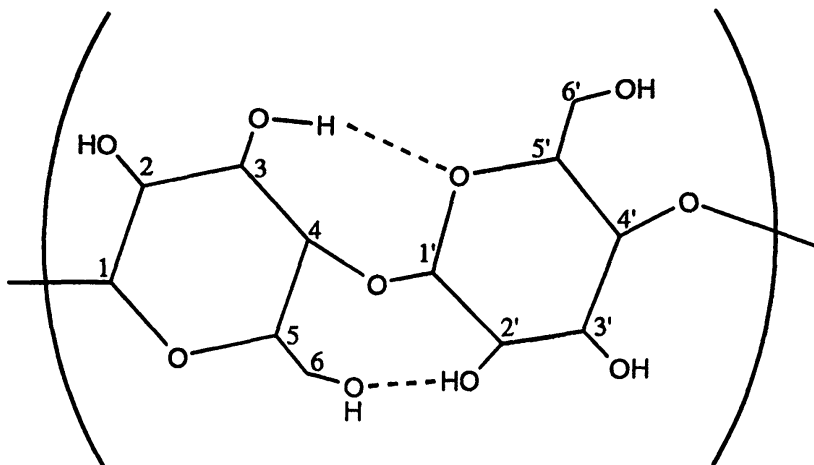
5.3.1.2. Μελέτη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου OH(5)···CO(4) φλαβονών και φλαβονολών σε μίγματα οργανικών διαλυτών και ύδατος με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR-<sup>1</sup>H. Η ύπαρξη ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου σε πρωτικούς διαλύτες και ιδιαίτερα σε υδατικά διαλύματα προκάλεσε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Οι Adams και Lerner (1992) μελέτησαν σακχαρόζης (Σχήμα 5.13), σε CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> και H<sub>2</sub>O με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR <sup>1</sup>H, με έμφαση: α) στην εξάρτηση της χημικής μετατόπισης από τη θερμοκρασία, β) στις σταθερές σύζευξης και γ) στην ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλικού πρωτονίου OH-1<sup>f</sup> και O-2<sup>g</sup>, που παρατηρήθηκε στην κρυσταλλική δομή της σακχαρόζης, δε διατηρείται στο μικό διαλύτη CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O.



Σχήμα 5.13.: Ο συντακτικός τύπος της σακχαρόζης (Adams and Lerner, 1992).

Οι Leeflang *et al.*, (1992), μελέτησαν τη διατήρηση ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ των O(6) ··· HO(2') σε διαλύματα β-μεθυλο-κελλοβιόζης (προϊόν της μερικής υδρόλυσης της κυτταρίνης) σε (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO και σε διάφορα μίγματα H<sub>2</sub>O - CD<sub>3</sub>OD (Σχήμα 5.14). Η μελέτη τους οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου O(6) ··· HO(2') διατηρείται μόνο σε διάλυμα (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO και όχι στο μίγμα H<sub>2</sub>O - CD<sub>3</sub>OD. Παρόμοιες έρευνες σε πλήθος σακχαριτών συμφωνούν πως οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου, αν και παρατηρούνται σε μη πρωτικούς διαλύτες, δε διατηρούνται σε υδατικά διαλύματα (Poppe and Van Halbeek, 1994).

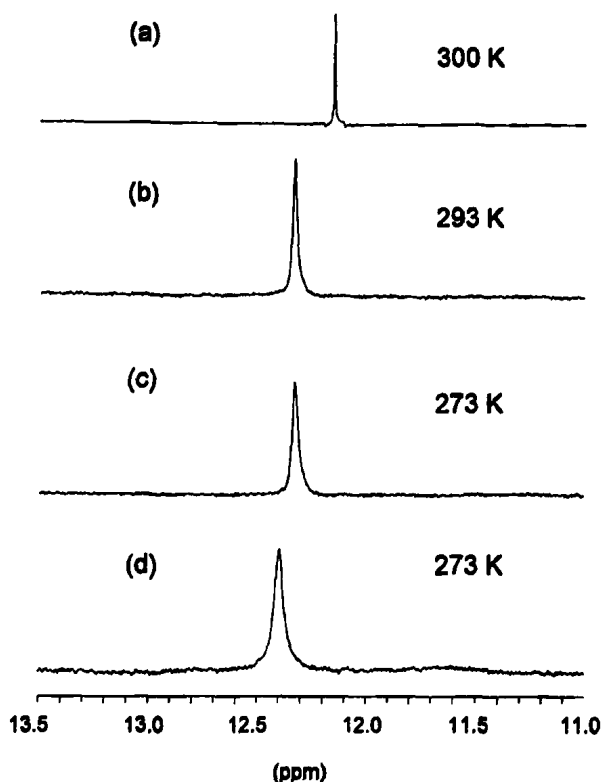




Σχήμα 5.14.: Μοντέλο της β-μεθυλο κελλοβιόζης ως δομική μονάδα της κυτταρίνης (Leeflang et al., 1992).

Για τη διερεύνηση της διατήρησης του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ  $\text{OH}(5) \cdots \text{OC}(4)$  στα φλαβονοειδή, παρασκευάστηκε σειρά διαλυμάτων των ενώσεων αυτών σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{COCD}_3 - \text{H}_2\text{O}$  και  $\text{CD}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  με συστηματική αύξηση του περιεχόμενου ύδατος. Η εξαιρετική αποπροστασία του σήματος συντονισμού του πρωτονίου  $\text{OH}(5)$  στην περιοχή των 12-13 ppm αναμένεται να είναι ένα άριστο κριτήριο μελέτης του βαθμού ανταγωνισμού του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου με μόρια  $\text{H}_2\text{O}$ .

Στο Σχήμα 5.15 παρουσιάζονται τα φάσματα  $\text{NMR-}^1\text{H}$  της κερκετίνης σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{COCD}_3 - \text{H}_2\text{O}$  με μοριακή αναλογία (a) 0%, (b) 82%, (c) 88%, (d) 91 % σε  $\text{H}_2\text{O}$ .

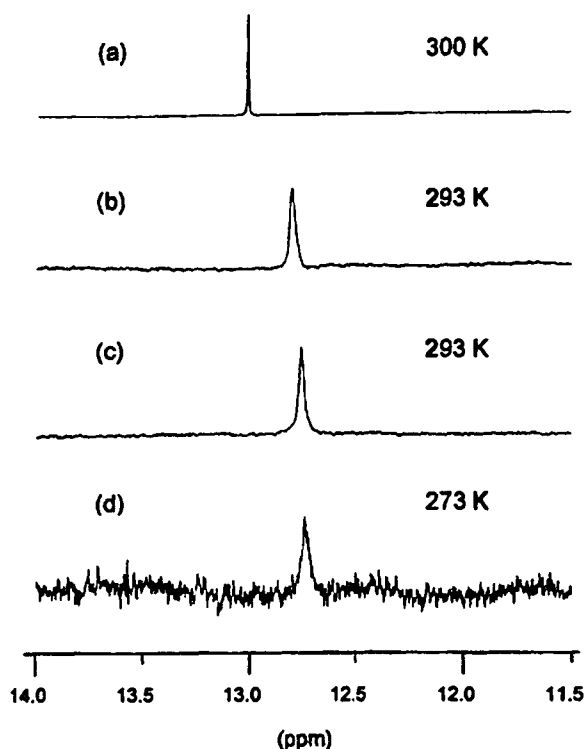


**Σχήμα 5.15.: Φάσματα NMR-<sup>1</sup>H κερκετίνης σε μίγματα  $CD_3COCD_3$  -  $H_2O$  με μοριακή αναλογία: (a) 0% (NS=32), (b) 82% (NS=128) (c) 88% (NS=128) και (d) 91 % (NS=320) σε  $H_2O$  (Exarchou, et al. 2002).**

Με τη συνεχή αύξηση του υδατικού περιεχομένου του διαλύματος η κορυφή απορρόφησης του πρωτονίου OH(5) της κερκετίνης αρχίζει να διευρύνεται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έτσι, η λήψη του φάσματος με μοριακή αναλογία ύδατος 88% και 91 % (Σχήμα 5.15 (c), (d)), πραγματοποιήθηκε στη θερμοκρασία των 273 K όπου το σήμα συντονισμού του πρωτονίου OH(5) παρατηρείται ευκρινώς. Πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας με μεγαλύτερη μοριακή αναλογία ύδατος ( $\geq 95$  %), δεν είναι εφικτά λόγω εξαιρετικής δυσδιαλυτότητας της κερκετίνης. Σημειώνεται πως δεν εμφανίζονται τα σήματα συντονισμού των άλλων υδροξυλικών πρωτονίων μετά την προσθήκη ύδατος στο διάλυμα.

Στο Σχήμα 5.16 παρουσιάζεται αντίστοιχη μελέτη της φλαβόνης λουτεολίνης σε μίγματα  $CD_3COCD_3$  -  $H_2O$ , ενώ ανάλογη συμπεριφορά παρατηρείται και για την καιμπερόλη.

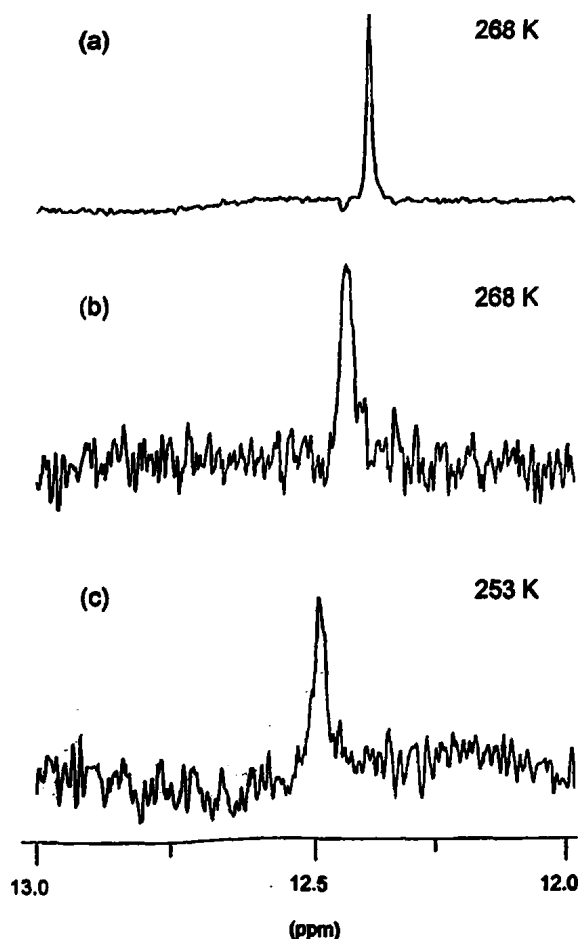




Σχήμα 5.16.: Φάσματα NMR- $^1\text{H}$  λουτεολίνης σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  -  $\text{H}_2\text{O}$  με μοριακή αναλογία σε  $\text{H}_2\text{O}$ : (a) 0% (NS=32), (b) 75% (NS=128) (c) 88% (NS=128) και (d) 91 % (NS=1024) (Exarchou, et al. 2002).

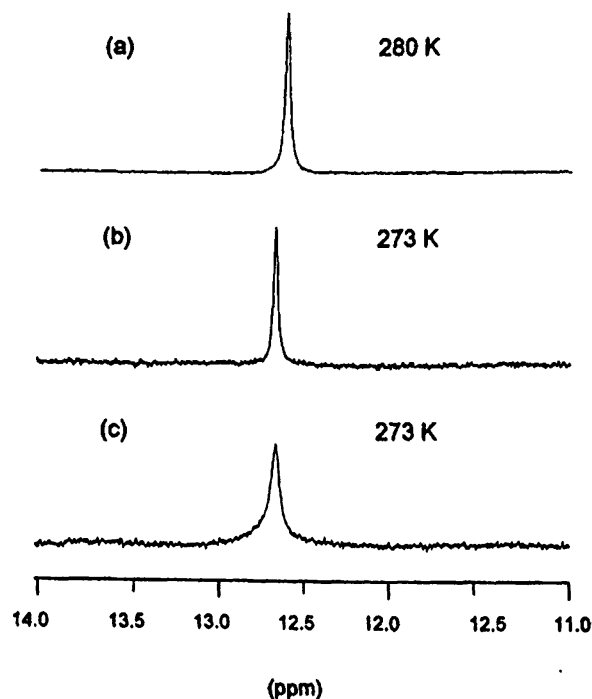
Η διατήρηση του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου  $\text{OH}(5) \cdots \text{OC}(4)$  στις φλαβόνες και φλαβονόλες μελετήθηκε και σε μικτούς διαλύτες  $\text{CD}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ . Στο Σχήμα 5.17 παρουσιάζονται φάσματα NMR- $^1\text{H}$  της κερκετίνης σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  με μοριακή αναλογία σε  $\text{H}_2\text{O}$ : (a) 0%, (b) 62% και (c) 71%. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε θερμοκρασίες  $< 268$  K εξαιτίας της διεύρυνσης της κορυφής απορρόφησης του  $\text{OH}(5)$  σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Σύμφωνα με το Σχήμα 5.17, ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου διατηρείται μέχρι και τη μοριακή αναλογία ύδατος 71 %. Περαιτέρω προσθήκη ύδατος στο διάλυμα οδηγεί σε εξαιρετική διεύρυνση της κορυφής απορρόφησης του  $\text{OH}(5)$ , αλλά και στην καταβύθιση της κερκετίνης, η οποία μειώνει σημαντικά την ποιότητα του φάσματος.





Σχήμα 5.17.: Φάσματα NMR- $^1\text{H}$  κερκετίνης σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  με μοριακή αναλογία σε  $\text{H}_2\text{O}$ : (a) 0% (NS=128), (b) 62% (NS=728) και (c) 71% (NS=1344) (Exarchou, et al. 2002).

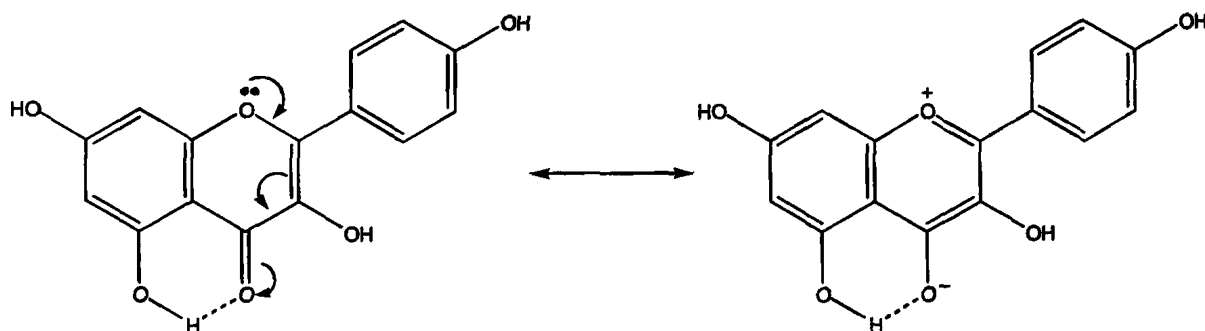
Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα ανάλογων μελετών διαλυμάτων της καιμπφερόλης και της φλαβόνης λουτεολίνης σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  (Σχήμα 5.18).



Σχήμα 5.18.: Φάσματα NMR- $^1\text{H}$  λουτεολίνης σε μίγματα  $\text{CD}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  με μοριακή αναλογία σε  $\text{H}_2\text{O}$ : (a) 0% (NS=32), (b) 62% (NS=192) και (c) 71% (NS=960) (Exarchou, et al. 2002).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως, ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου, μεταξύ του υδροξυλικού πρωτονίου στη θέση 5 και του καρβονυλικού οξυγόνου στη θέση 4 των φλαβονολών και φλαβονών, διατηρείται τόσο σε μη πρωτικούς όσο και σε πρωτικούς διαλύτες ακόμη κι όταν περιέχουν υψηλό ποσοστό ύδατος. Γενικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την ισχύ ενός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου είναι η ηλεκτραρνητικότητα των ατόμων, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα των ομάδων που συμμετέχουν σε αυτόν, φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης και η σταθερότητα του σχηματιζόμενου δακτυλίου (Rose and Stuehr, 1968). Η επίπεδη διαμόρφωση στη δομή των φλαβονοειδών και ο σχηματισμός του ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου  $\text{OH}(5) \cdots \text{CO}(4)$ , μπορούν να ερμηνευτούν από τη σταθεροποίηση των δομών συντονισμού του συστήματος. Αυτή οφείλεται στην αποτελεσματικότερη σταθεροποίηση του αρνητικού φορτίου του καρβονυλικού οξυγόνου ως συνέπεια της δημιουργίας εξαμελούς δακτυλίου (Σχήμα 5.19).





**Σχήμα 5.19.:** Ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου  $\text{OH}(5) \cdots \text{OC}(4)$  σχηματίζει εξαμελή δακτύλιο που σταθεροποιεί το αρνητικό φορτίο του καρβονυλικού οξυγόνου. Η προκύπτουσα εκτεταμένη συζυγία του μορίου της κερκετίνης προσδίδει ακόμη μεγαλύτερη σταθερότητα.

Επιπλέον, ο σχηματισμός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου ευνοείται εντροπικά συγκριτικά με τη δημιουργία διαμοριακού δεσμού υδρογόνου της ένωσης με μόριο του διαλύτη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως ο σχηματισμός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου δεν περιορίζει τη μεταφορική και περιστροφική κίνηση των μορίων της διαλυμένης ένωσης. Αντίθετα, ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ της διαλυμένης ένωσης και του διαλύτη συνεπάγεται σημαντική μείωση των βαθμών ελευθερίας της μεταφορικής και περιστροφικής κίνησης των μορίων με αποτέλεσμα την μείωση της εντροπίας του συστήματος (Jaffé, 1957). Η διατήρηση, συνεπώς, του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου  $\text{OH}(5) \cdots \text{OC}(4)$  σε πολικούς πρωτικούς διαλύτες ή μίγματα οργανικών διαλυτών με  $\text{H}_2\text{O}$  θα πρέπει να ερμηνευτεί σε όρους συνεργατικής συμβολής ενθαλπικών και εντροπικών παραγόντων.

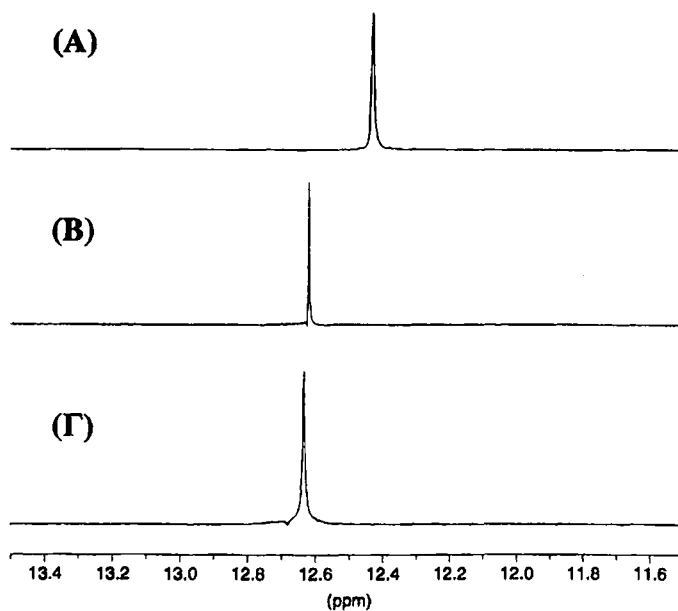
Επισημαίνεται πως αν και υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία ορισμένα παραδείγματα διατήρησης ισχυρών ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου ιοντικής φύσης του τύπου  $\text{X}^- \cdots \text{HO}$  κυρίως σε βιολογικά συστήματα (Frey *et al.*, 1994), η παρούσα μελέτη αποτελεί, ίσως, το πρώτο παράδειγμα ισχυρού δεσμού υδρογόνου μη ιοντικής φύσης που διατηρείται σε πρωτικούς διαλύτες και, ιδιαίτερα, σε υδατικά μίγματα.

Τέλος, από την παραπάνω μελέτη προκύπτει πως η ταυτοποίηση της τάξης των φλαβονών και των φλαβονολών με τη φασματοσκοπία NMR είναι δυνατή ακόμη και στην περίπτωση υδατικών εκχυλισμάτων, γεγονός που τονίζει την διαγνωστική σπουδαιότητα της μεθοδολογίας.



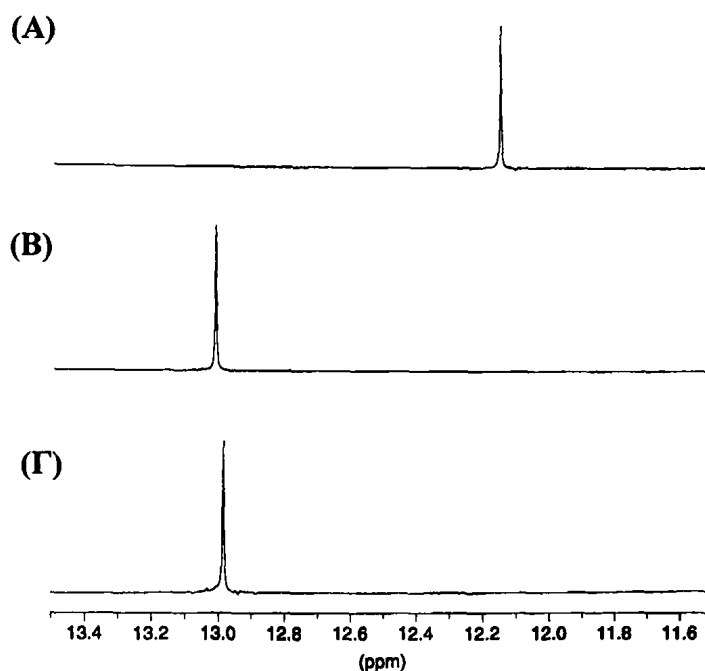
### 5.3.2. Ταυτοποίηση φλαβονοειδών στα φυτικά εκχυλίσματα με NMR

Η εμφάνιση του σήματος συντονισμού των υδροξυλικών πρωτονίων OH(5) στην περιοχή από 12 έως 13 ppm παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι στα φάσματα NMR-<sup>1</sup>H των αιθανολικών και ακετονικών εκχυλισμάτων των υπό μελέτη φυτών, η παραπάνω περιοχή δεν είναι τόσο πολύπλοκη όσο η περιοχή όπου συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια. Επιπλέον με βάση τα Σχήματα 5.20 και 5.21 παρατηρείται ότι είναι δυνατή η διάκριση των φλαβονολών από τις φλαβόνες. Αυτό οφείλεται στο ότι η χημική μετατόπιση του πρωτονίου OH(5) επηρεάζεται από την παρουσία της υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C. Η ομάδα OH(3) στις φλαβονόλες εξασθενίζει την ηλεκτρονική πυκνότητα του καρβονυλικού οξυγόνου CO(4) και, επομένως, μειώνει την ισχύ του ενδομοριακού δεμού υδρογόνου OH(5)···CO(4), πιθανώς λόγω της εν μέρει συμμετοχής της σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το CO(4).



Σχήμα 5.20.: Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR- <sup>1</sup>H: (A) της κερκετίνης, (B) της λουτεολίνης και (Γ) της απιγενίνης σε διαλύτη μερικώς δευτεριωμένη μεθανόλη, CD<sub>3</sub>OH, στους 240 K (NS=32).



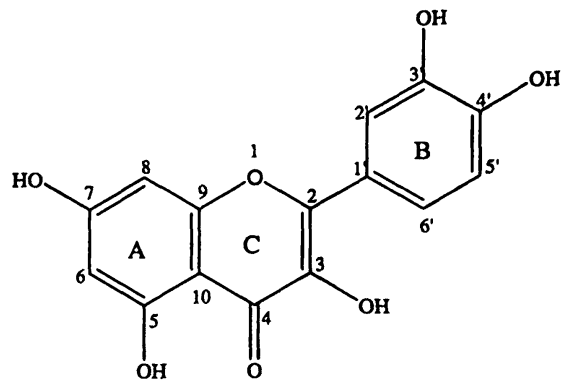
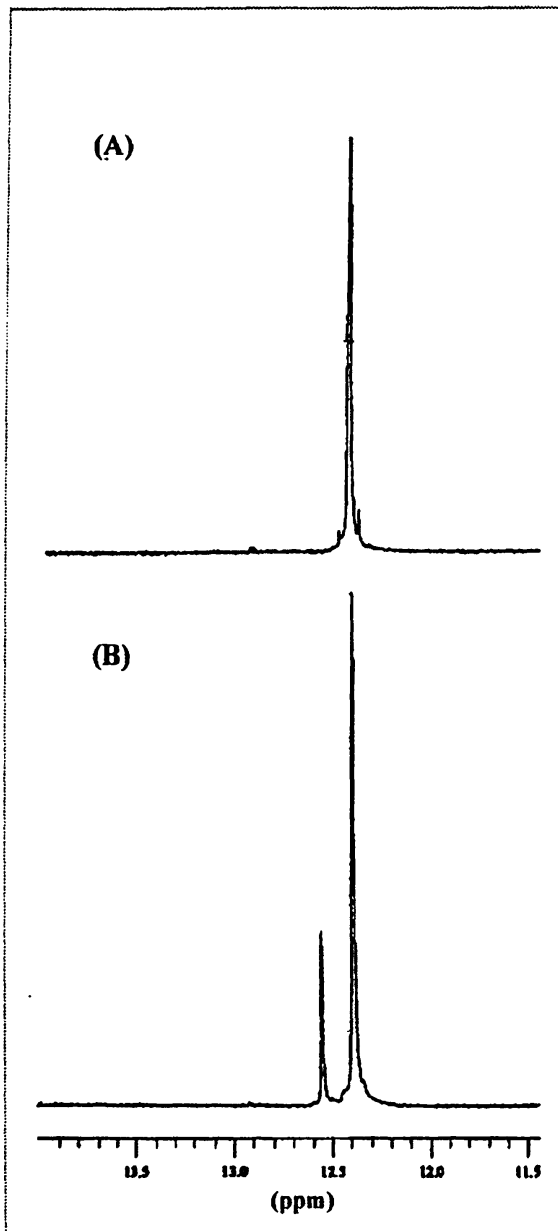


**Σχήμα 5.21.: Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H: (A) της κερκετίνης, (B) της λουτεολίνης και (Γ) της απιγενίνης σε διαλύτη δευτεριωμένη ακετόνη, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> στους 300 K (NS=32).**

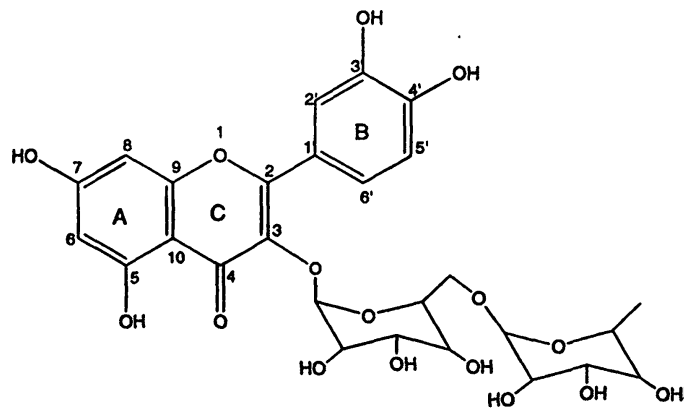
Το ερώτημα που μπορεί να τεθεί σχετικά με την ταυτοποίηση των φλαβονοειδών σε ένα πολύπλοκο και άγνωστης σύστασης φυτικό εκχύλισμα με τη χρήση μονοδιάστατης πρωτονιακής φασματοσκοπίας, είναι το κατά πόσον ακριβής και βέβαιη είναι, δεδομένου ότι στηρίζεται στη χημική μετατόπιση ενός μόνον πρωτονίου. Συγκεκριμένα, σε ένα φυτικό εκχύλισμα είναι δυνατό να συνυπάρχουν πλήθος φλαβονών και φλαβονολών αλλά και παραγώγων τους. Είναι, συνεπώς, εφικτή η διάκριση μεταξύ τους σε ένα μονοδιάστατο φάσμα NMR-<sup>1</sup>H;

Για την απάντηση στο ερώτημα αυτό πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με στόχο την ακριβή ταυτοποίηση της απιγενίνης, λουτεολίνης και κερκετίνης στα φυτικά εκχυλίσματα με τη φασματοσκοπία NMR. Αρχικά, μελετήθηκε η δυνατότητα διάκρισης των φλαβονοειδών και των παραγώγων τους με τη φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H και συγκεκριμένα της κερκετίνης και του γλυκοζίτη της, ρουτίνη. Τα φάσματα NMR-<sup>1</sup>H της κερκετίνης και του μίγματος της με το γλυκοζίτη της, ρουτίνη σε διαλύτη CD<sub>3</sub>OH, απεικονίζονται στο Σχήμα 5.22. Από τη μελέτη του Σχήματος 5.22 του φάσματος διαπιστώνεται η διάκριση των δύο σημάτων συντονισμού των πρωτονίων OH(5) αφού η διαφορά χημικών μετατοπίσεων είναι ~0.2 ppm.





κερκετίνη



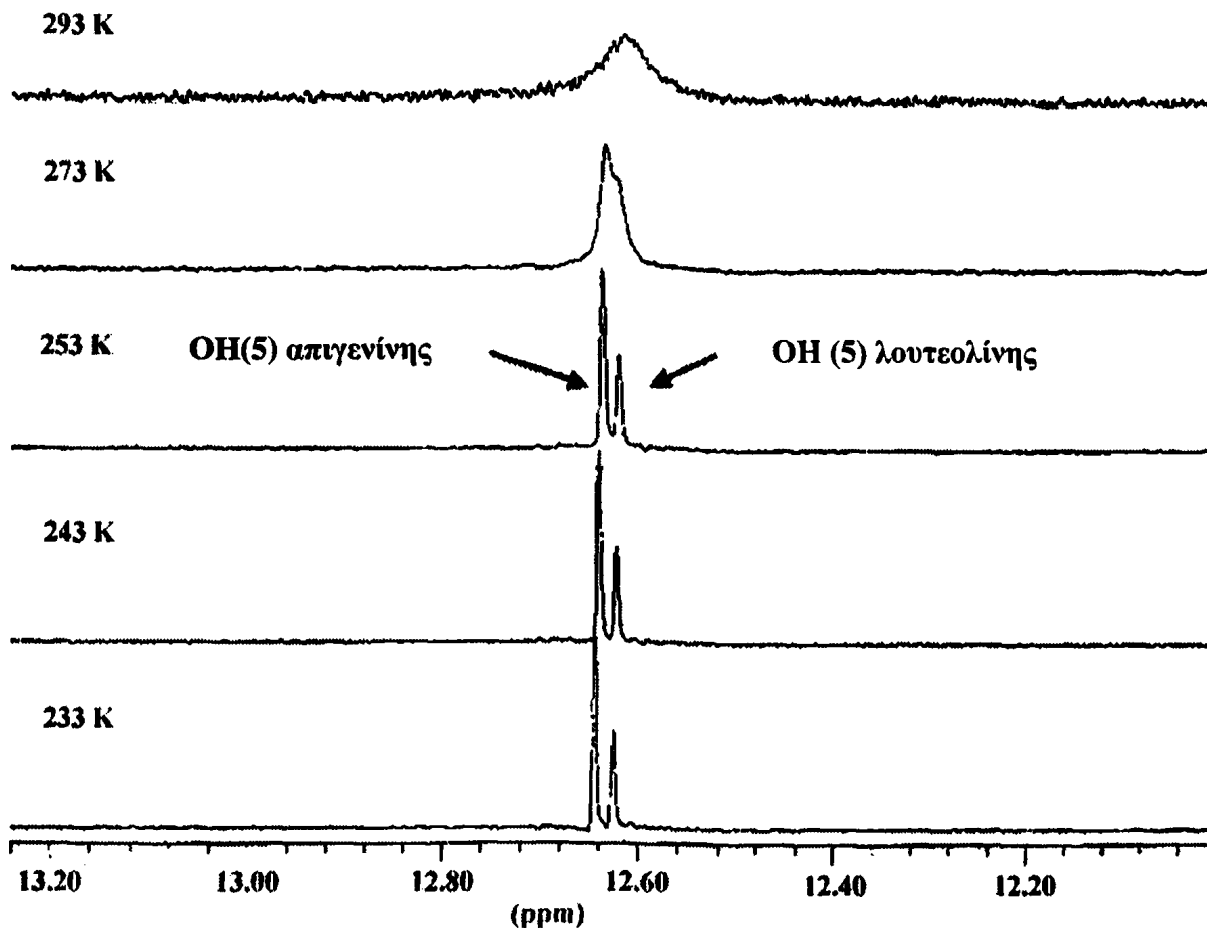
ρουτίνη

Σχήμα 5.22.: Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων  $NMR-^1H$ : (A) της κερκετίνης ( $NS=32$ ) και (B) του μίγματος κερκετίνης και ρουτίνης ( $NS=32$ ) σε  $CD_3OH$  στους 220 K.

Ομοίως, η λήψη φασμάτων  $NMR-^1H$  των δύο ενώσεων σε διαλύτη  $CD_3COCD_3$  έδειξε πως η διάκρισή τους είναι εφικτή ακόμη και στη θερμοκρασία των 300 K. Η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων  $OH(5)$  της κερκετίνης και της ρουτίνης οφείλεται πιθανώς στη μεγαλύτερη εξασθένιση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του καρβονυλικού οξυγόνου  $CO(4)$  που προκαλείται από την υδροξυλομάδα  $OH(3)$  σε σχέση με την επίδραση της αιθερικής ομάδας.



Στη συνέχεια μελετήθηκε ο διαχωρισμός των φλαβονών απιγενίνης και λουτεολίνης στους δύο διαλύτες. Στο Σχήμα 5.23 παρουσιάζονται τα φάσματα μεταβλητής θερμοκρασίας του μίγματος των δύο φλαβονών σε διαλύτη  $CD_3OH$ , που υποδηλώνουν ότι με τη λήψη του φάσματος στην κατάλληλη θερμοκρασία ο διαχωρισμός των δύο φλαβονών είναι εφικτός στο μίγμα των προτύπων ενώσεων.



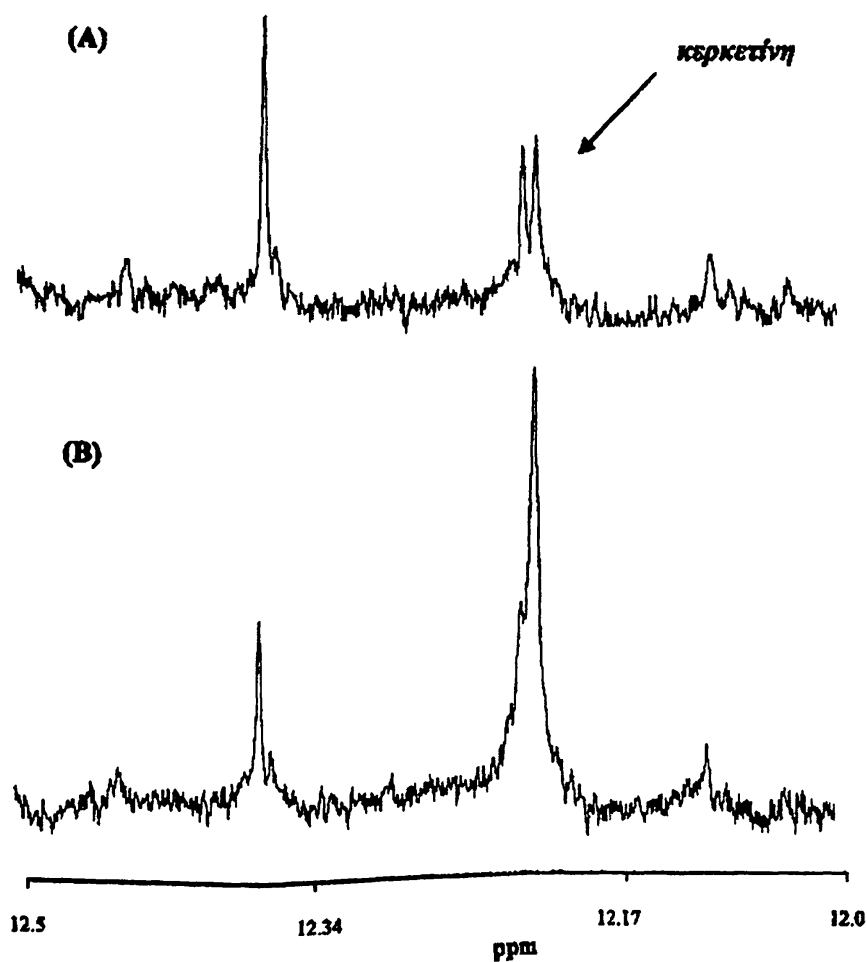
Σχήμα 5.23.: Επιλεγμένη περιοχή φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας NMR- $^1H$  μίγματος των φλαβονών απιγενίνης (4 mM) και λουτεολίνης (2 mM) σε διαλύτη  $CD_3OH$  (NS=32).

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και με την εφαρμογή μεταβλητής θερμοκρασίας του μίγματος των φλαβονών σε διαλύτη  $CD_3COCD_3$ .

Με βάση τα παραπάνω και προκειμένου να επιτευχθεί η ταυτοποίηση της απιγενίνης, λουτεολίνης και κερκετίνης στα φυτικά εκχυλίσματα με τη φασματοσκοπία NMR- $^1H$ , ακολούθησε η λήψη φασμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας των φυτικών εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια και αφού επιλέχθηκε η κατάλληλη θερμοκρασία, στην οποία τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων OH(5) χαρακτηρίζονται από τη μικρότερη δυνατή διεύρυνση, προστέθηκαν μικρές ποσότητες προτύπων ενώσεων στο κάθε εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος (μέθοδος spiking) και ακολούθησε η λήψη των φασμάτων.

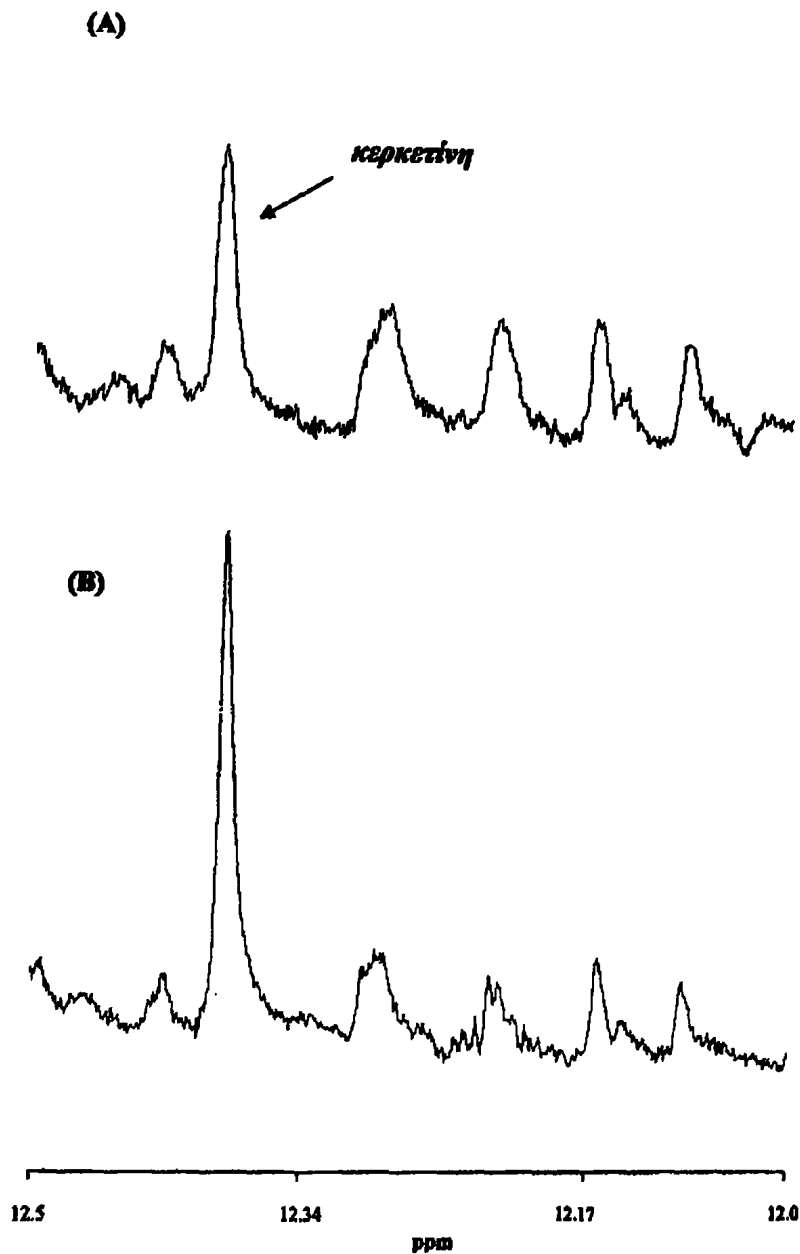


Στα Σχήματα 5.24 και 5.25 παρουσιάζεται ένα μέρος της πορείας πειραμάτων που οδηγούν στην ταυτοποίηση της κερκετίνης στο εκχύλισμα του φυτού *S.fruticosa*.



Σχήμα 5.24.: (A) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- $^1\text{H}$  ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *S.fruticosa* στους 300 K. (B) Το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη 0.5 mmol κερκετίνης. Η ταυτοποίηση της φλαβονόλης υποδηλώνεται με το βέλος (Exarchou et al., 2002a).

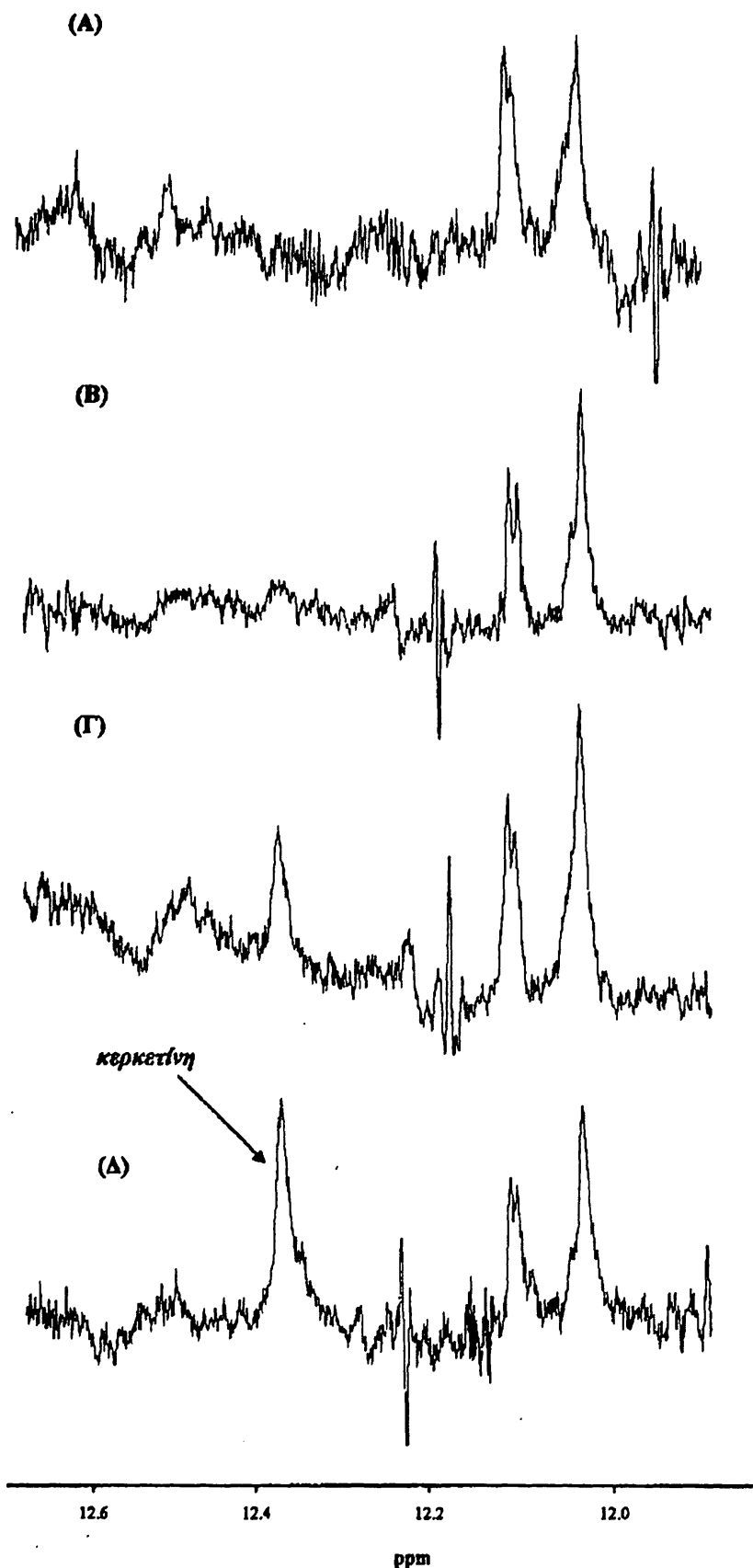




Σχήμα 5.25.: (A) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- $^1\text{H}$  αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *S. fruticosa* στους 240 K. (B) Το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη 0.4 ppmol κερκετίνης. Η ταυτοποίηση της φλαβονόλης υποδηλώνεται με το βέλος.

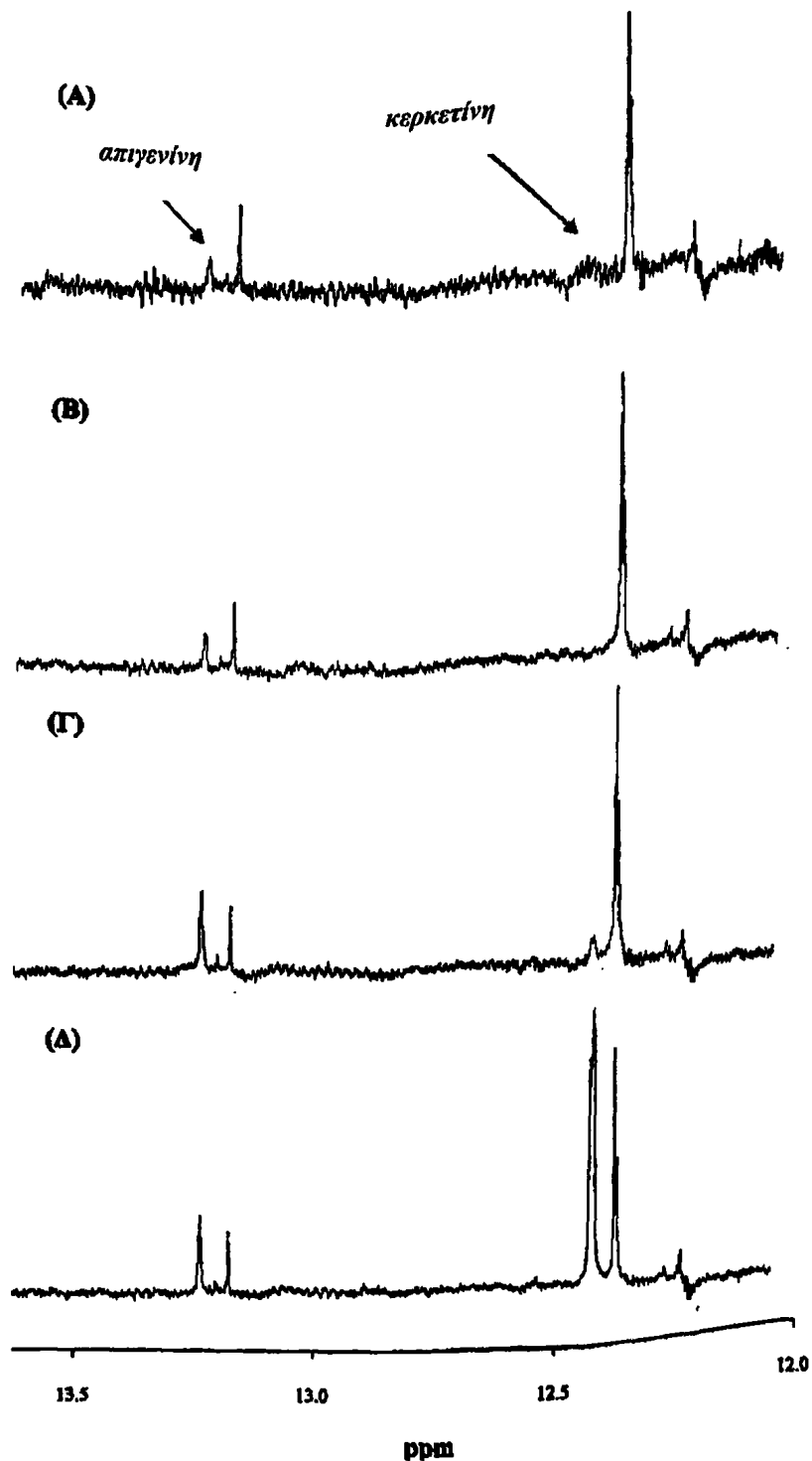
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στη μελέτη των εκχυλισμάτων του φυτού *S. hortensis*. Στην περίπτωση αυτή δεν ανιχνεύτηκε η φλαβονόλη κερκετίνη στα δύο εκχυλίσματα όπως φαίνεται στα Σχήματα 5.26 και 5.27.





Σχήμα 5.26.: (A) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- $^1\text{H}$  αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *S. hortensis* στους 260 K. Το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη (B) 0.05 mmol (Γ) 0.1 mmol και (Δ) 0.15 mmol κερκετίνης. Η κορυφή απορρόφησης της κερκετίνης υποδηλώνεται με το βέλος.

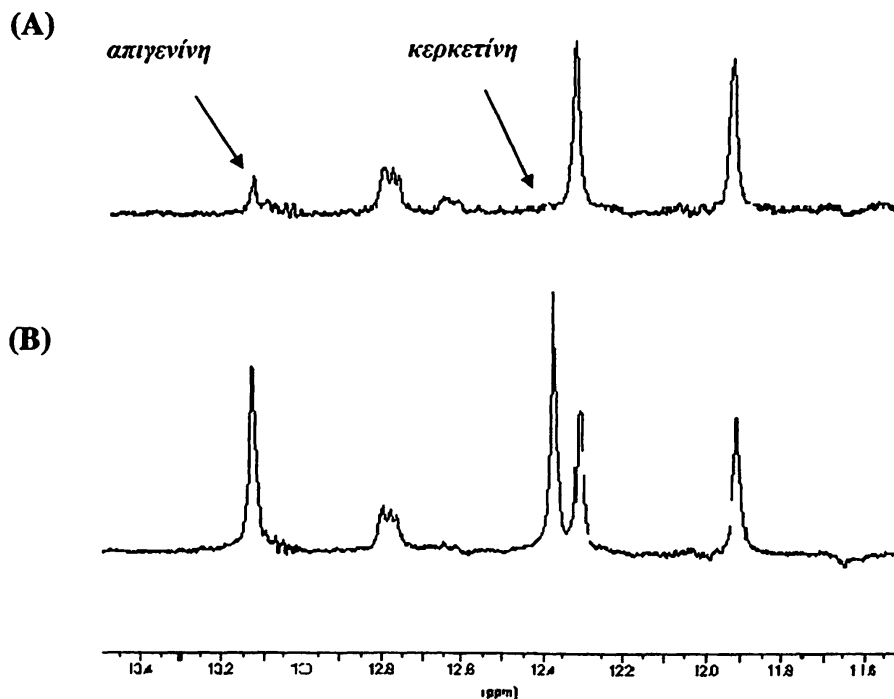




Σχήμα 5.27.: (A) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR- $^1\text{H}$  ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *S. hortensis* στους 240 K. Το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη (B) 0.01 mmol απιγενίνης, (Γ) 0.03 mmol απιγενίνης και 0.02 mmol κερκετίνης, (Δ) 0.06 mmol κερκετίνης. Η κορυφή απορρόφησης της κερκετίνης και η ταυτοποίηση της απιγενίνης υποδηλώνονται με τα αντίστοιχα βέλη.



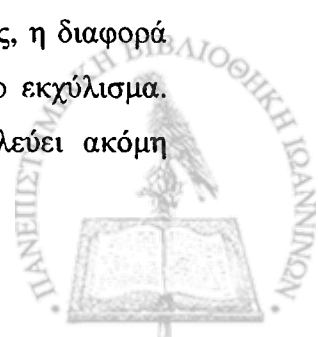
Στο Σχήμα 5.27 απεικονίζεται παράλληλα η ταυτοποίηση της απιγενίνης στο ακετονικό εκχύλισμα του φυτού *S. hortensis*. Στο αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *O. vulgare* δεν ταυτοποιήθηκαν τα υπό μελέτη φλαβονοειδή. Στο Σχήμα 5.28 απεικονίζεται η ταυτοποίηση της απιγενίνης στο ακετονικό εκχύλισμα του φυτού *O. vulgare* ενώ παράλληλα διαπιστώνεται η απουσία της κερκετίνης



Σχήμα 5.28.: (A) Επιλεγμένη περιοχή φάσματος NMR-  $^1\text{H}$  ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *O. vulgare* στους 240 K. Το ίδιο φάσμα μετά την προσθήκη (B) 0.05 mmol απιγενίνης, και 0.06 mmol κερκετίνης. Η κορυφή απορρόφησης της κερκετίνης και η ταυτοποίηση της απιγενίνης υποδηλώνονται με τα αντίστοιχα βέλη.

Επιπλέον, με την προσθήκη μικρής ποσότητας λουτεολίνης στο εκχύλισμα αυτό δεν επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός της από την κορυφή της απιγενίνης και επομένως, η κορυφή απορρόφησης δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στη μία εκ των δύο ενώσεων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη μελέτη των ακετονικών εκχυλισμάτων των φυτών *S. hortensis* και *S. fruticosa* στα οποία διαπιστώθηκε η ύπαρξη σήματος συντονισμού που μπορεί να αποδοθεί στην απιγενίνη ή/και λουτεολίνη.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερή η δυσκολία ταυτοποίησης ορισμένων φλαβονοειδών ενώσεων με τη φασματοσκοπία NMR πρωτονίου. Παρόλο που ο διαχωρισμός των φλαβονοειδών στο μίγμα των προτύπων ενώσεων είναι εξ' υπαρχής εφικτός, η διαφορά των  $\sim 0.015$  ppm δεν είναι ικανή για τον διαχωρισμό των απορροφήσεων στο εκχύλισμα. Επιπλέον, η εξαιρετικά μικρή συγκέντρωσή τους ( $< 0.1$   $\mu\text{g}/25$   $\mu\text{L}$ ) δυσκολεύει ακόμη περισσότερο την ανίχνευση.



#### **5.4. Κλασμάτωση εκχυλίσματος και ταυτοποίηση φλαβονοειδών με RP-HPLC και NMR**

Από τις μελέτες που περιγράφηκαν προηγουμένως, διαπιστώθηκε η ύπαρξη αταυτοποίητων κορυφών τόσο στα χρωματογραφήματα όσο και στα φάσματα NMR-<sup>1</sup>H (περιοχή 12-13 ppm) των φυτικών εκχυλίσμάτων, που είναι πιθανόν να ανήκουν στην τάξη των φλαβονοειδών. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την αδυναμία διαχωρισμού της απιγενίνης και της λουτεολίνης στο φάσμα του εκχυλίσματος οδήγησαν στην εφαρμογή της κλασμάτωσης επιλεγμένου εκχυλίσματος με χρωματογραφικές μεθόδους. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών του εκχυλίσματος σε ομάδες ενώσεων (κλάσματα), τη συλλογή τους και τη μελέτη της χημικής σύστασης επιλεγμένων κλασμάτων με RP-HPLC και NMR. Το φυτό που επιλέχθηκε ήταν η Ελληνική ρίγανη (*O. vulgare*) και από τα δύο είδη εκχυλίσμάτων (αιθανολικό και ακετονικό) μελετήθηκε το ακετονικό εξαιτίας της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς του σε φλαβονοειδή, όπως διαπιστώνεται από το χρωματογράφημα (Σχήμα 5.2 (B)) και το φάσμα NMR-<sup>1</sup>H (Σχήμα 5.28).

##### **5.4.1. Πειραματικό μέρος:**

Για την κλασμάτωση του ακετονικού εκχυλίσματος της Ελληνικής ρίγανης χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel, F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm και πάχους 0.5 mm, που ενεργοποιήθηκαν στους 105°C για 1 h. Ο διαχωρισμός των συστατικών έγινε με το σύστημα διαλυτών ανάπτυξης CH<sub>3</sub>COOEt - MeOH - H<sub>2</sub>O (77:13:10 v/v/v), που κατά τη βιβλιογραφία είναι κατάλληλος για το διαχωρισμό φλαβονοειδών και γλυκοζιτών τους (Montedoro, 1992). Η τοποθέτηση του εκχυλίσματος (10 mg) στην πλάκα πηκτής silica (TLC), έγινε με τη βοήθεια σύριγγας. Για την εξακρίβωση της τάξης στην οποία ανήκουν τα συστατικά που διαχωρίστηκαν, οι πλάκες παρατηρήθηκαν στο υπεριώδες φως προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανή απορρόφηση. Η περιοχή (κλάσμα) των φλαβονοειδών αφαιρέθηκε από τη γυάλινη επιφάνεια με απόξεση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα του κλάσματος των φλαβονοειδών ώστε να γίνει η μελέτη της χημικής του σύστασης με RP-HPLC και NMR. Ακολούθησε διάλυση του κλάσματος που συλλέχθηκε σε ακετόνη και απομάκρυνση της silica με διήθηση σε πτυχωτό ηθμό. Στο διήθημα διαβιβάστηκε άζωτο (για την εξάτμιση της ακετόνης) και στη συνέχεια έγινε η ανάλυση της χημικής σύστασης του κλάσματος.

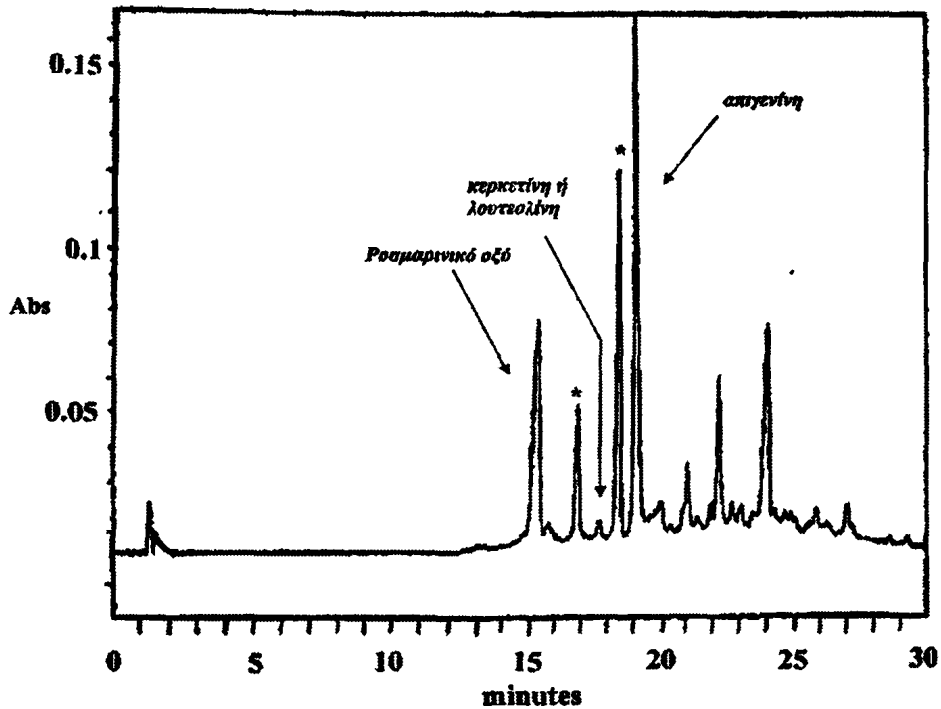


#### 5.4.2. Αποτελέσματα- Συζήτηση

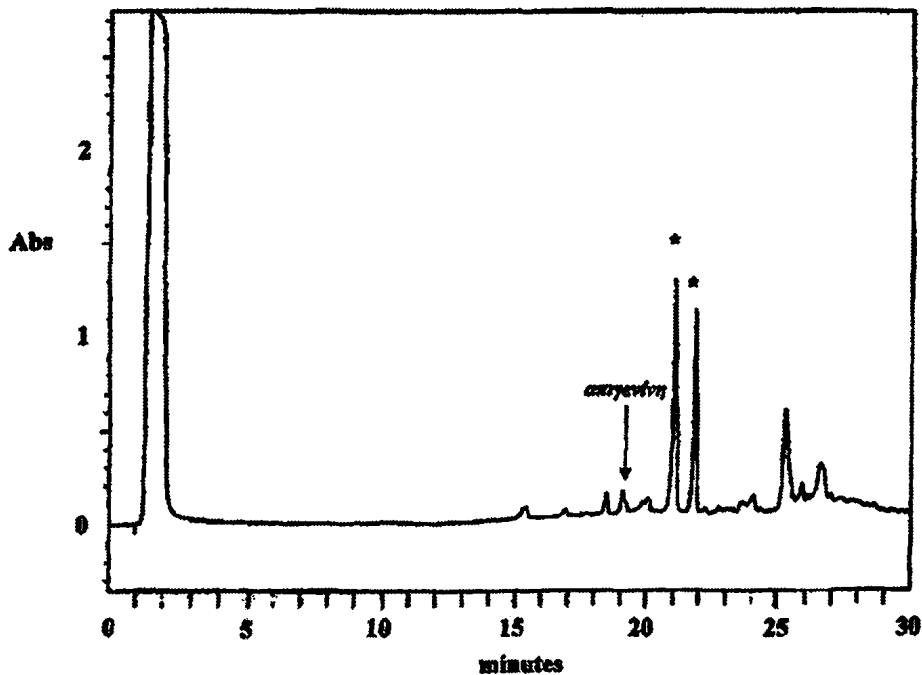
Στο Σχήμα 5.29 απεικονίζεται το χρωματογράφημα του κλάσματος των φλαβονοειδών που λήφθηκε στα 334 nm. Η κορυφή του ροσμαρινικού οξέος εξακολουθεί να εμφανίζεται, γεγονός που οφείλεται πιθανώς στην μεγάλη συγκέντρωση του στο εκχύλισμα και στη μικρή διαφορά του συντελεστή κατακράτησής του στη στατική φάση σε σχέση με τον αντίστοιχο των φλαβονοειδών. Επιπλέον, προσδιορίζονται η κερκετίνη και η απιγενίνη, που υποδηλώνονται με τα βέλη και διαπιστώνεται η ύπαρξη άγνωστων κορυφών, οι οποίες υποδηλώνονται με τον αστερίσκο. Η απόδοση των κορυφών στις αντίστοιχες ενώσεις έγινε με βάση τους χρόνους κατακράτησης, το φάσμα υπεριώδους (UV) και τη σταθερή προσθήκη μικρών ποσοτήτων προτύπων ενώσεων στο εκχύλισμα για την ενίσχυση του σήματος (μέθοδος *spiking*).

Στο Σχήμα 5.29 παρουσιάζεται το ίδιο χρωματογράφημα στα 255 nm που, σύμφωνα με τη βιβλιοθήκη χρωματογραφημάτων προτύπων ενώσεων του συστήματος που χρησιμοποιήθηκε, αποτελεί το μήκος κύματος της μέγιστης της απορρόφησης των περισσότερων φλαβονοειδών που αναλύθηκαν. Στο χρωματογράφημα αυτό παρατηρείται η ύπαρξη κορυφών με χρόνους κατακράτησης μεγαλύτερους των 20 λεπτών που δεν αποδίδονται σε κάποιο από τα φλαβονοειδή που αναλύθηκαν.





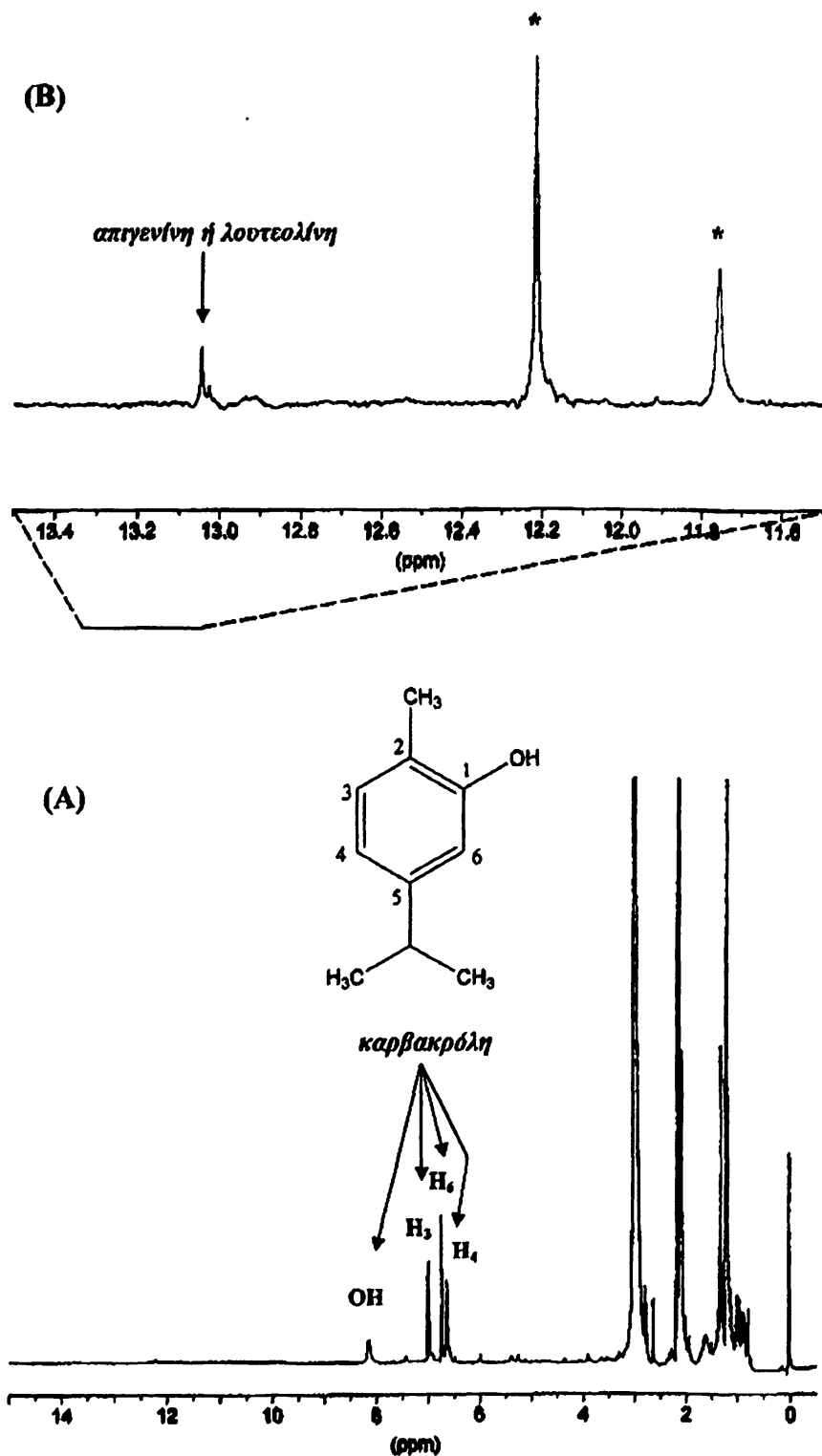
Σχήμα 5.29.: Χρωματογράφημα του κλάσματος των φλαβονοειδών που συλλέχθηκε από το ακετονικό εκχύλισμα του φυτού *O.vulgare* στα 334 nm. Οι κορυφές του ροσμαρινικού οξέος, της κερκετίνης ή λουτεολίνης και της απιγενίνης υποδηλώνονται με τα αντίστοιχα βέλη και η παρουσία αγνώστων κορυφών με αστερίσκο.



Σχήμα 5.30.: Χρωματογράφημα του κλάσματος του Σχήματος 5.24 που λήφθηκε στα 255 nm. Η κορυφή της απιγενίνης υποδηλώνεται με το βέλος και η παρουσία αγνώστων κορυφών με αστερίσκο.



Έτσι το ενδιαφέρον στράφηκε στα φάσματα NMR και στη διαδικασία ταυτοποίησης των αγνώστων ενώσεων. Στο Σχήμα 5.31 απεικονίζεται το φάσμα NMR- $^1\text{H}$  κλάσματος των φλαβονοειδών του ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare*.



Σχήμα 5.31.: (A) Φάσμα NMR- $^1\text{H}$  του κλάσματος των φλαβονοειδών του ακετονικού εκχυλίσματος του φυτού *O.vulgare*. Το κύριο συστατικό του κλάσματος είναι η καρβακρόλη. (B) Επιλεγμένη περιοχή του ίδιου φάσματος, όπου είναι σαφής η παρουσία αγνώστων φλαβονοειδών ( $T=295\text{ K}$ ,  $NS=5630$ ).





Οι κυρίαρχες κορυφές στο φάσμα NMR πρωτονίου του κλάσματος, (Σχήμα 5.31 (A)), αποδίδονται στο σύστημα spin της καρβακρόλης που είναι γνωστό πως περιέχεται στο εκχύλισμα που μελετήθηκε (Lagouri *et al.* 1993). Η καρβακρόλη μελετήθηκε και με την RP-HPLC και βρέθηκε πως ο χρόνος κατακράτησής της είναι 21.8 λεπτά, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η κορυφή που υποδηλώνεται με τον δεύτερο αστερίσκο στο χρωματογράφημα του Σχήματος 5.30 ανήκει σε αυτή.

Σε ότι αφορά την περιοχή των 12 έως 13 ppm του φάσματος, παρατηρείται πως εκτός από την κορυφή απορρόφησης της απιγενίνης δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση άλλων σημάτων συντονισμού. Το δείγμα ήταν αρκετά αραιό, (20 mg/L), και χρειάστηκε αυξημένο αριθμό παλμών (NS=5630), για τη λήψη ενός ικανοποιητικού φάσματος. Η κορυφή απορρόφησης που υποδηλώνεται με αστερίσκο στην περιοχή των ~12.2 ppm δεν μπορεί να αποδοθεί στην κερκετίνη, όπως αποδείχθηκε και προηγουμένως από τις μελέτες μεταβλητής θερμοκρασίας NMR-<sup>1</sup>H του εκχυλίσματος (Σχήμα 5.28).

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η καρβακρόλη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό των ακετονικών εκχυλισμάτων, όπως μπορεί να επιβεβαιωθεί από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων τους (παρουσία κορυφής στα 21.8 λεπτά, Σχήματα 5.2-5.4 (B)), και των φασμάτων NMR-<sup>1</sup>H (ταυτοποίηση συστήματος spin της καρβακρόλης όπως περιγράφεται πιο πάνω, Σχήματα 4.9 και 4.10-4.11 (B)). Θα πρέπει επιπλέον να τονιστεί ότι η χαμηλή συγκέντρωση των αγνώστων φλαβονοειδών δεν επιτρέπει την ταυτοποίησή τους με τη φασματοσκοπία NMR αφού η δισδιάστατη φασματοσκοπία, που μπορεί εφαρμοστεί για την εύρεση του συστήματος spin άγνωστης ένωσης, δεν έχει πρακτική αξία για τόσο μικρές συγκεντρώσεις.

Ολοκληρώνοντας την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αξίζει να αναφερθεί ότι η καλύτερη μέθοδος ανάλυσης πολύπλοκων μιγμάτων, όπως τα φυτικά εκχυλίσματα, είναι η συνδυασμένη χρήση της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματοσκοπία NMR. Η σχετικά πρόσφατη αυτή μέθοδος έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην μελέτη της σύστασης φυσικών προϊόντων (Hansen *et al.*, 1999, Lommen *et al.*, 2000, Bobzin *et al.*, 2000). Μελλοντικός στόχος της ερευνητικής μας ομάδας είναι η ανάπτυξη αυτής της μεθοδολογίας για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό βιοενεργών συστατικών σε φυτικά εκχυλίσματα, ακόμη κι όταν αυτά περιέχονται σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις.



## Παράρτημα

### Αρωματικά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*

Η οικογένεια *Lamiaceae* περιλαμβάνει 200 γένη και 3500 περίπου είδη φυτών, που φύονται κυρίως στη Μεσόγειο και σε μικρότερο βαθμό στην Αυστραλία, τη Ν.Δ. Ασία και τη Ν. Αμερική. Τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* χρησιμοποιούνται ευρέως από την αρχαιότητα ως αρτύματα, αφεψήματα ή ακόμη και ως «φάρμακα». Μπορεί να είναι ποώδη έως και μικρά δέντρα. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους είναι ο συνήθως τετράγωνος βλαστός τους, τα απλά και αντίθετα με έντονο άρωμα φύλλα και τα ζυγόμορφα ερμαφρόδιτα άνθη (μοβ, πορφυρά, λευκά), που σχηματίζουν κυματώδεις ταξιανθίες (Kokkini, *et al.*, 1991).

Τα κυριότερα μέλη της οικογένειας είναι το δεντρολίβανο (*rosemary*), το φασκόμηλο (*sage*), η ρίγανη (*oregano*), ο βασιλικός (*basil*), το θυμάρι (*thyme*), ο δίκταμος (*dittany*), η μαντζουράνα (*marjoram*), η μέντα (*mentha*), το θρούμπι (*savory*), η λεβάντα (*lavander*) κ.α. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η σύσταση τεσσάρων ειδών ρίγανης και ένα είδος από τα φυτά δίκταμος, φασκόμηλο και θρούμπι.

#### 1. Η ρίγανη (*Oregano*)

Το όνομα του γένους της ρίγανης είναι *Origanum*, ονομασία που προέρχεται από την αρχαία ελληνική και τα συνθετικά *όρος* και *γκάνος* που σημαίνει κόσμημα (Kokkini *et al.*, 1991). Είναι δηλαδή η ρίγανη το «κόσμημα του βουνού» και δεδομένου ότι δε φημίζεται για την ομορφιά του άνθους της, ο παραπάνω χαρακτηρισμός είναι πιθανό να οφείλεται στο άρωμα και στις θεραπευτικές ιδιότητές της. Παραδοσιακό άρτυμα της Μεσογειακής κουζίνας, η ρίγανη, έχει στυφή γεύση και έντονη οσμή. Χρησιμοποιείται εκτενώς στη μαγειρική και παλιότερα στον αρωματισμό της μύρας. Πριν το 2<sup>ο</sup> Παγκόσμιο πόλεμο η χρήση της ήταν σχεδόν άγνωστη στις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ στη συνέχεια η φήμη της συνδέθηκε με την πίτσα (the pizza herb).

Το φυτό της ρίγανης έχει ύψος μέχρι 75 εκατοστά, με άνθη που το χρώμα τους ποικίλει από λευκό έως επιδεικτικό πορφυρό και πρασινόγκριζα φύλλα. Αν και είναι από τα πλέον δημοφιλή φυτά παγκοσμίως, η ταξινόμησή του είναι ιδιαίτερα δύσκολη αφού περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό ειδών και πάνω από δώδεκα γένη. Το κοινό γνώρισμα όλων των ειδών είναι η παρουσία της καρβακρόλης στο αιθέριο έλαιό τους, στην οποία οφείλεται κυρίως η χαρακτηριστική οσμή και γεύση τους (Kokkini, 1991).

Τα είδη της ρίγανης που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι:

α) *Origanum vulgare* L. ssp *hirtum*, γνωστό και ως Ελληνική ρίγανη (Σχήμα 1).

Θεωρείται η καλύτερης ποιότητας ρίγανη. Περιέχει ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό αιθέριου



ελαίου (έως και 8% επί ξηρού), το 98% του οποίου έχει ταυτοποιηθεί (περισσότερες από 60 ενώσεις), με κύρια συστατικά του τη θυμόλη (40.4%) και την καρβακρόλη (24.8%) (Vokou *et al.*, 1993, Kokkini 1997, Russo *et al.*, 1998, L.F.D'Antuono *et al.*, 2000, Milos *et al.*, 2000, Daferera 2000). Το εκχύλισμα εξανίου είναι πλούσιο σε α-, β-, γ-, δ-τοκοφερόλες (Lagouri *et al.*, 1996) ενώ το πολικό εκχύλισμα του *O. vulgare* σε διαλύτη ακετόνη (Darkevicus, 1998), αιθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα (Marinova and Yanishlieva, 1997) έχει μελετηθεί αρκετά ως προς τη σύσταση (Kikuzaki and Nakatani, 1989) και την αντιοξειδωτική του δράση (Vekiari *et al.*, 1993).



Σχήμα 1: *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*

β) *Origanum onites* L., ή Τουρκική ρίγανη. Συναντάται στην περιοχή της Ανατ. Μεσογείου και συγκεκριμένα από τα νησιά του Αιγαίου έως την ΝΔ. Τουρκία.

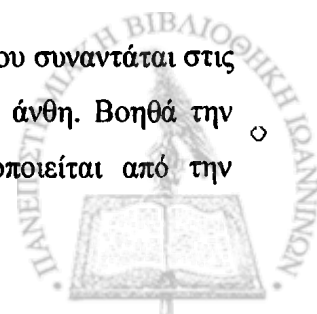
Στο φυτό αυτό έχουν προσδιοριστεί οι πτητικές ενώσεις του εκχυλίσματος διχλωρομεθανίου με κυριότερες την καρβακρόλη (43.9%), και τη γερανιόλη (8.0%) (Skoula, *et al.*, 1999). Το πλούσιο σε τοκοφερόλες εκχύλισμα εξανίου (Lagouri *et al.*, 1996) και το πλούσιο σε φλαβονοειδή μεθανολικό εκχύλισμα (Economidou *et al.*, 1991) παρουσιάζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση.

γ) *Satureja thymbra*. Ενδημικό φυτό της Ανατ. Μεσογείου. Το αιθέριο έλαιο του φυτού έχει μελετηθεί ως προς τα συστατικά του (Carone, *et al.*, 1988) και το μη πολικό εκχύλισμα εξανίου είναι πλούσιο σε τοκοφερόλες με υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Lagouri *et al.*, 1996).

δ) *Coridothymus capitatus*, ή Ισπανική ρίγανη. Το είδος αυτό, που απαντάται στην περιοχή της Μεσογείου, μπορεί να φτάσει τα 1.5 μέτρα ύψος με εντυπωσιακά βιολετί άνθη σε πυκνούς σχηματισμούς. Η σύσταση του εκχυλίσματος εξανίου του φυτού *Coridothymus capitatus* έχει μελετηθεί ως προς την ύπαρξη θρεπτικών αντιοξειδωτικών συστατικών (Demo *et al.*, 1998) ενώ η ανάλυση του αιθέριου ελαίου οδήγησε στην ταυτοποίηση πάνω από 60 συστατικών (Sendra and Cugat, 1980 a,b).

## 2. Ο δίκταμος (dittany)

Ο δίκταμος ή έρωντας είναι μικρό φυτό ύψους 30-40 εκατοστών που συναντάται στις ορεινές περιοχές της Κρήτης. Έχει μικρά και πλατιά φύλλα και βιολετί άνθη. Βοηθά την πέψη, είναι αντιμικροβιακό, αντισηπτικό και σπασμολυτικό. Χρησιμοποιείται από την



αρχαιότητα για τη διευκόλυνση των δύσκολων τοκετών. Ως αφέψημα καταπραΰνει τους πονοκεφάλους, τις νευραλγίες, και τις στομαχικές διαταραχές. Το αιθέριο έλαιο του *Origanum dictamnus* είναι πλούσιο σε θυμόλη και καρβακρόλη και χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία. Περιέχει επίσης φαινολικές ενώσεις, αλλά είναι φτωχό σε άκυκλες ενώσεις και σεσκιτερπένια (Skoula *et al.*, 1999a,b). Το εκχύλισμα εξανίου περιέχει τοκοφερόλες με πλούσια αντιοξειδωτική δράση (Lagougi *et al.*, 1996). Η αντίστοιχη δράση του υδατικού και μεθανολικού εκχυλίσματος οφείλεται στις φαινόλες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία περιέχει σε αφθονία (Economidou *et al.*, 1991, Moller *et al.*, 1999).

### 3. Το φασκόμηλο (sage)

Το βοτανολογικό όνομα του φασκόμηλου *salvia* προέρχεται από το Λατινικό ρήμα *salvare* που σημαίνει σώζω και υπαινίσσεται τη σπουδαιότητά του. Έτσι, οι Κινέζοι ήταν ιδιαίτερα ευτυχείς ανταλλάσσοντας την τριπλάσια ποσότητα του καλύτερου τσαγιού τους με το ευρωπαϊκό φασκόμηλο. Το ύψος του φυτού κυμαίνεται από 30 έως 60 εκατοστά και τα χρήσιμα μέρη του είναι τα φύλλα γκριζοπράσινου χρώματος.

Επί αιώνες το φασκόμηλο εκτιμάται για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Θεωρείται ότι χρησιμοποιούταν για τη θεραπεία των κρυολογημάτων, του πυρετού, της επιληψίας ακόμη και για τη φροντίδα έπειτα από τσιμπήματα φιδιών. Αν και το φασκόμηλο δε χρησιμοποιείται πια για θεραπευτικούς σκοπούς, έγινε ευρέως γνωστό και συγκαταλέγεται ανάμεσα στα πιο δημοφιλή βότανα. Ιδιαίτερα το είδος *Salvia officinalis*, έχει μελετηθεί εκτενώς (Wang *et al.*, 1998, Lu *et al.*, 2001). Το αιθέριο έλαιο του είδους αυτού περιέχει κυρίως θουξόνη (35-50 %), που θεωρείται ότι έχει τοξική δράση και κινεόλη. Μικρότερη ποσότητα θουξόνης (1-5 %) περιέχεται στο Ελληνικό φασκόμηλο που είναι βοτανολογικά γνωστό ως *Salvia triloba (fruticosa)* και δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό (Kintzios *et al.*, 1999, Skoula *et al.*, 2000). Η φαινολική σύσταση του αιθέριου ελαίου εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού (Skoula *et al.*, 1999b, Daferrera *et al.*, 2000). Το υδατικό της εκχύλισμα είναι πλούσιο σε φαινολικά οξέα και παρουσιάζει έντονη αντιοξειδωτική δράση.



#### 4 Το θρούμπι (savory)

Το θρούμπι απαντάται στα Βαλακάνια και σε επιλεγμένες περιοχές των Ηνωμένων πολιτειών. Το ύψος του φυτού φτάνει τα 40 εκατοστά και τα σκουροπράσινα φύλλα του αποτελούν τα χρήσιμα μέρη του φυτού. Το αιθέριο έλαιο του περιέχει κυρίως καρβακρόλη. Το καλοκαιρινό θρούμπι (*Satureja hortensis*) είναι μονοετές φυτό με ρόδινα, μενεξεδιά ή λευκά άνθη (Σχήμα II). Η γεύση του είναι καυτή και πιπεράτη. Το αιθέριο έλαιο του *Satureja hortensis* αποτελεί λιγότερο από το 1% του βάρους του φυτού και τα κυριότερα συστατικά του είναι η καρβακρόλη (25-45%), το λιμονένιο, το γ-τερπινένιο και άλλα τερπενοειδή με σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Thieme and Nguyen, 1972 a,b, Esquivel *et al.*, 1999). Το είδος αυτό αποτελεί επίσης πηγή φαινολικών οξέων (Kubátová *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2001, <http://www.medusa.maich.gr>) αλλά δεν έχει μελετηθεί εκτενώς.



Σχήμα II.: *Satureja hortensis*

## Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χωρίζεται σε πέντε (5) επιμέρους κεφάλαια. Τα δύο πρώτα Κεφάλαια αποτελούν το θεωρητικό μέρος και αναφέρονται στα φυτικά προϊόντα και στις κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που απαντούν σε αυτά και κυρίως στις βασικές αρχές των τεχνικών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας και δύο διαστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Στα επόμενα τρία Κεφάλαια περιγράφεται ο συνδυασμός των μεθοδολογιών NMR που αναπτύχθηκε με σκοπό το χαρακτηρισμό φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε φυτικά εκχυλίσματα, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους σε επιμέρους συστατικά. Οι συνδυασμένες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν αρχικά σε πρότυπες ενώσεις και σε μίγματα αυτών και τέλος σε φυτικά εκχυλίσματα. Η αρχική μελέτη των προτύπων ενώσεων και των μιγμάτων τους πραγματοποιήθηκε για τη εύρεση των κατάλληλων συνθηκών με τις οποίες επιτυγχάνεται διάκριση διαφόρων τάξεων των φαινολικών οξέων, με βάση τη διαγνωστική αξία των πληροφοριών που μπορούν να συλλεχθούν από τα φάσματα NMR μιας και δύο διαστάσεων. Επιπλέον, η σύσταση επιλεγμένων εκχυλισμάτων μελετήθηκε με υδροχρωματογραφικές τεχνικές για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και παράλληλα εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση. Το πειραματικό μέρος που αφορά τη φασματοσκοπία NMR πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και η εφαρμογή των υδροχρωματογραφικών τεχνικών καθώς και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΠΘ.

Η μελέτη πολύπλοκων μιγμάτων φυτικών εκχυλισμάτων με τη φασματοσκοπία NMR έδειξε ότι:

- (1) Η εφαρμογή της ομοπυρηνικής μεθοδολογίας COSY/TOCSY και NOESY/ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  τόσο στο πρότυπο μίγμα των φαινολικών οξέων όσο και στα μεθανολικά εκχυλίσματα των υπό μελέτη φυτών, μπορεί να αποτελέσει ένα πρωταρχικό σημαντικό βήμα στην ταυτοποίηση των φαινολικών οξέων χωρίς τον προηγούμενο αναλυτικό διαχωρισμό τους, δεδομένου ότι αποκαλύπτει το σύστημα των spin ενός μορίου. Η παραπάνω συνδυαστική μεθοδολογία εφαρμόζεται με επιτυχία στην ταυτοποίηση των υδροξύκιναμωμικών οξέων κυρίως λόγω της διαγνωστικής αξίας της αλληλεπίδρασης μέσω δεσμών των πρωτονίων  $\text{H}_{2\text{a}}$  και  $\text{H}_{3\text{a}}$ .
- (2) Η διάκριση των φαινολικών οξέων και των παραγώγων τους με παραπλήσιες χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου και άνθρακα-13, είναι εφικτή με τη συνδυαστική χρήση μεταβλητής θερμοκρασίας και δισδιάστατης ομοπυρηνικής (DQF-COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) και ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης (HMQC/HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).
- (3) Η ολοκλήρωση των διαχωρισμένων κορυφών συντονισμού ενός συστατικού έχει ως αποτέλεσμα την εξαγωγή έγκυρων συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα συγκέντρωσης του συστατικού αυτού στο πολύπλοκο μίγμα του εκχυλίσματος.

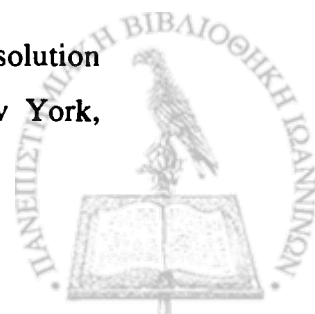


(4) Η ταυτοποίηση των φλαβονοειδών στα φυτικά εκχυλίσματα είναι εφικτή ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ) με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR- $^1\text{H}$  μιας διάστασης, εξαιτίας της ύπαρξης ισχυρού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ  $\text{OH}(5) \cdots \text{OC}(4)$ , που διατηρείται ακόμη και σε υδατικά διαλύματα.



**Βιβλιογραφία**

- Adams, B.; Lerner, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4827.
- Allinger, N. L. and Eliel, E. L. In *Topics in Stereochemistry, Vol.9*. John Wiley & Sons: New York, 1976.
- Andersen, N.H.; Heidigh, W.J.; Harris, S.M.; Lee, G.M.; Liu, Z.; Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547.
- Atkins, P.W. In *Physical chemistry; 6<sup>th</sup> edition*, New York: Oxford University Press Inc. 1998.
- Auroma, O.I., *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 671.
- Bairaktari, E.; Katopodis, K.; Siamopoulos, K. C.; Tsolas, O. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1256.
- Bax, A. *Bull. Magn. Reson.* **1985**, *7*, 167.
- Bax, A., and Freeman, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 1099.
- Bax, A.; Grzesiek, S. ROESY. In *Encyclopedia of NMR*; Grant, D. M., Harris, R. K., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., 1996; pp 4157.
- Baxter, N.J.; Hosszu, L.P.; Waltho, P.; Williamson, M.P. *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 1625.
- Belton, P. S., Delgadilo, I., Gil, A. M., Webb, G. A., Eds. In *Magnetic Resonance in Food Science*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1995.
- Belton, P.S.; Colquhoun I.J.; Kemsley, K E.; Delgadillo, I.; Roma, P.; Dennis, M.J.; Sharman, M.; Holmes, E.; Nicholson, J.K.; Spaul, M. *Food Chem.* **1998**, *61*, 207.
- Bobzin, S.; Yang, S.; Kasten, T.P. *J. Chromatogr. B.* **2000**, *748*, 259.
- Bock, J. L. *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 1873.
- Bovey F. A. In *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press: California, 1988.
- Bovisov, E.V. and Agrawal, P.A. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 499.
- Bovisov, E.V.; Zhang, S.; Bolvig, S.; Hansen, P.E. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 104.
- Bracco, U.; Loliger, J.; Viret, J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 686.
- Braun, S.; Kalinowski, S.; Berger, S. In *150 and more basic NMR experiments*. Wiley-VCH: New York, 1998.
- Brause, A.R. and Raterman, J.M. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, **1982**, *65*, 846.
- Breitmaier, E., and Voelter, W. In *Carbon-13 NMR spectroscopy. High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*. VCH:New York, 1989.





- Bringmann, G.; Messer, K.; Wohlfarth, M.; Kraus, J.; Dumbuya, K. and Ruckert, M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2678.
- Burr, H.L. *J. Human Nutr. Diet*, **1994**, *7*, 409.
- Capone W.; Mascia C.; Melis M. and Spanedda L., *J. Chromatogr.*, **1988**, *457*, 427.
- Chen, H.; Zuo, Y.; Deng, Y. *J. Chromatogr.A*, **2001**, *913*, 387.
- Chen, Q.; Huang, S.; and Ho, C.T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 999.
- Croasmun, W. R. and Carlson, R. M. K. Eds. In *Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Applications for Chemists and Biochemists*, 2<sup>nd</sup> ed. VCH: New York, 1994.
- Cuppert, S. *Inform*, **1998**, *9*, 588.
- Cuvelier, M.E.; Richard, H.; and Berset, C. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 324.
- Cuvelier, M. E.; Berset, C.; Richard, H. *Sci. Aliments* **1994**, *14*, 811.
- Cuvelier, M.E.; Richard, H.; and Berset, C. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 645.
- D'Antuono, L.F.; Galletti, G.C.; Bocchini, P. *Annals of Botany*, **2000**, *86*, 471.
- Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polission, M.G. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 2576.
- Dapkevicious, A.; Venskutonis, R.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H. *J. Sci Food Agric.* **1998**, *77*, 140.
- Demo A.; Petrakis C.; Kefalas P. and Boskou D., *Food Res. Inter.*, **1998**, *31*, 351.
- Deslaurier, R.; Smith, I. C. P. *Biol. Magn. Reson.* **1980**, *2*, 243.
- Duve, K. J.; White, P. J.. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 365-370.
- Dziedzic, S.Z. and Hudson, B.J.F. *Food Chem.*, **1984**, *14*, 45.
- Economou, K.D.; Oreopoulou, V.; Thomopoulos, C.D. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 109.
- Esquivel, M.M.; Ribeiro, M.A.; and Bernardo-Gil M.G. *J. Supercritical Fluids*, **1999**, *14*, 129.
- Exarchou, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P.; Tsimidou, M.; Boskou, D. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2.
- Exarchou, V.; Nenadis, N.; Tsimidou, M.; Gerothanassis, I.P.; Troganis, A. and Boskou, D. *J. Agric. Food Chem.* **2002a**, in press.
- Exarchou, V.; Troganis, A.; Gerothanassis, I.P.; Tsimidou, M.; Boskou, D. *Tetrahedron*, **2002**, in press.
- Fan, T. W. - M. *Progr. NMR Spectrosc.* **1996**, *28*, 161.
- Fauhl, C.; Reneiro, F.; Guillou, C. *Magn. Reson. Chem.*, **2000**, *38*, 436.
- Frankel, E.N.; Huang, S-W.; Aeschbach, R.; Prior, E. *J. Agric. Food Chem.* **1996** *44*,



131.

Frankel, E.N.; Huang, S-W.; Kanner, J.; and German, B.J. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1054.

Frey, P. A.; Whitt, S. A.; Tobin, J. B. *Science*, **1994**, *264*, 1927.

Fuleki, T.; Pelayo, E. and Palabay, R.B. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *42*, 1266.

Gagnaire, D.; St-Germain, J.; Vincendon, M. *J. Appl. Polym. Sci: Appl. Polym. Symp.* **1982**, *37*, 261.

Gerothanassis, I. P., and Kalodimos, C. G. *J. Chem. Educ.*, **1996**, *73*, 801-804.

Gerothanassis, I. P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M., Boskou, D. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4185.

Gerothanassis, I. P., Troganis, A., Exarchou, V., Barbarossou, K. *Chem. Educ. Res. Pract. Eur.*, **2002**, *3*, 229.

Griesinger, C.; Schwable, H.; Schleucher, J.; Sattler, M. Proton-Detected Heteronuclear and Multidimensional NMR. In *Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Applications for Chemists and Biochemists*, 2nd ed.; Croasmun, W. R., Carlson, R. M. K., Eds.; VCH: New York, 1996, pp 469-482.

Günther, H. In *NMR Spectroscopy. Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons: Chichester, 1995.

Häkkinen, S.H.; Kärenlampi, S.O.; Heinonen, M.I.; Mykkönen, H.M.; Törrönen, A.R. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2274.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J., and Auroma, O.I. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 601.

Hansen, S.H.; Jensen, A.G.; Cornett, C.; Björnsdottir, I.; Taylor, S.; Wright, B. and Wilson, I.D. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5235.

Harbonne, J.B.; Marby, T.J.; Marby, H. In *The flavonoids*. Chapman and Hall: London. 1975.

Harris, R.K. In *Nuclear magnetic resonance spectroscopy. A physicochemical view*, Massachusetts: Pitman Publishing Inc. 1983.

Harvey, D. In *Modern Analytical Chemistry*. McGraw Hill: Toronto, 2000.

Heinonen, M.; Rein, D.; Satué-Gracia, M.T.; Huang, S-W.; German, B.J. and Frankel, E.N. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 917.

Hermann, K. J. *Food Technol.*, **1976**, *11*, 117.

Hore, P. J. In *Nuclear Magnetic Resonance*. Oxford university Press: Oxford, 1996.

<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>



<http://www.medusa.maich.gr>

Hurd R. E.; John, B. K.; *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 648.

Jaffé, H. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2373.

Jameson, C. J. and Gutowsky, H. S. *J. Chem. Phys.*, **1964**, *40*, 1714.

Jin, G-Z.; Yamagata, Y.; Tomita K-I. *Acta Cryst.* **1990**, *C46*, 310.

Kanazawa, K.; Kawasaki, H.; Samejima, K.; Ashida, H.; Danno, G. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 404.

Karakaya, S.; Nehir, E. S. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *66*, 289.

Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 519.

Kintzios, S.; Nikolaou, A.; Skoula, M. *Plant Cell Rep.* **1999**, *18*, 462.

Kokkini S.; Karousou, R. and Vokou D. *Biochem. System. and Ecology*, **1994**, *22*, 517.

Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N. and Lanaras, T., *Phytochemistry* **1997**, *44*, 883.

Kokkini, S.; Vokou, D. and Karousou, R. *Botanica Chronica*, **1991**, *10*, 337.

Kubátová, A.; Lagadec, A.J.M.; Miller, D.J.; Hawthorne, S.B.. *Flavor Fragn. J.* **2001**, *16*, 64.

Lagouri, V. and Boskou, D. *Int. J. Food Sci. and Nutr.*, **1996**, *47*, 493.

Lagouri, V.; Blekas, G.; Tsimidou, M.; Kokkini, S. and Boskou, D. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *197*, 20.

Leefflang, B. R.; Vliegenhart, J. F. G.; Kroon-Batenburg, L. M. J.; van Eijck, B. P., Kroon, J.; *Carbohydr. Res.* **1992**, *270*, 41.

Limiroli, R.; Consonni, R.; Ranalli, A.; Bianchi, G.; Zetta, L. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 2040.

Lin, M.; Shapiro, M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4731.

Lommen, A.; Godejohann, M.; Venema, D.P.; Hollman, P.C.H.; Spraul, M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1793.

Lu, Y.; Foo, L.Y. *Food Chem.* **2001**, *75*, 197.

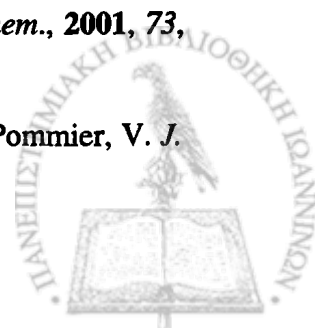
Madsen, H. L.; Bertelsen, G. *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, *6*, 271.

Marek, R.; Králík, L.; Sklenář, V. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 665.

Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V., *Food Chem.*, **1997**, *58*, 245.

Martinez-Ortega, M.V.; Parrilla-Garcia, M.C.; Troncoso, A.M. *Food Chem.*, **2001**, *73*, 11.

Mazumder, A.; Neamati, N.; Sunder, S.; Schulz, J.; Pertz, H.; Eich, E.; Pommier, V. *J.*



*Med. Chem.* **1997**, *40*, 3057.

McMaster, M.C. In *HPLC: A Practical User's Guide* VCH Publishers: New York. 1994.

Milos, M.; Mastelic, J. and Jerkovic, I. *Food Chem.*, **2000**, *71*, 79.

Møller, J.K.S.; Madsen, H.L.; Aaltonen, T. and Skibsted, L.H. *Food Chem.*, **1999**, *64*, 215.

Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1577.

Nardin, R.; Vincendon, M. *Macromol. Chem.* **1988**, *189*, 153.

Nardini, M.; D'Aquino, M.; Tomassi, G.; Di Felice, M.; Piccolelle, E. and Scaccini, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 541.

Nardini, M.; Pisu, P.; Gentili, V.; Natella, F.; Di Felice, M.; Piccolelle, E. and Scaccini, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 1098.

Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; and Scaccini, C. *J. Agric Food Chem.* **1999**, *47*, 1453-1459.

Neuhaus, D. and Williamson, M.P. In *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*, 2<sup>nd</sup> edition, New York: Wiley-VCH, Inc. 2000.

Nicholson, J. K.; Wilson, I. D. *Progr. NMR Spectrosc.* **1989**, *21*, 449.

Norwood, T. J. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 56-66.

Parella, T.; Belloc, J. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 311-315.

Perrin, C. L.; Nielson, J. B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 511-544.

Pokorny, J. *Major factors affecting the autoxidation of lipids*. In *Autoxidation of unsaturating lipids*. H.W.S. Champ Ed. Academic Press: London, 1987, pp.141-206.

Pokorny, J.; Korczak, J. Preparation of Natural Antioxidants. In *Antioxidants in Food*; Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M.; Eds.; Woodhead Publishing in Food Science and Technology Abington Hall: Cambridge, England, 2001; pp 311-330.

Pomeranz, Y., and Meloan, C.E. (Ed.) In *Food Analysis: Theory and Applications*. 3<sup>rd</sup> edition, Chapman and Hall: New York, 1994.

Poppe, L.; van Halbeek, H. *Nature Struct. Biol.* **1994**, *1*, 215.

Rahman, A., and Chouldhary, M. I. In *Solving Problems with NMR Spectroscopy*. Academic Press: California, 1996.

Rice-Evans, C.A. and Diplock, A.T. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15*, 77.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.



- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Trends in Plant Sci.* **1997**, *2*, 152.
- Robards, K.; Haddad, P.R.; Jackson, P.E. (Ed.) In *Principles & Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press: New York, 1994.
- Roberts, J.D. In *ABSs of FT-NMR*, Sausalito, California: University Science Books. 2000.
- Russo, M.; Galletti, G.C.; Bocchini, P.; Carnacini, A. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 3741.
- Sanders, J. K. M.; Hunder, B. K. The Second Dimension. In *Modern NMR Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1993; pp 113.
- Satué-Gracia, M.T.; Heinonen, M. and Frankel, E.N. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3362.
- Schieber, A.; Keller, P.; Carle R. *J. Chromatogr.A*, **2001**, *910*, 265.
- Schwarz, K.; Ernst, H. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *70*, 217.
- Sendra, J.M. and Cunat, P. *Phytochemistry*, **1980a**, *19*, 89.
- Sendra, J.M. and Cunat, P. *Phytochemistry*, **1980b**, *19*, 1513.
- Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Macchioni, A.; Montedoro G. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 12.
- Shahidi, F. (Ed). In *Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications*, AOCS Press: Champaign, Illinois, 1997.
- Skoula, M.; Abbes, J.E.; Johnson C.B. *Biochem. System. Ecol.*, **1999b**, *28*, 551.
- Skoula, M.; Gotsiou, P.; Naxakis, G. and Johnson, C.B., *Phytochemistry*, **1999a**, *52*, 649.
- Skoula, M.; Abbes, J.E.; Johnson, C.B.. *Biochem. System. Ecol.*, **2000**, *28*, 551.
- Spyros, A. and Dais, P. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 802.
- St-Jacques, M.; Sundararajan, P.R.; Taylor, K.J.; Marchessault, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4386.
- Stryer, L. In *Biochemistry. (3<sup>rd</sup> edition)*, Freeman, W.H. and Company: New York, 1988.
- Svoboda, K. P.; Deans, S. G. . *Flavor Fragrance J.* **1992**, *7*, 81-87.
- Synder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. (Eds.), In *Practical HPLC Method Development* 2nd. Edition, Wiley: New York, 1997.
- Schulz, J. M.; Herrmann, K. *J. Chromatogr.* **1980**, *195*, 85-94.
- Thieme, H. and Nguyen, Thi-Tam, *Die Pharmazie*, **1972a**, *27*, 255.
- Thieme, H. and Nguyen, Thi-Tam, *Die Pharmazie*, **1972b**, *27*, 324



- Tsimidou, M.; Paradopoulos, G.; and Boskou, D. *Food Chem.*, **1992**, *44*, 53.
- Tsimidou, M.; and Boskou, D. In *Spices, Herbs and Edible Fungi*, Charalambous, G., Ed. Elsevier: Amsterdam, **1994**, pp. 273-284.
- Urry, D. W.; Ohnishi, M. In *Spectroscopic Approaches to Biomolecular Conformation*; Urry, D. W. Ed., American Medical Association: Chicago, 1970.
- Vekiari, S.A.; Oreopoulou, V.; Tzia, C.; Thomopoulos, C.D. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 483.
- Vlahov, G. *Progr. NMR Spectrosc.* **1999**, *35*, 341.
- Vokou, D.; Kokkini, S. and Bessiere J.M. *Biochem. System. Ecology*, **1993**, *21*, 287.
- Wang, M.; Jiangang, L.; Rangrajan, M.; Shao, Y.; La Voie, E.J.; Huang, T.C.; Ho, C.T. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4869.
- Wishart, D.S.; Sykes, B.D.; Richards, F.M. *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 231.
- Wüthrich, K.. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science*, **1989**, *243*, 45.
- Yi, O.S.; Meyer, A.S.; Frankel, E.N. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 1301.
- Zheng, W.; Wang, S.Y.. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5165.
- Zuo, Y.; Chen, H.; Deng, Y. *Talanta*, **2002**, *57*, 307.
- Αλεξάνδρου, Ν.Ε. *Γενική Οργανική Χημεία, Δομή – Φάσματα – Μηχανισμοί (Β' Τεύχος)*. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη, 1992.
- Αλεξάνδρου, Ν. Ε., Βάρβογλης, Α.Γ., Χατζημιχαλάκης, Φ.Μ. *Εργαστηριακός οδηγός-Τεχνική –Οργανικές συνθέσεις*. Εκδόσεις Ζήτη: Θεσσαλονίκη, 1986.
- Γεροθανάσης, Ι. Π. *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων*. Εκδόσεις: Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα, 2001.
- Εξάρχου, Β. Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης: «Τα λανθανίδια ως αντιδραστήρια χημικής μετατόπισης NMR και η χρήση τους στην ανάλυση πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων με βιολογική δράση» Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2000.
- Κιοσέογλου, Μπλέκας, Γ., Μπόσκου, Δ., Τσιμίδου, Μ. *Εισαγωγή στην Ανάλυση Τροφίμων*, Εκδόσεις Πανεπιστημιακού Τυπογραφείου ΑΠΘ.: Θεσσαλονίκη, 2000.
- Λάγουρη, Β. Διδακτορική διατριβή. «Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής σύστασης εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*». ΑΠΘ, 1998.
- Μπόσκου, Δ. *Χημεία Τροφίμων με Στοιχεία Τεχνολογίας Τροφίμων. Μέρος 1<sup>ο</sup> Χημεία Τροφίμων*. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, 1989.
- Σωτηροπούλου Σοφία, Διπλωματική εργασία: «Αντιοξειδωτική δραστηριότητα εκχυλισμάτων φυτών της ρίγανης» ΑΠΘ, 2000.



Τμήματα της διδακτορικής διατριβής έχουν ήδη δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ή βρίσκονται στο στάδιο της εκτύπωσης.

1. **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.**  
Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M. and D. Boskou.  
*J. Agric.Food Chem.* **1998**, *46*, 4185-4192.
2. **Identification and Quantification of Caffeic and Rosmarinic Acid in Complex Plant Extracts by the Use of Variable Temperature Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.**  
Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I.P., Tsimidou, M., and D., Boskou.  
*J. Agric.Food Chem.* **2001**, *49*, 2-8.
3. **Do Strong Intramolecular Hydrogen Bonds Persist in Aqueous Solution? Variable Temperature Gradient  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  GE-HSQC and GE-HMBC NMR Studies of Flavonols and Flavones in Organic and Aqueous Mixtures.**  
Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I.P., Tsimidou, M., and D., Boskou.  
*Tetrahedron*, **2002**, υπό εκτύπωση.
4. **Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage and Summer Savory**  
Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou M., Gerothanassis LP., Troganis A. and Boskou D.  
*J. Agric.Food Chem.* **2002**, υπό εκτύπωση.

