
**Μελέτη φασμάτων NMR μίας και δύο
διαστάσεων προτύπων πολυφαινολών.
Μία πρώτη προσέγγιση προσδιορισμού
πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο.**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
Εφαρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας**

Χριστοφορίδου Στέλλα

**Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Χημείας
Ηράκλειο
Φεβρουάριος 2001**

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	i
Περίληψη	iii
Ευχαριστίες	iv
Κατάλογος Πινάκων.....	vi
Κατάλογος Σχημάτων	vii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	1
1.1 Γενικά Περί Φαινολών.....	1
1.2 Αντιοξειδωτική Δράση Πολυφαινολών	4
1.3 Θεραπευτικές Ιδιότητες Πολυφαινολών	6
1.4 Μεθοδοι Ανάλυσης Πολυφαινολών στο Παρθένο Ελαιόλαδο	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ (2D NMR)	10
2.1 Βασικές αρχές	10
2.2 Ταξινόμηση των πειραμάτων της φασματοσκοπίας 2D NMR.....	13
2.3 Coherence.....	14
2.4 Βαθμωτά πεδία	16
2.5 Φασματοσκοπία συσχέτισης ομοπυρηνικών σπιν με βαθμωτά πεδία (Gradient Correlated Spectroscopy, gCOSY)	19
2.6 Αντίστροφη φασματοσκοπία NMR (Inverse NMR spectroscopy)	22

2.7 Φασματοσκοπία συσχέτισης ετεροπυρηνικών σπιν με βαθμωτά πεδία (Gradient Correlated Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy, gHMQC)	23
--	----

2.8 Φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Enhancement).....	26
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **36**

3.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες	36
---	----

3.2 Σύνθεση της Υδροξυτυροσόλης	36
---------------------------------------	----

3.3 Προετοιμασία δειγμάτων.....	37
---------------------------------	----

3.4 Μονοδιάστατα φάσματα NMR	39
------------------------------------	----

3.5 Δισδιάστατα φάσματα NMR.....	40
----------------------------------	----

3.6 Αποτελέσματα-Συζήτηση	42
---------------------------------	----

3.7 Πολυδροξυφαινόλες	58
-----------------------------	----

3.8 Ελευρωπαΐνη.....	60
----------------------	----

3.9 Επίδραση της Συγκέντρωσης των Προτύπων Πολυφαινολών στη Χημική Μετατόπιση των Φασμάτων ^{31}P NMR.	63
--	----

3.10 Ποσοτική ανάλυση των πρότυπων πολυφαινολικών ενώσεων	64
---	----

3.11 Επαναληψιμότητα (repeatability) και αναπαραγωγικότητα (reproducibility) της μεθόδου.....	66
---	----

3.12 Φάσματα ^{31}P -NMR μειγμάτων πρότυπων πολυφαινολών του ελαιολάδου	68
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ **73**

Βιβλιογραφία	74
--------------------	----

Περίληψη

Η φωσφιτυλίωση ελεύθερων υδροξυλικών και καρβοξυλικών ομάδων σε μία σειρά πρότυπων πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχονται στο παρθένο ελαιόλαδο με 2-χλωρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο επιτρέπει την ανίχνευσή τους με βάση τις χημικές μετατοπίσεις τους στο φάσμα ^{31}P -NMR. Ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων στο φάσμα ^{31}P -NMR έγινε με την χρήση δισδιάστατων τεχνικών NMR. Επιπλέον η ολοκλήρωση των κατάλληλων σημάτων των υδροξυ- παραγώγων στα αντίστοιχα φάσματα επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των ενώσεων. Η διατριβή αυτή έχει σκοπό να επιδείξει τη δυνατότητα της φασματοσκοπίας ^{31}P -NMR στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών στα παρθένα ελαιόλαδα.

Abstract

Phosphitylation of the free hydroxyl and carboxyl groups of a series of polyphenol-containing virgin olive oil model compounds with 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyldioxaphospholane allows their detection on the basis of the ^{31}P -NMR chemical shifts. Unambiguous assignment of the ^{31}P -NMR chemical shifts of the dihydroxy- and polyhydroxy-phenols has been achieved by employing a number of two-dimensional NMR techniques. Furthermore, integration of the appropriate signals of the hydroxyl derivatives in the corresponding ^{31}P -NMR spectra allows the quantification of these compounds. This study demonstrates the potential of ^{31}P -NMR spectroscopy for the qualitative and quantitative analysis of polyphenols in virgin olive oils.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

-Τον καθ. κ. Φώτη Νταή για την ανάθεση της εργασίας αυτής και την αμέριστη συμπαράσταση, υποστήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησής της.

-Το Τμήμα Χημείας και ιδιαίτερα το ΕΠΕΑΕΚ Εφηρμοσμένης Μοριακής Φασματοσκοπίας για την επιλογή και την οικονομική υποστήριξη που μου προσέφερε.

-Τον Δρ. Απόστολο Σπύρο για τις πολύτιμες συμβουλές και συζητήσεις για τα πειράματα NMR.

-Τον καθ. κ. Ν. Χανιωτάκη για την διάθεση της ζυγαριάς ακριβείας.

-Τα μέλη του Εργαστηρίου NMR του τμήματος Χημείας για τη βοήθεια που μου προσέφεραν και για τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος.

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Χημικοί τύποι πολυφαινολών.....	2
Πίνακας 3.1 Χημικές μετατοπίσεις μονοδροξυφαινολών. Λαμβάνεται υπόψιν η αρίθμηση των πολυφαινολών και των υδροξυλίων στον πίνακα 1.1.	43
Πίνακας 3.2 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), της καρβακρόλης και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου της.....	52
Πίνακας 3.3 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), της θυμόλης και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου της.	54
Πίνακας 3.4 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), του βανιλικού οξέος και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου του.	54
Πίνακας 3.5 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), του πρωτοκατεχικού οξέος και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου του.	54
Πίνακας 3.6 Μεταβολή της χημικής μετατόπισης (ppm) του ^{13}C μετά τη φωσφιτυλίωση των ενώσεων καρβακρόλη, θυμόλη, βανιλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.	55
Πίνακας 3.7 Τιμές των σταθερών συζεύξεως $J_{C,P}$ (Hz) για τις ενώσεις καρβακρόλη, θυμόλη, βανιλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.	55
Πίνακας 3.8 Χημικές μετατοπίσεις φωσφόρου δίδροξυ- και πολυδροξυφαινολών. Λαμβάνεται υπόψιν η αρίθμηση του πίνακα 1.1.	60
Πίνακας 3.9 Ποσότητες (σε μmol) πολυφαινολών.	66
Πίνακας 3.10 Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης (μmol) της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου ^{31}P -NMR.	67
Πίνακας 3.11 Ποσοτικά αποτελέσματα (σε μmol) μείγματος μονοδροξυφαινολών.	69
Πίνακας 3.12 Ποσοτικά αποτελέσματα (σε μmol) μείγματος δίδροξυφαινολών.	69

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1.1 Οξείδωση λιπαρών οξέων.....	4
Σχήμα 1.2 Αυτοκαταλυτική οξείδωση λιπαρών οξέων.....	5
Σχήμα 1.3 Δράση του αντιοξειδωτικού AH.....	5
Σχήμα 1.4 Δομές συντονισμού των ριζών των πολυφαινολών.....	5
Σχήμα 1.5 Αντίδραση αλκοόλης με 2-γλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο.....	9
Σχήμα 2.1 Χρονικοί περίοδοι φασματοσκοπίας 2D NMR.....	11
Σχήμα 2.2 Βασικό πείραμα 2D NMR.....	12
Σχήμα 2.3 Διαμόρφωση (α) του πλάτους και (β) της φάσης του σήματος συναρτήσει του χρόνου εξέλιξης t_1	12
Σχήμα 2.4 Απεικόνιση δισδιάστατου φάσματος NMR. (α) Συστοιχία φασμάτων. (β) Διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών.....	13
Σχήμα 2.5 Ενεργειακό διάγραμμα ενός συστήματος πυρήνων AX, οι οποίοι παρουσιάζουν ασθενή σύζευξη.....	15
Σχήμα 2.6 Διάγραμμα μεταφοράς (διαδρομής) των coherences (κάτω) μιας ακολουθίας με τρεις παλμούς 90° (επάνω) Η coherence ξεκινά πάντα από το επίπεδο 0. Ο πρώτος παλμός δημιουργεί coherence τάξης $p = +1$, ο δεύτερος παλμός μετατρέπει την τάξη της coherence σε $+2$, και ο τρίτος την φέρει στην τάξη -1 , η οποία και τελικά ανιχνεύεται από τον δέκτη (R) του φασματογράφου.....	16
Σχήμα 2.7 Βαθμωτά μαγνητικά πεδία κατά μήκος του μαγνητικού πεδίου B_0 (άξονας z). Οι πυρήνες, οι οποίοι βρίσκονται σε πέντε αυθαίρετες εγκάρσιες διατομές του σωλήνα NMR υφίστανται πέντε διαφορετικά μαγνητικά πεδία: $B_0 - g_1$, $B_0 - g_2$, B_0 , $B_0 + g_1$, $B_0 + g_2$. Στη μέση του σωλήνα NMR το πεδίο είναι ομοιογενές, επειδή $g_3 = 0$. ν_1 έως ν_5 είναι οι συχνότητες Larmor των πυρήνων στις πέντε εγκάρσιες διατομές.....	17
Σχήμα 2.8 Συμπεριφορά της οριζόντιας μαγνήτισης πυρήνων υπό την επίδραση βαθμωτών πεδίων. (α) Οι πυρήνες στις πέντε εγκάρσιες διατομές υφίστανται το ομοιογενές μαγνητικό πεδίο B_0 . Οι οριζόντιες συνιστώσες της μαγνήτισης, M_n , περιστρέφονται με την ίδια συχνότητα Larmor, ν_0 . (β) Τα άνυσματα M_n των πυρήνων στις πέντε διατομές περιστρέφονται με διαφορετικές συχνότητες λόγω της επίδρασης των βαθμωτών πεδίων. Οι κατευθύνσεις των περιστροφών ως προς το σύστημα αναφοράς υποδεικνύονται με τα μικρά βέλη εκτός των ελλείψεων. (γ) Το άνυσμα της συνολικής οριζόντιας μαγνήτισης M_y στο επίπεδο (xy). (δ) Προβολές των ανυσμάτων M_n στο επίπεδο (xy).....	18
Σχήμα 2.9 Ακολουθία παλμών gCOSY ομοπυρηνικού συστήματος σπιν. Οι παλμοί $(90^\circ)_x$ απεικονίζονται με ορθογώνια παραλληλόγραμμα, ενώ οι παλμοί βαθμωτών πεδίων με σκιασμένα παραλληλόγραμμα. Στο κάτω μέρος απεικονίζεται το	

διάγραμμα διαδρομής των coherences ενός κβάντου. Με R συμβολίζεται ο δέκτης του φασματόμετρου NMR.....	20
Σχήμα 2.10 Φάσμα H,H gCOSY της ελευρωπαΐνης.....	21
Σχήμα 2.11 Ακολουθία παλμών με βαθμωτά πεδία, gHMQC και αποσύζευξη των ετεροπυρήνων με την ακολουθία GARP. Στο κάτω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το διάγραμμα των διαδρομών των coherences που δημιουργούνται από τους παλμούς της ακολουθίας και επιλέγονται από τα βαθμωτά πεδία.	23
Σχήμα 2.12 Φάσμα H,C-gHMQC της ελευρωπαΐνης	26
Σχήμα 2.13 Ενεργειακά επίπεδα και πιθανότητες μετάπτωσης ενός συστήματος δύο πυρήνων I και S. Τα σύμβολα α, β υποδηλώνουν αντίστοιχα παράλληλη και αντιπαράλληλη κατεύθυνση της μαγνητικής ροπής των πυρηνικών σπιν ως προς την ένταση του εξωτερικού πεδίου B ₀	28
Σχήμα 2.14 Ανακατανομή των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες μετά την ακτινοβόληση του πρωτονίου S.....	29
Σχήμα 2.15 Παλμική ακολουθία της μεθόδου transient NOE.	32
Σχήμα 2.16 Παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY.....	33
Σχήμα 2.17 Φάσμα H,H NOESY της στρυχνίνης.....	33
Σχήμα 2.18 Παλμική ακολουθία HOESY.....	34
Σχήμα 2.19 Ανυσματικό διάγραμμα της ακολουθίας παλμών HOESY	35
Σχήμα 3.1 Παρασκευή υδροξυτυροσόλης	37
Σχήμα 3.2 Διάσπαση κορεσμένων καρβοξυλικών οξέων.....	38
Σχήμα 3.3 Αντίδραση μετεστεροποίησης (transesterification) μεταξύ του αντιδραστηρίου φωσφόρου I και ενός α-υδροξυοξέος.....	38
Σχήμα 3.4 Φάσμα P,P-gCOSY του πρωτοκατεχικού οξέος.	44
Σχήμα 3.5 Μονοδιάστατα φάσματα ³¹ P-NMR των φωσφιτυλιωμένων ενώσεων (α) καφεϊκό οξύ, (β) πρωτοκατεχικό οξύ, (γ) υδροξυτυτροσόλη και (δ) ομοπρωτοκατεχικό οξύ, όπου φαίνεται η σταδιακή μετατόπιση του φάσματος από AX σε AB.	45
Σχήμα 3.6 Φάσμα P,P-gCOSY του γαλλικού οξέος.	46
Σχήμα 3.7 Φάσμα H,H-gCOSY του πρωτοκατεχικού οξέος.	47
Σχήμα 3.8 Φάσμα H,H-gCOSY του σικιμικού οξέος.....	48
Σχήμα 3.9 H,H-gCOSY της καρβακρόλης.....	49
Σχήμα 3.10 Φάσμα H,P-gHMQC του πρωτοκατεχικού οξέος.	50
Σχήμα 3.11 Φάσμα H,P-gHMQC του σικιμικού οξέος.	51
Σχήμα 3.12 Φάσμα H,C-gHMQC της φωσφιτυλιωμένης καρβακρόλης.....	53
Σχήμα 3.13 Φάσμα H,P-HOESY του πρωτοκατεχικού οξέος.	57
Σχήμα 3.14 Μονοδιάστατα ³¹ P-NMR φάσματα των πολυφαινολών κερκετίνη, απιγενίνη και καμφορόλη.	59
Σχήμα 3.15 Σύγκριση συζευγμένου ³¹ P- ¹ H φάσματος ³¹ P-NMR (πάνω) με το αποσυζευγμένο (³¹ P- ¹ H) φάσμα ³¹ P-NMR (κάτω) της ελευρωπαΐνης.	61

Σχήμα 3.16 Φάσμα H,H-gCOSY της φωσφιτυλιωμένης ελευρωπαϊνης	62
Σχήμα 3.17 Φάσμα H,P-gHMQC της ελευρωπαϊνης.....	63
Σχήμα 3.18 Μεταβολή της έντασης του σήματος NMR ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της πολυφαινόλης. Παρουσιάζονται τα φάσματα του σικιμικού οξέος με συγκέντρωση (α) 0.0175 M, (β) 0.01 M, και (γ) 0.00375 M.....	64
Σχήμα 3.19 Διάγραμμα της ποσότητας της κάθε πρότυπης ένωσης όπως υπολογίστηκε μέσω της ολοκλήρωσης των σημάτων φωσφόρου των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων ως προς την πραγματική συγκέντρωση.	65
Σχήμα 3.20 Μονοδιάστατο φάσμα ³¹ P-NMR μείγματος προτύπων μονοϋδροξυφαινολών (α) Σιναπικό οξύ, (β) Συριγγικό οξύ, (γ) 3-ϋδροξυ-4-μέθοξυ κινναμικό οξύ, (δ) Ομοβανιλικό οξύ, (ε) Φερουλικό οξύ, (ζ) Βανιλικό οξύ, (η) ο-κουμαρικό οξύ, (θ) p-ϋδροξυφαινυλοξικό οξύ, (ι) p-κουμαρικό οξύ, (κ) p-ϋδροξυβενζοϊκό οξύ.....	68
Σχήμα 3.21 Μονοδιάστατο φάσμα ³¹ P-NMR μείγματος προτύπων πολυϋδροξυφαινολών. (E) ελευρωπαϊνη, (Σ) Σικιμικό οξύ, (Y) Υδροξυτυροσόλη (T) Τυροσόλη, (Γα) Γαλλικό οξύ, (K) Καφεϊκό οξύ, (Π) Πρωτοκατεχικό οξύ, (Γ) Γεντιστικό οξύ.	70
Σχήμα 3.22 Σχέση της συγκέντρωσης της κάθε πρότυπης ένωσης των μειγμάτων πολυφαινολών όπως υπολογίστηκε μέσω της ολοκλήρωσης των σημάτων φωσφόρου των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων ως προς την πραγματική συγκέντρωση.....	71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

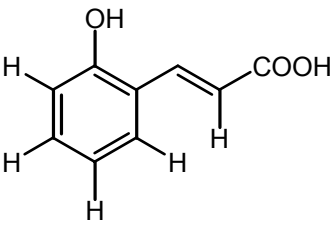
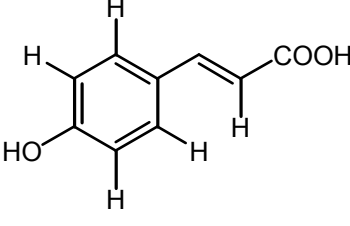
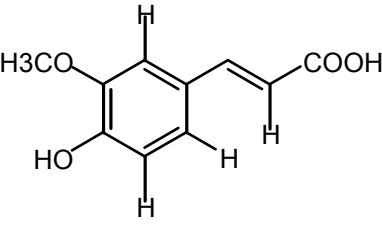
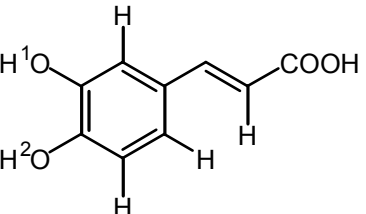
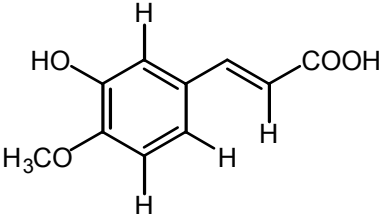
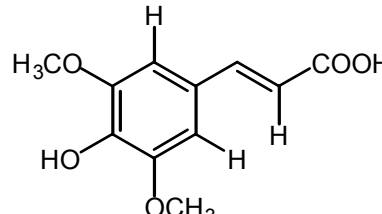
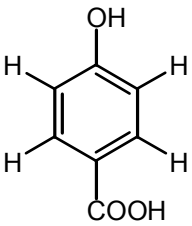
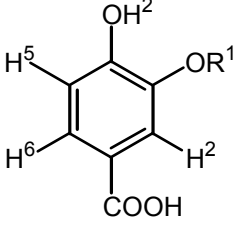
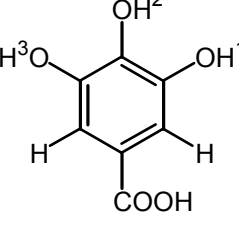
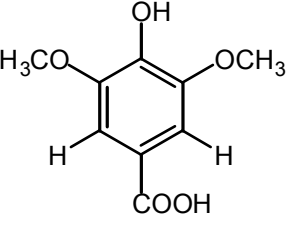
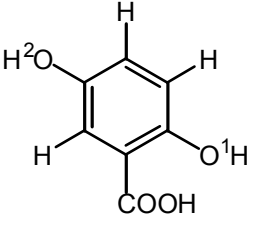
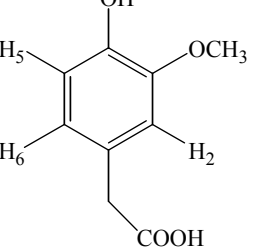
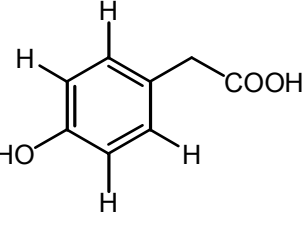
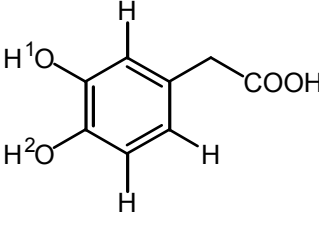
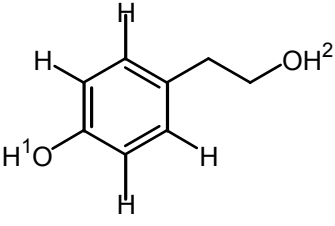
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

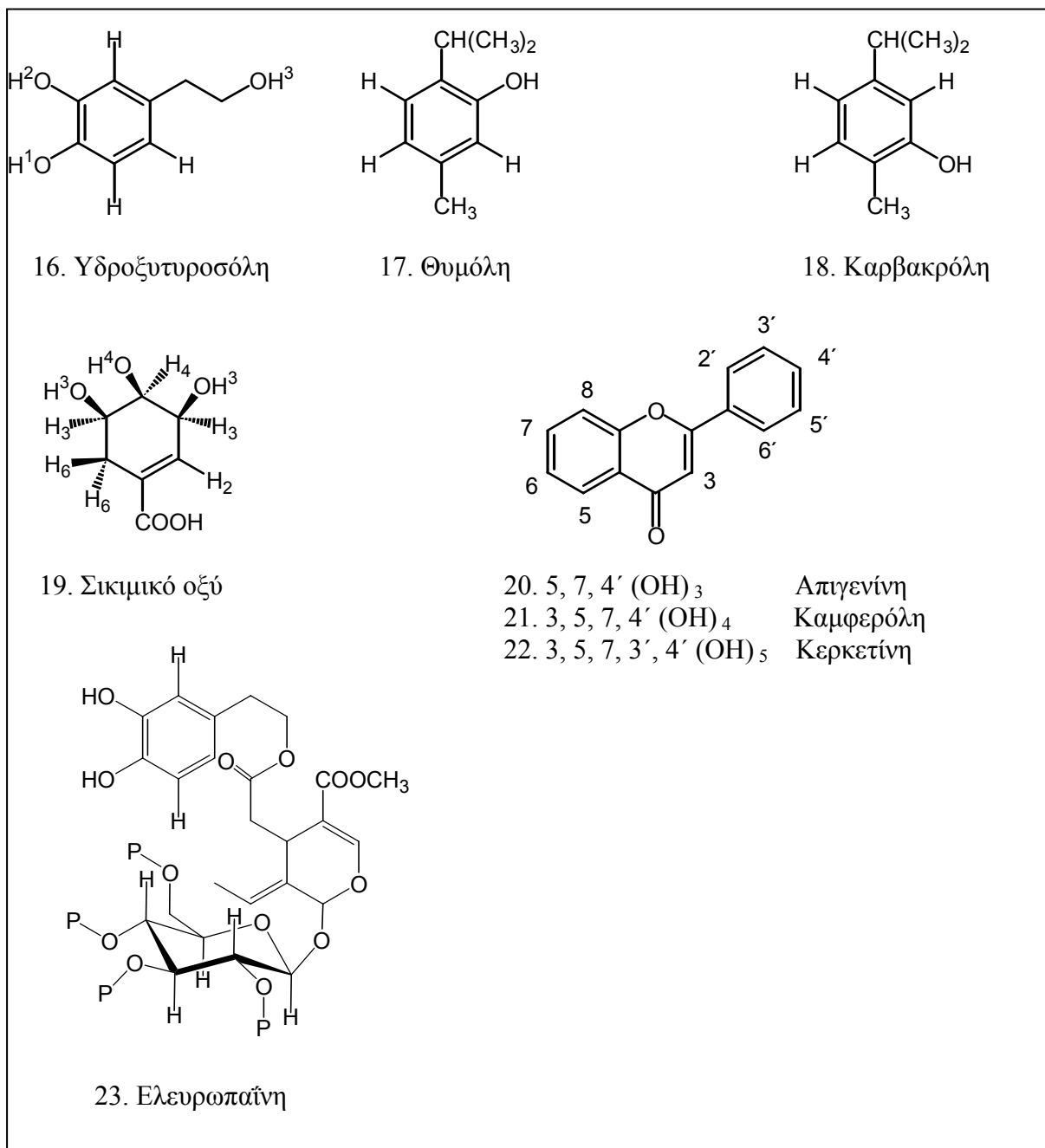
1.1 Γενικά Περί Φαινολών

Βασικό συστατικό της μεσογειακής δίαιτας είναι το ελαιόλαδο. Η διατροφική του αξία οφείλεται κυρίως στη σύστασή του σε λιπαρά οξέα, τα οποία κατά το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούνται από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (ελαϊκό οξύ).¹ Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα δεν είναι ζημιογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό όπως τα κορεσμένα λιπαρά οξέα και δεν οξειδώνονται σε υπεροξειδία με μεγάλες ταχύτητες, όπως τα πολυακόρεστα (η ταχύτητα οξείδωσης αυξάνεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών). Παρ'όλα αυτά η σταθερότητα του ελαιολάδου στην οξειδωτική δράση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, δεν εξηγείται μόνο από τη σύστασή του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, την ύπαρξη τοκοφερολών (βιταμίνη E) και καροτενοειδών. Το ελαιόλαδο περιέχει και άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες, τις πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες, οι οποίες περιέχονται στο ελαιόλαδο σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από άλλα λάδια,² προστατεύουν τα λιπαρά οξέα από την οξείδωση, ενώ δρουν ευεργετικά στον οργανισμό του ανθρώπου. Η πολυφαινολική σύσταση του ελαιολάδου συντελεί στην σταθερότητά του και στην αυξημένη διάρκεια διατήρησης της ποιότητάς του, είτε κατά την αποθήκευση, είτε κατά την παραμονή του στα ράφια των καταστημάτων.

Φαινολικές ενώσεις ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο ο οποίος περιέχει απευθείας ενωμένες μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Έχουν βρεθεί περισσότερες από 4000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις στα φυτά. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες.³ Οι φαινολικές ενώσεις, ελεύθερες ή εστεροποιημένες, περιέχονται στο πολικό μέρος του ελαιολάδου, το οποίο λαμβάνεται με εκχύλιση με μείγμα μεθανόλης-νερού. Έχουν απομονωθεί περισσότερες από 20 πολυφαινόλες (πίνακας 1.1) από τους διάφορους τύπους ελαιολάδου. Στο λάδι ο όρος πολυφαινόλες χρησιμοποιείται συμβατικά εφόσον, ως επί το πλείστον, αυτές οι ενώσεις δεν περιέχουν στο μόριο τους περισσότερες από 1-2 υδροξυλομάδες. Το κύριο πολυφαινολικό συστατικό του ελαιολάδου είναι η ελευρωπαΐνη, ένας εστέρας του ελενολικού οξέος με την 3,4-διυδροξυφαινολαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη). Άλλες πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο είναι τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (ο-κουμαρικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ,

Πίνακας 1.1 Χημικοί τύποι πολυφαινολών

		
1. ο-Κουμαρικό οξύ	2. p-Κουμαρικό οξύ	3. Φερουλικό οξύ
		
4. Καφεϊκό οξύ	5.3-Υδροξύ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ	6. Σιναπικό οξύ
		
7. p-Υδροξύβενζοϊκό οξύ	8. R=CH ₃ Βανιλικό οξύ 9. R=H Πρωτοκατεχικό οξύ	10. Γαλλικό οξύ
		
11. Συριγγικό οξύ	12. Γεντιστικό οξύ	24. Ομοβανιλλικό οξύ
		
13. p-Υδροξυφαινολοξικό οξύ	14. Ομοπρωτοκατεχικό οξύ	15. Τυροσόλη

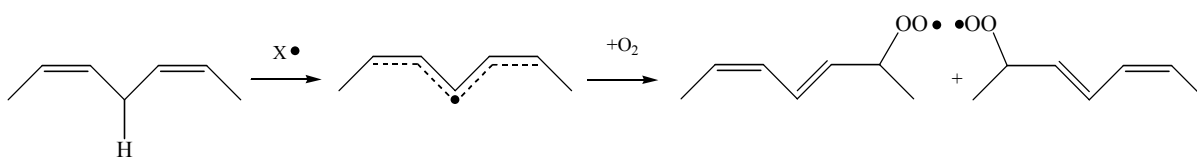


καφεϊκό οξύ, σιναπτικό οξύ, 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ), τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, γεντιστικό οξύ), φαινολικές αλκοόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη), το σικιμικό οξύ, παράγωγα του φαινυλοξικού οξέος (p-φαινυλοξικό), και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη, και κερκετίνη. Οι φαινολικές ουσίες είναι ευαίσθητες στο φως και την υψηλή θερμοκρασία, ενώ έχουν αντιοξειδωτική δράση, λόγω του φαινολικού τους δακτυλίου (παγίδες ριζών).

Ο υψηλός δείκτης συσχετισμού μεταξύ των πολυφαινολών και των γευστικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου είχε διαπιστωθεί από τον Gutierrez-Gonzalez και τους

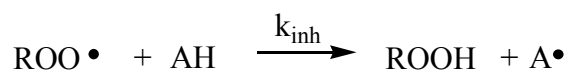
πενταδιενική διάταξη δεν υπάρχει στο ελαϊκό οξύ, αλλά εμφανίζεται δύο φορές στο λινολενικό οξύ και τρεις φορές στο αραχιδονικό οξύ. Η αναλογία του ρυθμού οξειδωσης των μεθυλεστέρων του ελαϊκού οξέος, του λινολενικού οξέος, και του αραχιδονικού οξέος μελετήθηκε και βρέθηκε ότι είναι 1:12:25.¹³ Επίσης, τα ελεύθερα ακόρεστα οξέα οξειδώνονται τουλάχιστον δύο φορές γρηγορότερα από ότι οι αντίστοιχοι εστέρες τους.

Κατά την θεωρία της αυτοκαταλυτικής οξειδώσεως των λιπαρών οξέων, η ρίζα δρα στον λιγότερο ισχυρό δεσμό C-H, ο οποίος στα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ο διαλλυλικός δεσμός C-H (ενέργειες δεσμών C-H, kcal/mole: βινυλικός 108, αλειφατικός 92-98, αλλυλικός 85, διαλλυλικός 75)³ σύμφωνα με το σχήμα 1.2.¹⁴ Η ρίζα που σχηματίζεται είναι σταθερή λόγω δομών συντονισμού.



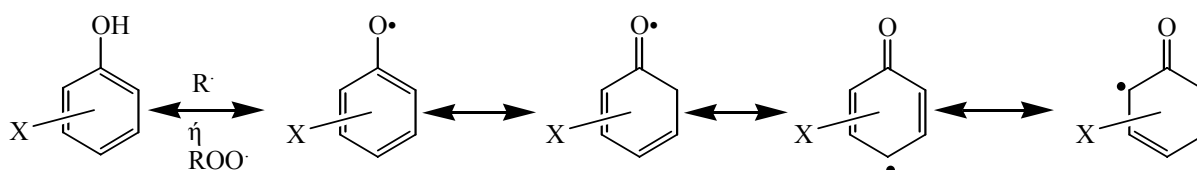
Σχήμα 1.2 Αυτοκαταλυτική οξείδωση λιπαρών οξέων

Το οξειδωτικό τάγισμα είναι αυτοκαταλυόμενη αντίδραση, αφού για κάθε υπεροξειδίο που σχηματίζεται, δημιουργείται και μία νέα ελεύθερη ρίζα σε ένα άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ. Έτσι, αν έχουμε συνεχή τροφοδοσία σε οξυγόνο, όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου θα μετατραπούν τελικά σε υπεροξειδία λιπαρών οξέων. Τον περιορισμό της οξειδωτικής δράσης του οξυγόνου προκαλούν οι αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες του λιπαρού οξέος δημιουργώντας αντίστοιχες ρίζες στο μόριό τους όπως φαίνεται στο σχήμα 1.3.



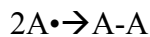
Σχήμα 1.3 Δράση του αντιοξειδωτικού AH

Μία ουσία για να είναι καλό αντιοξειδωτικό πρέπει (α) να παγιδεύει τις ρίζες ταχύτατα (η k_{inh} στην αντίδραση του σχήματος 1.3 να είναι μεγάλη) και (β) να μπορεί να πολυμεριστεί αντιδρώντας με μία άλλη ρίζα αντιοξειδωτικού, ή να αναχθεί ώστε να αναπαράγει το αντιοξειδωτικό.¹⁵ Οι φαινόλες έχουν σταθερές ρίζες λόγω των πολλών δομών συντονισμού που εμφανίζουν, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.4.



Σχήμα 1.4 Δομές συντονισμού των ριζών των πολυφαινολών.

Οι ελεύθερες ρίζες των αντιοξειδωτικών δεν παίρνουν μέρος στην αλυσιδωτή αντίδραση της ταγγίσεως γιατί αδρανοποιούνται μέσω διμερισμού ή άλλων αντιδράσεων. Έτσι αναγεννώνται κατά το ήμισυ ή σχηματίζουν διμερή παράγωγα σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Μεταξύ των φυσικών αντιοξειδωτικών εξέχουσα θέση έχουν οι φαινολικές ουσίες με υδροξύλια στην όρθο- ή πάρα- θέση του δακτυλίου τους επειδή συμμετέχουν επιπλέον δομές συντονισμού στις οποίες η ρίζες εμφανίζονται στα όρθο και πάρα υδροξύλια.¹⁶

Τα αντιοξειδωτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις χαρακτηρίζονται από προοξειδωτική δράση κατά την οποία επιταχύνεται η καταστροφή σημαντικών βιολογικών μορίων, όπως το DNA, υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες. Η *in vivo* προοξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών διαφέρει από την *in vitro*. Για παράδειγμα, η προοξειδωτική δράση *in vivo* της α-τοκοφερόλης αναιρείται από το ασκορβικό οξύ που υπάρχει στον οργανισμό. Έτσι, ενώ στις *in vitro* διαδικασίες έχει αποδειχθεί η προοξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, στις *in vivo* διαδικασίες η προοξειδωτική δράση είναι σχεδόν αμελητέα.¹⁴ Η αντιοξειδωτική και η προοξειδωτική δραστηριότητα πολλών από τις πολυφαινόλες που μελετώνται σε αυτή την εργασία έχει αποδειχθεί *in vitro*.^{17,18,19,20,21} Η *in vivo* όμως προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών δεν έχει αποδειχθεί.

1.3 Θεραπευτικές Ιδιότητες Πολυφαινολών

Οι αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών δεν συντελεί μόνο στην σταθερότητα του παρθένου ελαιόλαδου, αλλά είναι υπεύθυνη και για τις θεραπευτικές ιδιότητες τους στον ανθρώπινο οργανισμό.²²

Η μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης λόγω της παρουσίας πολυφαινολών έχει μελετηθεί *in vivo*.²³ Είναι γνωστό ότι η μείωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας LDL (“κακή” χοληστερόλη) και η αύξηση της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας HDL (“καλή” χοληστερόλη) εμποδίζουν μια σειρά από ασθένειες όπως η θρόμβωση, η αρτηριοσκλήρωση, το έμφραγμα, και το ήπιο εγκεφαλικό επεισόδιο. Το ελάχιστο των τριγλυκεριδίων ως εκατοστιαίο ποσοστό απαντά στην HDL, η οποία μεταφέρει και τοποθετεί την χοληστερίνη στο ήπαρ για την αποικοδόμηση της και έτσι αποτρέπει τη συσσώρευση χοληστερίνης στον οργανισμό. Η μέγιστη ποσοστιαία αναλογία φωσφολιπιδίων και χοληστερίνης απαντά στην LDL, η οποία είναι υπεύθυνη για την διακίνηση του 60-70% του συνόλου της χοληστερίνης. Όταν η ποσότητα της χοληστερόλης έχει φτάσει σε υψηλά σημεία σταματάει η παραγωγή LDL και έτσι τα επίπεδα μη δεσμευμένης χοληστερόλης στο αίμα αυξάνονται επικίνδυνα. Σε *in vivo* μελέτες έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες που προέρχονται από το παρθένο ελαιόλαδο εμποδίζουν αποτελεσματικά την οξείδωση της LDL και αυξάνουν την παραγωγή του

αγγειοδιασταλτικού παράγοντα NO (μονοξειδίου του αζώτου), το οποίο επίσης εμποδίζει την οξείδωση της LDL. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά τα οποία προέρχονται από το λάδι ωφελούν το καρδιαγγειακό σύστημα του ανθρώπου.^{24,25} Επίσης έχει βρεθεί ότι τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες, όπως το παρθένο ελαιόλαδο, μειώνουν την επιδεκτικότητα οξείδωσης της LDL,²⁶ στην οποία οφείλεται η αρτηριοσκλήρωση.²⁷

Σε πειράματα *in vivo* έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση ελαιολάδου μειώνει την απαίτηση για φάρμακα υπερτασικών ατόμων λόγω της πιθανής αύξησης των επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου που προκαλείται από τις πολυφαινόλες.²⁸ Πιο συγκεκριμένα η ελευρωπαΐνη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αύξηση στα επίπεδα NO η οποία πιστεύεται ότι είναι ευεργετική στην προστασία των κυττάρων και του οργανισμού.²⁹

In vivo έχει αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη, καμφερόλη και κερκετίνη, οι οποίες υπάρχουν στο ελαιόλαδο, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες σχετιζόμενες με καρδιαγγειακές παθήσεις και τον καρκίνο.^{30,31,32} Η υδροξυτυροσόλη του ελαιολάδου προστατεύει τα ερυθροκύτταρα³³ και τα κύτταρα Caco-2^{34,35} από οξειδωτικές βλάβες, εμποδίζει την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων (θρόμβωση), ενώ έχει αποδειχθεί *in vitro* η βιοδιαθεσιμότητα της.³⁶

Τέλος, κλινικά πειράματα έχουν δείξει ότι η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή δράση με συνέπεια να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπευτική αγωγή κατά των εντερικών μολύνσεων και για μολύνσεις της αναπνευστικής οδού.³⁷ Επίσης αντιβακτηριακή δράση έχουν τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέος.³⁸

1.4 Μέθοδοι Ανάλυσης Πολυφαινολών στο Παρθένο Ελαιόλαδο

Για τους λόγους που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, υπάρχει τα τελευταία χρόνια μια αξιοσημείωτη δραστηριότητα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων με στόχο την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο και την εκτίμηση των χαρακτηριστικών επιπέδων πολυφαινολών τα οποία δικαιολογούν τη σημαντική σταθερότητα του παρθένου ελαιολάδου.

Επί δύο δεκαετίες (1969-1978), για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο χρησιμοποιούνταν η χρωματογραφία χάρτου και/ή η χρωματογραφία στήλης. Οι μέθοδοι αυτοί παρουσίαζαν το μειονέκτημα ότι δεν ήταν εξειδικευμένες και προσδιόριζαν τη συνολική ποσότητα πολυφαινολών. Επίσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πολυφαινολών στο ελαιόλαδο η χρωματομετρική μέθοδος με UV, έπειτα από προσθήκη στο πολικό μέρος του ελαιολάδου του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, και της ποσότητας των όρθο-διφαινολών έπειτα από προσθήκη του αντιδραστηρίου Arnou.³⁹ Αυτές οι μέθοδοι είναι απλές και απαιτούν λίγα αντιδραστήρια, αλλά έχουν μικρή εξειδίκευση αφού η παρουσία οποιοδήποτε αναγωγικής ουσίας μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση. Η μέθοδοι Folin-Ciocalteu ή Arnou προσφέρουν μόνο ποσοτική πληροφορία για τις συνολικές πολυφαινόλες και όρθο-διφαινόλες στο ελαιόλαδο. Ένας ουσιαστικός

περιορισμός της μεθόδου Folin-Ciocalteu είναι ο μεγάλος αριθμός των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο.

Από το 1980, έγιναν σημαντικές προσπάθειες ανάπτυξης περισσότερο εξειδικευμένων μεθόδων ανίχνευσης πολυφαινολών όπως η αέρια χρωματογραφία^{40,41} (GC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διάφορους τύπους ανιχνευτών.⁴²

Η ανάλυση πολυφαινολών⁴³ με HPLC και ανιχνευτή UV η οποία είναι και η πιο διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού είναι πολύ ευαίσθητη και εξειδικευμένη με όριο ανίχνευσης της τάξης των ng. Παρουσιάζει όμως ορισμένα μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα απαιτείται προηγούμενη κατεργασία του δείγματος, βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα διαλύματα, ανίχνευση περιορισμένου αριθμού πολυφαινολών και μεγάλη διάρκεια ανάλυσης. Επίσης, δεν έχουν προσδιοριστεί όλες οι κορυφές του πολικού μέρους του ελαιολάδου στο χρωματογράφημα HPLC και έτσι μερικές από αυτές δεν μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, αφού δεν είναι γνωστή η κατάλληλη πρότυπη ουσία. Η μέθοδος HPLC έχει χρησιμοποιηθεί και με ανιχνευτή DAD (Diode Array Detector) καθώς και με ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάλυσης HPLC με τους τρεις προηγούμενους ανιχνευτές,⁴⁴ έχει δείξει ότι ο ανιχνευτής UV με μεταβλητό μήκος κύματος είναι ο πιο κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση. Ο ανιχνευτής DAD φαίνεται πιο κατάλληλος για τη λήψη πληροφοριών για άγνωστα πολυφαινολικά συστατικά, ενώ για τις ευαίσθητες πολυφαινόλες (τις πολυφαινόλες οι οποίες οξειδώνονται εύκολα) είναι πιο κατάλληλη η χρήση ηλεκτροχημικών ανιχνευτών.

Μια άλλη μεθοδολογία ανάλυσης πολυφαινολών συνδυάζει την υγρή⁴⁵ και αέρια⁴⁶ χρωματογραφία με τον φασματογράφο μάζας (LC-MS και GC-MS). Αυτή η μέθοδος είναι περισσότερο επιλεκτική και ευαίσθητη από τις προηγούμενες μεθόδους, αλλά παρουσιάζει τα ίδια σχεδόν μειονεκτήματα. Τελευταία έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολυφαινολών και ιδιαίτερα της ελευρωπαΐνης η φασματοσκοπία μάζας με την τεχνική ion-spray⁴⁷ και την τεχνική χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση.⁴⁸

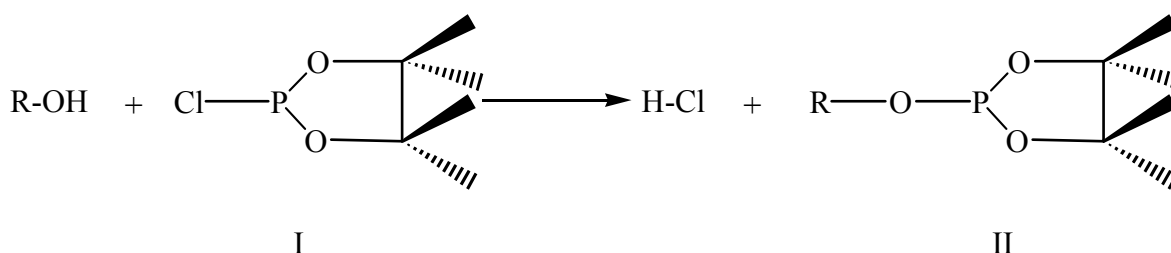
Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο, τα τελευταία δύο χρόνια έχει γίνει μία προσπάθεια χρήσης ηλεκτροχημικών μεθόδων, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τη μέθοδο HPLC-DAD. Οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούν ηλεκτρόδια μίας χρήσης (screen printed), όπως η SPE-DPV (disposable screen-printed sensor coupled with differential pulse voltametry) η οποία βασίζεται σε ηλεκτρόδιο γραφίτη, (graphite-based ink), και ο βιοαισθητήρας τυροσινάσης.^{49,50} Η πρώτη μέθοδος είναι ταχεία και αρκετά φθηνή, αλλά απαιτεί βαθμονόμηση. Η δεύτερη μέθοδος είναι γρήγορη, εύκολη, έχει εξειδίκευση και ευαισθησία, όμως υπάρχει ο κίνδυνος απενεργοποίησης του ενζύμου (enzyme inactivation) και δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό φαινολών με κατελιμμένη την ο- ή τη m- θέση ως προς το υδροξύλιο.⁵¹

Η φασματοσκοπία NMR εμφανίζεται μόλις το 1996 ως αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο.^{52,53} Η προσπάθεια ανίχνευσης πολυφαινολών με τη φασματοσκοπία NMR του πυρήνα άνθρακα-13 ήταν μάλλον απογοητευτική. Η χαμηλή φυσική αφθονία (μόλις 1,1%) και η χαμηλή ευαισθησία του πυρήνα άνθρακα-13 δεν επέτρεψαν την ανίχνευση άλλων πολυφαινολών, εκτός από την

τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, οι οποίες κυριαρχούν ποσοτικά των άλλων πολυφαινολών στο ελαιόλαδο. Επίσης, για τους ίδιους λόγους, η διάρκεια του πειράματος (3-4 ώρες) ήταν μάλλον απαγορευτική σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης. Η φασματοσκοπία NMR πρωτονίου δεν έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο, προφανώς λόγω της μικρής περιοχής συχνοτήτων που εμφανίζει το πρωτόνιο (10 ppm) και της πολυπλοκότητας των φασμάτων NMR λόγω της σύζευξης σπιν-σπιν.

Σε αντίθεση με τον πυρήνα άνθρακα-13, ο πυρήνας φώσφορος-31 είναι περισσότερο ευαίσθητος με φυσική αφθονία 100%. Επίσης, η μεγάλη περιοχή χημικών μετατοπίσεων που παρουσιάζει σε σχέση με τον πυρήνα άνθρακα-13 (τουλάχιστον πέντε φορές μεγαλύτερη), ευνοεί την αύξηση της διακριτικής ικανότητας των φασμάτων NMR. Συνεπώς, οι ιδιότητες του πυρήνα φώσφορος-31 σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR, καθιστούν την τελευταία μια πολλά υποσχόμενη αναλυτική τεχνική για την ανάλυση, όχι μόνον των πολυφαινολών, αλλά και άλλων συστατικών του παρθένου ελαιόλαδου (π.χ. ελεύθερα οξέα, αλειφατικές αλκοόλες, τοκοφερόλες, στερόλες, αλδεύδες, μόνο- και διγλυκερίδια).⁵⁵

Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί μια νέα αναλυτική τεχνική ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια, αλδεϋδικές ομάδες) με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο (I), σύμφωνα με την αντίδραση του σχήματος 1.5 και τη



Σχήμα 1.5 Αντίδραση αλκοόλης με 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο.

χρήση της φασματοσκοπίας NMR του πυρήνα φώσφορος-31 για την ταυτοποίηση των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων (II). Η αντίδραση γίνεται σε ήπιες συνθήκες (εντός του σωλήνα NMR σε θερμοκρασία δωματίου), είναι ποσοτική και ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 30 λεπτά. Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος σε σχέση με ένα εσωτερικό πρότυπο (κυκλοεξανόλη).^{54,55}

Αυτή η εργασία στόχο έχει τον προσδιορισμό της χημικής μετατόπισης των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων των πολυφαινολών οι οποίες έχει βρεθεί ότι υπάρχουν στο ελαιόλαδο. Αυτό θα επιτρέψει την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στο φάσμα ³¹P-NMR του ελαιόλαδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

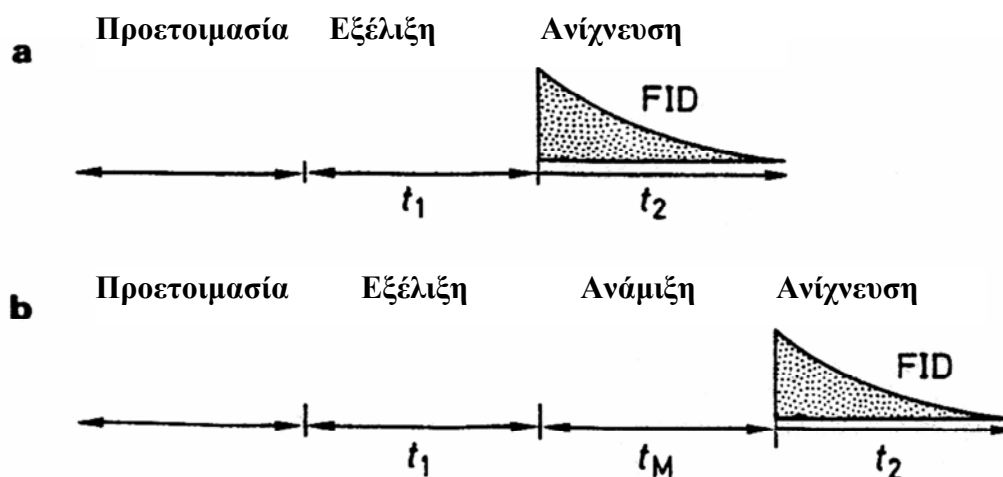
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ (2D NMR)

Η φασματοσκοπία 2D NMR αποτελεί τη πιο σημαντική εξέλιξη της φασματοσκοπίας NMR, η οποία τα 25 τελευταία χρόνια άλλαξε ριζικά τη θεωρητική και πειραματική βάση της συμβατικής φασματοσκοπίας. Η τεχνική 2D NMR ξεκίνησε από μια ιδέα του Βέλγου φυσικού Jeener, η οποία παρουσιάστηκε στο συνέδριο Ampere, το 1971 και αναπτύχθηκε σε σημαντικό βαθμό από τους R. R. Ernst (βραβείο Νόμπελ 1991) και R. Freeman. Σήμερα η φασματοσκοπία 2D NMR περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως για τον ευχερή και ταχύ προσδιορισμό φασματικών παραμέτρων. Παράλληλα, άνοιξε το δρόμο για την ανακάλυψη νέων αντιλήψεων για τη ιδιότητες των πυρηνικών συστημάτων σπιν.

2.1 Βασικές αρχές

Ένα πείραμα της φασματοσκοπίας 2D NMR χαρακτηρίζεται από ένα συνδυασμό ή ακολουθία παλμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν ορισμένα χρονικά διαστήματα ή χρόνους αναμονής.^{56,57} Το είδος της ακολουθίας των παλμών που χρησιμοποιείται προσδιορίζει το είδος της πληροφορίας που θα μας δώσει το δισδιάστατο φάσμα. Σε γενικές γραμμές ένα 2D NMR πείραμα περιλαμβάνει τρεις βασικές χρονικές περιόδους: (α) την περίοδο προετοιμασίας, (β) την περίοδο εξέλιξης και (γ) την περίοδο ανίχνευσης. Κάθε μια από τις περιόδους χαρακτηρίζεται από μια χρονική διάρκεια, τον χρόνο προετοιμασίας, T , τον χρόνο εξέλιξης, t_1 , και τον χρόνο ανίχνευσης, t_2 , αντίστοιχα (σχήμα 2.1α). Σε ορισμένα 2D NMR πειράματα, πριν την περίοδο ανίχνευσης, προστίθεται μια τέταρτη περίοδος, η περίοδος ανάμιξης με χρονική διάρκεια τον χρόνο ανάμιξης, t_m (σχήμα 2.1β).

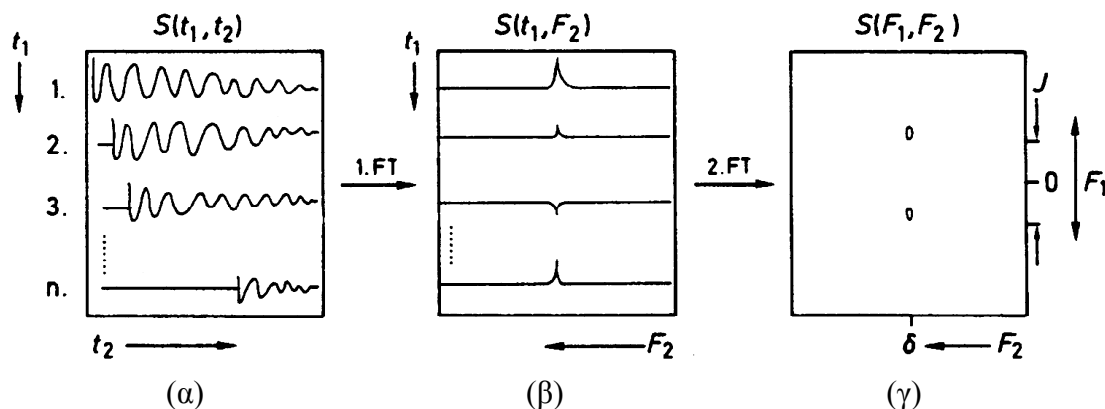
Κατά την περίοδο προετοιμασίας, το σύστημα σπιν προετοιμάζεται για το πείραμα. Συνήθως κατά την περίοδο προετοιμασίας το σύστημα βρίσκεται στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας. Η περίοδος της εξέλιξης ξεκινά συνήθως με ένα παλμό, ο οποίος διαταράσσει το σύστημα από την κατάσταση ισορροπίας. Μετά την παύση του παλμού, το σύστημα αναπτύσσεται (εξελίσσεται) για χρονικό διάστημα t_1 υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως π. χ. μεταπτωτική κίνηση με τη συχνότητα Larmor, σύζευξη σπιν-σπιν. Μετά το πέρας της περιόδου εξέλιξης, το σήμα ανιχνεύεται κατά την περίοδο της ανίχνευσης σε χρόνο t_2 .



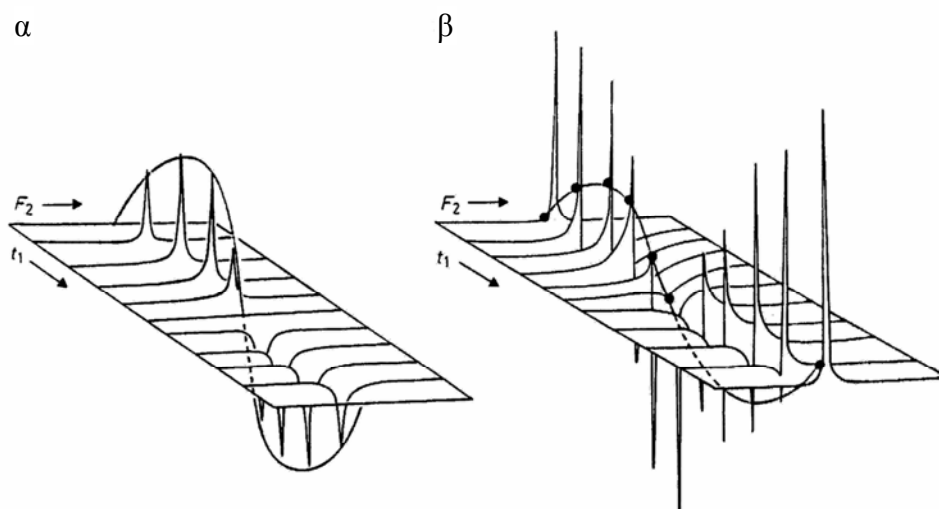
Σχήμα 2.1 Χρονικοί περίοδοι φασματοσκοπίας 2D NMR.

Η εξάρτηση του σήματος από δύο χρονικές περιόδους t_1 και t_2 συνιστά το δισδιάστατο πείραμα. Αυτή η εξάρτηση προκύπτει πειραματικά, εάν επαναληφθεί η ακολουθία παλμών του σχήματος 2.1α, αυξάνοντας τον χρόνο t_1 κατά σταθερά χρονικά διαστήματα Δt_1 , δηλαδή κατά $t_1 + n\Delta t_1$ ($n = 1, 2, 3, \dots$). Για κάθε τιμή $t_1 + n\Delta t_1$ μετράται η εξάρτηση του σήματος από τον χρόνο t_2 κατά την περίοδο της ανίχνευσης. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται μια σειρά από n FIDs, οι οποίες εξαρτώνται από τους χρόνους $t_1 + n\Delta t_1$ και t_2 (σχήμα 2.2α). Αυτή η εξάρτηση του σήματος στο χώρο του χρόνου συμβολίζεται συνήθως ως $S(t_1 + n\Delta t_1, t_2)$. Το δισδιάστατο φάσμα λαμβάνεται με ένα διπλό μετασχηματισμό Fourier του σήματος $S(t_1 + n\Delta t_1, t_2)$. Συνήθως, γίνεται πρώτα ο μετασχηματισμός ως προς τον άξονα του χρόνου t_2 , ο οποίος παρέχει τη συνάρτηση $S(t_1 + n\Delta t_1, \nu_2)$. Αυτή η συνάρτηση αντιπροσωπεύει μια σειρά από μονοδιάστατα φάσματα, τα σήματα των οποίων διαμορφώνονται κατά πλάτος και φάση (σχήμα 2.2β). Η διαμόρφωση του πλάτους και της φάσης του σήματος απεικονίζεται στο σχήμα 2.3. Στην πραγματικότητα το φάσμα στο σχήμα 2.3, δεν είναι το γνωστό μονοδιάστατο φάσμα NMR (διάγραμμα συχνότητας-έντασης), αλλά ένα διάγραμμα συχνότητας-χρόνου και ονομάζεται ιντερφερόγραμμα (interferogram). Το πραγματικά δισδιάστατο φάσμα λαμβάνεται μετά τον δεύτερο μετασχηματισμό Fourier ως προς το χρόνο t_1 και είναι συνάρτηση δύο συχνοτήτων $S(\nu_1, \nu_2)$. Ο ένας άξονας είναι η συχνότητα ν_1 και ο άλλος η συχνότητα ν_2 (σχήμα 2.2γ). Ο άξονας ν_1 περιέχει πληροφορίες για τους μηχανισμούς, οι οποίοι επέδρασαν στο σύστημα των σπιν κατά την περίοδο της εξέλιξης t_1 , οι οποίοι και προκάλεσαν τη διαμόρφωση του σήματος κατά πλάτος και φάση, ενώ ο άξονας ν_2 περιέχει πληροφορίες για τους μηχανισμούς οι οποίοι επέδρασαν στο σύστημα των σπιν κατά την περίοδο της ανίχνευσης t_2 . Εάν για παράδειγμα, η σύζευξη σπιν-σπιν επέδρασε στο σύστημα κατά την περίοδο t_1 και η μεταπτωτική κίνηση κατά την περίοδο t_2 , τότε ο άξονας ν_1 θα περιέχει πληροφορίες για τις σταθερές σύζευξης και ο άξονας ν_2 πληροφορίες για τις συχνότητες συντονισμού. Το σπουδαιότερο όμως επίτευγμα της φασματοσκοπίας 2D NMR είναι ότι οι πληροφορίες στους δύο άξονες του δισδιάστατου φάσματος μπορούν να συσχετισθούν και να

διευκολύνουν στην απλούστερη περίπτωση την ανάλυση ενός πολύπλοκου μονοδιάστατου φάσματος.



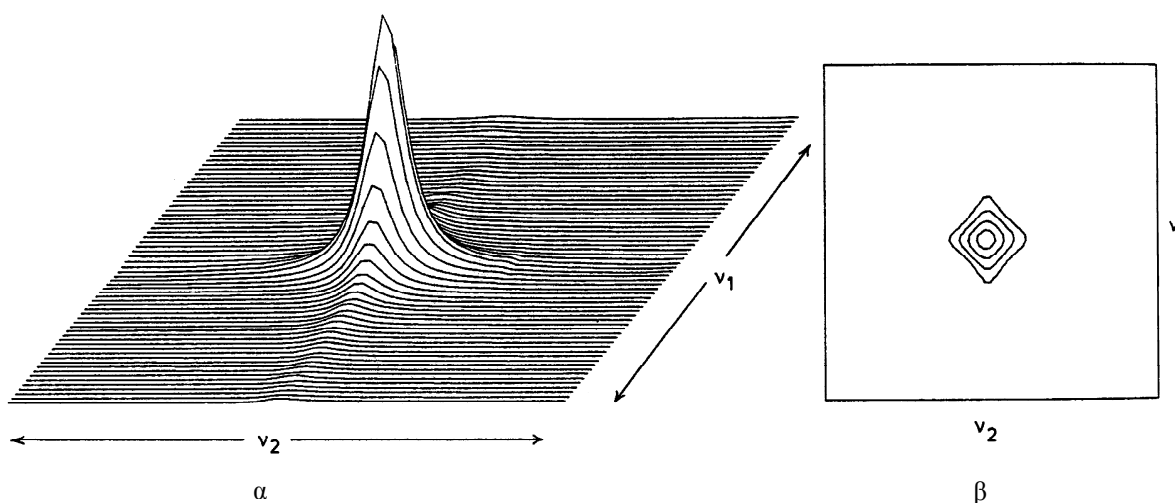
Σχήμα 2.2 Βασικό πείραμα 2D NMR.



Σχήμα 2.3 Διαμόρφωση (α) του πλάτους και (β) της φάσης του σήματος συναρτήσει του χρόνου εξέλιξης t_1 .

Για την απεικόνιση φασμάτων υπάρχουν αρκετοί τρόποι. Ένας τρόπος απεικόνισης διδιάστατου φάσματος είναι η συστοιχία φασμάτων (stacked plots), δηλαδή η διάταξη μιας σειράς φασμάτων συχνότητας ν_2 , το ένα πίσω από το άλλο, κατά σειρά αυξανόμενης συχνότητας ν_1 (σχήμα 2.4α). Τα φάσματα τοποθετούνται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να δίνουν την εντύπωση τρισδιάστατου φάσματος (η τρίτη διάσταση είναι η ένταση των κορυφών, αλλά δεν πρόκειται περί τρισδιάστατου φάσματος επειδή ο τρίτος άξονας δεν αντιπροσωπεύει συχνότητα). Η τρισδιάστατη εντύπωση ενισχύεται με την κεκλιμένη απεικόνιση του φάσματος, η οποία δημιουργείται σχεδιάζοντας κάθε φάσμα λίγα χιλιοστόμετρα αριστερά ή δεξιά από το προηγούμενο φάσμα. Αυτή η απεικόνιση είναι αρκετά εντυπωσιακή, αλλά παρουσιάζει μερικά σοβαρά μειονεκτήματα: (α) είναι αρκετά χρονοβόρος, (β) παρουσιάζεται η δυσκολία να βρεθεί η ακριβής θέση των κορυφών (συντεταγμένες ν_1 και ν_2) στο φάσμα, (γ)

υπάρχει κίνδυνος ορισμένες χαμηλής έντασης κορυφές, οι οποίες κρύβονται πίσω από κορυφές του επόμενου φάσματος, να ξεφύγουν την παρατήρηση.



Σχήμα 2.4 Απεικόνιση διδιάστατου φάσματος NMR. (α) Συστοιχία φασμάτων. (β) Διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών.

Η πιο δημοφιλής απεικόνιση είναι αυτή των ισοϋψών καμπυλών (contour plot), η οποία παρουσιάζει την κατανομή της έντασης των κορυφών, όπως ακριβώς απεικονίζεται το υψόμετρο στους γεωγραφικούς χάρτες. Οι γραμμές των ισοϋψών καμπυλών συνδέουν σημεία τα οποία έχουν την ίδια ένταση. Το σχήμα 2.4β δείχνει ένα τέτοιο διάγραμμα. Η καταγραφή του φάσματος με τη μορφή του contour plot είναι γρήγορη, αλλά παρουσιάζει προβλήματα όταν στο φάσμα υπάρχουν ταυτόχρονα κορυφές με πολύ μικρές και μεγάλες εντάσεις.

2.2 Ταξινόμηση των πειραμάτων της φασματοσκοπίας 2D NMR

Μια πρώτη γενική ταξινόμηση των πειραμάτων της φασματοσκοπίας 2D NMR μπορεί να γίνει με κριτήριο εάν αυτές δίνουν πληροφορίες συσχέτισης φασματικών παραμέτρων μεταξύ ομοίων πυρήνων (π. χ. πρωτονίων), ή μεταξύ ανόμοιων πυρήνων (π. χ. άνθρακα-πρωτόνιο, ή φωσφόρος-πρωτόνιο).

Μια πιο θεμελιώδης διάκριση⁵⁶ μπορεί να γίνει λαμβάνοντας υπόψη εάν η ακολουθία παλμών περιέχει ή όχι την περίοδο ανάμιξης (σχήμα 2.1β). Κατά την περίοδο ανάμιξης, μεταφέρονται πληροφορίες από ένα σύστημα σπιν, το οποίο έχει εξελιχθεί κατά τη διάρκεια t_1 , σε ένα άλλο σύστημα σπιν, το οποίο ανιχνεύεται κατά την περίοδο t_2 . Το προκύπτον διδιάστατο φάσμα συσχετίζει τις συχνότητες ν_1 και ν_2 . Γι' αυτό το λόγο, πειράματα τα οποία γίνονται με ακολουθίες παλμών, οι οποίες περιέχουν την περίοδο ανάμιξης, αναφέρονται συνήθως ως πειράματα ή μέθοδοι συσχέτισης (correlation methods) και τα προκύπτοντα φάσματα αναφέρονται ως φάσματα συσχέτισης (correlated spectra). Εάν η συσχέτιση γίνεται μεταξύ φασματικών παραμέτρων ομοίων πυρήνων, προκύπτουν τα φάσματα συσχέτισης

ομοίων πυρήνων (correlated homonuclear 2D NMR spectra), ενώ εάν η συσχέτιση γίνεται μεταξύ ανόμοιων πυρήνων, τα αντίστοιχα φάσματα ονομάζονται ετεροπυρηνικά φάσματα συσχέτισης (correlated heteronuclear 2D NMR spectra).

Στην περίπτωση όπου η ακολουθία παλμών δεν περιέχει την περίοδο ανάμιξης, τότε το ίδιο σύστημα εξελίσσεται και ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της ακολουθίας παλμών. Αυτό βέβαια προϋποθέτει ότι το σύστημα εκτίθεται σε δύο διαφορετικές φυσικές επιδράσεις κατά τη διάρκεια των δύο περιόδων και ότι θυμάται το παρελθόν του, δηλαδή θυμάται στην περίοδο ανίχνευσης τι του συνέβη στην περίοδο εξέλιξης. Ένα τέτοιο πείραμα, χωρίς την περίοδο ανάμιξης, συσχετίζει χημικές μετατοπίσεις με σταθερές σύζευξης ομοίων ή ανόμοιων πυρήνων (2D J-Resolved Spectroscopy).

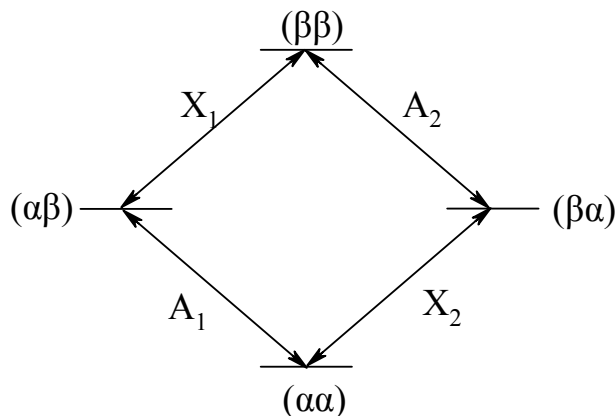
2.3 Coherence

Η λέξη coherence είναι αρκετά δύσκολη έννοια στη φασματοσκοπία NMR. Η ερμηνεία της γίνεται ακόμα πιο πολύπλοκη όταν κανείς προσπαθεί να περιγράψει ή να παρακολουθήσει την εξέλιξη, ή και να απομονώσει coherences ενός κβάντου (single quantum coherence), δύο κβάντων (double quantum coherence), ή και πολλαπλών κβάντων (multiple quantum coherence). Η έννοια coherence γίνεται περισσότερο κατανοητή με τη βοήθεια της κβαντομηχανικής και ιδιαίτερα με την απλούστερη εκδοχή της, τον φορμαλισμό του γινομένου των τελεστών (product operators formalism). Το διανυσματικό μοντέλο του Bloch είναι ανεπαρκές για την περιγραφή της γέννησης και της εξέλιξης των coherences, αν και πρόσφατα έχουν γίνει προσπάθειες προς αυτήν την κατεύθυνση.⁵⁶ Επειδή όμως η έννοια της coherence είναι σημαντική για την περιγραφή των διδιάστατων πειραμάτων NMR της παρούσας μελέτης, κρίνεται απαραίτητο να δοθεί μια ποιοτική περιγραφή της έννοιας coherence.

Ας θεωρήσουμε ένα σύνολο ομοίων πυρηνικών σπιν. Μετά την εφαρμογή ενός μη επιλεκτικού παλμού $(90^\circ)_x$, οι μαγνητικές ροπές του συστήματος των πυρήνων θα περιστρέφονται με την ίδια φάση στο επίπεδο (xy) του περιστρεφόμενου συστήματος αναφοράς με τη συχνότητα Larmor των πυρήνων (πριν την εφαρμογή του παλμού, δηλαδή στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας, οι μαγνητικές ροπές των πυρήνων περιστρέφονταν με τυχαία φάση). Παρατηρούμε δηλαδή ότι ο παλμός δημιούργησε στο σύστημα μια coherence φάσης (phase coherence) μεταξύ των σταθμών α και β . Αυτή η coherence μεταξύ δύο ενεργειακών σταθμών ονομάζεται coherence ενός κβάντου και αντιστοιχεί σε μία απλή επιτρεπτή μετάπτωση (κανόνας επιλογής $\Delta m_I = \pm 1$), η οποία μπορεί να ανιχνευθεί ως ένα σήμα NMR.

Η coherence ενός κβάντου μπορεί να μεταφερθεί (coherence transfer) σε άλλες ενεργειακές στάθμες με την εφαρμογή παλμών και να δημιουργήσει coherences μεγαλύτερου αριθμού κβάντων. Θα πρέπει να τονισθεί ότι οι πολλαπλών κβάντων coherences απαιτούν την ύπαρξη μαγνητικά μη ισοδύναμων πυρήνων (όμοιων ή όχι), οι οποίοι εμφανίζουν σύζευξη μεταξύ τους. Το σχήμα 2.5 παρουσιάζει το ενεργειακό διάγραμμα συστήματος δύο ομοπυρηνικών σπιν AX, τα οποία παρουσιάζουν ασθενή σύζευξη μεταξύ τους. Ας

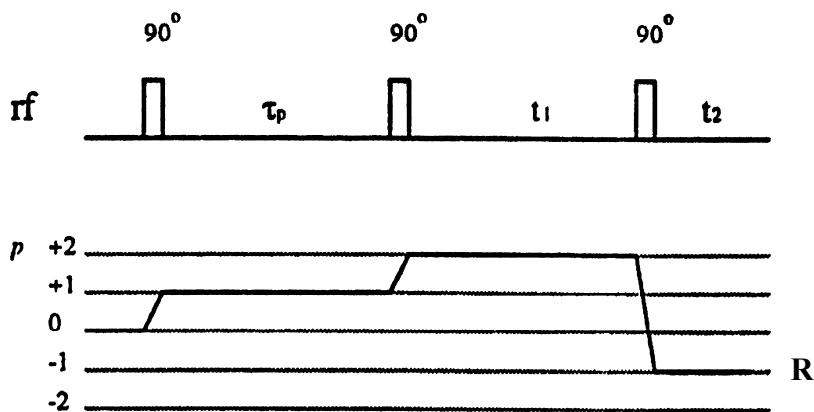
υποθέσουμε ότι αρχικά ένας επιλεκτικός παλμός 90° δημιουργεί coherence ενός κβάντου μεταξύ των σταθμών (αα) και (αβ) του πυρήνα A (μετάπτωση A_1 στο σχήμα 2.5). Η coherence αυτή μπορεί να μεταφερθεί στη στάθμη (ββ) με την εφαρμογή ενός δεύτερου επιλεκτικού παλμού 180° κατά μήκος της μετάπτωσης X_1 του πυρήνα X. Ο παλμός αναστρέφει τους πληθυσμούς των πυρήνων X στις στάθμες (αβ) και (ββ). Μ' άλλα λόγια, ο δεύτερος παλμός μεταφέρει τις πληροφορίες της στάθμης (αβ) στη στάθμη (ββ) και δημιουργεί μια coherence μεταξύ των σταθμών (αα) και (ββ). Αυτή η coherence είναι δύο κβάντων, επειδή οι δύο στάθμες χαρακτηρίζονται από μεταβολή του κβαντικού αριθμού κατά $\Delta m_I = \pm 2$ και φυσικά είναι απαγορευμένη.



Σχήμα 2.5 Ενεργειακό διάγραμμα ενός συστήματος πυρήνων AX, οι οποίοι παρουσιάζουν ασθενή σύζευξη.

Είναι δυνατόν να δημιουργήσουμε coherence μηδέν κβάντων ($\Delta m_I = 0$), ή coherence πολλαπλών κβάντων ($\Delta m_I = \pm 3, 4, \dots$) σε συστήματα με περισσότερους από δύο συζευγμένους πυρήνες. Οι τιμή της διαφοράς Δm_I χαρακτηρίζει την τάξη p της coherence. Σε κάθε περίπτωση, οι υψηλής τάξης coherences είναι απαγορευμένες και δεν ανιχνεύονται, παρά μόνον εάν μετατραπούν σε coherence ενός κβάντου με την εφαρμογή κατάλληλου παλμού. Η δημιουργία και η πορεία μεταφοράς (διαδρομής) των coherences κατά την εφαρμογή μιας ακολουθίας παλμών περιγράφεται από ένα διάγραμμα διαδρομής (coherence level diagram). Ένα τέτοιο διάγραμμα διαδρομής των coherences απεικονίζει το σχήμα 2.6.

Η coherence στην περίοδο προετοιμασίας έχει τάξη 0. Ο πρώτος παλμός δημιουργεί coherence ενός κβάντου, τάξης +1, η οποία εξελίσσεται για κάποιο χρονικό διάστημα, μέχρις ότου ο δεύτερος παλμός την μεταφέρει σε μία coherence δύο κβάντων, τάξης +2. Μετά το δεύτερο χρονικό διάστημα, τρίτος παλμός μεταφέρει τη coherence δύο κβάντων πίσω σε μία coherence ενός κβάντου, τάξης -1, η οποία και ανιχνεύεται από το δέκτη του φασματογράφου. Η συγκεκριμένη διαδρομή της coherence στο σχήμα 2.6, συμβολίζεται με το διάνυσμα της τάξης της coherences, δηλαδή $p = (0, +1, +2, -1)$.



Σχήμα 2.6 Διάγραμμα μεταφοράς (διαδρομής) των coherences (κάτω) μιας ακολουθίας με τρεις παλμούς 90° (επάνω) Η coherence ξεκινά πάντα από το επίπεδο 0. Ο πρώτος παλμός δημιουργεί coherence τάξης $p = +1$, ο δεύτερος παλμός μετατρέπει την τάξη της coherence σε +2, και ο τρίτος την φέρει στην τάξη -1 , η οποία και τελικά ανιχνεύεται από τον δέκτη (R) του φασματογράφου.

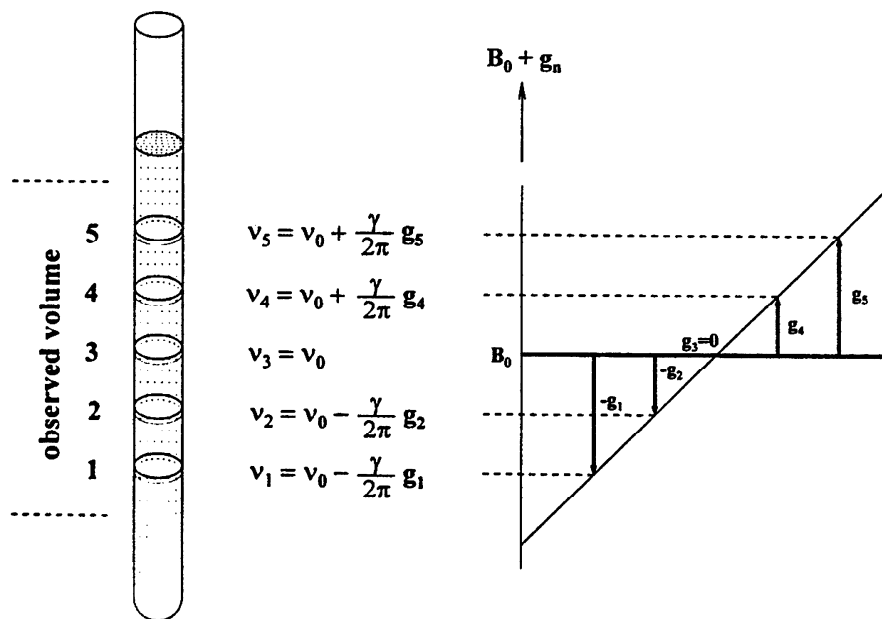
Το διάγραμμα των coherences στο σχήμα 2.6, παρουσιάζει μια μόνο διαδρομή από τις πολλές δυνατές διαδρομές που μπορούν να ακολουθήσουν οι coherences με την εφαρμογή της ακολουθίας των τριών παλμών. Επειδή λοιπόν, οι παλμικές ακολουθίες μπορούν να δημιουργήσουν πολλές διαδρομές των coherences, είναι απαραίτητο να καθορισθεί ποια διαδρομή πρέπει να επιλεγεί και ποιες διαδρομές πρέπει να κατασταλούν σε μια συγκεκριμένη παλμική ακολουθία. Ένας γρήγορος και αποτελεσματικός τρόπος για την επιλογή της διαδρομής των coherences είναι τα βαθμωτά πεδία, όπως θα δούμε στην επόμενη παράγραφο.

2.4 Βαθμωτά πεδία

Τα βαθμωτά ή κεκλιμένα πεδία, των οποίων η ένταση συμβολίζεται με G , ήταν γνωστά πριν από την ανακάλυψη του παλμικού NMR. Είχαν όμως περιορισμένη χρήση ακόμα και μετά την ανακάλυψη του. Αργότερα βρήκαν σημαντική εφαρμογή στη μαγνητική τομογραφία και στη μέτρηση της διάχυσης των υγρών ή την πιστοποίηση μοριακής τάξης. Σήμερα, βαθμωτά πεδία (τυπικές τιμές έντασης $0.1-0.5 \text{ T m}^{-1}$) χρησιμοποιούνται ευρέως στη φασματοσκοπία NMR δύο, τριών ή και τεσσάρων διαστάσεων.

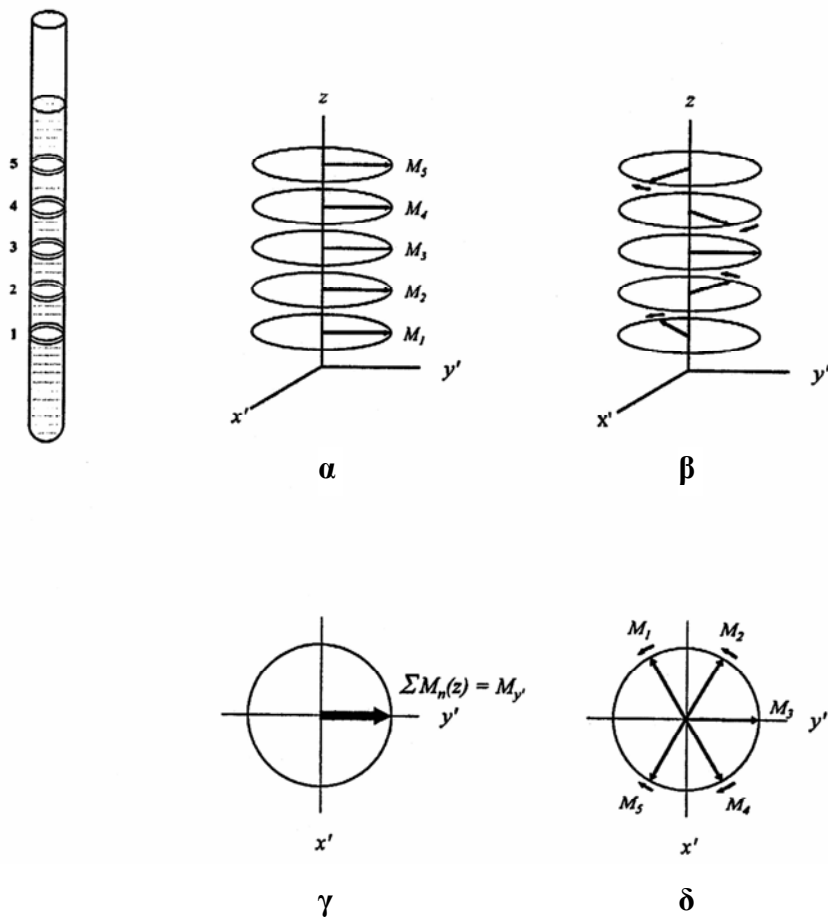
Τα βαθμωτά πεδία, σε αντίθεση με το σταθερό ομοιογενές μαγνητικό πεδίο, B_0 , της συμβατικής φασματοσκοπίας NMR, είναι ανομοιογενή.⁵⁸ Η ένταση των βαθμωτών πεδίων μεταβάλλεται γραμμικά κατά μήκος ενός άξονα, συνήθως κατά τον ίδιο άξονα z κατά τον οποίο εφαρμόζεται το πεδίο B_0 , όπως φαίνεται στο σχήμα 2.7. Οι ποσότητες g_n αντιπροσωπεύουν τη συνεισφορά των βαθμωτών πεδίων στην ένταση του πεδίου B_0 σε διαφορετικές θέσεις κατά τον άξονα z . Λόγω της ανομοιογένειας των βαθμωτών πεδίων, οι πυρήνες ενός δείγματος αισθάνονται διαφορετικά τοπικά μαγνητικά πεδία, $B_0 \pm g_n$, εντός του

σωλήνα NMR και επομένως θα περιστρέφονται με διαφορετικές συχνότητες Larmor, $\nu_n = (\gamma/2\pi) (B_0 \pm g_n)$ (σχήμα 2.7).



Σχήμα 2.7 Βαθμωτά μαγνητικά πεδία κατά μήκος του μαγνητικού πεδίου B_0 (άξονας z). Οι πυρήνες, οι οποίοι βρίσκονται σε πέντε αυθαίρετες εγκάρσιες διατομές του σωλήνα NMR υφίστανται πέντε διαφορετικά μαγνητικά πεδία: $B_0 - g_1$, $B_0 - g_2$, B_0 , $B_0 + g_1$, $B_0 + g_2$. Στη μέση του σωλήνα NMR το πεδίο είναι ομοιογενές, επειδή $g_3 = 0$. ν_1 έως ν_5 είναι οι συχνότητες Larmor των πυρήνων στις πέντε εγκάρσιες διατομές.

Η επίδραση των βαθμωτών πεδίων στην οριζόντια συνιστώσα της μαγνήτισης των πυρήνων απεικονίζεται στο σχήμα 2.8. Εξετάζουμε, όπως προηγουμένως, τη συμπεριφορά των πυρήνων στις πέντε εγκάρσιες διατομές του σωλήνα NMR. Πριν την εφαρμογή του παλμού $(90^\circ)_x$, όλοι οι πυρήνες του δείγματος βρίσκονται εντός του ίδιου ομοιογενούς μαγνητικού πεδίου B_0 και η μακροσκοπική μαγνήτιση των πυρήνων, M_0 , βρίσκεται κατά μήκος του άξονα z (κατάσταση θερμικής ισορροπίας). Μετά την εφαρμογή του παλμού $(90^\circ)_x$, η μαγνήτιση των πυρήνων σε κάθε εγκάρσια διατομή ευθυγραμμίζεται με τον οριζόντιο άξονα y' του περιστρεφόμενου συστήματος αναφοράς (σχήμα 2.8α), το οποίο περιστρέφεται με τη συχνότητα Larmor, ν_0 . Η συνολική οριζόντια συνιστώσα της μαγνήτισης, M_y , των πυρήνων και στις πέντε εγκάρσιες διατομές είναι το διανυσματικό άθροισμα των μερικών συνιστωσών της μαγνήτισης, M_n , των πυρήνων σε κάθε διατομή (σχήμα 2.8γ).



Σχήμα 2.8 Συμπεριφορά της οριζόντιας μαγνήτισης πυρήνων υπό την επίδραση βαθμωτών πεδίων. (α) Οι πυρήνες στις πέντε εγκάρσιες διατομές υφίστανται το ομοιογενές μαγνητικό πεδίο B_0 . Οι οριζόντιες συνιστώσες της μαγνήτισης, M_n , περιστρέφονται με την ίδια συχνότητα Larmor, ν_0 . (β) Τα ανύσματα M_n των πυρήνων στις πέντε διατομές περιστρέφονται με διαφορετικές συχνότητες λόγω της επίδρασης των βαθμωτών πεδίων. Οι κατευθύνσεις των περιστροφών ως προς το σύστημα αναφοράς υποδεικνύονται με τα μικρά βέλη εκτός των ελλείψεων. (γ) Το άνυσμα της συνολικής οριζόντιας μαγνήτισης M_y , στο επίπεδο (xy). (δ) Προβολές των ανυσμάτων M_n στο επίπεδο (xy).

Με την εφαρμογή των βαθμωτών πεδίων, τα ανύσματα M_n των πυρήνων στις πέντε εγκάρσιες διατομές περιστρέφονται με διαφορετικές συχνότητες ν_n (σχήμα 2.7). Επειδή το περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς περιστρέφεται με συχνότητα ν_0 , μόνον οι πυρήνες στο μέσον του σωλήνα NMR θα έχουν την ίδια συχνότητα. Αντίθετα, οι πυρήνες στις υπόλοιπες διατομές θα έχουν μικρότερες (ν_1, ν_2) ή μεγαλύτερες (ν_4, ν_5) συχνότητες από τη ν_0 . Τα ανύσματα της μαγνήτισης στις διατομές 1 και 2 θα περιστρέφονται πιο αργά και επομένως θα βραδυπορούν ως προς το σύστημα αναφοράς, ενώ τα ανύσματα της μαγνήτισης στις διατομές 4 και 5 θα περιστρέφονται πιο γρήγορα και επομένως θα προηγούνται ως προς το σύστημα αναφοράς (σχήμα 2.8β). Τελικό αποτέλεσμα της επίδρασης των βαθμωτών πεδίων είναι η απώλεια φάσης της coherence, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.8δ και ο ενδεχόμενος μηδενισμός της μαγνήτισης λόγω πυρηνικής μαγνητικής αποδιέγερσης.

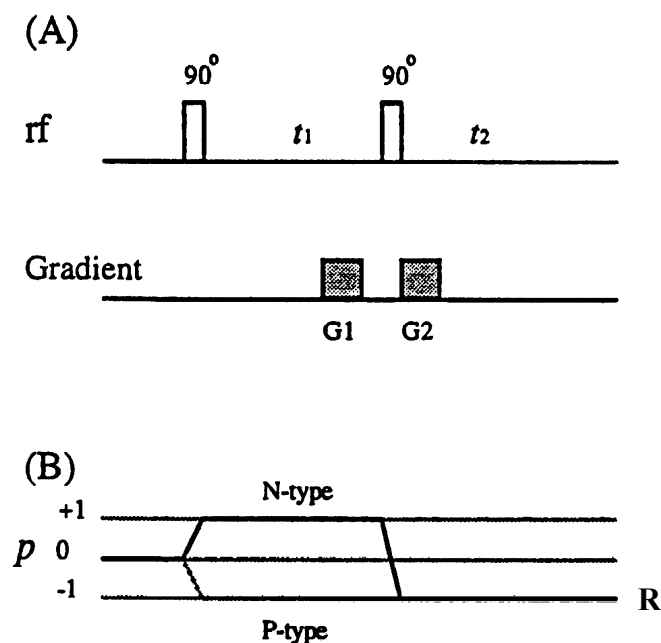
Οι ιδιότητες αυτές των βαθμωτών πεδίων είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε πειράματα με ακολουθίες παλμών, οι οποίες απαιτούσαν τον πλήρη μηδενισμό της

μαγνήτισης πριν την επανάληψη της ακολουθίας για την αποφυγή ανωμαλιών στο λαμβανόμενο φάσμα. Με τα βαθμωτά πεδία η απώλεια φάσης της coherence είναι πολύ γρήγορη σε σχέση με την εφαρμογή μακρών χρόνων αναμονής, γεγονός το οποίο οδηγεί στην μείωση της διάρκειας του πειράματος. Επίσης, θα πρέπει να τονισθεί ότι η φάση της coherence δεν καταστρέφεται μόνιμα. Εάν μετά την εφαρμογή των πρώτων βαθμωτών πεδίων (συνήθως υπό τη μορφή παλμού μικρής χρονικής διάρκειας), G , εφαρμόσουμε βαθμωτά πεδία της ίδιας έντασης με τα πρώτα, αλλά αντίθετης κατεύθυνσης, $-G$, τα ανύσματα M_n συγκλίνουν και ευθυγραμμίζονται (εστιάζονται) στον άξονα y' , ακριβώς όπως στην περίπτωση του ομοιογενούς πεδίου B_0 μετά την εφαρμογή του παλμού $(90^\circ)_x$ (σχήμα 2.8α,γ). Μ' άλλα λόγια η απορύθμιση της φάσης των ανυσμάτων με την εφαρμογή του πρώτου βαθμωτού πεδίου εξουδετερώνεται από το δεύτερο βαθμωτό πεδίο. Η εκ νέου ευθυγράμμιση της μαγνήτισης στον άξονα ονομάζεται ηχώ (echo) και το πείραμα δημιουργία ηχούς με βαθμωτά πεδία (gradient echo).

Η σπουδαιότερη όμως εφαρμογή των βαθμωτών πεδίων είναι η επιλογή της διαδρομής των διαφόρων coherences σε ένα πείραμα 2D NMR και η δημιουργία μιας coherence ενός κβάντου, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί. Η επιλογή της κατάλληλης διαδρομής των coherence είναι σημαντικό βήμα για την καταστολή ανωμαλιών που παρουσιάζονται κατά τη διάρκεια του πειράματος και οι οποίες εμφανίζονται στο δισδιάστατο φάσμα (π. χ. αξονικές κορυφές) υποβαθμίζοντας την ποιότητά του. Παλαιότερα, η επιλογή της κατάλληλης coherence γινόταν με την τεχνική της κυκλικής μεταβολής της φάσης των παλμών και του δέκτη (phase cycling). Σήμερα αυτή έχει αντικατασταθεί από τα βαθμωτά πεδία με τα οποία επιταχύνεται το πείραμα, δίνοντας έτσι στον πειραματιστή την ευχέρεια να αυξήσει την ευαισθησία του πειράματος. Τη λειτουργία των βαθμωτών πεδίων και την επιλογή της coherence θα παρακολουθήσουμε στο επόμενο δισδιάστατο πείραμα NMR.

2.5 Φασματοσκοπία συσχέτισης ομοπυρηνικών σπιν με βαθμωτά πεδία (Gradient Correlated Spectroscopy, gCOSY)

Το πείραμα gCOSY⁵⁹ συσχετίζει τις χημικές μετατοπίσεις ομοίων πυρήνων (π. χ. ^1H , ^{31}P), οι οποίες εκτείνονται κατά μήκος των δύο αξόνων του δισδιάστατου φάσματος. Η ακολουθία παλμών του πειράματος απεικονίζεται στο σχήμα 2.9. Αποτελείται από δύο μη επιλεκτικούς παλμούς $(90^\circ)_x$, οι οποίοι διαχωρίζονται από την περίοδο εξέλιξης, t_1 . Πριν από τον πρώτο παλμό προηγείται η περίοδος προετοιμασίας, T , ενώ μετά τον δεύτερο παλμό ακολουθεί η περίοδος ανίχνευσης του σήματος, t_2 .

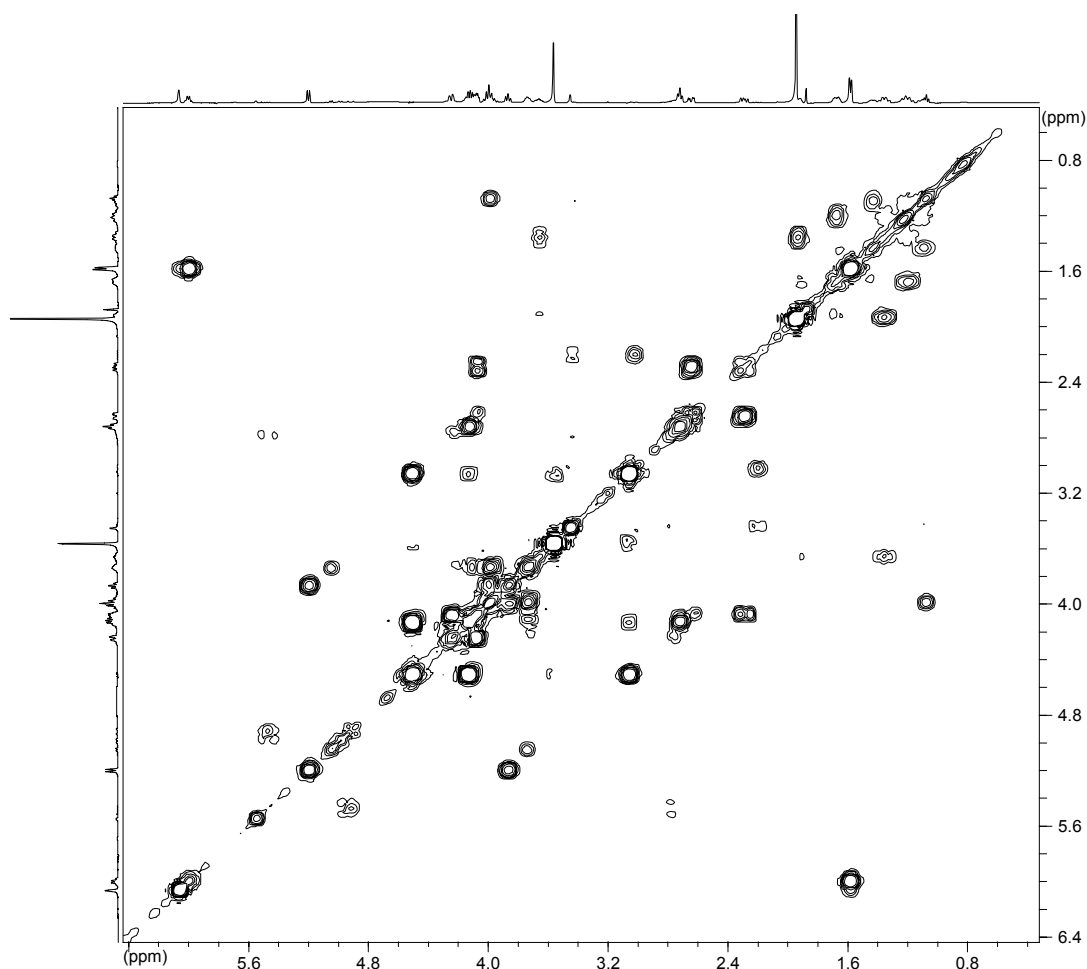


Σχήμα 2.9 Ακολουθία παλμών gCOSY ομοπυρηνικού συστήματος σπιν. Οι παλμοί $(90^\circ)_x$ απεικονίζονται με ορθογώνια παραλληλόγραμμα, ενώ οι παλμοί βαθμωτών πεδίων με σκιασμένα παραλληλόγραμμα. Στο κάτω μέρος απεικονίζεται το διάγραμμα διαδρομής των coherences ενός κβάντου. Με R συμβολίζεται ο δέκτης του φασματομέτρου NMR.

Μετά την εφαρμογή του πρώτου παλμού $(90^\circ)_x$, η μαγνήτιση ενός συνόλου πυρήνων, οι οποίοι εμφανίζουν σύζευξη σπιν-σπιν, ευθυγραμμίζεται με τον άξονα y' του συστήματος αναφοράς. Ο παλμός έχει δημιουργήσει μια coherence ενός κβάντου για όλους τους πυρήνες, τάξης ± 1 . Μετά την παύση του παλμού το σύστημα των σπιν εξελίσσεται για χρονικό διάστημα t_1 . Κατ' αυτό το χρονικό διάστημα τα ανύσματα των μαγνητικών ροπών των μαγνητικά μη ισοδύναμων πυρήνων περιστρέφονται στο επίπεδο (xy) με διαφορετικές συχνότητες $Larmor$, οι οποίες διαμορφώνονται από τις τιμές της σταθεράς σύζευξης J (σε Hz). Δηλαδή κάθε άνυσμα μαγνητικής ροπής έχει τη δική του ετικέτα (spin labeling). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καταστραφεί η φάση της coherence που είχαν τα ανύσματα με την εφαρμογή του παλμού. Ο δεύτερος μη επιλεκτικός παλμός $(90^\circ)_x$, ο οποίος ονομάζεται και παλμός ανάμιξης (δηλαδή ο ίδιος ο παλμός αποτελεί την περίοδο ανάμιξης στην ακολουθία παλμών gCOSY), τροποποιεί την τάξη των coherences. Έτσι, η coherence τάξης $+1$ μεταφέρεται σε coherence τάξης -1 , ενώ η coherence τάξης -1 έχει την ίδια τάξη -1 . (Σχήμα 2.9). Μ' άλλα λόγια, η μία coherence ακολουθεί τη διαδρομή $(0, +1, -1)$ και η άλλη τη διαδρομή $(0, -1, -1)$. Για την ανίχνευση επιλέγεται η coherence με $p = -1$, η οποία έχει την ίδια φάση με το δέκτη του φασματογράφου. Η άλλη coherence καταστέλλεται και δεν ανιχνεύεται. Παρ' όλα αυτά υπάρχει ευχέρεια επιλογής οποιασδήποτε από τις δύο coherences με βαθμωτά πεδία, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Coherences οι οποίες δημιουργούνται μεταξύ μαγνητικά ισοδύναμων πυρήνων, χαρακτηρίζονται από τη συχνότητα $Larmor$ των πυρήνων και στις δύο περιόδους εξέλιξης και ανίχνευσης της ακολουθίας παλμών και επομένως στο δισδιάστατο φάσμα (contour plot) ανιχνεύονται επί της διαγωνίου (diagonal peaks) με συντεταγμένες τις αντίστοιχες

συχνότητες ή χημικές μετατοπίσεις των μαγνητικά ισοδύναμων πυρήνων. Αντίθετα, coherences, οι οποίες δημιουργούνται μεταξύ μαγνητικά μη ισοδύναμων πυρήνων, οι οποίοι εμφανίζουν σύζευξη, χαρακτηρίζονται από συχνότητες, οι οποίες διαμορφώνονται από τη σταθερά σύζευξης. Αυτές οι coherences ανιχνεύονται ως εκτός της διαγωνίου κορυφές (off-diagonal peaks). Οι εκτός διαγωνίου κορυφές είναι συμμετρικές ως προς τη διαγώνιο με συντεταγμένες τις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων που εμφανίζουν σύζευξη. Έτσι, από το διδιάστατο φάσμα είναι δυνατόν να προσδιορίσουμε όλο το δίκτυο των συζεύξεων μεταξύ των μαγνητικά μη ισοδύναμων πυρήνων (π. χ. ^1H , ^{31}P , ^{19}F) του υπό εξέταση μορίου. Το σχήμα 2.10 απεικονίζει το φάσμα gCOSY πυρήνων πρωτονίου της ελευρωπαΐνης, η οποία αποτελεί αντικείμενο εξέτασης της παρούσας μελέτης.



Σχήμα 2.10 Φάσμα H,H gCOSY της ελευρωπαΐνης

Η επιλογή των coherences γίνεται με την εφαρμογή παλμών βαθμωτών πεδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από ένταση G και διάρκεια t . Τα βαθμωτά πεδία εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια χρονικών περιόδων ελεύθερης μεταπτωτικής κίνησης των πυρήνων και έχουν σκοπό τη δημιουργία σχηματισμού ημών βαθμωτών πεδίων, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4. Η γενική συνθήκη για τη δημιουργία ημών βαθμωτών πεδίων σε κάθε σημείο της διαδρομής των coherences εκφράζεται από την εξίσωση 2.1.

$$\sum_i^n p_i G_i t_{G_i} = 0 \quad (2.1)$$

Το πρώτο βαθμωτό πεδίο G_1 εφαρμόζεται υπό τη μορφή παλμού διάρκειας, $t_{G,1}$, μερικών ms πριν την εφαρμογή του δεύτερου παλμού $(90^\circ)_x$, ενώ το δεύτερο βαθμωτό πεδίο έντασης G_2 και διάρκειας $t_{G,2}$ ($t_{G,1} = t_{G,2}$) εφαρμόζεται αμέσως μετά τον δεύτερο παλμό $(90^\circ)_x$ και πριν από την ανίχνευση (σχήμα 2.9). Σύμφωνα με την εξίσωση 2.1, για την επιλογή της διαδρομής (0, -1, -1) χρησιμοποιούμε βαθμωτά πεδία με λόγο εντάσεων $G_1 : G_2 = 1 : -1$, ενώ για την επιλογή της διαδρομής (0, +1, -1) χρησιμοποιούμε βαθμωτά πεδία με λόγο εντάσεων $G_1 : G_2 = 1 : 1$. Επίσης, με την ίδια διαδικασία επιλογής της διαδρομής των coherences καταστέλλονται και άλλες ανεπιθύμητες διαδρομές, όπως η διαδρομή (0, 0, -1), η οποία αντιστοιχεί στη δημιουργία αξονικών κορυφών και οι οποίες, ως γνωστόν, προκαλούν ανωμαλίες στο φάσμα.

2.6 Αντίστροφη φασματοσκοπία NMR (Inverse NMR spectroscopy)

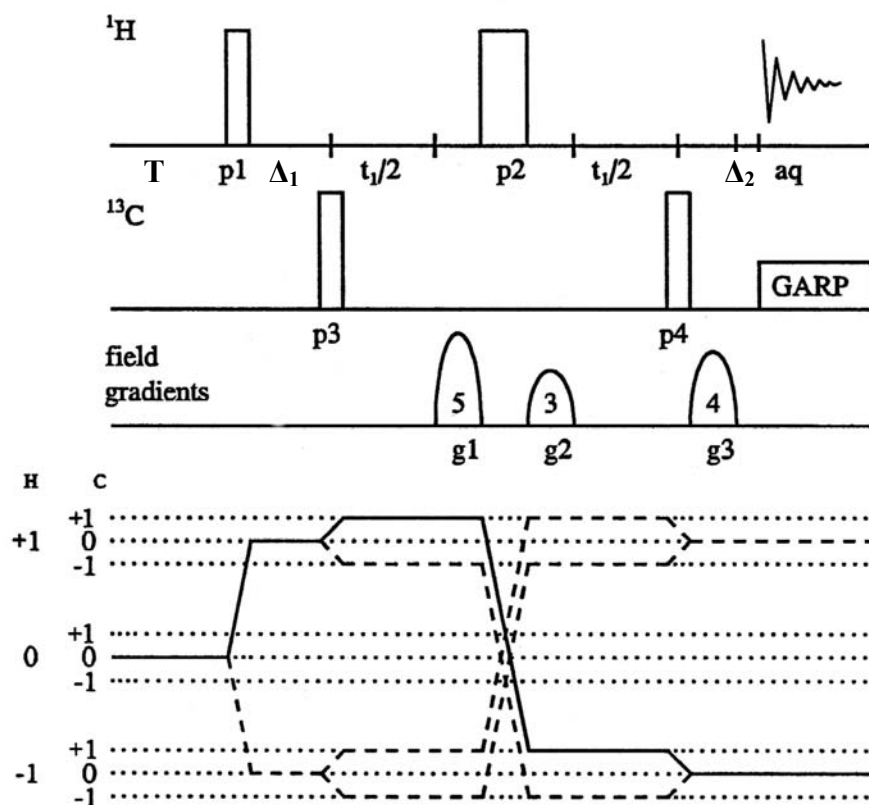
Οι μονοδιάστατες και δισδιάστατες τεχνικές της φασματοσκοπίας NMR με τις οποίες ανιχνεύονται οι λιγότερο ευαίσθητοι πυρήνες (π. χ. ^{13}C , ^{15}N) είναι χρονοβόρες. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ορισμένες τεχνικές, οι οποίες έχουν στόχο τη αύξηση της ευαισθησίας του πειράματος με παράλληλη μείωση της διάρκειάς του. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι τεχνικές INEPT, DEPT και οι διάφορες παραλλαγές τους, οι οποίες βασίζονται στη μεταφορά coherence από ένα περισσότερο ευαίσθητο πυρήνα, π. χ. πρωτόνιο, προς ένα λιγότερο ευαίσθητο πυρήνα, π. χ. άνθρακα-13 και την ανίχνευση του λιγότερο ευαίσθητου πυρήνα.⁵⁸ Κατ' αυτόν τρόπο, η ένταση του σήματος του λιγότερο ευαίσθητου πυρήνα αυξάνεται κατά γ_A/γ_X , όπου γ_A και γ_X είναι οι γυρομαγνητικοί λόγοι του περισσότερο και λιγότερο ευαίσθητου πυρήνα. Για παράδειγμα, ένα πείραμα INEPT $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ αυξάνει θεωρητικά την ένταση του σήματος του πυρήνα ^{13}C κατά $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} \cong 4$ φορές.

Μια δεύτερη κατηγορία τεχνικών λειτουργεί αντίστροφα από την προηγούμενη. Η μεταφορά coherence γίνεται από το λιγότερο ευαίσθητο πυρήνα (π.χ. ^{13}C) προς τον περισσότερο ευαίσθητο πυρήνα (π. χ. ^1H) και με την ανίχνευση του τελευταίου. Αυτή η κατηγορία τεχνικών (Inverse INEPT, HMQC, HSQC) ανήκει στη λεγόμενη αντίστροφη φασματοσκοπία NMR (Inverse NMR spectroscopy).⁶⁰ Μια από αυτές τις τεχνικές θα παρουσιασθεί στην επόμενη παράγραφο. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι για την καλύτερη αξιοποίηση των τεχνικών αντίστροφης φασματοσκοπίας NMR έχουν πρόσφατα κατασκευαστεί οι λεγόμενοι αντίστροφοι δοκιμαστές (inverse probes). Οι συνήθεις δοκιμαστές δύο καναλιών (^1H και $X = ^{13}\text{C}$, ^{31}P , ^{15}N -broadband) διαθέτουν δύο πηνία, ένα για το κανάλι του ^1H και ένα για το κανάλι του X , με το πηνίο του ^1H να είναι περιτυλιγμένο εξωτερικά του πηνίου X , επειδή οι δοκιμαστές αυτοί χρησιμοποιούνται κυρίως για τη ανίχνευση του πυρήνα X . Το εσωτερικό πηνίο ενός δοκιμαστή, επειδή βρίσκεται πιο κοντά

στο δείγμα, είναι πιο αποτελεσματικό τόσο στη μεταφορά παλμών, όσο και στην ανίχνευση του αντίστοιχου πυρήνα, σε σχέση με το εξωτερικό πηνίο. Στην αντίστροφη φασματοσκοπία NMR όμως η ανίχνευση γίνεται πάντα στο κανάλι του ^1H , επομένως οι αντίστροφοι ανιχνευτές στους οποίους το πηνίο του ^1H είναι το εσωτερικό πηνίο αποτελούν ιδανική λύση για τέτοιου είδους πειράματα.

2.7 Φασματοσκοπία συσχέτισης ετεροπυρηνικών σπιν με βαθμωτά πεδία (Gradient Correlated Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy, gHMQC)

Με αυτό το πείραμα συσχετίζονται οι χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων με πυρήνες ^{13}C , ^{15}N , ή ^{31}P με τους οποίους συνδέονται με χημικό δεσμό (π. χ. C-H, N-H, ή H-P). Η συσχέτιση αυτή γίνεται μέσω της ετεροπυρηνικής σύζευξης. Έτσι, μπορούμε να προσδιορίσουμε τις χημικές μετατοπίσεις κορυφών στα φάσματα ^{13}C , ^{15}N , ή ^{31}P εάν γνωρίζουμε τις χημικές μετατοπίσεις στο αντίστοιχο πρωτονιακό φάσμα και αντίστροφα.



Σχήμα 2.11 Ακολουθία παλμών με βαθμωτά πεδία, gHMQC και αποσύζευξη των ετεροπυρήνων με την ακολουθία GARP. Στο κάτω μέρος του σχήματος απεικονίζεται το διάγραμμα των διαδρομών των coherences που δημιουργούνται από τους παλμούς της ακολουθίας και επιλέγονται από τα βαθμωτά πεδία.

Το βασικό πείραμα HMQC αποτελείται από ένα συνδυασμό δύο ακολουθιών παλμών, οι οποίες επενεργούν στους πυρήνες ^1H και στους λιγότερους ευαίσθητους πυρήνες, π. χ. ^{13}C . Στο σχήμα 2.11, απεικονίζεται η ακολουθία παλμών του πειράματος HMQC, οι παλμοί των

βαθμών πεδίων για την επιλογή των διαδρομών των coherences και το διάγραμμα των διαδρομών των coherences.⁵⁶

Μετά την περίοδο προετοιμασίας, T , εφαρμόζεται στα πρωτόνια παλμός $(90^\circ)_x$, ο οποίος μεταφέρει τη coherence ενός κβάντου του πρωτονίου στο επίπεδο (xy) . Η coherence του πρωτονίου εξελίσσεται για χρονικό Δ_1 , όπου αναπτύσσεται η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων και του άνθρακα. Η χρονική περίοδος Δ_1 ρυθμίζεται, ώστε να αναπτυχθεί κατά προτίμηση η σύζευξη ενός δεσμού C-H [$\Delta_1 = 1 / 2(^1J_{C,H})$] ή σύζευξη μακράς εμβέλειας. Μετά το πέρας της περιόδου Δ_1 , εφαρμόζεται στον πυρήνα ^{13}C παλμός $(90^\circ)_x$, ο οποίος δημιουργεί coherence δύο κβάντων. Μ' αυτόν τον τρόπο μεταφέρεται coherence από τον άνθρακα στο πρωτόνιο, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.3. Η coherence εξελίσσεται κατά το χρονικό διάστημα t_1 , όπως επίσης εξελίσσονται κατά το ίδιο χρονικό διάστημα η σύζευξη μεταξύ πρωτονίων και η χημική μετατόπιση των πρωτονίων. Η επίδραση της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων εξουδετερώνεται (εστιάζεται) με μία ηχώ που δημιουργεί ο παλμός $P_2 = (180^\circ)_x$, ο οποίος εφαρμόζεται στα πρωτόνια στο μέσον της περιόδου εξέλιξης t_1 . Ο τελευταίος παλμός $P_4 = (90^\circ)_x$ μετατρέπει τη coherence δύο κβάντων (η οποία είναι απαγορευμένη και δεν μπορεί να ανιχνευθεί) σε coherence ενός κβάντου, η οποία και ανιχνεύεται. Κατά την περίοδο εξέλιξης διακόπτεται η επίδραση της σύζευξης C-H, η οποία επενεργεί εκ νέου κατά την περίοδο ανίχνευσης. Το σήμα στην περίοδο ανίχνευσης διαμορφώνεται από τη χημική μετατόπιση του άνθρακα, η οποία εξελίσσεται κατά την περίοδο t_1 . Το αποτέλεσμα του πειράματος είναι ένα δισδιάστατο φάσμα με τις χημικές μετατοπίσεις του πρωτονίου στον άξονα v_2 και τις χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα στον άξονα v_1 , οι οποίες συνδέουν μόνο τα ζεύγη πρωτόνιο-άνθρακα τα οποία εμφανίζουν σύζευξη.

Η επιλογή της διαδρομής των coherences γίνεται με παλμούς βαθμωτών πεδίων, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.11. Επειδή πρόκειται για σύστημα ανόμοιων πυρήνων, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένοι κανόνες; Πρώτον, η τάξη της coherence του συστήματος προκύπτει από το άθροισμα των τάξεων των coherences των μεμονωμένων πυρήνων. Για παράδειγμα, η coherence του πρωτονίου τάξης -1 , $H(-1)$, και coherence του ετεροπυρήνα X τάξης $+1$, $X(+1)$, αντιστοιχεί σε coherence συνολικής τάξης 0 . Δεύτερον, η ανίχνευση του σήματος γίνεται όταν η coherences του πρωτονίου είναι τάξης -1 και του άνθρακα τάξης 0 . Τρίτον, για τον υπολογισμό της σχετικής έντασης των βαθμωτών πεδίων, χρησιμοποιώντας τη συνθήκη 2.1, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη τους γυρομαγνητικούς λόγους των πυρήνων και να υπολογίσουμε την τροποποιημένη τάξη των coherences. Η τελευταία υπολογίζεται από την εξίσωση 2.2.

$$p' = p(H) + p(X) \frac{\gamma(X)}{\gamma(H)} \quad (2.2)$$

Όπου, p' η τροποποιημένη συνολική τάξη της coherence, $p(H)$ και $p(X)$ οι τάξεις των coherences του πρωτονίου και του ετεροπυρήνα X , $\gamma(H)$ και $\gamma(X)$ οι γυρομαγνητικοί λόγοι των πυρήνων H και X . Επομένως, η συνθήκη 2.1 μπορεί να τροποποιηθεί στην εξίσωση:

$$\sum_i^n p_i' G_i t_{G_i} = 0 \quad (2.3)$$

Στο σχήμα 2.11, φαίνονται δύο διαδρομές των coherences, οι οποίες συνεισφέρουν στο σήμα:

$$p_1 : H(0)X(0) \rightarrow H(+1)X(0) \rightarrow H(+1)X(+1) \rightarrow H(-1)X(+1) \rightarrow H(-1)X(0) \quad (2.4\alpha)$$

$$p_2 : H(0)X(0) \rightarrow H(+1)X(0) \rightarrow H(+1)X(-1) \rightarrow H(-1)X(-1) \rightarrow H(-1)X(0) \quad (2.4\beta)$$

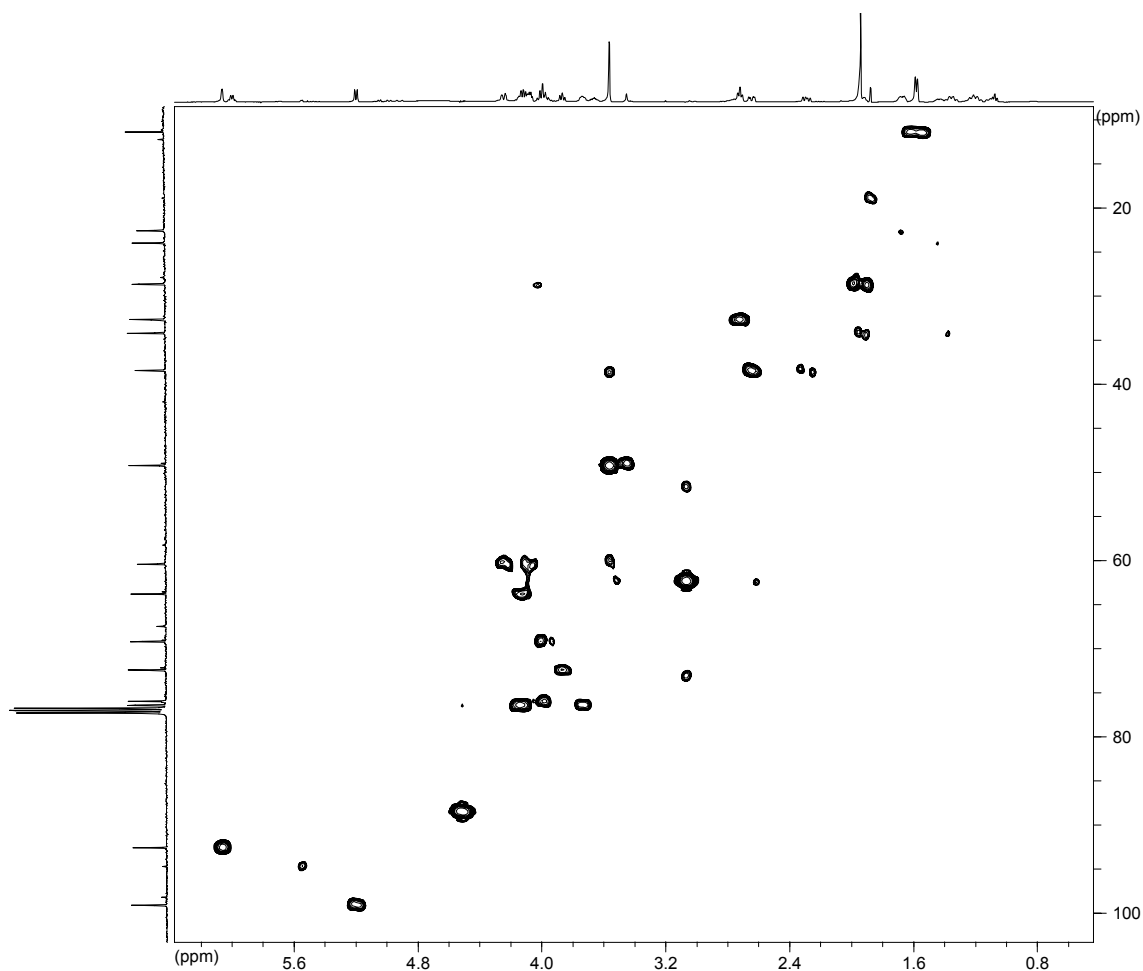
Η συνολική coherence θα είναι: $p_1 = (0, +1, +2, 0, -1)$ και $p_2 = (0, +1, 0, -2, -1)$. Η τροποποιημένη coherence, σύμφωνα με την εξίσωση 2.2, θα είναι: $p_1' = (0, +1, +1.25, -0.75, -1)$ και $p_2' = (0, +1, +0.75, -1.25, -1)$. Σύμφωνα με τη συνθήκη 2.3, η σχετική ένταση των βαθμωτών πεδίων, G_1, G_2, G_3 , υπολογίζεται από τις εξισώσεις:

$$1.25G_1 t_1 - 0.75G_2 t_2 - G_3 t_3 = 0 \quad (2.5\alpha)$$

$$0.75G_1 t_1 - 1.25G_2 t_2 - G_3 t_3 = 0 \quad (2.5\beta)$$

Αν θεωρήσουμε ότι η διάρκεια των βαθμωτών πεδίων είναι η ίδια, τότε διαφορετικές σχετικές εντάσεις βαθμωτών πεδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή της διαδρομής των coherences. Για παράδειγμα για τη διαδρομή p_1' , μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι σχετικές εντάσεις $G_1:G_2:G_3 = 2:2:1, 0:4:-3, 4:0:5, 3:5:0$, ενώ για τη διαδρομή p_2' , μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι σχετικές εντάσεις $G_1:G_2:G_3 = 2:2:-1, 4:0:3, 0:4:-5, 5:3:0$.

Μια ακόμα παρατήρηση στο σχήμα 2.11 αφορά την ακολουθία GARP (Globally optimized Alternating-phase Rectangular Pulses), η οποία χρησιμοποιείται κατά την περίοδο ανάχνευσης για την εστίαση των ανυσμάτων του ετεροπυρήνα, τα οποία περιστρέφονται με διαφορά φάσης λόγω σύζευξης με τα πρωτόνια. Το σχήμα 2.12, απεικονίζει ένα φάσμα gHMQC μεταξύ πρωτονίου και άνθρακα. Το διάστημα Δ_1 έχει επιλεγεί κατάλληλα, ώστε το πείραμα να συσχετίζει χημικές μετατοπίσεις μέσω σύζευξης ενός δεσμού πρωτονίου-άνθρακα.



Σχήμα 2.12 Φάσμα H,C -gHMBC της ελευρωπαΐνης

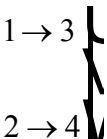
2.8 Φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Enhancement)

Είναι γνωστό ότι η ένταση του σήματος NMR ενός πρωτονίου μεταβάλλεται όταν ακτινοβολείται το σήμα ενός γειτονικού μαγνητικά μη ισοδύναμου πρωτονίου.⁶¹ Η μεταβολή της έντασης του σήματος είναι γνωστή ως φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των μαγνητικών ροπών των δυο πρωτονίων (αλληλεπίδραση δίπολο-δίπολο), η οποία διαμορφώνεται από την περιστροφική κίνηση του μορίου στο διάλυμα. Επειδή η αλληλεπίδραση δίπολο-δίπολο συμβαίνει στο χώρο και εξαρτάται από το αντίστροφο της έκτης δύναμης της απόστασης των πρωτονίων, μας επιτρέπει έναν έμμεσο προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής ενός μορίου, ή την ανάλυση των διαμορφώσεών του. Παράλληλα, η εξάρτηση του NOE από το αντίστροφο της έκτης δύναμης της απόστασης υποδηλώνει τη μείωση των αλληλεπιδράσεων δίπολο – δίπολο με αυτήν και συνεπώς περιορίζει την ακρίβεια της ανάλυσης για πρωτόνια, τα οποία απέχουν στο χώρο $<6\text{\AA}$.

2.8.1 ΟΜΟΠΥΡΗΝΙΚΟ NOE

Το σχήμα 2.13 παρουσιάζει το διάγραμμα των ενεργειακών σταθμών ενός συστήματος δυο πρωτονίων I και S. Στο διάγραμμα απεικονίζεται επίσης η κατανομή κατά Boltzmann των πληθυσμών των δυο πρωτονίων στην κατάσταση ισορροπίας. Για λόγους απλότητας υποθέτουμε ότι τα δυο πρωτόνια δεν εμφανίζουν σύζευξη σπιν-σπιν. Έτσι, το φάσμα NMR του συστήματος των δυο πρωτονίων θα εμφανίζει μια μόνο κορυφή για το πρωτόνιο I, επειδή οι μεταπτώσεις $1 \rightarrow 3$ και $2 \rightarrow 4$ συνοδεύονται από την ίδια ενέργεια. Για τον ίδιο λόγο παρατηρείται μια κορυφή για το πρωτόνιο S στο φάσμα NMR (οι μεταπτώσεις $1 \rightarrow 2$ και $3 \rightarrow 4$ έχουν την ίδια ακριβώς ενέργεια). Οι αντίστοιχες πιθανότητες μετάπτωσης W_{11} και W_{1S} απεικονίζονται στο σχήμα 2.13. Οι μεταπτώσεις W_{11} και W_{1S} είναι επιτρεπτές σύμφωνα με τον κανόνα επιλογής $\Delta m_I = \pm 1$ και οι αντίστοιχες πιθανότητες ονομάζονται πιθανότητες μετάπτωσης ενός κβάντου. Οι μεταπτώσεις $1 \rightarrow 4$ και $2 \rightarrow 3$ θεωρούνται απαγορευμένες γιατί απαιτούν δυο κβάντα ($\Delta m_I = \pm 2$) και μηδέν κβάντα ($\Delta m_I = 0$) ενέργειας, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες πιθανότητες W_2 και W_0 ονομάζονται πιθανότητες δύο και μηδέν κβάντων αντίστοιχα. Οι μεταπτώσεις W_2 και W_0 δεν παρατηρούνται στο πείραμα, αλλά ανιχνεύονται έμμεσα κατά τη διαδικασία της αποδιέγερσης. Συνοψίζοντας και λαμβάνοντας υπ' όψη τη διαφορά των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες, έχουμε:

Μεταπτώσεις πρωτονίου I:

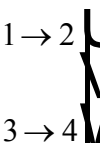


$1 \rightarrow 3$

$2 \rightarrow 4$

Διαφορά πληθυσμών = 2

Μεταπτώσεις πρωτονίου S:



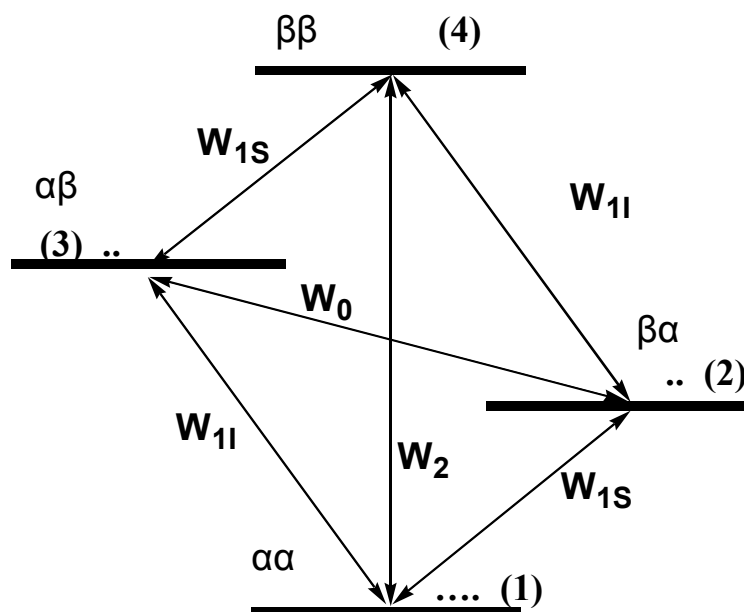
$1 \rightarrow 2$

$3 \rightarrow 4$

Διαφορά πληθυσμών = 2

Μετάπτωση W_2 : $1 \rightarrow 4$, Διαφορά πληθυσμών = 4

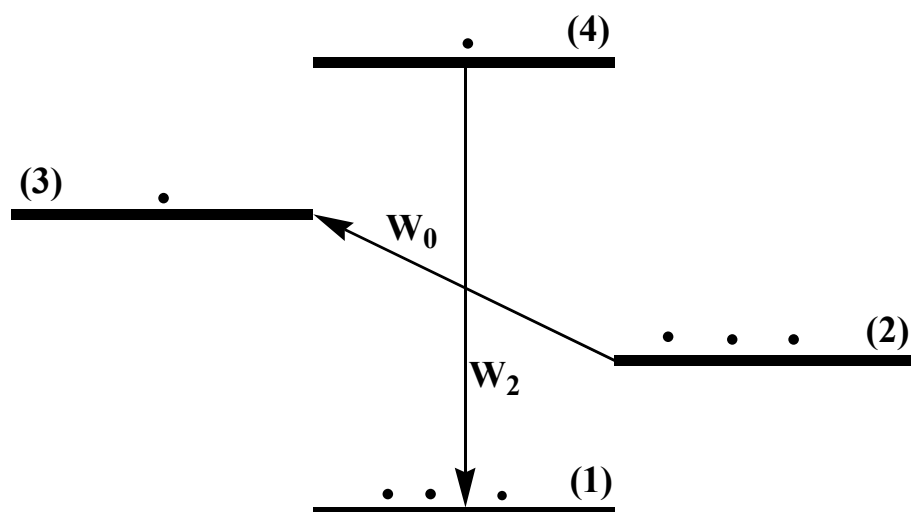
Μετάπτωση W_0 : $2 \rightarrow 3$, Διαφορά πληθυσμών = 0



Σχήμα 2.13 Ενεργειακά επίπεδα και πιθανότητες μετάπτωσης ενός συστήματος δύο πυρήνων I και S. Τα σύμβολα α, β υποδηλώνουν αντίστοιχα παράλληλη και αντιπαράλληλη κατεύθυνση της μαγνητικής ροπής των πυρηνικών σπιν ως προς την ένταση του εξωτερικού πεδίου B_0 .

Η διαφορά των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες αντιστοιχεί στην μαγνήτιση των πυρήνων, η οποία στην κατάσταση ισορροπίας έχει τη μέγιστη τιμή, έστω M_I και M_S για τα δυο πρωτόνια I και S.

Κατά την εκτέλεση ενός πειράματος NOE εξαναγκάζουμε τη διαφορά των πληθυσμών μεταξύ δυο ενεργειακών σταθμών να μεταβληθεί, δηλαδή εκτρέπουμε το σύστημα από την κατάσταση ισορροπίας. Το συνηθέστερο πείραμα είναι η ακτινοβολήση του ενός πρωτονίου με ένα μαγνητικό πεδίο μέχρι κορεσμού (ισοκατανομή των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες) και η παρατήρηση της ανακατανομής των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες του άλλου πρωτονίου. Στο σχήμα 2.14 παρουσιάζεται η νέα κατανομή των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες μετά την ακτινοβολήση του πρωτονίου S. Ιδιαίτερη πρόνοια πρέπει να ληφθεί ώστε η διάρκεια της ακτινοβολήσης να είναι πολύ σύντομη και συνεπώς να μην επηρεάζεται το σύστημα από φαινόμενα αποδιέγερσης.



Σχήμα 2.14 Ανακατανομή των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες μετά την ακτινοβόληση του πρωτονίου S.

Η διαφορά των πληθυσμών στις ενεργειακές στάθμες μετά την ακτινοβόληση και ανακατανομή των πληθυσμών θα είναι:

$$\begin{array}{l} \text{Μετάπτωση πρωτονίου I:} \\ \begin{array}{l} 1 \rightarrow 3 \\ 2 \rightarrow 4 \end{array} \quad \left. \begin{array}{l} | \\ | \\ | \end{array} \right\} \text{Διαφορά πληθυσμών} = 2 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Μετάπτωση πρωτονίου S:} \\ \begin{array}{l} 1 \rightarrow 2 \\ 3 \rightarrow 4 \end{array} \quad \left. \begin{array}{l} | \\ | \\ | \end{array} \right\} \text{Διαφορά πληθυσμών} = 0 \end{array}$$

$$\text{Μετάπτωση } W_2: \quad 1 \rightarrow 4, \quad \text{Διαφορά πληθυσμών} = 2$$

$$\text{Μετάπτωση } W_0: \quad 2 \rightarrow 3, \quad \text{Διαφορά πληθυσμών} = 2$$

Το φάσμα NMR θα παρουσιάζει μια κορυφή για το πρωτόνιο I με την ίδια ακριβώς ένταση την οποία είχε πριν από το πείραμα, ενώ θα απουσιάζει η κορυφή του πρωτονίου S λόγω κορεσμού. Παρατηρούμε δηλαδή ότι δεν εμφανίζεται μεταβολή της έντασης του πρωτονίου I μετά την ακτινοβόληση, έστω και αν η αποδιέγερση συνέβαινε με πιθανότητα ενός κβάντου, W_{11} . Η κατάσταση αλλάζει ριζικά αν συνεχισθεί η ακτινοβόληση του πρωτονίου S για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Μια νέα κατανομή πληθυσμών εμφανίζεται προοδευτικά μεταξύ των ενεργειακών σταθμών καθώς αρχίζει να συμβαίνει αποδιέγερση μεταξύ των σταθμών 1,4 και 2,3 (σχήμα 2.14). Η διεργασία αποδιέγερσης W_2 μεταφέρει πληθυσμούς πρωτονίων (μεταφορά μαγνήτισης) από τη στάθμη 4 στη στάθμη 1, προσπαθώντας να επαναφέρει το σύστημα στην αρχική ισορροπία (διαφορά πληθυσμών = 4). Η αύξηση όμως του πληθυσμού των πρωτονίων στη στάθμη 1 αυξάνει την ένταση του

σήματος του πρωτονίου I. Αντίθετα, η διεργασία αποδιέγερσης W_0 , μεταφέρει μαγνήτιση από τη στάθμη 2 στην στάθμη 3, προσπαθώντας να επαναφέρει την αρχική διαφορά των πληθυσμών (διαφορά πληθυσμών=0), μεταξύ των δυο καταστάσεων. Αποτέλεσμα αυτής της διεργασίας είναι η αύξηση του πληθυσμού των πρωτονίων I στη στάθμη 3 και ελάττωση στη στάθμη 2 και ως εκ τούτου μείωση της συνολικής έντασης του σήματος του πρωτονίου I. Το καθαρό αποτέλεσμα (αύξηση ή ελάττωση της έντασης του σήματος) εξαρτάται από την ανταγωνιστικότητα των δυο διεργασιών αποδιέγερσης W_2 και W_0 . Ποια από τις δυο διεργασίες υπερισχύει εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η απόσταση μεταξύ των δυο πρωτονίων, η ύπαρξη και η γεωμετρική διευθέτηση άλλων γειτονικών πρωτονίων και το μέγεθος του μορίου. Σε κάθε περίπτωση όμως, η μεταφορά μαγνήτισης και η ανάπτυξη (ή το κτίσιμο) του NOE εξαρτάται από τη διάρκεια της ακτινοβολίας.

Πριν προχωρήσουμε στην ποσοτική ανάλυση του φαινομένου NOE, να σημειώσουμε ότι οι διαδικασίες αποδιέγερσης W_{11} και W_{1S} αντιπροσωπεύουν την αποδιέγερση σπιν-πλέγμα ή διαμήκη αποδιέγερση (spin-lattice ή longitudinal relaxation), ενώ οι διεργασίες W_2 και W_0 περιγράφουν τη λεγόμενη διασταυρούμενη αποδιέγερση (cross-relaxation).

Το NOE στην κατάσταση ισορροπίας για το πρωτόνιο I.

$$\eta = \frac{\gamma_S \sigma_{IS}}{\gamma_I \rho_I} \quad (2.14)$$

Αν το σύστημα είναι ομοπυρηνικό θα ισχύει $\gamma_S = \gamma_I$, οπότε:

$$\eta = \frac{\sigma_{IS}}{\rho_I} \quad (2.15)$$

Εάν αντικαταστήσουμε τις ταχύτητες αποδιέγερσης, λαμβάνουμε το NOE συναρτήσει των πιθανοτήτων μετάπτωσης, δηλαδή:

$$\eta = \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_{1I} + W_2} \quad (2.16)$$

Όταν $W_2 > W_0$, τότε το NOE είναι θετικό, ενώ είναι αρνητικό όταν $W_2 < W_0$ και μηδέν όταν $W_2 = W_0$.

Αλλά από τι εξαρτάται το μέγεθος των τιμών των διαφορών πιθανοτήτων μετάπτωσης; Η κβαντομηχανική ανάλυση του φαινομένου της αποδιέγερσης συνδέει τις πιθανότητες μετάπτωσης με τη μοριακή κίνηση. Η μοριακή κίνηση διαμορφώνει τις αλληλεπιδράσεις δίπολο-δίπολο και δημιουργεί τοπικά πεδία τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αποδιέγερση εάν η συχνότητά τους είναι ίση ή σχεδόν ίση με τη συχνότητα $Larmor$ των πυρήνων. Χωρίς τα τοπικά πεδία, το πλέγμα όπως αποκαλούνται, δεν υπάρχει διαμήκης αποδιέγερση.

Η μέγιστη τιμή του NOE, είναι $\eta = 1/2$. Για μικρού μεγέθους μόρια, ή σε μη ιξώδη διαλύματα, ισχύει $W_2 > W_0$ και το NOE είναι θετικό, δηλαδή παρατηρούμε αύξηση στις

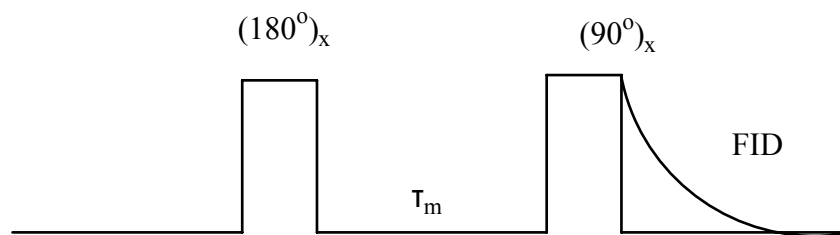
εντάσεις των κορυφών κατά το πείραμα NOE. Αντίθετα για μεγάλου μεγέθους μόρια (π.χ. πολυμερή), ισχύει $W_2 < W_0$ και το NOE είναι αρνητικό. Υπάρχει όμως και η δυσμενής περίπτωση κατά την οποία οι δύο πιθανότητες W_2 και W_0 μπορεί να έχουν παραπλήσια τιμή, γεγονός που οδηγεί σε αμελητέο NOE.

Στην περιοχή κινητικής στένωσης $\omega t \ll 1$ $\eta = 1/2$, το NOE δεν εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ δύο απομονωμένων πρωτονίων. Πράγματι, είναι αδύνατον να υπολογιστεί η απόσταση μεταξύ δύο απομονωμένων πρωτονίων με το πείραμα NOE. Θα πρέπει να υπάρχουν και άλλες ανταγωνιστικές πηγές αποδιέγερσης, ώστε το NOE να δείξει εξάρτηση από την απόσταση. Τέτοιες πηγές αποδιέγερσης είναι γειτονικοί πυρήνες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με το σύστημα των δύο πυρήνων με το μηχανισμό δίπολο-δίπολο.

Σε ένα μεγάλο μόριο με πολλά πρωτόνια είναι απίθανο να θεωρηθεί ότι κάθε ζεύγος πρωτονίων i και j είναι απομονωμένο από κάποιο γειτονικό πρωτόνιο k . Στην πραγματικότητα υπάρχει ένα δίκτυο πρωτονίων μεταξύ των οποίων ανταλλάσσεται μαγνήτιση κατά την αποδιέγερση δίπολο-δίπολο. Έτσι, το πείραμα NOE στην κατάσταση ισορροπίας αντανακλά ένα δίκτυο διεργασιών διασταυρούμενης αποδιέγερσης.

Στην περίπτωση δικτύου πυρήνων, ενδιαφέρον παρουσιάζει όχι η τιμή του NOE στην κατάσταση ισορροπίας, αλλά η ταχύτητα με την οποία αναπτύσσεται (ή κτίζεται) το NOE. Αυτή η προτίμηση οφείλεται στο γεγονός ότι το NOE σε ένα δίκτυο πρωτονίων εξαρτάται από ένα πλήθος διαδρομών αποδιέγερσης με συνέπεια να είναι δύσκολη η ερμηνεία του, εφ'όσον απαιτεί το διαχωρισμό όλων των συνεισφορών δίπολο-δίπολο. Η κατάσταση απλοποιείται όταν λάβουμε υπ'όψη μας την αρχική ταχύτητα ανάπτυξης του NOE κατά την οποία η ανάπτυξη του NOE οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην διασταυρούμενη αποδιέγερση μεταξύ ενός γειτονικού ζεύγους πρωτονίων. Η μέθοδος της αρχικής ταχύτητας ανάπτυξης του NOE είναι προσεγγιστική, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις είναι ικανοποιητική για τον υπολογισμό ενδοπρωτονιακών αποστάσεων.

Η ταχύτητα ανάπτυξης του NOE μπορεί να μετρηθεί με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως το NOE ισορροπίας, χρησιμοποιώντας όμως μεταβλητό χρόνο κορεσμού των πυρήνων. Επειδή όμως ο κορεσμός δεν επιτυγχάνεται ακαριαία, η ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι αρκετά περίπλοκη διότι απαιτεί υπολογιστικό μοντέλο το οποίο θα πρέπει να λαμβάνει υπ'όψη του τόσο το κτίσιμο του NOE, όσο και τη διάρκεια κορεσμού. Για να αποφύγουμε αυτή τη δυσκολία καταφεύγουμε στην επιλεκτική αναστροφή των πληθυσμών ενός πυρήνα με έναν παλμό $(180^\circ)_x$, η οποία συνοδεύεται από μια περίοδο αναμονής τ_m κατά την οποία γίνεται η ανακατανομή της μαγνήτισης στις διάφορες ενεργειακές στάθμες του πυρήνα. Η ανάπτυξη του NOE ανιχνεύεται με έναν παλμό $(90^\circ)_x$ μετά το πέρας της περιόδου τ_m . Το πείραμα επαναλαμβάνεται για αυξανόμενες τιμές τ_m , ώστε να καταγραφεί η πλήρης ανάπτυξη του NOE. Η πειραματική διάταξη αυτής της μεθόδου η οποία ονομάζεται transient NOE⁵⁹, απεικονίζεται σχηματικά στο σχήμα 2.15.



Σχήμα 2.15 Παλμική ακολουθία της μεθόδου transient NOE.

Η μέθοδος transient NOE παρουσιάζει ορισμένα πρακτικά προβλήματα:

(α) χρειάζεται επιλεκτικό παλμό 180° για την αναστροφή ενός και μόνο σήματος κάθε φορά, γεγονός που αυξάνει τη διάρκεια του πειράματος. Αυτή αυξάνεται ακόμα περισσότερο στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αρκετές τιμές της χρονικής περιόδου t_m για τη μελέτη της πλήρους ανάπτυξης του NOE.

(β) Όπως και στον επιλεκτικό κορεσμό του σήματος, η επιλεκτική αναστροφή καθίσταται προβληματική στην περίπτωση επικάλυψης κορυφών ή παρουσία ισχυρής σύζευξης.

(γ) Χρειάζονται περισσότερες επαναλήψεις του πειράματος για μικρές τιμές t_m , επειδή η ευαισθησία του σήματος (S/N) είναι χαμηλή λόγω της μικρής ανάπτυξης του NOE στις αρχικές τιμές t_m .

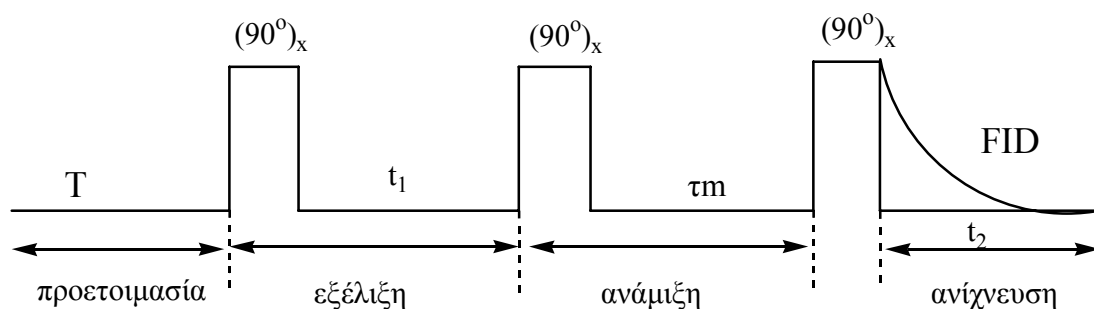
Ορισμένα από τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίζονται επιτυχώς με το αντίστοιχο πείραμα της φασματοσκοπίας NMR δυο διαστάσεων.

2.8.2 ΟΜΟΠΥΡΗΝΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ 2D-NOE ή NOESY

Το δισδιάστατο πείραμα NOE (2D NOE ή NOESY) πραγματοποιείται με την ακολουθία παλμών⁵⁹:

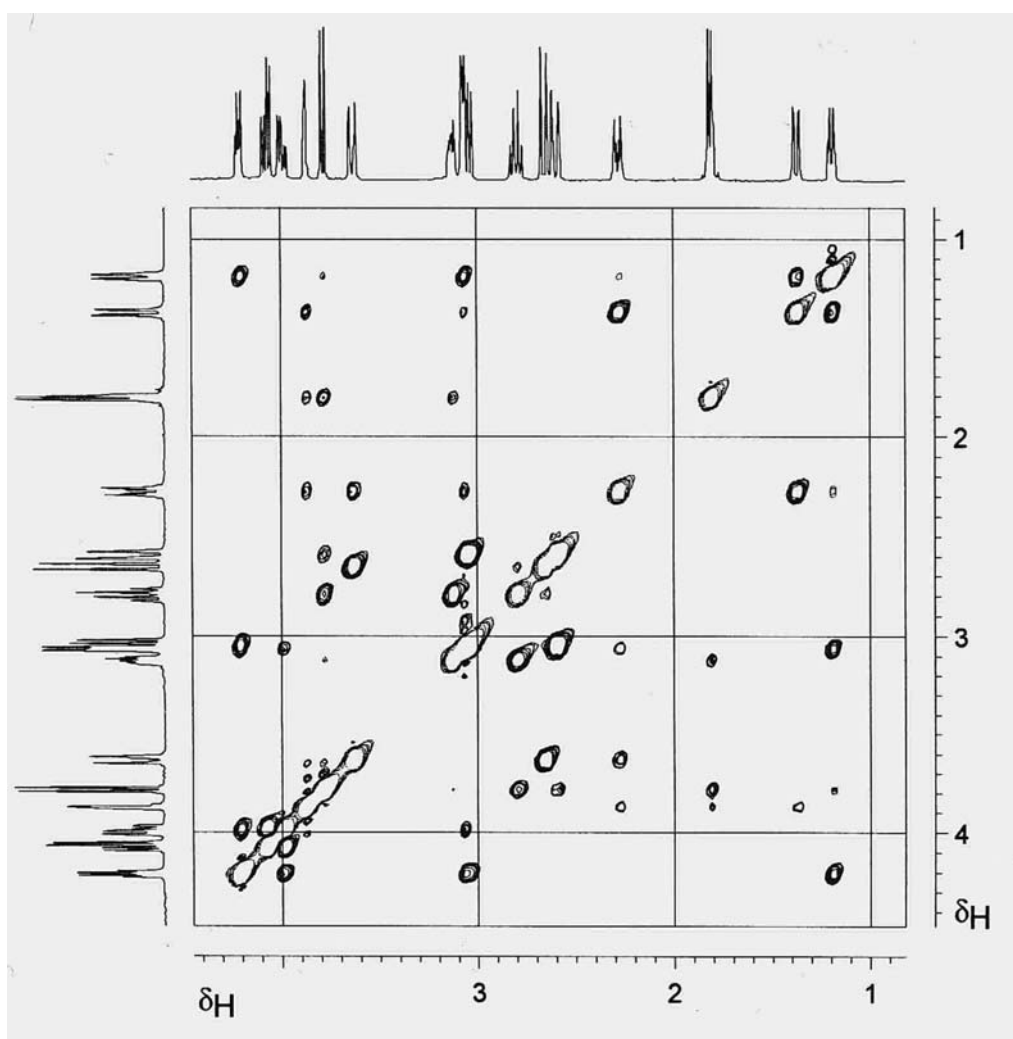
$$\mathbb{M} (90^\circ)_x - t_1 - (90^\circ)_x - t_m - (90^\circ)_x - t_2 \mathbf{r}_n \quad (83)$$

η οποία απεικονίζεται σχηματικά στο σχήμα 2.16. Μετά την περίοδο προετοιμασίας (χρόνος αναμονής T) κατά την οποία όλοι οι πυρήνες βρίσκονται στην κατάσταση ισορροπίας (M_0), εφαρμόζεται παλμός 90° στον άξονα x. Ο παλμός εκτρέπει τη μαγνήτιση στο επίπεδο xy. Κατά τη διάρκεια του χρόνου εξέλιξης t_1 , η οριζόντια μαγνήτιση αναλύεται στις συνιστώσες της, οι οποίες περιστρέφονται με τις συχνότητες Larmor κάθε πυρήνα. Οι γωνίες περιστροφής των συνιστωσών μαγνητίσεων γύρω από τον άξονα y εξαρτώνται από τις συχνότητες Larmor και τη χρονική διάρκεια t_1 .



Σχήμα 2.16 Παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY.

Στο τέλος της περιόδου της εξέλιξης εφαρμόζεται ένας δεύτερος παλμός $(90^\circ)_x$, ο οποίος δημιουργεί μαγνήτιση κατά τον άξονα z. Κατά την περίοδο ανάμιξης t_m , γίνεται μεταφορά μαγνήτισης από το ένα πρωτόνιο στο άλλο μέσω της διασταυρούμενης αποδιέγερσης. Ο τρίτος παλμός $(90^\circ)_x$ επαναφέρει τη μαγνήτιση στο επίπεδο xy, η οποία ανιχνεύεται κατά την περίοδο ανίχνευσης t_2 . Η προκύπτουσα FID περιέχει όλες τις πληροφορίες της συμπεριφοράς των πρωτονίων κατά τη διάρκεια των περιόδων εξέλιξης και ανάμιξης. Με άλλα λόγια περιέχει το κτίσιμο του NOE του δικτύου των σπιν κατά το χρόνο



Σχήμα 2.17 Φάσμα ^1H , ^1H NOESY της στρυχνίνης.

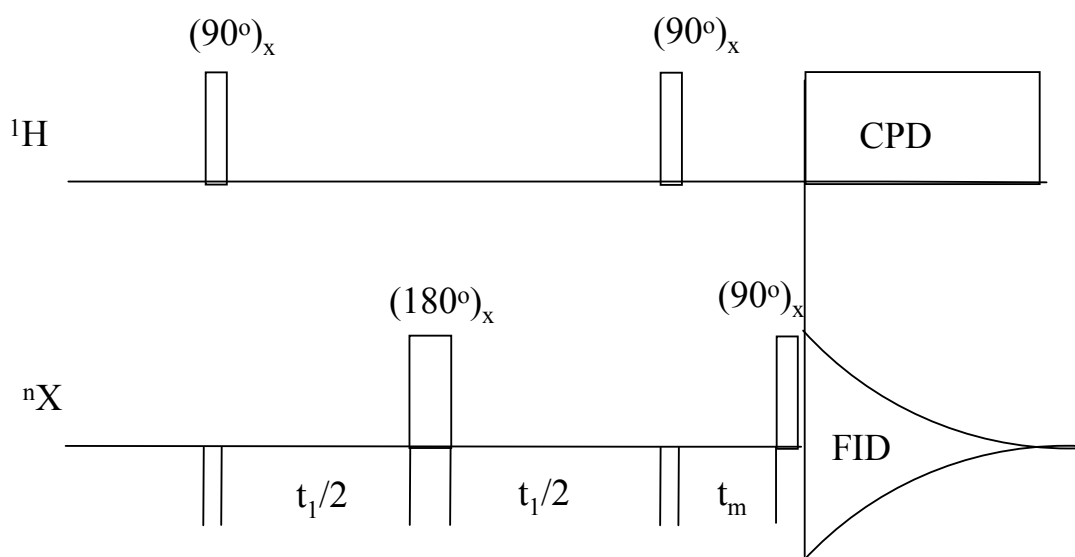
ανάμιξης τ_m . Το πείραμα μπορεί να επαναληφθεί με έναν αυξανόμενο αριθμό τ_m , ώστε να καταγραφεί η πλήρης ανάπτυξη του NOE, όπως ακριβώς στην περίπτωση του transient NOE.

Για δεδομένο χρόνο τ_m , το πείραμα επαναλαμβάνεται αυξάνοντας σταδιακά τον χρόνο εξέλιξης. Έτσι λαμβάνουμε μια σειρά από FID, οι οποίες εξαρτώνται από τους χρόνους t_1 και t_2 (δισδιάστατο πείραμα). Το δισδιάστατο φάσμα NOESY προκύπτει από έναν διπλό μετασχηματισμό Fourier. Στο φάσμα παρατηρούμε δυο είδη κορυφών: (α) τις κορυφές επί της διαγωνίου ή διαγώνιες κορυφές (diagonal peaks) και (β) τις κορυφές εκτός της διαγωνίου (off diagonal peaks) ή διασταυρούμενες κορυφές (cross peaks). Οι διαγώνιες κορυφές αντιστοιχούν ακριβώς στις συχνότητες συντονισμού των πρωτονίων και υποδηλώνουν μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ ισοδυνάμων πρωτονίων. Οι εκτός διαγωνίου κορυφές είναι συμμετρικές ως προς τη διαγώνιο και υποδηλώνουν μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ μη ισοδυνάμων πρωτονίων. Με άλλα λόγια συνδέουν μαγνητικά μη ισοδύναμα πρωτόνια τα οποία αποδιεγείρονται με τη διασταυρούμενη αποδιέγερση.

Το πιο σημαντικό στοιχείο του φάσματος NOESY είναι οι διασταυρούμενες κορυφές του, οι οποίες αντανακλούν την ανάπτυξη του NOE στο δίκτυο των πρωτονίων. Επειδή η ανάπτυξη του NOE απαιτεί η απόσταση στο χώρο μεταξύ των πρωτονίων που αλληλεπιδρούν να είναι μικρή ($<6 \text{ \AA}$) οι διασταυρούμενες κορυφές του NOESY μας αποκαλύπτουν ζεύγη ^1H που είναι γειτονικά στο χώρο. Η πληροφορία αυτή είναι σημαντική για τη διευκρίνιση της δομής και της διαμόρφωσης μίας χημικής ένωσης.

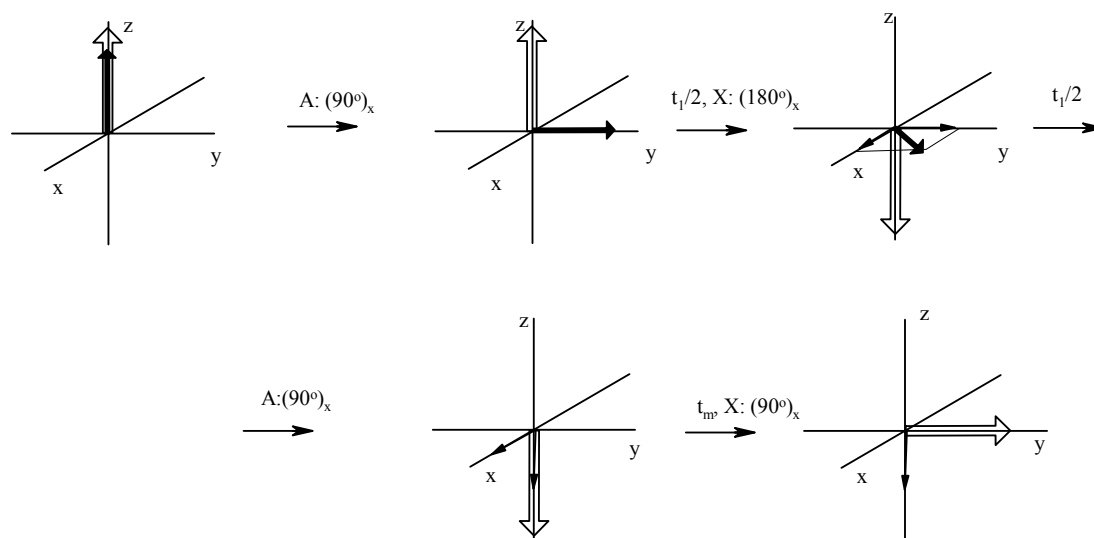
2.8.3 ΕΤΕΡΟΠΥΡΗΝΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ 2D-NOE ή HOESY

Το πείραμα HOESY⁵⁹ στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις διπόλο-δίπολο ενός ετεροπυρηνικού συστήματος σπιν, και δίνει πληροφορίες για την χωρική συσχέτιση των πυρήνων αυτών.



Σχήμα 2.18 Παλμική ακολουθία HOESY

Η παλμική ακολουθία HOESY (σχήμα 2.18) μπορεί να περιγραφεί με το ανυσματικό μοντέλο. Έστω ένα σύστημα σπιν HX. Ο πρώτος παλμός $(90^\circ)_x$ στέλνει τη μαγνήτιση των πρωτονίων (H) στον άξονα y' . Στη συνέχεια εξελίσσονται οι χημικές μετατοπίσεις κατά τη διάρκεια του χρόνου t_1 . Ο παλμός $(180^\circ)_x$ στο μέσο της χρονικής διάρκειας t_1 , μετατοπίζει τη μαγνήτιση του πυρήνα X στον άξονα $-z$, εξουδετερώνοντας έτσι τη σύζευξη σπιν-σπιν μεταξύ των πυρήνων H και X. Ένας δεύτερος παλμός $(90^\circ)_x$ στον πυρήνα H εφαρμόζεται μετά το πέρας του χρόνου t_1 , ο οποίος αναστρέφει τη μαγνήτιση των πυρήνων H στον αρνητικό άξονα z , όπου βρίσκεται η μαγνήτιση των πυρήνων X. Κατά τη διάρκεια του χρόνου μίξης t_m , δίνεται η δυνατότητα στο σύστημα πυρήνων HX να αλληλεπιδράσει μέσω του φαινομένου NOE (σύζευξη δίπολο-δίπολο). Ο τελευταίος παλμός $(90^\circ)_x$ δημιουργεί μαγνήτιση του πυρήνα X στο επίπεδο xy , η οποία μπορεί και ανιχνευεται. Η παλμική ακολουθία του σχήματος 2.17 επαναλαμβάνεται για διαφορετικές τιμές του χρόνου t_1 , μεταβάλλοντας έτσι το μέγεθος της μαγνήτισης των πρωτονίων που “αναμιγνύεται” με αυτήν του πυρήνα X κατά την περίοδο μίξης t_m . Αν δύο πυρήνες HX βρίσκονται κοντά στο χώρο, τότε μέρος της μαγνήτισης των πρωτονίων (η οποία εξαρτάται από τη χημική μετατόπιση του ^1H) μεταφέρεται στον πυρήνα X, με αποτέλεσμα η ανιχνευόμενη FID να εξαρτάται από τις συχνότητες ν_A και ν_X , και να εμφανίζεται η αντίστοιχη διασταυρούμενη κορυφή στο φάσμα HOESY. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν κορυφές επί της διαγωνίου στα φάσματα 2D-HOESY.



Σχήμα 2.19 Ανυσματικό διάγραμμα της ακολουθίας παλμών HOESY

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

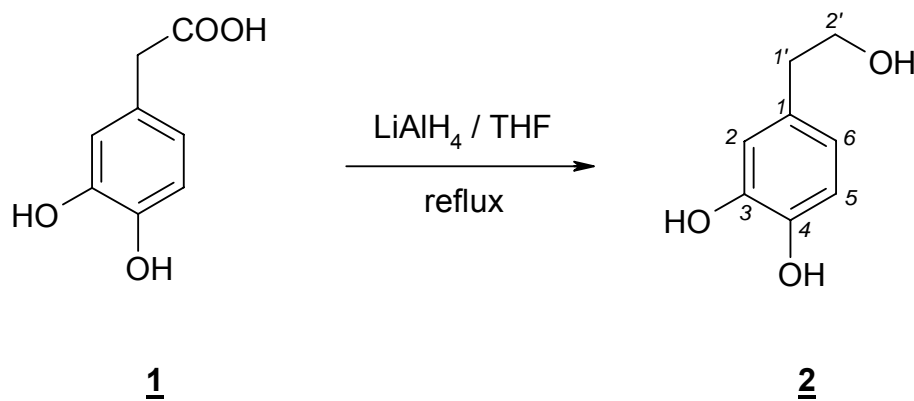
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 περιεκτικότητας σε δευτέριο 99,8 % και πυριδίνη καθαρότητας 99,5%, οι οποίοι αγοράστηκαν από τη MERCK. Το αντιδραστήριο φωσφόρου, 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο (I) (95%), αγοράστηκε από την Fluka Chem. Co. Για την προστασία των διαλυμάτων προτύπων από την υγρασία χρησιμοποιήθηκαν Molecular SievesTM διαμέτρου σφαιρών 0,5 nm και μεγέθους 2 mm οι οποίες αγοράστηκαν, επίσης, από την MERCK. Η κυκλοεξανόλη (99%) και το τρις(ακετυλοακετονικό) χρώμιο (97%) $[\text{Cr}(\text{acac})_3]$ αγοράστηκαν από την ALDRICH. Η ελευρωπαϊνή αγοράστηκε από την Extrasynthese. Από την ALDRICH αγοράστηκαν οι πρότυπες ουσίες: τυροσόλη (98%), ομοβανιλικό οξύ (98%), σικιμικό οξύ (98%), φερουλικό οξύ (99%), καφεϊκό οξύ (97%), σιναπικό οξύ (98%), 3-ύδροξυ-4-μέθοξυ κινναμικό οξύ (97%), απιγενίνη (95%), καρβακρόλη (98%), συριγλικό οξύ (98%), γαλλικό οξύ (97%), γεντιστικό οξύ (98%), και θυμόλη (98%). Από την SIGMA αγοράστηκαν οι πρότυπες ενώσεις: p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4 διυδροξυβενζοϊκό οξύ, ο-κουμαρικό, p-κουμαρικό, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ. Η μεθανόλη (99.8%), το εξάνιο, το μεικτό υδρίδιο λιθίου, το υδροχλώριο (HCl 37% σε νερό) και το θειϊκό νάτριο NaSO_4 αγοράστηκαν από την MERCK.

3.2 Σύνθεση της Υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη **2** παρασκευάστηκε με την αναγωγή του 3,4-διυδροξυβενζυλοξικού οξέος **1** με υδρίδιο του λιθίου-αργιλίου, LiAlH_4 σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα 3.1:^{62, 63}



Σχήμα 3.1 Παρασκευή υδροξυτυροσόλης

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 250 ml με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα προστέθηκαν 1.05g της ένωσης **1** διαλυμένα σε 30 ml τετραυδροφουρανίου, THF, υπό συνεχή ροή αερίου αζώτου. Ακολούθησε η στάγδην προσθήκη 0.5g LiAlH_4 διαλυμένου σε 100 ml THF σε διάστημα 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας υδατόλουτρο για την ψύξη του διαλύματος. Στη συνέχεια το λουτρό νερού θερμάνθηκε στους 70 °C και η αντίδραση θερμάνθηκε στους 70 °C υπο αναρροή για 2h. Το μείγμα ψύχθηκε με πάγο και στη φιάλη προστέθηκαν 50 ml H_2O και 10 ml HCl (6%) για την εξουδετέρωση της περισσειας του LiAlH_4 και τη διάσπαση του συμπλόκου του με το προϊόν της αντίδρασης. Το μείγμα της αντίδρασης διηθήθηκε, η όξινη υδατική στοιβάδα διαχωρίστηκε από την οργανική στοιβάδα και εκχυλίστηκε με οξεϊκό αιθυλεστέρα (3 x 50ml). Τα εκχυλίσματα ξηράθηκαν με θειϊκό νάτριο, Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν αρχικά σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotavap) και στη συνέχεια σε αντλία κενού. Το υπόλειμμα διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με silica gel χρησιμοποιώντας διαλύτη έκλουσης μείγμα 1:1 πετρελαϊκού αιθέρα/οξεϊκού αιθυλεστέρα. Παραλήφθηκαν 0.26g (30%) άχρωμο ελαίω **2**. - ^1H NMR [acetone- d_6]: δ 2.75(t, $^3J_{1',2'} = 7.5$, 2H, H-1'), 4.2 (t, $^3J_{1',2'} = 7.5$, 2H, H-2'), 6.58 (dd, $^3J_{5,6} = 6.9$, $^4J_{2,6} = 2.0$, 1H, H-6), 6.73 (m, 2H, H-2,5). ^{13}C NMR [acetone- d_6]: δ 39.10 (C-1'), 63.61 (C-2'), 115.31 (C-2), 116.25 (C-5), 120.43 (C-6), 131.37 (C-1), 143.49 145.05 (C-2, C-3).

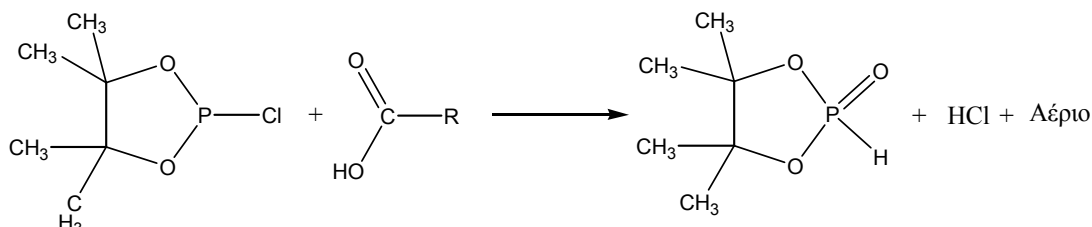
3.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος. Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml ζυγίστηκαν 13.5 mg κυκλοεξανόλης (14.47 μM). Σε άλλο φιαλίδιο ζυγίστηκαν 0.6 mg $\text{Cr}(\text{acac})_3$ (0.165 μM), και προστέθηκαν 6.15 ml ξηρής πυριδίνης και 3.85 ml CDCl_3 (1.6:1 v/v). Η παρουσία του χλωροφορμίου δεν επιτρέπει τον σχηματισμό του άλατος πυριδίνης-HCl. Το μείγμα των διαλυτών αναδεύθηκε και προστέθηκε στην ογκομετρική φιάλη. Το πρότυπο διάλυμα προστατεύθηκε από την υγρασία με την προσθήκη 5A μοριακών κόσκινων (molecular sieves).

Αντίδραση φωσφιτυλίωσης πρότυπων φαινολικών ενώσεων. Ποσότητες 0.1-3 mg των πρότυπων ενώσεων (ανάλογα με το μοριακό βάρος και τον αριθμό των -OH ανά μόριο)

ζυγίστηκαν απ' ευθείας σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5 mm, και στη συνέχεια προστέθηκαν 0.4 ml του πρότυπου διαλύματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10-50 μl αντιδραστήριου I (σχήμα 1.5), ανάλογα με το μοριακό βάρος και τον αριθμό των -OH ανά μόριο πρότυπης ένωσης. Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη λήψη των φασμάτων NMR.

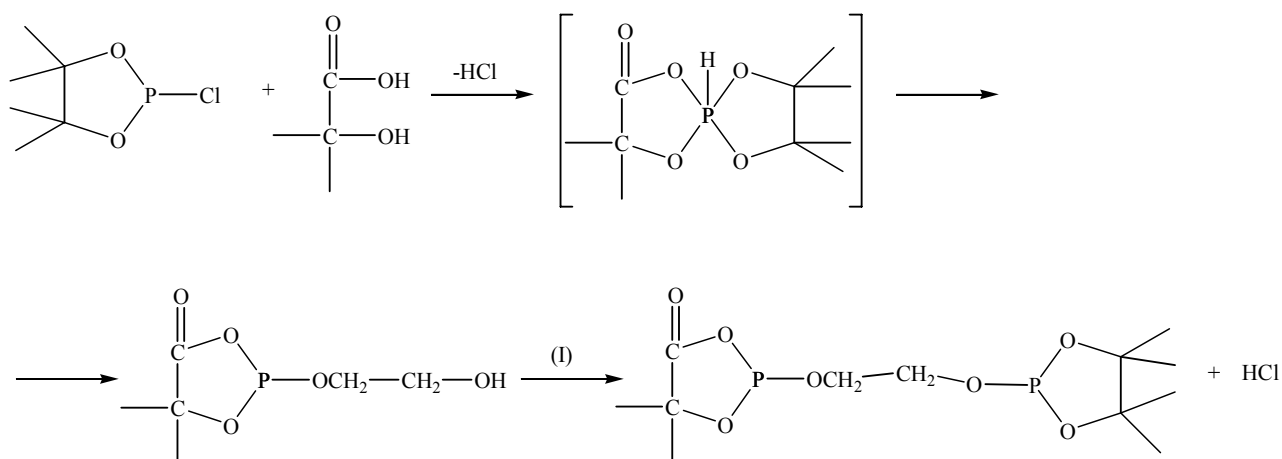
Η αντίδραση αυτή πρέπει να γίνεται με προσοχή αφού με αύξηση της θερμοκρασίας σε μερικές ενώσεις παρατηρείται μετά από ώρες μείωση της έντασης των κορυφών τους και



εμφάνιση πρόσθετων κορυφών οι οποίες δεν είναι οι αναμενόμενες.

Σχήμα 3.2 Διάσπαση κορεσμένων καρβοξυλικών οξέων

Παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις οι οποίες δίνουν αυτή τη δράση είναι το ομοπρωτοκατεχικό οξύ, το φαινυλοξικό οξύ και το ομοβανιλικό οξύ οι οποίες έχουν κοινό σημείο την ύπαρξη ενός κορεσμένου καρβοξυλικού οξέος στο μόριο τους. Για τα κορεσμένα καρβοξυλικά οξέα έχει προταθεί⁶⁴ ότι διασπώνται με τον τρόπο που φαίνεται στο σχήμα 3.2, όπου το αέριο μπορεί να είναι είτε CO είτε CO₂. Επίσης η ίδια συμπεριφορά παρουσιάστηκε στο γεντιστικό οξύ το οποίο περιέχει μία υδροξυλική ομάδα σε α-θέση ως προς το οξύ. Για τα α-ύδροξυ οξέα έχει προταθεί⁶⁴ ότι αντιδρούν με το I με τον τρόπο που φαίνεται στο σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3 Αντίδραση μετεστεροποίησης (transesterification) μεταξύ του αντιδραστήριου φωσφόρου I και ενός α-υδροξυοξέος

Παρατηρήθηκε ότι οι παραπάνω αντιδράσεις δεν πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι ζυγίσεις των πρότυπων ενώσεων πραγματοποιήθηκαν σε ζυγαριά ακριβείας πέντε δεκαδικών ψηφίων τύπου ATI CAHN μοντέλο CA-27.

Εκχύλιση του πολικού μέρους του ελαιόλαδου.⁴³ Σε κωνική των 250 ml ζυγίστηκαν 50 gr του ελαιόλαδου και διαλύθηκαν σε 50ml εξάνιου. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική φιάλη και εκχυλίστηκε τρεις φορές με 30 ml (3 x 30 ml) μείγματος μεθανόλης/νερού (60:40, v/v). Κάθε οργανική φάση εκχυλίστηκε με 50 ml εξάνιο. Τα τρία εκχυλίσματα μεθανόλης-νερού συνενώθηκαν και εξατμίσθηκαν υπο κενό σε θερμοκρασία δωματίου.

Αντίδραση φωσφιτυλίωσης πολικού μέρους του ελαιολάδου. Το πολικό μέρος διαλύθηκε σε 0.4 ml του μείγματος CDCl_3 -πυριδίνης και προστέθηκε σε αυτό αντιδραστήριο I. Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη λήψη φασμάτων NMR.

3.4 Μονοδιάστατα φάσματα NMR

Όλα τα πειράματα 1D-NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker AMX500 λειτουργικής συχνότητας 500.1 MHz για το πρωτόνιο, 125.7 MHz για τον άνθρακα-13 και 202.2 MHz για τον φώσφορο-31. Η θερμοκρασία στο δοκιμαστή ήταν 30 ± 1 °C και ελέγχθηκε με τη χρήση διαγράμματος βαθμονόμησης με αιθυλενογλυκόλη.

3.4.1 Μονοδιάστατα φάσματα H-1 NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα ^1H NMR ελήφθησαν με 16 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια καταγραφής (t_2). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 32 FID οι οποίες αποθηκεύθηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 2sec. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H -NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ με πρότυπη ουσία αναφοράς το TMS (δ 0.0).

3.4.2 Μονοδιάστατα φάσματα C-13 NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα ^{13}C -NMR ελήφθησαν με 32 k πραγματικά δεδομένα (data points). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 4096 σαρώσεις. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 4 sec. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier η ελεύθερη επαγωγική φθορά (FID) πολλαπλασιάστηκε με μία εκθετική συνάρτηση με έκθετη $\text{lb}=1$ Hz για την αύξηση της ευαισθησίας του πειράματος και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη 16 k μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling). Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του

φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης, μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε σχέση με την κορυφή του TMS (δ 0.0).

3.4.3 Μονοδιάστατα φάσματα P-31 NMR

Για τη λήψη ποσοτικών φασμάτων ^{31}P -NMR, θα πρέπει να αποκλειστεί η αλληλεπίδραση NOE μεταξύ του πυρήνα του φωσφόρου και γειτονικών πρωτονίων των μορίων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική inverse gated decoupling, κατά την οποία ο αποσυνζευκτής πρωτονίων λειτουργεί μόνο κατά την διάρκεια του χρόνου ανάκτησης ενώ παραμένει κλειστός όσο διαρκεί ο χρόνος αναμονής. Για την ελάττωση των χρόνων αποδιέγερσης T_1 των πυρήνων ^{31}P χρησιμοποιήθηκε το παραμαγνητικό αντιδραστήριο $\text{Cr}(\text{acac})_3$, με αποτέλεσμα οι χρόνοι αποδιέγερσης να μην υπερβαίνουν τα 5sec. Ο χρόνος αναμονής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30sec ίσος περίπου με $6T_1^{\text{max}}$, όπου T_1^{max} ο μεγαλύτερος χρόνος αποδιέγερσης σπιν-πλέγμα. Οι τυπικοί παράμετροι του πειράματος για ποσοτικές μετρήσεις ήταν: εύρος παλμού 90° 12.5 μs , φασματικό εύρος 48.41 ppm, χρόνος αναμονής 30 s, αριθμός δεδομένων (data points) 16 k. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκαν 32 FIDs. Πριν από το μετασχηματισμό Fourier, η ελεύθερη επαγωγική φθορά (FID) πολλαπλασιάστηκε με μία εκθετική συνάρτηση με έκθετη $\text{lb}=1$ Hz και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη μηδενικών 16 k στην μνήμη του υπολογιστή. Πριν από την ολοκλήρωση η γραμμή βάσης του φάσματος διορθώθηκε χρησιμοποιώντας ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και έγινε διόρθωση φάσης.

Όλες οι χημικές μετατοπίσεις ^{31}P -NMR που αναφέρονται σε αυτή την εργασία είναι σε σχέση με το προϊόν της αντίδρασης του I με το νερό, το οποίο σε διαλύτη πυριδίνη/γλωροφόρμιο (1.6:1.0), παρουσιάζει μία στενή κορυφή με δ 132.2.^{54,55}

3.5 Δισδιάστατα φάσματα NMR

Όλα τα φάσματα λήφθηκαν σε θερμοκρασία 30 °C. Για την απεικόνιση όλων των δισδιάστατων φασμάτων χρησιμοποιήθηκε απόλυτη τιμή (magnitude mode), ενώ δεν έγινε διόρθωση φάσης.

3.5.1 Ομοπυρηνική ^1H - ^1H φασματοσκοπία με τη χρήση βαθμωτού πεδίου (H,H-gCOSY)

Το πρωτονιακό πείραμα H,H-gCOSY με βαθμωτά πεδία πραγματοποιήθηκε με την παλμική ακολουθία του σχήματος 2.9. Χρησιμοποιήθηκαν 1 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια ανίχνευσης (t_2), 256 data points στην διάρκεια t_1 (περίοδος εξέλιξης). Οι χρονικές προσαυξήσεις Δt_1 είχαν συνολική διάρκεια 140 μsec με αρχική τιμή $t_1=3$ μsec . Συλλέχθηκαν 32 πραγματικές FIDs και 16 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) και ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) ήταν 1 sec. Τα 2 παλμικά βαθμωτά πεδία είχαν σχήμα

ημιτονοειδές, η αναλογία τους ήταν 1:1, και η διάρκειά τους 2 ms. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier στην δεύτερη διάσταση τα δεδομένα αυξήθηκαν με την τεχνική linear prediction⁵⁸ στα 256 και μετά με την προσθήκη μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling) στην τιμή 512. Τα δεδομένα και των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη μαθηματική συνάρτηση (sine-bell squared).

3.5.2 Ομοπυρηνική P,P φασματοσκοπία με τη χρήση βαθμωτού πεδίου (P,P-gCOSY)

Το πείραμα P,P-gCOSY με βαθμωτά πεδία πραγματοποιήθηκε με την παλμική ακολουθία του σχήματος 2.9. Χρησιμοποιήθηκαν 1 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια ανίχνευσης (t_2), 128 data points στην διάσταση t_1 (περίοδος εξέλιξης). Οι χρονικές προσαυξήσεις Δt_1 είχαν συνολική διάρκεια 102 μsec με αρχική τιμή $t_1=3 \mu\text{sec}$. Συλλέχθηκαν 8 πραγματικές FIDs και 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) και ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 1 sec. Τα 2 παλμικά βαθμωτά πεδία είχαν σχήμα ημιτονοειδές, η αναλογία τους ήταν 1:1, και η διάρκειά τους 2ms. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier στην δεύτερη διάσταση τα δεδομένα αυξήθηκαν με linear prediction στα 256 και μετά με την προσθήκη μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling) στην τιμή 512. Τα δεδομένα και των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη μαθηματική συνάρτηση (sine-bell squared).

3.5.3 Ετεροπυρηνική H,C φασματοσκοπία με coherence πολλαπλών κβάντων και με τη χρήση βαθμωτών πεδίων (H,C-gHMQC)

Το πείραμα H,C-gHMQC με βαθμωτά πεδία πραγματοποιήθηκε με την παλμική ακολουθία του σχήματος 2.11. Χρησιμοποιήθηκαν 1 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια ανίχνευσης (t_2), 256 data points στην διάσταση t_1 (περίοδος εξέλιξης). Οι χρονικές προσαυξήσεις Δt_1 είχαν συνολική διάρκεια 36 μsec με αρχική τιμή $t_1=3 \mu\text{sec}$. Συλλέχθηκαν 64 πραγματικές FIDs και 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε να αποκτήσει το σύστημα δυναμική ισοροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 1 sec. Τα 2 βαθμωτά πεδία είχαν σχήμα ημιτονοειδές, η αναλογία τους ήταν 1:1, και η διάρκειά τους 2ms. Ο χρόνος ανάμιξης (τ) ήταν 3.5 ms ώστε το πείραμα να είναι βελτιστοποιημένο για ανίχνευση σύζευξης 140 Hz που είναι η τυπική τιμή $J_{C,H}$ σύζευξης. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier στην δεύτερη διάσταση τα δεδομένα αυξήθηκαν με Linear prediction στα 256 και μετά με την προσθήκη μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling) στην τιμή 512. Τα δεδομένα και των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη μαθηματική συνάρτηση (sine-bell squared). Η αναλογία των βαθμωτών πεδίων ημιτονοειδούς σχήματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5:3:4, ώστε να ικανοποιείται η σχέση:

$$G_1(\gamma_H + \gamma_C) + G_2(-\gamma_H + \gamma_C) + G_3(-\gamma_H) = 0$$

3.5.4 Ετεροπυρηνική H,P φασματοσκοπία με coherence πολλαπλών κβάντων και με τη χρήση βαθμωτών πεδίων (H,P-gHMQC)

Το πείραμα H,P-gHMQC με βαθμωτά πεδία πραγματοποιήθηκε με την παλμική ακολουθία του σχήματος 2.11. Χρησιμοποιήθηκαν 1 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια ανίχνευσης (t_2), 64 data points στην διάσταση t_1 (περίοδος εξέλιξης). Οι χρονικές προσαυξήσεις Δt_1 είχαν συνολική διάρκεια 102 μsec με αρχική τιμή $t_1=3 \mu\text{sec}$. Συλλέχθηκαν 16 πραγματικές FIDs και 8 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε να αποκτήσει το σύστημα δυναμική ισοροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 1 sec. Τα 2 βαθμωτά πεδία είχαν σχήμα ημιτονοειδές, η αναλογία τους ήταν 1:1, και η διάρκειά τους 2ms. Ο χρόνος ανάμειξης (τ) ήταν 50 ms ώστε το πείραμα να είναι βελτιστοποιημένο για ανίχνευση σύζευξης 10Hz που είναι η τυπική τιμή $J_{P,H}$ σύζευξης μακράς εμβέλειας στις ενώσεις που μελετώνται, όπως μετρήθηκε από συζευγμένα μονοδιάστατα πειράματα ^{31}P NMR. Πειράματα βελτιστοποιημένα για την ανίχνευση συζεύξεων 3Hz έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier στην δεύτερη διάσταση τα δεδομένα αυξήθηκαν με Linear prediction στα 256 και μετά με την προσθήκη μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling) στην τιμή 512. Τα δεδομένα και των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη μαθηματική συνάρτηση (sine-bell squared). Η αναλογία των βαθμωτών πεδίων ημιτονοειδούς σχήματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50:30:52.4, ώστε να ικανοποιείται η σχέση:

$$G_1(\gamma_H + \gamma_P) + G_2(-\gamma_H + \gamma_P) + G_3(-\gamma_H) = 0$$

3.5.5 H,P ετεροπυρηνικό φάσμα NOE (H,P-HOESY)

Το πείραμα H,P-HOESY πραγματοποιήθηκε με την παλμική ακολουθία του σχήματος 2.17. Χρησιμοποιήθηκαν 1 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια ανίχνευσης (t_2), 64 data points στην διάσταση t_1 (περίοδος εξέλιξης). Οι χρονικές προσαυξήσεις Δt_1 είχαν συνολική διάρκεια 142 μsec με αρχική τιμή $t_1=3 \mu\text{sec}$. Συλλέχθηκαν 48 πραγματικές FIDs και 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε να αποκτήσει το σύστημα δυναμική ισοροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 3 sec. Ο χρόνος μίξης ήταν 3sec. Χρησιμοποιήθηκε η σύνθετη παλμική ακόλουθια αποσύζευξης (composite pulse decoupling sequence) WALTZ-16 για την αποσύζευξη πρωτονίου. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier στην δεύτερη διάσταση τα δεδομένα αυξήθηκαν με linear prediction στα 256 και μετά με την προσθήκη μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling) στην τιμή 512. Τα δεδομένα και των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη μαθηματική συνάρτηση (sine-bell squared).

3.6 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό των πολυφαινόλων στο ελαιόλαδο είναι η εύρεση της χημικής μετατόπισης ^{31}P -NMR του φωσφωρυλιωμένου παραγώγου κάθε πολυφαινόλης.

Για τον προσδιορισμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι πολυφαινολικές πρότυπες ενώσεις. Οι χημικοί τύποι των ενώσεων αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1. Ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων των φωσφιτυλιωμένων καρβοξυλομάδων πραγματοποιήθηκε εύκολα, αφού τα φαινολικά οξέα που συνήθως ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο έχουν μόνο ένα καρβοξύλιο και οι χημικές μετατοπίσεις φωσφόρου-31 των φωσφιτυλιωμένων καρβοξυλικών ομάδων εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία από ότι των υδροξυλικών παραγώγων.⁵⁵ Οι πολυφαινόλες με ένα φαινολικό και ένα αλειφατικό υδροξύλιο προσδιορίστηκαν εύκολα αφού τα αλειφατικά υδροξύλια εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία από ότι τα φαινολικά.⁵⁵ Οι χημικές μετατοπίσεις των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων των μονουδροξυφαινολών συγκεντρώνονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Χημικές μετατοπίσεις μονουδροξυφαινολών. Λαμβάνεται υπόψιν η αρίθμηση των πολυφαινολών και των υδροξυλίων στον πίνακα 1.1.

Φαινόλη	O-P	COO-P
O-κουμαρικό οξύ (1)	138.94	135.04
p-κουμαρικό οξύ (2)	137.82	135.13
Φερουλικό οξύ (3)	139.46	135.20
3-ύδροξυ-4-μέθοξυκιναμικό οξύ (5)	140.37	135.20
Σιναπικό οξύ (6)	142.23	135.25
p-ύδροξυβενζοϊκό οξύ (7)	137.68	135.21
Βανιλικό οξύ (8)	139.20	135.17
Συριγγικό οξύ (11)	141.88	135.19
Ομοβανιλικό οξύ (13)	138.21	134.75
Τυροσόλη (15)	1: 138.20 2: 146.91	
Θυμόλη (17)	138.64	
Καρβακρόλη (18)	138.88	
Ομοβανιλικό οξύ (24)	139.94	134.8

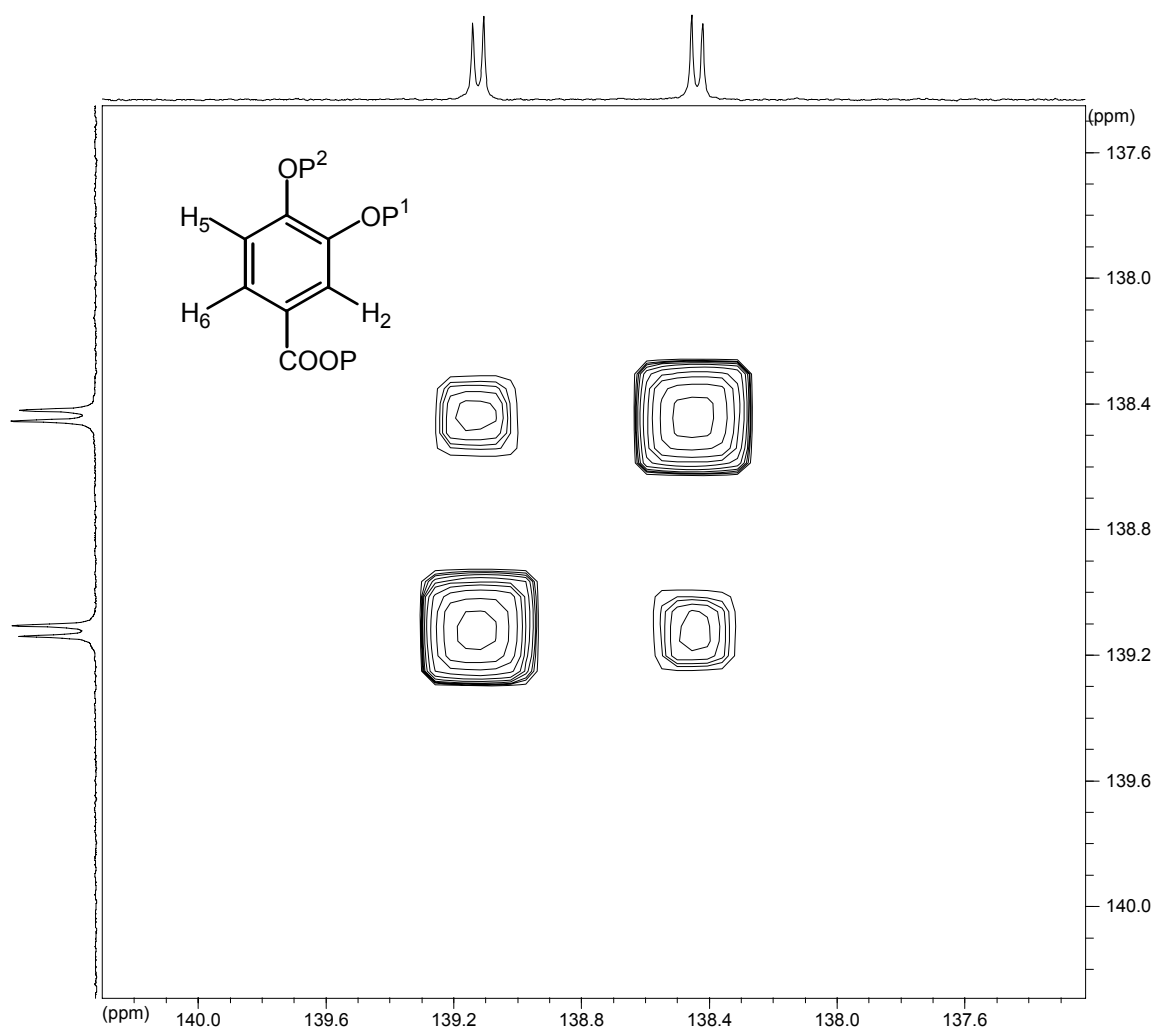
Ο προσδιορισμός των σημάτων πολυφαινολών, οι οποίες περιέχουν δύο ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια δεν είναι εύκολος. Η εφαρμογή προσθετικών κανόνων της επίδρασης υποκαταστατών για τον υπολογισμό των χημικών μετατοπίσεων απέτυχε να προβλέψει τα πειραματικά δεδομένα στις περισσότερες περιπτώσεις. Έτσι ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων φωσφόρου-31 NMR έγινε με τη χρήση δισδιάστατων φασμάτων NMR. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Προσδιορισμός της πολλαπλότητας των κορυφών στα μονοδιάστατα φάσματα NMR φωσφόρου.
- Προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων πρωτονίου ή/και άνθρακα με τη χρήση δισδιάστατων πειραμάτων NMR.

- Προσδιορισμός των σημάτων φωσφόρου με τη χρήση πειραμάτων τα οποία ανιχνεύουν βαθμωτή σύζευξη μακράς εμβέλειας μεταξύ πυρήνων πρωτονίου-φωσφόρου ή/και άνθρακα-πρωτονίου, ή πειραμάτων τα οποία ανιχνεύουν χωρικές αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου μεταξύ φωσφόρου-πρωτονίου.

3.6.1 Προσδιορισμός της πολλαπλότητας των κορυφών στα μονοδιάστατα φάσματα φωσφόρου NMR.

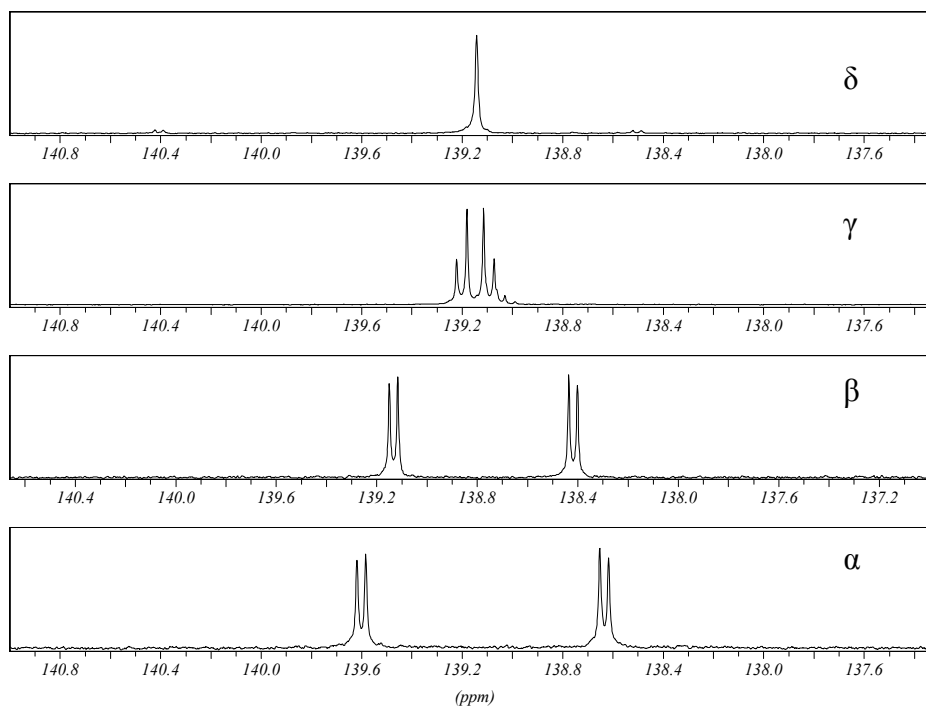
Το μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P -NMR του πρωτοκατεχικού οξέος εμφανίζει δύο διπλές κορυφές σε δ 138.43 και δ 139.14. Επειδή το πείραμα έχει γίνει με αποσύζευξη των πυρήνων πρωτονίου ($^{31}\text{P}\{-\text{H}\}$) η σχάση των κορυφών στο φάσμα αποδεικνύει την ύπαρξη ομοαλλυλικής σύζευξης, δηλαδή σύζευξη πέντε δεσμών μεταξύ των δύο πυρήνων ^{31}P . Για την διερεύνηση αυτής της πιθανότητας λήφθηκε ένα δισδιάστατο φάσμα, ομοπυρηνικής



Σχήμα 3.4 Φάσμα P,P -gCOSY του πρωτοκατεχικού οξέος.

σύζευξης φωσφόρου-φωσφόρου (P,P-gCOSY) το οποίο απεικονίζεται στο σχήμα 3.4. Η εμφάνιση διασταυρούμενων κορυφών στο φάσμα αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη σύζευξης $^5J_{P,P}$ στο αντίστοιχο μονοδιάστατο φάσμα. Η σύζευξη αυτή παρατηρείται στα μονοδιάστατα φάσματα ^{31}P -NMR όλων των ο-διυδροξυπολυφαινολικών παραγώγων που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή και η τιμή της κυμαίνεται μεταξύ $^5J_{P,P}=6.5\text{-}7.0\text{ Hz}$. Για το πρωτοκατεχικό οξύ είναι $^5J_{P,P}=6.88\text{ Hz}$.

Στο σχήμα 3.5 δίνονται τα φάσματα ^{31}P -NMR μιας σειράς φωσφιτυλιωμένων όρθο-διυδροξυφαινολών της παρούσας μελέτης. Το μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P -NMR του καφεϊκού οξέος είναι του τύπου AX ($\Delta\nu/J \gg 1$) και εμφανίζεται στο σχήμα 3.5 (α). Στο φάσμα του παραγώγου του πρωτοκατεχικού οξέος (σχήμα 3.5 (β)) φαίνεται η σύζευξη των φωσφόρων των φαινολικών υδροξυλίων δίνοντας ένα φάσμα το οποίο πλησιάζει ένα φάσμα τύπου AB ($\Delta\nu/J > 1$). Στο φάσμα του παραγώγου της υδροξυτυτροσόλης (σχήμα 3.5 (γ)) η σύζευξη μεταξύ των ατόμων φωσφόρου των φαινολικών υδροξυλίων γίνεται πιο ισχυρή δίνοντας ένα AB φάσμα ($\Delta\nu/J \leq 1$), ενώ στο ομοπρωτοκατεχικό (σχήμα 3.5 (δ)) αυτή η σύζευξη γίνεται ακόμα ισχυρότερη ($\Delta\nu/J \sim 0$) και διακρίνουμε μόνο μία κορυφή στα 139.14.

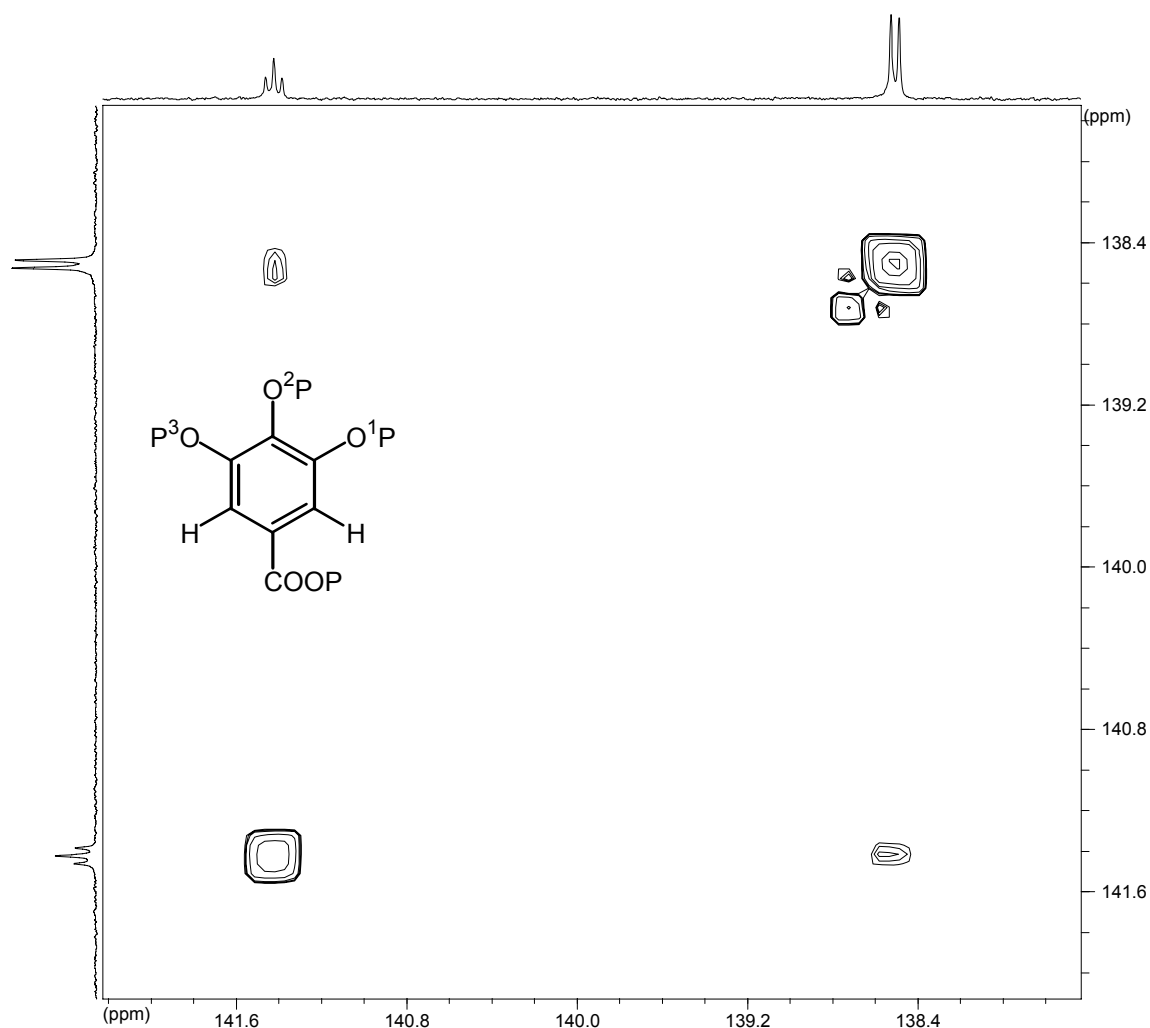


Σχήμα 3.5 Μονοδιάστατα φάσματα ^{31}P -NMR των φωσφιτυλιωμένων ενώσεων (α) καφεϊκό οξύ, (β) πρωτοκατεχικό οξύ, (γ) υδροξυτυτροσόλη και (δ) ομοπρωτοκατεχικό οξύ, όπου φαίνεται η σταδιακή μετατόπιση του φάσματος από AX σε AB.

Το μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P NMR του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου του γαλλικού οξέος είναι του τύπου A_2X . Η διάκριση των *πάρ*α και *μέτα* ομάδων φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων O-P ως προς το καρβοξυλικό οξύ του μορίου γίνεται εύκολα λόγω της ομοαλλυλικής σύζευξης μεταξύ των τριών ομάδων O-P. Στο φάσμα του γαλλικού οξέος εμφανίζονται μία τριπλή σε δ 141.43 και μία διπλή κορυφή σε δ 138.51 με αναλογία

εντάσεων 1:2 αντίστοιχα οι οποίες αποδίδονται στο *πάρα* O-P και το *μέτα* O-P φωσφυτυλιωμένο υδροξύλιο του γαλλικού οξέος, αντίστοιχα. Η φύση της σύζευξης επιβεβαιώνεται με την εμφάνιση μίας διασταυρούμενης κορυφής στο πείραμα P,P-gCOSY NMR του γαλλικού οξέος (σχήμα 3.6).

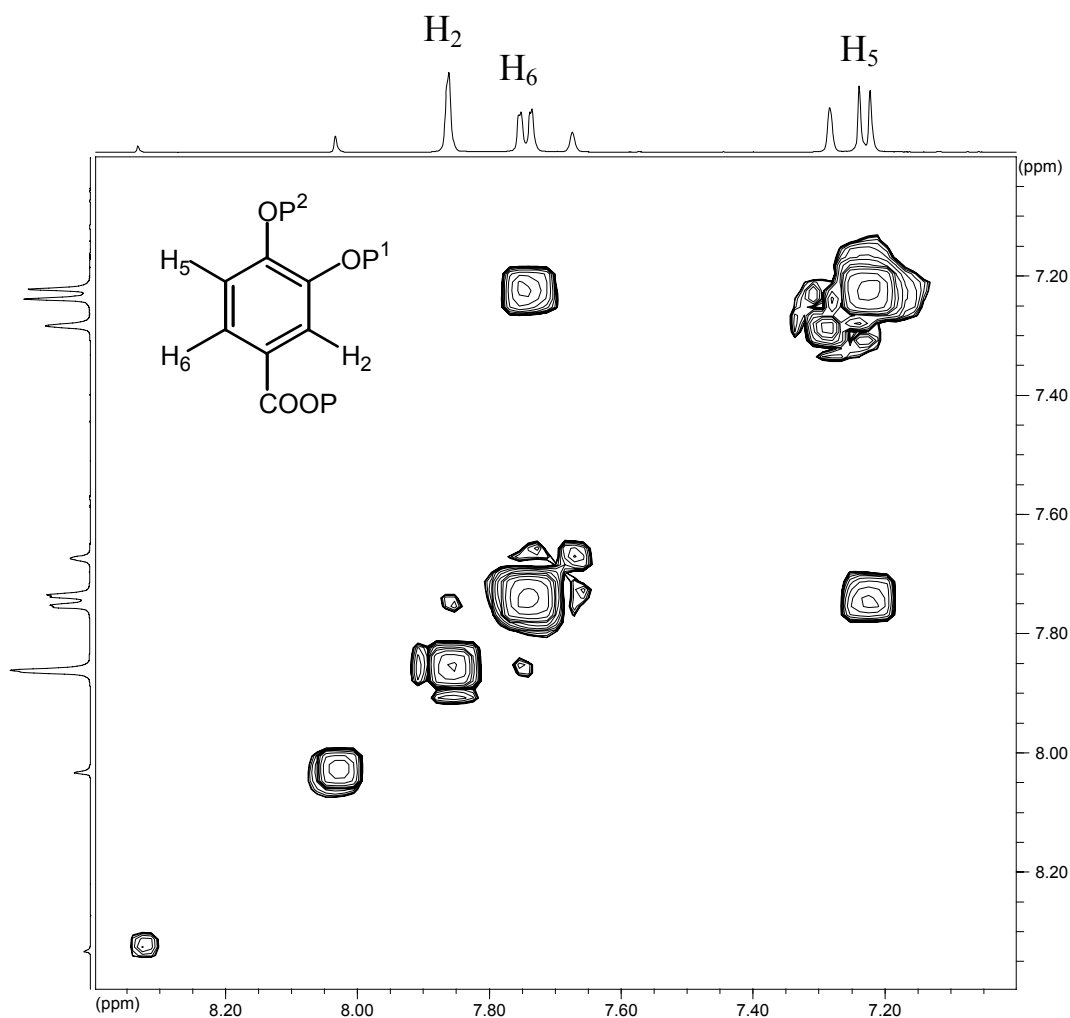
Το μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P -NMR του σικιμικού οξέος εμφανίζει τρεις απλές κορυφές σε χαμηλότερα πεδία από αυτά που αντιστοιχούν σε φαινολικά παράγωγα⁵⁴ δηλαδή σε δ 146.47, 146.69, και 147.98, γεγονός που αναμένεται επειδή τα υδροξύλια αυτά είναι αλειφατικά και όχι αρωματικά. Είναι χαρακτηριστική η έλλειψη σύζευξης $^5J_{\text{P,P}}$ στο φάσμα του σικιμικού οξέος, όπως και σε άλλες μη αρωματικές φωσφυτυλιωμένες πολυυδροξυαλκοόλες που μελετήθηκαν (ελευρωπαϊνή, παράγραφος 3.8). Η απουσία της σύζευξης $^5J_{\text{P,P}}$ σε κορεσμένες ενώσεις δείχνει ότι αυτή πραγματοποιείται μέσω των π -δεσμών του αρωματικού δακτυλίου των πολυφαινολών.



Σχήμα 3.6 Φάσμα P,P-gCOSY του γαλλικού οξέος.

3.6.2 Προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων πρωτονίου των φωσφυτυλιωμένων πολυφαινολών

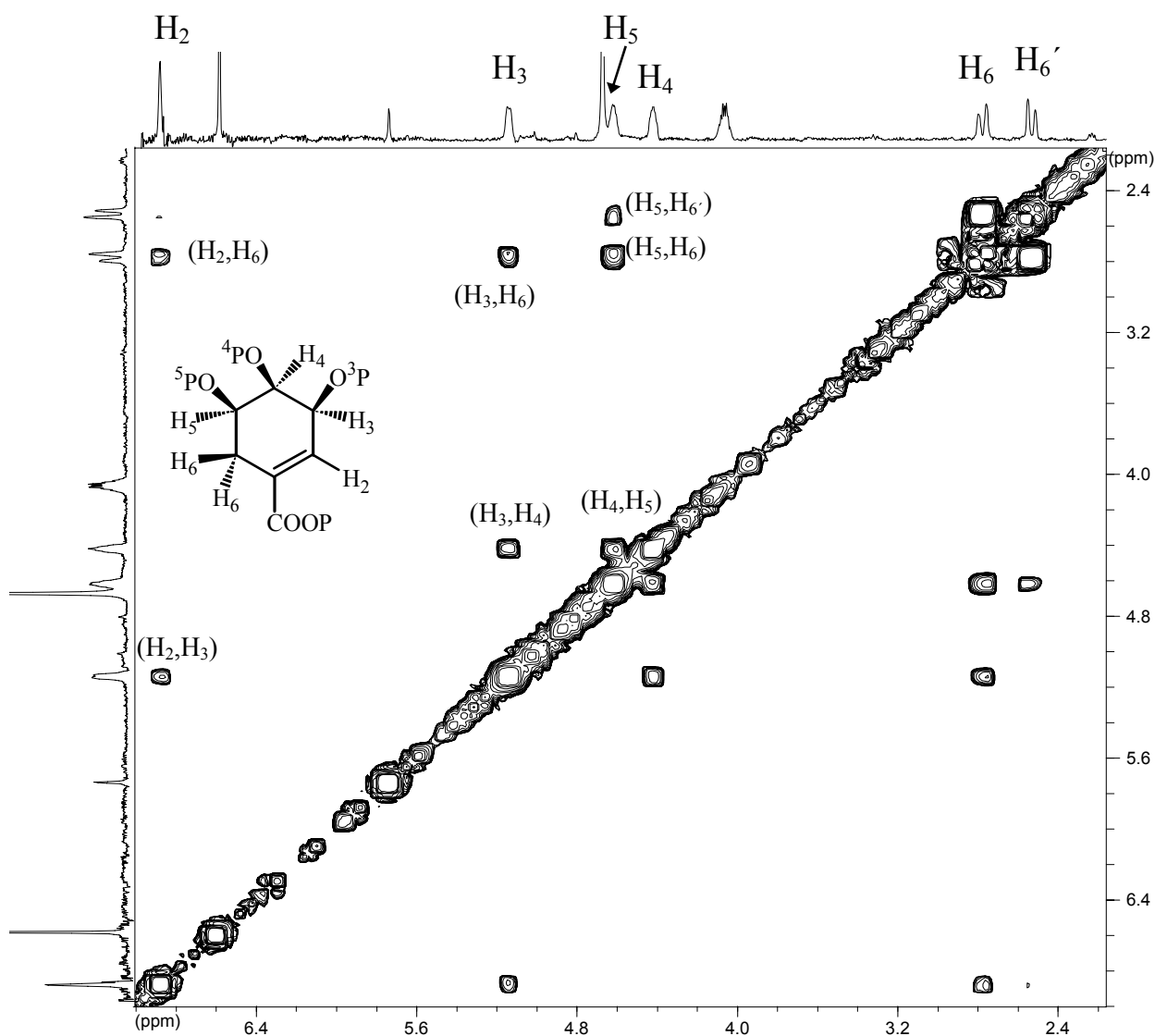
Στο μονοδιάστατο φάσμα πρωτονίου του φωσφυτυλιωμένου πρωτοκατεχικού οξέος (σχήμα 3.7) το σήμα σε δ 7.9 οφείλεται στο πρωτόνιο H-2 εφόσον αυτό το πρωτόνιο βρίσκεται σε όρθο θέση με δύο υποκαταστάτες (-OH και -COOH) δέκτες ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου θα πρέπει να συντονίζεται στα χαμηλότερα πεδία. Τα πρωτόνια H-5 και H-6 εμφανίζουν γειτονική σύζευξη και τα βλέπουμε σαν δύο διπλές κορυφές στο φάσμα πρωτονίου. Για τον προσδιορισμό των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων H-5 και H-6 λήφθηκε ένα δισδιάστατο φάσμα ομοπυρηνικής σύζευξης πρωτονίου-πρωτονίου του πρωτοκατεχικού (H,H-gCOSY) (σχήμα 3.7). Από το φάσμα αυτό διακρίνουμε εύκολα το πρωτόνιο H-6 (δ 7.75) το οποίο συζεύγνυται με το πρωτόνιο H-2 (αλληλική σύζευξη). Το πρωτόνιο H-5 (δ 7.2) είναι αυτό το οποίο συζεύγνυται με το πρωτόνιο H-6. Η σύζευξη μεταξύ



Σχήμα 3.7 Φάσμα H,H-gCOSY του πρωτοκατεχικού οξέος.

των πρωτονίων H-2 και H-6 είναι ασθενής και χαρακτηρίζεται από πολύ μικρή σταθερά σύζευξης, ($^4J_{H,H} \sim 1-2$ Hz) και δεν αναλύεται στο αντίστοιχο φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ (διακρίνεται από μία πολύ μικρή διεύρυνση των αντίστοιχων κορυφών).

Για τον προσδιορισμό του μονοδιάστατου πρωτονιακού φάσματος του φωσφιτυλιωμένου σικιμικού οξέος λήφθηκε ένα φάσμα 2D H,H-gCOSY (σχήμα 3.8). Ξεκινώντας από το χωρίς καμιά αμφιβολία βινυλικό πρωτόνιο H-2, το οποίο εμφανίζεται σε χαμηλότερα πεδία (δ 6.88) σε σχέση με τα κορεσμένα πρωτόνια, βλέπουμε ότι συνδέεται με διασταυρούμενη κορυφή με το H-3 σε δ 5.14 και με τα δυο δίδυμα πρωτόνια H-6 και H-6' με δ 2.78 και 2.54, αντίστοιχα (αλληλική σύζευξη). Με τη σειρά του το H-3 έχει μία διασταυρούμενη κορυφή με την κορυφή σε δ 4.39 η οποία αποδίδεται στο H-4.

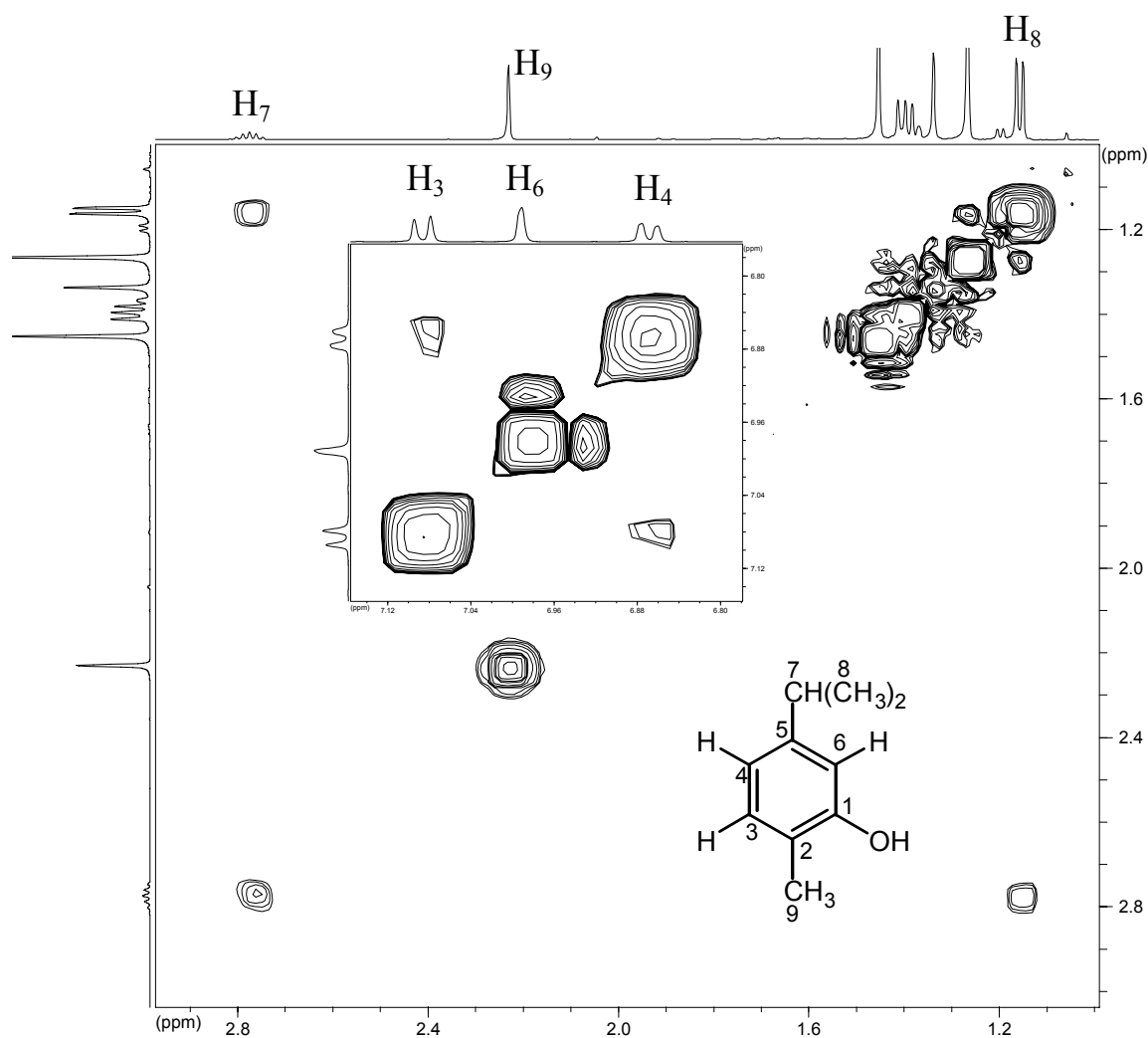


Σχήμα 3.8 Φάσμα H,H-gCOSY του σικιμικού οξέος

Επίσης το φάσμα δείχνει διασταυρούμενες κορυφές οι οποίες συνδέουν το πρωτόνιο H-3 με το H-6 μέσω ομοαλλυλικής σύζευξης μακράς εμβέλειας. Το σήμα για το H-5 (δ 4.62) βρίσκεται μέσω της διασταυρούμενης κορυφής με το H-4.

Στο φάσμα πρωτονίου της καρβακρόλης (σχήμα 3.9) προσδιορίζουμε το αρωματικό H-6 σε 6.98 το οποίο δεν εμφανίζει γειτονική σύζευξη όπως τα πρωτόνια H-3 και H-4, και είναι απλή κορυφή. Από το φάσμα H,H gCOSY της καρβακρόλης βρίσκουμε ότι στο H-3 αντιστοιχεί η κορυφή σε δ 7.08 και στο πρωτόνιο H-4 η κορυφή σε δ 6.87 αφού το H-4 έχει ισχυρότερη σύζευξη με το H-6 (αλλυλική), από ότι το H-3 (ομοαλλυλική). Τα πρωτόνια H-7, H-8, H-9 τα ξεχωρίζουμε αφού έχουν αναλογία 1:6:3 ενώ το H-7 είναι πολλαπλή σε δ 2.77, και το H-8 και το H-9 είναι διπλές, σε δ 1.16, 2.23 αντίστοιχα.

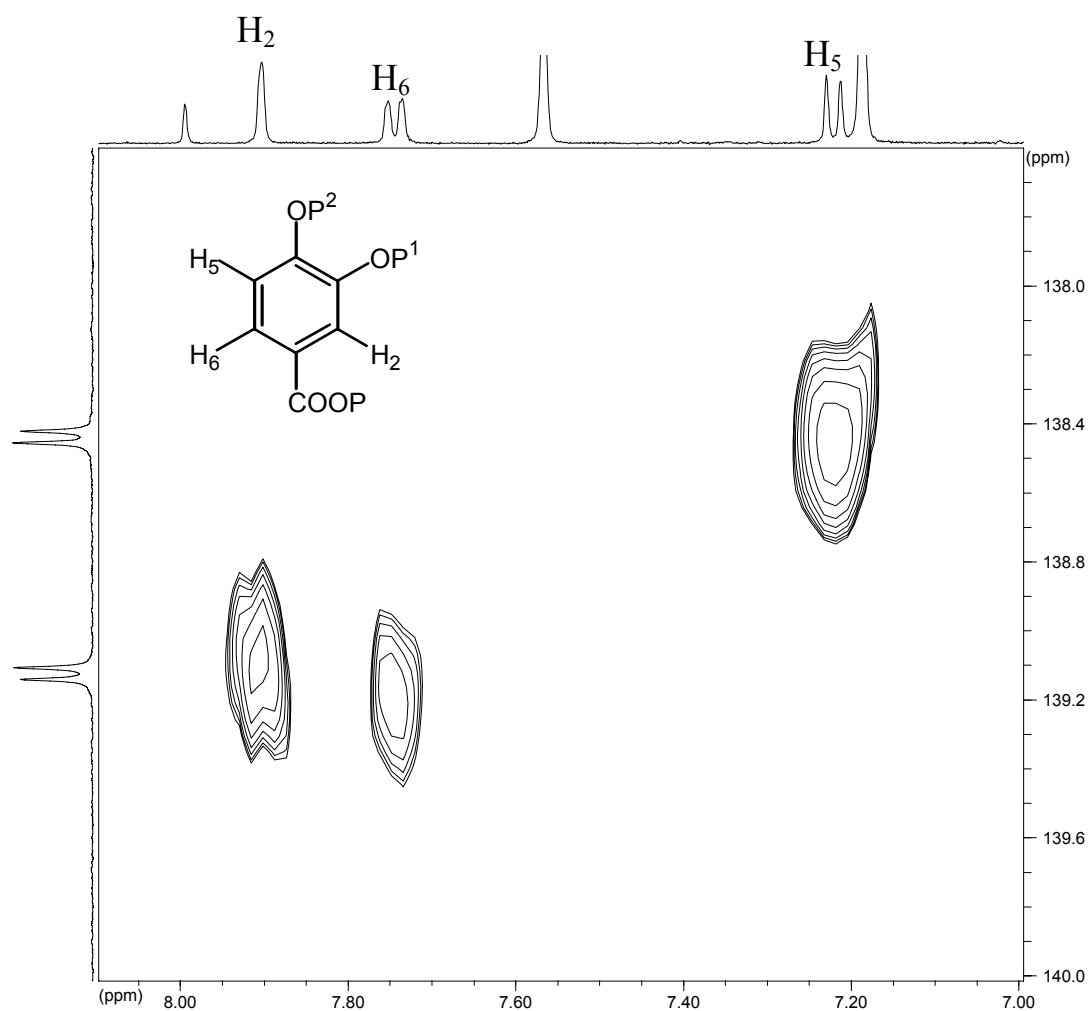
Με παρόμοιο τρόπο προσδιορίστηκαν και τα μονοδιάστατα φάσματα πρωτονίου των ενώσεων ομοπρωτοκατεχικό οξύ, υδροξυτυροσόλη, γεντιστικό οξύ, καφεϊκό οξύ, θυμόλη, καρβακρόλη και βανιλλικό οξύ.



Σχήμα 3.9 H,H-gCOSY της καρβακρόλης

3.6.3 Προσδιορισμός των σημάτων φωσφόρου με τη χρήση πειραμάτων τα οποία ανιχνεύουν βαθμωτή σύζευξη μακράς εμβέλειας μεταξύ πυρήνων πρωτονίου-φωσφόρου

Έχοντας κάνει τον προσδιορισμό των σημάτων στα φάσματα πρωτονίου θα προσπαθήσουμε να προσδιορίσουμε τα σήματα στο φάσμα του φωσφόρου με τα διδιάστατα φάσματα ετεροπυρηνικής σύζευξης φωσφόρου-πρωτονίου (P,H g-HMQC) Στο σχήμα 3.10 απεικονίζεται το φάσμα P,H g-HMQC του πρωτοκατεχικού οξέος. Σε αυτό παρατηρείται σύζευξη μακράς εμβέλειας μεταξύ του σήματος σε δ 139.14 και των πρωτονίων H-2 και H-6 και μεταξύ του σήματος σε δ 138.43 και του πρωτονίου H-5. Όμως αυτές οι συσχετίσεις δεν μπορούν να αποδείξουν σε ποιο φώσφορο αντιστοιχεί το κάθε σήμα διότι δεν ξέρουμε το μηχανισμό της σύζευξης, δηλαδή αν είναι σύζευξη τεσσάρων ($^4J_{P,H}$), πέντε ($^5J_{P,H}$) ή έξι δεσμών ($^6J_{P,H}$).

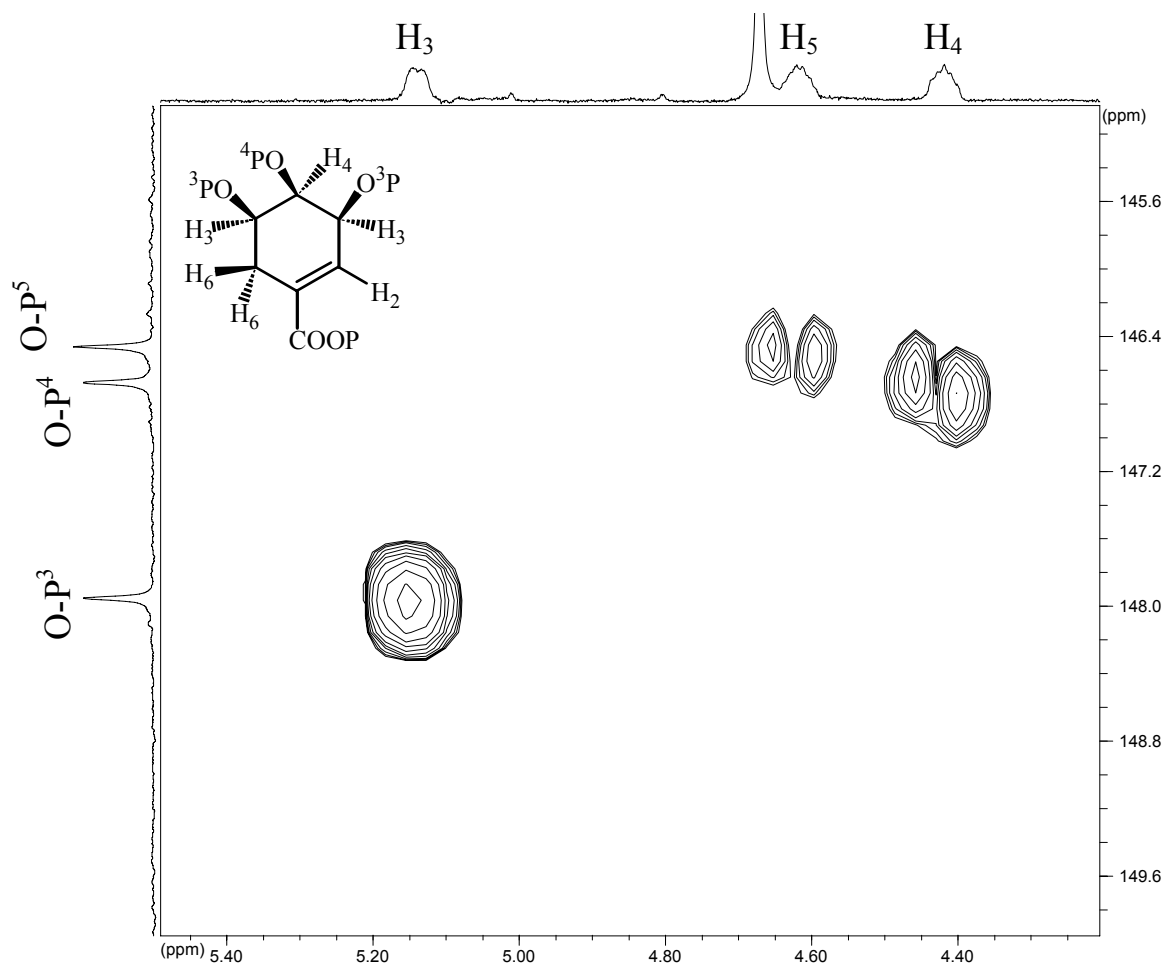


Σχήμα 3.10 Φάσμα H,P-gHMQC του πρωτοκατεχικού οξέος.

Αν παραδείγματος χάριν ο ισχυρότερος μηχανισμός σύζευξης ήταν μέσω 5 δεσμών ($^5J_{P,H}$) τότε ο φώσφορος O-P² του πρωτοκατεχικού οξέος θα αντιστοιχούσε στην κορυφή με δ 139.14, ενώ ο O-P¹ θα αντιστοιχούσε στην κορυφή με δ 138.43. Αν όμως η διαδρομή

σύζευξης ήταν μέσω 4 και 6 δεσμών (${}^4J_{P,H}$ και ${}^6J_{P,H}$) τότε ο O-P¹ θα αντιστοιχούσε στην κορυφή με δ 139.14, ενώ ο O-P² θα αντιστοιχούσε στην κορυφή με δ 138.43, ο προσδιορισμός δηλαδή θα ήταν αντίστροφος.

Για το σικιμικό οξύ το φάσμα H,P-gHMQC (σχήμα 3.11) προσδιορίζει καθαρά τα σήματα φωσφόρου αφού η σύζευξη που παρατηρούμε σε κορεσμένα συστήματα είναι σύζευξη τριών δεσμών (${}^3J_{P,H}$), η οποία δεν υπάρχει στις φαινολικές ενώσεις.



Σχήμα 3.11 Φάσμα H,P-gHMQC του σικιμικού οξέος.

Ετσι προκύπτει εύκολα ότι ο φώσφορος ο οποίος συνδέεται με το O-3 αντιστοιχεί σε δ 147.98, ο φώσφορος ο οποίος συνδέεται με το O-5 αντιστοιχεί σε δ 146.47 και ο φώσφορος ο οποίος συνδέεται με το O-4 αντιστοιχεί σε δ 146.69.

3.6.4 Προσδιορισμός των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ των φωσφυτυλιωμένων πολυφαινολών με τη χρήση πειραμάτων τα οποία ανιχνεύουν βαθμωτή σύζευξη μακράς εμβέλειας μεταξύ πυρήνων πρωτονίου-άνθρακα και φωσφόρου-άνθρακα.

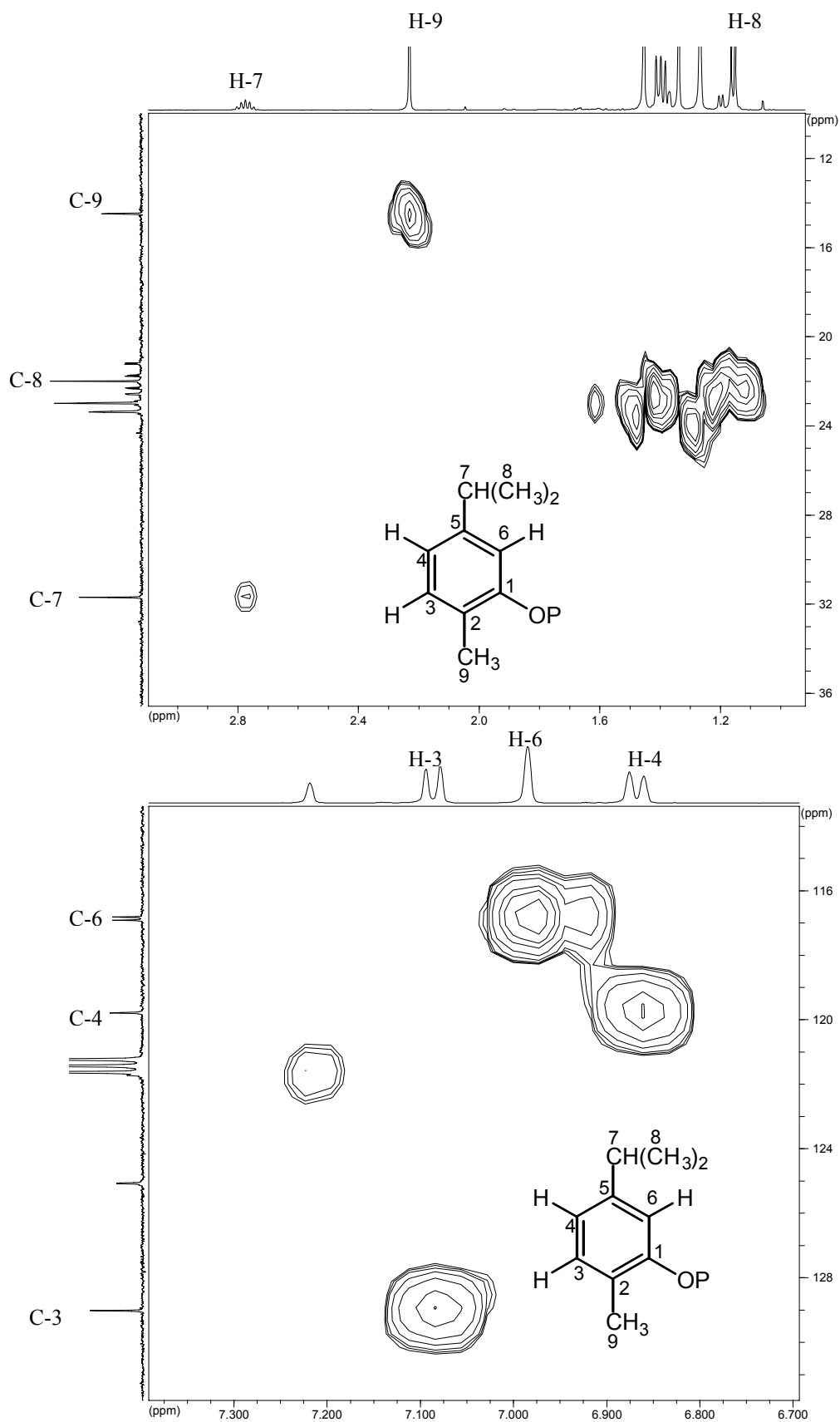
Ο προσδιορισμός των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ των φωσφυτυλιωμένων πολυφαινολών έγινε ώστε να εξεταστεί αν οι συζεύξεις μεταξύ των πυρήνων άνθρακα και φωσφόρου μπορούν να βοηθήσουν στον προσδιορισμό των φασμάτων φωσφόρου. Για να μελετήσουμε την επίδραση της φωσφυτυλίωσης στις χημικές μετατοπίσεις των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ των πρότυπων ενώσεων επιλέξαμε αρχικά ένα απλό μόριο την καρβακρόλη. Αναμένεται ότι η αντικατάσταση του πρωτονίου της φαινολικής $-\text{OH}$ ομάδας με τον πολύ ηλεκτραρνητικότερο P, επιδρά σημαντικά στη χημική μετατόπιση των γειτονικών στο μοριακό σκελετό πυρήνων ^{13}C . Επίσης οι πυρήνες ^{13}C που φέρουν $-\text{OH}$ αναμένεται μετά τη φωσφυτυλίωση να εμφανίζουν διπλές κορυφές λόγω σύζευξης $^2J_{\text{P,C}}$.

Από το φάσμα H,C-gHMQC της καρβακρόλης (σχήμα 3.12) προσδιορίζονται εύκολα οι πρωτονιωμένοι άνθρακες 3, 4, 6, 7, 8, 9 μέσω των διασταυρούμενων κορυφών τους με τα αντίστοιχα πρωτόνια. Από το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ προσδιορίζουμε τον τεταρτοταγή άνθρακα C-1 σε δ 148.8. Ο προσδιορισμός αυτός δικαιολογείται από το γεγονός ότι ο C-1 εμφανίζει διπλή κορυφή λόγω ισχυρής σύζευξης ($^2J_{\text{C,P}} = 6.83 \text{ Hz}$) με τον φώσφορο O-P¹. Επίσης ο C-2 εμφανίζει σύζευξη τριών δεσμών ($^3J_{\text{C,P}}$) με τον φώσφορο O-P¹ και διακρίνεται από τον άνθρακα C-5, ο οποίος δεν παρουσιάζει σύζευξη με τον φώσφορο O-P¹. Με ανάλογο τρόπο έγινε ο προσδιορισμός στα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ των ενώσεων θυμόλη, βανιλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.

Οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα και οι σταθερές σύζευξης μεταξύ άνθρακα-φωσφόρου της καρβακρόλης, της θυμόλης, του βανιλικού οξέος και του πρωτοκατεχικού οξέος και των φωσφυτυλιωμένων παραγώγων τους συγκεντρώνονται στους πίνακες 3.2, 3.3, 3.4 και 3.5 αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης (Hz), της καρβακρόλης και του φωσφυτυλιωμένου παραγώγου της

Άτομο άνθρακα	μη φωσφυτυλιωμένη	φωσφυτυλιωμένη	nJ
1	154.63	148.8	6.8
5	146.01	146.03	
3	129.12	129.01	
2	120.41	125.06	2.6
4	115.48	119.79	
6	111.53	116.82	12.4
7	32.07	31.68	
8	22.40	22.00	
9	14.34	14.50	1.2



Σχήμα 3.12 Φάσμα H,C-gHMQC της φωσφοριτυλιωμένης καρβακρόλης

Πίνακας 3.3 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), της θυμόλης και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου της.

Άτομο άνθρακα	μη φωσφιτυλιωμένη	φωσφιτυλιωμένη	ⁿJ
1	153.64	147.73	7.6
3	134.21	134.45	
6	130.70	135.01	2.4
5	124.49	124.58	
4	118.42	122.85	
2	114.47	119.40	13.2
7	25.17	25.13	
8	21.18	21.04	
9	19.25	18.78	

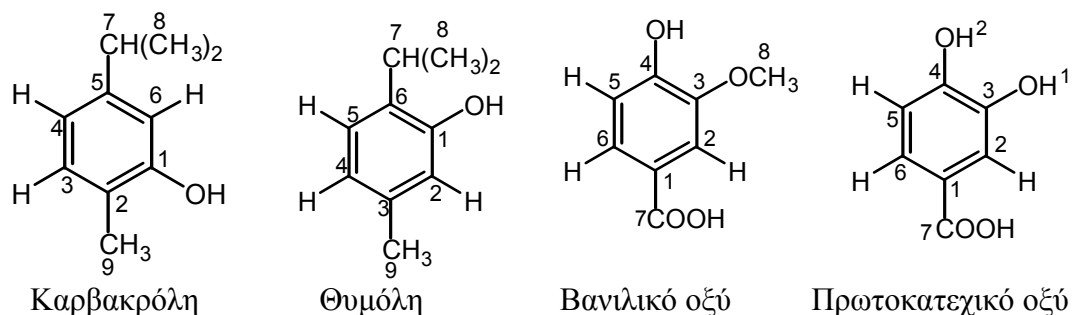
Πίνακας 3.4 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), του βανιλικού οξέος και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου του.

Άτομο άνθρακα	μη φωσφιτυλιωμένη	φωσφιτυλιωμένη	ⁿJ
7	167.17	163.67	4.4
4	150.47	144.85	5.6
3	146.14	149.22	2.4
1	122.78	124.05	3.6
6	121.39	121.76	
5	113.91	119.51	8.4
2	111.68	112.14	
8	54.00	54.00	

Πίνακας 3.5 Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές συζεύξης (Hz), του πρωτοκατεχικού οξέος και του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου του.

Άτομο άνθρακα	μη φωσφιτυλιωμένη	φωσφιτυλιωμένη	ⁿJ
7	167.42	163.37	4.8
4	149.74	-	
3	144.60	141.98	2.4 6.1
6	121.16	124.56	
1	-	123.99	3.6
2	115.97	-	
5	113.80	119.68	11.6

Από τους παραπάνω πίνακες παρατηρούμε ότι οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα πάνω στους οποίους βρίσκεται το φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο επηρεάζονται σημαντικά μετά τη φωσφιτυλίωση δίνοντας θετική μεταβολή στη χημική μετατόπιση ($\Delta\delta$). Οι άνθρακες σε όρθο και πάρα θέση ως προς το φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο επίσης επηρεάζονται μετά τη φωσφιτυλίωση, αλλά έχουν αρνητική μεταβολή, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα σε μέτα θέση παρουσιάζουν αμελητέα μεταβολή. Οι μεταβολές στη χημική μετατόπιση που επιφέρει η φωσφιτυλίωση είναι σύμφωνες με τη αύξηση της ηλεκτραρνητικότητας του υποκαταστάτη ($\text{OH} \rightarrow \text{O-P}$) και τα πρόσημα της μεταβολής ανάλογα με τη θέση του πυρήνα εμφανίζουν τις αναμενόμενες τάσεις. Για τον



άνθρακα που είναι συνδεδεμένος με το φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο κυριαρχεί το επαγωγικό φαινόμενο (αποπροστασία), ενώ στους όρθο και πάρα άνθρακες κυριαρχεί το συζυγιακό φαινόμενο (προστασία). Επίσης, οι άνθρακες σε παρά και μέτα θέση δεν παρουσιάζουν σύζευξη με τον φώσφορο. Οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων $\Delta\delta$ και οι σταθερές σύζευξης, $^1J_{C,P}$, για τις ενώσεις καρβακρόλη, θυμόλη βανιλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ, συγκεντρώνονται στους πίνακες 3.6 και 3.7.

Πίνακας 3.6 Μεταβολή της χημικής μετατόπισης (ppm) του ^{13}C μετά τη φωσφιτυλίωση των ενώσεων καρβακρόλη, θυμόλη, βανιλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.

Φαινόλη	$\Delta\delta$			
Θυμόλη	+5.91 (C-1)	-4.93 (C-2)	-4.31 (C-6)	-4.43 (C-2)
Καρβακρόλη	+5.83 (C-1)	-5.29 (C-6)	-4.65 (C-2)	-4.31 (C-4)
Βανιλικό οξύ	+5.62 (C-4)	-5.60 (C-5)	-3.08 (C-3)	-1.27 (C-1)
Πρωτοκατεχικό οξύ	+2.62 (C-3)	-5.88 (C-5)		

Πίνακας 3.7 Τιμές των σταθερών συζεύξεως $J_{C,P}$ (Hz) για τις ενώσεις καρβακρόλη, θυμόλη, βανιλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.

Φαινόλη	J		
Θυμόλη	$^2J_{C1,P}=7.6$ (C-1)	$^3J_{C2,P}=13.2$ (C-2)	$^3J_{C6,P}=2.4$ (C-6)
Καρβακρόλη	$^2J_{C1,P}=6.8$ (C-1)	$^3J_{C6,P}=12.4$ (C-6)	$^3J_{C2,P}=2.6$ (C-2)
Βανιλικό οξύ	$^2J_{C4,P}=5.6$ (C-4)	$^3J_{C5,P}=8.4$ (C-5)	$^3J_{C3,P}=2.4$ (C-3)
Πρωτοκατεχικό οξύ	$^2J_{C3,P1}=6.1$ και	$^3J_{C5,P}=11.64$ (C-5)	$^3J_{C3,P2}=2.4$ (C-3)

Πιο αναλυτικά, η σύζευξη μεταξύ του βενζολικού άνθρακα που συνδέεται με το φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο, και του φωσφόρου (σύζευξη δύο δεσμών) κυμαίνεται από 5.5-7.5 Hz ανάλογα με το περιβάλλον του μορίου ενώ η μεταβολή στην χημική μετατόπιση του άνθρακα αυτού κυμαίνεται στα +5-6 ppm. Η σύζευξη τριών δεσμών μεταξύ βενζολικού άνθρακα και φωσφόρου όταν ο άνθρακας είναι συνδεδεμένος με πρωτόνιο κυμαίνεται από 8.5-13 Hz και η μεταβολή στην χημική μετατόπισή του κυμαίνεται στα -5.6 ppm. Όταν ο βενζολικός άνθρακας είναι συνδεδεμένος με ομάδες όπως CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{O}(\text{CH}_3)$, O-P το $J_{\text{C,P}}$ κυμαίνεται γύρω στα 2.4-3.08 Hz και η μεταβολή στην χημική μετατόπισή του κυμαίνεται μεταξύ +3-5 ppm. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο πρωτοκατεχικό οξύ ο άνθρακας C-3 εμφανίζεται σαν πολλαπλή κορυφή (διπλή της διπλής), κι αυτό οφείλεται στην σύζευξη του άνθρακα C-3 τόσο με τον φώσφορο του φωσφιτυλιωμένου υδροξυλίου με το οποίο είναι συνδεδεμένος ($J = 6.1 \text{ Hz}$) όσο και με τον φώσφορο του άνθρακα C-4 με τον οποίο βρίσκεται σε όρθο θέση ($J = 2.4 \text{ Hz}$).

Από την παραπάνω συζήτηση, μπορούμε να συνάγουμε το συμπέρασμα, ότι ο πυρήνας ^{13}C , σε αντίθεση με το πρωτόνιο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των κορυφών του φωσφόρου στο αντίστοιχο φάσμα $^{31}\text{P-NMR}$. Και αυτό γιατί:

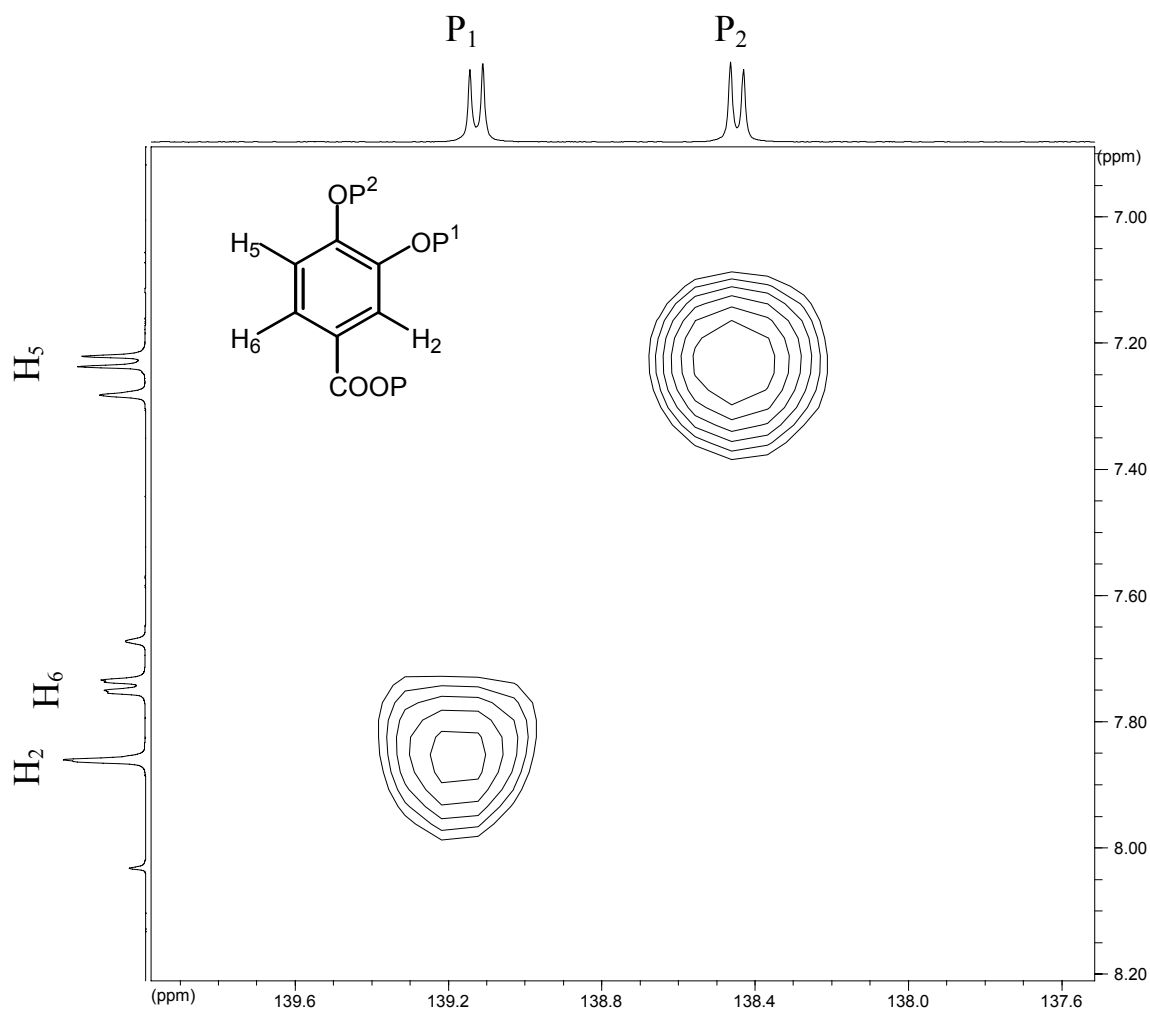
- Η εισαγωγή του πυρήνα ^{31}P στο μόριο των πολυφαινόλων επηρεάζει ισχυρά την χημική μετατόπιση ακόμα και πυρήνων ^{13}C απομακρυσμένων από το σημείο εισαγωγής. Το πρόβλημα περιπλέκεται περισσότερο όταν υπάρχουν στο μόριο περισσότερα από ένα υδροξύλια.
- Παρατηρούνται συζεύξεις C-P μακράς εμβέλειας, και ο ακριβής προσδιορισμός της διαδρομής σύζευξης είναι αδύνατος, όταν υπάρχουν περισσότερα από ένα υδροξύλια.
- Η ανίχνευση συζεύξεων C-P με τη χρήση τεχνικών 2D-NMR παρουσιάζει ιδιαίτερες οργανολογικές δυσκολίες. Το πρόβλημα γίνεται οξύτερο λόγω της χαμηλής ευαισθησίας του πυρήνα ^{13}C .

3.6.5 Προσδιορισμός των σημάτων φωσφόρου με τη χρήση πειραμάτων τα οποία ανιχνεύουν αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου φωσφόρου-πρωτονίου μέσω του χώρου.

Για να διερευνήσουμε τη διαδρομή της σύζευξης P-H (βλέπε παράγραφο 3.6.3) μελετήσαμε τη δυνατότητα ύπαρξης αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μεταξύ φωσφόρου και πρωτονίου στο χώρο. Με αυτόν τον τρόπο υπάρχει η δυνατότητα να προσδιορίσουμε ζεύγη πυρήνων πρωτονίου-φωσφόρου, τα οποία βρίσκονται σε κοντινή απόσταση στο χώρο. Το πείραμα το οποίο ανιχνεύει δίπολο-δίπολο αλληλεπιδράσεις μεταξύ ετεροπυρήνων περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8.3. Το σχήμα 3.13 παρουσιάζει το φάσμα HOESY για το πρωτοκατεχικό οξύ. Παρατηρούμε ότι η κορυφή ^{31}P με δ 138.43 παρουσιάζει διασταυρούμενη κορυφή με το πρωτόνιο H-5 και έτσι αποδίδεται στον O-P^2 , ενώ το σήμα με δ 139.14 συνδέεται με το πρωτόνιο H-2 και έτσι αποδίδεται στον φώσφορο O-P^1 .

Επιστρέφοντας τώρα στο φάσμα $\text{H}_2\text{P-gHMQC}$, του ομοπρωτοκατεχικού οξέος (σχήμα 3.10) και γνωρίζοντας ότι ο O-P^2 είναι σε δ 138.43, ενώ ο O-P^1 σε δ 139.14, διαπιστώνουμε ότι ο ισχυρότερος μηχανισμός σύζευξης φωσφόρου-πρωτονίου είναι τεσσάρων ($^4J_{\text{H,P}}$) και έξι

δεσμών (${}^6J_{H,P}$) ενώ δεν εμφανίζεται μηχανισμός σύζευξης 5 δεσμών (${}^6J_{H,P}$). Μελέτες που έγιναν και σε άλλες διυδροξυφαινόλες της παρούσας εργασίας έδειξαν την ύπαρξη σύζευξης τεσσάρων και έξι δεσμών και την απουσία σύζευξης πέντε δεσμών.



Σχήμα 3.13 Φάσμα H,P-HOESY του πρωτοκατεχικού οξέος.

Η γνώση της επικρατέστερης διαδρομής σύζευξης μεταξύ πρωτονίου και φωσφόρου επιτρέπει τον προσδιορισμό των κορυφών των διυδροξυπολυφαινόλων από τα αντίστοιχα φάσματα H,P-gHMQC, γιατί ο χρόνος που απαιτείται για τη λήψη τους είναι πολύ μικρότερος (40 min) από τα αντίστοιχα φάσματα HOESY (4 h). Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκαν οι κορυφές στα φάσματα ${}^{31}\text{P}$ -NMR των φωσφιτυλιωμένων ενώσεων καφεϊκό οξύ, γεντιστικό οξύ και υδροξυτυροσόλη.

Για την επιβεβαίωση αυτού του μηχανισμού μελετήθηκαν και άλλες πολυφαινόλες. Έτσι στο δισδιάστατο φάσμα P,H g-HMQC του γαλλικού οξέος φαίνεται ότι υπερισχύει η σύζευξη ${}^4J_{P,H}$ έναντι της σύζευξης ${}^5J_{P,H}$. Στο δισδιάστατο φάσμα φωσφόρου-πρωτονίου P,H g-HMQC, του βανιλικού οξέος, μιας μονουδροξυφαινόλης, οι συζεύξεις ${}^4J_{P,H}$ και ${}^6J_{P,H}$ επίσης

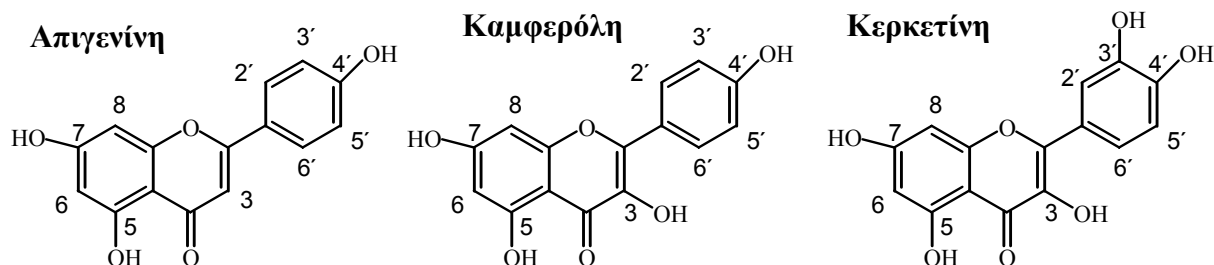
υπερισχύουν της σύζευξης $^5J_{P,H}$, με την σύζευξη τεσσάρων δεσμών ($^4J_{P,H}$) να είναι περίπου 10-20 φορές ισχυρότερη από την σύζευξη πέντε δεσμών ($^5J_{P,H}$).

3.7 Πολυδροξυφαινόλες

Ο προσδιορισμός των κορυφών των πολυδροξυφαινολών κερκετίνη, απιγενίνη και καμφερόλη έγινε με άμεση σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ^{31}P -NMR (Σχήμα 3.14).

Τα σήματα φωσφόρου με δ 141.78 και 141.70 στο φάσμα της κερκετίνης και της καμφερόλης αποδίδονται στο φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο OH-3, αφού αυτό το υδροξύλιο λείπει από την απιγενίνη. Η κορυφή με δ 140.47 στο φάσμα της κερκετίνης η οποία λείπει και από το φάσμα της καμφερόλης και από το φάσμα της απιγενίνης ανατίθεται στο φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο OH-3'.

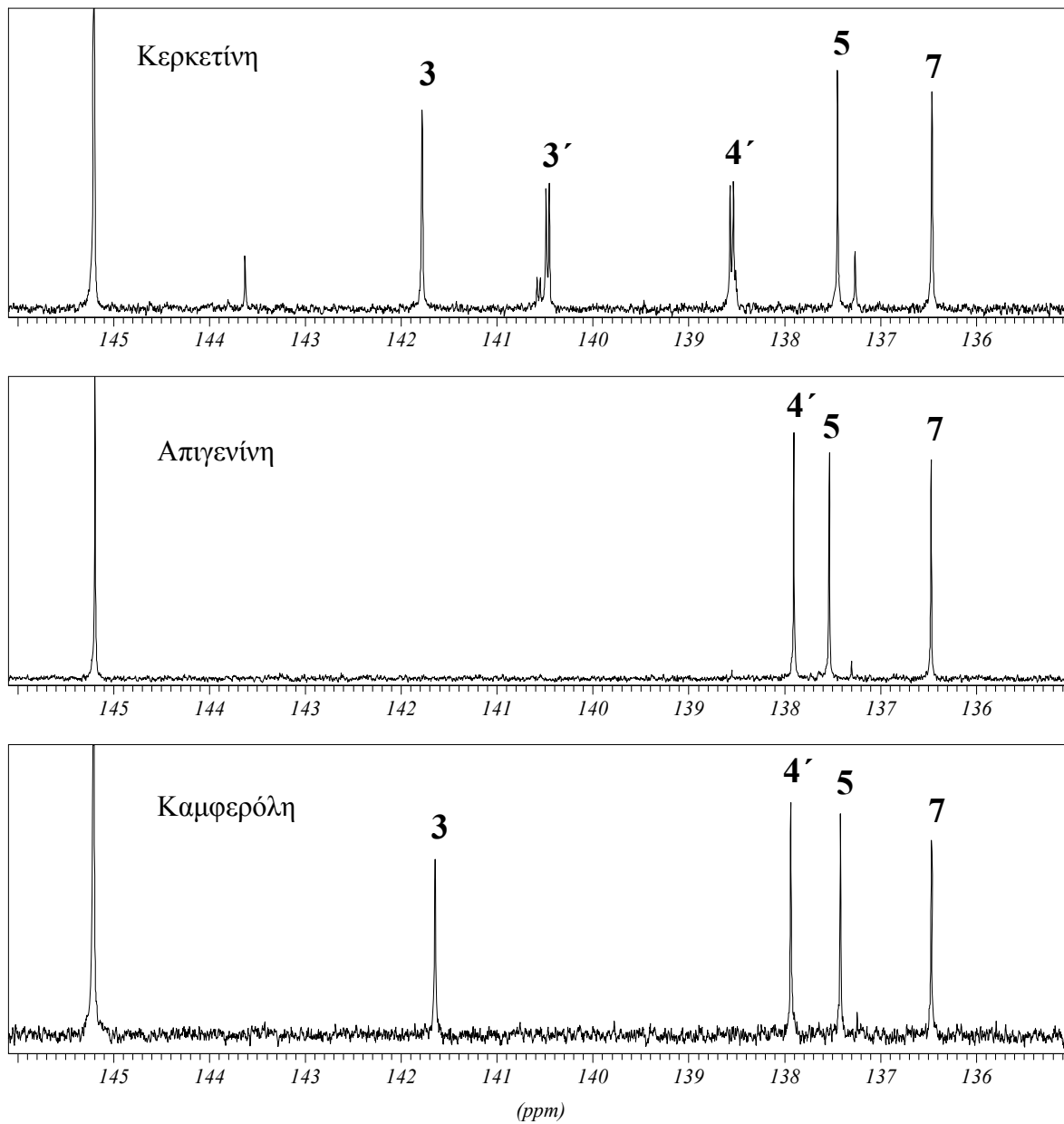
Το σήμα με δ 138.55 στο φάσμα της κερκετίνης αποδίδεται στο φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο OH-4' αφού τα σήματα με δ 140.47 και 138.55 είναι διπλές αντικατοπτρίζοντας τη συνήθη ομοαλλυλική σύζευξη ($^5J_{P,P} = 6.88$ Hz) η οποία παρατηρείται σε φωσφιτυλιωμένες όρθο-διυδροξυφαινόλες. Έτσι τα σήματα με δ 137.88 και 137.95 στα φάσματα της καμφερόλης και της απιγενίνης αποδίδονται στο φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο OH-4'. Η μετατόπιση σε υψηλότερα πεδία ($\sim +0.60$ ppm) αυτών των σημάτων σε σχέση με την κερκετίνη οφείλεται στο φαινόμενο προστασίας της όρθο υδροξυλομάδας OH-3' της κερκετίνης.



Τέλος τα δύο εναπομείναντα σήματα τα οποία υπάρχουν και στις τρεις ενώσεις αποδίδονται στα φωσφιτυλιωμένα υδροξύλια OH-5 και OH-7. Δεν έγιναν περαιτέρω πειράματα για τον προσδιορισμό της χημικής μετατόπισης των δύο αυτών φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων. Παρ'όλα αυτά, η χημική μετατόπιση του φωσφιτυλιωμένου υδροξυλίου OH-5 αναμένεται να εμφανίζεται σε χαμηλότερα πεδία από ότι το φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο OH-7 αφού το πρώτο βρίσκεται στον κώνο προστασίας της γειτονικής καρβονυλικής ομάδας.

Οι χημικές μετατοπίσεις φωσφόρου των φωσφιτυλιωμένων διυδροξυ- και πολυδροξυ φαινολών, όπως προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη συγκεντρώνονται στον πίνακα 3.8.

Σχήμα 3.14 Μονοδιάστατα ^{31}P -NMR φάσματα των πολυφαινολών κερκετίνη, απιγενίνη και καμφερόλη.



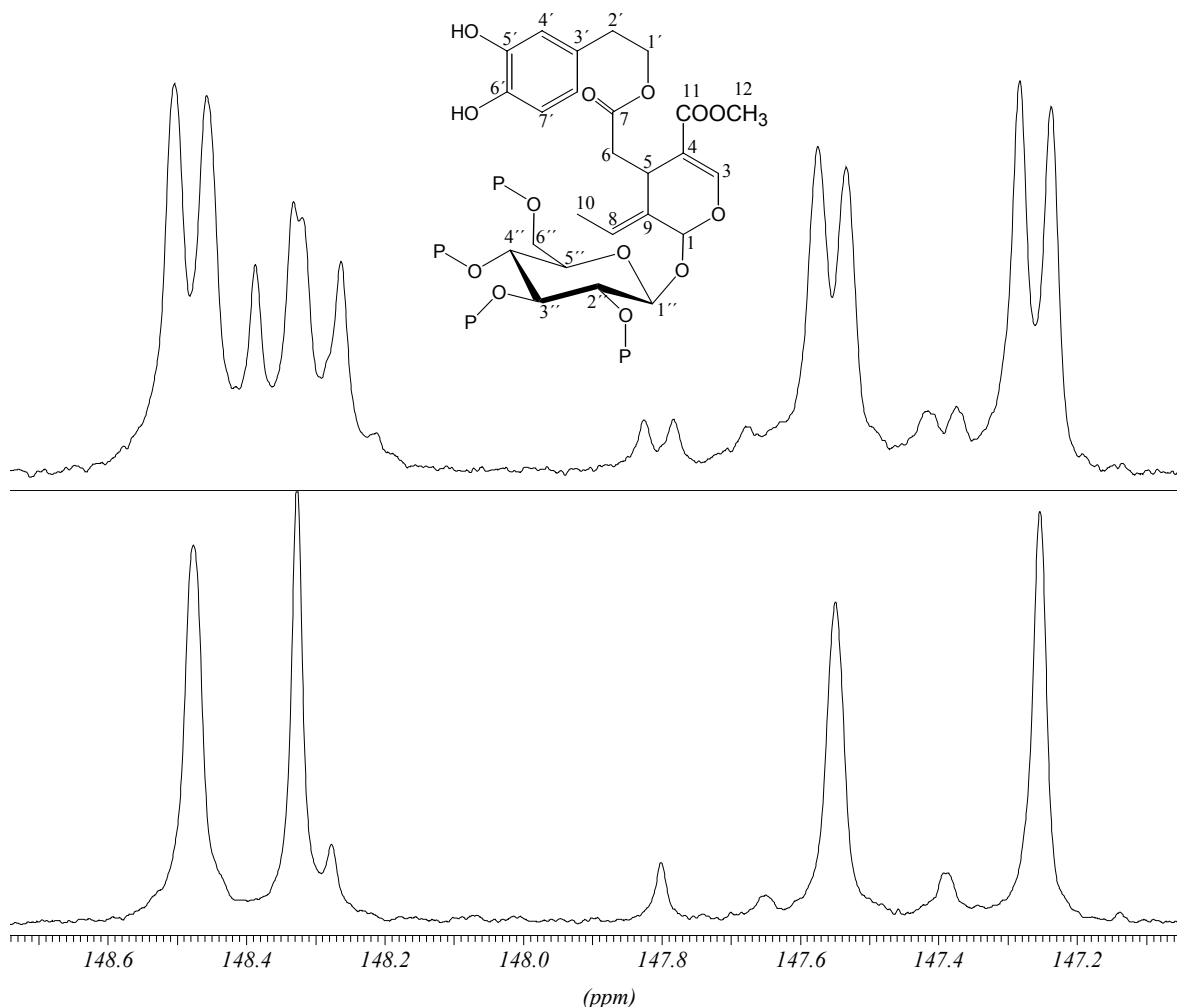
Πίνακας 3.8 Χημικές μετατοπίσεις φωσφόρου διϋδροξυ- και πολυϋδροξυφαινόλων. Λαμβάνεται υπόψιν η αρίθμηση του πίνακα 1.1.

Πολυφαινόλη	O-P	COO-P
Καφεϊκό οξύ (4)	1: 139.85 2: 138.92	135.22
Πρωτοκατεχικό οξύ (9)	1: 139.14 2: 138.51	134.94
Γαλλικό οξύ (10)	1, 3 : 138.51 2: 141.43	134.58
Γεντιστικό οξύ (12)	1: 138.27 2: 138.55	135.03
Ομοπρωτοκατεχικό οξύ (14)	1: 139.14 2: 139.14	134.65
Τυροσόλη (15)	1: 138.20 2: 146.91	
Υδροξυτυροσόλη (16)	1: 139.25 2: 139.13 3: 146.99	
Σικιμικό οξύ (19)	3: 147.98 4: 146.69 5: 146.47	134.81
Απιγενίνη (20)	5: 137.44 7: 136.46 4': 137.88	
Καμφερόλη (21)	3: 141.70 5: 137.44 7: 136.46 4': 137.95	
Κερκετίνη (22)	3: 141.78 5: 137.44 7: 136.44 3': 140.47 4': 138.55	

3.8 Ελευρωπαΐνη

Επειδή η ελευρωπαΐνη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του ελαιολάδου θα αντιμετωπιστεί ξεχωριστά σ' αυτήν την παράγραφο. Όπως αναφέραμε στην παράγραφο 1.1 η ελευρωπαΐνη είναι ο εστέρας του ελενολικού οξέος με την υδροξυτυροσόλη. Επομένως, οι κορυφές των αρωματικών υδροξυλίων της ελευρωπαΐνης στα φάσματα ^{31}P -NMR μετά την

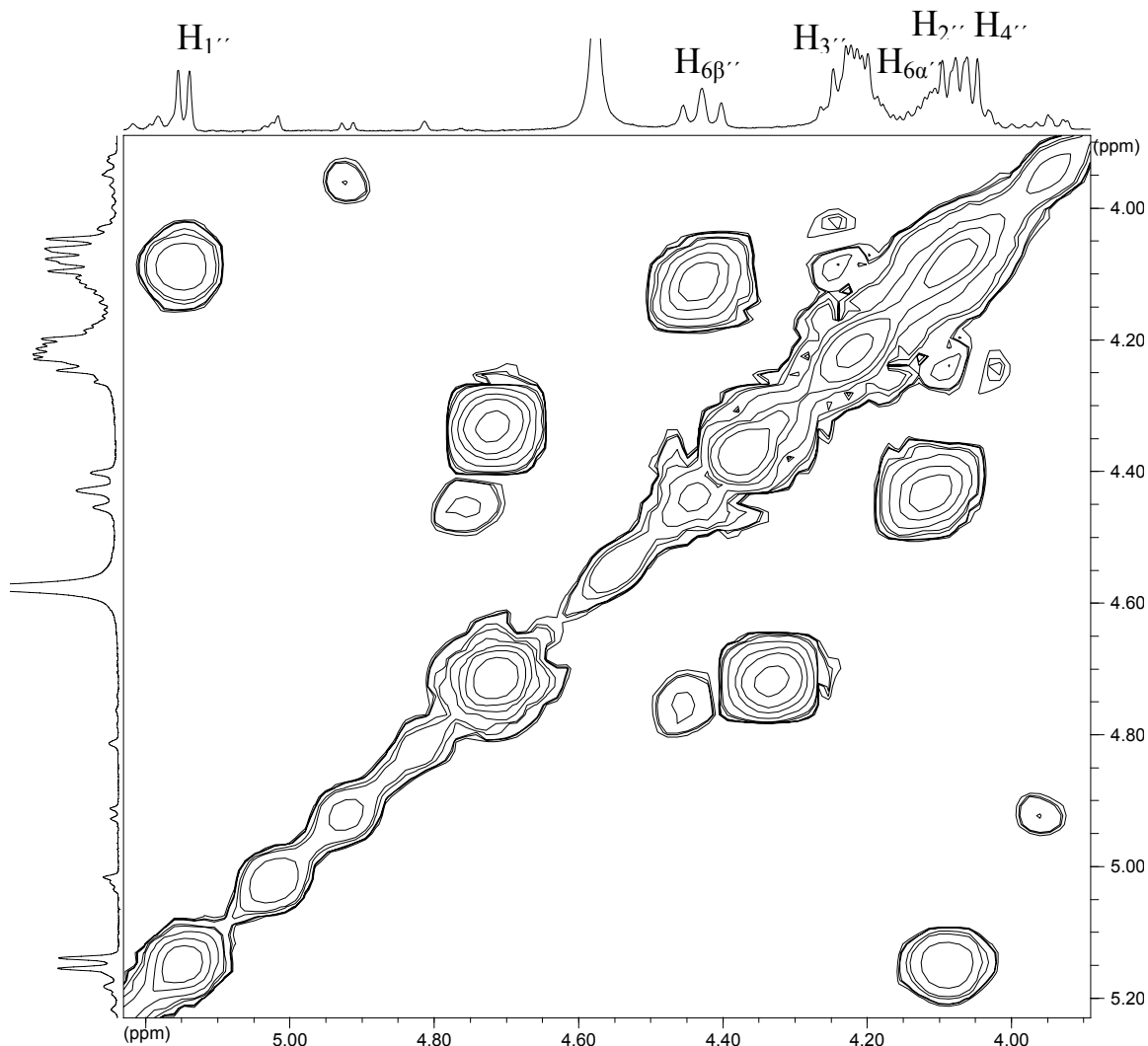
φωσφιτυλίωση θα έχουν την ίδια χημική μετατοπιση με τα φωσφιτυλιωμένα υδροξύλια της απλής υδροξυτυροσόλης. Ενδιαφέρον, επομένως παρουσιάζει ο προσδιορισμός των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων της γλυκόζης στο μόριο της ελευρωπαΐνης (σχήμα 3.15)



Σχήμα 3.15 Σύγκριση συζευγμένου ^{31}P - ^1H φάσματος ^{31}P -NMR (πάνω) με το αποσυζευγμένο (^{31}P - $\{^1\text{H}\}$) φάσμα ^{31}P -NMR (κάτω) της ελευρωπαΐνης.

Το μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P -NMR της φωσφιτυλιωμένης ελευρωπαΐνης παρουσιάζει δύο διπλές σε δ 139.18 και 139.02 που αποδίδονται στα φαινολικά υδροξύλια 5' και 6', και τέσσερις κορυφές σε δ 148.49, 148.33, 147.56 και 147.30 (σχήμα 3.15) οι οποίες οφείλονται στα υδροξύλια της γλυκόζης η οποία αποτελεί δομικό στοιχείο της ελευρωπαΐνης. Για τον προσδιορισμό των χημικών μετατοπίσεων των ομάδων O-P του δακτυλίου της γλυκόζης της ελευρωπαΐνης λήφθηκε καταρχήν ένα συζευγμένο με πρωτόνιο φάσμα ^{31}P -NMR (σχήμα 3.15), ώστε να εξακριβωθεί ποιά από τις τέσσερις κορυφές του αποσυζευγμένου φάσματος ^{31}P -NMR αντιστοιχεί στο φωσφιτυλιωμένο υδροξύλιο O-P $^{6''}$ (υδροξυμεθυλομάδα της γλυκόζης). Τα δίδυμα πρωτόνια H $''_{\alpha}$ και H $''_{\beta}$ είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και έτσι η κορυφή του φάσματος ^{31}P -NMR η οποία αντιστοιχεί στην ομάδα O-P $^{6''}$ θα πρέπει να δίνει μία διπλή της διπλής. Η κορυφή σε δ 148.32 στο συζευγμένο φάσμα ^{31}P -NMR είναι διπλή της διπλής και επομένως αντιστοιχεί στην ομάδα O-P $^{6''}$.

Το σχήμα 3.16 παρουσιάζει την περιοχή του φάσματος H,H gCOSY της φωσφιτυλιωμένης ελευρωπαΐνης στην οποία εμφανίζονται οι απορροφήσεις των πρωτονίων του μορίου της γλυκόζης. Ως γνωστόν, το ανωμερικό πρωτόνιο $H-1''$ συντονίζεται στα χαμηλότερα πεδία. Έτσι το σήμα σε δ 5.1 αποδίδεται στο πρωτόνιο $H-1''$. Το $H-1''$ δίνει διασταυρούμενη κορυφή με την κορυφή σε δ 4.08 η οποία συνεπώς πρέπει να αντιστοιχεί στο

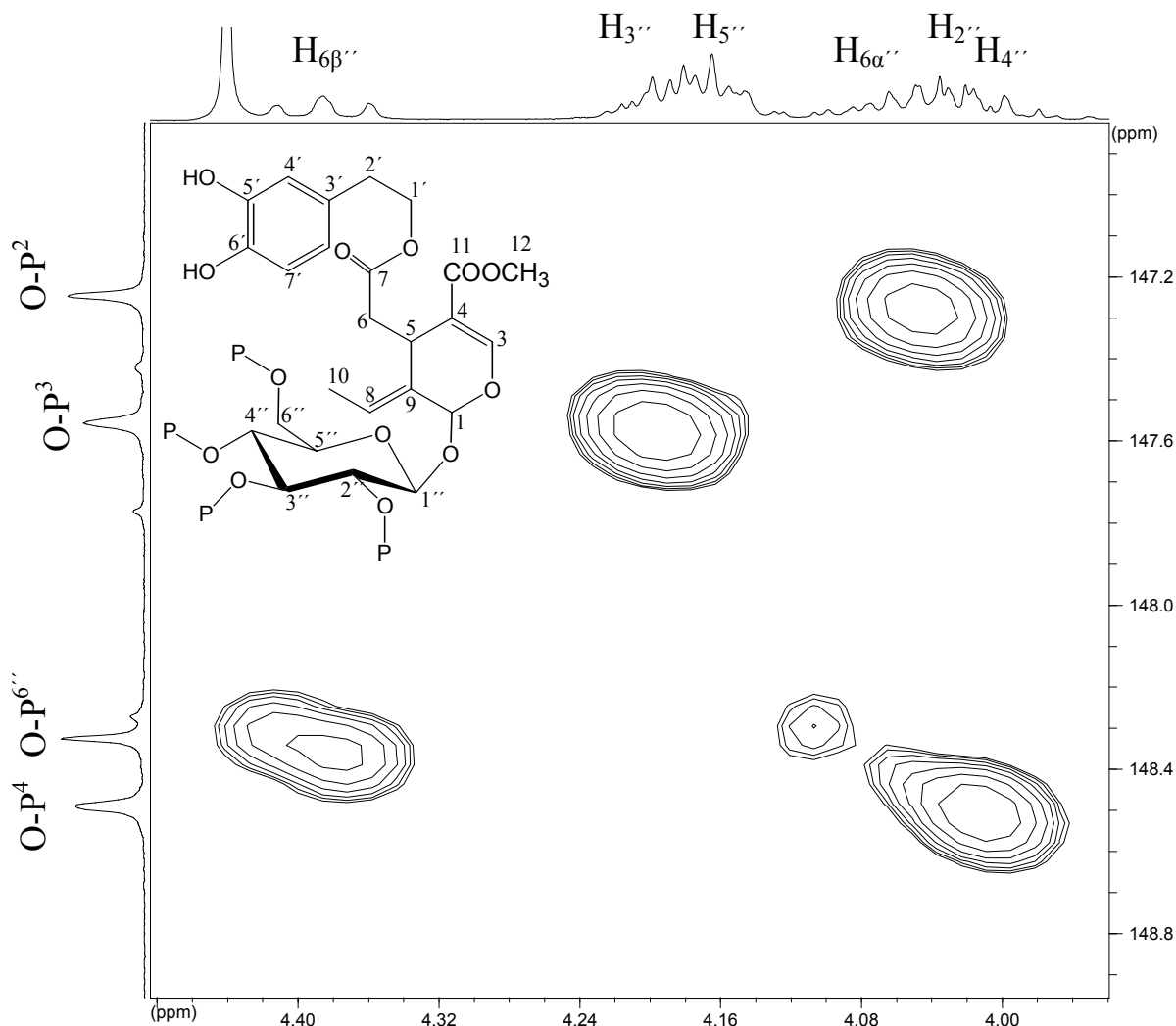


Σχήμα 3.16 Φάσμα H,H -gCOSY της φωσφιτυλιωμένης ελευρωπαΐνης

πρωτόνιο $H-2''$. Η κορυφή αυτή παρουσιάζει διασταυρούμενη κορυφή με την κορυφή σε δ 4.20, η οποία συνεπώς αντιστοιχεί στο πρωτόνιο $H-3''$. Το πρωτόνιο $H-3''$ παρουσιάζει διασταυρούμενη κορυφή με την κορυφή σε δ 4.02 και ως εκ τούτου το σήμα αυτό αντιστοιχεί στο πρωτόνιο $H-4''$.

Μετά τον προσδιορισμό των πρωτονίων του θραύσματος της γλυκόζης μπορούμε να προσδιορίσουμε τα φωσφιτυλιωμένα υδροξύλια με ένα πείραμα H,P -gHMQC. Στο σχήμα 3.17 παρουσιάζεται το φάσμα H,P -gHMQC της φωσφιτυλιωμένης ελευρωπαΐνης στην περιοχή απορροφήσεων της γλυκόζης. Από αυτό το φάσμα επιβεβαιώνεται ότι η κορυφή σε δ 148.32 αντιστοιχεί στην ομάδα $O-P''$ αφού είναι η μόνη η οποία δίνει διασταυρούμενες κορυφές με δύο κορυφές σε δ 4.40 και 4.15. Οι κορυφές αυτές επομένως σωστά αποδίδονται

στα πρωτόνια $H''_{6\alpha}$ και $H''_{6\beta}$. Η κορυφή με δ 147.30 αντιστοιχεί στον φώσφορο ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το $O-P^5$, η κορυφή με δ 147.56 στο $O-P^3$, και δ 148.49 στο $OH-4'$.



Σχήμα 3.17 Φάσμα H,P-gHMQC της ελευρωπαΐνης

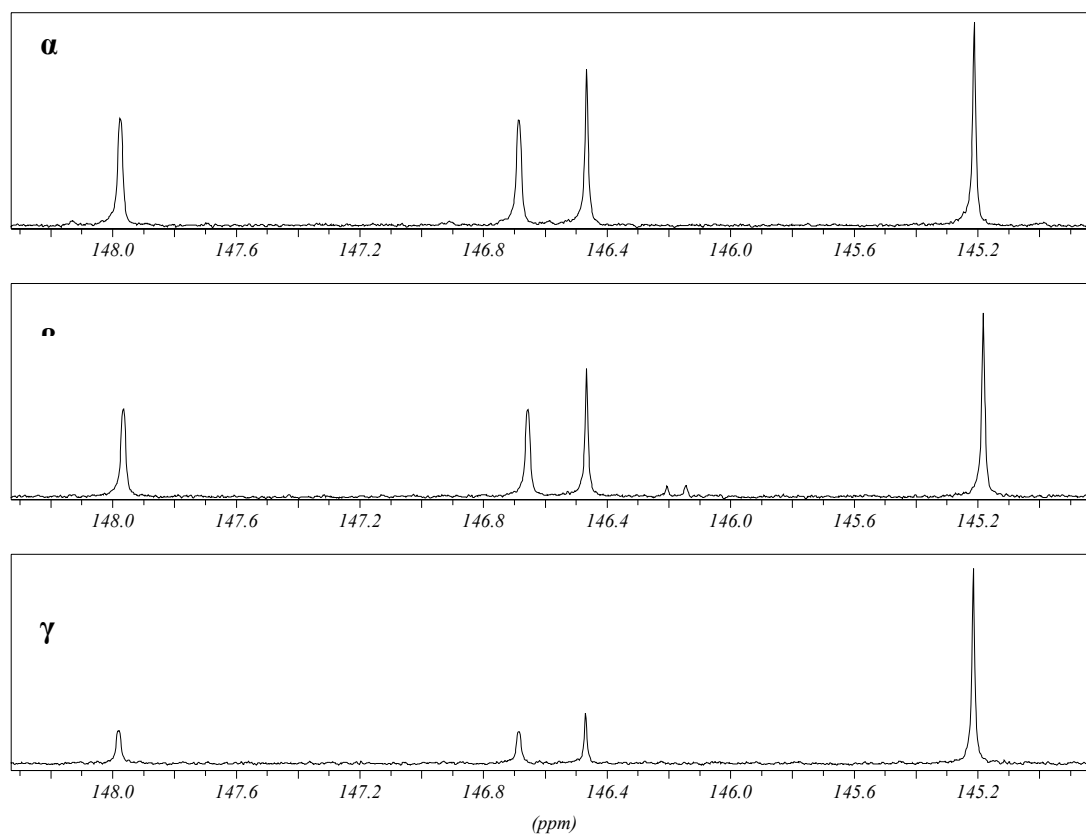
3.9 Επίδραση της Συγκέντρωσης των Προτύπων Πολυφαινολών στη Χημική Μετατόπιση των Φασμάτων ^{31}P NMR.

Εφόσον οι πολυφαινόλες στα παρθένα ελαιόλαδα βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία για τη λήψη των φασμάτων ^{31}P -NMR, κρίθηκε ενδιαφέρον να εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης στις χημικές μετατοπίσεις ^{31}P -NMR των φωσφιτυλιωμένων πολυφαινολικών πρότυπων ενώσεων. Η εξάρτηση από τη συγκέντρωση των χημικών μετατοπίσεων του ^{31}P μελετήθηκε χρησιμοποιώντας πειράματα ^{31}P -NMR με δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης. Τα πειράματα αυτά έδειξαν καθαρά ότι η συγκέντρωση έχει ελάχιστη επίδραση στις χημικές μετατοπίσεις ^{31}P των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλομάδων. Για παράδειγμα η αύξηση κατά 50

φορές της συγκέντρωσης της καρβακρόλης (από 2.5 σε 49 μmol s) δεν έδειξε επίδραση στη χημική μετατόπιση της φωσφιτυλιωμένης υδροξυλομάδας. Η αύξηση κατά 30 φορές της συγκέντρωσης του σικιμικού οξέος (από 1.5 σε 31 μmol s) είχε ως αποτέλεσμα μία πολύ μικρή μετατόπιση προς ισχυρότερα πεδία της τάξης του 0.01-0.02 ppm για τις τρεις υδροξυλομάδες της ένωσης αυτής, η οποία θεωρείται αμελητέα.

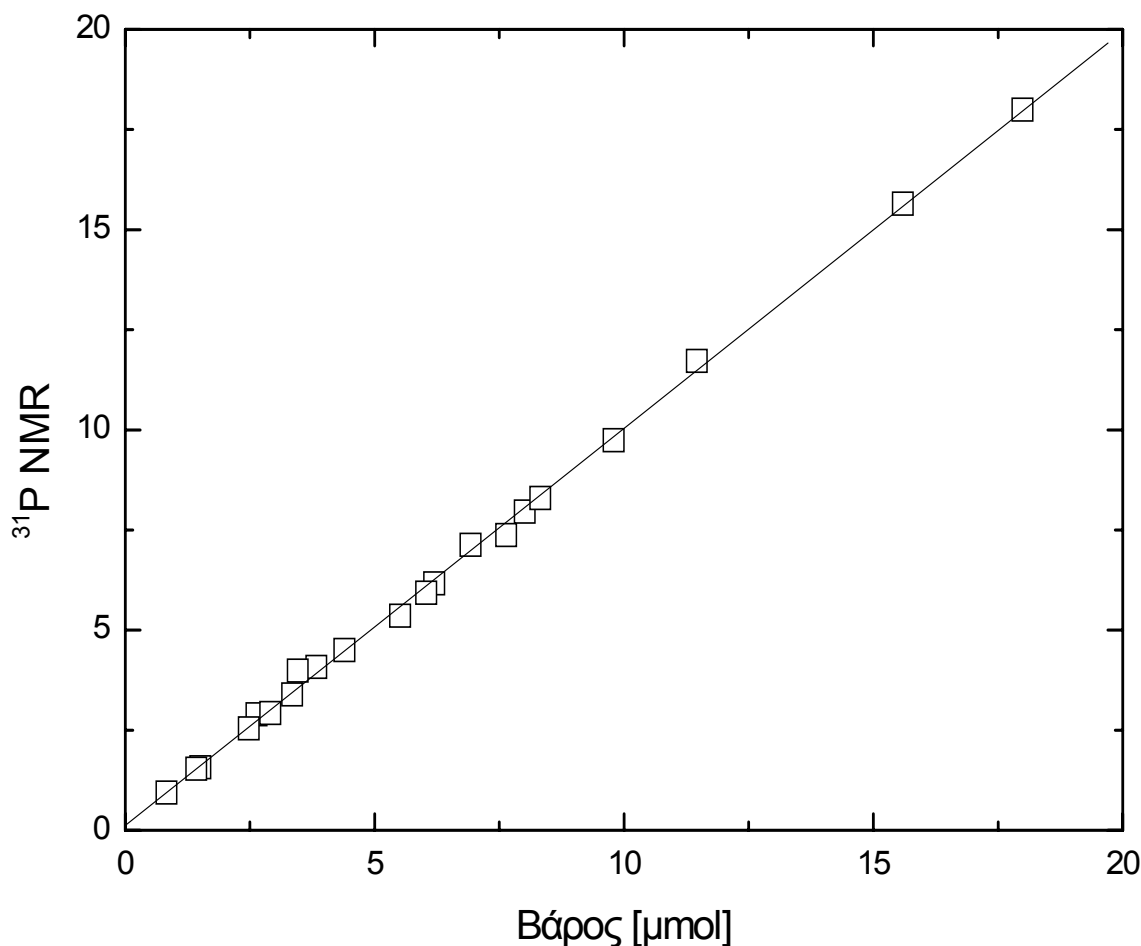
3.10 Ποσοτική ανάλυση των πρότυπων πολυφαινολικών ενώσεων

Τα απλά φάσματα ^{31}P -NMR των φωσφιτυλιωμένων πρότυπων ενώσεων σε αυτήν την εργασία ελήφθησαν χρησιμοποιώντας μεγάλο χρόνο αναμονής, έτσι ώστε η μαγνήτιση να επανέρχεται πλήρως στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας πριν από την επανάληψη της παλμικής ακολουθίας. Ο μεγάλος χρόνος αναμονής έχει σαν αποτέλεσμα τα ολοκληρώματα των κορυφών στο φάσμα να αντανακλούν τις πραγματικές συγκεντρώσεις των διαλυμένων πολυφαινολών. Περαιτέρω, η ποσοτικοποίηση της κάθε πολυφαινολικής ένωσης



Σχήμα 3.18 Μεταβολή της έντασης του σήματος NMR ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της πολυφαινόλης. Παρουσιάζονται τα φάσματα του σικιμικού οξέος με συγκέντρωση (α) 0.0175 M, (β) 0.01 M, και (γ) 0.00375 M.

διευκολύνεται από ένα κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο. Η προσθήκη γνωστής ποσότητας εσωτερικού προτύπου επιτρέπει την απ' ευθείας σύγκριση των ποσοτήτων των πολυφαινολών, όπως αυτές υπολογίζονται από τα ολοκληρώματα των αντιστοιχων κορυφών, με τις πραγματικές ποσότητες των πολυφαινολών. Η κυκλοεξανόλη αποτελεί ένα χρήσιμο εσωτερικό πρότυπο στην παρούσα ανάλυση.⁵⁴



Σχήμα 3.19 Διάγραμμα της ποσότητας της κάθε πρότυπης ένωσης όπως υπολογίστηκε μέσω της ολοκλήρωσης των σημάτων φωσφόρου των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων ως προς την πραγματική συγκέντρωση.

Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου στον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών φαίνεται στο σχήμα 3.18, το οποίο απεικονίζει την σχέση της ποσότητας της κάθε πρότυπης ένωσης όπως υπολογίστηκε μέσω ολοκλήρωσης των σημάτων φωσφόρου των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων ως προς την πραγματική ποσότητα. Η ποσότητα της κάθε υδροξυφαινόλης που υπολογίστηκε με φασματοσκοπία ³¹P-NMR αντιπροσωπεύεται από την μέση τιμή των συγκεντρώσεων που υπολογίστηκαν από την κάθε φωσφιτυλιωμένη υδροξυλική ομάδα στο μόριο ξεχωριστά. Όπως φαίνεται από το σχήμα 3.18 η συσχέτιση είναι γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $r = 0.999$ κλίση = 0.99 ± 0.01 και τεταγμένη = 0.12 ± 0.06 , υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος ³¹P-NMR είναι ακριβής για ποσοτική ανάλυση.

Στον πίνακα 3.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ποσοτικών μετρήσεων με φασματοσκοπία ^{31}P -NMR όλων των πρότυπων ενώσεων που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία και που χρησιμοποιήθηκαν στο διάγραμμα του σχήματος 3.18.

Πίνακας 3.9 Ποσότητες (σε μmol) πολυφαινολών.

Πρότυπη ένωση	Θεωρητική τιμή	^{31}P -NMR	% Σχετικό Σφάλμα
ο-κουμαρικό οξύ (1)	5.36	5.51	-2.8
p-κουμαρικό οξύ (2)	9.74	9.80	-0.6
Βανιλλικό οξύ (3)	7.38	7.64	-3.5
Πρωτοκατεχικό οξύ (4)	6.16	6.19	-0.5
p-Υδροξυβενζοϊκό οξύ (5)	7.96	8.01	-0.6
Τυροσόλη (6)	0.94	0.82	12.8
p-Υδοξυφαινυλοξικό οξύ (7)	15.65	15.59	0.4
Ομοπρωτοκατεχικό οξύ (8)	7.13	6.92	2.9
Καφειικό οξύ (9)	3.39	3.34	1.5
Φερουλικό οξύ (10)	4.08	3.83	6.1
Γαλλικό οξύ (11)	5.93	6.04	-1.9
Θυμόλη (12)	18.00	17.99	0.1
3-ύδροξυ-4-μέθοξυκινναμικό οξύ (13)	3.99	3.46	13.3
Κερκετίνη (14)	2.90	2.63	9.3
Σικιμικό οξύ (15)	1.58	1.51	4.4
Καρβακρόλη (16)	2.54	2.48	2.4
Σιναπικό οξύ (17)	4.50	4.4	2.2
Γεντιστικό οξύ (18)	2.92	2.91	0.3
Καμφερόλη (19)	1.54	1.42	7.8
Υδροξυτυροσόλη (20)	8.30	8.32	-0.2
Συριγκικό οξύ (21)	11.72	11.46	2.2

3.11 Επαναληψιμότητα (repeatability) και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) της μεθόδου

Η αξιοπιστία της μεθόδου ^{31}P -NMR για ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών αντανακλάται επίσης στην επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ^{31}P -NMR εξετάστηκε με τη λήψη πολλών διαφορετικών φασμάτων ^{31}P -NMR χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα πρότυπης πολυφαινόλης. Η αναπαραγωγιμότητα δεν στάθηκε δυνατό να μετρηθεί με τη λήψη φασμάτων ^{31}P -NMR σε διαφορετικά φασματόμετρα NMR. Έτσι για την εξέταση της αναπαραγωγιμότητας προετοιμάστηκαν πολλά διαφορετικά δείγματα με την ίδια ποσότητα πολυφαινόλης (σε

μmol) κάθε φορά και λήφθηκε φάσμα ^{31}P -NMR για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η πρότυπη φαινόλη που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις αυτές ήταν η τυροσόλη. Στον πίνακα 3.10 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της μέτρησης της αναπαραγωγιμότητας (12 φάσματα ^{31}P -NMR του ίδιου δείγματος τυροσόλης) και της επαναληψιμότητας (8 διαφορετικά δείγματα τυροσόλης).

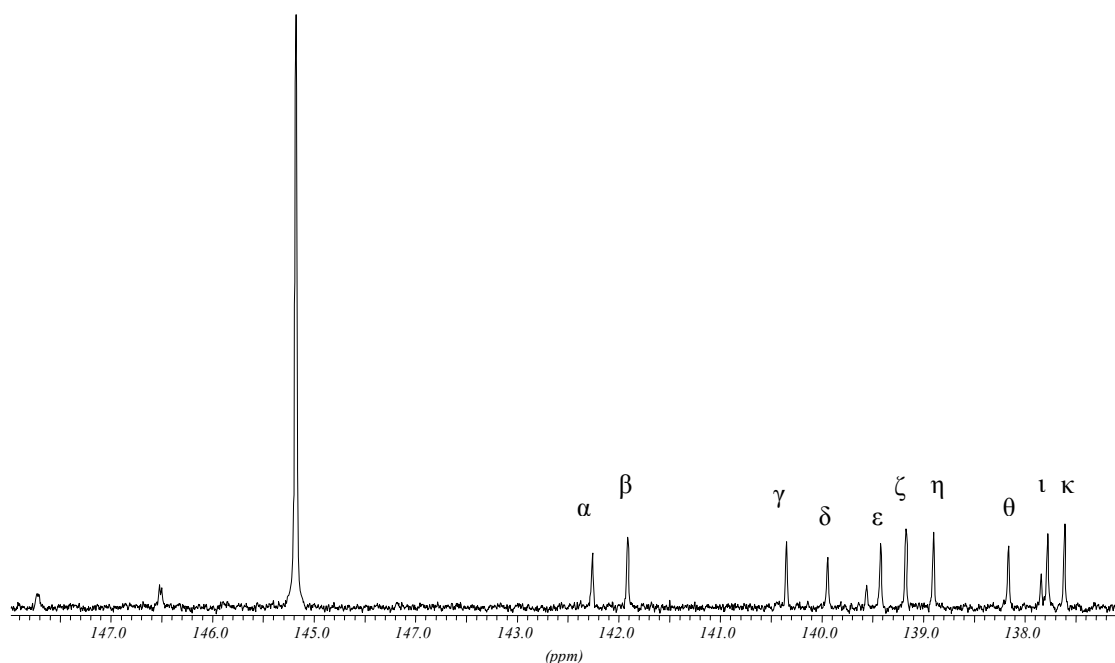
Πίνακας 3.10 Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης (μmol) της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου ^{31}P -NMR.

Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
Αριθμός Μέτρησης	Ολοκλήρωση σημάτων ^{31}P -NMR	Μετρήσεις	Ολοκλήρωση σημάτων ^{31}P -NMR
1	12.26	1	12.31
2	12.39	2	11.93
3	12.06	3	12.02
4	12.03	4	12.00
5	12.18	5	12.55
6	12.02	6	12.41
7	12.05	7	12.64
8	12.30	8	12.71
9	12.23		
10	12.20		
11	12.35		
12	12.22		
Μέσος όρος	12.19	μέσος όρος	12.32
Τυπική απόκλιση	0.13	τυπική απόκλιση	0.31
Επαναληψιμότητα	1.04%	%	2.49%

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 3.10 η επαναληψιμότητα για το δείγμα της φωσφιτυλιωμένης τυροσόλης, βρέθηκε ότι είναι 1.04% (ή σε όρους τυπικής απόκλισης, 12.19 ± 0.13). Η αναπαραγωγιμότητα βρέθηκε ίση με 2.44% (ή σε όρους τυπικής απόκλισης, 12.32 ± 0.31). Η συνολική στατιστική ανάλυση αποδεικνύει ότι αυτή η μέθοδος είναι επαναλήψιμη και ακριβής.

3.12 Φάσματα ^{31}P -NMR μειγμάτων πρότυπων πολυφαινολών του ελαιολάδου

Για να διερευνηθεί εάν η χημική μετατόπιση μιας πολυφαινόλης μεταβάλλεται από την παρουσία άλλων πολυφαινολών, όπως συμβαίνει στο πολικό μέρος του ελαιολάδου, καθώς επίσης και η ικανότητα της μεθόδου για ποσοτική ανάλυση σε πραγματικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ^{31}P -NMR σε μείγματα πρότυπων μονοϋδροξυφαινολών και σε μείγματα πρότυπων πολυυδροξυφαινολών.



Σχήμα 3.20 Μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P -NMR μείγματος πρότυπων μονοϋδροξυφαινολών
(α) Σιναπικό οξύ, (β) Συριγγικό οξύ, (γ) 3-ϋδροξυ-4-μέθοξυ κινναμικό οξύ, (δ) Ομοβανιλλικό οξύ, (ε) Φερουλικό οξύ, (ζ) Βανιλλικό οξύ, (η) ο-κουμαρικό οξύ, (θ) p-ϋδροξυφαινολοξικό οξύ, (ι) p-κουμαρικό οξύ, (κ) p-ϋδροξυβενζοϊκό οξύ.

Στο σχήμα 3.19 δίνεται το φάσμα ^{31}P -NMR ενός μείγματος 10 πρότυπων μονοϋδροξυφαινολών. Οι χημικές μετατοπίσεις των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων στο μείγμα δεν παρουσίασαν μεταβολές σε σύγκριση με τις χημικές μετατοπίσεις των απλών φαινολών. Έτσι ο προσδιορισμός του ήταν πολύ εύκολος (σχήμα 3.19). Τα ποσοτικά αποτελέσματα αυτού του φάσματος δίνονται στον πίνακα 3.11. Τα αποτελέσματα της ζύγισης είναι σχεδόν ταυτόσημα με τις ποσότητες που υπολογίστηκαν από το φάσμα του σχήματος 3.19.

Το φάσμα ^{31}P -NMR του μείγματος των πολυυδροξυφαινολών παρουσιάζεται στο σχήμα 3.20. Στο φάσμα αυτό στις κορυφές σε δ 138.4 και 139.0 συνεισφέρουν περισσότερες από μία φαινόλες. Στην κορυφή σε δ 139.0 συμμετέχουν με δύο πυρήνες φωσφόρου οι

ενώσεις υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαϊνή και ομοπρωτοκατεχικό οξύ, και με ένα πυρήνα φωσφόρου το πρωτοκατεχικό οξύ. Οι ποσότητες όμως για όλες τις υπολοιπες ενώσεις εκτός από το ομοπρωτοκατεχικό οξύ μπορούν να υπολογιστούν από άλλες κορυφές που αυτές παρουσιάζουν: η υδροξυτυροσόλη υπολογίζεται από την κορυφή Y, η ελευρωπαϊνή από την κορυφή E ενώ το πρωτοκατεχικό οξύ από την κορυφή Π. Αν συμβολίσουμε το ολοκλήρωμα της κορυφής του ομοπρωτοκατεχικού οξέως με X_o, και το ολοκλήρωμα της κορυφής με δ 139.0 H, η ποσότητα του ομοπρωτοκατεχικού οξέως, μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

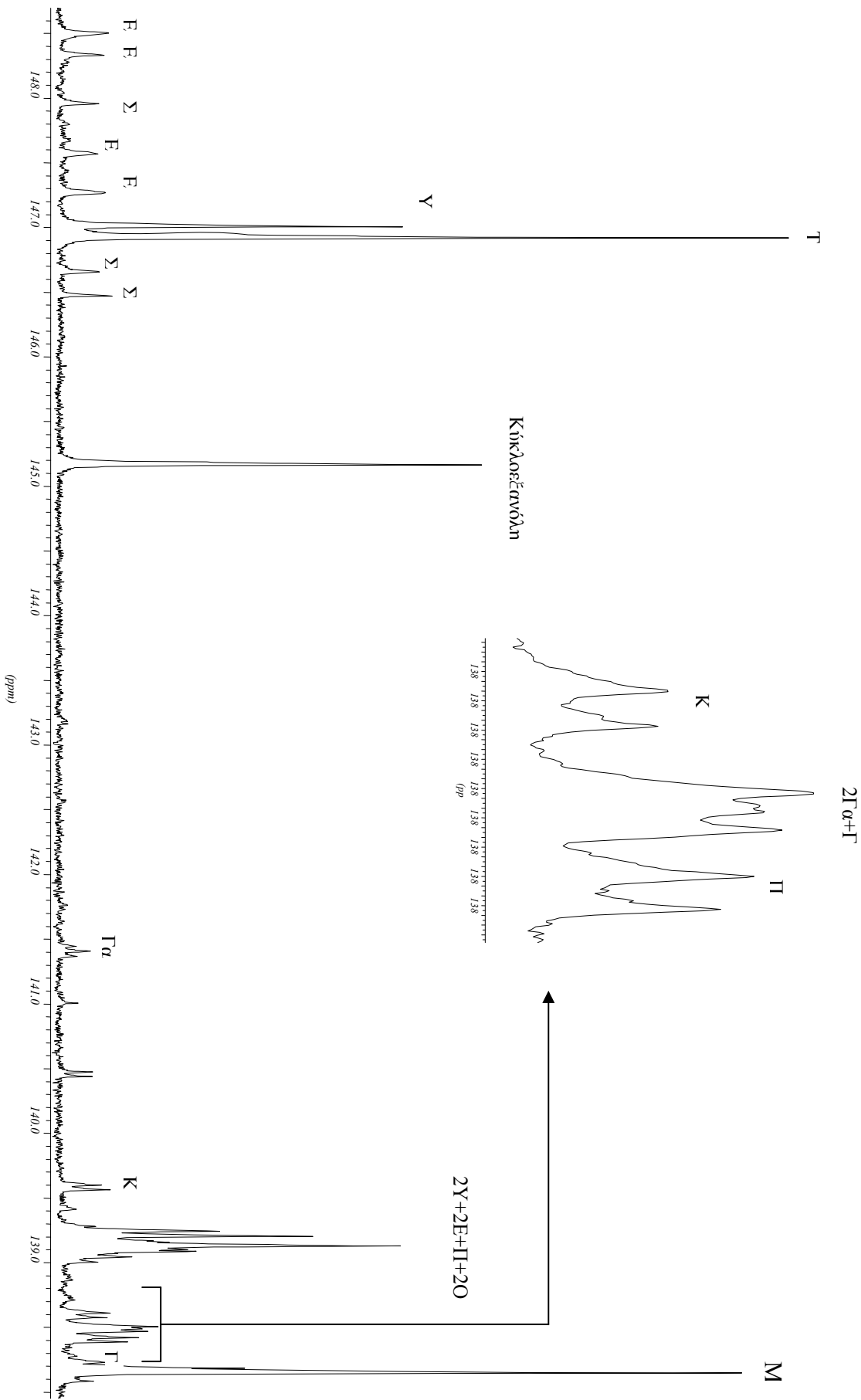
$$X_o = \frac{H - 2Y - 2E - \Pi}{2}$$

Πίνακας 3.11 Ποσοτικά αποτελέσματα (σε μmol) μείγματος μονοϋδροξυφαινολών.

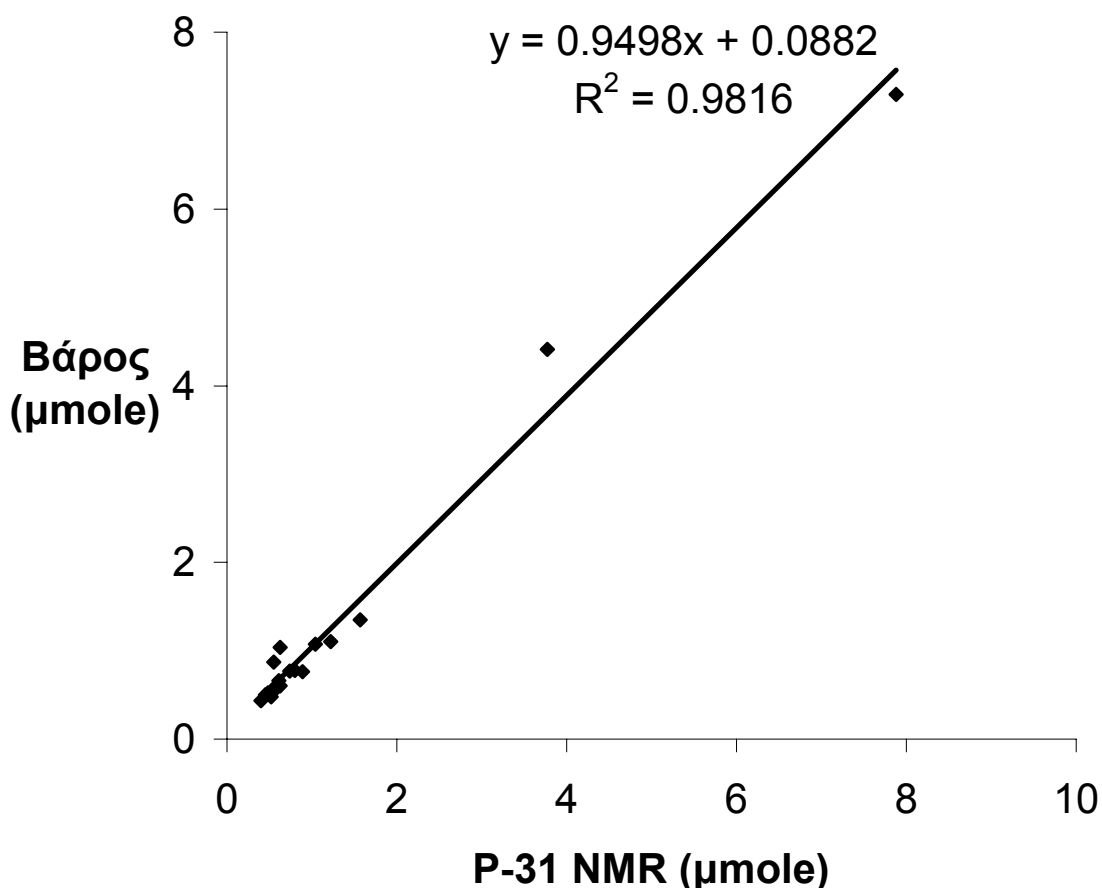
Μονοϋδροξυ-φαινόλες	Βάρος	³¹P-NMR	% Σχετικό Σφάλμα
Σιναπικό οξύ	0.44	0.40	9.1
Συριγγικό οξύ	0.48	0.52	-8.3
3-ϋδροξυ-4-μέθοξυκιννικό οξύ	0.50	0.45	10.0
Ομοβανιλλικό οξύ	0.54	0.55	-1.9
Φερουλικό οξύ	0.53	0.48	9.4
Βανιλλικό οξύ	0.59	0.59	0.0
ο-κουμαρικό οξύ	0.60	0.58	3.3
p-ϋδροξυφαινυλακετικό οξύ	0.77	0.74	3.9
p-κουμαρικό οξύ	0.60	0.63	-5.0
p-ϋδροξυβενζοϊκό οξύ	0.66	0.61	7.6

Πίνακας 3.12 Ποσοτικά αποτελέσματα (σε μmol) μείγματος διϋδροξυφαινολών

Διϋδροξυφαινόλες	Βάρος	³¹P-NMR	% Σχετικό Σφάλμα
Ελευρωπαϊνή	0.76	0.89	-17.1
Σικιμικό οξύ	0.87	0.55	36.8
Υδροξυτυροσόλη	4.41	3.77	14.5
Τυροσόλη	7.30	7.88	-7.9
Γαλλικό οξύ	1.04	0.63	39.4
Καφεϊκό οξύ	1.07	1.04	2.8
Πρωτοκατεχικό οξύ	1.11	1.22	-9.9
Ομοπρωτοκατεχικό οξύ	0.78	0.80	-2.6
Γεντιστικό οξύ	1.35	1.38	-2.2



Σχήμα 3.21 Μονοδιάστατο φάσμα ^{31}P -NMR μείγματος προτύπων πολυδρόξυφαινόλων. (E) ελευρωπαΐνη, (Σ) Σικμικό οξύ, (Y) Υδροξυτυροσώλη (T) Τυροσώλη, (Γα) Γαλακικό οξύ, (Κ) Καφεϊκό οξύ, (Π) Πρωτοκατεχλικό οξύ, (Γ) Γεντιστικό οξύ.



Σχήμα 3.22 Σχέση της συγκέντρωσης της κάθε πρότυπης ένωσης των μειγμάτων πολυφαινολών όπως υπολογίστηκε μέσω της ολοκλήρωσης των σημάτων φωσφόρου των φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων ως προς την πραγματική συγκέντρωση.

Στην κορυφή σε δ 138.4 συμμετέχουν το γαλλικό οξύ με δύο πυρήνες φωσφόρου και το γεντιστικό οξύ με έναν. Η ποσότητα του γαλλικού οξέος όμως μπορεί να υπολογιστεί από την κορυφή Γα. Έτσι αν ονομάσουμε το ολοκλήρωμα της κορυφής σε δ 138.4 I, η ποσότητα του γεντιστικού οξέος (Γ) υπολογίζεται από την σχέση:

$$\Gamma = I - 2\Gamma\alpha$$

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γεντιστικό οξύ, μπορεί να υπολογιστεί και από την κορυφή σε δ 138.1 με deconvolution, αφού δεν ξεχωρίζει πάντοτε καλά από την κορυφή T στην οποία συμμετέχει με ένα πυρήνα φωσφόρου η τυροσόλη, η οποία βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο πολικό μέρος του ελαιολάδου. Αν η συγκέντρωση της τυροσόλης είναι τόσο μεγάλη ώστε η κορυφή T να επικαλύπτει τελείως την κορυφή Γ, η συγκέντρωση του γεντιστικού οξέος (Υ), μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$Y = \Phi - T$$

όπου T ένταση του αλειφατικού υδροξυλίου της τυροσόλης και Φ το ολοκλήρωμα της κορυφής σε δ 138.1. Τα ποσοτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την επεξεργασία του φάσματος 3.20 με τη βοήθεια των παραπάνω σχέσεων δίνονται στον πίνακα 3.12.

Στο σχήμα 3.21 δίνεται η συσχέτιση μεταξύ της πραγματικής συγκέντρωσης των μόνο και διυδρόξυφαινολών και αυτής που υπολογίστηκε από τα φάσματα ^{31}P -NMR των σχημάτων 3.19 και 3.20. Όπως φαίνεται η συσχέτιση είναι γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $r = 0.98$ κλίση = 0.95 και τεταγμένη = 0.09, υποδεικνύοντας ότι αυτή η μέθοδος παραμένει αξιόπιστη για την ποσοτική ανάλυση μειγμάτων πολυφαινολών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή παρουσιάστηκε μία νέα μέθοδος για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών του ελαιόλαδου με τη χρήση της φασματοσκοπίας $^{31}\text{P-NMR}$. Η μέθοδος συνίσταται στην φωσφιτυλίωση των υδροξυλικών ομάδων των πολυφαινολών και την ανίχνευση των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων τους στο φάσμα $^{31}\text{P-NMR}$, χρησιμοποιώντας ένα εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση των αντίστοιχων ολοκληρωμάτων.

Η εξέταση των φασμάτων $^{31}\text{P-NMR}$ μιας σειράς φωσφιτυλιωμένων πρότυπων μονοϋδροξυφαινολών που υπάρχουν στο ελαιόλαδο έδειξε ότι αυτές διαφέρουν αρκετά στη χημική τους μετατόπιση ώστε να μπορούν να ανιχνευτούν με την φασματοσκοπία $^{31}\text{P-NMR}$. Η χημική μετατόπιση των ομάδων $-\text{OP}$ των πρότυπων πολυϋδροξυφαινολών προσδιορίστηκε με επιτυχία με τη χρήση μιας σειράς τεχνικών NMR δύο διαστάσεων. Η χρήση της σύζευξης μεταξύ C-P αποδείχθηκε μη αποτελεσματική για τον προσδιορισμό των φασμάτων $^{31}\text{P-NMR}$ των πολυφαινολών. Η αποσαφήνιση του μηχανισμού σύζευξης P-H μέσω τεσσάρων και έξι δεσμών με την λήψη φασμάτων ετεροπυρηνικού NOE P-H (NOESY) οδήγησε τελικά στον εύκολο προσδιορισμό των χημικών μετατοπίσεων των ομάδων $-\text{OP}$ από τα ετεροπυρηνικά φάσματα συσχέτισης P-H gHMQC. Τα φάσματα πρωτονίου των πολυφαινολών προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια δισδιάστατων NMR πειραμάτων H,H gCOSY και C-H gHMQC.

Τέλος δείχθηκε ότι η μέθοδος $^{31}\text{P-NMR}$ είναι πολύ ευαίσθητη (ανίχνευση μέχρι 0.5 μmol πολυφαινολών), ποσοτική, και δίνει αποτελέσματα με πολύ καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα. Η επίδραση της συγκέντρωσης στις χημικές μετατοπίσεις $^{31}\text{P NMR}$ των πολυφαινολών βρέθηκε ότι είναι αμελητέα. Η αξιοπιστία της μεθόδου ελέγχθηκε και σε μείγματα πολυφαινολών με συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές του πολικού μέρους του ελαιόλαδου.

Βιβλιογραφία

1. Μπαλατσούρας Γ., ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ, © Μπαλατσούρας Γ., **1997**, Αθήνα.
2. Colquhoun DM.; Hics BJ.; Reed AW.; Phenolic content of olive oil is reduced in extraction and refining. Analysis of phenolic content of three grades of olive and ten seed oils.; *Asia Pasific J Clin Nutr* (**1996**), 5: 105-107.
3. Trichopoulou A.; Lagiou P.; Papas A.; Mediterranean Diet: Are Antioxidants Central to Its Benefits? in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, chapter 6, p. 113.
4. Angerosa F.; Mostalino R.; Besti C.; Vito R.; Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds.; *Food Chemistry*, **2000**, 68, 3, 283-287.
5. Gutierrez F.; Jimerez B.; Ruiz A.; Albi M.A.; Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different compounds involved. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 121-127.
6. Cinquanta L.; Esti M.; La Notte E.; Evolution of phenolic Compounds in Virgin Olive Oil During Storage; *JAACS*, **1997**, 74, 10, 1259-1263.
7. Di Giovacchino, From olive harvesting to virgin olive oil production, *OCL*, **1997**, 4, 5, 359-362
8. Caponio F.; Allogio V.; Gomes T.; Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, **1999**, 64, 203-209.
9. Esti M.; Cinquanta L.; La Notte E.; Phenolic compounds in different olive varieties.; *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 32-35.
10. Monteleone E.; Caporale G.; Carlucci A.; Pagliarini E.; Optimization of extra virgin olive oil quality.; *J. Sci. Food Agric.*, 77, 1, **1998**, 31-37.
11. Aparicio R.; Roda L.; Albi M.; Gutierrez F.; Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat; *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 4150-4155.
12. Punchard N. A.; Kelly F. J.; *Free Radicals*, Punchard N. A.; Kelly F. J. (Eds.), Oxford University Press Inc., **1996**, New York, Chap. 1.
13. Μπαλατσούρας Γ., ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ, Κεφάλαιο 5, σελ 228, **1997**, Αθήνα.
14. Noguchi N.; Niki E.; Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, p. 3.
15. Niki E.; Free radicals in chemistry and biochemistry in *Food and Free Radicals*, Hiramatsu M.; Yoshikawa T.; Inoue M. (eds), **1997**, Plenum Press, New York, chapter 1, page 1.

16. Papadopoulos G.; Tsimidou M.; Boskou D.; Stability of Virgin Olive Oil, Assessment of Natural Antioxidants and Other Related Factors, *Dev. Food Sci.*, **1993**, 32, 321-326.
17. Fukumoto L.R.; Mazza G.; "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds"; *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 3597-3604.
18. Papadopoulos, G. and Boskou, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 669-671.
19. Montedoro, G., F.,; Servili M; Baldioli M; Miniati E; Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **1992a**, 40, 1571-1576.
20. Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Moltedo O., Leone A.; Zappia V.; The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4 dihydroxy)ethanol counteracts reactive oxygen reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J. Nutrition*, **1997**, 127, 2, 286-292.
21. Miller N.; Rise-Evans C.; Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: antioxidant activity assessed using the ABTS• + radical cation.; *British Food Journal*, **1997**, 99/2 57-62.
22. Kafatos A.; Diet, Antioxidants, and Health – Case Study: The Cretan Experience *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, chapter 7, page 119.
23. Fernantez-Moyano A.; Mangas M.A., Albis T.; Guinda A.; Lanzon A.; Montilla C.; Villar J.; Palma F.; Dignon D.; Garcia-Luna P.P.; Effects of olive oil minor components over fibrinolytic enzyme system in hipercholesteromic rats. Book Of Abstracts, 4.P.154, *11th International Symposium on Atherosclerosis*, Paris, October, **1997**.
24. Visioli F.;Bellosta S.; Galli C.;Cardioprotective properties of olive oil-derived polyphenols. Book Of Abstracts, 4.P.191, *11th International Symposium on Atherosclerosis*, Paris, October, **1997**.
25. Visioli F.; Galli C.; The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings. *Nutrition Reviews* (**1998**), 56, 5 I, 142-147.
26. Wiseman, S.A., Mathot J.N.N.J., de Fouw M.J., Tijbur, Dietary non- tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation on rabbits. *Atherosclerosis* **1996**, 120,15-23.
27. Aviram M., Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrofages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants, *Eur. J. Clinical Chem. Clinical Biochem.*, **1996**, 34, 8, 599-608.
28. Ferrara L.A.; Raimondi A.S.; D'Episcopo L.; Guida L.; Guida L.; Russo A.D.; Marotta T.; Olive oil and reduced need for antihypertensive medications; *Archives of Internal Medicine*, 160, 6, (**2000**), 837-842.
29. Visioli F.; Bellosta S.; Galli C.; Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages.; *Life Sciences*, **1997**, 62, 6, 541-546.

-
30. Visioli F.; Bellomo G.; Galli C.; Free Radical-Scavenging Properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 247, 1, 60-64.
 31. Das N. P.; Ramanathan L.; Studies on flavonoids and related compounds as antioxidants in food in *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*; A.S.H. Ong. and L. Packer (eds), **1992**, Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, p. 295.
 32. Stavric B.; Matula T. I.; Flavonoids in foods: Their significance in nutrition and health in *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*; A.S.H. Ong. and L. Packer (eds), **1992**, Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, p. 274.
 33. Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Montedoro G., Zappia V., Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.* 10:159-165, **1999**.
 34. Manna C.; Yan X.; Takenaka M.; Seiya K.; Nagata T.; **1998**; *J. Agric. Food Chem.* 46, 3998-4001.
 35. Giovannini C.; Straface E.; Modesti D.; Coni E.; Cantafora A.; De Vincenzi M.; Malorni W.; Masella R.; Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 129, 7, **1999**, 1269-1277.
 36. Manna C.; Galletti P.; Maisto G.; Cucciolla V.; D'Angelo S.; Zappia V.; Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol on Caco-2 cells.; *FEBS Letters* 470, (**2000**), 341-344.
 37. Bisignano G.; Tomaino A.; Lo Cascio R.; Crisafi G.; Uccella N.; Saija A.; On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1999**, 51, 8, 971-974.
 38. Ramos-Nino M.E.; Clifford M.N.; Addams M.R.; Quantitative structure-activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*; *J. Appl Bacteriol.*, **1996**, 80, 303-10.
 39. Ranalli A.; Angerosa F.; Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemist's Society.*; **1996**, 73, 417-422.
 40. Andersen, G. M.; Petersen, W. B. Analysis of plant phenolics by High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatography*, **1983**, 259, 131-139.
 41. Villeneuve F.; Abravanel G.; Moutounet M. Alibert M. *J. Chromatogr.* **1982**, 234, 131-140.
 42. Tsimidou M.; Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect.; *Ital. J. Food Sci.*, **1998**, 2, 10, 99-116.
 43. Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou D. . Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection., *Food Chemistry*, **1992**, 44, 53-60.
 44. Tsimidou M.; Lytridou M.; Boskou D.; Pappa-Louisi A.; Kotsifaki F.; Petrakis C.; On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC. *Grasas y Aceites*, **1996** 47, 3, 151-157.

-
45. Angerosa F.; D'Alessandro N.; Konstantinov P.; Di Giacinto L.; GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 1082-1087.
 46. Cortesi N., Azzolini M., Rovellini P. and Fedeli E.. I componenti minori polari degli oli vergini di oliva: ipotesi di struttura mediante LC-MS. *Riv. It. Sost. Grasse*, **1995** a, 72:241.
 47. Perri E.; Raffaelli A.; Sindona G.; "Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry-selected reaction monitoring"; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4156-4160.
 48. Caruso D.; Colombo R.; Patelli R.; Giavarini F.; Galli G.; "Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS)"; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1182-1185.
 49. Mosca L.; De Marco C.; Visioli F.; Canella C.; "Enzymatic determination of olive oil polyphenol content: assay conditons and validation of the method"; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 297-301.
 50. Campanella L.; Favero G.; Pastorino M.; Tomassetti M.;Monitoring the rancidification prosses in olive oils using a biosensor operating in organic solvents; *Biosensors & Bioelectronics*, 14, (1999), 179-186.
 51. Capannesi C.; Paltchetti I.; Mansini M.; Parenti A.; Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols.;*Food Chemistry*, 71, 4, **2000**, 553-562.
 52. Sacchi R.; Patumi M.; Fontanazza.;Barone P.; Fiordiponti P.; Mannina L.; Rossi E.; Segre A.L.; A high field ^1H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive olive oils. *JAOCS*, **1996**, 73, .6, 747-758.
 53. Sacchi R.; Addeo F.; Paolillo L.; ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magn. Reson Chem.*, (1997), 35, S133-S145.
 54. Jiang Z.H.; Argyropoulos D.; Granada A.; Correlation analysis of ^{31}P -NMR chemical shifts with substituent effects of phenols.; *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1995**, 33, 375-382.
 55. Spyros A.; Dais P.; Application of ^{31}P -NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils; *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 802-805.
 56. ⁵⁶ "NMR Spectroscopy. Basic principles, concepts and applications in chemistry." 2nd Ed., H. Gunter, Wiley Interscience, 1996.
 57. ⁵⁷ "Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity", G. E. Martin, A. S. Zektzer, VCH Publishers, New York, 1988.
 58. ⁵⁸ "150 and more Basic NMR Experiments", S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
 59. ⁵⁹ "Modern NMR Techniques for Chemistry Research", A. E. Derome, Pergamon Press, Oxford, 1987

-
60. ⁶⁰ “Introduction to NMR Spectroscopy”, R. J. Abraham, J. Fisher, P. Loftus, Wiley, Chichester, 1988.
 61. ⁶¹ “NMR Spectroscopy. A Physicochemical View”, R. K. Harris, Pitman, London 1983.
 62. Capasso, R.; Evidente, A.; Avolio, S.; Sollo, F. A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1745-1748.
 63. Baraldi P. G.; Simoni D.; Manfredini S. ; Menziani E. ; Preparation of 3,4-Dihydroxy-1-benzeneethanol: A reinvestigation.; *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 684-686.
 64. ⁶⁴ Y. Archipov, D.S. Argyropoulos, H.I. Bolker, and C. Heitner, JOURNAL OF WOOD CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, 11(2), 137-157 (1991).