ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΝΜR

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη των φύλλων της ελιάς με τη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) στερεής και υγρής φάσης.

ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

UNIVERSITY OF CRETE DEPARTMENT OF CHEMISTRY NMR LABORATORY

A study of olive leaves by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in the solid and liquid state.

M. Sc. THESIS

MANOLOPOULOU EFSTATHIA

ADVISOR: APOSTOLOS SPYROS

HERAKLION CRETE, 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
ПЕРІЛНΨН	vi
ABSTRACT	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xiii
Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.Το δέντρο της ελιάς	1
1.1Οι θεραπευτικές ιδιότητες των φύλλων της ελιάς	2
1.2 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας στερεής κατάστασης (HR-MAS NMR) σε	
τρόφιμα	5
1.3 Фа Фатраточко піа στερεάς κατάστασης $^1 \mathrm{H}$ HR-MAS NMR	7
Κεφάλαιο 2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	12
Κεφάλαιο 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
3.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ενώσεις	13
3.2 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος	13
3.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την λήψη φασμάτων ¹ Η NMR	
στην υγρή φάση	13
3.4 Λήψη φασμάτων 1D NMR	.14
3.5 Λήψη φασμάτων ¹ H- ¹ H COSY 2D NMR	14
3.6 Λήψη φασμάτων ¹ H- ¹³ C, gHMQC COSY 2D NMR	14
3. 7 Λήψη φασμάτων ¹ H- ¹³ C, gHMQC, gHMBC και ¹ H- ¹ H gCOSY 2D NMR	15
3.8 Λήψη φασμάτων ¹ H- ¹ H j-resolved 2D NMR	15
3.9 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός	15
3.10 Λήψη φασμάτων ¹ Η HR-MAS NMR	16
Κεφάλαιο 4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ	ΤН
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ HR-MAS NMR	
4.1 Ποιοτικός προσδιορισμός βιοδραστικών ενώσεων στα φύλλα ελιάς με την τεχν	νική
¹ H HR-MAS NMR	17
4.2 Ανάλυση φασμάτων HR-MAS φύλλων ελιάς σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο	18
4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενικών ενώσεων	29
4.4 Ανάλυση φασμάτων HRMAS των φύλλων ελιάς σε δευτεριωμένο νερό	.33
4.5 Ανάλυση φασμάτων HR-MAS φύλλων ελιάς σε δευτεριωμένη μεθανόλη	41

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ

ПАРАРТНМА99
ВІВЛІОГРАФІА
Κεφάλαιο 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ87
φύλλων με αυτά της τεχνικής ¹ Η NMR σε εκχυλίσματα φύλλων με διαλύτη MeOD.85
5.8 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά δείγματα
δευτεριωμένη μεθανόλη77
5.7 Ανάλυση των φασμάτων ¹ Η-ΝΜR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με διαλύτη
φύλλων με αυτά της τεχνικής $^1 H$ NMR σε εκχυλίσματα φύλλων με διαλύτη $D_2 O \ldots 75$
5.6 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά δείγματα
δευτεριωμένο νερό
5.5 Ανάλυση των φασμάτων ¹ Η-ΝΜR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με
φύλλων με αυτά της τεχνικής 1 H NMR σε εκχυλίσματα φύλλων με διαλύτη CDCl ₃ .65
5.4 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά δείγματα
5.3Ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενικών ενώσεων σε διαλύτη CDCl ₃ 61
δευτεριωμένο χλωροφόρμιο51
5.2 Ανάλυση των φασμάτων ¹ Η-ΝΜR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με
Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 50
5.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με την τεχνική του Πυρηνικού

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του επικ. καθηγητή Απόστολου Σπύρου, στα πλαίσια του Γενικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Απόστολο Σπύρο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου μια θέση στο εργαστήριο του, καθώς και για τις επιστημονικές γνώσεις και βοήθεια που μου παρείχε τα δύο χρόνια της διατριβής μου.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή Eugenio Caponetti και τον Δρ. Alberto Spinella από το Πανεπιστήμιο του Παλέρμο για τη συνεργασία και την λήψη των φασμάτων HR-MAS NMR, καθώς και τους καθηγητές κ. Φώτη Νταή και κ. Σπύρο Περγαντή που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή και να κρίνουν την διατριβή μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Βίβιαν Μάρα, τη Σοφία Σφακιανάκη, τη Μαρία Αμαργιανιτάκη, το Μανώλη Καραφά και τη Λίλα Ράλλη για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο, καθώς και για τη συμπαράσταση τους.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, κυρίως όμως στους γονείς και τον αδερφό μου που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια παρέχοντας μου ηθική, οικονομική στήριξη αλλά και κατανόηση σε όλες μου τις αποφάσεις.

Περίληψη

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) στερεής κατάστασης με περιστροφή στη μαγική γωνία (High-Resolution Magic Angle Spinning, HR-MAS NMR) έχει βρει τα τελευταία χρόνια σημαντική εφαρμογή στην επιστήμη των τροφίμων, και αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον γρήγορο προσδιορισμό της χημικής σύστασης διαφόρων στερεών τροφίμων και την ταυτοποίηση των ενώσεων που υπάρχουν στα τρόφιμα αυτά, διευρύνοντας έτσι τις δυνατότητες για νέες εφαρμογές αυτής της προσέγγισης στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων και σε μεταβολομικές μελέτες.

Αν και το ελαιόλαδο είναι γνωστό για τη γεύση του και τα οφέλη στην υγεία, τα φύλλα της ελιάς έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί φαρμακευτικά σε διάφορες εποχές και τόπους. Τα φυσικά φύλλα ελιάς και τα εκχυλίσματα τους χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια στο εμπόριο ως σκευάσματα αντιγήρανσης, αντιοξειδωτικά, αντιυπερτασικά αλλά και για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα φύλλα ελιάς περιέχουν διάφορα τριτερπενικά οξέα, φλαβονοειδή, λιγνάνες, φαινολικές ενώσεις και παράγωγα σεκοϊριδοειδών όπως η ελευρωπαϊνη.

Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας παρουσιάζεται μια προσπάθεια ταυτοποίησης και ανάλυσης σύγκρισης των χημικών ενώσεων που ανιχνεύονται σε δείγματα φύλλων ελιάς ελληνικών ποικιλιών με τη χρήση της φασματοσκοπίας ¹Η HR-MAS NMR μίας και δύο διαστάσεων απευθείας σε ολόκληρα φύλλα ελιάς, αλλά και με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας (HR-NMR) σε εκχυλίσματα των ίδιων φύλλων. Οι δύο τεχνικές εφαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας τρείς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη, νερό).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών έδειξε ότι η φασματοσκοπία HR-MAS NMR παρέχει το ίδιο αξιόπιστα αποτελέσματα με την φασματοσκοπία HR-NMR και ότι αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την απευθείας ανάλυση των φύλλων ελιάς και τη μεταβολομική ανάλυσή τους. Η προτεινόμενη μεθοδολογία HR-MAS NMR εφαρμόστηκε στη συνέχεια για τη μελέτη της κατανομής των τριτερπενικών ενώσεων των φύλλων της ελιάς σε δείγματα ελαιόδενδρων από τρεις διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες, και για την παρακολούθηση των αλλαγών στην τριτερπενική σύσταση των φύλλων κατά τη διάρκεια της ελαιοκομικής περιόδου. **Λέξεις κλειδιά**: Φασματοσκοπία HR-MAS NMR, φύλλα ελιάς, τριτερπένια, φαινολικά αντιοξειδωτικά, ποικιλία ελιάς.

ABSTRACT

In recent years HR-MAS ¹H NMR spectroscopy has proven to be a useful tool for the rapid determination of the metabolic profile of several solid and semisolid foods, such as fruits and vegetables,¹ cheese² and meat³. Olive leaves are increasingly recognized as direct sources of the same natural antioxidants that can be found in olive oil. The use of olive leave extracts as a source of natural antioxidants (flavonoids, secoiridoids) to be used as food additives is a subject of active research. Olive leave components are found today as beauty care products and are almarketed as tea bags or in raw form, suitable for the preparation of hot beverages. Thus, olive leaves are emerging as a new and potentially important product for olive tree growing regions. In this report we present the application of ¹H and ¹³C HR-MAS 1D and 2D NMR spectroscopy for the characterization and metabolomic analysis of solid olive leaves. HR-MAS NMR spectral analysis in three solvents of different polarity is presented and compared directly with the more traditional approach of high resolution liquid state NMR analysis of leaf solvent extracts of the same leave samples. The effect of olive tree variety on the relative abundance of bioactive triterpenoids in leaves is also studied, along with the variations in olive leave triterpenoid distribution during the oil

cultivating season.

Key words: HR-MAS NMR spectroscopy, olive leaves, triterpenoids, phenolic antioxidants, olive variety

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1.3.1: Σχεδιάγραμμα ενός περιστροφέα μαγικής γωνίας8
Σχήμα 1.3.2: Η ηλεκτρονική κυκλοφορία στα μη σφαιρικά τροχιακά μιας ομάδας
μεθυλίου δίνει αφορμή για μια ανισοτροπική χημική μετατόπιση9
Σχήμα1.3.3: α) η γωνία θ μεταξύ του δεσμού 1 H- 13 C και της διεύθυνσης του
εξωτερικού μαγνητικού πεδίου ${f B}_0$. b) Η αρχή της περιστροφής της μαγικής γωνίας
θ 10
Σχήμα 1.3.4: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹ ΗΝΜR για δείγμα ιταλικής
πιπεριάς με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην υγρή φάση (πάνω) και της
φασματοσκοπίας HR-MAS απευθείας στη στερεή φάση (κάτω)11
Σχήμα1.3.5:Δοκιμαστής για τη λήψη φασμάτων με την τεχνική HR-MAS (αριστερά),
και ρότορας ζιρκονίου HR-MAS (αριστερά)11
Σχήμα 4.2.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹ Η HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς σε
διαλύτη CDCl ₃ και σε συχνότητα 400 MHz18
Σχήμα4.2.2: Μονοδιάστατα φάσματα ¹ Η-ΝΜR των πρότυπων ενώσεων
ερυθροδιόλη, ουβαόλη και ουρσολικό οξύ σε διαλύτη CDCl3 σε πεδίο 500 MHz 21
Σχήμα 4.2.3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης 1 H, ¹ H gCOSY
των φύλλων ελιάς σε διαλύτη $CDCl_3$ και σε συχνότητα 400 MHz22
Σχήμα4.2.4: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C
gHSQC των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε διαλύτη
$CDCl_3$ και σε συχνότητα 400 MHz. Με f συμβολίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν
στα τριγλυκερίδια
Σχήμα 4.2.5: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C 2D
gHMBC των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε
διαλύτη CDCl ₃ και σε συχνότητα 400 MHz 24
Σχήμα 4.2.6: Διέυρυνση του μονοδιάστατου φάσματος ¹ Η HR-MAS NMR φύλλων
ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη: βινυλικό πρωτόνιο Η-12(πάνω αριστερά), μεθύλια
Η-27(πάνω δεξιά), ολικό φάσμα σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (κάτω) σε συχνότητα
400 MHz
Σχήμα4.2.7: Υδροξυλική περιοχή (CH-OH) του μονοδιάστατου φάσματος ¹ HR-MAS
της ποικιλίας Κορωνέικη σε διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 400 MHz 26

Σχήμα 4.2.8: Μονοδιάστατα φάσματα ¹ Η HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς από
τρείς διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες (Χονδρολιά, Κορωνέικη, Τσουνάτη) σε
διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 400 MHz 29
Σχήμα 4.3.1: Διάγραμμα της % σύστασης των τριτερπενίων στα φύλλα ελιάς για
τρείς ελληνικές ποικιλίες σε διαλύτη CDCl330
Σχήμα 4.3.2: % Σύσταση των τριτερπενίων στα φύλλα Κορωνέικη ελιάς κατά τη
διάρκεια του έτους σε διαλύτη $CDCl_3$ 32
Σχήμα 4.4.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹ Η-ΗRMAS των φύλλων ελιάς της ποικιλίας
Κορωνέικη σε διαλύτη D2O και σε συχνότητα 400 MHz33
Σχήμα 4.4.2: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹ H, ¹ H
gCOSY των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D_2O και σε συχνότητα 400 MHz36
Σχήμα 4.4.3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹ H, ¹³ C
HSQC NMR των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε
διαλύτη D2O και σε συχνότητα 400 MHz37
Σχήμα 4.4.4 :Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹ H, ¹³ C
ΗΜΒC των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε
διαλύτη D ₂ O και σε συχνότητα 400
MHz
Σχήμα 4.5.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹ Η-ΗR-MAS των φύλλων σε διαλύτη MeOD και
σε συχνότητα 400 MHz 41
Σχήμα 4.5.2: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹ H, ¹ H gCOSY
των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz44
Σχήμα 4.5.3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C
gHSQC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz45
Σχήμα 5.2.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹ Η Η-ΝΜR εκχυλισμάτων των φύλλων
Κορωνέϊκης ελιάς με διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 500 MHz51
Σχήμα 5.2.2: Μονοδιάστατα φάσματα ¹ Η-ΝΜR των πρότυπων ενώσεων
(ερυθροδιόλη, ουβαόλη και ουρσολικό οξύ) σε διαλύτη $CDCl_3$ και σε συχνότητα 500
MHz53
Σχήμα 5.2.3:Δισδιάστατο φάσμα NMR ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹ Η- ¹ Η gCOSY
του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 500
MHz

Σχήμα 5.2.4: Δισδιάστατο φάσμα Η NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹ Η, ¹³ C
HMQC του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς Κορωνέικης ποικιλίας (αλειφατική
περιοχή) με διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 500 MHz 56
Σχήμα 5.2.5: Δισδιάστατο φάσμα HNMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1H,13C g
ΗΜΒΕ του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική
περιοχή) με διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 500
MHz57
Σχήμα 5.2.6: Διέυρυνση του μονοδιάστατου φάσματος ¹ Η NMR του εκχυλισματος
με χλωροφόρμιο φύλλων ελιάς της Κορωνέικης ποικιλίας: βινυλικό πρωτόνιο Η-12(
πάνω αριστερά), μεθύλιο Η-27(πάνω δεξιά), ολικό φάσμα δευτεριωμένου
χλωροφορμίου (κάτω) σε συχνότητα 500 MHz 58
Σχήμα 5.2.7: Αλκοολική περιοχή του μονοδιάστατου φάσματος 1Η NMR των
εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς από τρεις διαφορετικές ποικιλίες Κορωνέικη με διαλύτη
CDCl ₃ και σε συχνότητα 500 MHz 59
Σχήμα 5.3.1: Διάγραμμα της % σύστασης των τριτερπενίων στα φύλλα ελιάς για
τρείς ελληνικές ποικιλίες σε διαλύτη CDCl362
Σχήμα 5.3.2: % Μεταβολή της κατανομής των τριτερπενίων στα φύλλα ελιάς
(Κορωνέικη) κατά τη διάρκεια του έτους σε διαλύτη CDCl363
Σχήμα 5.4.1: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹ Η NMR για τα φύλλα ελιάς
σε διαλύτη CDCl3 με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε υγρή φάση (HNMR
πάνω) και στερεή φάση (HR-MAS κάτω)65
Σχήμα 5.4.2: Σύγκριση της % τερπενικής σύστασης στα φύλλα ελιάς με τις τεχνικές
HR-NMR (υγρή φάση) και HRMAS-NMR (στερεή φάση) σε διαλύτη CDCl ₃ 66
Σχήμα 5.4.3: Μεταβολή της % τερπενικής σύστασης στα φύλλα ελιάς (Κορωνέικη
ποικιλία) κατά τη διάρκεια του έτους σε διαλύτη CDCl3 με τη χρήση των τεχνικών
HR-NMR (υγρή φάση) και HRMAS-NMR (στερεή φάση)66
Σχήμα 5.5.2: Αλειφατική περιοχή του δισδιάστατου φάσματος 1 H, 1 H J-resolved των
φύλλων ελιάς σε διαλύτη D2O και σε συχνότητα 500 MHz68
Σχήμα 5.5.3: Δισδιάστατο φάσμα ¹ H, ¹ H gCOSY εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με
διαλύτη D ₂ O και σε συχνότητα 500 MHz 71
Σχήμα 5.5.4: Δισδιάστατο φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H - 13 C gHMQC 2D
NMR εκχυλίσματος των φύλλων της Κορωνέικης με διαλύτη D2O (αλειφατική
περιοχή) και σε συχνότητα 500 MHz72
Σχήμα 5.5.5 : Δισδιάστατο φάσμα HNMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹ H, ¹³ C

gHMBC εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς Κορωνέϊκης ποικιλίας (αλειφατική
περιοχή) με διαλύτη D_2O και σε συχνότητα 500 MHz73
Σχήμα 5.6.1: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹ Η NMR για τα φύλλα ελιάς
σε διαλύτη D2O με τη χρήση των τεχνικών HR-NMR (πάνω) και HRMAS-NMR
(κάτω)75
Σχήμα 5.7.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹ Η NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD
και σε συχνότητα 500 MHz77
Σχήμα 5.7.2: Αλειφατική περιοχή του δισδιάστατου φάσματος 1 H- 1 H J-resolved
εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz78
Σχήμα 5.7.3: Δισδιάστατο φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹ Η- ¹ Η gCOSY
εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz80
Σχήμα 5.7.4: Δισδιάστατο φάσμα NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹ H- ¹³ C gHMQC
εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz81
Σχήμα 5.7.5: Δισδιάστατο φάσμα HNMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹ H, ¹³ C
gHMBC εκχυλίσματος φύλλων ελιάς της Κορωνέικης ποικιλίας (αλειφατική περιοχή)
με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz82
Σχήμα 5.8.1: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹ ΗΝΜR για τα φύλλα ελιάς
σε διαλύτη MeOD με τη χρήση της HR-NMR και HRMAS-NMR τεχνικής (HR-NMR
κάτω) και (HRMAS πάνω)85
Σχήμα 6.1: Μονοδιάστατα φάσματα HR-MAS NMR σε τρείς διαφορετικούς
διαλύτες (CDCl ₃ , D ₂ O, MeOD) και σε συχνότητα 400 MHz87

•

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 4.2.1: Χημική δομή των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα ¹ Η
HR-MAS NMR των φύλλων της ελιάς με διαλύτη $CDCl_3$ 19
Πίνακας4.2.2: Χημικές μετατοπίσεις ¹ Η και ¹³ C των τερπενοειδών ενώσεων από τα
φάσματα gCOSY και gHSQC HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς27
Πίνακας 4.3.1: % Σύσταση των τριτερπενίων σε φύλλα ελιάς από τρείς διαφορετικές
ελληνικές ποικιλίες
Πίνακας4.3.2: Σύσταση των τερπενίων για τους μήνες (Μάρτιο, Μάιο, Ιούλιο και
Σεπτέμβριο)
Πίνακας 4.4.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς
με τη φασματοσκοπία HR-MAS NMR σε διαλύτη D_2O και σε συχνότητα μαγνητικού
πεδίου 400 MHz
Πίνακας 4.4.2: Χημικές μετατοπίσεις 1 Η και 13 C των ενώσεων ταυτοποιήθηκαν στα
φάσματα HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D_2O39
Πίνακας 4.5.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς
σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz 42

Πίνακας 4.5.2 : Χημικές μετατοπίσεις 1 Η και 13 C των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν
στα φάσματα HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD 46
Πίνακας 4.5.3 : Πλήρης ανάθεση των κορυφών 1 Η και 13 C NMR για την ελευρωπαίνη
από τα φάσματα gCOSY και gHMQC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD 47
Πίνακας 5.2.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα
φύλλων ελιάςε με διαλύτη CDCl ₃
Πίνακας 5.2.2: Χημικές μετατοπίσεις ¹ Η και ¹³ C NMR των τριτερπενοειδών
ενώσεων στα φάσματα NMR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με CDCl3 59
Πίνακας 5.3.1: Συγκεντρώσεις των τριτερπενίων σε φύλλα ελιάς από τρείς
ελληνικές ποικιλίες όπως προέκυψαν από τη μελέτη των εκχυλισμάτων τους με
$CDCl_3$ με τη φασματοσκοπία NMR62
Πίνακας 5.3.2: Συγκεντρώσεις των τριτερπενίων σε φύλλα Κορωνέϊκης ελιάς για
τους μήνες Μάρτιο, Μάιο , Ιούλιο και Σεπτέμβριο όπως προέκυψαν από τη μελέτη
των εκχυλισμάτων τους με $CDCl_3$ με τη φασματοσκοπία NMR64
Πίνακας 5.5.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα
φύλλων ελιάς με διαλύτη D_2O με τη φασματοσκοπία NMR69
Πίνακας 5.5.2 : Χημικές μετατοπίσεις 1 Η και 13 C των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν
από τα φάσματα gCOSY και gHMQC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D2O 73
Πίνακας 5.6.1: Ενώσεις που δεν ταυτοποιούνται και με τις δύο τεχνικές NMR (υγρά-
στερεά) σε διαλύτη D ₂ O 76
Πίνακας 5.7.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς
σε διαλύτη MEOD και σε συχνότητα 500 MHz
Πίνακας 5.7.2 : Χημικές μετατοπίσεις ¹ Η και ¹³ C NMR των ενώσεων από τα
φάσματα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD
Πίνακας 5.7.3: Χημικές μετατοπίσεις 1 Η και 13 C NMR για την ελευρωπαίνη από τα

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1. Το δέντρο της ελιάς

Το δέντρο της ελιάς έχει μεγάλη οικονομική και κοινωνική σημασία για τις μεσογειακές χώρες. Συγκεκριμένα για χώρες όπως η Ιταλία, η Ελλάδα και η Τουρκία αποτελεί την κύρια αγροτική δραστηριότητα και πηγή εσόδων.

Η ελιά αποτελεί τη βασίλισσα της ελληνικής αγροτικής παράδοσης και καλλιέργειας για αρκετές χιλιάδες χρόνια, και είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την οικονομία του νησιού της Κρήτης και της Ελλάδας γενικότερα. Το ελαιόλαδο είναι σήμερα το πιο σημαντικό εξαγώγιμο προϊόν για την περιφέρεια της Κρήτης, τόσο ως εμφιαλωμένο όσο και στην ακατέργαστη (χύμα) μορφή του. Αυτό οφείλεται, χωρίς αμφιβολία στα αυξημένα για την υγεία οφέλη που έχουν αποδοθεί στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο είναι πλούσιο σε φαινολικά αντιοξειδωτικά, αλλά και στην παγκόσμια ευαισθητοποίηση για τη συμβολή της υγειινής διατροφής στην ανθρώπινη ευημερία.

Πολύ πρόσφατα η Επιτροπή για την Ασφάλεια των Τροφίμων της Ευρωπαικής Ένωσης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η σχέση αιτίου -αποτελέσματος που παρατηρείται ανάμεσα στην κατανάλωση των πολυφαινολών του ελαιολάδου (κυρίως τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης) και την προστασία των LDL λιποπρωτεινών από την οξειδωτική καταστροφή, επιτρέπει στα προιόντα διατροφής που περιλαμβάνουν τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου να προσθέσουν συγκεκριμένες αιτιάσεις που αφορούν την υγεία του καταναλωτή (health claims) στην ετικέτα της συσκευασία τους. Όλα τα μέρη του δέντρου της ελιάς, συμπεριλαμβανομένου του ελαιοκάρπου, των κλαδιών και των φύλλων είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά του ελαιολάδου προέρχονται κυρίως από τον καρπό, ωστόσο και τα φύλλα ελιάς, μπορεί να είναι μια καλή πηγή αντιοξειδωτικών, εάν ίχνη φύλλων έχουν παραμείνει, λόγω της ατελούς διαδικασίας καθαρισμού των καρπών από υπολλείματα φύλλων πριν τη φυγοκέντρηση. Μεταξύ άλλων παραγόντων, η ποικιλία της ελιάς και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού επηρεάζουν σημαντικά το προφίλ των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο και έχουν μελετηθεί αρκετά με χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές τεχνικές όπως η αέρια και υγρή αρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματοσκοπία μάζας, GC-MS, LC-MS² και η φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR, υγρής κατάστασης.^{3,4}

1.1 Οι θεραπευτικές ιδιότητες των φύλλων της ελιάς.

Τα τελευταία χρόνια, τα φύλλα ελιάς αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως άμεσες πηγές των ίδιων φυσικών αντιοξειδωτικών που μπορούν να βρεθούν στο ελαιόλαδο. Η άδεια χρήσης των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς ως πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, σαν πρόσθετα τροφίμων αποτελεί αντικείμενο ενεργούς έρευνας. Επιπλέον, σήμερα τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς μπορούν να βρεθούν σε φαρμακεία και σούπερ μάρκετ, με τη μορφή (δισκίου ή σταγόνων) σαν συμπληρώματα διατροφής, και ως συστατικά προιόντων περιποίησης και ομορφιάς.⁵ Τα φύλλα ελιάς κυκλοφορούν στο εμπόριο ως σακκουλάκια τσαγιού ή σε ακατέργαστη μορφή, κατάλληλη για την παρασκευή ζεστών ροφημάτων. Έτσι τα φύλλα ελιάς αποτελούν ένα νέο και οικονομικά πολύ προσοδοφόρο προιόν για τις αγροτικές περιοχές που ασχολούνται ενεργά με την καλλιέργεια της ελιάς.

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων των φύλλων μπορεί να ειναι πολύ πλούσια σε πολυφαινόλες, μια σειρά ερωτημάτων γεννιέται σχετικά με τη σωστή χρήση τους. Αυτό είναι εμφανές αν αναλογιστεί κανείς ότι αρκετές από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα φύλλα της ελιάς έχει αποδειχθεί ότι κατέχουν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση αντιοξειδωτική δράση, και ακόμα και προοξειδωτική δραστικότητα σε μεγάλες συγκεντρώσεις.⁶ Για το λόγο αυτό, η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών και άλλων βιοενεργών ενώσεων στα φύλλα της ελιάς αποτελεί ένα σημαντικό ερεθνητικό θέμα όσον αφορά τη διατροφική αξία των φύλλων και ενδιαφέρει άμεσα την επιστημονική και ιατρική κοινότητα.

Η ποικιλότητα και η συγκέντρωση των βιοενεργών ενώσεων στα φύλλα ελιάς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως: γενετικοί (ποικιλία), εδαφοκλιματολογικοί (έδαφος, καιρικές συνθήκες) και ποικίλλει ανάλογα με την εποχή του χρόνου κατά την οποία γίνεται η συγκομιδή των φύλλων της ελιάς. Έτσι αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να μελετηθούν για να εξασφαλιστούν οι ποσότητες οι οποίες πρέπει να καταναλώνονται ώστε να είναι ευεργετική η δράση τους στην υγεία.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκατιών, η ικανότητα της φασματοσκοπίας NMR υψηλής ανάλυσης (στην υγρή κατάσταση) να παρέχει πληροφορίες για τη σύσταση και τη ποσοτικλη ανάλυση υγρών τροφίμων ή των εκχυλισμάτων τους, έχει κάνει αυτή την τεχνική ένα απαραίτητο εργαλείο για τους επιστήμονες τροφίμων.^{7,8,9} Η φασματοσκοπία NMR έχει αποδειχθεί ότι είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος για την ανάλυση του ελαιολάδου,^{10,11} και σε συνδυασμό με την πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση (μεταβολομική) μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τον έλεγχο της ποιότητας και της αυθεντικότητας του.^{4,12} Το NMR έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για τον προσδιορισμό και την ανάλυση των φαινολικών αντιοξειδωτικών στο ελαιόλαδο με μεγάλη επιτυχία.^{13,14,15}

Επιπλέον η μεταβολομική ανάλυση των τροφίμων ή αλλιώς χημειομέτρια έχει εξελιχθεί σε σημαντικό βαθμό την τελευταία δεκαετία, χρησιμοποιώντας κυρίως τη φασματοσκοπία NMR ή MS.¹⁶ Ειδικότερα, η φασματοσκοπία NMR επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού φυσικών μεταβολιτών και ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (φυσικές ή προστιθέμενες) σε μήτρες τροφίμων, και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρατηρηθεί το συνθετικό προφίλ των τροφίμων. Επιπλέον, η "μεταβολομική τροφίμων" μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση και ταξινόμηση της επίδρασης διαφόρων βασικών παραγόντων που έχουν σημασία για την επιστήμη των τροφίμων, όπως το στάδιο ωρίμανσης, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, η τεχνολογία επεξεργασίας, και η καλλιεργητική πρακτική στον αγρό, και να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με θέματα όπως η ποιότητα των τροφίμων, η ταυτοποίηση, η νοθεία, η προστασία και η προέλευση.¹⁷

πολυπαραγοντική ανάλυση μεγάλων συλλογών δεδομένων χρησιμοποιώντας

στατιστικά μοντέλα τα οποία βοηθούν στη κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε

3

κατάλληλες ομάδες και επιτρέπει τη δημιουργία ''μοντέλων''με προβλεπτική ικανότητα για άγνωστα δείγματα. Μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων έχει μελετηθεί με τη χρήση της μεταβολομικής ανάλυσης με βάση NMR, συμπεριλαμβανομένων πολλών φυτών (τομάτα, τσάι, χαμομήλι, ginseng, καπνός), φυτικών ελαίων όπως το ελαιόλαδο, έλαια ψαριών, κρέας, γάλα, κρασί, μπύρα και χυμοί φρούτων.^{16,18}

Η καθιερωμένη μεθοδολογία για την ανάλυση των φύλλων ελιάς και τους καρπούς περιλαμβάνει τη χρήση υγρής εκχύλισης με διαλύτη για την απομόνωση των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν (λιπιδικό ή πολικό κλάσμα) από την μήτρα των τροφίμων, καθώς και τον διαχωρισμό του εκχυλίσματος που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας είτε περαιτέρω εκχύλιση με άλλο διαλύτη, ή χρωματογραφία στήλης σε περισσότερα κλάσματα ανάλογα με την πολικότητα της κατηγορίας των ενώσεων που θέλουμε. Ο χαρακτηρισμός, η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των βιοδραστικών ενώσεων μπορούν στη συνέχεια να επιτευγχθούν είτε με συνδυασμένες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) και η υγρή γρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS), ή με υψηλής ανάλυσης φασματοσκοπία NMR σε υγρή κατάσταση.¹⁵ Αυτές οι ερευνητικές προσεγγίσεις είναι μέχρι στιγμής αρκετά επιτυχείς όσον αφορά τον χαρακτηρισμό οργανικών ενώσεων σε φύλλα ελιάς και φρούτα.² Ωστόσο το προαναφερθέν πειραματικό πρωτόκολλο παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Οι εκχυλίσεις με διαλύτη και οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί, είναι αρκετά χρονοβόροι, και δαπανηροί λόγω των μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών που απαιτούνται, ένας παράγοντας ο οποίος είναι ειδικού ενδιαφέροντος το τελευταίο καιρό εξαιτίας των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και της προσπάθειας ανάπτυξης «πράσινων» πειραματικών τεχνικών. Αυτά τα μειονεκτήματα αποτελούν ένα σοβαρό εμπόδιο σε περιπτώσεις όπου ένας μεγάλος αριθμός (αρκετές φορές εκατοντάδες) δειγμάτων πρέπει να αναλυθούν, όπως για παράδειγμα στις μεταβολομικές μελέτες, όπου η στατιστική εγκυρότητα απαιτεί την εξέταση πολλών δειγμάτων για να αποδειχθεί η γνησιότητα και η γενικότητα των πολυπαραγοντικών στατιστικών μοντέλων, η οποία εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Στην περίπτωση των φύλλων ελιάς, αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να είναι η ποικιλία, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες (έδαφος, καιρικές συνθήκες), οι γεωργικές πρακτικές, το έτος συγκομιδής, η υγεία του δέντρου, κλπ.¹⁹

1.2 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας στερεής κατάστασης (HR-MAS NMR) σε τρόφιμα.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) στερεής κατάστασης με περιστροφή στη μαγική γωνία (High-Resolution Magic Angle Spinning; HR-MAS NMR) έχει βρει τα τελευταία χρόνια σημαντική εφαρμογή στην επιστήμη των τροφίμων. Η φασματοσκοπία HR-MAS έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τους επιστήμονες τροφίμων στον γρήγορο προσδιορισμό της χημικής σύστασης διαφόρων στερεών τροφίμων και την ταυτοποίηση των ενώσεων που υπάρχουν σε αυτά, διευρύνοντας έτσι τις δυνατότητες για νέες εφαρμογές αυτής της προσέγγισης στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων έναντι των εφαρμογών της συμβατικής υγρής φασματοσκοπίας NMR. Το πρωτόκολλο παρασκευής του δείγματος, στις περισσότερες περιπτώσεις, τυπικά περιλαμβάνει μια μη φυσική ή γημική επεξεργασία, τα δείγματα τροφίμων τοποθετούνται απλά σε ειδικούς ρότορες MAS, με μια ελάχιστη ποσότητα (10-20μL) δευτεριωμένου διαλύτη που έιναι απαραίτητη για το κλείδωμα. Έτσι, για παράδειγμα, οι μεταβολίτες των φρούτων και λαγανικών, ή ένα ευρύ φάσμα πολικών και μη πολικών συστατικών των τροφών μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα μόνο πείραμα, χωρίς να χρειάζεται να καταφύγουμε σε περίπλοκες διαδικασίες εκχύλισης και διαχωρισμού. Ένα άλλο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας HR-MAS NMR είναι ότι επιπτώσεις του διαλύτης στις χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων στο λαμβανόμενο φάσμα είναι ελάχιστες, λόγω του μικρού όγκου των χρησιμοποιούμενων δευτεριωμένων διαλυτών. Στην ανάλυση των υγρών με φασματοσκοπία NMR η επιλογή του διαλύτη συχνά έχει σημαντική επίδραση στις χημικές μετατοπίσεις, ιδίως για τις περισσότερο πολικές ενώσεις.

Η ανάπτυξη κατάλληλων ηλεκτρονικών υποσυστημάτων (ενισχυτές, ανιχνευτές, συστήματα περιστροφής δείγματος, και γενικότερα κατάλληλου hardware) έκανε τα προηγμένα (2D) ομο και ετεροπυρηνικά πειράματα NMR που πραγματοποιούνταν μόνο στην υγρή κατάσταση, διαθέσιμα και στα φασματόμετρα HR-MAS, διευκολύνοντας έτσι την ανάθεση φασμάτων που προέρχονται από ημιστερεά τρόφιμα.²⁰ Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο, αφού στα φάσματα HR-MAS του πυρήνα του πρωτονίου των τροφίμων όλες οι ενώσεις ανιχνεύονται ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πολύπλοκα φάσματα τα οποία δεν είναι δυνατό να ανατεθούν μόνο με μονοδιάστατη φασματοσκοπία NMR.

Τα φρούτα και τα λαχανικά ήταν από τους πρώτους στόχους της φασματοσκοπίας HR-MAS NMR λόγω της ημιστερεής υφής τους, που είναι αποτέλεσμα της μεγάλης περιεκτικότητας τους σε νερό. Αρχικές μελέτες ερεύνησαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας ¹³C και 1H HR-MAS τη σάρκα των φρούτων.^{21,22,23}

Στη συνέχεια η τεχνική HR-MAS χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση αλλαγών στη σύσταση του μάνγκο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία υγρής κατάστασης για πειράματα στο χυμό του μάνγκο και έτσι αναγνωρίστηκε η δυναμική της HR-MAS για την μελέτη της συνολικής βιοχημείας των φρούτων.²⁴

Πιο πρόσφατες εφαρμογές περιλαμβάνουν τη χρήση της τεχνικής HR-MAS για τον προσδιορισμό της β-καροτίνης σε φρέσκα λαχανικά,²⁵ το χαρακτηρισμό της κουτίνης (cutin), μιας αδιάλυτης πρωτεΐνης της ντομάτας και άλλων λαχανικών.²⁶ Η φασματοσκοπία HR-MAS έχει χρησιμοποιηθεί επίσης ως εργαλείο για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ της ντομάτας, τη διαφοροποίηση των ιστών και ως δείκτης ωρίμανσης των φρούτων.²⁷

Μελέτες με την τεχνική HR-MAS έχουν γίνει και για το πεπόνι και καρπούζι με σκοπό τον χαρακτηρισμό του αμύλου που προέρχεται από τους σπόρους των δύο φρούτων αλλά και για τον προσδιορισμό των κύριων χημικών συστατικών τους (λίπη, πρωτείνες, πολυσακχαρίτες).²⁸

Διάφοροι τύποι τυριών (παρμεζάνα, έμενταλ) έχουν διερευνηθεί με τη φασματοσκοπία HR-MAS σε συνδυασμό με τη χημειομετρία, με σκοπό τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου για τη γεωγραφική διάκριση του προιόντος^{29,30} ή την παρακολούθηση της διαδικασίας ωρίμανσης.³¹

Τα προιόντα κρέατος ,έχουν τραβήξει επίσης το ενδιαφέρον, και συμπεριλαμβάνουν τη μελέτη του κρέατος αρνιού,³² βοδινού^{33,34} καπνιστού σολομού.³⁵ Έχουν μελετηθεί επίσης οι αλλαγές που προκύπτουν στον μεταθανάτιο μύ μετρώντας το γλυκογόνο και το λακτικό οξύ με την τεχνική HR-MAS δείχνοντας τη σχέση που υπάρχει μεταξύ των μεμβρανικών ιδιοτήτων και της ποσότητας του νερού που έχει διαφύγει μεταθανάτια από τα μυικά κύτταρα.³⁶

Η τεχνική HR-MAS έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη δημητριακών όπως είναι το σιμιγδάλι,³⁷ το ψωμί και το αλεύρι, για το οποίο έχει διερευνηθεί η διαφορά μεταξύ των μαλακών και σκληρών αλευριών σιταριού. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη κινητικότητα της πρωτείνης στο μαλακό αλεύρι παρά στο σκληρό, με αντίστοιχα μεγαλύτερη κινητικότητα του αμύλου για το σκληρό αντι του μαλακού σιταριού.³⁸

Άλλα προιόντα που έχουν ερευνηθεί με τη φασματοσκοπία HR-MAS είναι διάφοροι τύποι σπόρων³⁹ καθώς και το ιταλική ποικιλία πιπεριάς, με σκοπό τη γεωγραφική και βοτανική διάκριση.⁴⁰

1.3 Φασματοσκοπία στερεάς κατάστασης ¹Η HR-MAS NMR

Για πολλά χρόνια η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) στην υγρή φάση χρησιμοποιούταν αποκλειστικά για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση φυσικών και φυτικών εκχυλισμάτων μετά από μια διαδικασία διαχωρισμού και καθαρισμού τους για την απλοποίηση και ευκολότερη μελέτη των φασμάτων NMR που προκύπτουν. Ωστόσο αυτή η τεχνική έχει κάποια μειονεκτήματα: 1) ορισμένες κατηγοριές χημικών ενώσεων μπορούν να εξαχθούν με υγρή εκχύλιση μόνο μερικώς με αποτέλεσμα να χάνονται ποιοτικές ή ποσοτικές πληροφορίες, 2) απαιτείται μεγάλη ποσότητα δείγματος για την εκχύλιση (τουλάχιστον κάποια γραμμάρια) ώστε τα φάσματα να έχουν υψηλό λόγο S/N(σήμα/θόρυβο και 3) η διαδικασία εκχύλισης είναι αρκετά χρονοβόρα, απαιτεί δεξιότητα και είναι δαπανηρή.⁴¹

Γι' αυτούς τους λόγους η επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια στράφηκε στην τεχνική της φασματοσκοπίας στερεάς κατάστασης HR-MAS NMR. Σε αυτήν την τεχνική το δείγμα εισέρχεται χωρίς καμία κατεργασία σ'ένα κατάλληλο ρότορα ζιρκονίου μαζί με 10 μl δευτεριωμένου διαλύτη και περιστρέφεται με ταχύτητα μερικά Khz γύρω απ τη μαγική γωνία.⁴²



Σχήμα 1.3.1: Σχεδιάγραμμα ενός περιστροφέα μαγικής γωνίας.

Τα φρούτα, τα λαχανικά αλλά και τα προιόντα τους (δέρμα, καρπός, πολτός) χαρακτηρίζονται από διαφορετικές φυσικές φάσεις με ξεχωριστές μαγνητικές επιδεκτικότητες και ανισοτροπικές επιπτώσεις όπως η <u>χημική ανισοτροπία</u> και οι <u>πυρηνικές διπολικές αλληλεπιδράσεις</u> που παίζουν σημαντικό ρόλο για ημιστερεά και στερεά υλικά. Η μαγνητική επιδεκτικότητα μπορεί να οδηγήσει σε διεύρυνση γραμμής από εκατοντάδες Ηz σε μερικά KHz, ανάλογα με τη φύση της φάσης ενώ οι διπολικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διευρύνουν τις κορυφές NMR σε εύρη δεκάδων ή εκατοντάδων KHz στην περίπτωση άκαμπτων στερεών.^{43,44} Έτσι η παρατήρηση φασμάτων NMR στερεών δεγμάτων με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για υγρά δείγματα δεν είναι δυνατή.

Πυρηνικές διπολικές αλληλεπιδράσεις –διεύρυνση σήματος

Η διπολική σύζευξη είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο διαφορετικών πυρήνων και εξαρτάται από τους γυρομαγνητικούς λόγους των πυρήνων, την απόσταση τους και τον προσανατολισμό τους ως προς τη διεύθυνση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, όπως ορίζεται από το χαμιλτονιανό όρο ($3\cos^2\theta$ -1), P₂ ($\cos\theta$) =1/2 ($3\cos^2\theta$ -1), όπου θ η γωνία μεταξύ των πυρήνων και του

εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B₀ (Σχήμα 1.3.3). Στην υγρή φασματοσκοπία NMR, όπου τα μόρια κινούνται ταχύτατα ο μέσος όρος αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι μηδέν (η γωνία θ λαμβάνει όλες τις πιθανές τμές) με αποτέλεσμα να μη παρατηρείται σημαντική διπολική διεύρυνση, σε αντίθεση με τα στερεά στα οποία οι πυρήνες έχουν συγκεκρριμένο προσανατολισμό μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα και παραμένουν ακίνητοι συναρτήσει του χρόνου. Η συχνότητα συντονισμού στην οποία εμφανίζονται οι πυρήνες που αποτελούν μέρος ενός κρυστάλλου εξαρτάται από τον προσανατολισμό του κρυστάλλου ως προς το εξωτερικό πεδίο.^{44,45}

Ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης – διεύρυνση γραμμής

Καθώς οι χημικές μετατοπίσεις εξαρτώνται από τα ηλεκτρόνια που θωρακίζουν τον πυρήνα από το εφαρμοσμένο μαγνητικό πεδίο, θα έχουν συγκεκριμένο προσανατολισμό αφού οι ηλεκτρονικές πυκνότητες δεν είναι σφαιρικά διατεταγμένες γύρω από τους πυρήνες. Στα διαλύματα το τοπικό μαγνητικό που δημιουργείται απ τα ηλεκτρόνια του μορίου και του διαλύτη μηδενίζονται κατά μέσο όρο λόγω των γρήγορων μοριακών κινήσεων. Στη στερεή κατάσταση η συμμετοχή των μορίων στα κρυσταλλικα πλέγματα έχει σημαντική επίδραση στη μαγνητική θωράκιση και τη χημική μετατόπιση.



Σχήμα 1.3.2: Η ηλεκτρονική κυκλοφορία στα μη σφαιρικά τροχιακά μιας ομάδας μεθυλίου δίνει αφορμή για μια ανισοτροπική χημική μετατόπιση.

Για να παρατηρήσουμε φάσματα υψηλής ανάλυσης παρόμοια με αυτά που λαμβάνονται για τα υγρά αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές. Μια από αυτές είναι η περιστροφή στη μαγική γωνία (MAS). Στην τεχνική αυτή το δείγμα περιστρέφεται με έναν ρότορα γύρω από τον άξονα σχηματίζοντας γωνία 54.44° με τη κατεύθυνση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B₀. Μια απαραίτητη προυπόθεση για να έχουμε στενές κορυφές είναι η ταχύτητα της περιστροφής να είναι της ίδιας ή μεγαλύτερης τάξης μεγέθους από τις αλληλεπιδράσεις διπολικής διεύρυνσης. Για στερεά δείγματα όπως είναι π.χ. τα φρούτα μια συχνότητα περιστροφής 2 KHz θεωρείται ικανοποιητική, ενώ για σκληρότερα στερεά απαιτούνται ταχύτεροι ρυθμοί περιστροφής.^{44,46}



Σχήμα 1.3.3: α) η γωνία θ μεταξύ του δεσμού 1 H- 13 C και της διεύθυνσης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B₀. β) Η αρχή της περιστροφής της μαγικής γωνίας θ.

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής HR-MAS είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση στο ίδιο πείραμα των πολικών και άπολων μεταβολιτών που υπάρχουν στα τρόφιμα. Μία αποδεκτή τιμή S/N μπορεί να επιτευχθεί ήδη από μικρές ποσότητες δειγματος (<2 mg). Επιπλέον το πλήρες πλάτος στο ήμισυ τους ύψους των περισσοτέρων σημάτων είναι συγκρίσιμο με εκείνα των υγρών.⁴³ Στο σχήμα 1.3.4 που ακολουθεί βλέπουμε το φάσμα NMR στην υγρή φάση (υδατικό εκχύλισμα πάνω) και του στερεού HR-MAS (κάτω) για ένα δείγμα από ιταλική πιπεριά, ενώ στο σχήμα 1.3.5 παρουσιάζεται ένας δοκιμαστής και ένας ρότορας κατάλληλα για τη λήψη φασμάτων HR-MAS.



Σχήμα 1.3.4: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹HNMR για δείγμα ιταλικής πιπεριάς με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην υγρή φάση (πάνω) και της φασματοσκοπίας HR-MAS απευθείας στη στερεή φάση (κάτω).



Σχήμα 1.3.5: Δοκιμαστής για τη λήψη φασμάτων με την τεχνική HR-MAS (αριστερά), και ρότορας ζιρκονίου HR-MAS (αριστερά).

Κεφάλαιο 2

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην εισαγωγή αναφέρθηκε η σπουδαιότητα της ελιάς καθώς και των φύλλων της από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες στη βιβλιογραφία, η χρήση των φύλλων της ελιάς ως αυτοτελών προϊόντων, για φαρμακευτικούς σκοπούς αλλά και ως πηγή αντιοξειδωτικών πρόσθετων για τα τρόφιμα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και οι δυνατότητες ανάπτυξης στον συγκεκριμένο τομέα είναι ενθαρρυντικές. Ο ποιοτικός έλεγχος και η ποσοτική ανάλυση των βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχουν στα φύλλα της ελιάς με τη χρήση νέων αναλυτικών τεχνικών αποτελεί επομένως ένα πεδίο με ισχυρό επιστημονικό ενδιαφέρον.

Η παρούσα εργασία έχει ως κύριο στόχο την ανάλυση και το χαρακτηρισμό των φύλλων ελιάς με τη χρήση της φασματοσκοπίας α) ¹Η HR-MAS NMR απευθείας σε ολόκληρα φύλλα ελιάς, και β) ¹Η NMR μίας και δύο διαστάσεων σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς.

Επιμέρους στόχους της εργασίας αποτελούν τα εξής:

- Βελτιστοποίηση των συνθηκών λήψης φασμάτων HR-MAS NMR σε στερεά φύλλα ελιάς, και επιλογή του κατάλληλου διαλύτη.
- Σύγκριση της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά φύλλα ελιάς με την κλασσική τεχνική λήψης φασμάτων NMR από εκχυλίσματα φύλλων στην υγρή φάση.
- Ποσοτικοποίηση των οργανικών βιοδραστικών ενώσεων (τριτερπένια, φαινολικές ενώσεις, σάκχαρα) στα φύλλα ελιάς και με τις δύο τεχνικές NMR.
- Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των οργανικών ενώσεων σε φύλλα που προέρχονται από τρείς διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες ελιάς.
- Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των μεταβολών στις συγκεντρώσεις των βιοδραστικών οργανικών ενώσεων που πιθανώς επέρχονται στα φύλλα της ελιάς κατά την εξέλιξη της ελαιοκομικής περιόδου.

Κεφάλαιο 3

Πειραματικό μέρος

3.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ενώσεις

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) περιεκτικότητας σε δευτέριο 99,8%, δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD) περιεκτικότητας σε δευτέριο 99,8% και δευτεριωμένο νερό (D₂O) 99,9%. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες για τα φάσματα ¹H NMR η ερυθροδιόλη καθαρότητας 97,0% (HPLC), η ουβαόλη καθαρότητας 98,4% (GC) και το ουρσολικό οξύ (HPLC). Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των φασμάτων ¹H NMR στην υγρή φάση ήταν τριαζίνη καθαρότητας 95,0% (UV). Οι παραπάνω διαλύτες και το εσωτερικό πρότυπο προέρχονταν από την εταιρία SIGMA-ALDRICH.

3.2 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος

Σε φιαλίδιο των 15ml ζυγίστηκαν 2,8mg τριαζίνης και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 5 ml CDCl₃. Το πρότυπο διάλυμα αποθηκεύτηκε στο στους 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίηση του στην ανάλυση των δειγμάτων.

3.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για την λήψη φασμάτων ¹Η NMR στην υγρή φάση.

Ζυγίστηκαν 100 mg φύλλων ελιάς και αφού θρυμματίστηκαν σε γουδί πορσελάνης παρουσία υγρού αζώτου μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο όγκου 4 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 800μl δευτεριωμένου χλωροφορμίου CDCl₃ και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 1 ώρα. Ακολούθησε διήθηση του διαλύματος με χρήση τη χρήση υαλοβάμβακα απευθείας στο εσωτερικό σωλήνά NMR διαμέτρου 5mm.

Με την ίδια διαδικασία παρασκευάστηκαν και τα εκχυλίσματα με δευτεριωμένη μεθανόλη MeOD και D_2O .

3.4 Λήψη φασμάτων 1D NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα ¹H NMR του υδατικού διαλύματος και της μεθανόλης λήφθηκαν με 32K πραγματικά δεδομένα (data points). Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° μοιρών για το ¹H ήταν 9.3μs και η ακολουθία παλμών περιελάμβανε την εξάλειψη του σήματος του νερού (ακολουθία παλμών zgpr). Για κάθε φάσμα λήφθηκαν 256 σαρώσεις. Ο χρόνος καταγραφής σήματος ήταν 2.7 sec. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 8 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών. Η επεξεργασία των φασμάτων μετά το μετασχηματισμό Fourier περιελάμβανε πολλαπλασιασμό με εκθετική συνάρτηση (LB=1Hz), διόρθωση φάσης και διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) και έγινε με λογισμικό Tospin της εταιρίας Bruker.

Για το φάσμα του διαλύματος του χλωροφορμίου χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες αλλά χωρίς εξάλειψη του νερού (ακολουθία παλμών zg).

3.5 Λήψη φασμάτων ¹H-¹H COSY 2D NMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ¹H-¹H COSY 2D NMR λήφθησαν χρησιμοποιώντας 192 πραγματικά δεδομένα των 2K, 96 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις, με χρονική καθυστέρηση 1s. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ημιτονοειδή παλμικά βαθμιδωτά πεδία 1:1 διάρκειας 1 ms. Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα δεδομένα στη δεύτερη διάσταση αυξήθηκαν στα 1K πραγματικά δεδομένα (data points) με την τεχνική της γραμμικής πρόβλεψης (linear prediction) και κατόπιν στα 2K με την προσθήκη μηδενικών σημείων στη μνήμη του υπολογιστή, ώστε τα δεδομένα να σχηματίσουν μια μήτρα δεδομένων 2K*2K. Τα δεδομένα των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με τη μαθηματική συνάρτηση sine-bell squared.

3.6 Λήψη φασμάτων 1 H- 13 C, gHMQC COSY 2D NMR

Τα ετεροπυρηνικά ¹H-¹³C, gHMQC COSY 2D NMR λήφθησαν χρησιμοποιώντας 128 πραγματικά δεδομένα των 1K, 300 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις , με χρονική καθυστέρηση 1s. Το πείραμα gHMQC βελτιστοποιήθηκε για συζεύξεις ενός δεσμού ¹H-¹³C, των 140 Hz, ορίζοντας τη χρονική καθυστέρηση στα 30ms. Χρησιμοποίθηκε η σύνθετη παλμική ακολουθία GARP για την αποσύζευξη των πρωτονίων κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης. Η αναλογία των εντάσεων των βαθμωτών πεδίων G₁, G₂, G₃ ημιτονοειδούς σχήματος ήταν 5:3:4, και είχαν διάρκεια 1 ms. Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα δεδομένα στη δεύτερη διάσταση αυξήθηκαν στα 2K πραγματικά δεδομένα (data points) με την τεχνική της γραμμικής πρόβλεψης (linear prediction) και με την προσθήκη μηδενικών σημείων στη μνήμη του υπολογιστή, τα δεδομένα σχημάτισαν έναν πίνακα δεδομένων 2*2 K. Τα δεδομένα των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με τη μαθηματική συνάρτηση sine-bell squared.

3. 7Λήψη φασμάτων ¹H-¹³C, gHMQC, gHMBC και ¹H-¹H gCOSY 2D NMR.

Τα ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά πειράματα 2D NMR λήφθησαν χρησιμοποιώντας 128 πραγματικά δεδομένα των 1K, 128-290 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier, όλα τα δισδιάστατα σετ δεδομένων αυξήθηκαν στα 2K πραγματικά δεδομένα (data points) με την τεχνική της γραμμικής πρόβλεψης (linear prediction) και με την προσθήκη μηδενικών σημείων στη μνήμη του υπολογιστή, ώστε τα δεδομένα να αποτελούν έναν πίνακα δεδομένων 2K*2K. Τα δεδομένα των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με τη μαθηματική συνάρτηση sine-bell squared.

3.8 Λήψη φασμάτων ¹H-¹H j-resolved 2D NMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ¹H-¹H j-resolved 2D NMR λήφθησαν χρησιμοποιώντας 128 πραγματικά δεδομένα των 1K, 4 σαρώσεις και 4 ψευδοσαρώσεις, με χρονική καθυστέρηση 1s. Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα δεδομένα στη δεύτερη διάσταση αυξήθηκαν στα 1K πραγματικά δεδομένα (data points) με την τεχνική της γραμμικής πρόβλεψης (linear prediction). Τα δεδομένα των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με τη μαθηματική συνάρτηση sine-bell squared.

3.9 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των ενώσεων στα δείγματα των φύλλων έγινε με την χρήση φασματοσκοπίας NMR πυρήνα πρωτονίου (¹H) καθώς και δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR πρωτονίου-πρωτονίου (¹H-¹H) gCOSY, J-resolved, και ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας gHMQC και gHMBC.

Η ποσοτική ανάλυση των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε με την ολοκλήρωση των κορυφών με το λογισμικό WINNMR της εταιρίας Bruker, λαμβάνοντας υπόψιν τον αριθμό των πρωτονίων κάθε κορυφής.

3.10 Λήψη φασμάτων ¹Η HR-MAS NMR

Ta φάσματα HR-MAS NMR λήφθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε φασματόμετρο Bruker Avance II 400 MHz λειτουργικής συχνότητας 400.15 MHz για τον πυρήνα ¹H και 100.63 MHz για τον πυρήνα ¹³C. Περίπου 10 mg φύλλου τοποθετήθηκαν σε ρότορα ζιρκονίου μαζί με 10-20 μL δευτεριωμένου διαλύτη (CDCl₃, MeOD ή D₂O) για το κλείδωμα του φασματομέτρου. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ταχύτητα περιστροφής ίση με 5 KHz και καταστολή του σήματος του νερού. Τα μονοδιάστατα φάσματα ¹H NMR ελήφθησαν με 32K πραγματικά δεδομένα και 128 σαρώσεις. Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° μοιρών ήταν 7,9 μs για το ¹H και 10,3μs για τον ¹³C. Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 1024 και 11776 σαρώσεις αντίστοιχα. Τα πειράματα 2D gCOSY HR-MAS λήφθηκαν κάτω απ τις ακόλουθες συνθήκες: εύρος φάσματος 4000Hz και για τις δύο διαστάσεις, 1k πραγματικά δεδομένα (data points) για την f2 και 256 σαρώσεις για την f1. Μια ημιτονοειδής συνάρτηση εφαρμόστηκε και στις δύο διαστάσεις ενώ έγινε προσθήκη μηδενικών σημείων στην διάσταση f1.

Τα πειράματα 2D HSQC HR-MAS πραγματοποιήθηκαν με τις εξής παραμέτρους: 80 με για τη σύνθετη παλμική ακολουθία GARP για την αποσύζευξη ¹³C, 4000 Hz και 21 kHz εύρος φάσματος για τη διάσταση του ¹H και του ¹³C αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν 1k πραγματικά δεδομένα (data points) στην f2 και 256 σαρώσεις στην f1. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier πραγματοποιήθηκε προσθήκη μηδενικών σημείων στην f1 και εφαρμογή τετραγωνικής ημιτονοειδούς συνάρτησης και για τις δύο διαστάσεις.

Κεφάλαιο 4

ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ HR-MAS NMR

4.1 Ποιοτικός προσδιορισμός βιοδραστικών ενώσεων στα φύλλα ελιάς με την τεχνική ¹H HR-MAS NMR.

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστεί η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στα φύλλα ελιάς με τη χρήση της φασματοσκοπίας στερεής κατάστασης HR-MAS NMR. Αρχικά θα ανατεθούν τα φάσματα NMR μιας και δύο διαστάσεων φύλλων ελιάς Κορωνέικης ποικιλίας χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο για το κλείδωμα του φασματομέτρου HR-MAS NMR. Στη συνέχεια, θα γίνει σύγκριση μεταξύ των φασμάτων HR-MAS NMR φύλλων ελιάς από τρείς διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες (Κορωνέϊκη, Τσουνάτη και Χονδρολιά), και θα παρουσιαστούν τα φάσματα HR-MAS NMR φύλλων ελιάς Κορωνέικης ποικιλίας που συλλέχθηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια μιας πλήρους ελαίοκομικής περιόδου. Τέλος, θα μελετηθούν τα φάσματα HR-MAS φύλλων ελιάς διαλυτών για το κλείδωμα του φασματομέτρου HR-MAS NMR, και συγκεκριμένα δευτεριωμένο γμεθανόλη και δευτεριωμένο γορό.

4.2 Ανάλυση φασμάτων HR-MAS φύλλων ελιάς σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.



Σχήμα 4.2.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹Η HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.

Στο Σχήμα 4.2.1 παρουσιάζεται το μονοδιάστατο φάσμα ¹Η HR-MAS NMR φύλλων ελιάς Κορωνέϊκης ποικιλίας σε διαλύτη CDCl₃. Το χλωροφόρμιο είναι ένας σχετικά άπολος διαλύτης, και έτσι το φάσμα ¹Η HR-MAS NMR στο σχήμα 4.2.1 κυριαρχείται από κορυφές που προέρχονται από τερπενοειδείς ενώσεις, οι οποίες αποτελούν το κύριο συστατικό του επιδερμικού κεριού των φύλλων ελιάς αλλά και του καρπού της ελιάς και άλλων φρούτων.⁴⁷ Το επιδερμικό κερί αποτελεί ένα λεπτό στρώμα κεριού που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια των ανώτερων φυτών και τα προστατεύει από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες.

Οι τριτερπενικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο φάσμα του Σχήματος 4.2.1 είναι το ολεανολικό οξύ, η ουβαόλη, η ερυθροδιόλη, το μασλινικό οξύ και το ουρσολικό οξύ. Στον πίνακα 4.2.1 παρουσιάζονται οι δομές των τερπενίων αυτών. Άλλες ενώσεις που που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στην επιφάνεια των φύλλων ελιάς και ταυτοποιήθηκαν στο φάσμα ¹Η HR-MAS NMR είναι τα τριγλυκερίδια (εστέρες λιπαρών οξέων με τη γλυκερόλη), σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα.⁴⁸



Πίνακας 4.2.1: Χημική δομή των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα 1 Η HR-MAS NMR των φύλλων της ελιάς με διαλύτη CDCl₃.



Τα τερπενοειδή αποτελούν μια ομάδα φυτοχημικών που έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες, λόγω της υψηλής αφθονίας τους σε φυτά και καρπούς.⁷ Ειδικότερα έχει βρεθεί ότι το ολεανολικό και το ουρσολικό οξύ παρουσιάζουν αντιμικροβιακή,⁴⁹ αντι-ιική,⁵⁰ και αντι-υπερτασική δράση^{51,52} και βοηθούν στην αναστολή της καρκινογένεσης ενώ είναι πιθανόν να συντελούν στη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου.^{53,54,55}

Η ανάθεση των κορυφών των τριτερπενικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δισδιάστατων τεχνικών φασματοσκοπίας 2D HR-MAS NMR gCOSY, g-HSQC και gHMBC. Στα δισδιάστατα φάσματα ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H-¹H gCOSY εμφανίζονται κορυφές εκτός διαγωνίου που αντιστοιχούν σε πρωτόνια που βρίσκονται σε διπλανές θέσεις στην ανθρακική αλυσίδα του μορίου. Τα ετεροπυρηνικά φάσματα ¹H-¹³C 2D g-HSQC HR-MAS NMR παρέχουν πληροφορίες για την σύζευξη του πρωτονίου με τον απευθείας ενωμένο με χημικό δεσμό άνθρακα (σύζευξη ενός δεσμού, ¹J_{CH}), ενώ τα φάσματα 2D g-HMBC HR-MAS NMR εμφανίζουν τη σύζευξη του πρωτονίου με άτομα άνθρακα που απέχουν 2 ή και 3 δεσμούς στην ανθρακική αλυσίδα του μορίου (²J_{CH} και ³J_{CH}).

Επίσης πολύ χρήσιμη στην ανάλυση των φασμάτων HR-MAS NMR αποδείχθηκε και η λήψη φασμάτων ¹H NMR ορισμένων πρότυπων ενώσεων (ουρσολικό, ερυθροδιόλη και ουβαόλη) τα οποία φαίνονται στο Σχήμα 4.2.2.



Σχήμα 4.2.2: Μονοδιάστατα φάσματα ¹H-NMR των πρότυπων ενώσεων ερυθροδιόλη, ουβαόλη και ουρσολικό οξύ σε διαλύτη CDCl₃ σε πεδίο 500 MHz.

Λόγω της μεγάλης δομικής ομοιότητας (Πίνακας 4.2.1) που παρουσιάζουν, οι τριτερπενικές ενώσεις εμφανίζουν πολλές παρόμοιες κορυφές και σε ταυτόσημες σχεδόν χημικές μετατοπίσεις, γεγονός που δε βοηθάει στην ταυτοποίηση των κορυφών του φάσματος που αντιστοιχούν σε κάθε τριτερπένιο. Ωστόσο τα βινυλικά πρωτόνια των πρότυπων ενώσεων στο Σχήμα 4.2.2, διαφέρουν αρκετά, και έτσι μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε για την ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών στα φάσματα HR-MAS. Το βινυλικό πρωτόνιο για την ερυθροδιόλη βρίσκεται σε χημική μετατόπιση δ 5.20, για την ουβαόλη σε δ 5.15 και για το ουρσολικό οξύ σε δ 5.25.

Για την ανάθεση των κορυφών στο φάσμα ¹H-HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε το δισδιάστατο φάσμα ¹H, ¹H gCOSY που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.2.3. Στο φάσμα επισημαίνονται επιλεκτικά τις συζεύξεις του ολεανολικού οξέος οι οποίες και ξεχωρίζουν πιο έντονα. Το βινυλικό πρωτόνιο H-12 σε δ 5.28 εμφανίζει σύζευξη με το αλλυλικό πρωτόνιο H-11a. Φαίνεται επίσης η σύζευξη μεταξύ του πρωτονίου H-3 σε δ 3.22 με τα διαστερεοτοπικά πρωτόνια H-2a και H-2b

σε δ 1.61 και δ 3.54 αντίστοιχα. Ακόμα, βλέπουμε τις συσχετίσεις μεταξύ των αλειφατικών πρωτονίων Η-18 σε δ 2.81 και Η-19a σε δ 1.62, καθώς επίσης και των πρωτονίων Η-23 σε δ 0.99 και Η-24 σε δ 0.78. Στο φάσμα αυτό φαίνεται τέλος και η συσχέτιση μεταξύ των διαστερεοτοπικών πρωτονίων Η-16a σε δ 1.98 και Η-16b σε δ 1.62.



Σχήμα 4.2.3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης 1 H, H gCOSY των φύλλων ελιάς σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.

Η επιβεβαίωση της ανάθεσης των υπολοίπων κορυφών στα φάσματα HR-MAS και gCOSY έγινε με τη χρήση των φασμάτων 2D ¹H-¹³C gHSQC NMR και 2D gHMBC. Στο Σχήμα 4.2.4 παρουσιάζεται το αλειφατικό τμήμα του φάσματος 2D ¹H-¹³C gHSQC NMR των φύλλων ελιάς, στο οποίο παρουσιάζεται η ανάθεση των πρωτονιωμένων ατόμων άνθρακα του ολεανολικού οξέος, το οποίο αποτελεί το κύριο τριτερπένιο των φύλλων ελιάς, ενώ στο Σχήμα 4.2.5 δίνεται το φάσμα gHMBC με βάση το οποίο γίνεται η ανάθεση των τεταρτοταγών πυρήνων ανθράκων και επαληθεύεται η ανάθεση των φασμάτων πρωτονίου. Η ανάθεση των κορυφών του ελεανολικού οξέος ήταν σε συμφωνία με τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα δεδομένα NMR στην υγρή κατάσταση.⁵⁶


Σχήμα 4.2.4: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H,¹³C gHSQC των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz. Με f συμβολίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα τριγλυκερίδια.

Το φάσμα gHSQC συσχετίζει τις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα με τα απευθείας συνδεδεμένα πρωτόνια (σύζευξη ενός δεσμού). Στη συνέχεια θα παρουσιαστεί αναλυτικά η ανάθεση των κορυφών του ολεανολικού οξέος. Η κορυφή σε δ 78.9 αποδίδεται στον C-3, η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-3 σε δ 3.22, ενώ η κορυφή σε δ 27.2 αποδίδεται στον άνθρακα C-2 και συσχετίζεται με τα πρωτόνια H-2a και H-2b σε δ 1.61 και δ 3.54, ενώ το σήμα σε δ 54.4 αποδίδεται στον άνθρακα C-5 ο οποίος συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-5 σε δ 0.70. Φαίνεται επίσης η συσχέτιση του αλλυλικού άνθρακα C-11 σε δ 23.2 με τα αλλυλικά πρωτόνια H-11, και του άνθρακα C-16 σε δ 22.1 με τα πρωτόνια H-16a και H-16b σε δ 1.98 και δ 1.62 αντίστοιχα. Η κορυφή σε δ 45.7 αποδίδεται στον άνθρακα C-19, λόγω της συσχέτισης με το πρωτόνιο H-19a σε δ 1.62, ενώ οι κορυφές σε δ 23.4 και δ 15.5 αποδίδονται στους άνθρακες C-23 και C-24, αντίστοιχα λόγω συσχέτισης με τα πρωτόνια H-23 και H-24. Από το φάσμα φαίνονται επίσης οι κορυφές σε δ 15.1 και δ 16.9 που αποδίδονται στους άνθρακες C-25 και C-26, οι οποίοι συσχετίζονται με τα

πρωτόνια H-25 και H-26 σε δ 0.92 και δ 0.76. Τέλος οι κορυφές σε δ 23.4 και 33.1 αποδίδονται στους άνθρακες C-29 και C-30 που συσχετίζονται με τα πρωτόνια H-29 και H-30 σε δ 0.93 και δ 0.90 αντίστοιχα.



22 gHMBC των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.

Με τη βοήθεια του φάσματος gHMBC του Σχήματος 4.2.5 εξετάσαμε στη συνέχεια τη σύζευξη των πρωτονίων τόσο με τους γειτονικούς τους άνθρακες όσο και με τους τεταρτοταγείς μη πρωτονιωμένους άνθρακες και έτσι επιβεβαιώσαμε τις ανάθεσεις μας. Τα πρωτόνια H-23 εμφανίζουν συσχέτιση δύο δεσμών με τους άνθρακες C-3, C-24 και C-25. Επίσης στο ίδιο σχήμα φαίνεται η συσχέτιση των πρωτονίων H-29 με τον άνθρακα C-30 καθώς και των πρωτονίων H-1 με τον άνθρακα C-2.

Με ανάλογο τρόπο, έγινε και η ανάθεση των κορυφών και των υπόλοιπων τερπενίων του Πίνακα 4.2.1 στο φάσμα ¹H HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς της Κορωνέικης ποικιλίας. Στο Σχήμα 4.2.6 παρουσιάζονται σε διευρυμένη μορφή οι περιοχές του φάσματος ¹H HR-MAS NMR, που περιλαμβάνουν τις κορυφές των πρωτονίων H-12 και H-27 των τριτερπενίων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα της ελιάς. Η ανάθεση αυτή επαληθεύτηκε με σύγκριση με τα φάσματα ¹H- NMR (υγρής κατάστασης) των πρότυπων ενώσεων ουβαόλη, ερυθροδιόλη και ουρσολικό οξύ.



Σχήμα 4.2.6: Διέυρυνση του μονοδιάστατου φάσματος ¹Η HR-MAS NMR φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη: βινυλικό πρωτόνιο H-12 (πάνω αριστερά), μεθύλια H-27 (πάνω δεξιά), ολικό φάσμα σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (κάτω) σε συχνότητα 400 MHz.

Όπως μπορούμε να δούμε και από τις δομές των ενώσεων παραπάνω το ουρσολικό οξύ είναι ισομερές του ολεανολικού οξέος και η ουβαόλη ισομερές της ερυθροδιόλης, γεγονός που κάνει τον διαχωρισμό των ενώσεων αυτών αρκετά πιο δύσκολο. Ωστόσο, και τα πέντε τερπένια μπορούν να διαφοροποιηθούν στην περιοχή των μεθυλίων ενώ τέσσερις από τις πέντε ενώσεις μπορούν να διακριθούν στη φασματική περιοχή των βινυλικών πρωτονίων (Σχήμα4.2.6).

Το βινυλικό πρωτόνιο H-12 του μασλινικού οξέος βρίσκεται μεταξύ του ολεανολικού οξέος και του ουρσολικού, ωστόσο το πρωτόνιο H-3 δίνει μια ξεκάθαρη κορυφή σε δ 3.00 η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση του μασλινικού οξέος στα φάσματα ¹Η NMR (Σχήμα 4.2.7).



Σχήμα4.2.7: Υδροξυλική περιοχή (CH-OH) του μονοδιάστατου φάσματος ¹HR-MAS της ποικιλίας Κορωνέικη σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.

Όλα τα τερπένια που αναφέραμε (ολεανολικό οξύ, ουρσολικό οξύ, μασλινικό οξύ, ερυθροδιόλη και ουβαόλη) ότι περιέχονται στο επιδερμικό κερί των φύλλων ελιάς έγινε δυνατό να ταυτοποιηθούν από τα φάσματα 1D και 2D HR-MAS NMR των φύλλων της ελιάς. Στον παρακάτω Πίνακα 4.4.2 δίνονται συγκεντρωτικά οι χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου και άνθρακα-13 με βάση την ανάθεση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα gHSQC και gCOSY για όλα τα τερπένια.^{57,58,59,60,61,62,63}

ppm

Πίνακας4.2.2: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C των τερπενοειδών ενώσεων από τα φάσματα gCOSY και gHSQC HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς.

#H	Ολεανολικό	Μασλινικό	Ουρ σ ολικό	Ερυθροδιόλη	Ουβαόλη
	οξύ	οξύ	οξύ		
1	0.97/1.63	0.90/1.98			
	(38.5)				
2	1.61	3.68			
	(27.2)				
3	3.22	3.00			
	(78.9)				
4	q				
5	0.7				
	(54.4)				
6	nd				
7	nd				
8	q				
9	1.53				
	(47.5)				
10	q				
11	1.86/1.91		1.89/1.94	1.84	1.88/1.94
	(23.2)				
12	5.28	nd	5.25	5.19	5.14
13	q				
14	q				
15	nd				
16	1.62/1.98				
	(22.1)				
17	q				
18	2.81/2.84				
	(41.0)				
19	1.15/1.62				
	(45.7)				
20	q				
21	1.38/1.52				

	(18.0)				
22	1.43/1.52				
	(32.7)				
23	0.99				
	(28.0)				
24	0.78				
	(15.5)				
25	0.92				
	(15.1)				
26	0.76				
	(16.9)				
27	1.14	1.03	1.08	1.17	1.11
	(25.7)				
28	-			3.55/3.21	3.53/3.20
	(182.2)			(69.8)	
29	0.93				
	(23.4)				
30	0.90				
	(33.1)				

Μετά την ταυτοποίηση των τριτερπενίων στα φάσματα ¹Η HR-MAS NMR και την ανάθεση χαρακτηριστικών κορυφών για κάθε τριτερπένιο, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό τους σε δείγματα φύλλων ελιάς ακολούθησε μια προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου HR-MAS NMR για τη μελέτη της κατανομής των τριτερπενίων σε φύλλα ελιάς διαφορετικής βοτανικής προέλευσης (ποικιλίας δένδρου), καθώς και των πιθανών αλλαγών στην κατανομή των τριτερπενίων στα φύλλα κατά την διάρκεια και εξέλιξη της ελαιοκομικής περιόδου. Η πρώτη μελέτη εστιάστηκε σε τρείς κρητικές ποικιλίες, Κορωνέικη, Χονδρολιά και Τσουνάτη και χρησιμοποιήθηκαν φύλλα που είχαν συλλεχθεί την ίδια εποχή (Μάρτιος 2011) για κάθε ποικιλία. Στο Σχήμα 4.2.8 παρουσιάζεται η αλκοολική περιοχή του φάσματος HR-MAS NMR, στην οποία γίνεται η σύγκριση των ποικιλιών με βάση τη διπλή κορυφή του μασλινικού και του πρωτονίου H-28 της ουβαόληςερυθροδιόλης. Άπο το φάσμα φαίνεται ότι η ποικιλία Χονδρολιά έχει υψηλότερη περιεκτικότητα μασλινικού οξέος και χαμηλότερη περιεκτικότητα ερυθροδιόλης και ουβαόλης σε σχέση με τις ποικιλίες Τσουνάτη και Κορωνέικη.



Σχήμα 4.2.8: Μονοδιάστατα φάσματα ¹Η HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς από τρείς διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες (Χονδρολιά, Κορωνέικη, Τσουνάτη) σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.

4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενικών ενώσεων

Έχοντας τώρα διαχωρίσει τις πιο χαρακτηριστικές κορυφές προχωρήσαμε στην ολοκλήρωση των σημάτων για να υπολογίσουμε την % σύσταση των τριτερπενίων που υπάρχουν στις τρείς κρητικές ποικιλίες (Κορωνέικη, Χονδρολιά και Τσουνάτη) και να διαπιστώσουμε αν υπάρχουν διαφορές.⁶⁴ Η ποσοτικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας τις κορυφές που ήταν ελεύθερες από αλληλεπικαλύψεις στο φάσμα του HR-MAS NMR με τον εξής τρόπο: επιλογή της κατάλληλης κορυφής για την κάθε ένωση, ολοκλήρωση της με το λογισμικό WIN-NMR και στη συνέχεια κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε κορυφή. Με τον τρόπο αυτό υπολογίσαμε από τα ολοκληρώπατα NMR των

τριτερπενίων την % σύσταση του τριτερπενικού κλάσματος. Στον Πίνακα 4.3.1 που ακολουθεί δίνονται συγκεντρωτικά τα ολοκληρώματα των ενώσεων, ενώ τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης φαίνονται στο Σχήμα 4.3.1.

Πίνακας 4.3.1: % Σύσταση των τριτερπενίων σε φύλλα ελιάς από τρείς διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες σε διαλύτη CDCl₃.

Ενώσεις	Κορωνέικη	Τσουνάτη	Χονδρολιά
	ολοκλήρωμα NMR	ολοκλήρωμα NMR	ολοκλήρωμα NMR
Ολεανολικό οξύ	950,48	1288,01	897,84
Ουρσολικό οξύ	100,37	177,04	40,79
Ερυθροδιόλη	84,66	153,54	10,58
Ουβαόλη	170,23	171,39	44,31
Μασλινικό οξύ	111,69	154,56	144,25



Σχήμα 4.3.1: Διάγραμμα της % σύστασης των τριτερπενίων στα φύλλα ελιάς για τρείς ελληνικές ποικιλίες σε διαλύτη CDCl₃.

Όπως προκύπτει από το παραπάνω διάγραμμα η Χονδρολιά έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ολεανολικού οξέος και μασλινικού και αντίστοιχα το μικρότερο ποσοστό ερυθροδιόλης και ουβαόλης σε σχέση με τις άλλες δύο ποικιλίες. Επίσης παρατηρούμε ότι η Κορωνέικη και η Τσουνάτη παρουσιάζουν παρόμοια ποσοστά τριτερπενίων με εξαίρεση την ουβαόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στην ποικιλία Κορωνέικη.

Τα ποσοστά του ολεανολικού οξέος και του μασλινικού οξέος που βρέθηκαν στα φύλλα της ποικιλίας Κορωνέικη με την φασματοσκοπία HR-MAS είναι 67%, και 7% αντίστοιχα, σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν ότι στα φύλλα ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη η συγκέντρωση του ολεανολικού είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη από αυτή του ουρσολικού οξέος.⁶⁵

Θέλοντας να εξετάσουμε τώρα και αν υπάρχουν διαφορές στην κατανομή των τριτερπενικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της ελαιοκομικής περιόδου λάβαμε φάσματα HR-MAS NMR φύλλων της Κορωνέικης ποικιλίας που είχαν συλλεχθεί από το ίδιο δέντρο κατά τους μήνες Μάρτιο, Μάιο, Ιούλιο και Σεπτέμβριο του 2011. Στη συνέχεια κάναμε ποσοτικοποίηση για τις κορυφές των τριτερπενίων με την ίδια διαδικασία που ακολουθήσαμε για τις τρεις ποικιλίες. Στον Πίνακα 4.3.2 που ακολουθεί δίνονται συγκεντρωτικά οι αναλογίες των τριτερπενικών ενώσεων στα φύλλα της ελιάς κατά τη διάρκεια της ελαιοκομικής περιόδου. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης φαίνονται στο Σχήμα 4.3.2.

Πίνακας4.3.2: Σύσταση των τερπενίων για τους μήνες (Μάρτιο, Μάιο, Ιούλιο και Σεπτέμβριο).

Ενώσεις	Μάρτιος	Μάιος	Ιούλιος	Σεπτέμβριος
	ολοκλήρωμα NMR	ολοκλήρωμα NMR	ολοκλήρωμα NMR	ολοκλήρωμα NMR
Ολεανολικό οξύ	105,93	101,75	122,68	79,38
Ουρσολικό οξύ	8,82	17,11	22,88	19,88
Ερυθροδιόλη	16,81	28,13	26,36	23,26
Ουβαόλη	17,55	33,61	29,23	31,59
Μασλινικό οξύ	17,33	9,6	10,6	5,7



Σχήμα 4.3.2: % Σύσταση των τριτερπενίων στα φύλλα Κορωνέικη ελιάς κατά τη διάρκεια του έτους σε διαλύτη CDCl₃.

Από το Σχήμα 4.3.2 βλέπουμε ότι δεν παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές στην τριτερπενική σύσταση των φύλλων της ελιάς με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο υπάρχει μια σαφής ένδειξη ότι τα επίπεδα του μασλινικού και του ολεανολικού οξέος μειώνονται κατά τη, εξέλιξη της ελαικομικής περιόδου, ενώ αντίθετα τα επίπεδα της ουβαόλης και του ουρσολικού οξέος αυξάνονται. Εξαίρεση όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.3.2 πιθανώς αποτελεί ο μήνας Ιούλιος στον οποίο εμφανίζεται αύξηση του ολεανολικού οξέος και αντίστοιχα μείωση της ουβαόλης σε σχέση με τους υπόλοιπους μήνες.

4.4 Ανάλυση φασμάτων HR-MAS των φύλλων ελιάς σε δευτεριωμένο νερό.

Η μελέτη με την φασματοσκοπία HR-MAS των φύλλων της ελιάς χρησιμοποιώντας χλωροφόρμιο για το κλείδωμα του φασματομέτρου NMR έδειξε ότι στα φάσματα παρατηρούνται κυρίως άπολες ενώσεις, όπως τα τριτερπένια. Για το λόγο αυτό, θελήσαμε να εξετάσουμε και τη χρήση δευτεριωμένων διαλυτών διαφορετικής πολικότητας για τη λήψη φασμάτων HR-MAS.

Για την μελέτη του πλέον πολικού μέρους των φύλλων ελιάς της Κορωνέικης ποικιλίας χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη δευτεριωμένο νερό. Στην παρούσα ενότητα θα αναφερθούμε στην ανάθεση των κορυφών των φασμάτων 1D και 2D HRMAS NMR. Στο Σχήμα 4.4.1 που ακολουθεί παρουσιάζεται το φάσμα ¹H HRMAS NMR φύλλων ελιάς με διαλύτη D₂O.



7.5 8.0 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 9.5 9.0 8.5 2.0 1.5 1.0 mag Σχήμα 4.4.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹H-HRMAS των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη σε διαλύτη D₂O και σε συχνότητα 400 MHz.

Στο φάσμα του Σχήματος 4.4.1 με μια πρώτη εξέταση εμφανίζονται κυρίως κορυφές σακχάρων, αμινοξέων αλλά και φαινολών. Τα φυτά όπως είναι γνωστό παράγουν υδατάνθρακες με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης για να τους χρησιμοποιήσουν είτε σαν πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη τους, είτε ως πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση ενός μεγάλου αριθμού μορίων, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεινών και άλλων σακχάρων.⁶⁶ Οι υδατάνθρακες, μεταξύ άλλων διαλυτών ουσιών χρησιμοποιούνται στα φυτά σαν οσμωτικοί ρυθμιστές και οσμωπροστατευτικά βοηθώντας τα φυτά να ανταπεξέλθουν εναντι διαφόρων αβιοτικών πιέσεων.^{67,68,69}

Η υψηλή αλατότητα και η ξηρασία μειώνουν την ανάπτυξη των φυτών και κατά συνέπεια τη γεωργική παραγωγικότητα περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη αβιοτική πίεση.^{70,71}

Η ελιά είναι ένα αειθαλές δέντρο που παραδοσιακά καλλιεργείται στις μεσογειακές χώρες, που τους καλοκαιρινούς μήνες χαρακτηρίζονται από υψηλές θερμοκρασίες, υψηλά επίπεδα ηλιοφάνειας και χαμηλή διαθεσιμότητα νερού.⁷² Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ελιά φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα ανθεκτική κυρίως στην έλλειψη νερού, ενώ μεγάλος αριθμός σακχάρων όπως η γλυκόζη, η σακχαρόζη, η μαννιτόλη και η ραφινόζη που περιέχει φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς που έχει αναπτύξει το δέντρο για την αντιμετώπιση των δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών.^{73,69,74,75} Τα σάκχαρα καθώς και οι υπόλοιπες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία στα φύλλα ελιάς δίνονται στον πίνακα 4.4.1 που ακολουθεί.

Πίνακας 4.4.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς με τη φασματοσκοπία HR-MAS NMR σε διαλύτη D₂O και σε συχνότητα μαγνητικού πεδίου 400 MHz.





Στο Σχήμα 4.4.1 παρατηρούμε ότι υπάρχει πληθώρα κορυφών τόσο στην αλειφατική όσο και στην αρωματική περιοχή του φάσματος γεγονός που έκανε δύσκολη τη μελέτη και ανάλυση του. Για να γίνει η ανάθεση των κορυφών ήταν αναγκαία η χρήση του δισδιάστατου φάσματος HR-MAS gCOSY, που δίνεται στο Σχήμα 4.4.2.



Σχήμα 4.4.2: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης 1 H, H gCOSY των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D₂O και σε συχνότητα 400 MHz.

Στο σχήμα 4.4.2 παρουσιάζεται η αλειφατική περιοχή του φάσματος gCOSY στην οποία φαίνονται πιο καθαρά οι συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων των σακχάρων που ταυτοποιήσαμε. Στο φάσμα μας βλέπουμε τις συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων Η-1 σε δ 5.23 και Η-2 σε δ 3.54 με μαύρο χρώμα για την α-γλυκόζη και τις συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων Η-1 σε δ 4.64 και Η-2 σε δ 3.26 με κόκκινο χρώμα για την β-γλυκόζη. Επίσης για τη β-γλυκόζη φαίνεται καθαρά και η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων Η-2 και Η-3 σε δ 3.49. Ακόμα φαίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων Η-3" σε δ 4.20 και Η-4" σε δ 4.05 με μπλέ χρώμα για τη ραφινόζη καθώς και οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων Η-1 σε δ 5.42 και Η-2 σε δ 3.58 με πράσινο χρώμα για τη σακχαρόζη.

Η πιστοποίηση της ανάθεσης των κορυφών που παρουσιάσαμε καθώς και η επιβεβαίωση άλλων κορυφών στα φάσματα ¹Η HR-MAS και gCOSY έγινε με τη χρήση των φασμάτων 2D ¹H-¹³C ετεροπυρηνικής συσχέτισης gHSQC και gHMBC. Στο Σχήμα 4.4.3 παρουσιάζεται το αλειφατικό τμήμα του φάσματος 2D gHSQC ¹H-¹³C NMR των φύλλων ελιάς, που δείχνει την ανάθεση των πρωτονιωμένων ατόμων άνθρακα των σακχάρων που αναφέραμε, και στο Σχήμα 4.4.4 δίνεται το φάσμα gHMBC για πιστοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων.

Η ανάθεση των κορυφών ήταν σε συμφωνία με τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα δεδομένα NMR στην υγρή κατάσταση.^{76,77,78,40,27,24}



Σχήμα 4.4.3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C HSQC NMR των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε διαλύτη D₂O και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα 4.4.4 :Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H, ¹³C HMBC των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) σε διαλύτη D_2O και σε συχνότητα 400 MHz.

Το φάσμα gHSQC συσχετίζει τις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα με τα απευθείας συνδεδεμένα πρωτόνια (σύζευξη ενός δεσμού). Η κορυφή σε δ 93.9 αποδίδεται στον άνθρακα C-1, η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-1σε δ 5.23, ενώ η κορυφή σε δ 73.4 στον άνθρακα C-2 η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-1σε δ 5.23, ενώ η κορυφή σε δ 73.4 στον άνθρακα C-2 η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-2 σε δ 3.54 για την α-γλυκόζη (μαύρο χρώμα). Φαίνεται επίσης, η συσχέτιση του άνθρακα C-1 σε δ 97.5 με το πρωτόνιο H-2 σε δ 4.64 και του άνθρακα C-2 σε δ 75.3 με το πρωτόνιο H-2 σε δ 3.26 για την β-γλυκόζη (κόκκινο χρώμα). Για τη β-γλυκόζη φαίνεται και η συσχέτιση του άνθρακα C-3 σε δ 76.8 με το πρωτόνιο H-4 σε δ 3.49. Η κορυφή σε δ 78.8 αποδίδεται στον άνθρακα C-4" η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-4 σε δ 4.05 για τη ραφινόζη (μπλέ χρώμα), ενώ η κορυφή σε δ 74.0 αποδίδεται στον άνθρακα C-7 που σχετίζεται με το πρωτόνιο H-7 σε δ 3.58 για τη σακχαρόζη (πράσινο χρώμα). Με ανάλογο τρόπο, έγινε η ανάθεση στα φάσματα HR-MAS των κορυφών και των υπόλοιπων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν. Στον Πίνακα 4.4.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα φασματικά δεδομένα των ενώσεων που

ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα HR-MAS NMR των φύλλων της ελιάς με διαλύτη D2O.

ΕΝΩΣΕΙΣ	¹ H	¹³ C	Ανάθεση
α-Γλυκόζη	5.23	93.9	CH-1
	3.54	73.4	CH-2
β-Γλυκόζη	4.64	97.5	CH-1
	3.26	75.3	CH-2
	3.49	76.8	CH-3
Σακχαρόζη	5.43	-	CH-1
	3.58	74.0	CH-7
Τυροσίνη	6.82	118.1	CH-3,CH-5
	7.15	118.6	CH-2,CH-6
Μαννιτόλη	3.87	64.8	1,6 CH ₂
	3.68	65.8	2,5CH
Σελοβιόζη	4,51	105.2	CH-3
Βαλίνη	2,24	-	βСН
	1,03	17,4	γCH ₃
Οξικό οξύ	1,95	-	CH ₃
Ραφινόζη	4.22	78.8	CH-3"
	4.04	78.4	CH-4"
	3.73	62.4	CH-1"

Πίνακας 4.4.2: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C των ενώσεων ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D_2O .

Σύμφωνα με μελέτες η μαννιτόλη και η γλυκόζη αποτελούν τα πρωτογενή προιόντα της φωτοσύνθεσης και ακολουθούν η σακχαρόζη με τη φρουκτόζη.⁶⁹ Αυτά τα σάκχαρα αποτελούν το 90% των ολικών διαλυτών υδατανθράκων, κάτι που είναι αναμενόμενο αφού η γλυκόζη και η μαννιτόλη αποτελούν τα κύρια σάκχαρα μεταφοράς και συμβάλλουν στην οσμωτική προσαρμογή.¹⁰ Εκτός από το ρόλο τους στην οσμωτική προσαρμογή όμως αυτές οι ενώσεις εχουν και οσμωπροστατευτικές λειτουργίες. Λόγω της υδρόφιλης δομής τους, είναι ικανά να υποκαταστήσουν το νερό στις επιφάνειες των πρωτεινών, πρωτεινικών συμπλόκων ή μεμβρανών, προστατεύοντας έτσι τις βιολογικές τους λειτουργίες.⁷⁹ Οι πιο διαλυτές ουσίες

φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο και στη δέσμευση ελεύθερων υδροξυλικώνριζών OH⁸⁰ προστατεύοντας έτσι τα φυτά από οξειδωτική βλάβη, η οποία είναι η πιο κοινή επίπτωση λόγω των αβιοτικών πιέσεων.⁸¹

Η σακχαρόζη είναι ο πιο συχνά αναφερόμενος υδρογονάνθρακας στα πλαίσια απόκρισης των φυτών έναντι των περιβαλλοντικών πιέσεων και είναι γνωστή για τη μεμβρανική και μακρομοριακή σταθεροποίηση που παρέχει.⁸² Η ραφινόζη ανήκει στην οικογένεια των ολιγοσακχαριτών οι οποίοι αποτελούν μια άλλη ομάδα διαλυτών υδρογονανθράκων που συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών απέναντι στις αβιοτικές πιέσεις. Η ραφινόζη συσσωρεύεται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά που εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες.^{83,84}

Σύμφωνα πάλι με μελέτες που έχουν γίνει για την ελιά συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι ο κύριος υδατάνθρακας που συμμετέχει στη μείωση της όσμωσης κατά τη δίαρκεια έλλειψης νερού είναι η μαννιτόλη.^{85,86} Επίσης έχει βρεθεί ότι η μαννιτόλη παίζει κύριο ρόλο και στην προστασία της ελιάς από την υψηλή αλατότητα του εδάφους ακολουθούμενη από τη γλυκόζη, η οποία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αποτελεί το 60% των σακχάρων. Οσον αφορά τα άλλα δυο σάκχαρα που αναφέραμε, έχει παρατηρηθεί μια μικρή αύξηση της ποσότητας της σουκρόζης και μικρή μείωση της ποσότητας της ραφινόζης σε συνθήκες αβιοτικής πίεσης.^{87,84} Οπως έχει παρατηρηθεί η ραφινόζη παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από την αλατότητα αντίθετα με τη μαννιτόλη η οποία δείχνει να ανταποκρίνεται σε οποιαδήποτε αβιοτική πίεση.⁸⁸

4.5 Ανάλυση φασμάτων HR-MAS φύλλων ελιάς σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στις προηγούμενες ενότητες παρουσιάσαμε τα αποτελέσματα από τη χρήση ενός πολικού και ενός άπολου διαλύτη για τη μελέτη των φύλλων της Κορωνέικης ποικιλίας. Στην παρούσα ενότητα θα σχολιάσουμε τα φάσματα ¹H,¹³C HR-MAS NMR ενός διαλύτη ενδιάμεσης πολικότητας, της μεθανόλης. Στο Σχήμα 4.5.1 που ακολουθεί βλέπουμε το φάσμα ¹H-HR-MAS NMR φύλλων ελιάς με διαλύτη κλειδώματος MeOD.



Σχήμα 4.5.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹H-HR-MAS των φύλλων σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz.

Στο φάσμα ¹H- HR-MAS παρατηρούμε πλήθος κορυφών τόσο στην αλειφατική περιοχή όσο και στην αρωματική. Εξετάζοντας την αρωματική περιοχή πιο προσεκτικά βλέπουμε ότι κυριαρχείται από κορυφές που προέρχονται από πολυφαινόλες, ενώσεις που αποτελούν κύρια συστατικά των φύλλων αλλά και του λαδιού της ελιάς. Οι πολυφαινόλες προστατεύουν τα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου από την οξέιδωση και συμβάλουν στη σταθερότητα του ελαιολάδου και στην αυξημένη διάρκεια διατήρησης της ποιότητας του.

Πίνακας 4.5.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz.





Οι πολυφαινόλες ή αλλιώς φαινολικά οξέα, που έχουν προσδιοριστεί και ποσοτικά στο ελαιόλαδο ανήκουν σε τέσσερις κατηγορίες: απλές φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, βανιλίνη κλπ), σεκοιριδοειδή (ελευρωπαίνη, λιγκστροσίδιο και τα παράγωγα τους), λιγνάνες (πινορεσινόλη, ακετοξυπινορεσινόλη) και τα φλαβονοειδή (απιγενίνη και λουτεολίνη). Τα μέλη αυτών των κατηγοριών έχουν ισχυρή αντιοξειδωτικη δράση,^{89,90} ενώ πολλές είναι και οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν δείξει ότι οι ενώσεις αυτές επιφέρουν μεγάλη προστασία έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου (του δέρματος, του μαστού και του παχέος εντέρου) της στεφανιαίας καρδιακής νόσου και της γήρανσης, αναστέλλοντας το οξειδωτικό στρες.^{91,92} Στον Πίνακα 4.5.1 παρουσιάζονται οι δομές των πολυφαινολών που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα HR-MAS NMR με διαλύτη τη μεθανόλη. Άλλες ενώσεις που ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα είναι σάκχαρα, αμινοξέα και λιπαρά οξέα.

Για να γίνει η ανάθεση των κορυφών στο φάσμα ¹Η HR-MAS NMR και να ταυτοποιηθούν οι πολυφαινόλες που υπάρχουν στα φύλλα ελιάς χρησιμοποίησαμε το δισδιάστατο φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης gCOSY (Σχήμα 4.5.2).



Σχήμα 4.5.2: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H, ¹H gCOSY των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz.

Στο φάσμα αυτό θα δείξουμε ενδεικτικά τις συζεύξεις της ελευρωπαϊνης που όπως αποδείχθηκε αποτελεί και την κύρια πολυφαινόλη των φύλλων της ελιάς. Το βινυλικό πρωτόνιο Η-7΄ σε δ 6.68 παρουσιάζει σύζευξη με το βινυλικό πρωτόνιο Η-8΄σε δ 6.54. Τα αλλυλικά πρωτόνια Η-10 σε δ 1.65 παρουσιάζουν συσχέτιση με το βινυλικό πρωτόνιο Η-9 σε δ 6.07. Φαίνονται επίσης οι συσχετίσεις μεταξύ των διαστερεοτοπικών πρωτονίων Η-1΄α σε δ 4.20 και Η-1΄ b σε δ 4.08 και το πρωτόνιο Η-2΄σε δ 2.76. Ακόμα, φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων Η-6΄΄σε δ 3.35 και Η-5΄΄ σε δ 3.65, καθώς και η συσχέτιση του πρωτονίου Η-5 σε δ 3.95 με τα διαστερεοτοπικά πρωτόνια Η-6b σε δ 2.44 και Η-6a σε δ 2.69. Τέλος στο φάσμα φαίνεται και η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων Η-6



Σχήμα 4.5.3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C gHSQC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 400 MHz.

Η ανάθεση των πρωτονιωμένων ατόμων άνθρακα έγινε με το ετεροπυρηνικό πείραμα δύο διαστάσεων gHSQC που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.5.3. Στο φάσμα αυτό επιλέξαμε να δείξουμε τις συσχετίσεις των ατόμων άνθρακα της ελευρωπαϊνης όπως έγινε και για το φάσμα gCOSY. Η κορυφή σε δ 154.7 αποδίδεται στον άνθρακα C-3, η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-3 σε δ 7.50, ενώ η κορυφή σε δ 116.0 στον άνθρακα C-7'η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-7'σε δ 6.68 και το σήμα σε δ120.8 αποδίδεται στον άνθρακα C-8',επειδή συσχετίζεται στο δισδιάστατο φάσμα με το βινυλικό πρωτόνιο H-8' σε δ 6.54. Φαίνεται επίσης, η συσχέτιση του αλλυλικού άνθρακα C-1 σε δ 94.6 με το αλλυλικό πρωτόνιο H-1 σε δ 5.90 και του βινυλικού άνθρακα C-9 σε δ 124.2 με το βινυλικό πρωτόνιο H-9 σε δ 6.07. Η κορυφή σε δ 66.8 αποδίδεται στον άνθρακα C -1',λόγω της συσχέτισής του με τα πρωτόνια H-1a' σε δ 4.20 και H-1b' σε δ 4.05, ενώ οι κορυφές σε δ 63.7 και δ 71.3 αποδίδονται στους άνθρακες C-6'' και C-4'' αντίστοιχα, λόγω της συσχέτισης τους με τα πρωτόνια H-6'' και H-4''. Επίσης φαίνεται η συσχέτιση του άνθρακα C-2' σε δ 35.1 ο οποίος συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-2' σε δ 2.76 καθώς και του άνθρακα C-6 σε δ 40.7, λόγω της συσχέτισης του με το πρωτόνια H-6 σε δ 2.69. Με ανάλογο τρόπο, έγινε η ανάθεση και των υπόλοιπων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα της ελιάς με διαλύτη MeOD. Στους Πίνακες 4.5.2 και 4.5.3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα φασματικά δεδομένα των ενώσεων αυτών.^{93,94,95,96,97,98,99}

Ενωση	¹ H	¹³ C	ανάθεση
Σακχαρόζη	5.39	92.9	CH-1
	3.38	72.3	CH-7
Μαννιτόλη	3.80	64.3	1,6 CH ₂
	3.60	64.3	2,5CH
Τυροσίνη	7.25	-	CH-2,CH-6
υδροξυτυροσόλη	6.68	116.0	CH-7'
	6.54	120.8	CH-8'
Ολεανολικο οξύ	5.23	123.4	CH-12
	1.88	23.9	CH-11
	1.15	25.9	CH-27
Μασλινικό οξύ	3.04	69.1	CH-3
	3.53	69.1	CH-2
	1.03	27.6	CH-27
Ουρσολικό οξύ	1.64	39.8	
	1.11	23	CH-27
Ερυθροδιόλη	1.36	36.8	

Πίνακας 4.5.2 : Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD.

	1.18	33.8	CH-27
Ουβαόλη	1.71	-	CH-11
	1.13	18.4	CH-27
	7.65		
	6.34		
	7.60		
Καφεικό οξύ	6.25		
	7.08		
	6.81	150	
Βερμπασκοσίδιο	6.96	81.7	CH-6
	6.78	115.4	CH-5
	7.42	107.5	СН-6'
7 –Ο γλυκοζίτης της	6.90	107.1	CH-5'
Λουτεολίνης	6.60	103.9	CH-3
	5.10	93.6	CH-1''
	3.32	73.8	SUGAR PROTON
	4.50	110.8	CH-3
	3.54	69.8	CH-15
Σελοβιόζη	4.66	132.0	CH-2
	3.20	74.3	CH-19

Πίνακας 4.5.3: Πλήρης ανάθεση των κορυφών ¹Η και ¹³C NMR για την ελευρωπαίνη από τα φάσματα gCOSY και gHMQC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD.

Ελευρωπαίνη	¹ H	¹³ C
1'	4.20,4.08	66.8
2'	2.76	35.1
3'	-	130.7
4'	6.64	118.3
5'	-	?
6'	-	?
7'	6.68	116.0
8'	6.54	120.8
1	5.90	94.6
3	7.50	154.7
4	-	?

5	3.95	31.6
6	2.44,2.69	40.7
7	-	172.6
8	-	129.7
9	6.07	124.2
10	1.65	13.0
1''	4.79	-
2''	3.30	74.3
3''	3.45	77.8
4''	3.33	71.3
5''	3.33	77.3
6''	3.65,3.85	63.7
СООСН3	3.71	167.7

Σύμφωνα με μελέτες η ελευρωπαίνη¹⁰⁰ αποτελεί την κύρια πολυφαινόλη τόσο στο ελαιόλαδο όσο και στον καρπό και τα φύλλα της ελιάς.¹⁰¹ Είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση στο λάδι^{102,103} ενώ η περιεκτικότητα της στο ελαιόλαδο φαίνεται να εξαρτάται από την ωρίμανση της ελιάς,¹⁰⁴ την ποικιλία¹⁰⁵ αλλά και την περίοδο συγκομοιδής.¹⁰⁶

Η ελευρωπαίνη και τα παράγωγα της έχει αποδειχθεί μέσα από επιδημιολογικές μελέτες ότι διαθέτει αντικαρκινικές,⁹³ αντιοξειδωτικές,¹⁰⁷ αντιφλεγμονώδεις,¹⁰⁸ αντιμικροβιακές,¹⁰⁹ αντιγηραντικές¹¹⁰ και αντι-ιικές¹¹¹ ιδιότητες, ενώ προστατεύει και το δέρμα από την ηλιακή ακτινοβολία.¹¹² Πέρα όμως από την προστασία που παρέχει στον άνθρωπο η ελευρωπαίνη έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται και στην άμυνα των φυτών κατά της προσβολής από εντόμα¹¹³ και παθογόνους οργανισμους¹¹⁴ όπως: βακτήρια, μύκητες και ιούς.¹¹⁵

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.5.2, η χρήση της μεθανόλης για το κλείδωμα του φασματομέτρου HR-MAS NMR οδηγεί σε φάσματα τα οποία περιέχουν τόσο άπολες ενώσεις, όπως τα τριτερπένια, όσο και πολικές όπως τα σάκχαρα, γεγονός που οφείλεται στην ενδιάμεση πολικότητα της μεθανόλης σε σχέση με το χλωροφόρμιο και το νερό. Τα φάσματα σε μεθανόλη όμως, είναι πολύ σημαντικά, γιατί επιτρέπουν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων των φύλλων της

ελιάς, οι οποίες λόγω των βιοδραστικών και αντιοξειδωτικών τους ικανοτήτων αποτελούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό ποιότητας για τα φύλλα ελιάς ως προϊόντα.

Κεφάλαιο 5

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΦΥΛΛΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ

5.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται μια προσπάθεια για την μελέτη και την ταυτοποίηση των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στα φύλλα ελιάς με χρήση της φασματοσκοπίας υγρής κατάστασης NMR σε εκχυλίσματα των φύλλων. Η μελέτη αυτή περιελάμβανε φύλλα ελιάς από τρείς διαφορετικές ποικιλίες, φύλλα που αναλύθηκαν με τη χρήση τριών διαφορετικών διαλυτών αλλά και δείγματα φύλλων ελιάς που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της ελαιοκομικής περιόδου σε τέσσερις διαφορετικούς μήνες του χρόνου, όπως ακριβώς και στη φασματοσκοπία στερεής κατάστασης HR-MAS NMR, που παρουσιάστηκε στο Κεφ. 4.

Σε πρώτη φάση έγινε ποιοτική ταυτοποίηση των ενώσεων σε κάθε εκχύλισμα φύλλων με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR, ενώ για την ποσοτικοποίηση των φασμάτων ¹Η NMR προστέθηκε στα δείγματα των εκχυλισμάτων μια πρότυπη ένωση τριαζίνη και έγινε ολοκλήρωση των κορυφών με το λογισμικό WINNMR. 5.2 Ανάλυση των φασμάτων ¹Η-NMR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.



2.5 2.0 1.5 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 3.5 a.o. 1.0 410 oja ppn Σχήμα 5.2.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹Η Η-ΝΜR εκχυλισμάτων των φύλλων Κορωνέϊκης ελιάς με διαλύτη CDCl3 και σε συχνότητα 500 MHz.

Στο σχήμα 5.2.1 παρουσιάζεται το φάσμα ¹Η NMR του εκχυλίσματος των φύλλων της Κορωνέικης ποικιλίας. Όπως και στο αντίστοιχο φάσμα ¹Η HR-MAS NMR, έτσι και εδώ το πρωτονιακό φάσμα κυριαρχείται από σήματα που ανήκουν κυρίως σε τερπενοειδείς ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές είναι το ολεανολικό οξύ, η ουβαόλη, η ερυθροδιόλη, το μασλινικό οξύ και το ουρσολικό οξύ. Άλλες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα με χλωροφόρμιο ήταν τα τριγλυκερίδια.

Η ποιοτική ανάλυση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένες κορυφές του φάσματος όπου ήταν δυνατόν να γίνει η ταυτοποίηση των ενώσεων. Στον πίνακα 5.2.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα ¹Η NMR των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με χλωροφόρμιο.

Πίνακας 5.2.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο εκχύλισμα φύλλων ελιάςε με διαλύτη CDCl_{3.}





Η ανάθεση των κορυφών έγινε με τη φασματοσκοπία 2D NMR (gCOSY, g-HMQC και gHMBC) και με τη βοήθεια φασμάτων πρότυπων τριτερπενικών ενώσεων (ουρσολικό, ερυθροδιόλη και ουβαόλη) οι οποίες φαίνονται στο σχήμα 5.2.2.



Σχήμα 5.2.2: Μονοδιάστατα φάσματα ¹H-NMR των πρότυπων ενώσεων (ερυθροδιόλη, ουβαόλη και ουρσολικό οξύ) σε διαλύτη $CDCl_3$ και σε συχνότητα 500 MHz.

Όπως αναφέραμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, από το φάσμα των πρότυπων τριτερπενικών ενώσεων και λόγω της μεγάλης ομοιότητας που εμφανίζουν οι δομές τους (εμφανίζουν κορυφές με σχεδόν ταυτόσημες χημικές μετατοπίσεις) δε μπορούμε να κάνουμε σαφή διαχωρισμό. Ωστόσο τα βινυλικά πρωτόνια τους διαφέρουν αρκετά και έτσι μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε για την ανάλυση των δικών μας φασμάτων. Το βινυλικό πρωτόνιο για την ερυθροδιόλη βρίσκεται σε δ 5.20, για την ουβαόλη σε δ 5.15 και για το ουρσολικό οξύ σε δ 5.25.

Για την ανάθεση των κορυφών στο φάσμα ¹Η NMR χρησιμοποιήθηκε το δισδιάστατο φάσμα ¹H,¹H gCOSY που δίνεται στο Σχήμα 5.2.3. Στο φάσμα αυτό δίνουμε επιλεκτικά τις συζεύξεις του ολεανολικού οξέος που έχουν και την μεγαλύτερη ένταση. Το βινυλικό πρωτόνιο H-12 σε δ 5.26 εμφανίζει σύζευξη με το αλλυλικό πρωτόνιο H-11a σε δ 1.85. Φαίνεται επίσης η σύζευξη μεταξύ του πρωτονίου H-3 σε δ 3.20 με τα διαστερεοτοπικά πρωτόνια H-2a και H-2b σε δ 1.57 και δ 3.52 αντίστοιχα. Ακόμα, βλέπουμε τις συσχετίσεις μεταξύ των αλειφατικών πρωτονίων H-18 σε δ 2.80 και H-19b σε δ 1.59, καθώς επίσης και των πρωτονίων H-1a σε δ 1.61 και H-1b σε δ 0.94. Στο φάσμα του Σχήματος 5.2.3 φαίνεται τέλος και η συσχέτιση μεταξύ των διαστερεοτοπικών πρωτονίων H-16a σε δ 1.97 και H-16b σε δ 1.59.



Σχήμα 5.2.3: Δισδιάστατο φάσμα NMR ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H-¹H gCOSY του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 500 MHz.

Η επιβεβαίωση της ανάθεσης τους έγινε με τη χρήση των φασμάτων 2D gHMQC και gHMBC ¹H-¹³C NMR. Στο Σχήμα 5.2.4 παρουσιάζεται το αλειφατικό τμήμα του φάσματος 2D gHMQC ¹H-¹³C NMR του εκχυλίσματος χλωροφορμίου των φύλλων, στο οποίο επισημαίνεται η ανάθεση των πρωτονιωμένων ατόμων άνθρακα του ολεανολικού οξέος, το οποίο αποτελεί το κύριο τριτερπένιο του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς, ενώ στο Σχήμα 5.2.5 δίνεται το φάσμα gHMBC που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων.



Σχήμα 5.2.4: Δισδιάστατο φάσμα Η NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H,¹³C HMQC του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς Κορωνέικης ποικιλίας (αλειφατική περιοχή) με διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 500 MHz.

Το φάσμα gHMQC συσχετίζει τις χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα με τα απευθείας συνδεδεμένα πρωτόνια (σύζευξη ενός δεσμού). Στο Σχήμα 5.2.4 η κορυφή σε δ 78.9 αποδίδεται στον C-3, η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-3 σε δ 3.20, ενώ η κορυφή σε δ 27.4 αποδίδεται στον άνθρακα C-2 η οποία συσχετίζεται με τα πρωτόνια H-2a και H-2b σε δ 1.57 και δ 3.52, και το σήμα σε δ 54.3 αποδίδεται στον άνθρακα C-5 ο οποίος συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-5 σε δ 0.70. Φαίνεται επίσης η συσχέτιση του αλλυλικού άνθρακα C-21 σε δ 18.4 με τα πρωτόνια H-21 και του άνθρακα C-16 σε δ 23.7 με τα πρωτόνια H-16a και H-16b σε δ 1.97 και δ 1.59 αντίστοιχα. Οι κορυφές σε δ 28.3 και δ 15.4 αποδίδονται στους άνθρακες C-23 και C-24, αντίστοιχα, λόγω συσχέτισης με τα πρωτόνια H-23 και H-24. Από το φάσμα αυτό φαίνονται επίσης οι κορυφές σε δ 15.1 και δ 26.3 που αποδίδονται στους άνθρακες C-25 και C-27 οι οποίοι συσχετίζονται με τα πρωτόνια H-25 και H-27 σε δ 0.92 και δ 1.11 αντίστοιχα. Τέλος η κορυφή σε δ 33.7 αποδίδεται στον άνθρακα C-30 που συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-30 σε δ 0.88.



Σχήμα 5.2.5: Δισδιάστατο φάσμα HNMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H,¹³C gHMBC του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη (αλειφατική περιοχή) με διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 500 MHz.

Με τη χρήση του φάσματος gHMBC είδαμε στη συνέχεια τη σύζευξη πρωτονίων και με τους γειτονικούς άνθρακες αλλά και τους μη πρωτονιωμένους άνθρακες και επιβεβαιώσαμε έτσι τις ανάθεσεις μας. Στο Σχήμα 5.2.5 τα πρωτόνια H-23 εμφανίζουν συσχέτιση δύο δεσμών με τους άνθρακες C-3, C-24 και C-5. Επίσης φαίνεται η συσχέτιση δύο δεσμών του πρωτονίου H-5 με τους άνθρακες C-25, C-3, C-1, C-24 και συσχέτιση τριών δεσμών με τον άνθρακα C-1, καθώς και των πρωτονίων H-27 με τον άνθρακα C-18.

Με ανάλογο τρόπο, έγινε η ανάθεση των κορυφών και των υπόλοιπων τριτερπενίων στο φάσμα ¹Η NMR του εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με χλωροφόρμιο. Στο Σχήμα 5.2.6 παρουσιάζεται η διευρυμένη περιοχή του φάσματος ¹Η NMR, η οποία περιλαμβάνει τις κορυφές συγκεκριμένων πρωτονίων των τριτερπενίων που ταυτοποιήθηκαν. Η ανάθεση αυτή επαληθεύτηκε με σύγκριση με τα φάσματα ¹Η-NMR των πρότυπων ενώσεων ουβαόλη, ερυθροδιόλη και ουρσολικό οξύ.



Σχήμα 5.2.6: Διέυρυνση του μονοδιάστατου φάσματος ¹Η NMR του εκχυλισματος με χλωροφόρμιο φύλλων ελιάς της Κορωνέικης ποικιλίας: βινυλικό πρωτόνιο Η-12(πάνω αριστερά), μεθύλιο Η-27(πάνω δεξιά), ολικό φάσμα δευτεριωμένου χλωροφορμίου (κάτω) σε συχνότητα 500 MHz.

Λόγω της δομικής ομοιότητας που παρουσιάζουν τα τριτερπένια των φύλλων της ελιάς, όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η ταυτοποίησή τους δεν ήταν εύκολη. Ωστόσο και τα πέντε τριτερπένια μπορούν να ταυτοποιηθούν ανεξάρτητα στην περιοχή των μεθυλίων ενώ τέσσερις από τις πέντε ενώσεις μπορούν να διακριθούν στην περιοχή των βινυλικών πρωτονίων (Σχήμα 5.2.6).

Το βινυλικό πρωτόνιο H-12 του μασλινικού οξέος βρίσκεται μεταξύ του ολεανολικού οξέος και του ουρσολικού, ωστόσο το πρωτόνιο H-3 δίνει μια ξεκάθαρη κορυφή σε δ 3.00 η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση της ένωσης αυτής (Σχήμα 5.2.7). Στον Πίνακα 5.2.2 δίνονται συγκεντρωτικά οι χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C NMR για όλα τα τριτερπένια που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα NMR του εκχυλίσματος με χλωροφόρμιο των φύλλων της Κορωνέικης ποικιλίας.


Σχήμα5.2.7: Αλκοολική περιοχή του μονοδιάστατου φάσματος 1Η NMR των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς από τρεις διαφορετικές ποικιλίες Κορωνέικη με διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 500 MHz.

Πίνακας 5.2.2: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C NMR των τριτερπενοειδών ενώσεων στα φάσματα NMR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με CDCl₃.

#H	Ολεανολικό	Μασλινικό	Ουρσολικό	Ερυθροδιόλη	Ουβαόλη
	οξύ	οξύ	οξύ		
1	0.94/1.61	0.88/1.96			
	(38.2)				
2	1.57/3.52	3.66			
3	3.20	2.98			
	(78.9)				
4	q				
5	0.73				
	(54.3)				
6	nd				

7	nd				
8	q				
9	1.51				
10	q				
11	1.85				
12	5.26	nd	5.22	5.17	5.11
13	q				
14	q				
15	nd				
16	1.59/1.97				
	(22.1)				
17	q				
18	2.80				
	(41.0)				
19	1.11/1.59				
	(45.7)				
20	q				
21	1.32/1.51				
	(18.0)				
22	?				
23	-				
	(28.0)				
24	-				
	(15.4)				
25	0.92				
	(15.1)				
26	-				
27	1.11	1.01	1.06	1.14	1.08
	(26.3)				
28	-			3.53/3.21	3.51/3.19

29	0.93		
30	0.88		
	(33.2)		

Αφού έγινε η ταυτοποίηση των πιο χαρακτηριστικών κορυφών των πέντε τριτερπενίων από τα φάσματα ¹Η NMR του χλωροφορμικού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς, στη συνέχεια μελετήσαμε τις μεταβολές στη συγκέντρωση των τριτερπενίων στα φύλλα της ελιάς ανάλογα με την ποικιλία και τον χρόνο συλλογής των φύλλων κατά την εξέλιξη της ελαιοκομικής περιόδου. Για αυτό το σκοπό εστιάσαμε σε τρείς κρητικές ποικιλίες, Κορωνέικη, Χονδρολιά και Τσουνάτη (Σχήμα 5.2.7). Στο Σχήμα 5.2.7 παρουσιάζεται η αλκοολική περιοχή των φασμάτων ¹HNMR, στην οποία παρατηρούμε ότι η Χονδρολιά έχει υψηλότερη περιεκτικότητα μασλινικού οξέος και χαμηλότερη περιεκτικότητα ερυθροδιόλης και ουβαόλης σε σχέση με την Τσουνάτη και την Κορωνέικη.

5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των τριτερπενικών ενώσεων σε διαλύτη CDCl₃.

Κάνοντας την ολοκλήρωση των πιο χαρακτηριστικών κορυφών για τα πέντε τερπένια που υπάρχουν στα φύλλα ελιάς υπολογίσαμε ποσοτικά (με τη βοήθεια του εσωτερικού προτύπου τριαζίνης) τις συγκεντρώσεις και την % τριτερπενική σύσταση των φύλλων για τις τρείς κρητικές ποικιλίες που μελετήσαμε (Κορωνέικη, Τσουνάτη και Χονδρολιά). Στον Πίνακα 5.3.1 που ακολουθεί δίνονται συγκεντρωτικά οι απόλυτες ποσότητες των τριτερπενικών ενώσεων στα φύλλα της ελιάς υπολογισμένες επί του ξηρού βάρους των φύλλων. **Πίνακας 5.3.1**: Συγκεντρώσεις των τριτερπενίων σε φύλλα ελιάς από τρείς ελληνικές ποικιλίες όπως προέκυψαν από τη μελέτη των εκχυλισμάτων τους με CDCl₃ με τη φασματοσκοπία NMR.

	Κορωνέικη		Τσουνάτη			Χονδρολιά			
Ενώσεις	μmol	μg	mg/g ξηρό	µmol	μg	mg/g ξηρό	μmol	μg	mg/g ξηρό
Ολεανολικό οξύ	6,1	2700	42,69	12,55	5556	87,83	10,39	4599	78,15
Ουρσολικό οξύ	0,76	336	5,32	0,8	354	5,60	0,18	79	1,35
Ερυθροδιόλη	1,26	540	8,54	2,1	900	14,23	0,32	137	2,33
Ουβαόλη	1,83	784	12,40	1,29	553	8,74	0,47	201	3,42
Μασλινικό οξύ	0,91	417	6,60	1,3	596	9,42	1,3	596	10,13
Συνολική									
ποσότητα									
	10,86	4777	75,55	18,04	7959	125,82	12,66	5412	95,38

Η % τριτερπενική σύσταση των φύλλων της Κορωνέικης ελιάς όπως προκύπτει από τα δεδομένα του Πίνακα 5.3.1 παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.3.1.



Σχήμα 5.3.1: Διάγραμμα της % σύστασης των τριτερπενίων στα φύλλα ελιάς για τρείς ελληνικές ποικιλίες σε διαλύτη CDCl₃.

Όπως παρατηρούμε από το διάγραμμα η ποικιλία Χονδρολιά έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολεανολικό και μασλινικό οξύ και τη μικρότερη περιεκτικότητα σε ερυθροδιόλη, ουρσολικό οξύ και ουβαόλη σε σύγκριση με τις άλλες δύο ποικιλίες.

Στη συνέχεια λήφθηκαν φάσματα ¹Η-ΝΜR εκχυλισμάτων φύλλων Κορωνέϊκης ελιάς που είχαν συλλεχθεί τέσσερις διαφορετικούς μήνες του έτους (Μάρτιο, Μάιο, Ιούλιο και Σεπτέμβριο 2011) για να εξεταστεί αν υπάρχει διαφορά στην κατανομή των τερπενικών ενώσεων με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της ελαιοκομικής περιόδου. Η ποσοτικοποίηση για τις κορυφές των τερπενίων έγινε με την ίδια διαδικασία που ακολουθήσαμε για την μελέτη των ποικιλιών. Στον Πίνακα 5.3.2 που ακολουθεί δίνονται συγκεντρωτικά οι ποσότητες των τριτερπενικών ενώσεων για κάθε δείγμα φύλλων. Η μεταβολή της τριτερπενικής σύστασης των φύλλων δίνεται στο Σχήμα 5.3.2 με τη μορφή διαγράμματος.



Σχήμα 5.3.2: % Μεταβολή της κατανομής των τριτερπενίων στα φύλλα ελιάς (Κορωνέικη) κατά τη διάρκεια του έτους σε διαλύτη CDCl₃.

Από το διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι δε παρουσιάζονται μεγάλες διαφοροποιήσεις με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο μπορούμε να διακρίνουμε μια σταδιακή μείωση του ποσοστού του μασλινικού οξέος, καθώς και της ερυθροδιόλης με εξαίρεση το μήνα Σεπτέμβρη. Μια άλλη παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε είναι ότι το ποσοστό του ολεανολικού οξέος αυξάνεται για τους δύο τελευταίους μήνες.

Πίνακας 5.3.2: Συγκεντρώσεις των τριτερπενίων σε φύλλα Κορωνέϊκης ελιάς για τους μήνες Μάρτιο, Μάιο, Ιούλιο και Σεπτέμβριο όπως προέκυψαν από τη μελέτη των εκχυλισμάτων τους με CDCl₃ με τη φασματοσκοπία NMR.

]	Μάρτιος		М	[άιος		Io	ύλιος		Σ	επτέμβρ	ιος
Ενώσεις	µmol	μg	mg/g Encó	μmol	μg	mg/g	μmol	μg	mg/g	μmol	μg	mg/g
Ολεανολικό οξύ	6,1	2700	42,69	4,56	2019	34,31	8,52	3772	58,61	7,42	3285	51,93
Ουρσολικό οξύ	0,76	336	5,32	0,57	252	4,29	0,61	270	4,20	0,38	168	2,66
Ερυθροδιόλη	1,26	540	8,54	1,01	433	7,36	1,67	716	11,13	1,67	716	11,32
Ουβαόλη	1,83	785	12,40	1,63	699	11,87	1,98	849	13,19	2,22	952	15,05
Μασλινικό οξύ	0,91	417	6,60	0,54	248	4,21	0,95	436	6,77	0,83	381	6,02
Συνολική ποσότητα	10,86	4778	75,55	8,31	3651	62,04	13,73	6043	93,9	12,52	5502	86,98

5.4 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά δείγματα φύλλων με αυτά της τεχνικής ¹H NMR σε εκχυλίσματα φύλλων με διαλύτη CDCl₃.

HNMR-CDCl₃ HR-MAS-CDCl₃ 5.4 5.2 5.0 4.8 4.6 4.4 4.2 4.0 s.a 3.6 3.4 3.2 3.0 2.9

Σχήμα 5.4.1: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹H NMR για τα φύλλα ελιάς σε διαλύτη CDCl₃ με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR σε υγρή φάση (HNMR πάνω) και στερεή φάση (HR-MAS κάτω).

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.4.1 τα μονοδιάστατα φάσματα ¹HNMR των δύο τεχνικών εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα δίνοντας μας παρόμοιες πληροφορίες σχετικά με τις ενώσεις που μπορούν να ανιχνευθούν. Μια διαφορά που παρατηρήθηκε είναι ότι στο μονοδιάστατο φάσμα πρωτονίου της τεχνικής HRMAS-NMR δεν φαίνονται καθαρά οι κορυφές των λιπιδίων σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία NMR στην υγρή φάση.



Σχήμα 5.4.2: Σύγκριση της % τερπενικής σύστασης στα φύλλα ελιάς με τις τεχνικές HR-NMR (υγρή φάση) και HRMAS-NMR (στερεή φάση) σε διαλύτη CDCl₃.

Συγκρίνοντας στη συνέχεια και ποσοτικά τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών για τα φύλλα της ποικιλίας Κορωνέικη βλέπουμε ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην κατανομή των τριτερπενίων, εκτός ίσως από το ποσοστό της ουβαόλης, το οποίο προκύπτει μεγαλύτερο με την τεχνική HR-NMR στα εκχυλίσματα των φύλλων στο Σχήμα 5.4.2.



Σχήμα 5.4.3: Μεταβολή της % τερπενικής σύστασης στα φύλλα ελιάς (Κορωνέικη ποικιλία) κατά τη διάρκεια του έτους σε διαλύτη CDCl₃ με τη χρήση των τεχνικών HR-NMR (υγρή φάση) και HRMAS-NMR (στερεή φάση).

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του Σχήματος 5.4.3 δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών για την μεταβολή της τριτερπενικής σύστασης των φύλλων κατά τη διάρκεια του έτους με εξαίρεση το ποσοστό του ουρσολικού οξέος για το οποίο με την τεχνική HR-NMR παρατηρείται μια σταδιακή μείωση ενώ αντίθετα με την τεχνική HRMAS-NMR παρατηρείται αύξηση.

5.5 Ανάλυση των φασμάτων ¹Η-NMR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με δευτεριωμένο νερό.

Για την μελέτη του άπολου μέρους των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Κορωνέικη χρησιμοποιήσαμε σαν διαλύτη εκχύλισης δευτεριωμένο χλωροφόρμιο όπως αναπτύχθηκε διεξοδικά στην ενότητα 5.4. Στην παρούσα ενότητα θα αναφερθούμε στην ανάθεση των κορυφών των φασμάτων ¹Η και¹³C NMR εκχυλισμάτων των φύλλων χρησιμοποιώντας σαν διαλύτη D₂O. Στο Σχήμα 5.5.1 που ακολουθεί παρουσιάζεται το φάσμα ¹Η NMR του εκχυλίσματος με D₂O.



7.0 6.5 6.0 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 8.5 7.5 5.5 2.5 2.0 9.0 8.0 1.5 1.0 Σχήμα 5.5.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹Η NMR εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη D_2O και σε συχνότητα 500 MHz.

Όπως φαίνεται και από το φάσμα, λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει δεν είναι εύκολη η απευθείας ανάθεση των κορυφών. Για να διευκολυνθεί η ανάλυση του φάσματος του Σχήματος 5.5.1 χρησιμοποιήθηκε το δισδιάστατο φάσμα ¹H⁻¹H 2D J-resolved, που φαίνεται στο Σχήμα 5.5.2.



Σχήμα 5.5.2: Αλειφατική περιοχή του δισδιάστατου φάσματος ¹H,¹H J-resolved των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D₂O και σε συχνότητα 500 MHz.

Το φάσμα ¹H, ¹H J-resolved είναι χρήσιμο για να διακρίνουμε την πολλαπλότητα και να ορίσουμε τις συζεύξεις J (J-coupling) των κορυφών στην αλειφατική περιοχή, όπου υπάρχει και η μεγαλύτερη αλληλεπικάλυψη κορυφών, ώστε να μπορέσουμε να κάνουμε την ταυτοποίηση των διαφόρων ενώσεων στο φάσμα ¹H NMR των φύλλων. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν κυρίως σάκχαρα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και φαινόλες. Στον Πίνακα 5.5.1 παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν μαζί με την αρίθμηση των πρωτονίων τους.

Πίνακας 5.5.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς με διαλύτη D_2O με τη φασματοσκοπία NMR.





Για την ανάθεση των κορυφών στο φάσμα ¹H NMR χρησιμοποιήθηκε το δισδιάστατο φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης gCOSY, που δίνεται στο Σχήμα 5.5.3. Στο φάσμα φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων H-1 σε δ 5.23 και H-2 σε δ 3.55 της α-γλυκόζης, και μεταξύ των πρωτονίων H-1σε δ 4.65 και H-2 σε δ 3.25 της β-γλυκόζης. Για την β -γλυκόζη μπορούμε να δούμε και τη συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων H-2 σε δ 3.25 και η συσχέτιση συσχέτιση των πρωτονίων H-1 σε δ 1.33 του λακτικού οξέος. Για να επιβεβαιωθεί η ανάθεση των πρωτονίων και να δούμε και άλλες κορυφές που δε φαίνονται στο φάσμα gCOSY έγινε χρήση του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης 2D ¹H-¹³C gHMQC (Σχήμα 5.5.4).



Σχήμα 5.5.3: Δισδιάστατο φάσμα 1 H, 1 H gCOSY εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη D₂O και σε συχνότητα 500 MHz.

Στο σχήμα 5.5.4 παρουσιάζεται το αλειφατικό τμήμα του φάσματος 2D gHMQC των φύλλων, που δείχνει την ανάθεση των πρωτονιωμένων ατόμων άνθρακα . Η κορυφή σε δ 92.7 αποδίδεται στον άνθρακα C-1 που εμφανίσει συσχέτιση με το πρωτόνιο H-1 σε δ 5.23 ενώ η κορυφή σε δ 72.5 αποδίδεται στον άνθρακα C-2 που συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-2 σε δ 3.55 (μαύρο χρώμα για την α-γλυκόζη). Στο φάσμα φαίνεται επίσης η κορυφή σε δ 75.6 που αποδίδεται στον άνθρακα C-2 λόγω της συσχέτισης του με το πρωτόνιο H-2 σε δ 3.25 καθώς και του άνθρακα C-3 σε δ 76.8 οποίος συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-3 σε δ 3.47. Τέλος η κορυφή σε δ 96.0 αποδίδεται στον άνθρακα C-1 που εμφανίζει συσχέτιση με το πρωτόνιο H-1 σε δ 4.66 (κόκκινο χρώμα για τη β-γλυκόζη).



Σχήμα 5.5.4: Δισδιάστατο φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H - 13 C gHMQC 2D NMR εκχυλίσματος των φύλλων της Κορωνέικης με διαλύτη D₂O (αλειφατική περιοχή) και σε συχνότητα 500 MHz.

Με τη χρήση του φάσματος gHMBC εξετάσαμε στη συνέχεια τη σύζευξη των πρωτονίων με τους γειτονικούς άνθρακες αλλά και τους μη πρωτονιωμένους άνθρακες, και έτσι επιβεβαιώσαμε τις ανάθεσεις μας (Σχήμα 5.5.5). Στο φάσμα αυτό φαίνεται η συσχέτιση (δύο δεσμών) του πρωτονίου Η-4 με τον άνθρακα C-3,5 της β-γλυκόζης. Επίσης φαίνεται η συσχέτιση δύο δεσμών του πρωτονίου Η-2 με τους άνθρακα C-1 και δύο δεσμών με το άνθρακα C-3 για τη β-γλυκόζη (κόκκινο χρώμα). Για την α-γλυκόζη βλέπουμε και εδώ όπως και στο HMQC τη συσχέτιση του πρωτονίου Η-1 με τον άνθρακα C-2 (μαύρο χρώμα). Με ανάλογο τρόπο, έγινε και η ανάθεση των κορυφών και των υπόλοιπων ενώσεων στο ¹H, Η NMR φάσμα των φύλλων ελιάς. Στον πίνακα 5.5.2 παρουσιάζονται όλα τα φασματικά δεδομένα και των ενώσεων που καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε.



Σχήμα 5.5.5: Δισδιάστατο φάσμα HNMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H, ¹³C gHMBC εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς Κορωνέϊκης ποικιλίας (αλειφατική περιοχή) με διαλύτη D_2O και σε συχνότητα 500 MHz.

Πίνακας 5.5.2 :Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν από τα φάσματα gCOSY και gHMQC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη D_2O .

ΕΝΩΣΕΙΣ	$^{1}\mathrm{H}$	¹³ C	Ανάθεση
	5.23	92.7	CH-1
α-Γλυκόζη	3.55	72.5	CH-2
	4.66	96.5	CH-1
	3.25	74.9	CH-2
β-Γλυκόζη	3.47	76.8	CH-3
	3.42	70.9	CH-4
	3.48	76.6	CH-5
	3.87	61.6	CH-6
Τυροσίνη	7.22	-	CH-2,CH-6
	6.89		
Λακτικό οξύ	4.13	76.1	bCH ₃
	1.33		aCH ₃
Μαννιτόλη	3.87	64.8	1,6 CH ₂
	3.68	65.8	2,5CH
Θρεονίνη	1.34	27.8	γCH_3
	1,15	22,5	aCH ₃

Βαλίνη	2,24	-	βCH
	1,03	17,4	γCH_3
Οξικό οξύ	1,95	-	CH ₃
	2,58	32,2	Gluy
	2.23	-	Gluβ
Φαινυλαλανίνη	7,46	130,5	CH-3,CH-5
	7.38	121.5	CH-4
	2.43	?	
Σελοβιόζη	4.51	105.3	CH-3
	3.36	-	CH-18
	6.40	129.1	CH-2
	7.65		
Καφεικό οξύ	6.28		
	7.60		
Βερμπασκοσίδο	6.79		CH-5
	6.96		CH-6
	2.07	24.0	CH-2"a
	1.88	33.8	CH-2"b
	5.83		CH-8'
	5.63		CH-6'
	2.78		CH-2′
	3.80		CH-6''
Μαννόζη	3.71	63.2	βCH-6
	3.56	64.8	βCH-4

5.6 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά δείγματα φύλλων με αυτά της τεχνικής ¹H NMR σε εκχυλίσματα φύλλων με διαλύτη D₂O.



Σχήμα 5.6.1: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹H NMR για τα φύλλα ελιάς σε διαλύτη D_2O με τη χρήση των τεχνικών HR-NMR (πάνω) και HRMAS-NMR (κάτω).

Συγκρίνοντας τα φάσματα με διαλύτη νερό για τις δύο τεχνικές βλέπουμε ότι είναι σχεδόν όμοια, και οτι το φάσμα της HRMAS τεχνικής έρχεται σε συμφωνία με τη θεωρία σύμφωνα με την οποία το πλήρες πλάτος στο των κορυφών είναι συγκρίσιμο με το ήμισυ του ύψους των σημάτων στα υγρά. Επίσης βλέπουμε ότι υπάρχει ικανοποιητική ένταση S/N όπως και στα υγρά παρά τη μικρή ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιήθηκε γεγονός που έρχεται πάλι σε συμφωνία με τη θεωρία της στερεής κατάστασης NMR.⁴²

Ωστόσο συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων 1D και 2D NMR των δύο τεχνικών διαπιστώσαμε και κάποιες διαφορές. Κάποιες από τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με την φασματοσκοπία HR-NMR στα υδατικά εκχυλίσματα των φύλλων δεν υπήρχαν ή ήταν πολύ μικρής έντασης για να είναι ανιχνεύσιμες στην φασματοσκοπία HRMAS NMR ενώ για κάποιες άλλες ενώσεις βρέθηκε το αντίστροφο. Στον Πίνακα 5.6.1 που ακολουθεί δίνονται οι ενώσεις στις οποίες εντοπίζονται διαφορές στην ανίχνευσή τους με τις δύο τεχνικές. Μια άλλη διαφορά

που εντοπίσαμε είναι ότι για τις κοινές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και με τις δύο φασματοσκοπικές μεθόδους υπήρχε μια μικρή απόκλιση όσον αφορά τη χημική μετατόπιση των ενώσεων, η οποία οφείλεται κυρίως στην επίδραση του διαλύτη στην τεχνική HR-NMR στην υγρή φάση.

Πίνακας 5.6.1: Ενώσεις που δεν ταυτοποιούνται και με τις δύο τεχνικές NMR (υγράστερεά) σε διαλύτη D_2O .

Ενώσεις	HR-NMR	HR-MAS NMR
Φαινυλαλανίνη		-
Καφεικό οξύ		-
Μαννόζη		-
Σακχαρόζη	-	
Ραφινόζη	-	
Βερμπασκοσίδιο		-
Λακτικό οξύ		-
Θρεονίνη		-

5.7 Ανάλυση των φασμάτων ¹Η-NMR εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς με διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη.

Σ΄ αυτήν την ενότητα θα μελετήσουμε τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς με ένα διαλύτη ενδιάμεσης πολικότητας, τη μεθανόλη. Στο Σχήμα 5.7.1 που ακολουθεί βλέπουμε το φάσμα ¹H NMR ενός εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με MeOD.



Σχήμα 5.7.1: Μονοδιάστατο φάσμα ¹Η NMR των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz.

Άπο το φάσμα ¹H NMR των φύλλων του Σχήματος 5.7.1 διακρίνουμε ότι υπάρχει πλήθος κορυφών τόσο στην αλειφατική όσο και στην αρωματική περιοχή, γεγονός που κάνει δύσκολη την ανάθεση των κορυφών όπως και στην περίπτωση του D₂O. Για να διευκολυνθεί η ανάλυση του φάσματος χρησιμοποιήσαμε και πάλι ένα δισδιάστατο φάσμα ¹H-¹H J-resolved, που δίνεται στο Σχήμα 5.7.2. Με τη βοήθεια του φάσματος ¹H-¹H J-resolved καταφέραμε αρχικά να ξεκαθαρίσουμε την πολλαπλότητα ορισμένων κορυφών που αλληλεπικαλύπτονταν ή λόγω της χαμηλής έντασής τους δεν διακρίνονταν εμφανώς στο μονοδιάστατο φάσμα ¹H NMR.



Σχήμα 5.7.2: Αλειφατική περιοχή του δισδιάστατου φάσματος ¹H-¹H J-resolved εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz.

Εξετάζοντας την αρωματική περιοχή του φάσματος ¹Η NMR βλέπουμε ότι κυριαρχείται από κορυφές που προέρχονται από πολυφαινόλες, ενώσεις που αποτελούν κύρια συστατικά των φύλλων αλλά και του λαδιού της ελιάς. Εκτός από τις πολυφαινόλες, ταυτοποίηθηκαν επίσης και άλλες ενώσεις, όπως τα σάκχαρα και τα λιπαρά οξέα. Στον Πίνακα 5.7.1 παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα μεθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων. Σε μικρή ποσότητα ανιχνεύθηκαν τα τριτερπένια (ολεανολικό οξύ, ουρσολικό οξύ, ερυθροδιόλη, ουβαόλη, και μασλινικό οξύ) που ταυτοποιήσαμε στο εκχύλισμα χλωροφορμίου. Για να γίνει η ανάθεση των κορυφών στο φάσμα ¹Η NMR και να ταυτοποιηθούν οι πολυφαινόλες που υπάρχουν στα φύλλα ελιάς χρησιμοποίησαμε στη συνέχεια το δισδιάστατο φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹Η-¹Η gCOSY (Σχήμα 5.7.3).

Πίνακας 5.7.1: Χημικές δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα φύλλα ελιάς σε διαλύτη MEOD και σε συχνότητα 500 MHz.





Σχήμα 5.7.3: Δισδιάστατο φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H-¹H gCOSY εκχυλίσματος των φύλλων ελιάς με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz.

Στο φάσμα ομοπυρηνικής συσχέτισης gCOSY παρουσιάζουμε ενδεικτικά τις συζεύξεις για τα πρωτόνια της ελευρωπαϊνης. Στη συνέχεια της εργασίας θα δώσουμε αναλυτικά όλα τα φασματικά δεδομένα για τις ενώσεις που καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε. Για την ελευρωπαϊνη, το βινυλικό πρωτόνιο H-7΄ σε δ 6.69 παρουσιάζει σύζευξη με το βινυλικό πρωτόνιο H-8΄σε δ 6.55. Τα αλλυλικά πρωτόνια H-10 σε δ 1.66 παρουσιάζουν συσχέτιση με το βινυλικό πρωτόνιο H-9 σε δ 6.08. Φαίνονται επίσης οι συσχετίσεις μεταξύ των διαστερεοτοπικών πρωτονίων H-1΄α σε δ 4.20 και H-1΄b σε δ 4.11 και το πρωτόνιο H-2΄σε δ 2.77. Ακόμα, φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίω H-6b σε δ 2.44 και H-5 σε δ 3.97, καθώς και η συσχέτιση του πρωτονίου H-9 σε δ 6.08 με το πρωτόνιο H-1 σε δ 5.91. Τέλος στο φάσμα φαίνεται και η συσχέτιση μεταξύ των διαστερεοτοπικών πρωτονίων H-6a και H-6b και μεταξύ των πρωτονίων H-1΄ σε δ 4.80 και H-2΄ σε δ 3.34.

Η ανάθεση των πρωτονιωμένων ατόμων άνθρακα έγινε με το ετεροπυρηνικό πείραμα ¹H-¹³C δύο διαστάσεων gHMQC που παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.7.4.



Σχήμα 5.7.4: Δισδιάστατο φάσμα NMR ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H-¹³C gHMQC εκχυλίσματος φύλλων ελιάς με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz.

Στο φάσμα gHMQC επιλέξαμε να δείξουμε τις συσχετίσεις των ατόμων άνθρακα της ελευρωπαϊνης, όπως έγινε και για το φάσμα gCOSY. Η κορυφή σε δ 155.4 αποδίδεται στον άνθρακα C-3, η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-3 σε δ 7.51, ενώ η κορυφή σε δ 116.2 στον άνθρακα C-7'η οποία συσχετίζεται με το πρωτόνιο H-7'σε δ 6.69, και το σήμα σε δ 121.4 αποδίδεται στον άνθρακα C-8', επειδή συσχετίζεται στο δισδιάστατο φάσμα με το βινυλικό πρωτόνιο H-8' σε δ 6.55. Φαίνεται επίσης, η συσχέτιση του αλλυλικού άνθρακα C-1 σε δ 95.3 με το αλλυλικό πρωτόνιο H-1 σε δ 5.91 και του βινυλικού άνθρακα C-9 σε δ 125.0 με το βινυλικό πρωτόνιο H-9 σε δ 6.08. Η κορυφή σε δ 67.0 αποδίδεται στον άνθρακα C -1', λόγω της συσχέτισης του με τα πρωτόνια H-1a' σε δ 4.20 και H-1b' σε δ 4.11, ενώ οι κορυφές σε δ 35.5 και δ 41.3 αποδίδονται στους άνθρακες C-2' και C-6 αντίστοιχα, λόγω της συσχέτισης τους με τα πρωτόνια H-2' και H-6. Επίσης φαίνεται η κορυφή σε δ 101.0 που αποδίδεται στον άνθρακα C -1'' λόγω της συσχέτισης του με το πρωτόνια H-2' και H-1'' σε δ 4.80.

Με τη χρήση του φάσματος gHMBC μελετήσαμε στη συνέχεια τη σύζευξη των πρωτονίων με τους γειτονικούς άνθρακες αλλά και τους μη πρωτονιωμένους άνθρακες του φάσματος, και έτσι επιβεβαιώσαμε τις ανάθεσεις μας (Σχήμα 5.7.5).



gHMBC εκχυλίσματος φύλλων ελιάς της Κορωνέικης ποικιλίας (αλειφατική περιοχή) με διαλύτη MeOD και σε συχνότητα 500 MHz.

Στο φάσμα αυτό φαίνεται η συσχέτιση (δύο δεσμών) του πρωτονίου Η-3 με τον άνθρακα C-1 και δύο δεσμών με τους άνθρακες C-4 και C-5. Επίσης φαίνεται η συσχέτιση δύο δεσμών του πρωτονίου Η-7΄με τους άνθρακες C-3΄ και C-5', καθώς και η συσχέτιση δύο δεσμών του πρωτονίου Η-8΄με τους άνθρακες C-4΄ και C-6΄. Ακόμα φαίνεται η συσχέτιση ενός δεσμού του πρωτονίου Η-2΄ με τον άνθρακα C-1΄, τριών δεσμών με τον άνθρακα C-7΄ και δύο δεσμών με τον άνθρακα C-8΄. Τέλος στο φάσμα αυτό φαίνεται η συσχέτιση δύο δεσμών του πρωτονίου Η-10 με τον άνθρακα C-8 και τον άνθρακα C-9. Με ανάλογο τρόπο, έγινε η ανάθεση και των υπόλοιπων ενώσεων που μελετήσαμε. Στους Πίνακες 5.7.2 και 5.7.3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλα τα φασματικά δεδομένα των ενώσεων που έγινε δυνατό να ταυτοποιηθούν στα φάσματα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς.

Πίνακας 5.7.2: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C NMR των ενώσεων από τα φάσματα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD.

Ενωση	¹ H	¹³ C	Ανάθεση
Σακχαρόζη	5.39	93.9	CH-1
	3.40	72.9	CH-7
Μαννιτόλη	3.82	65.2	1,6 CH ₂
	3.63	65.7	2,5CH
Τυροσίνη	7.24		CH-2,CH-6
	6.98		
Υδροξυτυροσόλη	6.68	117.2	CH-7'
	6.54	121.5	CH-8'
Τριγλυκερίδια	5.33	129.1	CH-2
	2.81	43.0	CH-3
Ολεανολικο οξύ	5.25	123.7	CH-12
	1.88	26.9	CH-11
	1.15	26.6	CH-27
Μασλινικό οξύ	3.03	70.5	CH-3
	3.54	70.1	CH-2
	1.01	24.3	CH-27
Ουρσολικό οξύ	1.66	40.0	
	1.12	-	CH-27
Ερυθροδιόλη	1.36	34.8	
	1.18	-	CH-27
Ουβαόλη	1.72	-	CH-11
	1.11	-	CH-27
	7.64		
	6.40		
	7.57		
Καφεικό οξύ	6.32		
	7.08		
	6.81	117.7	
Βερμπασκοσίδιο	6.95	109.1	CH-6

	6.79	117.7	CH-5
	7.42	114.5	CH-6'
	6.90	116.7	CH-5'
7-Ο γλυκοζίτης της	6.60	104.7	CH-3
Λουτεολίνης	5.10	93.8	CH-1''
	3.34	71.5	SUGAR PROTON
	4.48	98.6	CH-2
	3.14	79.6	CH-19
Σελοβιόζη	4.66	100.1	CH-3
	3.22	74.3	CH-18

Πίνακας 5.7.3: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η και ¹³C NMR για την ελευρωπαίνη από τα φάσματα των εκχυλισμάτων των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MeOD.

Ελευρωπαίνη	¹ H	¹³ C
1'	4.21,4.11	67.0
2'	2.77	35.5
3'	-	130.7
4'	6.67	117.3
5'	-	145.9
6'	-	144.6
7'	6.69	116.2
8'	6.55	121.4
1	5.91	95.31
3	7.51	155.4
4	-	109.2
5	3.97	32.1
6	2.44, 2.70	41.3
7		172.8

8		130.3
9	6.08	125.0
10	1.66	13.4
1"	4.80	101.0
2''	3.34	74.4
3''	3.41	78.0
4''	3.33	71.5
5''	3.33	78.6
6''	3.68,3.89	62.9
СООСН3	3.71	52.1
		169.0

5.8 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της τεχνικής HR-MAS NMR σε στερεά δείγματα φύλλων με αυτά της τεχνικής ¹Η NMR σε εκχυλίσματα φύλλων με διαλύτη MeOD..



Σχήμα 5.8.1: Σύγκριση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹HNMR για τα φύλλα ελιάς σε διαλύτη MeOD με τη χρήση της HR-NMR και HRMAS-NMR τεχνικής (HR-NMR κάτω) και (HRMAS πάνω).

Συγκρίνοντας τα μονοδιάστατα φάσματα για τις δύο τεχνικές σε διαλύτη μεθανόλη παρατηρούμε ότι υπάρχει εξαιρετική ομοιότητα σε βαθμό που δεν θα ήταν εύκολο να τα ξεχωρίσουμε. Η ίδια ομοιότητα παρουσιάζεται και στα δισδιάστατα φάσματα των δύο τεχνικών, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τεχνική HRMAS NMR δίνει εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα με την φασματοσκοπία υγρής κατάστασης NMR. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και με τις δύο μεθόδους ήταν ίδιες με μοναδική διαφορά τη χημική μετατόπιση των ενώσεων λόγω της επίδρασης του διαλύτη στην περίπτωση της τεχνικής HR-NMR στην υγρή φάση.

Κεφάλαιο 6

Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία αναφέρεται στην εφαρμογή μιας νέας σχετικά αναλυτικής τεχνικής στο πεδίο των τροφίμων, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των οργανικών ενώσεων στα φύλλα ελιάς. Η τεχνική αυτή είναι η φασματοσκοπία στερεής κατάστασης HR-MAS NMR, η οποία τα τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης διαφόρων στερεών ή ημιστερεών τροφίμων διευρύνοντας έτσι τις δυνατότητες για νέες εφαρμογές της στον τομέα του ποιοτικού ελέγχου των τροφίμων. Η τεχνική αυτή μπορεί να συγκριθεί με την παραδοσιακή ανάλυση των τροφίμων με την φασματοσκοπία NMR στην υγρή φάση (HR-NMR, high-resolution NMR), κατά την οποία μελετώνται εκχυλίσματα των τροφίμων με διάφορους διαλύτες, συνηθέστερα με το νερό.

Στη συγκεκριμένη διατριβή έγινε χρήση και των δύο τεχνικών ανάλυσης HR-NMR και HR-MAS NMR για τα φύλλα ελιάς σε τρείς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας CDCl₃, D₂O, MeOD (Σχήμα 6.1).



διαλύτες (CDCl₃, D₂O, MeOD) και σε συχνότητα 400 MHz.

Με τον άπολο διαλύτη CDCl₃ οι ενώσεις που ανιχνεύσαμε τόσο με την φασματοσκοπία HR-NMR όσο και με τη φασματοσκοπία HR-MAS NMR ήταν κυρίως τριτερπένια και τριγλυκερίδια. Τα τριτερπένια που ταυτοποίηθηκαν ήταν το ολεανολικό οξύ, το μασλινικό οξύ, η ερυθροδιόλη, η ουβαόλη και το ουρσολικό οξύ, ενώσεις που αποτελούν τα κύρια συστατικά του επιδερμικού κεριού των φύλλων. Η τριτερπενική σύσταση των φύλλων όπωςπροσδιορίστηκε με τη φασματοσκοπία HR-MAS NMR στην παρούσα εργασία συμφωνεί με αυτή που προέκυψε με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR στην υγρή φάση, τόσο με την παρούσα εργασία αλλά και σε σε σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

Με το διαλύτη ενδιάμεσης πολικότητας MeOD τα φάσματα που πήραμε με τις δύο μεθόδους παρουσιάζουν απόλυτη ταύτιση με μόνη διαφορά την μικρή απόκλιση των χημικών μετατοπίσεων για την κάθε ένωση, ενώ οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν πολυφαινόλες, τερπένια και σάκχαρα.

Τέλος με τον πολικό διαλύτη D₂O παρατηρήσαμε κάποιες διαφορές σχετικά με τις ενώσεις που ανιχνεύτηκαν με την τεχνική HR-NMR (υγρή φάση) και την τεχνική HR-MAS NMR (στερεή φάση), αλλά και σε αυτή την περίπτωση οι ενώσεις που ταυτοποιήσαμε και με τις δύο μεθόδους ήταν κυρίως σάκχαρα και αμινοξέα.

Τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία αποδεικνύουν ότι η φασματοσκοπία HR-MAS NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απευθείας ανάλυση των φύλλων της ελιάς χωρίς να απαιτείται κανένα στάδιο προετοιμασίας του δείγματος (απομόνωση – εκχύλιση, κλπ). Τα φάσματα 1D και 2D HR-MAS NMR των φύλλων ελιάς παρουσιάζουν υψηλή διακριτική ικανότητα και επιτρέπουν την ταυτοποίηση των κύριων συστατικών των φύλλων της ελιάς όπως οι πολυφαινολικές ενώσεις, τα σάκχαρα και τα τριτερπενοειδή.

Τέλος, στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε η δυνατότητα χρήσης της μεθόδου της απευθείας ανάλυσης των φύλλων της ελιάς με τη φασματοσκοπία HR-MAS NMR στη στερεή φάση για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της επίδρασης παραγόντων όπως η ποικιλία του ελαιόδενδρου και ο χρόνος συλλογής των φύλλων στην χημική σύσταση των φύλλων της ελιάς. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η φασματοσκοπία HR-MAS NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα ισχυρό εργαλείο για την μεταβολομική ανάλυση των φύλλων της ελιάς, αλλά και άλλων φυτών τα οποία παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην Χημεία Τροφίμων.

Βιβλιογραφία

¹EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) *European Food Safety Authority Journal*, 9 (4):2033.

²Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., Gallina Toschi, T. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 52, 7026-7032.

³Mannina, L., Calcagni, C., Rossi, E., Segre, A. L., (2003). Review about olive oil characterization using high-field nuclear magnetic resonance. Ann Chim, 93, 97-103.

⁴Hidalgo, F.J., and Zamora, R. (2003). Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives, *Trends in Food Science & Technology*, 14, 499-506.

⁵(<u>http://www.olivus.com</u>)

⁶Sakihama, Y., Cohena, M. F., Grace, S. C. and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80.

⁷Webb, G.A. (2008). (Ed.) *Modern Magnetic Resonance: Part 3, Applications in Material Science and Food Science*. Dordrecht:Springer.

⁸Bertocchi, F., and Paci, M. (2008). Applications of high-resolution solid-state NMR spectroscopy in food science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9317-9327.

⁹Alberti, E., Belton, P. S., and Gil, A. M. (2002). Applications of NMR to food science. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 47, 109-148.

¹⁰Spyros, A. and Dais, P. (2009). ³¹P NMR in food analysis. *Progress in NMR Spectroscopy*, 54, 195-207.

¹¹Spyros, A. and Dais, P. (2000). Application of ³¹P NMR spectroscopy in food analysis. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 802-805.

¹²Dais, P., Spyros, A. (2007) ³¹P NMR spectroscopy in the quality control and authentication of extra-virgin olive oil: A review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45, 367-377.

¹³Christophoridou, S., Dais, P., Tseng, L-H., and Spraul, M. (2005). Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn soli-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4667-4679.

¹⁴Christophoridou, S., Dais, P. (2009) Detection and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oil by High Resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Analytica Chimica Acta 633, 283-292.

¹⁵Perez-Trujillo, M., Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., and Parella, T. (2010). Separation and Identification of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil from *Olea europaea L*. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a New Diastereoisomer of the Aldehydic Form of Oleuropein Aglycone, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9129-9136.

¹⁶Wishart, D.S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 482-493.

¹⁷Gil, A.M. (2009). Metabonomics in Food Science. In: Lindon, J., Tranter, G., & Koppenaal D. (Eds), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, pp. 1513-1520, Academic Press, 2nd edition.

¹⁸Cevallos-Cevallos, J.M., Reyes-De-Corcuera, J.I., Etxeberria, E., Danyluk M.D. and Rodrick, G.E (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 557-566.

¹⁹Consonni, R. and Cagliani, L. R. (2010). Nuclear magnetic resonance and chemometrics to assess geographical origin and quality of traditional food products. *Advances in Food and Nutrition Research*, 59, 87-165.

²⁰Power W. P. (2010). High-Resolution Magic Angle Spinning-Enabling Applications of NMR Spectroscopy to Semi-Solid Phases, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 72, 111-156.

²¹Ni, Q. W. and Eads, T. M. (1992). Low-Speed Magic-Angle-Spinning Carbon-13 NMR of Fruit Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chem*istry, 40, 1507-1513.

²²Ni, Q. W. and Eads, T. M. (1993a). Liquid-phase composition of intact fruit tissue measured by high-resolution proton NMR. *Journal of Agricultural and Food Chem*istry, 41, 1026-1034.

²³ Ni, Q. W. and Eads, T. M. (1993b). Analysis by proton NMR of changes in liquidphase and solid-phase components during ripening of banana. *Journal of Agricultural and Food Chem*istry, 41, 1035-1040.

²⁴Gil, A.M., Duarte, I.F., Delgadillo, I., Colquhoyn, I.J., Casuscelli, F., Humpfer, E., and Spraul, M. (2000). Study of the Compositional Changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 1524-1536.

²⁵Miglietta, M. L. and Lamana, R. (2006). ¹H HR-MAS NMR of carotenoids in aqueous samples and raw vegetables. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44, 675-685.

²⁶Deshmukh, A. P., Simpson A. J., and Hatcher, P. G. (2003). Evidence for crosslinking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 64, 1163–1170.

²⁷Perez, E.M.S., Iglesias, M.J., Ortiz, F.L. Perez, I.S. and Galera, M.M. (2010). Study of the suitability of HR-MAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening, *Food Chemistry*, 122, 877-887

²⁸Costa P.M., Tavares M.I.B., Bathista A. L. B. S., Silva E.O. and Nogueira J. S. (2007). High Resolution NMR Study of Tropical Fruit Seed Starches. *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 973-977.

²⁹Shintu, L., Ziarelli, F., Caldarelli, S. (2004). Is high-resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples? Parmigiano Reggiano as a case study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42, 396–401.

³⁰Shintu, L., Caldarelli, S. (2006). Toward the determination of the geographical origin of emmental(er) cheese via high resolution MAS NMR: A preliminary investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4148-4154.

³¹Shintu, L., Caldarelli, S. (2005). High-resolution MAS NMR and chemometrics: Characterization of the ripening of parmigiano reggiano cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4026-4031.

³²Sacco, D., Brescia, M.A., Buccolieri, A., Jambrenghi, A.C. (2005). Geographical origin and breed discrimination of Apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determinations. *Meat Science*, 71, 542-548.

³³Brescia, M.A., Jambrenghi, A.C., Di Martino, V., Sacco, D., Giannico, F., Vonghia,
G., Sacco, A. (2002a). High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy

(NMR) studies on meat components: Potentialities and prospects. *Italian Journal of Animal Science*, 1, 151-158.

³⁴Shintu, L., Caldarelli, S., Franke, B.M. (2007). Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy. *Meat Science*, 76, 700-707.

³⁵Castejon, D., Villa, P., Calvo, M. M., Santa-Maria, G., Herraiz, M. and Herrera, A. (2010) ¹H-HR-MAS NMR study of smoked Atlantic salmon (Salmo salar), *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48, 693-703.

³⁶H.C.Betram, H. J.Jakobsen, and H.J.Andersen (2004). Combined High-Field 13C CP MAS NMR and Low-Field NMR Relaxation Measurements on Post Mortem Porcine Muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3159-3164.

³⁷Brescia, M.A., Di Martino, G., Fares, C., Di Fonzo, N., Platani, C., Ghelli, S., Reniero, F., Sacco, A. (2002b). Characterization of Italian durum wheat semolina by means of chemical analytical and spectroscopic determinations. *Cereal Chemistry*, 79, 238-242.

³⁸Sacco A., Bolsi I.N., Massini R., Spraul M., Humpfer E. and Ghelli S. (1998). Preliminary Investigation on the Characterization of Durum Wheat Flours Coming from Some Areas of South Italy by Means of 1H High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance.

³⁹Seefeldt, H. F., Larsen, F.H., Viereck, N., Wollenweber, B., and Engelsen, S.B. (2008). Bulk carbohydrate grain filling of barley beta-glucan mutants studied by H-1 HR MAS NMR, Cereal Chemistry, 85, 571-577.

⁴⁰Ritota, M., Marini, F., Sequi, P., and Valentini, M. (2010). Metabolomic Characterization of Italian Sweet Pepper (*Capsicum annum L.*) by Means of HR-MAS-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9675–9684.

⁴¹Gidley M. J. (1992). High-resolution solid-state NMR of food materials. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 231-236.

⁴²Valentini M., Ritota M., Cafiero C., Cozzolino S., Leita L. and Sequi P. (2011). The HRMAS–NMR tool in foodstuff characterization. Magn. Reson. Chem.49,121-125.

⁴³Gil A.M. and Duarte I.F. (2008). High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy of Fruits and Vegetables. Modern Magnetic Resonance, 1765–1768.

⁴⁴Bertocchi F. and Paci M. (2008). Applications of High-Resolution Solid-State NMR Spectroscopy in Food Science. *J. Agric. Food Chem*, 56, 9317-9327.

⁴⁵Macomber R.(1998). A complete introduction to Modern NMR spectroscopy. Wiley J. & Sons, Inc, 1, 378.

⁴⁶Power W. (2011). High-Resolution Magic Angle Spinnin-Enabling Applications of NMR Spectroscopy to Semi-Solid Phases. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 72, 111-155.

⁴⁷Bianchi G., Vlahov G., Anglani C. and Murelli C. (1993). Epicuticular wax of olive leaves. *Phytochemistry*, 32:1, 49-52.

⁴⁸Vlahov G., Rinaldi G., Del Re P., Giuliani A.A. (2008). 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the different components of epicuticular waxes of olive fruit (Olea europaea) Dritta cultivar. *Analytica Chimica Acta*, 624, 184-194.

⁴⁹Kurek A., <u>Nadkowska</u> P., <u>Pliszka</u> S. and <u>Wolska</u> KI. (2012). Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine*, 19(6), 515–519.

⁵⁰Zhang L., Cheng Y.X., Liu A.L., Wang H.-D., Wang Y.L. and Du G.H. (2010). Molecules, 15, 8507-8517.

⁵¹Liu <u>Jie (1995)</u>. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49(2), 57-58.

⁵²Somova <u>L.I., Shode F.O., Ramnanan P.</u> and Nadar <u>A.</u> (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 299-305.

⁵³Newman D.J. and Cragg G.M. (2007). J. Nat. Prod., 70, 461.

⁵⁴Sporn M.B., Liby K., Yore M.M., Suh N., Albini A., Honda T., Sundararajan C., Gribble G.W. (2007). *Drug Dev. Res*, 68, 174.

⁵⁵Deeb D., Gao X., Arbab A.S., Barton K., Dulchavsky S. A., and Gautam S. C. (2010). CDDO-Me: A Novel Synthetic Triterpenoid for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 2(4): 1779–1793.

⁵⁶ <u>http://www.hmdb.ca</u>, HMDB02364, accessed on Feb.25, 2012.

⁵⁷Voutquennea L., Guinota P., Thoisonb O., Sevenet T. and Lavauda C. (2003). Oleanolic glycosides from Pometia ridleyi. *Phytochemistry*, 64, 781–789. ⁵⁸Ishikawa T., dos Santos Donatini R., Diaz I.E.C., Yoshida M., Bacchi E. M. and Kato E.T.M. (2008). Evaluation of gastroprotective activity of Plinia edulis (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 527–529.

⁵⁹Seebacher W., Simic N., Weis R., Saf R. and Kunert O. (2003). Complete assignments of 1H and 13C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance In Chemistry*, **41**: 636–638.

⁶⁰Smati D., Longeon A. and Guyot M.E. (2004). 3B-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)erythrodiol, a cytotoxic constituent of Zygophyllum geslini collected in the Algerian Sahara. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 405–407.

⁶¹Duquesnou E., Castola V. and Casanova J. (2007). Triterpenes in the Hexane Extract of Leaves of Olea europaea L.: Analysis using 13C-NMR Spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 18, 347–353.

⁶²Misra L., and Laatsc H. (2000). Triterpenoids, essential oil and photo-oxidative 28-13-lactonization of oleanolic acid from Lantana camara. *Phytochemistry*, 54, 969-974.
⁶³Wang X.F., Lia C., Shia Y.P. and Dia Duo-Long (2009). Two new secoiridoid glycosides from the leaves of Olea europaea L. Journal of Asian Natural Products Research, 11(11), 940-944.

⁶⁴Guinda A., Rada M., Delgado T., Adanez P.G. and Castellano J.M. (2010). *J. Agric. Food Chem*, 58, 9685.

⁶⁵Kontogianni V. G., Exarchou V., Troganis A., Gerothanassis I. P. (2009). Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. *Analytica Chimica Acta*, 635, 188-195.

⁶⁶Duffus C.M, Duffus J.H. (1984). Carbohydrates:Structure,Location,Function.By Carbohydrate Metabolism in Plants, *Longman House:Burnt Mill, Harlow Essex, UK*.

⁶⁷Stoop J.M.H., Williamson J.D. and Pharr D.M. (1996). *Trends Plant Science*, 1, 139.

⁶⁸Flora L.L. and Mandore M.A. (1993). *Planta*, 189, 484.

⁶⁹Tattini M., Gucci R., Baldi A., Romani A. and Everard J.D. (1996). *Plant physiology*, 98, 117.

⁷⁰Bongi G., and Palliotti A. (1994). Olive. In: Handbook of environmental physiology of fruit crops. Temperature Crops. Vol. I Pp 165-187.
⁷¹Hussain T.M., Chandrasekhar T., Hazara M., Sultan Z., Saleh B.K., and Gopal G.R.
(2008). Recent advances in salt stress biology – a review. *Biotechnol. Mol. Biol.* 3:
8-13.

⁷²Loumou A., and Giourga C., (2003). Olive groves, the life and identify of the Mediterranean. *Agric. Hum. Val.* 20: 87–95.

⁷³Angelopoulos K., Dichio B. and Xiloyannis C. (1996). Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *J. Exp. Bot.* 47: 1093–1100.

⁷⁴ Drossopoulos, J.B. and Niavis, C.A. (1988). Seasonal changes of the metabolites in the leaves, bark and xylem tissues of olive tree (*Olea europaea* L). II. Carbohydrates. *Ann. Bot.* 62: 321–327.

⁷⁵Romani A., Baldi A., Tattini M. and Vincieri F.F. (1994). *Chromatographia* 39, 35.
 ⁷⁶ Fan T.W.-M., and Lane A. N. (2008). Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 52, 69–117.

⁷⁷Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J. A, Silva A.MS, Renard C. MGC and Coimbra M. A. (2006). Identification of oleuropein oligomers in olive pulp and pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**:1495–1502.

⁷⁸Fan Tereza W.-M. (1996). Metabolite profiling by one and two dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28, 161-219.

⁷⁹Hasegawa PM., Bressan RA., Zhu JK. and Bohnert HJ. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu.Rev Plant Physiol Mol Biol*, 51, 463-499.

⁸⁰Smirnoff N. and Quinton JC. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1061-1067.

⁸¹Smirnoff N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol* 9, 214-219.

⁸²Hoekstra FA. and Golovina EA. (1999). Membrane behaviour during dehydration: implication for desiccation tolerance. *Russ J Plant Physiol*, 46, 295–306.

⁸³Chatterton NJ., Harrison PA., Thornley WR., Bennett. (1990). Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. *Plant Physiol Biochem*, 28, 167–72. ⁸⁴Bachmann M., Inan C., Keller F. (1995). Raffinose oligosaccharide storage carbon partitioning and source–sink interaction in plants. In: Madore M, Lukas WJ, editors. Carbon partitioning and source–sink interactions in plants. *American Society of Plant Physiologists*, 215–25.

⁸⁵Gucci R., Lombardini L. and Tattini M. (1997). Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (Olea europaea) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol*, 17, 13–21.

⁸⁶Gucci R., Moing A., Gravano E. and Gadillere JP. (1998). Partitioning of photosynthetic carbohydrates in leaves of saltstressed olive plants. *J Plant Physiol*, 25, 571–9.

⁸⁷Keller F. and Ludlow MM. (1993). Carbohydrate-metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (Cajanus cajan). *J Exp Bot*, 44, 1351–9.

⁸⁸Gilbert GA., Wilson C. and Madore MA. (1997). Root-zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in Coleus. *Plant Physiol*, 115, 1267–76.

⁸⁹Gutierrez G.Q., Janer del Valle R. C., Janer del Valle C., Gurierrez Rosales M.L., Vazquez Roncero F.A. (1977). Relationship between polyphenol content and the quality and stability of virgin olive oil. *Grasas Aceites*, *28*, 101-106.

⁹⁰Tsimidou M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food Sci.*, *10*, 99-116.

⁹¹Owen R.W., Giacosa A., Hull W. E., Haubner R., Wurtele G., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000). Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *Lancet Oncol*, 1, 107-112.

⁹²Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer*, 36, 1235-1247.

⁹³Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000). Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinical Chemistry*, 46:7, 976–988.

⁹⁴Servili M. and Montedoro G.F. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 104, 602–613.

⁹⁵Sobolev A.P., Brosio E., Gianferri R. and Segre A. L. (2005). Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magn. Reson. Chem*, 43, 625–638.

⁹⁶Gering B. and Wichtl M. (1987). Phytochemical investigations on penstemon hzrsutus. *Journal of Natural Products*, 50:6, 1048-1054.

⁹⁷Shaoping F., Roman D.A., Carretero A.S., Menéndez J.A., Gutiérrez M. P.M., Micol V. and Gutiérrez A. F. (2010). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Anal. Bioanal. Chem*, 397, 643–654.

⁹⁸Obied H. K., Bedgood Jr D.R., Prenzler P. D. and Robards K. (2007). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 603, 176–189.

⁹⁹Cardoso S.M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J.A., Silva A.MS, Renard C.MGC and Coimbra M.A (2006). *J Sci Food Agric*, 86, 1495–1502.

¹⁰⁰ Panizzi L., Scarpati M. L. and Gazz G., (1960) . Chim . Ital . 90,1449.

¹⁰¹Le Tutour B. and Guedon D. (1992). *Phytochemistry*, 31, 1173.

¹⁰² Andrews P., Busch J.L.H.C., Joode T.D., Groenewegen A. and Alexandre H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside agglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric.Food Chem.* 51, 1415–1420.

¹⁰³Soler-Rivas C., Espin J.C., Wichers H.J. (2000). Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric*, 80, 1013–1023.

¹⁰⁴Gutierez F., Jimerez B., Ruiz A., Albi M.A. (1999). 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*, 47, 121-127.

¹⁰⁵Esti M., Cinquanta L. and La Notte E. (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem*, 46, 32-35.

¹⁰⁶Giovacchino Di (1997). From olive harvesting to virgin olive oil production. *OCL*, 4, 5, 359-362.

¹⁰⁷ Visioli F., Poli A. and Galli C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*, 22, 65-75.

¹⁰⁸Visioli F., Bellosta S., Galli C. (1998). Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci*, 62, 541-546.

¹⁰⁹Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M. (2005). The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 18, 98-112.

¹¹⁰Katsiki M., Chondrogianni N., Chinou I., Rivett AJ. and Gonos ES. (2007). The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res*, 10, 157-172.

¹¹¹Fredrickson WR. F., and Inc. S. Group (2000). Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves.*U.S. Patent*, 6:117, 884.

¹¹²Ancora C., Roma C. and Vettor M. (2004). Evaluation of cosmetic efficacy of oleuropein. Symposium on the New Frontiers of Dermo-cosmetology: Efficacy, Stability and Safety. Rome, Italy, November 4-6.

¹¹³Scalzo Lo R., Scarpati M.L., Verzengnassi B. and Vita G., (1994). Olea europaea chemical repellent to Dacus oleae females. *J. Chem. Ecol*, 20, 1813-1823.

¹¹⁴ Uccella N. (2001). Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytolexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Sci.Technol*, 11, 315-327.

¹¹⁵ Marsilio V., Campestre C. and Lanza B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing, *Food Chem.*, 74, 55-60.

Παράρτημα



Σχήμα Π1: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H,¹H gCOSY των φύλλων ελιάς της ποικιλίας Χονδρολιά σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π2: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H,¹H gCOSY των φύλλων ελιάς το μήνα Ιούλιο σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



 $\Sigma_{\chi \eta \mu \alpha}$ Π3: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H, ¹³C gHSQC των φύλλων ελιάς για το μήνα Ιούλιο σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π4: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης 1 H, ¹H gCOSY των φύλλων ελιάς το μήνα Μάιο σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π5: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C gHSQC των φύλλων ελιάς για το μήνα Μάιο σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π6: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H,¹H gCOSY των φύλλων ελιάς το μήνα Σεπτέμβριο σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π7: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης ¹H, ¹³C gHSQC των φύλλων ελιάς για το μήνα Σεπτέμβριο σε διαλύτη CDCl₃ και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π8: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ομοπυρηνικής συσχέτισης ¹H, ¹H gCOSY των φύλλων ελιάς το μήνα Μάρτιο σε διαλύτη D_2O και σε συχνότητα 400 MHz.



Σχήμα Π9: Δισδιάστατο φάσμα HR-MAS ετεροπυρηνικής συσχέτισης 1 H, 13 C gHMBC των φύλλων ελιάς σε διαλύτη MEOD και σε συχνότητα 400 MHz.