

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΡΩΤΟΤΥΠΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Ι.Π. Γεροθανάσης<sup>1</sup>, Π. Χαρισιάδης<sup>1</sup>, Α. Πριμικήρη<sup>1</sup>, Β. Κοντογιάννη<sup>1</sup>, Κ. Τσιαφούλης<sup>2</sup>, Β. Εξάρχου<sup>2</sup> & Α. Τζάκος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας & Βιοχημείας, Πανεπιστημιούπολη, 45110 Ιωάννινα

<sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Κέντρο NMR, Πανεπιστημιούπολη, 45110, Ιωάννινα

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία συνοψίζεται η συμβολή της ερευνητικής μας ομάδας στην ανάλυση φυτοχημικών ενώσεων σε πολύπλοκα εκχυλίσματα φυτικών προϊόντων, χωρίς τον προηγούμενο διαχωρισμό τους, με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR. Οι μεθοδολογίες 1D και 2D NMR που χρησιμοποιήθηκαν βασίζονται στη μελέτη διακριτών χημικών μετατοπίσεων και συστημάτων spin προτύπων φυτοχημικών ενώσεων (φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών, τερπενοειδών) καθώς και μιγμάτων αυτών, με σκοπό τη διερεύνηση χαρακτηριστικών σημάτων συντονισμού διαγνωστικής σημασίας. Η παραπάνω διαδικασία επεκτάθηκε σε εκχυλίσματα φυτών και αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες-πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό φαινολικών οξέων και τριτερπενοειδών (Gerothanassis et al., 1998; Exarchou et al., 2001; Kontogianni et al., 2009). Ακολούθησε ο προσδιορισμός φλαβονοειδών που βασίστηκε στις εξαιρετικά αποπροστατευμένες κορυφές συντονισμού στην περιοχή από 11 έως 14 ppm, που αποδίδονται στα υδροξυλικά πρωτόνια OH(5), τα οποία συμμετέχουν σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου (Exarchou et al., 2002; Tatsis et al., 2008). Με τη χρήση DMSO-*d*<sub>6</sub> ως διαλύτη και με προσθήκη πικρικού οξέος επιτεύχθηκαν κορυφές απορρόφησης με εύρος μικρότερο των 2 Hz. Οι οξείες κορυφές των υδροξυλικών πρωτονίων σε συνδυασμό με τη χρήση της ετεροπυρηνικής δισδιάστατης φασματοσκοπίας (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) επέτρεψαν τη σαφή ανάλυση της δομής φυτοχημικών σε πολύπλοκα φυσικά εκχυλίσματα (Charisiadis et al., 2010; 2011). Επιπλέον, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR-<sup>1</sup>H που βασίζεται στις απορροφήσεις-ολοκληρώματα των υδροξυλικών πρωτονίων (Nerantzaki et al., 2011).

**Λέξεις κλειδιά:** ελαιουρωπαΐνη, πικρικό οξύ, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, χημικές μετατοπίσεις, σταθερές σύζευξης, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR

## Εισαγωγή

Τα φυσικά προϊόντα είναι ανεξάντλητη πηγή βιοενεργών συστατικών που αποκτούν ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση τους στη θεραπευτική και τη βιοτεχνολογία. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι περίπου το 50 % των φαρμάκων κατά του καρκίνου είναι είτε φυτικά προϊόντα είτε προέρχονται άμεσα από αυτά (Kingston, 2011). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται στροφή της επιστημονικής κοινότητας στην αναζήτηση φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοενεργές ενώσεις για την πρόληψη ή/και καταπολέμηση μεγάλου αριθμού ασθενειών. Η αναζήτηση συστατικών με ποικίλες δράσεις σε φυσικά προϊόντα, όμως, είναι μια εξαιρετικά δύσκολη και επίπονη διαδικασία εξαιτίας της πολυπλοκότητάς τους.

Ανάμεσα στις πιο σημαντικές λειτουργικές ομάδες όσον αφορά στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες φυσικών προϊόντων είναι τα φαινολικά υδροξυλικά (-OH). Είναι, επίσης γεγονός ότι η πλειονότητα των βιοενεργών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από φυσικά προϊόντα και εμφανίζουν φαρμακευτική χρήση, φέρουν χαρακτηριστικές ομάδες -OH, και ειδικότερα υδροξυλομάδες φαινολικού τύπου. Στην παρούσα εργασία συνοψίζονται μεθοδολογίες 1D και 2D NMR στην ανάλυση τερπενοειδών, φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών και παραγώγων τους, καθώς και ελαιουρωπαΐνης και παραγώγων της σε πολύπλοκα εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων χωρίς προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό.

## Υλικά και Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε φυτικό υλικό που ανήκει στις οικογέ-

νιες *Lamiaceae* και *Oleaceae*. Τα εκχυλίσματα των φυτών προέκυψαν κυρίως από εκχύλισή τους με πολικούς διαλύτες, προκειμένου να παραληφθούν τα περισσότερα πολικά συστατικά.

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

## Αποτελέσματα - Συζήτηση

Γενικά, στη φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H οι απορροφήσεις συντονισμού των φαινολικών υδροξυλικών πρωτονίων εμφανίζονται εξαιρετικά διευρυμένες στη θερμοκρασία δωματίου, ιδιαίτερα όταν το φάσμα ληφθεί σε πρωτικό διαλύτη (Sanders & Hunter, 1993; Englander & Kallenbach, 1984). Αυτό οφείλεται στην ευκίνηση των υδροξυλικών πρωτονίων και στη γρήγορη ανταλλαγή τους με πρωτόνια πρωτικών διαλυτών ή με ίχνη ύδατος σε μη πρωτικούς διαλύτες. Εντούτοις, με τη λήψη φάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνεται η ταχύτητα ανταλλαγής των υδροξυλικών πρωτονίων και οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται οξείες.

Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας μείωσης της ταχύτητας ανταλλαγής πρωτονίων των ευκίνητων ομάδων -OH και τη λήψη φασμάτων NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας οδηγήθηκαμε στη μελέτη διαφό-

ρων οξέων για την οξίνιση του DMSO-*d*<sub>6</sub>. Η συγκριτική μελέτη υποδεικνύει ότι το πικρικό οξύ παρουσιάζει πλεονεκτήματα για τη διάκριση των απορροφήσεων –OH σε σχέση με τα υπόλοιπα οξέα. Με τη χρήση του πικρικού οξέος ελήφθησαν απορροφήσεις ομάδων –OH με εύρη απορροφήσεων από 0.6 έως 1.5 Hz, σε σύγκριση με εύρη απορροφήσεων 3 έως 6 Hz που λήφθηκαν με τη χρήση του υδροχλωρικού οξέος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το πικρικό οξύ παρουσιάζει επιπλέον το πλεονέκτημα ότι ως στερεό είναι πιο εύκολο στη χρήση σε σύγκριση π.χ. με το τριφθοροοξικό οξύ που είναι υγρό και ιδιαίτερα πηκτικό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητικών εργασιών, το πρωτόκολλο ανάλυσης φυτικών εκχυλισμάτων, περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1) Καταγραφή φάσματος NMR-<sup>1</sup>H μιας διάστασης (1D) εκχυλίσματος και επιλογή περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH (8 - 14 ppm).

2) Προσθήκη πικρικού οξέος εντός του δείγματος NMR για την επίτευξη του ελαχίστου του εύρους απορρόφησης των ομάδων –OH, το οποίο αντιστοιχεί στο ελά-

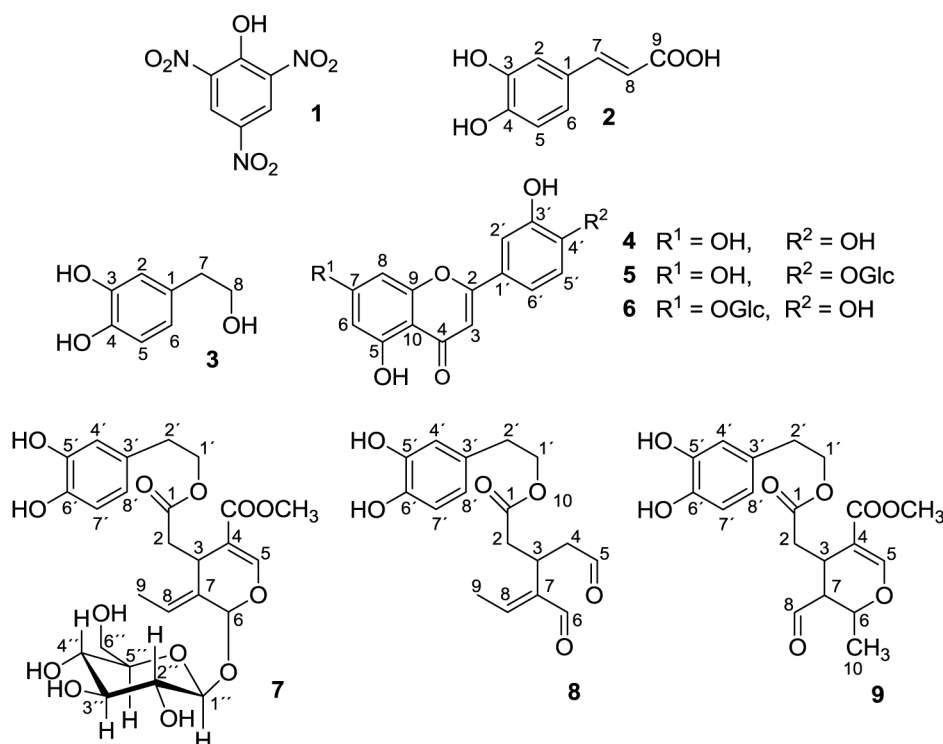
χιστο της ταχύτητας ανταλλαγής αυτών.

3) Καθορισμός του βέλτιστου συνδυασμού θερμοκρασίας λήψης φάσματος και βέλτιστης συγκέντρωσης εκχυλίσματος μέσω σειράς φασμάτων 1D NMR-<sup>1</sup>H για την περαιτέρω ελάττωση του εύρους απορρόφησης των ομάδων –OH.

4) Λήψη φάσματος <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC υπό τις βέλτιστες συνθήκες.

5) Λήψη φάσματος <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, υπό τις βέλτιστες συνθήκες, για σταθερές σύζευξης <sup>1</sup>J<sub>HC</sub> στην περιοχή τιμών 6 με 10 Hz, και για τις ασθενείς σταθερές σύζευξης <sup>5</sup>J<sub>HC</sub> στην περιοχή τιμών ≤ των 2.5 Hz.

Το παραπάνω πρωτόκολλο εργασίας εφαρμόστηκε στο μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς με ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα δύο αυτά εκχυλίσματα παρουσιάζουν παρόμοια σύσταση (Goulas κ.ά., 2009; Charisiadis κ.ά., 2011) και διαφοροποιούνται κυρίως ως προς την παρουσία διαφορετικών αλδεϋδικών μορφών της ελαιουρωπαϊίνης. Στα Σχήματα 2 και 3, αναλύεται η εφαρμογή του πρωτοκόλλου στο μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς.

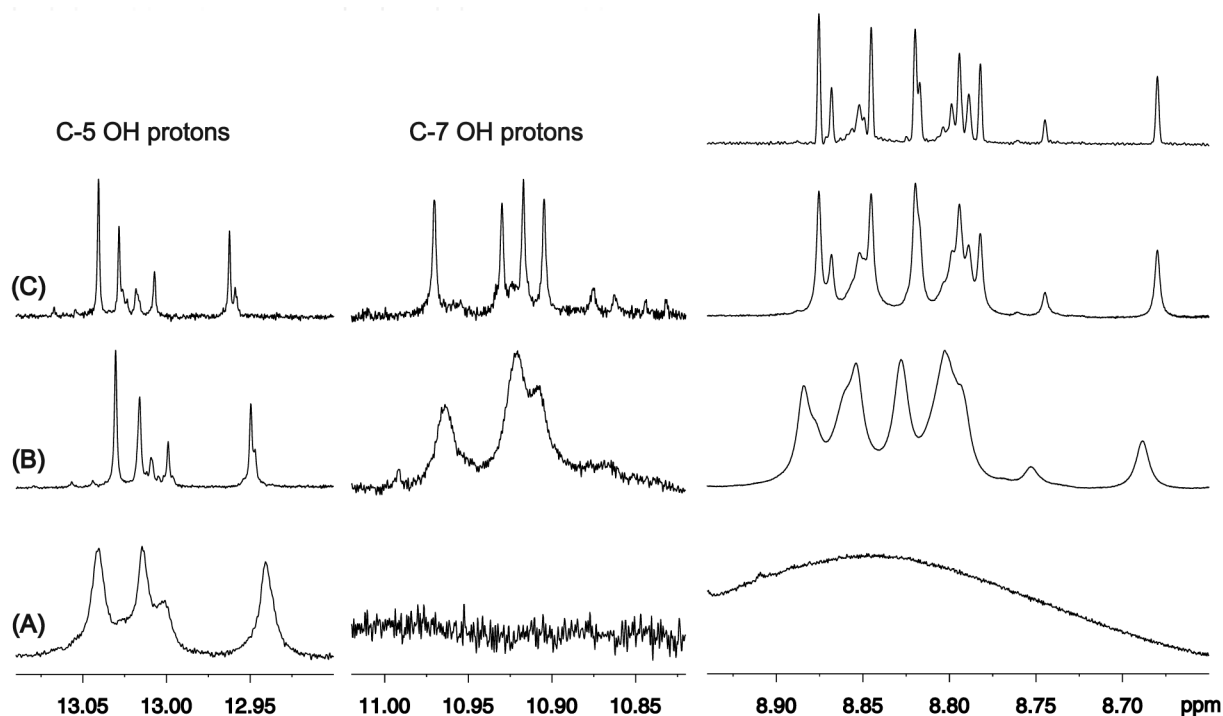


**Σχήμα 1:** Συντακτικοί τύποι ενώσεων που απαντώνται στο μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα φύλλων ελιάς (Charisiadis et al., 2011).

Στο Σχήμα 2 απεικονίζονται επιλεγμένες περιοχές φάσματος NMR-<sup>1</sup>H μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε διαλύτη DMSO-*d*<sub>6</sub>. Ιδιαίτερα διευρυμένες απορροφήσεις εντοπίζονται στην περιοχή πάνω από τα 12.5 ppm με εύρη απορροφήσεων μεταξύ 10.0 - 5.0 Hz. Οι απορροφήσεις αυτές αποδίδονται στα πρωτόνια των ομάδων OH(5) των φλαβονοειδών που συμμετέχουν σε ισχυρό ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο C-4. Στην περιοχή απορρόφησης των πρωτονίων των ομάδων OH(7) (10.5 - 11.5 ppm) δεν παρατηρούνται απορροφήσεις. Στην περιοχή των 8.0 - 9.0 ppm παρατηρείται μία ισχυρή και ευρεία απορρόφηση ( $\Delta\nu_{1/2} \approx 250$  Hz) στην οποία αποδίδονται οι απορροφήσεις των ομάδων –OH των ενώσεων των κύριων συστατικών του εκχυλίσματος (ελαιοευρωπαϊίνης, υδροξυτυροσόλης και παραγώγων αυτών). Προσθήκη πικρικού οξέος στο παραπάνω δείγμα (Σχήμα 2B) και περαιτέρω εφαρμογή της συνδυαστικής μεθόδου

αραίωσης των διαλυμάτων και χρήση της ελάχιστης δυνατής θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη φάσματος υψηλής διακριτικής ικανότητας για όλες τις απορροφήσεις των ομάδων –OH (Σχήμα 2C).

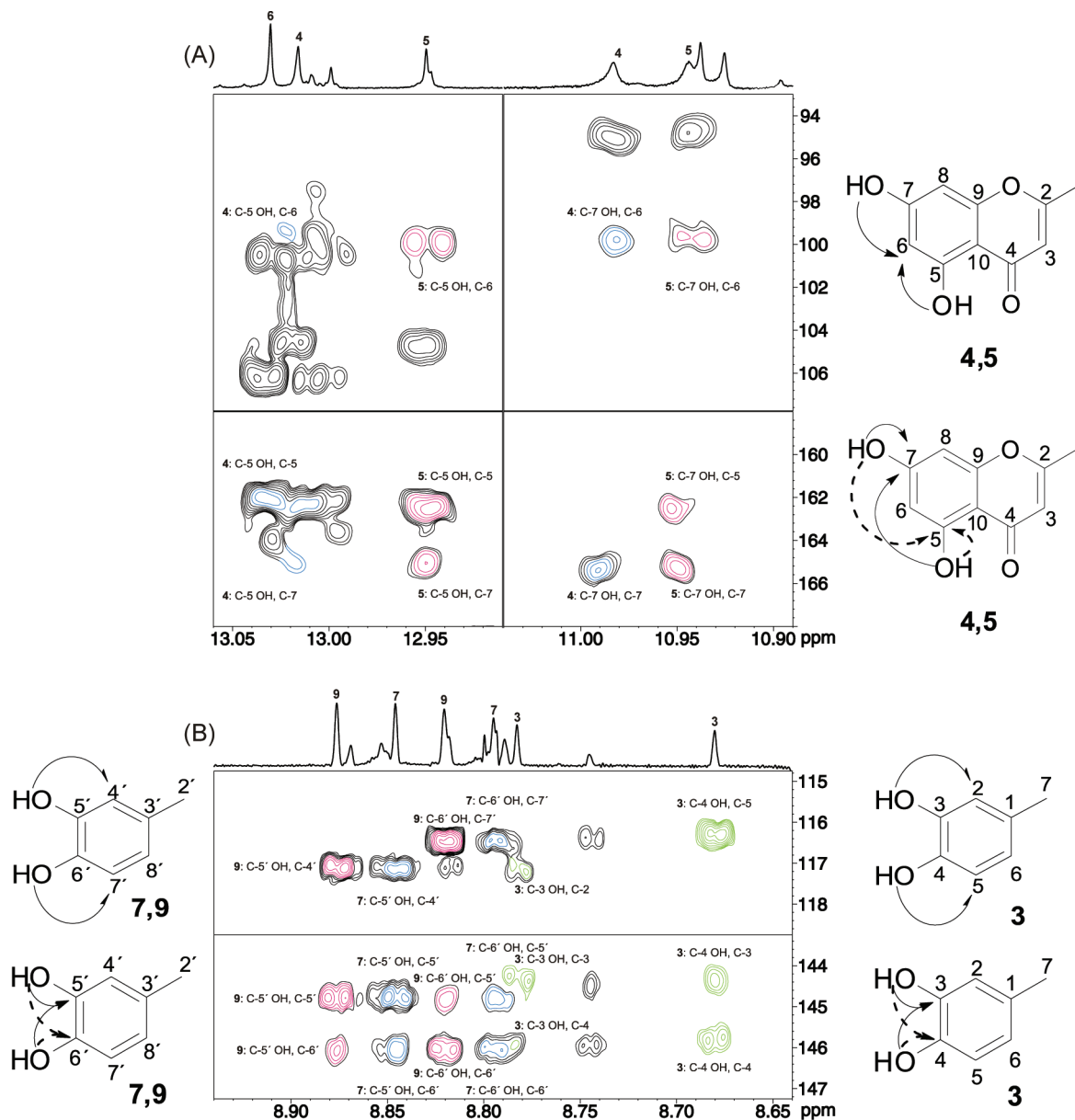
Συγκεκριμένα στην περιοχή απορρόφησης των ομάδων OH(5) παρατηρούνται τρεις κύριες κορυφές στα 13.03 ppm ( $\Delta\nu_{1/2} \approx 0.7$  Hz), 13.02 ppm ( $\Delta\nu_{1/2} \approx 0.7$  Hz) και στα 12.95 ppm ( $\Delta\nu_{1/2} \approx 0.6$  Hz), καθώς επίσης και μερικές μικρής έντασης απορροφήσεις. Στην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



**Σχήμα 2:** Επιλεγμένες περιοχές φάσματος 500 MHz 1D NMR- $^1\text{H}$  20 mg μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε 0.6 mL διαλύτη  $\text{DMSO-}d_6$  ( $T=288\text{K}$ ): (A) χωρίς την προσθήκη πικρικού οξέος, (B) με προσθήκη πικρικού οξέος με λόγο μαζών  $[\text{PA}]/[\text{εκχύλισμα}] = 49.3 \times 10^{-3}$  και (C) το ίδιο διάλυμα όπως στο (A) με αραιώση κατά ένα παράγοντα 4 και λόγο μαζών  $[\text{PA}]/[\text{εκχύλισμα}] = 49.4 \times 10^{-3}$  (Charisiadis κ.ά., 2011).

Με εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR (Σχήμα 3) προέκυψε σημαντικός αριθμός κορυφών διασταύρωσης  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  των C-5 και C-7 OH πρωτονίων τα οποία επέτρεψαν την ταυτοποίηση των ενώσεων **4** - **6** (Σχήμα 1). Οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6 (99.92 ppm), C-5 (162.55 ppm), και C-7 (165.05 ppm) της ένωσης λουτεολίνη-4'-O-γλυκοζίτη (**5**), και οι κοινές κορυφές διασταύρωσης των C-5 και C-7 OH πρωτονίων με τους άνθρακες C-6 (99.42 ppm), C-5 (162.50 ppm) και C-7 (165.01 ppm) της λουτεολίνης (**4**) είναι ιδιαίτερης διαγνωστικής σημασίας.

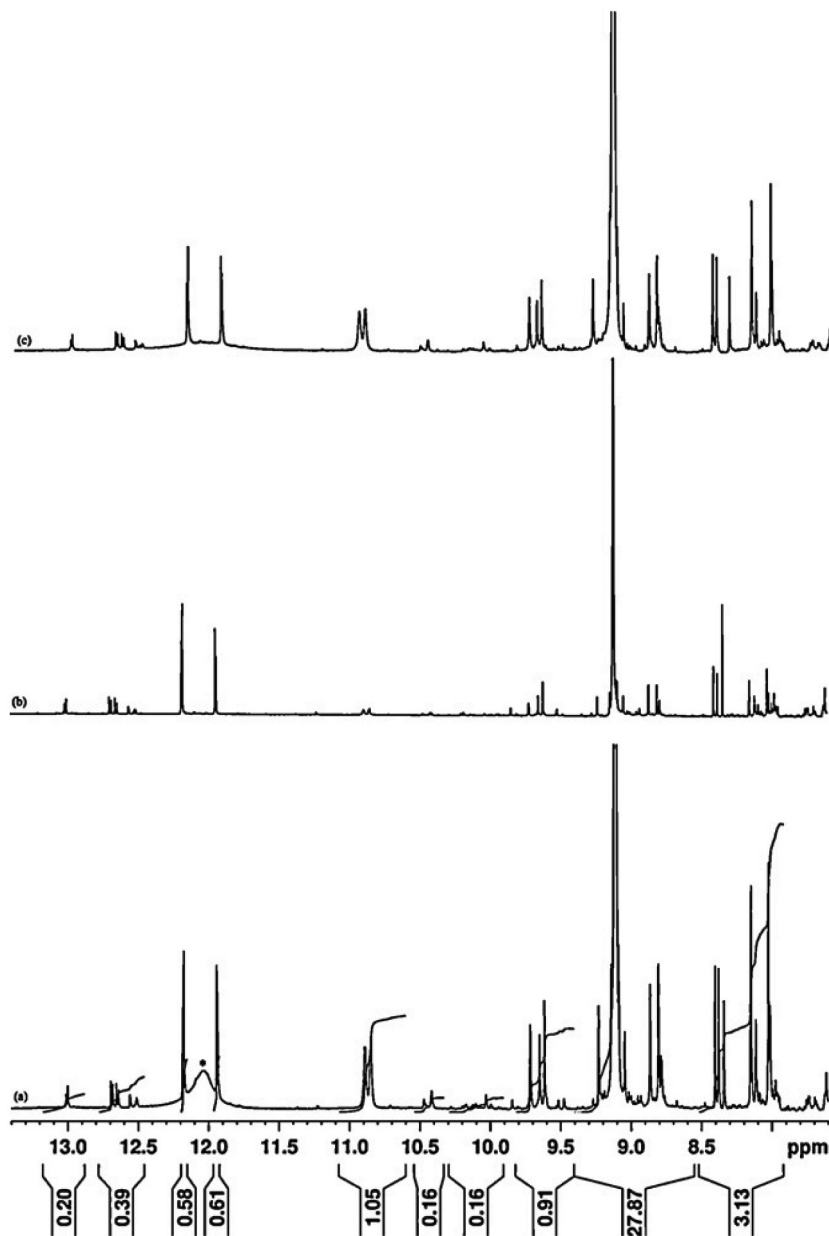
Με την προσθήκη πικρικού οξέος στο παραπάνω δείγμα (Σχήμα 2B) και περαιτέρω χρήση αραιωμένων διαλυμάτων (Σχήμα 2C) προέκυψε φάσμα υψηλής διακριτικής ικανότητας για όλες τις απορροφήσεις των ομάδων -OH της ελαιοευρωπαϊνης, της υδροξυτυροσόλης και παραγώγων αυτών, στην περιοχή 8.6 - 8.9 ppm. Με εφαρμογή της δισδιάστατης φασματοσκοπίας 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC και  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR (Σχήμα 3) προέκυψε σημαντικός αριθμός κορυφών διασταύρωσης των ομάδων -OH, που επέτρεψε την πλήρη ταυτοποίηση του ανθρακικού σκελετού των ενώσεων **3**, **7** και **9** (Σχήμα 1).



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

Οι απορροφήσεις στα 8.66 και 8.77 ppm αποδίδονται στα C-6' και C-5' OH πρωτόνια της υδροξυευροσόλης (3), αντίστοιχα, εφόσον οι κορυφές διασταύρωσης με τους άνθρακες στα 116.28, 144.37, και 145.83 ppm και 117.22, 144.37, και 145.83 ppm, αντίστοιχα, ταυτίζονται με τις κορυφές της πρότυπης ένωσης. Επιπροσθέτως τα C-6' και C-5' OH πρωτόνια εμφανίζουν κοινές κορυφές διασταύρω-

σης με τους άνθρακες C-6' και C-5' στα 144.37 και 145.83 ppm, αντίστοιχα, οι οποίες είναι ιδιαίτερης διαγνωστικής σημασίας για την μεταξύ τους διάταξη σε θέση *ortho* (Σχήμα 3B). Παρόμοια, οι απορροφήσεις στα 8.80 και 8.85 ppm και αυτές στα 8.82 και 8.88 ppm, αποδίδονται στα C-6' και C-5' OH πρωτόνια της ελαιουερωπαΐνης (7) και της αλδεϋδικής μορφής της ελαιουερωπαΐνης (9), αντίστοιχα.



**Σχήμα 4:** Επιλεγμένη περιοχή φάσματος 500 MHz 1D NMR-<sup>1</sup>H της περιοχής απορρόφησης των ομάδων –OH και –COOH ακετονικού εκχυλίσματος ρίγανης σε διαλύτη DMSO-*d*<sub>6</sub> (T=295K, ns=1024, *t*<sub>expt</sub>=2h): (a) χωρίς ακτινοβολία, (b) με ακτινοβολία του σήματος συντονισμού του νερού, (c) μετά την προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> (*C*<sub>extract</sub>/*C*<sub>NaHCO<sub>3</sub></sub> = 100). Ο αστερίσκος υποδεικνύει την απορρόφηση των πρωτονίων των καρβοξυλικών ομάδων –COOH (Nerantzaki κ.ά., 2011).

Επίσης αναπτύχθηκε μεθοδολογία προσδιορισμού ολικών φαινολικών που εφαρμόστηκε σε φυτικά εκχυλίσματα ρίγανης, με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR-<sup>1</sup>H μιας διάστασης. Ο προσδιορισμός πραγματοποιείται σε 3 στάδια: (i) λήψη φάσματος NMR-<sup>1</sup>H μιας διάστασης σε διαλύτη DMSO-*d*<sub>6</sub>. (ii) Ακολουθεί λήψη φάσματος NMR-<sup>1</sup>H μιας διάστασης με ακτινοβολία του σήματος συντονισμού του νερού το οποίο προκαλεί μείωση στα σήματα συντονισμού των φαινολικών –OH ομάδων (με αυτό τον τρόπο ξεχωρίζουν τα σήματα συντονισμού των φαινολικών –OH ομάδων από αυτά άλλων πρωτονίων π.χ αλδεϋδικών). (iii) Λήψη φάσματος NMR-<sup>1</sup>H μιας διάστασης με σταδιακή προσθήκη αυξανόμενης ποσότητας υδατικού

διαλύματος NaHCO<sub>3</sub>, με αποτέλεσμα την εξαφάνιση του σήματος συντονισμού στα 12 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο του καρβοξυλίου (με αυτό τον τρόπο ξεχωρίζουν τα σήματα συντονισμού των φαινολικών –OH ομάδων από αυτά των καρβοξυλικών). Ολοκλήρωση των σημάτων συντονισμού, ως προς το εσωτερικό πρότυπο TSP-*d*<sub>4</sub>, στην περιοχή 8 - 14 ppm στο φάσμα του σταδίου (i) επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των ολικών φαινολών. Η προτεινόμενη μεθοδολογία υπερτερεί έναντι της χρωματομετρικής δοκιμής με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (F-C) και αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο προσδιορισμού ολικών φαινολών σε άγνωστα εκχυλίσματα, τρόφιμα αλλά και σε βιολογικά δείγματα.

## Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία έγινε επισκόπηση ανάπτυξης και εφαρμογής μεθοδολογιών φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για την ταυτοποίηση ενώσεων σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα χωρίς τον προηγούμενο χρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται ως ακολούθως:

- (1) Ανάπτυξη ενός πειραματικού πρωτοκόλλου εργασίας για την εκλέπτυνση των απορροφήσεων NMR-<sup>1</sup>H φαινολικών ομάδων –OH σε πολύπλοκα εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων με τη συνδυαστική χρήση DMSO-*d*<sub>6</sub> ως διαλύτη, πικρικού οξέος, αραιωμένων διαλυμάτων και θερμοκρασίας πλησίον του σημείου πήξεως του διαλύματος.
- (2) Εφαρμογή δισδιάστατης τεχνικής NMR <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC για την πλήρη ταυτοποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών σε εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων, χωρίς τη χρήση πολύπλοκων και χρονοβόρων χρωματογραφικών τεχνικών απομόνωσης κάθε συστατικού χωριστά.
- (3) Ταξινόμηση των απορροφήσεων των ομάδων –OH

στην κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων με βάση τη δομή των ενώσεων και τη φύση των υποκαταστατών. Βασικό πλεονέκτημα των απορροφήσεων των ομάδων –OH αποτελεί η μεγάλη κλίμακα χημικών μετατοπίσεων (8 - 15 ppm), η εξαιρετική ευαισθησία σε υποκαταστάσεις ακόμη και σε απόσταση δώδεκα δεσμών και ο μικρός βαθμός αλληλεπικάλυψης των κορυφών –OH σε σχέση με την περιοχή των αλειφατικών και αρωματικών πρωτονίων.

- (4) Η επιλογή τόσο του διαλύτη όσο και της θερμοκρασίας επηρεάζουν σημαντικά την ισορροπία των διαφόρων αλδεϋδικών μορφών της ελαιοευρωπαϊνης, η ταυτοποίηση των οποίων μπορεί να επιτευχθεί σε πολύπλοκα εκχυλίσματα χωρίς τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων.
- (5) Οι απορροφήσεις των ομάδων –OH και οι λαμβανόμενες κορυφές διασταύρωσης φασμάτων 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την αυτοματοποιημένη, μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων, ανάλυση πολύπλοκων εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων. Περαιτέρω εφαρμογή της μεθοδολογίας θα μπορούσε να αποτελέσει και η μεταβολομική (metabolomics).

## Ευχαριστίες

Το ερευνητικό έργο συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II» το οποίο εντάσσεται στο Ε.Π. Ε.Δ.Β.Μ του Υπουργείου Παιδείας Διά Βίου Μάθησης και Θρησκευμάτων. Ευχαριστίες απευθύνονται στο Ελληνικό Κοινωνικό Πλαίσιο Στήριξης III, Περιφερειακό Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Ηπείρου 2000-2006 (MIS 91629), για τη χρηματοδότηση της αγοράς του οργάνου LC-NMR cryo, καθώς και στο Ίδρυμα Ιωσήφ και Εσθήρ Γκανή για τη μερική χρηματοδότηση.

## Βιβλιογραφία

- Charisiadis, P., Exarchou, V., Troganis, A.N. and Gerothanassis, I.P. 2010. Exploring the “forgotten” –OH NMR spectral region in natural products. *Chem. Commun.* 46:3589-3591.
- Charisiadis, P., Primikyri, A., Exarchou, V., Tzakos, A. and Gerothanassis, I.P. 2011. Unprecedented ultra-high-resolution hydroxy group <sup>1</sup>H NMR spectroscopic analysis of plant extracts. *J. Nat. Prod.* 74:2462-2466.
- Englander, S.W. and Kallenbach, N.R. 1984. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Quart. Rev. Biophys.* 16:521-655.
- Exarchou, V., Troganis, A., Ioannis P. Gerothanassis, I.P., Tsimidou, M. and Boskou, D. 2001. Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *J. Agric Food Chem.* 49:2-8.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I. P., Troganis, A. and Boskou, D. 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agric. Food Chem.* 50:5294-5299.
- Gerothanassis, I.P., Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M. and Boskou, D. 1998. Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to methanolic extracts of two oregano species. *J. Agric. Food Chem.* 46:4185-4192.
- Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A., Psomiadou, E., Briassoulis, E., Fotsis, T. and Gerothanassis, I.P. 2009. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 53:600-608.
- Kingston, D.I. 2011. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.* 74: 496-511.
- Kontogianni, V.G., Exarchou, V., Troganis, A. and 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. *Anal. Chim. Acta* 635:188-195.
- Nerantzaki, A.A., Tsiafoulis, C.G., Charisiadis, P., Kontogianni, V.G. and Gerothanassis, I.P. 2011. Novel determination of the total phenolic content in crude plant extracts by the use of <sup>1</sup>H NMR of the –OH spectral region. *Anal. Chim. Acta* 688:54-60.
- Sanders J.M.K. and Hunter B.K. 1993. *Modern NMR spectroscopy - a guide for chemists*, Oxford University Press, Oxford.
- Tatsis, E.C., Exarchou, V., Troganis, A.N. and Gerothanassis, I.P. 2008. <sup>1</sup>H NMR determination of hypericin and pseudohypericin in complex natural mixtures by the use of strongly deshielded –OH groups. *Anal. Chim. Acta* 607:219-226.