



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**Π.Μ.Σ. ΜΕ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ
ΕΛΕΓΧΟ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ
ΕΛΙΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΥΔΑΤΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΚΠΙΚΡΑΝΣΗΣ
ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ – ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΜΕ 1D ΚΑΙ 2D NMR**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : Προκόπιος Μαγιάτης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : Βασίλειος Ρούσσης, Καθηγητής

Ιωάννα Χήνου, Καθηγήτρια

Προκόπιος Μαγιάτης, Αναπληρωτής καθηγητής

Μουσούρη Ευγενία

Χημικός

A.M. 121112

Αθήνα 2014

Ευχαριστίες

- Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή κ. Βασίλειο Ρούσση, την καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία.
- Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Α.Λ. Σκαλτσούνη, κ. Β. Ρούσση και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ.Μ. Κουλάδη που δέχτηκαν να εκπονήσω το μεταπτυχιακό μου στον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.
- Ευχαριστώ τον υπεύθυνο για αυτήν την διπλωματική εργασία, αναπληρωτή καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, για την ανάθεση του θέματος, την συνεχή παρακολούθηση και καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια αυτής της εργασίας.
- Ευχαριστώ την διδάκτορα κ. Ελένη Μέλλιου για την συμβολή της στην υλοποίηση αυτής της εργασίας.
- Ευχαριστώ τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά την διάρκεια των μαθημάτων και τις συμβουλές τους κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.
- Ευχαριστώ την επίκουρη καθηγήτρια στο πανεπιστήμιο της Βουργουνδίας, Μαρία Νικολαντωνάκη, η οποία ως μεταδιδάκτορας στο UC Davis βοήθησε στην λήψη φασμάτων NMR και φασμάτων μάζας.
- Ευχαριστώ την εταιρεία ΓΑΙΑ για την οικονομική ενίσχυση κατά την διάρκεια του τελευταίου έτους.
- Ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Νικητία Μέξια για τις χρήσιμες συμβουλές της, την υπομονή και την φιλία της.
- Ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα και φίλη μου Εύα Κάρκουλα για την ανιδιοτελή και συνεχή στήριξη της καθόλη την διάρκεια των τελευταίων χρόνων.
- Ευχαριστώ τους φίλους μου Μαρία, Κατερίνα, Παναγιώτη, Πάολα και Χρυσάνθη για τις ευχάριστες στιγμές στο εργαστήριο και την ηθική υποστήριξη τους.
- Ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας για το ευχάριστο κλίμα και το ενδιαφέρον τους.
- Ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για την αγάπη, την υπομονή και την αδιάλλειπτη συμπαράσταση τους.

Στον Σπύρο για την ακούραστη υποστήριξη σε κάθε μου βήμα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Μεγαρίτικη ποικιλία αποτελεί μία από τις ευρέως διαδεδομένες ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς. Ορισμένες παρατηρήσεις σε παλαιότερες μελέτες όπως τα χαμηλά επίπεδα πολυφαινόλων στο αντίστοιχο ελαιόλαδο και τα χαμηλά επίπεδα ελευρωπαΐνης στον ελαιοκαρπό οδήγησαν στην ανάγκη μελέτης της χημικής σύστασης και στην διερεύνηση της ύπαρξης πιθανής μεταβολικής διαφοροποίησης στην εν λόγω ποικιλία. Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της χημικής σύστασης του ελαιοκαρπού καθώς επίσης και των υδατικών αποβλήτων που προκύπτουν από την διαδικασία εκπίκρυνσης. Επιπλέον διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάκτησης βιοδραστικών μεταβολιτών από τα υδατικά απόβλητα με σκοπό την αξιοποίηση αυτού του παραπροϊόντος. Πραγματοποιήθηκε συγκομιδή, κατεργασία των ελαιοκαρπών σε υδατικό μέσο και τοποθέτηση σε άλμη σύμφωνα με παραδοσιακή μέθοδο εκπίκρυνσης. Τα υδατικά απόβλητα και τα υδατικά εκχυλίσματα επεξεργασμένου και μη καρπού υπέστησαν προσυγκέντρωση με ρητίνη XAD-4 και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η ποσοτικοποίηση των βιοδραστικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR 2D ενώ η απόδοση δομής πραγματοποιήθηκε με την χρήση NMR 800 MHz. Από την μελέτη αυτή προέκυψε ότι τα υδατικά απόβλητα περιέχουν σημαντικά επίπεδα των μεταβολιτών 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης (35.5 mg/L), 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (10.8 mg/L), υδροξυτυροσόλη (12.9 mg/L) και τυροσόλη (3.7 mg/L). Από τον φρέσκο καρπό και από τα υδατικά απόβλητα απομονώθηκαν για πρώτη φορά στο είδος οι μεταβολίτες «rengyoxide» και «rengyoside B». Από τους βρώσιμους καρπούς εκτός από την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη, απομονώθηκαν για πρώτη φορά στο είδος οι μεταβολίτες «rengyoxide», «halleridone» και «cleroindicin C» καθώς επίσης και τέσσερα νέα φυσικά προϊόντα με ονομασίες μεγαριτοδολακτόνη, μεγαριτολακτονικό οξύ, μεθυλεστέρας του Β μεγαριτολακτονικού οξέος και μεγαριτολακτονόλη.

ABSTRACT

Megaritiki cultivar is one of the widely used varieties as table olives. Previous observations like the low polyphenol concentration in the corresponding olive oil and low oleuropein concentration in olive fruits led us to study the constituents of this variety and to investigate possible metabolic differentiation. We aimed to study the composition of megaritiki olive fruits and wastewaters resulting from the debittering procedure. In addition we attempted to evaluate the recovery of bioactive metabolites from wastewater in order to exploit this byproduct. Olives were harvested and treated with water according to a traditional debittering method and finally placed in brine. Wastewaters and water extract of edible olives were preconcentrated through a selective adsorption procedure with XAD-4 resin and submitted to chromatographic separations. Bioactive metabolites from wastewaters were quantified using two dimensional NMR spectroscopy. The structure elucidation was performed using NMR at 800 MHz. Wastewater contains significant amounts of hydroxytyrosol 4-O-glucoside (35.5 mg/L), 11-methyl-oleoside (10.8 mg/L), hydroxytyrosol (12.9 mg/L) and tyrosol (3.7 mg/L). Furthermore, wastewater afforded two metabolites: rengyoxide and rengyoside B which are for the first time isolated from this species. Edible olives, besides hydroxytyrosol and tyrosol, afforded rengyoxide, haleridone and cleroidicin C which are first isolated from the species and four metabolites which are new natural products, megaritodilactone, megaritolactonic acid, Megaritolactonic B methyl ester and megaritolactonol.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	10
Α΄ ΜΕΡΟΣ	12
Κεφάλαιο 1	13
Εισαγωγή	13
1.1 Ελιά.....	13
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση.....	14
1.1.2 Εξάπλωση – Στατιστικά στοιχεία.....	15
1.1.3 Χαρακτηριστικά ελαιόκαρπου.....	16
1.2 Ποικιλίες.....	17
1.3 Χημική σύσταση του καρπού της ελιάς.....	19
1.3.1 Φαινολικά συστατικά του ελαιοκαρπού.....	22
1.3.2 Βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών.....	22
1.3.3 Μεταβολές κατά την ωρίμανση.....	25
Κεφάλαιο 2	28
Επιτραπέζιος ελαιόκαρπος	28
2.1 Επιτραπέζιες ποικιλίες.....	29
2.2 Τρόποι επεξεργασίας.....	30
2.2.1 Πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου.....	32
2.2.2 Ελιές τεχνητά μαυρισμένες τύπου Καλιφόρνιας.....	33
2.2.3 Ελληνικοί τύποι επιτραπέζιων ελαιοκάρπων.....	33
2.2.4 Ελιές επεξεργασμένες με νερό.....	34
2.3 Μεταβολές στην χημική σύσταση.....	35
2.3.1 Μεταβολές λόγω διάχυσης.....	35
2.3.2 Μεταβολές λόγω χημικών αντιδράσεων.....	35
2.3.3 Μεταβολές λόγω ζύμωσης.....	36
2.3.4 Μεταβολές στα φαινολικά και τριτερπενικά συστατικά.....	37
2.4 Απόβλητα εκπίκρυνσης.....	38
Κεφάλαιο 3	40
Βιολογικές δράσεις	40
3.1 Βιολογικές δράσεις τριτερπενικών συστατικών.....	41
3.2 Βιολογικές δράσεις φαινολικών συστατικών.....	42
3.2.1 Βιολογικές δράσεις φαινολικών οξέων και αλκοολών.....	42
3.2.2 Βιολογικές δράσεις συζευγμένων φαινολικών συστατικών.....	44

3.2.3 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών	46
3.3 Βιολογικές δράσεις λιπαρών οξέων	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	47
Ποσοτικός προσδιορισμός με την χρήση φασματοσκοπίας NMR	47
4.1 Θεωρητική βάση του πειράματος	48
4.2 Οργανολογία	51
4.3 Πείραμα NMR μίας διάστασης	54
4.4 Πειραματικές παράμετροι.....	56
4.4.1 Παλμική ακολουθία	56
4.4.2 Παράμετροι λήψης φάσματος.....	58
4.4.3 Παράμετροι επεξεργασίας φάσματος.....	61
4.5 Φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης	63
4.5.1 Βασικές έννοιες του ποσοτικού NMR.....	64
4.5.2 Εφαρμογές	65
4.6 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων	66
4.6.1 Πείραμα δύο διαστάσεων.....	67
4.6.2 Ποσοτικοποίηση και εφαρμογές.....	69
Β' ΜΕΡΟΣ.....	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	72
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ	72
5.1 Οργανολογία	73
5.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC).....	73
5.1.2 Ρητίνη προσρόφησης XAD-4	73
5.1.3 Υγρή χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης	73
5.1.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	73
5.1.5 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	74
5.1.6 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS)	74
5.1.7 Πολωσίμετρο.....	74
5.2 Παρασκευή επιτραπέζιου ελαιοκάρπου.....	74
5.3 Μελέτη υδατικού αποβλήτου	75
5.3.1 Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης XAD-4.....	75
5.3.2 Διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών.....	80
5.3.3 Φασματοσκοπική μελέτη απομονωθέντων μεταβολιτών και βιολογικές ιδιότητες	84
5.4 Μελέτη επιτραπέζιου ελαιοκαρπού	101

5.4.1 Παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος	101
5.4.2 Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης XAD-4.....	101
5.4.3 Διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών	102
5.4.4 Φασματοσκοπική μελέτη απομονωθέντων μεταβολιτών και βιολογικές ιδιότητες	110
5.4.5 Βιοσύνθεση απομονωμένων μεταβολιτών με σκελετό C6-C2	133
5.4.6 Προϊόντα μεταβολικής διάσπασης της ελευρωπαΐνης	134
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	140
ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΕΝΤΕ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR	140
6.1 Εισαγωγή	140
6.2 Οργανολογία.....	141
6.3 Καμπύλες αναφοράς ουσιών με χρήση NMR 1D.....	141
6.3.1 Πρότυπες ουσίες αναφοράς και εσωτερικό πρότυπο.....	141
6.3.2 Προετοιμασία και λήψη φάσματος NMR.....	142
6.3.3 Καμπύλη αναφοράς υδροξυτυροσόλης.....	142
6.3.4 Καμπύλη αναφοράς τυροσόλης.....	143
6.3.5 Καμπύλη αναφοράς 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης.....	144
6.3.6 Καμπύλη αναφοράς 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη	144
6.3.7 Καμπύλη αναφοράς ελευρωπαΐνης.....	145
6.4 Καμπύλες αναφοράς ουσιών με χρήση NMR 2D.....	146
6.4.1 Πείραμα δύο διαστάσεων.....	147
6.4.2 Καμπύλη αναφοράς υδροξυτυροσόλης.....	148
6.4.3 Καμπύλη αναφοράς τυροσόλης.....	148
6.4.4 Καμπύλη αναφοράς 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης.....	149
6.4.5 Καμπύλη αναφοράς 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη	149
6.4.6 Καμπύλη αναφοράς ελευρωπαΐνης.....	150
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	151
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΑ ΥΔΑΤΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΚΠΙΚΡΑΝΣΗΣ.....	151
7.1 Πειραματική διαδικασία	151
7.1.1 Οργανολογία	151
7.1.2 Προετοιμασία δείγματος	152
7.1.3 Ανάλυση με NMR	152
7.2 Αποτελέσματα.....	154

7.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων μεταβολιτών	154
7.2.2 Ανάκτηση των τεσσάρων μεταβολιτών από τα υδατικά απόβλητα	156
7.3 Συμπεράσματα	156
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	158
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΠΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ	158
8.1 Πειραματική διαδικασία	158
8.1.1 Οργανολογία	158
8.1.2 Προετοιμασία δείγματος	158
8.1.3 Ανάλυση με NMR	159
8.2 Αποτελέσματα.....	160
8.3 Συμπεράσματα	161
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.....	162
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΚΑΡΠΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ	162
9.1 Πειραματική διαδικασία	162
9.1.1 Οργανολογία	162
9.1.2 Προετοιμασία δείγματος	162
9.1.3 Ανάλυση με NMR	163
9.2 Αποτελέσματα.....	163
9.3 Συμπεράσματα	164
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10.....	166
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	166
Βιβλιογραφία.....	170
I.Παράρτημα φασμάτων.....	176
II.Δημοσίευση.....	198

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία τέθηκε ως στόχος η μελέτη των βιοδραστικών και μη συστατικών της Μεγαρίτικης ποικιλίας. Η ποικιλία αυτή, η οποία είναι μία από τις ευρέως διαδεδομένες στον χώρο της επιτραπέζιας ελιάς, περιέχει ασυνήθιστα χαμηλά επίπεδα του μεταβολίτη ελευρωπαΐνη. Για τον λόγο αυτό διερευνήθηκε η σύσταση τόσο του φρέσκου καρπού όσο και του επεξεργασμένου. Όσον αφορά τον φρέσκο καρπό, πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης σε αυτόν κατά τα διάφορα στάδια της ωρίμανσης προκειμένου να εντοπιστεί το σημείο έναρξης καταβολισμού του μορίου. Μεγάλης σημασίας τμήμα αυτής της εργασίας αποτέλεσε η μελέτη των υδατικών αποβλήτων που προκύπτουν από την διαδικασία εκπίκρυνσης του καρπού και ο υπολογισμός της ανάκτησης βιοδραστικών μεταβολιτών από αυτά.

Η διερεύνηση της σύστασης της Μεγαρίτικης ποικιλίας πραγματοποιήθηκε σε ποιοτικό και σε ποσοτικό επίπεδο. Η ποιοτική μελέτη επιτεύχθηκε με την χρήση χρωματογραφικών τεχνικών και οδήγησε στην απομόνωση τεσσάρων νέων φυσικών προϊόντων. Η ποσοτική μελέτη βασίστηκε στη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και επικεντρώθηκε στους μεταβολίτες υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, 4-O-γλυκοσίδα της υδροξυτυροσόλης, ελευρωπαΐνη και 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδα.

Η πολυπλοκότητα των δειγμάτων τα οποία μελετήθηκαν κατέστησε την ποσοτικοποίηση με $^1\text{H-NMR}$, σε ορισμένες περιπτώσεις, ανεπαρκή και οδήγησε στην ανάγκη ανεύρεσης κάποιων τεχνικών με αυξημένη διακριτική ικανότητα. Την λύση σε αυτό το πρόβλημα έδωσε η φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων, μία νέα – κυρίως στον χώρο των φυσικών προϊόντων – και πολλά υποσχόμενη τεχνική. Με την χρήση αυτής, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τα πέντε συστατικά με εξαιρετική γραμμικότητα. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκαν τα επίπεδα των εν λόγω μεταβολιτών στα απόβλητα εκπίκρυνσης καθώς επίσης και στο φρέσκο και επεξεργασμένο καρπό.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας παρατίθενται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες οι οποίες παρέχουν το υπόβαθρο για την κατανόηση αυτής της μελέτης. Αυτές αφορούν τις ιδιότητες του καρπού της ελιάς, τις ποικίλες διαδικασίες εκπίκρυνσης που υφίσταται, τα βιοδραστικά του συστατικά και τις ιδιότητές τους. Επιπλέον γίνεται λεπτομερής αναφορά στην τεχνική πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και στον τρόπο ποσοτικοποίησης με αυτή.

Το δεύτερο τμήμα χωρίζεται σε πέντε κεφάλαια. Στο πρώτο από αυτά (Κεφάλαιο 5) γίνεται η περιγραφή της ποιοτικής μελέτης της Μεγαρίτικης ποικιλίας. Αναφέρεται ο τρόπος εργαστηριακής παρασκευής επιτραπέζιου καρπού, η μετέπειτα κατεργασία των υδατικών αποβλήτων αλλά και του εκχυλίσματος των επιτραπέζιων καρπών με τη χρήση ρητίνης προσρόφησης, καθώς και η διαδικασία διαχωρισμού και απομόνωσης μεταβολιτών. Τα επόμενα τέσσερα κεφάλαια αφορούν την κατασκευή καμπύλων αναφοράς για τα πέντε συστατικά, την παρακολούθηση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης στον φρέσκο καρπό και την διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού των τεσσάρων μεταβολιτών σε δείγματα αποβλήτων και καρπού της Μεγαρίτικης ποικιλίας με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων.

Α΄ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Η ελιά είναι ένα φυτό με μακρά ιστορία και μεγάλη εμπορική σημασία κυρίως για τις χώρες της Μεσογείου. Τα προϊόντα που προκύπτουν από το ελαιόδεντρο, ο καρπός και το λάδι της ελιάς, κατέχουν σημαντική θέση στην Μεσογειακή διατροφή. Ένα πλήθος βιοδραστικών μεταβολιτών παράγονται από το φυτό της ελιάς και κατ' επέκταση περιέχονται στα προϊόντα του. Οι σημαντικές βιολογικές δράσεις αυτών των συστατικών και η ποσότητα στην οποία βρίσκονται μέσα στα προϊόντα της ελιάς ενισχύουν συνεχώς τον ισχυρισμό για τον υγειοπροστατευτικό τους χαρακτήρα.

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί παρατίθενται πληροφορίες σχετικές με το ελαιόδεντρο και τις ποικιλίες αυτού ενώ γίνεται αναφορά στην διάκριση μεταξύ ελαιοποιήσιμων και μη ποικιλιών. Επιπλέον παρατίθεται το σύνολο των βιοδραστικών μεταβολιτών που περιέχονται στον καρπό της ελιάς καθώς επίσης και οι μεταβολές που υφίστανται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης.

1.1 Ελιά

Το ελαιόδεντρο αποτελεί ένα από τα παλαιότερα καλλιεργούμενα είδη στον πλανήτη. Η αρχή της ελαιοκαλλιέργειας χρονολογείται περίπου στα 7.000 χρόνια πριν. Σύμφωνα με αρχαιολογικές ενδείξεις, γύρω στο 3.000 π.χ. κατά την περίοδο του Μινωικού πολιτισμού στην Κρήτη γινόταν καλλιέργεια ελαιοδέντρων για εμπορικούς σκοπούς^{[21],[29]}. Οι χρήσεις του ελαιοδέντρου και των προϊόντων του για τις θεραπευτικές και διαθρεπτικές τους ιδιότητες από τους λαούς της Μεσογείου έχουν επίσης μακρά ιστορία. Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν οι χρήσεις του ελαίου που προκύπτει από τον καρπό της ελιάς από τους αρχαίους Έλληνες για την διατήρηση της υγείας του σώματος ή η χρήση εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς από του αρχαίους Αιγυπτίους για την θεραπεία της μαλάριας^{[21],[30]}.

Η οικονομική σημασία του φυτού της ελιάς είναι επίσης πολύ μεγάλη. Ο καρπός της ελιάς αποτελεί σημαντικό εμπορικό προϊόν αφενός μεν διότι από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο το οποίο διαθέτει υγειοπροστατευτικό χαρακτήρα αφετέρου δε ο ίδιος ο καρπός, ύστερα από την διαδικασία εκπίκρυνσης που υφίσταται για να καταστεί βρώσιμος, αποτελεί μαζί με το ελαιόλαδο αναπόσπαστο τμήμα της Μεσογειακής διατροφής. Είναι γνωστό ότι η τελευταία αποτελεί έναν από τους υγιέστερους τρόπους διατροφής λόγω της συσχέτισης με τον περιορισμένο κίνδυνο εμφάνισης

καρδιαγγειακών νόσων και συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την τάση των σύγχρονων κοινωνιών προς την βέλτιστη διατροφή και τα λειτουργικά τρόφιμα, κυρίως σε χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Ευρώπη, η Ιαπωνία, ο Καναδάς και η Αυστραλία, έχει οδηγήσει σε αξιοσημείωτη αύξηση στην κατανάλωση των προϊόντων της ελιάς. Αυτή η τάση έχει προσανατολίσει τις αγορές σε συνεχή εξέλιξη και ανάπτυξη των προϊόντων της ελιάς^{[21],[23]}. Επιπλέον προς την ίδια κατεύθυνση στρέφεται και η επιστημονική κοινότητα η οποία βρίσκεται σε συνεχή ερευνητική δραστηριότητα αφενός για να αποσαφηνιστούν πλήρως όλα τα οφέλη που προκύπτουν από την κατανάλωση των προϊόντων αυτών, αφετέρου για να εξασφαλιστούν οι ιδανικές συνθήκες παραγωγής των προϊόντων της ελιάς ούτως ώστε αυτά να διατηρούν τα υψηλά επίπεδα βιοδραστικών συστατικών στα οποία οφείλεται και ο υγειοπροστατευτικός τους χαρακτήρας.

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση

Το φυτό με συστηματική βοτανική ονομασία *Olea europaea* ή Ελαιόλαδο η ευρωπαϊκή ή κοινώς Ελιά ανήκει στην οικογένεια των Ελαιιδών (*Oleaceae*). Στην οικογένεια αυτή ανήκουν 22 γένη και περίπου 500 είδη. Χαρακτηριστικά γένη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια αυτή είναι τα *Fraxinus*, *Ligustrum* και *Forsythia*. Το γένος *Olea* είναι το πιο σημαντικό μέσα στην οικογένεια των *Oleaceae* καθώς διαθέτει περίπου 40 είδη. Μεταξύ αυτών, το περισσότερο διαδεδομένο είδος και αυτό με το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον, τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε επίπεδο οικογένειας είναι το είδος *Olea europaea*. Όσον αφορά στα *taxa* που υπάγονται στο είδος *Olea europaea*, αυτά διακρίνονται στις καλλιεργούμενες ποικιλίες οι οποίες συνιστούν το υποείδος *Olea europaea* var. *sativa*. Ορισμένοι συγγραφείς θεωρούν την αγριελιά ξεχωριστό είδος με ονομασία *Olea oleaster*. Ωστόσο οι περισσότεροι θεωρούν ότι αποτελεί υποείδος ή ποικιλία με τα ονόματα *oleaster* ή *sylvestris* εντός του είδους *europaea*.

Πίνακας 1.1 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς

Βασίλειο	Plantae
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Oleaceae
Υποοικογένεια	Oleoideae
Γένος	<i>Olea</i>

Είναι δέντρο αειθαλές, που φθάνει μέχρι ύψους 20 μέτρων. Ο μέσος όρος ζωής είναι 500 χρόνια, ωστόσο ορισμένα ελαιόδεντρα στην ανατολική Μεσόγειο χρονολογούνται

γύρω στα 1.500 χρόνια. Τα φύλλα της είναι μικρά, αντίθετα, βραχύμισχα, ωοειδή, με σκουροπράσινο χρώμα από πάνω και αργυρόλευκο από κάτω. Τα άνθη της εμφανίζονται σε ταξιανθίες τύπου βότρου ενώ οι καρποί είναι δρύπτες ωοειδείς, ελλειψοειδείς ή στρογγυλές. Ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας το χρώμα της επιδερμίδας του καρπού μεταβάλλεται από κίτρινο-πράσινο αρχικά σε κόκκινο-καφέ κατά το στάδιο της ωρίμανσης^[26]. Υπάρχουν βέβαια ποικιλίες στις οποίες το πράσινο χρώμα του καρπού παραμένει αρκετά μετά την πλήρη ωρίμανση. Οι ποικιλίες αυτές χαρακτηρίζονται ως πράσινες.

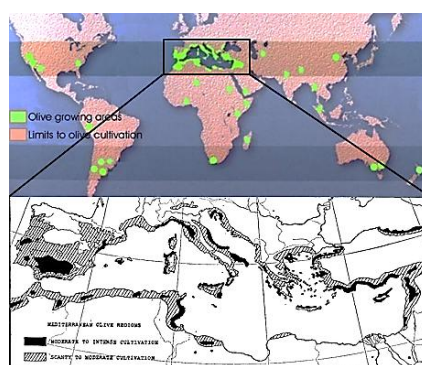


Εικόνα 1.1 Διαφορετικά στάδια ωρίμανσης καρπών ελιάς αμέσως μετά τη συγκομιδή^[27]

Η ανάπτυξη και η ωρίμανση του καρπού της ελιάς είναι μία διαδικασία η οποία υπό συνήθεις κλιματικές συνθήκες διαρκεί περίπου 5 μήνες. Σε ψυχρά κλίματα ωστόσο η ανάπτυξη καθυστερεί.^[21]

1.1.2 Εξάπλωση – Στατιστικά στοιχεία

Το ελαιόδεντρο φύτεται σε τροπικές και θερμές εύκρατες περιοχές, γι' αυτό και συναντάται ευρύτατα στις παράκτιες περιοχές της Μεσογείου. Παρά την εξάπλωση και καλλιέργεια του φυτού σε αρκετές περιοχές των πέντε ηπείρων, οι παράκτιες περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου κατέχουν την μεγαλύτερη μερίδα της παγκόσμιας ελαιοκαλλιέργειας^[23].



Εικόνα 1.2 Γεωγραφική κατανομή του φυτού της ελιάς παγκοσμίως (πάνω)^[25] και στην λεκάνη της Μεσογείου (κάτω)^[24]

Συγκεκριμένα, αυτή τη στιγμή καλλιεργούνται παγκοσμίως 750 εκατομμύρια ελαιόδεντρα. Εξ αυτών περίπου το 98% της επιφάνειας που καλλιεργείται, το 99%

των παραγωγικών δέντρων και το 99% της ολικής ελαιοπαραγωγής ανήκει στις χώρες της Μεσογειακής λεκάνης και της Μέσης Ανατολής^[21].

Σύμφωνα με τα δεδομένα του οργανισμού FAO (Food and Agriculture Organization) όπως προέκυψαν για το 2011, η συνολική έκταση που καλλιεργείται με ελαιόδεντρα παγκοσμίως είναι 9.6 εκατομμύρια εκτάρια, εκ των οποίων η Ισπανία αποτελεί την σημαντικότερη παραγωγική δύναμη με συνολική καλλιεργούμενη έκταση 2.3 εκατομμύρια εκτάρια. Ακολουθούν η Ιταλία και η Ελλάδα με συνολικές εκτάσεις 1.1 εκατομμύρια εκτάρια και 850 χιλιάδες εκτάρια αντίστοιχα^[31].

Πίνακας 1.2 Οι 7 χώρες με την μεγαλύτερη ελαιοπαραγωγή για το 2011 ^[31]

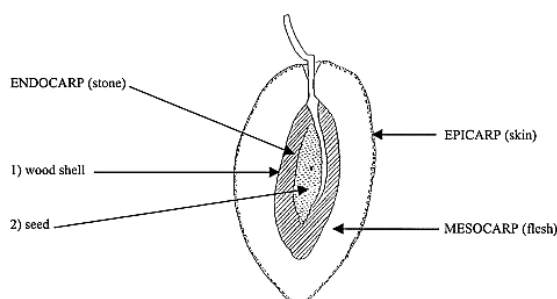
Χώρα	Παραγωγή (tn)	Καλλιεργούμενη έκταση (Ha)	Απόδοση (Hg/ Ha)
Παγκόσμια	19.845.300	9.634.576	20.598
Ισπανία	6.940.230	2.330.400	29.781,28
Ιταλία	3.182.200	1.144.420	27.806,22
Ελλάδα	2.000.000	850.000	23.529,41
Τουρκία	1.750.000	798.493	21.916,28
Συρία	1.095.040	684.490	15.997,9
Μαρόκο	1.364.690	597.513	22.839,5
Τυνησία	863.000	1.779.950	4.848,45

1.1.3 Χαρακτηριστικά ελαιόκαρπου

Η ελιά διαθέτει έναν ωοειδή σαρκώδη καρπό με ξυλώδες ενδοκάρπιο (δρύπη). Το τυπικό του μέγεθος είναι 2 – 3 cm (σε πλάτος και ύψος) και το τυπικό του βάρος ποικίλει από 2 έως 12 g, αν και ο καρπός ορισμένων ποικιλιών φτάνει έως και τα 20 g. Η αναλογία σάρκας προς πυρήνα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 3.0 – 6.5 cm^[21]. Ανατομικά ο καρπός της ελιάς αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα. Αυτά είναι το επικάρπιο ή επιδερμίδα, το μεσοκάρπιο ή σάρκα και το ενδοκάρπιο το οποίο αποτελείται από το ξυλώδες περίβλημα και το ενδροσπέρμιο.

Το επικάρπιο είναι ένας προστατευτικός ιστός, κηρώδους σύστασης ο οποίος αποτελεί το 1.0 – 3.0 % του συνολικού βάρους του καρπού. Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης το χρώμα της επιδερμίδας αλλάζει κάτι το οποίο οφείλεται στις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των κύριων χρωστικών της που είναι οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή και οι ανθοκυανίνες.

Το μεσοκάρπιο αποτελεί μαζί με το επικάρπιο το 70 – 80 % του συνολικού βάρους του καρπού και το βρώσιμο τμήμα αυτού. Κατά το 70 – 75 % το μεσοκάρπιο αποτελείται από νερό, ενώ η περιεκτικότητά του σε έλαιο κυμαίνεται από 14 – 15 % στις πράσινες επιτραπέζιες ελιές και φτάνει το 30 % στις μαύρες ώριμες ελιές. Στο μεσοκάρπιο επίσης περιέχονται οργανικά οξέα τα οποία αποτελούν το 1.2 – 2.1 % του ξηρού βάρους του. Η ύπαρξη τους υποδηλώνει μεταβολική δραστηριότητα καθώς αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού που προκύπτουν από την αποσύνθεση άλλων ενώσεων. Μαζί με τα λιπαρά οξέα αποτελούν συνολικά τα ελεύθερα οργανικά οξέα. Επιπλέον περιέχονται σάκχαρα (3.5 – 6 %), πρωτεΐνες (1.5 – 2.2 %), πολυσακχαρίτες και πηκτίνες. Τέλος οι ελεύθερες φαινόλες και οι γλυκοσιδικές μορφές τους αποτελούν το 1 – 3 % του βάρους του μεσοκαρπίου.



Εικόνα 1.3 Σχηματική εγκάρσια τομή ελαιόκαρπου^[28]

Το ενδοκάρπιο αποτελεί το 18 – 22 % του συνολικού βάρους του καρπού. Το ενδοσπέρμιο περιέχει έλαιο σε ποσοστό 18 – 22% ενώ αντιθέτως το ξυλώδες περίβλημα μόλις 1%^[28]

Η κατανομή των χημικών συστατικών της ελιάς στα διάφορα τμήματα του καρπού της ελιάς είναι σύνθετη και σε ένα βαθμό μεταβλητή καθώς εξαρτάται από παραμέτρους όπως η ποικιλία, οι καλλιεργητικές τεχνικές, η γεωγραφική προέλευση και το επίπεδο της ωρίμανσης^[21].

1.2 Ποικιλίες

Η διαδικασία της ταυτοποίησης και της κατάταξης των ποικιλιών της ελιάς είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Υπάρχουν περίπου 2.500 γνωστές ποικιλίες εκ των οποίων οι 250 κατατάσσονται από το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου στις εμπορικές ποικιλίες. Οι ποικιλίες αυτές χρησιμοποιούνται είτε για την παρασκευή επιτραπέζιας ελιάς είτε για την παραλαβή ελαιολάδου ή και για τα δύο^{[21],[25]}. Ο χαρακτηρισμός των ποικιλιών ελιάς και η μεταξύ τους διάκριση επιτεύχθηκε χάρη σε ένα σύνολο μορφολογικών χαρακτήρων, βιομετρικών και βιοχημικών δεικτών το οποίο θέσπισε το 8^ο Διεθνές Συνέδριο Ελαιοκομίας (Ισπανία 1950) για αυτό το σκοπό^[33].

Πίνακας 1.3 Εμπορικές ποικιλίες ελιάς ανά χώρα προέλευσης^{[21],[32]}

Προέλευση	Ποικιλία
Ελλάδα	Αδραμυτηνή, Αμυδαλολιά, Αμφίσσης, Χαλκιδικής (Χονδρολιά), Δαφνελιά, Ντόπια, Frantoio, Gordal, Κορωνέικη, Καρυδολιά, Λιανολιά, Πατρινή, Χονδρολιά (Θρουμποελιά), Τσουνάτη, Βαλανολιά
Ιταλία	Biancolilla, Bosana, Canino, Casaliva, Cellina di Nardo, Coratina Dolce Agoglio, Dritta, Maraiolo, Rosciola, Pisciotana, Grignan, Ottobratica
Ισπανία	Alfajara, Arbequina, Bical, Blanqueta, Empeltre, Farga, Gordal, Lechin, Hojiblanca, Manzanilla de Jaen, Morrut Palomar, Picual, Sevillanca Verdiell, Vilalonga
Γαλλία	Aglandau, Amellau, Cayon, Germaine, Picholine, Lucques, Salonenque Picholine, Zinzala
Τυνησία	Chemlali, Chetoui, Gerboui, Meski, Oueslati

Η παραπάνω διάκριση έγινε με κριτήριο την εμπορική ή μη χρήση της ποικιλίας. Ένα άλλο κριτήριο βάσει του οποίου ταξινομήθηκαν στο παρελθόν οι ελληνικές ποικιλίες είναι το μέγεθος. Έτσι δημιουργήθηκαν τρεις κατηγορίες οι μικρόκαρπες (βάρος καρπού μικρότερο των 2,6g), οι μεσόκαρπες (βάρος καρπού από 2,7g έως 4,2g) και οι αδρόκαρπες (βάρος καρπού μεγαλύτερο από 4,3g). Βάσει αυτού του κριτηρίου ταξινομήθηκαν 38 ελληνικές ποικιλίες (πίνακας 1.4).^[33]

Πίνακας 1.4 Κατάταξη ορισμένων ελληνικών ποικιλιών βάσει μεγέθους^[33]

Κατηγορία	Ποικιλίες
Μικρόκαρπες	Κουτσουρελιά, Κορωνέικη, Αγριελιά, Λιανολιά Κερκύρας, Μαστοιδής, Θιακή, Χρυσολιά, Μαυρελιά, Τραγολιά, Λευκόκαρπος ή Ασπρολιά, Μελολιά, Μυρτολιά
Μεσόκαρπες	Αγουρομανακολιά, Αδραμυτινή, Βαλανολιά, Θρουμπολιά, Μεγαρίτικη, Πικρολιά, Καλοκαιρίδα, Δαφνελιά
Αδρόκαρπες ή Χονδρολιές	Αμυδαλολιά, Βασιλικάδα, Γαϊδουρολιά, Καρολιά, Καρυδολιά, Καλαμών, Κοθρέικη, Κολυμπάδα, Κονσερβολιά, Στρογγυλολιά

Ωστόσο, η παραπάνω κατάταξη βάσει μεγέθους αντικατοπτρίζει μόνο φαινοτυπικές διαφορές και δεν έχει γενετική βάση.

Η πιο χρήσιμη διάκριση ποικιλιών ελιάς γίνεται με βάση το κριτήριο της προοριζόμενης χρήσης του καρπού. Έτσι διακρίνονται τρεις κατηγορίες, (1) οι ποικιλίες για ελαιοποίηση, όπου ο καρπός της ελιάς χρησιμοποιείται αποκλειστικά για

την παραλαβή ελαιολάδου, (2) οι επιτραπέζιες ποικιλίες, όπου ο καρπός χρησιμοποιείται για επιτραπέζια κατανάλωση και (3) οι ποικιλίες διπλής χρήσης, όπου κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται για την παραλαβή ελαιολάδου και μόνο περιστασιακά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιτραπέζιες^[26].

Οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την μετέπειτα χρήση είναι η περιεκτικότητα σε έλαιο και το μέγεθος του καρπού. Όσον αφορά την επίδραση του πρώτου παράγοντα, ποικιλίες ελιάς με περιεκτικότητα σε έλαιο λιγότερο από 12% χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για την παραγωγή επιτραπέζιου ελαιοκάρπου, ενώ ποικιλίες οι οποίες περιέχουν περίπου 20% λάδι προτιμούνται συνήθως για την παραλαβή ελαιολάδου. Το όριο το οποίο διαχωρίζει ελαιοποιήσιμες και μη ποικιλίες με κριτήριο το μέγεθος είναι τα 4 g. Καρποί που ξεπερνούν το όριο αυτό προτιμώνται για επιτραπέζια χρήση. Όσον αφορά τις ποικιλίες διπλής χρήσης ο τελικός προορισμός εξαρτάται από την χρονιά και την εκάστωτε σοδειά.



Εικόνα 1.4 Καρποί από 4 διαφορετικές ποικιλίες, η συγκομιδή των οποίων έχει γίνει την ίδια χρονική στιγμή

Πίνακας 1.5 Κατάταξη ελληνικών ποικιλιών βάσει της προοριζόμενης χρήσης^[33]

Κατηγορία	Κριτήριο	Ποικιλίες
Ποικιλίες για ελαιοποίηση	απόδοση σε λάδι	Κορωνέικη, Λιανολιά Κερκύρας (Παξοί, Κέρκυρα), Αγουρομανακολιά, Βαλανολιά(Μυτιλήνη), Αδραμυτινή, Ματοειδής (Λακωνία, Κρήτη)
Επιτραπέζιες ποικιλίες	μέγεθος αναλογία σάρκας - πυρήνα	Κονσερβολιά, Χαλκιδικής, Νυχάτη Καλαμών
Ποικιλίες διπλής χρήσης	το τελικό αποτέλεσμα (ανάλογα με την χρονιά)	Μεγαρίτικη, Κοθρεϊκή (Φωκίδα), Καρυδολιά (Εύβοια), Θρουμπολιά

Επιπλέον, στην περίπτωση της παραγωγής επιτραπέζιων καρπών υπάρχουν ορισμένες φυσικές ιδιότητες πέρα από το μέγεθος του καρπού που έχουν καθοριστική σημασία. Αυτές οι ιδιότητες αφορούν το σχήμα, την αναλογία σάρκας προς πυρήνα, το χρώμα και την υφή του καρπού^{[21],[32]}.

1.3 Χημική σύσταση του καρπού της ελιάς

Η χημική σύσταση του καρπού μίας ποικιλίας καθορίζεται κατά κύριο λόγο από γενετικούς παράγοντες. Ωστόσο το κλίμα και το στάδιο ωρίμανσης τους καρπού είναι επίσης δύο παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά την χημική σύσταση. Οι διαφορές στην σύσταση ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες αντικατοπτρίζουν τον σύνθετο μεταβολισμό του ελαιοκαρπού^{[34],[35]}.

Η χημική σύσταση του ελαιοκαρπού έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητών. Στις μελέτες αυτές ταυτοποιούνται οι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες ανήκουν είτε στα κυρίαρχα συστατικά (γλυκερίδια) είτε στα δευτερεύοντα συστατικά (αλειφατικές ενώσεις, πολυκυκλικά τριτερπένια, φαινολικές ενώσεις). Τα συστατικά αυτά στις περισσότερες μελέτες διακρίνονται σε πολικά (διαλυτά σε νερό / αλκοόλη) και σε λιγότερο πολικά. Επιπλέον σε αρκετές μελέτες, για την απλοποίηση της διαδικασίας, πραγματοποιείται σαπωνοποίηση του ελαίου προς διαχωρισμό των τριγλυκεριδίων από τα μικρότερου μοριακού βάρους συστατικά και στη συνέχεια μελετάται το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα^[28].

Στον πίνακα 1.5 παρατίθενται ενδεικτικά οι κατηγορίες των ενώσεων του σαπωνοποιήσιμου και μη κλάσματος των συστατικών του ελαιοκαρπού συνολικά. Τα συστατικά αυτά δεν κατανέμονται ομοιόμορφα στα τμήματα του καρπού. Αντιθέτως κάθε ένα από αυτά κατανέμεται με συγκεκριμένο τρόπο αναλόγως του ρόλου που επιτελεί στην φυσιολογία του καρπού.

Πίνακας 1.6 Χημική σύσταση ελαιοκαρπού^[28]

Σαπωνοποιήσιμο κλάσμα		τριγλυκερίδια, αλειφατικές αλκοόλες μακράς αλύσου, πολυκυκλικές τριτερπενόλες και πολυκυκλικά τριτερπενικά οξέα
Ασαπωνοποίητο κλάσμα	Λιγότερο πολικά συστατικά	αλκάνια (η-αλκάνια C ₂₃ – C ₃₃ , σκουαλένιο)
		αλειφατικές αλκοόλες (C ₂₂ – C ₂₈)
		αλδεΐδες (C ₂₆ – C ₃₂)
		λιπαρά οξέα (C ₁₆ – C ₁₈ και C ₂₂ – C ₂₈)
		αλκυλεστέρες (C ₄₀ – C ₄₄ και C ₄₆ – C ₅₆ , εστέρες του παλμιτικού και ελαϊκού οξέος με αλκοόλες C ₂₂ , C ₂₄ , C ₂₆)
		μεθυλφαινυλεστέρες (εστέρες της βενζυλικής αλκοόλης με λιπαρά οξέα C ₂₆ – C ₃₂)
	τριτερπενοειδή (κυκλοαρτενόλη, ερυθροδιόλη, ουβαόλη, ολεανολικό και μασλινικό οξύ)	
Πολικά συστατικά	σάκχαρα, φαινολικές ενώσεις και γλυκοσίδες αυτών	

Πίνακας 1.7 Χαρακτηριστικές δομές λιπαρών οξέων και τριτερπενίων του ελαιοκαρπού

Λιπαρά οξέα	
Ελαϊκό οξύ (C-18)	
Λινελαϊκό οξύ (C-18)	
Παλμιτικό οξύ (C-16)	
Τριτερπένια	
Σκουαλένιο (C – 30)	Κυκλοαρτενόλη (C – 30)
Μασλινικό οξύ (C – 30)	Ολεανολικό οξύ (C – 30)

1.3.1 Φαινολικά συστατικά του ελαιοκαρπού

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν το 1-3% του συνολικού βάρους του ελαιοκαρπού. Το είδος, η ποσότητα και κατανομή τους στα τμήματα του καρπού καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία, το στάδιο ανάπτυξης και τις κλιματικές συνθήκες.

Η ειδική αναφορά στις φαινολικές ενώσεις οφείλεται στην μεγάλη σημασία αυτών τόσο για το ίδιο το φυτό όσο και για τον άνθρωπο. Τα συστατικά αυτά εμπλέκονται στις διαδικασίες άμυνας του φυτού, σχετίζονται με την μεταβολή του χρώματος του καρπού κατά την ωρίμανση καθώς επίσης και με τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, ενώ διαθέτουν αρκετές και σημαντικές βιολογικές δράσεις.

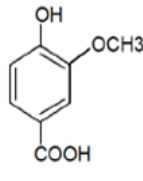
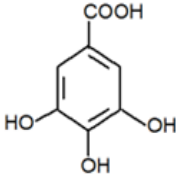
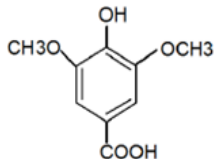
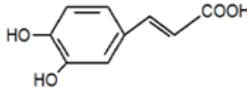
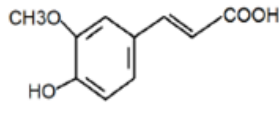
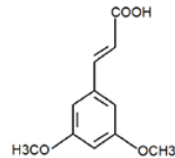
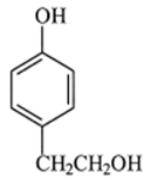
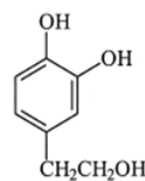
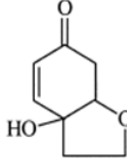
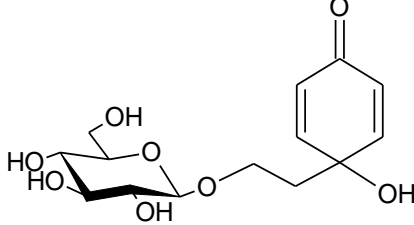
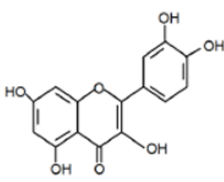
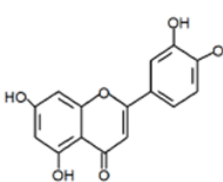
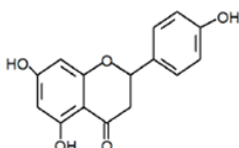
Στις φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή, τα σεκοϊριδοειδή και παράγωγα υδροξυκινναμικού οξέος (πίνακας 1.8).

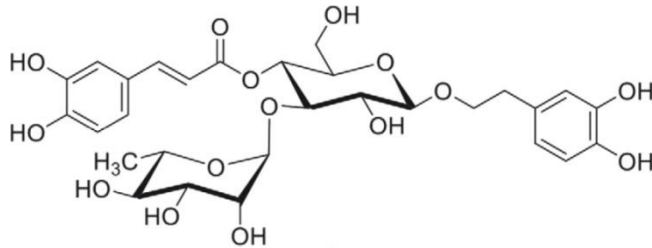
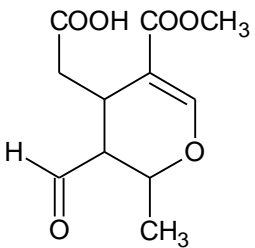
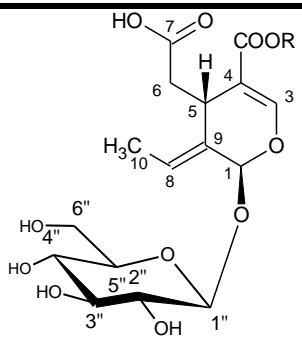
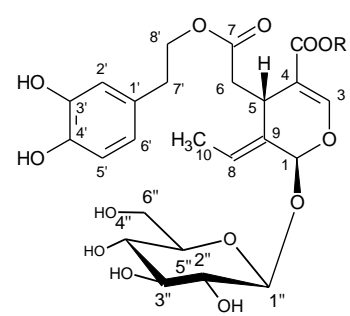
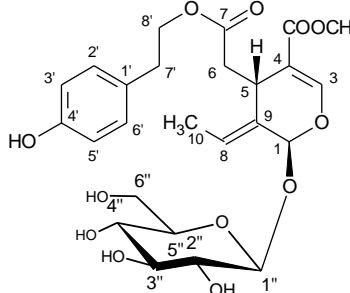
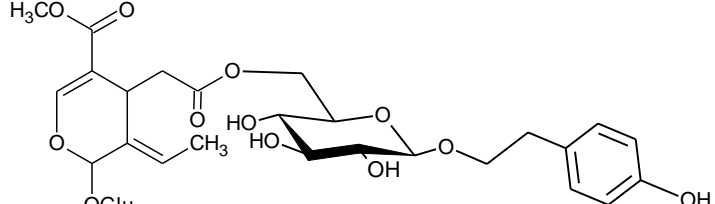
1.3.2 Βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών

Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντώνται στον καρπό της ελιάς ανήκουν στις κατηγορίες των τερπενίων, των φαινολικών ενώσεων και των σεκοϊριδοειδών.

Τα τερπένια και τα σεκοϊριδοειδή συντίθενται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος ενώ οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να προκύψουν μέσω δύο οδών. Η πρώτη είναι η οδός του σικιμικού οξέος από την οποία προκύπτουν τα αρωματικά αμινοξέα, τα κινναμωμικά και τα βενζοϊκά οξέα καθώς επίσης και τα λιγνάνια. Από την δεύτερη οδό αυτή του οξικού οξέος, προκύπτουν πολυ-β-κετο-εστέρες οι οποίοι οδηγούν σε πολυκυκλικά παράγωγα όπως είναι οι χρωμόνες, οι κινόνες κλπ. Τα φλαβονοειδή προκύπτουν από τον συνδυασμό των δύο οδών.

Πίνακας 1.8 ^{[21],[28]}

φαινολικά οξέα	C6-C1				
		βανιλλικό οξύ	γαλλικό οξύ	συριγγικό οξύ	
	C6-C3				
		καφεϊκό οξύ	φερουλικό οξύ	σιναπτικό οξύ	
C6-C2 : ομοβανιλικό C6-C1 : πρωτοκατεχικό, 4-υδροξυ-βενζοϊκό C6-C3 : p-κουμαρικό οξύ, κιναιμικό οξύ, o-κουμαρικό, χλωρογενικό					
φαινολικές αλκοόλες και πρόδρομες μορφές (C6-C2)	C6-C2				
		τυροσόλη	υδροξυτυροσόλη	halleridone	
					
	Κορνοσίδης				
3-μεθόξυ τυροσόλη, οξικός εστέρας της 3-μεθοξυ τυροσώλης, οξικός εστέρας της υδροξυτυροσώλης, σαλιντροσίδης, 4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης, 3-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης, 1'-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης, 3,4-διυδροξυφαινυλ-γλυκόλη					
φλαβονοειδή	C6-C3-C6				
		κερκετίνη	λουτεολίνη	απιγενίνη	
3-ρουτινοσίδης της κβανιδίνης, 7-γλυκοσίδης της απιγενίνης, 7-γλυκοσίδης της λουτεολίνης, 4-γλυκοσίδης της λουτεολίνης, 7-ρουτινοσίδης της λουτεολίνης, σπεριδίνη					

<p><u>παράγωγα υδροξυκινναμικού οξέος</u></p>		
<p>βερμπασκοσίδης</p>		
<p><u>Σεκοϊριδοειδή (συζευγμένα με φαινολική ομάδα)</u></p>		
<p>ελενολικό οξύ</p>	<p>ολεοσίδης (R=H) και 11- μεθυλεστέρας του ολεοσίδη (R=CH₃)</p>	
		
<p>ελευρωπαΐνη (R=CH₃) και δεμεθυλελευρωπαΐνη (R=H)</p>		
		
<p>Λιγκτροσίδης</p>		
		
<p>Nuzhenide</p>		
<p>Άγλυκο της ελευρωπαΐνης, άγλυκο του λιγκτροσίδη, αποκαρβοξυλιωμένο άγλυκο της ελευρωπαΐνης και αποκαρβοξυλιωμένο άγλυκο του λιγκτροσίδη, γλυκοζυλιωμένες μορφές της ελευρωπαΐνης</p>		

1.3.3 Μεταβολές κατά την ωρίμανση

Τα επίπεδα των συστατικών της ελιάς, είτε αυτά είναι πρωτογενείς είτε δευτερογενείς μεταβολίτες, μεταβάλλονται ποιοτικά και ποσοτικά κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού ικανοποιώντας έτσι τις εκάστοτε ανάγκες του φυτού. Η διακύμανση αυτή έχει μελετηθεί αρκετά, και από τα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Ας επισημάνουμε σε αυτό το σημείο ότι η ανάπτυξη του καρπού της ελιάς αποτελείται από τρία στάδια : (α) αυτό της αύξησης, κατά το οποίο ο καρπός αυξάνεται σε μέγεθος και στο τέλος αυτού του σταδίου έχει αποκτήσει τις οριστικές του διαστάσεις, (β) το στάδιο της πράσινης ώριμης ελιάς (green mature), όπου οι καρποί είναι πλέον πλήρως ανεπτυγμένοι και έτοιμοι να μεταβούν στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης παρά το έντονο πράσινο χρώμα της επιδερμίδας τους, και τέλος (γ) το στάδιο της μαύρης ώριμης ελιάς (black mature), που αφορά ώριμους καρπούς με επιδερμίδα χρώματος έντονου μωβ έως μαύρο.

1.3.3.1 Τριτερπενικά συστατικά

Όσον τα αφορά τα τριτερπενικά συστατικά, κατά τη πλειοψηφία τους κατανέμονται στην επιδερμίδα του καρπού και στις εξωτερικές στιβάδες του μεσοκαρπίου ενώ δεν ανιχνεύονται στη σάρκα και στο ξυλώδες ενδοκάρπιο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το μασλινικό και ολεανολικό οξύ. Αντίθετα, η ουβαόλη και η ερυθροδιόλη δεν βρίσκονται ελεύθερες αλλά συζευγμένες με λιπαρά οξέα στα λιπίδια της επιδερμίδας.

Η παρουσία των τριτερπενικών συστατικών στις εξωτερικές στιβάδες του καρπού δικαιολογείται διότι εκεί επιτελούν έναν αμυντικό ρόλο κατά των εξωτερικών επιθέσεων από μικροοργανισμούς κλπ. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του καρπού και κατά την μετάβαση από το στάδιο της πράσινης ώριμης ελιάς στο στάδιο της μαύρης ώριμης παρατηρείται μείωση των επιπέδων τους της τάξεως του 20% ^[36].

1.3.3.2 Φαινολικά συστατικά και παράγωγα

Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο ωρίμανσης. Παρατηρείται ότι ο καρπός της ελιάς τείνει να συσσωρεύει στους ιστούς του γλυκοζυλιωμένα παράγωγα σεκοϊριδοειδών ενώ τα αντίστοιχα μη γλυκοζυλιωμένα εμφανίζονται κυρίως στα φύλλα ^[37], Γενικά, οι κυρίαρχοι φαινολικοί μεταβολίτες του φυτού της ελιάς είναι η ελευρωπαΐνη, η δεμεθυλ-ελευρωπαΐνη, ο λιγκστροσίδης και ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη, ενώ ο βερμπασκοσίδης αποτελεί το κύριο παράγωγο υδροξυκιναμικού οξέος στον ελαιόκαρπο.

Η ελευρωπαΐνη, το συστατικό της ελιάς το οποίο προσδίδει στον καρπό την ιδιαίτερα πικρή του γεύση, είναι το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό του καρπού ιδίως κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμανσης. Συγκεκριμένα τα επίπεδα του φθάνουν έως και το 14% του ξηρού βάρους του άωρου καρπού (στάδιο αύξησης). Το στάδιο της πράσινης ωρίμανσης συμπίπτει με τη μείωση στα επίπεδα της ελευρωπαΐνης και των χλωροφυλλών, ενώ το στάδιο της μαύρης ωρίμανσης χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση των ανθοκυανών καθώς η ελευρωπαΐνη εξακολουθεί να μειώνεται ^[42].

Στις πράσινες ποικιλίες τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης παραμένουν υψηλά (αλλά χαμηλότερα από το 14%). Αντίθετα σε ορισμένες ποικιλίες, όταν η επιδερμίδα του καρπού αποκτήσει μαύρο χρώμα τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης φθίνουν ενώ δύνανται ακόμα και να μηδενιστούν (π.χ. *Olea europaea* var *leccino*) ^{[37],[38]}. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του λιγκστροσίδη – ο οποίος διαφέρει από την ελευρωπαΐνη στο ότι είναι εστεράς τυροσόλης και όχι υδροξυτυροσόλης – υπάρχει σχετική αφθονία αυτού στον άωρο καρπό ενώ τα επίπεδα του μειώνονται σημαντικά κατά την ωρίμανση.

Έχει παρατηρηθεί ότι στις ποικιλίες που διαθέτουν μικρούς καρπούς τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης είναι ιδιαίτερα υψηλά από τα πολύ αρχικά στάδια της ωρίμανσης μέχρι και την ολοκλήρωση της. Αντιθέτως, οι ποικιλίες με μεγαλύτερους καρπούς χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα του εν λόγω σεκοϊριδοειδούς τα οποία παραμένουν χαμηλά καθ'όλη την διάρκεια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης ^[28]. Ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη και η δεμεθυλελευρωπαΐνη αποτελούν προϊόντα διάσπασης του μορίου της ελευρωπαΐνης υπό την επίδραση πιθανώς κάποιας εστεράσης. Έτσι, εμφανίζονται κατά το στάδιο της πράσινης ωρίμανσης καθώς τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης μειώνονται, ενώ σημειώνουν μέγιστο στο στάδιο όπου ο καρπός είναι πλήρως μαύρος και η διαδικασία της υδρόλυσης είναι ιδιαίτερα έντονη ^[39]. Εκτός από τον 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και την δεμεθυλελευρωπαΐνη, προϊόντα της ενζυμικής υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης, αποτελούν επίσης και τα αγλυκα της ελευρωπαΐνης (πίνακας 1.7). *Παρά την έντονη διαδικασία υδρόλυσης, η ελευρωπαΐνη εξακολουθεί να υπερισχύει των συστατικών διάσπασης της* ^[40].

Σημαντική αύξηση παρατηρείται στα επίπεδα του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη, της τυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης και των γλυκοσιδικών μορφών τους κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση, η οποία σχετίζεται, για πολλά από αυτά τα συστατικά, με την διαδικασία υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη. Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να χαρακτηριστεί ως δείκτης ωρίμανσης του καρπού ^[44]. Επίσης, σημειώνεται μείωση των επιπέδων του κορνοσίδη, ο οποίος μετατρέπεται

στον μεταβολίτη halleridone^[43]. Αρκετά αργότερα από τον σχηματισμό της ελευρωπαΐνης, σημειώνεται σημαντική συσσώρευση βερμπασκοσίδη και άλλων συστατικών όπως τα φλαβονοειδή. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ποικιλίες με τα υψηλότερα επίπεδα ελευρωπαΐνης χαρακτηρίζονται από χαμηλές συγκεντρώσεις βερμπασκοσίδη, ενώ είναι δεδομένο ότι τα επίπεδα και των δύο συστατικών διαφέρουν σημαντικά από ποικιλία σε ποικιλία^[28].

1.3.3.3 Τριγλυκερίδια

Όσον αφορά το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα δηλαδή τα τριγλυκερίδια, ισχύει ότι η περιεκτικότητα της σάρκας του καρπού σε έλαιο αυξάνεται προοδευτικά όσο ωριμάζει ο καρπός. Εάν ωστόσο εκφραστεί ως περιεκτικότητα επί του ξηρού βάρους του καρπού, παρατηρείται αύξηση και σταθεροποίηση μετά από ένα σημείο. Στην πραγματικότητα η παραγωγή του ελαίου εξελίσσεται μέχρι ενός ορισμένου σταδίου της ωρίμανσης φθάνοντας σε ένα μέγιστο, στην συνέχεια η ποσότητα του παραμένει σταθερή^[41].

Κεφάλαιο 2

Επιτραπέζιος ελαιόκαρπος

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (International Olive Oil Council, IOOC), ορίζει ως επιτραπέζια ελιά «τον υγιή καρπό καλλιεργήσιμων ποικιλιών ελιάς (*Olea europaea* L.), η συγκομιδή του οποίου γίνεται σε στάδιο κατάλληλης ωριμότητας και η ποιότητα του είναι τέτοια ώστε μετά από κατάλληλη επεξεργασία που διασφαλίζει την σωστή συντήρηση, να προκύπτει ένα εδώδιμο προϊόν»^[45].

Ο καρπός της ελιάς διαφέρει σημαντικά από τις άλλες δρύπτες όσον αφορά τη χημική του σύσταση και κατ' επέκταση τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η παρουσία του πικρού σεκοϊριδοειδούς (ελευρωπαΐνη), η χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (2.6 – 6%) συγκριτικά με άλλες δρύπτες (12% ή περισσότερο) και η υψηλή περιεκτικότητα σε έλαιο (12 – 30 % ανάλογα με την ποικιλία και την περίοδο του χρόνου) καθιστούν την επεξεργασία της ελιάς απαραίτητη. Ενώ άλλες δρύπτες είναι εδώδιμες απευθείας από το δέντρο, κάτι τέτοιο δεν ισχύει για τον καρπό της ελιάς ο οποίος υφίσταται μία σειρά διαδικασιών κατά τις οποίες συντελούνται φυσικά, χημικά και βιολογικά φαινόμενα. Στόχος της επεξεργασίας του καρπού είναι η απομάκρυνση ή αποικοδόμηση της ελευρωπαΐνης προκειμένου να μειωθεί η έντονη πικρή γεύση και ο καρπός να είναι πιο εύληπτος.

Η εκπίκρυνση επιτυγχάνεται με την χρήση κάποιου μέσου όπως νερό, άλμη (υδατικό διάλυμα NaCl ή ξηρό αλάτι) ή άλκαλι (NaOH ή KOH). Ένα από τα στάδια της διαδικασίας εκπίκρυνσης σε ορισμένες περιπτώσεις είναι η ζύμωση κατά την οποία διαμορφώνονται τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού. Υπάρχουν ακόμη περιπτώσεις όπου η διαδικασία της εκπίκρυνσης πραγματοποιείται φυσικά πάνω στο δέντρο όπως γίνεται με την ελληνική ποικιλία Θρούμπα και την ιταλική Amele d'Andria. Ο βαθμός εκπίκρυνσης ποικίλει ανάλογα με το επιθυμητό τελικό αποτέλεσμα και εξαρτάται σημαντικά από την ποικιλία. Επίσης οι τρόποι εκπίκρυνσης διαφέρουν ανά περιοχή.

Κατά την διαδικασία της εκπίκρυνσης συντελούνται αλλαγές αναφορικά με την χημική σύσταση του καρπού. Ορισμένες μέθοδοι επιδρούν σημαντικά επί του καρπού μειώνοντας τα επίπεδα των βιοδραστικών συστατικών, ενώ άλλες είναι πιο ήπιες. Επιπλέον από κάθε μέθοδο εκπίκρυνσης προκύπτει κάποια ποσότητα αποβλήτου λιγότερο ή περισσότερο εμπλουτισμένη σε βιοδραστικούς μεταβολίτες. Η δυνατότητα

ανάκτησης αυτών από το απόβλητο το αναδεικνύει άμεσα σε μία εκμεταλλεύσιμη πηγή παραλαβής των βιοδραστικών συστατικών του ελαιοκαρπού.

2.1 Επιτραπέζιες ποικιλίες

Οι επιτραπέζιες ποικιλίες (όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 1.2) χαρακτηρίζονται κυρίως από τον μεγάλο μέγεθος του καρπού και την χαμηλή απόδοση σε λάδι. Γενικά τα κριτήρια για τον χαρακτηρισμό μίας ποικιλίας ως επιτραπέζια είναι : το μέγεθος και το σχήμα του καρπού, η αναλογία σάρκας προς πυρήνα, η υφή και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της σάρκας, η ευκολία αποκόλλησης του πυρήνα και το πάχος της επιδερμίδας. Για την παρασκευή επιτραπέζιου καρπού χρησιμοποιούνται είτε οι επιτραπέζιες ποικιλίες είτε οι ποικιλίες διπλής χρήσης.

Πίνακας 2.1 Ελληνικές επιτραπέζιες ποικιλίες και ποικιλίες διπλής χρήσης^[135]

Επιτραπέζιες ποικιλίες		Ποικιλίες διπλής χρήσης	
Αδρόκαρπη	<i>Olea europaea</i> var <i>Mayor</i> ή <i>Punera</i>	Αμυγδαλολιά	<i>Olea europaea</i> var. <i>Amygdaliformis</i>
Βασιλικάδα	<i>Olea europaea</i> var <i>Regalis</i>	Θρουμπολιά	<i>Olea europaea</i> var . <i>Media oblonga</i>
Καλαμών	<i>Olea europaea</i> var. <i>Ceraticarpa</i>	Κοθρέικη	<i>Olea europaea</i> var. <i>Minor rotunda</i>
Καρολιά	<i>Olea europaea</i> var. <i>Oblonga</i>	Κορωνέικη	<i>Olea europaea</i> var. <i>Mastoides</i>
Καρυδολιά	<i>Olea europaea</i> var . <i>Maxima</i>	Μεγαρίτικη	<i>Olea europaea</i> var. <i>Argentana</i>
Κολυμπάδα	<i>Olea europaea</i> var. <i>Uberina</i>		
Κονσερβολιά	<i>Olea europaea</i> var. <i>Rotunda</i>		
Χαλκιδικής	<i>Olea europaea</i> var. <i>Rubrotunda</i>		

Σύμφωνα με την οδηγία 2081/92/ΕΟΚ ορισμένες ελληνικές ποικιλίες ελιάς χαρακτηρίζονται ως προϊόντα προστασίας γεωγραφικής προέλευσης ΠΓΕ και ως προϊόντα ονομασίας προέλευσης ΠΟΠ. Στα προϊόντα ΠΓΕ ανήκει η Κονσερβολιά Άρτας, ενώ στα ΠΟΠ περιλαμβάνονται οι Ελιές Καλαμάτας, η Κονσερβολιά Άμφισσας, Αταλάντης, Ροβίων, Στυλίδας, Πηλίου Βόλου και η θρούμπα Θάσου, Χίου και Ρεθύμνης Κρήτης^[46].

Μεταξύ των ποικιλιών που καλλιεργούνται στα ελληνικά εδάφη ανήκουν ορισμένες ξένες ποικιλίες κυρίως ισπανικές, ιταλικές και γαλλικές. Βέβαια λόγω διαφοράς στις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες, ο καρπός που προκύπτει διαφέρει σημαντικά από μορφολογικής άποψης. Οι κυριότερες ξένες ποικιλίες που καλλιεργούνται είναι οι Arbequina, Ascolana, Frantoio, Gordal, Leccino, Manzanilla και Picholine^[47].

2.2 Τρόποι επεξεργασίας

Υπάρχει ένα πλήθος διαθέσιμων τρόπων επεξεργασίας των καρπών της ελιάς. Αυτοί εξαρτώνται από την ποικιλία, τον τεχνολογικό εξοπλισμό και τα παραδοσιακά χαρακτηριστικά που έχουν διαμορφωθεί ανά περιοχή. Με κάθε έναν από αυτούς τους τρόπους είναι δυνατή η επεξεργασία οποιασδήποτε ποικιλίας. Ωστόσο για εμπορικούς σκοπούς, κάθε ποικιλία επιλέγεται να επεξεργαστεί με συγκεκριμένο τρόπο ο οποίος θα επιτύχει το βέλτιστο οργανοληπτικό αποτέλεσμα.

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου μαζί με το Codex Alimentarius (CODEX STAN 66-1981) διατύπωσαν έναν τρόπο ταξινόμησης των επιτραπέζιων καρπών ανάλογα με τον τύπο της ελιάς και τον εμπορικό τρόπο επεξεργασίας. Με βάση το πρώτο κριτήριο προκύπτουν τρεις κατηγορίες οι οποίες είναι οι πράσινες ελιές, οι ελιές που βρίσκονται σε στάδιο αλλαγής χρώματος και οι μαύρες ελιές.

Οι δύο βασικές κατηγορίες που προκύπτουν ανάλογα με τον τρόπο επεξεργασίας είναι οι επεξεργασμένες ελιές σε άλμη και οι μη επεξεργασμένες ελιές σε άλμη. Ο όρος επεξεργασμένες ή μη απευθύνεται στην κατεργασία ή μη του καρπού με άλαλι (NaOH) προς συντόμευση της εκπίκρυνσης. Στον πίνακα 2.2 παρατίθενται οι κατηγορίες όπως προτίνονται από το Codex Alimentarius.

Πίνακας 2.2 Ταξινόμηση των επιτραπέζιων ποικιλιών ελιάς ^[48]

Τύπος	Χαρακτηριστικά καρπού	Τρόπος επεξεργασίας
Πράσινες ελιές	Συγκομιδή στο στάδιο της "πράσινης ώριμης ελιάς" όπου ο καρπός έχει αποκτήσει το οριστικό του μέγεθος και η επιδερμίδα του είναι πράσινη	Επεξεργασμένες πράσινες ελιές σε άλμη : κατεργασία καρπού με άλαλι και τοποθέτηση σε άλμη όπου υποβάλλεται σε πλήρη (Ισπανικού τύπου) ή μερική γαλακτική ζύμωση. Μέσα συντήρησης : παστερίωση ή αποστείρωση, προσθήκη συντηρητικών, ψύξη.
		Μη επεξεργασμένες πράσινες ελιές σε άλμη : τοποθέτηση απευθείας σε άλμη και διατήρηση με φυσική ζύμωση
Ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος	Συγκομιδή στο στάδιο αλλαγής χρώματος όπου η πλήρης ωρίμανση έχει επιτευχθεί, η επιδερμίδα του καρπού είναι ερυθρή έως καφέ.	Επεξεργασμένες πράσινες ελιές σε άλμη : κατεργασία με άλαλι και διατήρηση με φυσική ζύμωση α) σε άλμη, β) με θερμική κατεργασία, και γ) με συνδυασμό των δύο.
		Μη επεξεργασμένες πράσινες ελιές σε άλμη : τοποθέτηση απευθείας σε άλμη και διατήρηση με φυσική ζύμωση

Τύπος	Χαρακτηριστικά καρπού	Τρόπος επεξεργασίας	
Οξειδωμένες μαύρες ελιές	Προκύπτουν είτε από πράσινες ελιές είτε από ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος.	<u>Επεξεργασμένες ελιές σε άλμη</u> : Οι καρποί αποκτούν μαύρο χρώμα μέσω οξείδωσης. Η εκπίκραση γίνεται με χρήση αλκάλεος, η συσκευασία γίνεται σε άλμη και η συντήρησή τους επιτυγχάνεται με αποστείρωση.	
Μαύρες ελιές	Συγκομιδή στο στάδιο της "μαύρης ώριμης ελιάς", ή λίγο πριν την πλήρη ωρίμανση, το χρώμα της επιδερμίδα αλλά και της σάρκα του καρπού ποικίλει από ιώδες έως σκούρο μαύρο.	<p>1. Μαύρες ελιές σε άλμη Πρόκειται για καρπούς με λεία και γυαλιστερή επιδερμίδα.</p>	<p><u>Επεξεργασμένες μαύρες ελιές σε άλμη</u> <u>Μη επεξεργασμένες μαύρες ελιές σε άλμη (Ελληνικού τύπου)</u> Διαθέτουν ιδιαίτερη φρουτώδη και ελαφρά πικρή γεύση.</p>
		<p>2. Ζαρωμένες μαύρες ελιές : Η συγκομιδή τους γίνεται λίγο πριν την πλήρη ωρίμανση. Ύστερα από μία σύντομη εμβάπτιση σε ασθενές διάλυμα NaOH, η συντήρησή τους γίνεται τοποθετώντας ξηρό αλάτι πάνω από τους καρπούς.</p>	
		<p>3. Μη επεξεργασμένες φυσικώς ζαρωμένες μαύρες ελιές : Η συγκομιδή τους γίνεται σε στάδιο πλήρους ωρίμανσης αφού έχουν ζαρώσει φυσικά πάνω στο δέντρο. Αμέσως μετά γίνεται τοποθέτησή τους σε άλμη.</p>	
		<p>4. Μαύρες ελιές σε ξηρό αλάτι : Η επιδερμίδα τους έχει ζαρωμένη όψη ενώ είναι εντελώς άθικτη.</p>	
		<ul style="list-style-type: none"> Επεξεργασμένες μαύρες ελιές σε ξηρό αλάτι : Η συγκομιδή γίνεται στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης. Οι καρποί υφίστανται ελαφριά κατεργασία με άλκαλι ενώ συντηρούνται με εναλλασσόμενα στρώματα ξηρού αλατιού. 	
		<ul style="list-style-type: none"> Μη επεξεργασμένες μαύρες ελιές σε ξηρό αλάτι : Η συγκομιδή γίνεται στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης. Απευθείας οι καρποί επεξεργάζονται σε εναλλασσόμενα στρώματα ξηρού αλατιού. Διατηρούν πικρή και φρουτώδη γεύση. 	
		<ul style="list-style-type: none"> Μη επεξεργασμένες φυσικώς ζαρωμένες ελιές σε ξηρό αλάτι : Η συγκομιδή γίνεται στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης όπου οι καρποί έχουν ζαρώσει φυσικά πάνω στο δέντρο. Συντηρούνται με εναλλασσόμενα στρώματα ξηρού αλατιού. 	
<ul style="list-style-type: none"> Μη επεξεργασμένες μαύρες ελιές τρυπημένες με ξηρό αλάτι : Η συγκομιδή γίνεται στο στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, αφού η επιδερμίδα του καρπού έχει τρυπηθεί με αλάτι. Η συντήρηση γίνεται σε εναλλασσόμενα στρώματα ξηρού αλατιού. 			

Τύπος	Χαρακτηριστικά καρπού	Τρόπος επεξεργασίας
		5. Αφυδατωμένες μαύρες ελιές : Προκύπτουν από ώριμους καρπούς, εφόσον αυτοί αποχρωματιστούν και αφυδατωθούν ελαφρά με αλάτι και με ήπια θέρμανση.
Τσακιστές ελιές	Προκύπτουν είτε από πράσινες ελιές είτε από ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος.	Οι νωποί καρποί ή καρποί που έχουν ήδη επεξεργαστεί στην άλμη, υποβάλλονται σε μία ειδική κατεργασία όπου ο καρπός υφίσταται ρήξη χωρίς να επηρεαστεί ο πυρήνας. Διακρίνονται οι ακόλουθοι τύποι : (i) τσακιστές πράσινες ελιές σε άλμη, μη επεξεργασμένες, (ii) μη επεξεργασμένες πράσινες ελιές σε άλμη, τσακιστές, (iii) τσακιστές επεξεργασμένες πράσινες ελιές, (iv) τσακιστές ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος.
Χαρακτές ελιές	Προκύπτουν από πράσινες ελιές, από ελιές στο στάδιο αλλαγής χρώματος και από μαύρες ελιές.	Οι καρποί υφίστανται κάθετη τομή στην επιδερμίδα και σε μέρος της σάρκας, στη συνέχεια γίνεται κατεργασία στην άλμη με ή χωρίς ξύδι. Ελαιόλαδο και αρωματικά συστατικά μπορούν να προστεθούν για τον αρωματισμό του προϊόντος. Διακρίνονται δύο κατηγορίες : (i) οι επεξεργασμένες, όπου η αλκαλική κατεργασία γίνεται πριν την τομή, και (ii) οι μη επεξεργασμένες

* όπως και στις πράσινες ποικιλίες.

Ο πίνακας 2.2 συνοψίζει το σύνολο των δυνατών τρόπων επεξεργασίας του καρπού της ελιάς. Ωστόσο οι περισσότεροι εμπορικοί τύποι επεξεργασίας ανήκουν στις κατηγορίες Ισπανικού τύπου, τύπου Καλιφόρνιας και Ελληνικού τύπου, οι οποίες περιγράφονται ακολούθως.

2.2.1 Πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου

Οι πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου καταλαμβάνουν το 50% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής. Αυτός ο τύπος επεξεργασίας είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος για τις πράσινες ελιές.

Η συγκομιδή γίνεται στο στάδιο λίγο πριν την πλήρη ωρίμανση όπου ο καρπός έχει αποκτήσει το οριστικό του μέγεθος και η επιδερμίδα του είναι πράσινη – κίτρινη. Ακολουθούνται τρία στάδια τα οποία περιλαμβάνουν την κατεργασία με άλκαλι, την έκπλυση και την ζύμωση στην άλμη.

Κατά το στάδιο κατεργασίας με άλκαλι, οι ελιές βυθίζονται σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 2 – 2.5% (w/v), το οποίο εξαρτάται από την ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης και την θερμοκρασία. Οι καρποί παραμένουν βυθισμένοι για 8 – 12 h.

Η κατεργασία σταματά όταν το άλκαλι έχει δυεισδύσει σημαντικά στη σάρκα του καρπού. Η περίσσεια του αλκάλειος απομακρύνεται με την προσθήκη νερού και έτσι

εξουδετερώνεται το μέσο στο οποίο βρίσκονται οι ελιές. Η εξουδετέρωση, επιτυγχάνεται επιπλέον με την προσθήκη υπολογισμένης ποσότητας υδροχλωρικού οξέος ή με προσθήκη αέριου CO₂ στο υδατικό μέσο. Μετά το πέρας της έκπλυσης, η περιεκτικότητα σε άλας και σάκχαρα μεταβάλλεται ενώ η περιεκτικότητα σε έλαιο παραμένει σταθερή.

Το τελικό βήμα περιλαμβάνει ζύμωση σε άλμη περιεκτικότητας 5 – 9% (w/v) σε NaCl. Η ζύμωση ξεκινά είτε αυθόρμητα ή υποβοηθούμενη. Ένας κατάλληλος συνδυασμός pH και αλατότητας επιτρέπει την σωστή συντήρηση του επιτραπέζιου καρπού.

2.2.2 Ελιές τεχνητά μαυρισμένες τύπου Καλιφόρνιας

Οι επιτραπέζιες ελιές τύπου Καλιφόρνια καλύπτουν το 25% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής. Οι ελιές αυτού του τύπου συλλέγονται είτε πριν την πλήρη ωρίμανση ή αφού έχει ξεκινήσει η αλλαγή του χρώματος της επιδερμίδας. Στο στάδιο αυτό ο καρπός είναι ιδιαίτερα συμπαγής και η παραγωγή του ελαίου δεν έχει ολοκληρωθεί. Ενδέχεται, εάν είναι απαραίτητο, να γίνει αποθήκευση των καρπών σε άλμη για αρκετούς μήνες υπό αναερόβιες συνθήκες

Σε αυτόν τον τύπο επεξεργασίας, οι καρποί υφίστανται διαδοχικές κατεργασίες με διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 1 – 2% (w/v), όπου το NaOH δεισιδύει στη σάρκα και φθάνει μέχρι τον πυρήνα. Μετά από κάθε κατεργασία με άλκαλι, ακολουθεί έκπλυση των καρπών με νερό και αερισμός.

Η αερόβια κατεργασία με άλκαλι προκαλεί δραματικές αλλαγές στην υφή της σάρκας. Κατά την διάρκεια της επεξεργασίας τόσο η επιδερμίδα όσο και η σάρκα αλλάζουν σταδιακά χρώμα από πράσινο σε σκούρο καφέ έως μαύρο. Η αλλαγή του χρώματος κατά την διάρκεια της κατεργασίας σχετίζεται με την οξείδωση και τον πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων.^{[49], [50], [51]}

Ύστερα από ρύθμιση του μαύρου χρώματος με υδατικά διαλύματα γλυκονικού ή γαλακτικού σιδήρου, οι καρποί συσκευάζονται σε άλμη και η διαδικασία ολοκληρώνεται με αποστείρωση.

2.2.3 Ελληνικοί τύποι επιτραπέζιων ελαιοκάρπων

Πρόκειται για μαύρες ώριμες ελιές, η συγκομιδή των οποίων γίνεται σε στάδιο πλήρους ωρίμανσης. Στο στάδιο αυτό υπάρχει συσσώρευση των ανθοκυανινών, ενώ τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες δεν επιδρούν πλέον στο χρώμα. Η φυσική ωρίμανση οδηγεί σε αποικοδόμηση των πηκτινών και αλλαγή στην υφή της σάρκας.

Κανέννας από τους γνωστούς τρόπους κατεργασίας της μαύρης ώριμης ελιάς δεν κάνει χρήση της κατεργασίας με άλκαλι.

Οι κύριοι τύποι μαύρης ελιάς είναι οι φυσικώς ώριμες μαύρες ελιές σε άλμη (Ελληνικού τύπου) ποικιλίας Χαλκιδικής, οι φυσικώς ώριμες μαύρες ελιές τύπου Καλαμάτας ποικιλίας Καλαμών και οι φυσικώς μαύρες ελιές ξηρού αλατίσματος ποικιλίας Θρούμπα Θάσου.

Οι φυσικώς ώριμες μαύρες ελιές σε άλμη ή αλλιώς Ελληνικού τύπου καταλαμβάνουν το υπόλοιπο 25% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής. Στην περίπτωση αυτή οι καρποί συλλέγονται σε στάδιο πλήρους ωρίμανσης προτού ωστόσο η επιδερμίδα να έχει ζαρώσει. Στη συνέχεια οι καρποί τοποθετούνται σε διάλυμα άλμης περιεκτικότητας 8% για ορισμένο χρονικό διάστημα. Αυτό κάνει την διαδικασία της ζύμωσης ασφαλέστερη καθώς γίνεται αποφυγή οποιαδήποτε επικίνδυνης δράσης μικροοργανισμών. Οι καρποί επίσης μπορούν να συντηρηθούν στην άλμη με προσθήκη μικρής ποσότητας ξυδιού.

Οι φυσικώς ώριμες μαύρες ελιές τύπου Καλαμάτας ξεπικρίζονται σε νερό ή άλμη. Η ζύμωση γίνεται σε άλμη 8% - 10% και ολοκληρώνεται σε διάστημα 6-9 μηνών. Η συντήρηση τους γίνεται με την προσθήκη ελαιολάδου και ξυδιού.

Τέλος οι φυσικώς μαύρες ελιές σε ξηρό αλάτι προκύπτουν από καρπούς σε πλήρη ωρίμανση. Οι καρποί τοποθετούνται με εναλλασσόμενα στρώματα ξηρού αλατιού μέσα σε καλάθια. Παραμένουν έτσι για 20 με 60 ημέρες αναλόγως της ποικιλία. Η διαδικασία προκαλεί αφυδάτωση και η όψη των καρπών είναι ζαρωμένη. Το προϊόν που προκύπτει είναι αλμυρό και ελαφρώς πικρό.^[28]

2.2.4 Ελιές επεξεργασμένες με νερό

Γενικά η εκπίκρυνση των καρπών της ελιάς πραγματοποιείται κάνοντας χρήση κάποιου μέσου όπως είναι η άλμη, το υδατικό διάλυμα κάποιας βάσης (NaOH), το ξηρό αλάτι και το νερό.

Το τελευταίο χρησιμοποιείται κυρίως στην οικιακή παρασκευή επιτραπέζιου ελαιόκαρπου και αποτελεί τον ηπιότερο τρόπο εκπίκρυνσης. Προκειμένου να είναι εφικτή η διείσδυση του νερού στην σάρκα της ελιάς ώστε να απομακρυνθεί η «πικρή» ελευρωπαΐνη και να επιτευχθεί η εκπίκρυνση είναι αναγκαία η ρήξη ή χάραξη του καρπού. Αφού γίνει αυτό, οι καρποί υποβάλλονται σε αλληπάλληλη κατεργασία με νερό το οποίο αλλάζει καθημερινά για μία εβδομάδα ή περισσότερο έως ότου επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός εκπίκρυνσης. Όταν ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, οι καρποί τοποθετούνται σε ένα τελικό διάλυμα άλμης το οποίο

αποτελείται από αλάτι (8-10%) και ξύδι. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι οι καρποί είναι έτοιμοι προς κατανάλωση σε χρονικό διάστημα λίγων εβδομάδων. Οι καρποί θα διατηρούν μία ελαφρά πικρή γεύση καθώς η απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης είναι περιορισμένη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ελιές Καλαμών και οι Μεσογειακού τύπου τσακιστές ελιές^[27].

2.3 Μεταβολές στην χημική σύσταση

Κατά την διάρκεια των διαδικασιών της εκπίκρασης των καρπών της ελιάς προκειμένου αυτοί να καταστούν βρώσιμοι, συντελούνται δύο σημαντικά φαινόμενα. Αυτά καθορίζουν τις ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές που υφίστανται τα συστατικά του καρπού κατά την επεξεργασία.

Τα φαινόμενα αυτά έχουν είτε ευεργετικές είτε μη, συνέπειες όσον αφορά στην τελική ποιότητα του καρπού. Η μείωση για παράδειγμα των επιπέδων της ελευρωπαΐνης αφενός καθιστά τον καρπό βρώσιμο εφόσον μειώνει την πικρή του γεύση, αφετέρου είναι ευνοϊκή διότι επιτρέπει την έναρξη της γαλακτικής ζύμωσης καθώς η ελευρωπαΐνη την αναστέλλει. Η απώλεια ωστόσο διαφορών βιοδραστικών φαινολικών συστατικών μειώνει την συνολική περιεκτικότητα του καρπού σε φαινόλες. Παρά τις όποιες μειώσεις, τα επίπεδα των φαινολών παραμένουν ικανοποιητικά ώστε να προστατεύσουν το έλαιο του καρπού από οξειδώσεις. Συνολικά ωστόσο η σταθερότητα του καρπού μειώνεται κατά τις διάφορες κατεργασίες.

2.3.1 Μεταβολές λόγω διάχυσης

Το ένα από τα δύο σημαντικά φαινόμενα που συντελούνται αφορά την διάχυση προς κάθε κατεύθυνση των συστατικών από το εσωτερικό του καρπού προς το μέσον και αντίστροφα. Η εισροή και η εκροή των διαφόρων συστατικών λόγω όσμωσης εξαρτάται από την διαπερατότητα της επιδερμίδας του καρπού, από την σχετική συγκέντρωση των συστατικών αλλά και από την φύση αυτών. Τα συστατικά του καρπού διακρίνονται ανάλογα με τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα αλκάνια μακράς αλυσίδας, τις αλδεΐδες, τους αλειφατικούς εστέρες και τα τριγλυκερίδια τα οποία είναι πρακτικά αδιάλυτα στο νερό. Σε αυτά τα συστατικά δεν παρατηρείται κάποια ουσιαστική μεταβολή καθώς είναι αδύνατη η διάχυση τους. Στην δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται τα περισσότερο υδατοδιαλυτά συστατικά όπως καρβοξυλικά οξέα, τριτερπενικές αλκοόλες, οξέα και γλυκοσίδες. Τα τελευταία απελευθερώνονται στο υδατικό μέσο σχεδόν άμεσα.

2.3.2 Μεταβολές λόγω χημικών αντιδράσεων

Το δεύτερο φαινόμενο σχετίζεται με την αντίδραση των συστατικών που χρησιμοποιούνται ως μέσα εκπίκρασης, με τις δραστικές λειτουργικές ομάδες των διαφόρων συστατικών τις επιδερμίδας, της σάρκας και του πυρήνα του καρπού. Από τις αντιδράσεις αυτές προκύπτουν υδρόφιλα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Όσον αφορά το NaOH, αρχικά επιδρά στην επιδερμίδα του καρπού αντιδρώντας με τα κηρώδη συστατικά που την συνιστούν. Εκεί διαλύει και αφαιρεί την πλειοψηφία τους με αποτέλεσμα να διεισδύει στο εσωτερικό του καρπού. Κατ' αυτόν τον τρόπο μειώνει δραστικά το πάχος των εξωτερικών επιδερμικών στιβάδων επιδρώντας αρνητικά στην συνοχή των ιστών του καρπού. Η ίδια συνέπεια προκύπτει και στην περίπτωση του ξηρού αλατιού, όπου τα κηρώδη συστατικά απομακρύνονται πλήρως και τα κύτταρα των παρεγχυματικών ιστών κάτω από την επιδερμίδα καταστρέφονται. Αντιθέτως η χρήση άλμης δεν προκαλεί κάποια ουσιαστική βλάβη στην επιδερμίδα του καρπού.^{[68],[69]}

Το NaOH αντιδρά με κάθε συστατικό της επιδερμίδας, της σάρκας και του πυρήνα το οποίο διαθέτει καρβοξυλικές και υδροξυλικές λειτουργικές ομάδες. Αυτά τα συστατικά αντιδρούν με το καυστικό νάτριο και σχηματίζουν άλατα τα οποία απομακρύνονται κατά την κατεργασία και διαλύονται στο αλκαλικό διάλυμα ή στην άλμη. Επιπλέον εστέρες ή ενώσεις υπό την μορφή ακετάλης υδρολύονται και ελευθερώνονται στο υδατικό μέσο.

2.3.3 Μεταβολές λόγω ζύμωσης

Μετά την προσθήκη των καρπών στην άλμη, γίνεται λόγω διάχυσης μεταφορά διαφόρων συστατικών από και προς αυτήν. Μεταξύ αυτών που μεταφέρονται από τον καρπό προς την άλμη είναι τα σάκχαρα, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, φαινολικά συστατικά κλπ. Επιπλέον το αλάτι διαπερνά την σάρκα της ελιάς με αποτέλεσμα να μειώνεται η περιεκτικότητά του στο διάλυμα. Έτσι σύντομα η άλμη μετατρέπεται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για ξεκινήσει μία αναερόβια ζύμωση από τους εγγενείς μικροοργανισμούς του καρπού. Ορισμένες φορές ωστόσο προστίθενται έτοιμες εναρκτήριοιες καλλιέργειες για να διευκολύνουν και να επιταχύνουν την ζύμωση.

Η ζύμωση λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζεται από αύξηση των μη σπορογόνων Gram (-) βακτηριών μέχρι ενός μεγίστου πληθυσμού. Χαρακτηριστικό επίσης αποτελεί η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων CO₂ το οποίο μειώνει το pH περίπου στο 5 και δημιουργεί αναερόβιες συνθήκες. Στο σημείο αυτό ξεκινά το δεύτερο στάδιο στο οποίο οι νέες συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη των γαλακτοβακίλλων και των ζυμών. Ωστόσο, η ελευρωπαΐνη παρεμποδίζει την

ανάπτυξη του *Lactobacillus plantarum* επομένως ανάλογα με την συγκέντρωση της άλλοτε επικρατούν οι ζύμες και άλλοτε οι γαλακτοβάκιλλοι. Αυτά καταναλώνουν τα ζυμώσιμα συστατικά και παράγουν γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη μείωση των Gram(-) βακτηρίων. Εκτός από το γαλακτικό οξύ παράγεται CO₂, οξικό οξύ και αιθανόλη. Έτσι σταδιακά η οξύτητα αυξάνεται και οι αυστηρά αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων. Το τρίτο στάδιο διαρκεί μέχρι εξαντήσεως των ζυμώσιμων συστατικών. Σε αυτό επικρατούν ομοζυμωτικοί λακτοβάκιλλοι, όπως ο *Lactobacillus plantarum*, οι οποίοι παράγουν αποκλειστικά γαλακτικό οξύ από γλυκόζη και ολοκληρώνουν την ζύμωση. Στο τέλος της ζύμωσης το pH θα πρέπει να είναι μικρότερο από 4.0 προκειμένου να εξασφαλιστεί η σωστή συντήρηση του προϊόντος.

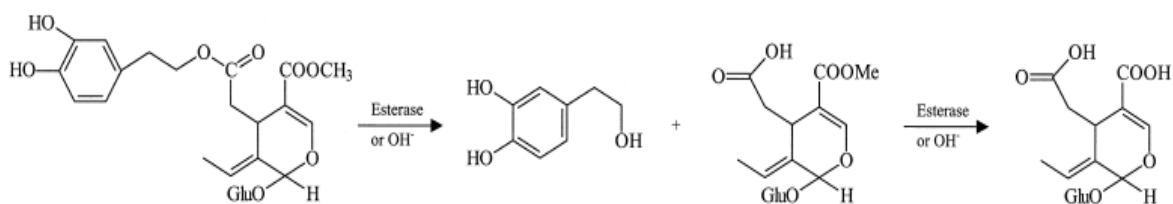
2.3.4 Μεταβολές στα φαινολικά και τριτερπενικά συστατικά

Όπως προκύπτει από τις παραπάνω παρατηρήσεις οι μεγαλύτερες μεταβολές κατά την διάρκεια της εκτίκρασης συντελούνται στα επίπεδα των φαινολικών και τριτερπενικών συστατικών. Οι αλλαγές αυτές επιδρούν τόσο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού όσο και στην συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού προϊόντος. Ο τρόπος επεξεργασίας είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει αυτές τις μεταβολές, ακολουθούμενος από την ποικιλία.

Μετά την επεξεργασία, παρατηρείται σημαντική μείωση στα φαινολικά συστατικά ενώ η ελευρωπαΐνη εξαφανίζεται σχεδόν πλήρως. Η μείωση αυτή ταυτίζεται χρονικά με αύξηση της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης στον καρπό όπου αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά μετά το πέρας της κατεργασίας.

Όσον αφορά τις επιτραπέζιες ελιές τύπου Καλιφόρνια, ενώ οι νωποί καρποί χαρακτηρίζονται από τους μεταβολίτες ελευρωπαΐνη, 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη, υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη και τα άγλυκα της ελευρωπαΐνης, μετά από την συντήρησή τους στην άλμη η ελευρωπαΐνη εξαφανίζεται και παρατηρείται αύξηση των άγλυκων της και της υδροξυτυροσόλης. Ωστόσο η οξειδωση παρουσία αέρα προκαλεί δραματικές αλλαγές στα φαινολικά συστατικά τα οποία αποτελούνται πλέον από υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη.^[51]

Στην περίπτωση της επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου, παρατηρείται ότι το NaOH αντιδρά με τις λειτουργικές ομάδες των συζευγμένων φαινολικών ενώσεων τις οποίες διασπά προς τα συστατικά τους. Χαρακτηριστική είναι η υδρόλυση του μορίου της ελευρωπαΐνης προς υδροξυτυροσόλη και τον 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη. Σε κατάλληλο pH υδρολύεται και η λιγότερο δραστική καρβομεθόξυ ομάδα οδηγώντας στο δικαρβοξυλικό μόριο του ολεοσίδη.



Εικόνα 2.1 Υδρόλυση της ελευρωπαΐνης ^[28]

Όσο εξελίσσεται η ζύμωση, τόσο στον καρπό όσο και στο μέσον, προκαλείται σημαντική μείωση στο pH η οποία οδηγεί στην υδρόλυση περισσότερων συστατικών. Συγκεκριμένα τα επίπεδα του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη φθίνουν ενώ αυξάνονται τα αντίστοιχα των προϊόντων υδρόλυσης. Σε χαμηλές τιμές pH υδρολύονται και όλοι οι υπόλοιποι γλυκοσίδες.

Όσον αφορά τα τριτερπενικά συστατικά, σημειώνεται σημαντική μείωση των επιπέδων τους στον καρπό και αύξηση στην άλμη. Αφενός πρόκειται για συστατικά τα οποία φυσιολογικά βρίσκονται στις εξωτερικές στιβάδες του καρπού και είναι πιο εύκολα εκχυλίσιμα, αφετέρου διαθέτουν όξινες δραστικές ομάδες οι οποίες αντιδρούν με το NaOH σχηματίζοντας άλατα τα οποία διαλύονται στο υδατικό μέσο.

Η εκπίκρυνση του καρπού σε «φυσικά συστήματα», δηλαδή απουσία βάσης, προκαλεί την ίδια αποικοδόμηση των φαινολικών και άλλων συστατικών, με σημαντικά πιο αργούς ρυθμούς.

2.4 Απόβλητα εκπίκρυνσης

Η διαδικασία εκπίκρυνσης του επιτραπέζιου καρπού της ελιάς παράγει τεράστιες ποσότητες υδατικών αποβλήτων ιδίως όταν πραγματοποιείται σε βιομηχανική κλίμακα. Στην Ισπανία για παράδειγμα για κάθε κιλό ελαιοκαρπών που επεξεργάζεται παράγονται 8.5 L υδατικών αποβλήτων εκ των οποίων το 1.5 L είναι αλκαλικό διάλυμα, τα υπόλοιπα 7.5 L νερά έκπλυσης, ενώ ο ετήσιος συνολικός όγκος φθάνει τα 10^8 L.^[70] Η διαχείριση αυτών των αποβλήτων είναι δύσκολη δεδομένου του υψηλού φαινολικού και οργανικού τους φορτίου. Η διάθεση τους οδηγεί σε ένα σοβαρό περιβαλλοντικό πρόβλημα σε επίπεδο Μεσογειακών χωρών αλλά και γενικότερα. Σε πολλές περιπτώσεις η απόθεση γίνεται σε ποτάμια ή απ'ευθείας στην θάλασσα^{[71],[72]}, ενώ σε άλλες περιπτώσεις τοποθετούνται σε υπαίθριες δεξαμενές προκειμένου να εξατμιστούν προκαλώντας οχλήσεις λόγω δυσάρεστων οσμών καθώς και πιθανότητα επιμόλυνσης του γύρω περιβάλλοντος.^{[70],[73],[74]}

Όσον αφορά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αποβλήτου, πρόκειται για ένα σκουρόχρωμο, μη διαυγές λύμα το οποίο φέρει υψηλό οργανικό φορτίο και πολυφαινολικά συστατικά τα οποία του προσδίδουν μία οξεία χαρακτηριστική οσμή.

Παρουσιάζει αντιβακτηριακές ιδιότητες, έχει φυτοτοξική δράση και αναστέλλει την βλάστηση των σπερμάτων. Η φυτοτοξικότητα οφείλεται στα υψηλά επίπεδα πολυφαινολών και στην παρουσία ορισμένων οργανικών οξέων όπως το οξικό και το φορμικό. Επιπλέον χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD, chemical oxygen demand).^[75]

Πίνακας 2.3 Χαρακτηριστικά χημικά συστατικά των υδατικών αποβλήτων εκπίκρανσης ^[75]	
<u>Οργανικό κλάσμα</u>	σάκχαρα, φαινολικά συστατικά (κυρίως κατεχόλη, τυροσόλη, 4-μεθυλοκατεχόλη, υδροξυτυροσόλη), αζωτούχα συστατικά (αμινοξέα), οργανικά οξέα, ταννίνες, πηκτίνες, καροτενοειδή
<u>Ανόργανο κλάσμα</u>	χλωριούχα, θειικά, φωσφορικά άλατα του καλίου, ασβέστιο, σίδηρος, μαγνήσιο, νάτριο, χαλκός (σε διάφορες χημικές δομές)

Η σύσταση του υδατικού αποβλήτου εξαρτάται σημαντικά από την ποικιλία και τον τρόπο επεξεργασίας. Λόγω των συνθηκών που επικρατούν κατά την διαδικασία εκπίκρανσης, τα κύρια συστατικά του αποβλήτου είναι αυτά που προκύπτουν από την πλήρη υδρόλυση των συζευγμένων φαινολικών ενώσεων. Έτσι δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν στα υδατικά απόβλητα τα σεκοϊριδοειδή ελευρωπαΐνη ή λιγκοτροσίδης διότι έχει επέλθει η πλήρης υδρόλυση τους. Ως εκ τούτου προκύπτουν μεγάλες ποσότητες υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης. Όσο πιο ήπιος είναι ο τρόπος επεξεργασίας τόσο μικρότερη είναι η έκταση αλλά και η ταχύτητα με την οποία συμβαίνουν τα υδρολυτικά φαινόμενα. Είναι αναμενόμενο λοιπόν ότι στα υδατικά απόβλητα από την επεξεργασία της ελιάς Ισπανικού τύπου όπου γίνεται χρήση NaOH, περιέχονται κυρίως υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη σε ποσότητες σημαντικά μεγαλύτερες συγκριτικά με περιπτώσεις όπου δεν έχει γίνει η χρήση αλκάλειος.

Τα τελευταία χρόνια εντείνονται διαρκώς οι προσπάθειες για την εύρεση νέων μεθόδων κατεργασίας των υδατικών αποβλήτων εκπίκρανσης. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι είτε χημικοί^{[77],[78],[79]} είτε βιολογικοί^{[74],[76]}, βάσει των οποίων επιτυγχάνεται η μείωση του πολυφαινολικού περιεχομένου του αποβλήτου.

Μία άλλη προοπτική για την λύση αυτού του προβλήματος αποτελεί η επιχείρηση ανάκτησης βιοδραστικών πολυφαινολών και άλλων βιοδραστικών συστατικών από το απόβλητο. Αυτή η λύση στοχεύει αφενός μεν στην μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου, αφετέρου δε στην αξιοποίηση του ως μία πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών^[80].

Κεφάλαιο 3

Βιολογικές δράσεις

Οι επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο αποτελούν κύρια συστατικά της Μεσογειακής διατροφής. Η τελευταία αποτελεί μία από τις πιο υγιεινές διατροφές παγκοσμίως, καθώς σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και μειωμένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου. Κύρια πηγή λίπους στην διατροφή αυτή είναι τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Ο καρπός της ελιάς αποτελεί πλούσια πηγή αυτών. Επιπλέον, η ελιά αποτελεί σημαντική πηγή βιταμινών (βιταμίνη Α, Ε και σύμπλεγμα βιταμινών Β) και ιχνοστοιχείων (νάτριο, ασβέστιο, σίδηρος). Οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις της βιταμίνης Ε και των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων μαζί με τις διαθέσιμες πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή βοηθούν στην προστασία του οργανισμού έναντι των ελευθέρων ριζών. Τα φαινολικά και άλλα μικροσυστατικά του καρπού της ελιάς όπως τα τριτερπενικά οξέα παρουσιάζουν μία σειρά από ενδιαφέρουσες δράσεις που αναπτύσσονται στις επόμενες παραγράφους.

Ένα ακόμη θετικό χαρακτηριστικό του καρπού της ελιάς όσον αφορά την διαθρεπτική του αξία, είναι ότι δύναται να αποτελέσει πηγή προβιοτικών. Σύμφωνα με νέες έρευνες, τα βακτήρια και οι μύκητες που είναι υπεύθυνοι για την ζύμωση σχηματίζουν ένα μικροσκοπικό στρώμα (biofilm) στην επιφάνεια του καρπού. Οι μικροοργανισμοί αυτοί εισέρχονται στην γαστρεντερική οδό όταν γίνεται η κατανάλωση του καρπού. Ορισμένα βακτήρια και στελέχη μυκήτων από αυτά που συναντώνται στον καρπό της ελιάς έχει βρεθεί ότι επιδρούν ευεργετικά στην υγεία του εντέρου. Παραδείγματος χάριν στην Ισπανική ποικιλία Gordal περίπου 100 δισεκατομμύρια λακτοβάκιλοι βρίσκονται στην επιφάνεια ενός καρπού. Πολλοί από αυτούς έχουν θετική επίδραση ενώ εξετάζεται η προβιοτική φύση των υπολοίπων^[120].

Σημαντικό μειονέκτημα του επιτραπέζιου καρπού ελιάς ωστόσο αποτελεί η υψηλή συγκέντρωση σε νάτριο. Αυτό οφείλεται στην χρησιμοποίηση του χλωριούχου νατρίου κατά την επεξεργασία του καρπού κυρίως για λόγους συντήρησης. Έτσι η κατανάλωση επιτραπέζιου καρπού ελιάς είναι περιορισμένη από άτομα με υψηλή αρτηριακή πίεση, καρδιακή ανεπάρκεια, ασθένειες νεφρών και άλλες παθήσεις που επηρεάζονται από την πρόσληψη νατρίου. Χαρακτηριστική περίπτωση καρπού με χαμηλά επίπεδα νατρίου είναι οι μαύρες ελιές στις οποίες η εκπίκρυνση έχει γίνει φυσικά πάνω στο δέντρο. Μία διαφορετική προσέγγιση σε αυτό το πρόβλημα έχει αναπτυχθεί στο τμήμα Βιοτεχνολογίας Τροφίμων στην Ισπανία. Η προσέγγιση αυτή

προτείνει την αντικατάσταση του χλωριούχου νατρίου με το χλωριούχο άλας του ψευδαργύρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται το επιθυμητό αποτέλεσμα στο τελικό προϊόν και ταυτόχρονα του προσδίδεται επιπρόσθετη διαθρεπτική αξία^[121].

3.1 Βιολογικές δράσεις τριτερπενικών συστατικών

Τα τριτερπενικά συστατικά και κυρίως τα τριτερπενικά οξέα μασλινικό και ολεανολικό αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά στην επιδερμίδα του καρπού της ελιάς ενώ συνιστούν το 0.08 – 1.16 % του συνολικού βάρους του καρπού^[52]. Επιπλέον περιέχονται τα συστατικά ερυθροδιόλη και ουβαόλη σε δευτερεύουσες ποσότητες και κυρίως στο στάδιο της πράσινης ώριμης ελιάς^[36]. Τα δύο κυρίαρχα τριτερπενικά οξέα δηλαδή το μασλινικό και το ολεανολικό οξύ διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων.

Το μασλινικό, οξύ διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς δρα παγιδεύοντας ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Η ικανότητα του να προστατεύει από την οξειδωση την LDL χοληστερόλη συντελεί στην επιβράδυνση ή ακόμα και την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης. Ακόμα η ικανότητα του να αποτρέπει την υπεροξειδωση των λιπιδίων της ηπατοκυτταρικής μεμβράνης του προσδίδει ηπατοπροστατευτική δράση.^{[53],[54]}

Το ολεανολικό και το μασλινικό οξύ παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την παραγωγή δύο κεντρικών μεσολαβητών της φλεγμονής, την ιντερλευκίνη-1β και την ιντερλευκίνη-6 το πρώτο, και το δεύτερο την ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (TNF-a).

Επιπλέον, το μασλινικό οξύ παρουσιάζει αντιμικροβιακή και αντιϊκή δράση. Συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί κατά των πρωτίστων του φύλου *Aricomplexa* όπου δρα ως αναστολέας πρωτεασών. Η αντιϊκή του δράση οφείλεται στην δράση κατά του HIV ιού αναστέλλοντας ισχυρά την HIV-πρωτεάση.^{[57],[58],[59]}

Μία ακόμα σημαντική δράση του εν λόγω συστατικού είναι η αντικαρκινική, καθώς δύναται να παρέχει φυσικούς μηχανισμούς άμυνας κατά πολλών τύπων καρκίνου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι παρέχει φυσική άμυνα κατά των καρκίνων του παχέος εντέρου (HT29 & Caco-2)^[60] καθώς επίσης προκαλεί απόπτωση στα κύτταρα του αστροκυττώματος (1321N1)^[61] και στα λευχαιμικά κύτταρα (U937)^[62]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί κυτταροτοξική δράση στην ακόλουθη σειρά καρκινικών κυττάρων: A549 (κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα), SK-OV-3 (καρκίνος των ωοθηκών), SK-MEL-2 (μελάνωμα), XF-498 (καρκίνος του κεντρικού νευρικού

συστήματος), *HCT-15* (καρκίνος του παχέος εντέρου), *HSC-2* (πλακώδες καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας), *HSG* (καρκίνος των σιελογόνων αδένων)^[63].

Το μασλινικό οξύ προκαλεί μείωση της αρτηριακής πίεσης σε απομονωμένη αορτή *in vitro* από αυθορμήτως υπερτασικά ποντίκια. Η δράση αυτή οφείλεται στην ικανότητα του να προκαλεί αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου NO, από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων^[64].

Τέλος δύο ακόμη σημαντικές δράσεις είναι η υπογλυκαιμική και η υπολιπιδαιμική. Το μασλινικό οξύ παρουσιάζει ισχυρή υπογλυκαιμική δράση καθώς αποτελεί αναστολέα του ενζύμου φωσφορύλαση του γλυκογόνου (GP). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος σε ποντίκια (KK-Ay) με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου του ήπατος^[65]. Στο ίδιο *in vivo* μοντέλο, βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη παρουσιάζοντας έτσι υπο-ινσουλιναϊκή δράση, ενώ δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις στο ήπαρ. Επίσης στερείται των παρενεργειών που προκαλούν τα συνήθη φάρμακα της κατηγορίας αυτής (όπως η υπερβολική αναστολή)^[66].

Επιπλέον το μασλινικό οξύ παρουσιάζει υπολιπιδαιμική δράση σε αρουραίους (Sprague-Dawley) στους οποίους είχε προκληθεί υπερλιπιδαιμία από διατροφή υψηλή σε χοληστερόλη. Αναστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου ακετυλο-CoA ακετυλοτρανσφεράση, προκαλεί μείωση στα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία του αίματος λόγω αναστολής της απορρόφησης και της αποθήκευσης των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, μειώνει την παραγωγή της λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) στο ήπαρ εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό αθηρωματικής βλάβης^[67].

3.2 Βιολογικές δράσεις φαινολικών συστατικών

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα απλά φαινολικά συστατικά όπως τα φαινολικά οξέα και οι φαινολικές αλκοόλες, τα συζευγμένα φαινολικά συστατικά όπως τα σεκοϊριδοειδή και ο βερμπασκοσίδης, και τα φλαβονοειδή.

3.2.1 Βιολογικές δράσεις φαινολικών οξέων και αλκοολών

Στα απλά φαινολικά συστατικά ανήκουν τα φαινολικά οξέα και οι φαινολικές αλκοόλες. Τα πρώτα είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και είναι γνωστά κατά κύριο λόγο για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Ωστόσο βιβλιογραφικά αναφέρεται μία σειρά σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων.

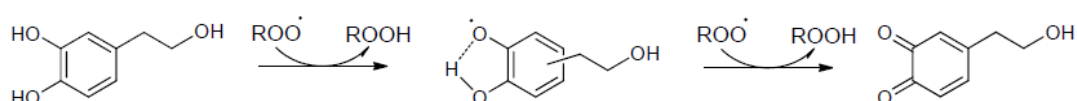
Χαρακτηριστική είναι η προστασία που παρέχουν κατά των καρδιαγγειακών νοσημάτων μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισής τους. Είναι δραστικά επίσης στην αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας και του διαβήτη τύπου 2.

Έχουν δράση προληπτική και θεραπευτική έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου. Η προληπτική δράση έγκειται στην ικανότητα παγίδευσης των ελευθέρων ριζών μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου. Ορισμένα φαινολικά οξέα είναι δραστικά στην αντιμετώπιση συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Παραδείγματα αποτελούν το καφεϊκό οξύ κατά της προμυελωτικής λευχαιμίας (HL-60) και του ηπατοκαρκινώματος, και το χλωρογενικό οξύ το οποίο παρουσιάζει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη καρκινώματος στην γλώσσα ποντικών.

Τα φαινολικά οξέα γενικά είναι δραστικά κατά των μικροοργανισμών *Bacillus subtilis subsp.niger*, *Escherichia coli*, και *Pseudomonas syringe*. Παραδείγματος χάρη το φερουλικό οξύ εμφανίζει δράση κατά του *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = 4.0 μM). Άλλα φαινολικά οξέα εμφανίζουν δράση κατά του *Listeria monocytogenes*.

Άλλες δράσεις είναι η αντιαλλεργική, η προστατευτική έναντι παρενεργειών από τις χημειοθεραπείες και η αντιοστεοκλαστική δράση.^[106]

Σημαντικότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας των φαινολικών αλκοολών στον καρπό της ελιάς είναι η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη. Και τα δύο συστατικά διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ιδίως το μόριο της υδροξυτυροσόλης διαθέτει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά του ελαιοκάρπου λόγω σταθεροποίησης της ρίζας στο σύστημα των όρθο υδροξυλίων.



Εικόνα 3.1 Μηχανισμός παγίδευσης ελευθέρων ριζών από την υδροξυτυροσόλη^[109]

Δεδομένης της αντιοξειδωτικής δράσης της, η υδροξυτυροσόλη δύναται να παρέχει προστασία έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου καθώς μειώνει τα επίπεδα των ενεργών μορφών οξυγόνου, ελαχιστοποιεί τις αλλοιώσεις του γενετικού υλικού και αποτρέπει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Συγκεκριμένα, η υδροξυτυροσόλη ασκεί προαποπτωτική δράση στα κύτταρα της προμυελωτικής λευχαιμίας (HL-60)^[110], αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του ανθρωπίνου μαστού (MCF-7)^[108], κυττάρων καρκίνου του εντέρου (HT29)^[112], κυττάρων ανθρωπίνου μελανώματος (M-14)^[111] και των κυττάρων ανθρωπίνου προστάτη (PC3)^[113].

Αποτελεί επίσης αντιαγγειογενετικό παράγοντα καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την μετάσταση και τον σχηματισμό σωληναριακής δομής ενώ ταυτόχρονα αυξάνει τον πληθυσμό των αποπτωτικών κυττάρων.^[107]

Άλλες δράσεις της υδροξυτυροσόλης είναι η αντιμικροβιακή^[114], η αντιϊική (anti – HIV)^[115], η αντιφλεγμονώδης^[116] και η δράση κατά της οστεοπόρωσης^[117]. Τέλος διαθέτει αντιυπερτασική ικανότητα λόγω δράσης έναντι των ιόντων ασβεστίου^[118].

Η τυροσόλη βρίσκεται στον καρπό της ελιάς σε μικρότερες ποσότητες συγκριτικά με την υδροξυτυροσόλη, έχει ωστόσο ενδιαφέρουσες δράσεις. Η αντιοξειδωτική της δράση είναι ασθενέστερη της υδροξυτυροσόλης. Η τυροσόλη προστατεύει από την οξείδωση την LDL χοληστερόλη. Επιπλέον έχει καρδιοτονωτικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες αποτρέποντας τις αλλαγές στα επίπεδα των νουκλεοτιδίων cAMP και cGMP στο μυοκάρδιο, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει δράση κατά της αρρυθμίας^[119].

3.2.2 Βιολογικές δράσεις συζευγμένων φαινολικών συστατικών

Τα σημαντικότερα συστατικά του καρπού της ελιάς τα οποία εντάσσονται σε αυτή την κατηγορία είναι η ελευρωπαΐνη, ο λιγκστροσίδης και τα παράγωγα τους (σεκοϊριδοειδή), καθώς επίσης και ο βερμπασκοσίδης.

Το μόριο της ελευρωπαΐνης χαρακτηρίζεται από ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις ορισμένες εκ των οποίων είναι η αντικαρκινική, η αντιμικροβιακή, η αντιφλεγμονώδης και η αντιϊκή.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αντιοξειδωτική δράση του μορίου η οποία διενεργείται με παραπάνω από έναν τρόπους. Η ελευρωπαΐνη αναστέλλει την οξείδωση που προκαλείται από τα ιόντα χαλκού στα μόρια της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον σε πειράματα in vivo με κουνέλια, στην διατροφή των οποίων γινόταν προσθήκη ελαιολάδου και ελευρωπαΐνης, παρατηρήθηκε ότι η LDL λιποπρωτεΐνη παρουσίαζε αυξημένη αντίσταση στην οξείδωση. Επιπλέον η ελευρωπαΐνη διαθέτει ικανότητα παγίδευσης ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα ριζών NO^{[81],[82]}.

Δύο ακόμη σημαντικές δράσεις είναι η αντιφλεγμονώδης και η δράση κατά της αθηροσκλήρωσης. Η πρώτη διενεργείται με αναστολή της δράσης του ενζύμου λιποξυγεννάση και της παραγωγής του λευκοτριενίου B₄^[82]. Η δράση κατά της αθηροσκλήρωσης οφείλεται εμμέσως στην προστατευτική δράση κατά της

οξειδωσης των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία αποτελεί ένα βήμα – σταθμό στον σχηματισμό της αθηρωματικής βλάβης^[81]. Η ελευρωπαΐνη παρουσιάζει υπολιπιδαιμική δράση, μειώνοντας τα ολικά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, ενώ ταυτόχρονα μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος σε κουνέλια με υπερχοληστερολαιμία^[136].

Η ελευρωπαΐνη παρουσιάζει δράση έναντι πολλών σειρών καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων LN-18 (πολύμορφο γλοιοβλάστωμα), TF-1a (ερυθρολευχαιμία), 786-O (νεφροκυτταρικό καρκίνωμα), T-47D (καρκινικά κύτταρα ανθρωπίνου μαστού), RPMI (κακόηθες μελάνωμα), LoVo (αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου)^[83]. Επιπλέον το άγλυκο της ελευρωπαΐνης μειώνει σημαντικά την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού, συγκριτικά με άλλα φαινολικά συστατικά^[84].

Η ισχυρή αντιμικροβιακή δράση της ελευρωπαΐνης αφορά τόσο τα Gram-αρνητικά όσο και τα Gram-θετικά βακτήρια καθώς επίσης και το μυκόπλασμα. Η αντιμικροβιακή δράση διενεργείται μέσω καταστροφής της κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βακτηρίων των οποίων ο πολλαπλασιασμός αναστέλλεται από το μόριο της ελευρωπαΐνης είναι οι *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* και *Helicobacter pylori*^{[85]-[95]}.

Αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές ενισχύουν τον ισχυρισμό για την αντιϊκή δράση του εν λόγω μορίου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ιοί του έρπη, της ηπατίτιδας, ο ροταϊός, ο ρινοϊός, ο κυνικός παρβοϊός, ο ιός λευχαιμίας της γάτας, ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός και ο ιός παραγρίπης τύπου 3^{[96],[97]}.

Άλλες δράσεις της ελευρωπαΐνης είναι η προστατευτική επί του δέρματος^[98] (καθώς δρα παγιδεύοντας ελεύθερες ρίζες σε επίπεδο δέρματος) και η αντιγηραντική^[99], ενισχύοντας *in vitro* την δράση του πρωτεασώματος. Αρκετές μελέτες (επιδημιολογικές και *in vitro*) υποδεικνύουν την θετική επίδραση της ελευρωπαΐνης στην συχνότητα εμφάνισης δυσλειτουργιών οι οποίες εξαρτώνται από την ηλικία, όπως η άνια και το Alzheimer^[100].

Ο λιγκστροσίδης ο οποίος περιέχεται σε δευτερεύουσες συγκεντρώσεις στον καρπό της ελιάς χαρακτηρίζεται επίσης από ορισμένες ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις. Χαρακτηριστική είναι η αναστολή που προκαλεί στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (3T3-L1) στοχεύοντας έτσι στην διαχείριση της παχυσαρκίας^[101]. Επιπλέον η ανασταλτική δράση του μορίου επί του ενζύμου της παγκρεατικής

λιπάσης αποτελεί μία ακόμη θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας^[104]. Το μόριο του λιγκστροσίδη συνίσταται από ένα άγλυκο και μία μονάδα σακχάρου, συνεπώς το μόριο αυτό υφίσταται υδρόλυση στις όξινες συνθήκες του στομάχου. Από μελέτες προσομοίωσης αυτών των συνθηκών έχει προκύψει ότι το άγλυκο του λιγκστροσίδη παραμένει σταθερό στις όξινες συνθήκες του στομάχου και εκεί δύναται να παρέχει προστασία έναντι του βακτηρίου *Helicobacter pylori*^[102]. Όσον αφορά τις αντικαρκινικές του ιδιότητες σημαντική είναι η δράση κατά των καρκινικών κυττάρων του ανθρωπίνου μαστού στοχεύοντας την πρωτεΐνη HER2 (η υπερέκφραση του γονιδίου που την κωδικοποιεί είναι πρωτεύουσας σημασίας στην εξέλιξη συγκεκριμένων τύπων καρκίνου του μαστού)^[103].

Ο βερμπασκοσίδης είναι ένας φαινυλοπροπανοειδής γλυκοσίδης γνωστός για τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες του^[105].

3.2.3 Βιολογικές δράσεις φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο. Ο καρπός της ελιάς αποτελεί σημαντική πηγή πολλών από αυτά. Πολυάριθμες προκλινικές και κλινικές μελέτες προτείνουν ότι τα φλαβονοειδή έχουν την δυνατότητα να αποτρέπουν αλλά και να θεραπεύουν διάφορες ασθένειες. Ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι μία διατροφή πλούσια σε φλαβονοειδή σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων.^[122]

3.3 Βιολογικές δράσεις λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά συστατικά του καρπού της ελιάς αποτελούν το 22% του βάρους του^[21]. Εξ αυτών το 80% περίπου συνίσταται από τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (monounsaturated fatty acids, MUFA), το 15% από κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFA) και το 5% από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFA). Τα λιπαρά οξέα τα οποία επικρατούν κατά κύριο λόγο στον καρπό είναι, κατά σειρά φθίνουσας περιεκτικότητας, το ελαϊκό (C18:1), το παλμιτικό (C16:0), το λινελαϊκό (C18:2) και το στεατικό (C18:0)^[123].

Η παρουσία πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στον καρπό της ελιάς, είναι σημαντική από πλευράς διαθρεπτικής αξίας δεδομένου ότι ο οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει και η ανεπάρκεια σε αυτά προκαλεί σοβαρές δυσλειτουργίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ποσοτικός προσδιορισμός με την χρήση φασματοσκοπίας NMR

Η μέτρηση της ακριβούς συγκέντρωσης ενός ή περισσότερων αναλυτών μέσα σε ένα μείγμα, μαζί με την ταυτοποίηση αγνώστων μορίων αποτελούν δύο από τους κύριους σκοπούς της αναλυτικής χημείας. Αν και υπάρχουν αρκετές τεχνικές που αποκρίνονται και στις δύο αυτές ανάγκες, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ικανοποιεί ταυτόχρονα και σε εξίσου υψηλό βαθμό και τους δύο παραπάνω στόχους. Αφενός αποτελεί μία πολύ χρήσιμη τεχνική για τον προσδιορισμό της δομής οργανικών και βιολογικών μορίων, αφετέρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών μορίων ακόμη και αν αυτά βρίσκονται σε ακατέργαστα εκχυλίσματα ή σε πολύπλοκα μείγματα, χωρίς να προηγηθεί διαχωρισμός από τα υπόλοιπα συστατικά. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση φασματοσκοπίας NMR μίας ή δύο διαστάσεων – με την δεύτερη να αποτελεί μία σχετικά νέα και πολλά υποσχόμενη εφαρμογή.

Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η ποσοτικοποίηση με την τεχνική της φασματοσκοπίας NMR είναι ότι όλες οι συχνότητες συντονισμού που παράγονται από έναν συγκεκριμένο πυρήνα έχουν ένταση ευθέως ανάλογη προς την μοριακή συγκέντρωση του αναλύτη και του αριθμού των πυρήνων που δημιουργούν αυτή τη συχνότητα.

$$\frac{\text{περιοχή ολοκλήρωσης}}{\text{αριθμός πυρήνων}} \propto \text{συγκέντρωση}$$

Η τεχνική του ποσοτικού NMR είναι ευρέως διαδεδομένη για ποσοτικούς σκοπούς. Πρωτίστως η τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο είναι η φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης. Εντούτοις σε ένα σύνθετο μείγμα, η επικάλυψη μεταξύ των κορυφών των διαφόρων συστατικών δημιουργεί σοβαρό περιορισμό στη χρήση του.

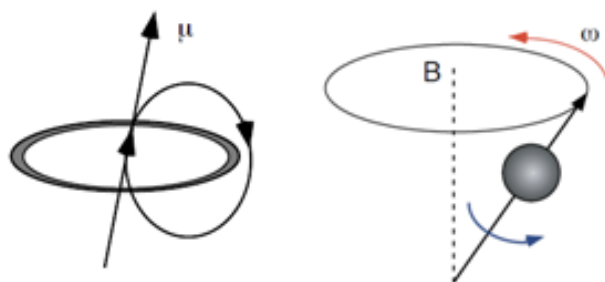
Η εφαρμογή του ποσοτικού NMR σε άλλους πυρήνες (^{13}C , ^{31}P) θα αποτελούσε ενδιαφέρουσα εναλλακτική αν δεν περιοριζόταν λόγω της χαμηλής φυσικής αφθονίας που οδηγεί σε μειωμένη ευαισθησία. Προσφάτως ωστόσο, με την ανάπτυξη τεχνολογιών που μειώνουν δραματικά το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) (χρήσης μαγνητών υψηλών πεδίων και τεχνολογιών CryoProbe) παρέχεται η

δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις με εφαρμογή στη μεταβιομηχανική, στα φαρμακευτικά και φυσικά προϊόντα.

Για να ξεπεραστούν προβλήματα χαμηλής ευαισθησίας και επικαλύψεων, η ποσοτική ανάλυση με χρήση φασματοσκοπίας NMR στρέφεται προς την χρήση πειραμάτων δύο διαστάσεων. Η διάκριση δύο ή περισσότερων σημάτων τα οποία επικαλύπτονται σε ένα φάσμα $^1\text{H-NMR}$ καθίσταται τις περισσότερες φορές εφικτή σε φάσματα NMR που προκύπτουν από την χρήση κάποιου πειράματος δύο διαστάσεων. Η εφαρμογή αυτή ωστόσο δεν στερείται μειονεκτημάτων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα πειράματα δύο διαστάσεων έχουν μεγαλύτερη χρονική διάρκεια.

4.1 Θεωρητική βάση του πειράματος

Για την ερμηνεία του φαινομένου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρέπει να ανατρέξουμε στην κβαντομηχανική ιδιότητα του spin (ή ιδιοπεριστροφή). Το spin των πυρήνων προσδιορίζεται από τον κβαντικό αριθμό του spin I ο οποίος μπορεί να πάρει τιμές $0, \frac{1}{2}, 1, 1\frac{1}{2}$ κλπ. Το πρωτόνιο για παράδειγμα έχει $I = 1/2$, το ^{14}N έχει $I = 1$. Με το πυρηνικό spin συνδέεται η μαγνητική διπολική ροπή μ με τύπο, $\mu = \gamma I \hbar$, όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος, μία ιδιότητα χαρακτηριστική για κάθε είδος πυρήνα. Το φαινόμενο του NMR αφορά μόνο πυρήνες που εμφανίζουν στροφορμή, έχουν δηλαδή μη μηδενικό κβαντικό αριθμό spin και μπορούν έτσι να δημιουργήσουν μαγνητικά δίπολα όπως αυτό της εικόνας 4.1 .



Εικόνα 4.1 Μαγνητικό δίπολο (αριστερά), μεταπτωτική κίνηση με συχνότητα Larmor (δεξιά)^[131]

Όταν το δίπολο αυτό βρεθεί σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο δεν προσανατολίζεται παράλληλα με αυτό, αλλά επιτελεί μία σύνθετη κίνηση ιδιοπεριστροφής και μετάπτωσης περί τον άξονα του πεδίου. Η συχνότητα μετάπτωσης ονομάζεται συχνότητα Larmor ω , και είναι χαρακτηριστική του είδους του πυρήνα. Η μετάπτωση αυτή περιορίζεται από την γωνία φ που σχηματίζει το δίπολο με το πεδίο καθώς αυτή μπορεί να λάβει μόνο συγκεκριμένες τιμές.

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευθεί καλύτερα μέσω του κβαντομηχανικού μοντέλου. Σύμφωνα με αυτό ο προσανατολισμός του διπόλου μέσα στο πεδίο παύει να είναι τυχαίος και λαμβάνει συγκεκριμένες διευθετήσεις που εξαρτώνται από τον μαγνητικό κβαντικό αριθμό του spin m_l , ο οποίος μπορεί να πάρει $2l + 1$ τιμές. Αυτές οι διευθετήσεις αντιστοιχούν σε $2l+1$ διαφορετικές ενεργειακές καταστάσεις και το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οφείλεται στην μετάπτωση μεταξύ αυτών των ενεργειακών επιπέδων.

Η ενέργεια του μαγνητικού διπόλου μέσα σε πεδίο B_0 δίνεται από την σχέση :

$$E = - \mu \cdot B_0$$

Από τις σχέσεις $\mu_z = \gamma I_z$ και $I_z = m_l \hbar$ προκύπτει ο τύπος ενέργειας $E = - \gamma \hbar m_l B_0$. Για την μετάπτωση ανάμεσα στα ενεργειακά επίπεδα ισχύει ο κανόνας επιλογής $\Delta m = \pm 1$ οπότε η συνθήκη συντονισμού είναι :

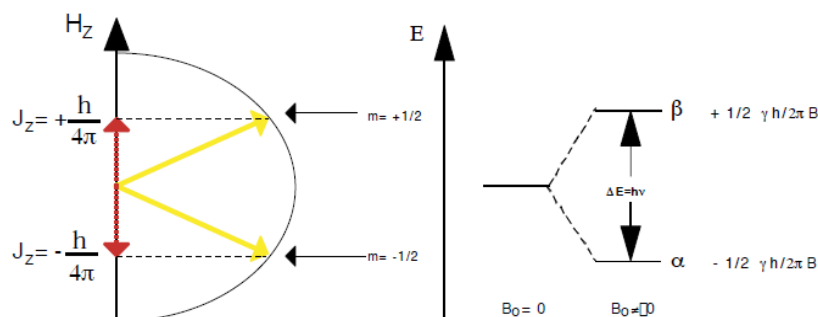
$$\Delta E = \hbar \gamma B_0$$

Σύμφωνα με την σχέση Boltzman η κατανομή των πυρήνων στα δύο ενεργειακά επίπεδα α και β δίνεται από την σχέση :

$$N_\beta / N_\alpha = e^{-\Delta E/kT},$$

όπου k η σταθερά Boltzman.

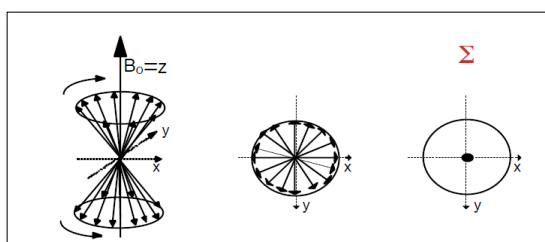
Η διαφορά πληθυσμών ανάμεσα στα δύο ενεργειακά επίπεδα υπολογίζεται με βάση την παραπάνω σχέση σε έναν πυρήνα στους $10^4 - 10^6$ ανάλογα με την θερμοκρασία και το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.



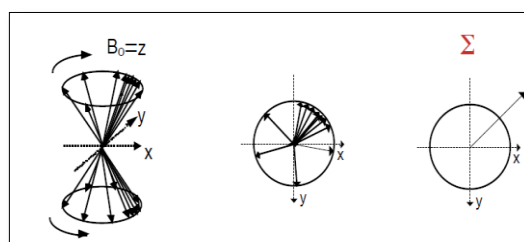
Εικόνα 4.2 Ενεργειακά επίπεδα πυρήνων για $l=1/2$ ^[131]

Στην πραγματικότητα αυτό που μετράται είναι η *μαγνήτιση* δηλαδή το σύνολο των μαγνητικών διπόλων που προέρχονται από ένα μεγάλο σύνολο μορίων. Σε κατάσταση ισορροπίας οι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από το πεδίο B_0 χωρίς συμφωνία φάσεων και έτσι η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μηδενική. Ας υποθέσουμε ότι γίνεται εφαρμογή ενός πεδίου B_1 κάθετα προς το B_0 τότε

δημιουργείται μία κατάσταση στην οποία υπάρχει συμφωνία φάσεων και η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μη μηδενική.



Εικόνα 4.3 Κατάσταση ισορροπίας. Οι πληθυσμοί α και β είναι ισοκαταναμημένοι. Κινούνται γύρω από το B_0 χωρίς συμφωνία φάσεων και η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μηδενική^[131]



Εικόνα 4.4 Συμφωνία φάσεων με εφαρμογή πεδίου B_1 μαγνήτιση αποκτά μη μηδενική συνιστώσα στο επίπεδο xy^[131]

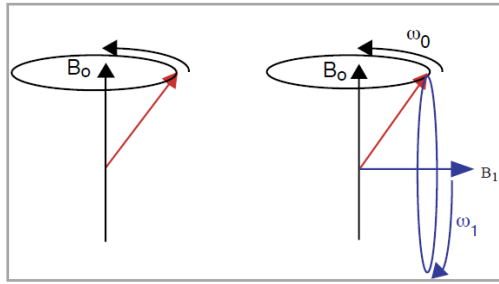
Όταν η εφαρμογή του πεδίου B_1 σταματήσει, η μαγνήτιση επιστρέφει στην κατάσταση ισορροπίας. Η διαδικασία αυτή καλείται αποδιέγερση (relaxation) και πραγματοποιείται αφενός με την αύξηση της μαγνήτισης στον άξονα z και αφετέρου με την μείωση της μαγνήτισης στο επίπεδο xy. Συγκριτικά με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές η αποδιέγερση του πυρήνα είναι πολύ αργή διαδικασία. Για να αποδιεγερθούν οι πυρήνες υποβοηθούνται είτε από το περιβάλλον του πυρήνα είτε από άλλους γειτονικούς πυρήνες^[131].

Οι δύο αυτές διαδικασίες χαρακτηρίζονται από τις χρονικές σταθερές T_1 και T_2 . Η πρώτη σταθερά ή χρόνος αποδιέγερσης T_1 αφορά την ανταλλαγή ενέργειας με το περιβάλλον (Lattice) και τη αύξηση της μαγνήτισης στον άξονα z. Η σχέση μαγνήτισης στον άξονα z με τη σταθερά T_1 δίνεται από την εξίσωση:

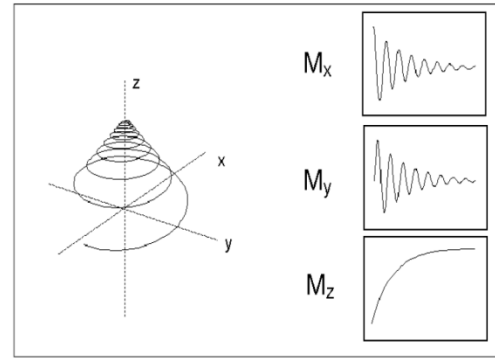
$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$$

Η δεύτερη χρονική σταθερά T_2 χαρακτηρίζει την σπιν-σπιν αποδιέγερση. Αυτή δεν έχει να κάνει με απώλεια ενέργειας αλλά με απώλεια συμφωνίας φάσεως των μαγνήτισεων στο επίπεδο xy. Η μαγνήτιση στο επίπεδο xy δίνεται από την σχέση :

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}$$



Εικόνα 4.5 Κίνηση του πυρήνα υπό την επίδραση του B_0 (αριστερά) και υπό την επίδραση των B_0 και B_1 (δεξιά)^[131]



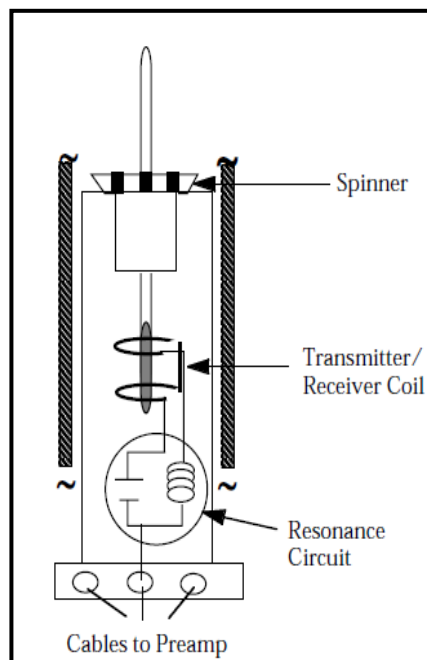
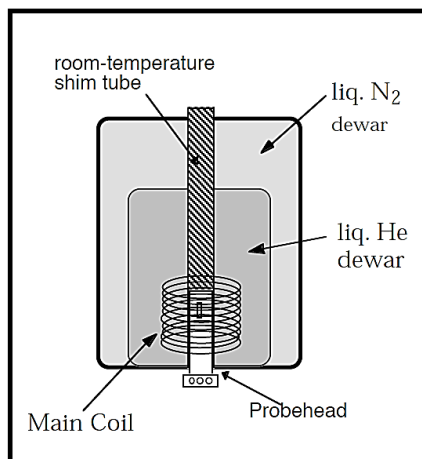
Εικόνα 4.6 Διαδικασία αποδιέγερσης. Μείωση της μαγνήτισης στους άξονες x και y και αύξηση στον z^[131]

4.2 Οργανολογία

Όλα τα παραπάνω ήταν μία πολύ συνοπτική επισκόπηση του φαινομένου NMR. Για να γίνει ωστόσο μία σύνδεση όσων προηγήθηκαν με την διαδικασία λήψης φασμάτων NMR είναι χρήσιμη μία υποτυπώδης παρουσίαση της οργανολογίας του.

Τα κύρια συστατικά στοιχεία ενός οργάνου NMR είναι :

- ❖ ο μαγνήτης
- ❖ ανιχνευτές (probeheads)
- ❖ πηγή ραδιοσυχνότητας
- ❖ ενισχυτές
- ❖ μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC's)
- ❖ σύστημα lock
- ❖ σύστημα shim
- ❖ υπολογιστής



Εικόνα 4.7 (αριστερά)

Σχηματική απεικόνιση του μαγνήτη με τα δοχεία dewars He και N_2 , τα πηνία και τους ανιχνευτές^[131]

Εικόνα 4.8 (δεξιά)

Εισαγωγή του δείγματος στον ανιχνευτή με την βοήθεια του spinner^[131]

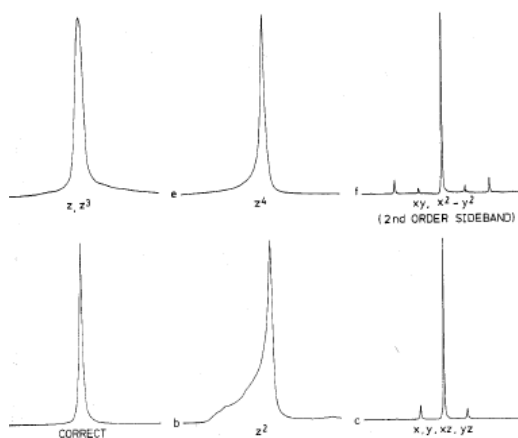
Το **στατικό μαγνητικό πεδίο** παρέχεται από υπεραγώγιμο μαγνήτη. Το κύριο πηνίο που παράγει το πεδίο περιβάλλεται από υγρό ήλιο ούτως ώστε η ηλεκτρική αντίσταση να είναι μηδέν. Υγρό άζωτο περιβάλλει τον μαγνήτη για να αποφευχθεί η απώλεια του “ακριβού” ηλίου. Επιπρόσθετα πηνία υπάρχουν προκειμένου να γίνεται διόρθωση της ομοιογένειας του πεδίου. Το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα 5mm σε spinner και εισέρχεται κάθετα στον μαγνήτη μέσα στον ανιχνευτή.

Ο **ανιχνευτής** αποτελείται από ένα ή δύο πηνία τα οποία αποτελούν το πομπό/δέκτη του ραδιοσήματος (receiver/transmitter coil). Ο ανιχνευτής αποτελείται συνήθως από δύο πηνία ένα εσωτερικό (inner coil) περισσότερο ευαίσθητο και ένα εξωτερικό (outer coil). Ένας ανιχνευτής με υψηλή ευαισθησία σε πειράματα πρωτονίου χρησιμοποιεί το εσωτερικό πηνίο για την ανίχνευση ^2H και ^1H και το εξωτερικό για τον ^{13}C και προσφέρεται κυρίως για πειράματα HSQC και HMQC. Αντίθετα ένας ανιχνευτής ευαίσθητος στην ανίχνευση σημάτων άνθρακα χρησιμοποιεί το εσωτερικό πηνίο για την ανίχνευση ^2H και ^{13}C ενώ το εξωτερικό για την ανίχνευση ^1H και χρησιμοποιείται για πειράματα άνθρακα με αποσύζευξη πρωτονίου. Ο ανιχνευτής συνδέεται σε έναν προενισχυτή ο οποίος προκαλεί μία πρώτη ενίσχυση του σήματος. Επίσης συνδέεται με μία μονάδα (wobbling unit) μέσω της οποίας γίνεται ο συντονισμός και η προσαρμογή του ανιχνευτή (tuning and matching), δηλαδή ο *συντονισμός* με την συχνότητα του αντίστοιχου πυρήνα και η *προσαρμογή* σε μία σταθερή αντίσταση (50 Ohm). Η διαδικασία αυτή αυξάνει την ευαισθησία.

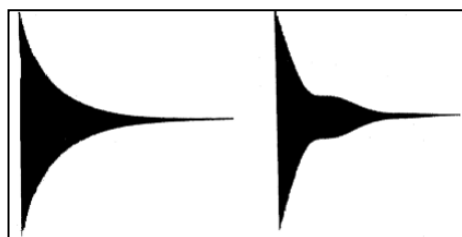
Η **πηγή ραδιοσυχνοτήτων** αποτελείται από ηλεκτρονικά στοιχεία τα οποία παράγουν ημιτονικά ή συνημιτονικά κύματα σε κατάλληλες συχνότητες. Επιτελούν επίσης εν μέρει διαδικασίες για την διόρθωση του σχήματος και της φάσης των κορυφών. Η διακριτική ικανότητα μεταξύ των συχνοτήτων είναι συνήθως καλύτερη από 0.1 Hz.

Τα εισερχόμενα και εξερχόμενα σήματα ενισχύονται από τους **ενισχυτές (amplifiers)**. Το σήμα που παράγεται είναι αναλογικό και η μετατροπή του σε ψηφιακό γίνεται από τους **μετατροπείς αναλογικού προς ψηφιακό σήμα** (analog-digital converters, ADC's). Η μετατροπή είναι απαραίτητη προκειμένου το σήμα να είναι προσβάσιμο στον μετασχηματισμό Fourier από τον υπολογιστή. Οι ψηφιοποιητές που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως 16 ή 18 bit. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το ισχυρότερο σήμα ψηφιοποιείται σε 2^{18} , γεγονός που δημιουργεί προβλήματα στο δυναμικό εύρος καθώς σήματα με μέγεθος μικρότερο από $1/2^{18}$ δεν μπορούν να διακριθούν. Για αυτό το σκοπό η παράμετρος receiver gain (rg) δηλαδή ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας για ενίσχυση του σήματος, ρυθμίζεται έτσι ώστε η μέγιστη ένταση της FID να καλύπτει σχεδόν πλήρως το εύρος του μετατροπέα AD.

Η ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου σε όλο τον όγκο του δείγματος είναι απαραίτητη για την παρατήρηση μικρών διαφορών στις συχνότητες και ρυθμίζεται με το **σύστημα shim**. Εάν το πεδίο δεν είναι πλήρως ομογενοποιημένο οδηγεί σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως η διεύρυνση των κορυφών, καθώς πυρήνες σε διαφορετικά σημεία του δείγματος “αισθάνονται” διαφορετικό πεδίο. Το σύστημα shim αποτελείται από δύο τμήματα. Η γενική αρχή και των δύο είναι ότι αποτελούνται από έναν αριθμό πηνίων τα οποία παράγουν συμπληρωματικά μικρά πεδία τα οποία διορθώνουν τις ανομοιογένειες του κύριου πηνίου. Πολυάριθμα πηνία ποικίλης γεωμετρίας παράγουν διορθωτικά πεδία προς διάφορες κατευθύνσεις. Το ένα από τα δύο επιμέρους τμήματα ρυθμίζεται από ειδικούς κατά την διάρκεια των αρχικών ρυθμίσεων του οργάνου. Το δεύτερο τμήμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου και ρυθμίζεται από τον χρήστη κάθε φορά που ένα δείγμα τοποθετείται στον μαγνήτη ή όταν αλλάζει η θερμοκρασία. Το σύστημα shim ομαδοποιείται σε δύο κατηγορίες στα shims πάνω στο άξονα ($z, z^2, z^4 \dots$) και στα shims εκτός άξονα ($x, y, xy \dots$). Τα πρώτα διορθώνουν την ομοιογένεια στον άξονα z και συνδέονται κυρίως με τον διαλύτη και το ύψος του διαλύτη στο σωληνάκι το οποίο πρέπει να είναι σταθερό στα 550 μL . Κακή ρύθμιση της ομοιογένειας του πεδίου οδηγεί σε μορφές κορυφών όπως αυτή της εικόνας 4.9.



Εικόνα 4.9a Κακή ρύθμιση των α) z, z^3, z^5 οδηγεί σε συμμετρική διεύρυνση κορυφών, β) z^2, z^4, z^6 οδηγεί σε ασύμμετρες κορυφές, γ) x, y, xy, yx οδηγεί σε πλευρικές κορυφές (spinning sideband)^[131]



Εικόνα 4.9b FID. Κακή ρύθμιση της ομοιογένειας του μαγνητικού πεδίου (δεξιά)^[131]

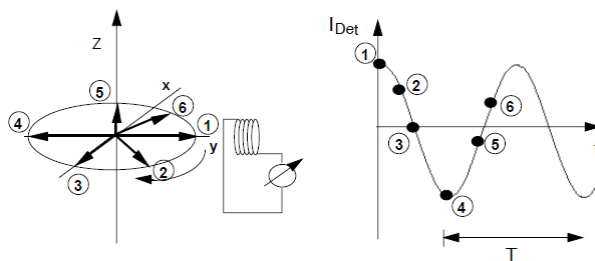
Η σταθερότητα του πεδίου επιτυγχάνεται με το **σύστημα lock**. Το σύστημα lock μετράει την συχνότητα του δευτεριωμένου διαλύτη και δημιουργεί διορθώσεις στην ισχύ του μαγνητικού πεδίου τέτοιες ώστε η συχνότητα του δευτεριωμένου διαλύτη να παραμένει σταθερή. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας όλες οι άλλες συχνότητες παραμένουν σταθερές. Συνήθως το σύστημα lock ενεργοποιείται αμέσως μετά την τοποθέτηση του δείγματος στον μαγνήτη για την αποφυγή της φυσικής ολίσθησης του μαγνητικού πεδίου που συμβαίνει και οδηγεί σε διεύρυνση κορυφών. Η σταθερότητα του συστήματος lock είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για τα πειράματα δύο διαστάσεων^[131].

4.3 Πείραμα NMR μίας διάστασης

Από τον υπεραγώγιμο μαγνήτη ασκείται στο δείγμα το πεδίο B_0 το οποίο βρίσκεται στην κλίμακα εκατοντάδων MHz. Αντίθετα το B_1 είναι πολύ μικρότερο και κυμαίνεται από 1-20 KHz. Το πεδίο B_1 αποτελεί την μαγνητική συνιστώσα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκπέμπεται στο δείγμα κάθετα προς το B_0 . Η συχνότητα της ακτινοβολίας που μπορεί να παράγει πεδίο τέτοιου μεγέθους ανήκει στα ραδιοκύματα (RF). Η εφαρμογή της συχνότητας ονομάζεται και παλμός. Αν και οι παλμοί έχουν κατασκευαστεί από τον πομπό με μία συγκεκριμένη συχνότητα f_1 (φέρουσα συχνότητα) έχουν ισχύ για ένα εύρος συχνοτήτων. Ανάλογα με τον χρόνο εφαρμογής του παλμού (pulse width) η μαγνήτιση εκτρέπεται με διαφορετικό τρόπο από την θέση ισορροπίας.

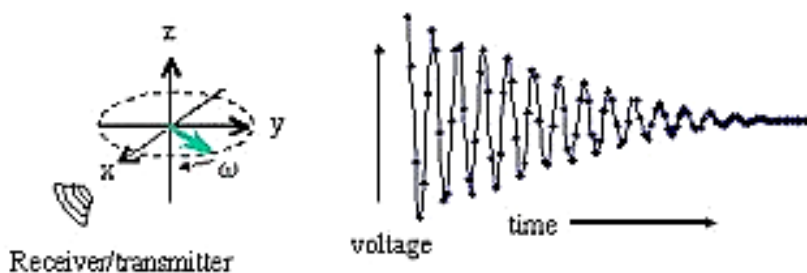
Οι παλμοί που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι αυτοί των 90° και των 180° . Ο παλμός των 90° περιστρέφει την μαγνήτιση από τον άξονα z στον άξονα y. Ως εκ τούτου εξισώνει τους δύο πληθυσμούς αφού η μαγνήτιση στον άξονα z παύει να υπάρχει ενώ μετατρέπεται σε μαγνήτιση στον άξονα y, έτσι λοιπόν ο παλμός 90° δημιουργεί συμφωνία φάσεων αφού οι μαγνήτισεις δεν κινούνται πλέον τυχαία γύρω από το B_0 . Ο παλμός των 180° αναστρέφει την μαγνήτιση στον άξονα z δηλαδή προκαλεί αναστροφή πληθυσμών των δύο ενεργειακών επιπέδων $m=\pm 1/2$.

Με την εφαρμογή του παλμού 90° προκύπτει μαγνήτιση στο επίπεδο xy και ως εκ τούτου σήμα στον ανιχνευτή μέσω επαγωγής ρεύματος. Όταν η περιστρεφόμενη μαγνήτιση στο επίπεδο xy προσανατολίζεται παράλληλα με το πηνίο-ανιχνευτή το επαγόμενο ρεύμα είναι μέγιστο (εικόνα 4.10).



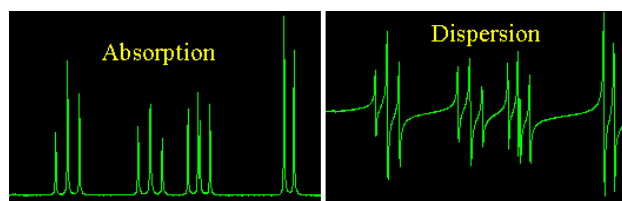
Εικόνα 4.10 Περιστρεφόμενο spin (αριστερά) και το αντίστοιχο επαγόμενο ρεύμα που φτάνει στο πηνίο (δεξιά) ^[131]

Όταν ο παλμός σταματήσει, πραγματοποιείται αποδιέγερση των πυρήνων και η συνισταμένη μαγνήτιση κινείται μεταπτωτικά γύρω από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η μετάπτωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή ραδιοσημάτων που είναι γνωστά ως Free Induction Decay (FID) όπου παρατηρείται η απόσβεση του σήματος εκθετικά με τον χρόνο.



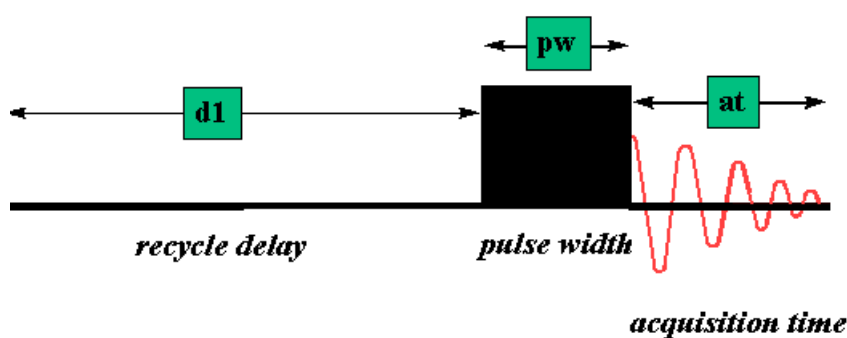
Εικόνα 4.11 Καταγραφή της FID. Η μαγνήτιση στο επίπεδο xy μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί. Το σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή (ο οποίος καταγράφει σήμα στο επίπεδο xy) αποσβένει εκθετικά με τον χρόνο. ^[131]

Το σήμα συλλέγεται και καταγράφεται συναρτήσει του χρόνου. Προκειμένου να μετατραπεί σε συνάρτηση συχνοτήτων γίνεται χρήση του μετασχηματισμού Fourier ενός χρήσιμου μαθηματικού εργαλείου ούτως ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση όλων των συχνοτήτων συντονισμού. Η συνάρτηση για την μετατροπή είναι μιγαδική : $f(\omega) = \int f(t) e^{i\omega t} dt$, συνεπώς αποτελείται από φανταστικό και πραγματικό μέρος. Το φανταστικό μέρος απεικονίζεται με γραμμές τύπου διασποράς (dispersion) ενώ το πραγματικό με γραμμές τύπου απορρόφησης (absorption) (εικόνα 4,12). Ο τελευταίος τύπος είναι και αυτός που απεικονίζεται στα φάσματα. Τα διάφορα σήματα που απεικονίζονται ενδέχεται να έχουν διαφορετική φάση σε σχέση με την συχνότητα τους και αυτό αντικατοπτρίζεται στην σχέση φανταστικού πραγματικού μέρους με αποτέλεσμα ανάμιξη των τύπων απορρόφησης και διασποράς.



Εικόνα 4.12 Φάσμα με γραμμές τύπου απορρόφησης (αριστερά) και τύπου διασποράς (δεξιά)^[131]

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται n φορές προκειμένου να αυξηθεί η αναλογία σήματος προς θόρυβο (S/N). Είναι απαραίτητο πριν από κάθε επανάληψη να δίνεται ένα χρονικό διάστημα ούτως ώστε οι πυρήνες να επανέρχονται σε κατάσταση ισορροπίας (relaxation delay)^[131].



Εικόνα 4.13 Παλμική ακολουθία (χρόνος αναμονής, εφαρμογή παλμού, συλλογή της FID)^[131]

4.4 Πειραματικές παράμετροι

Μία σειρά παραμέτρων οι οποίες επηρεάζουν την ακρίβεια και την πιστότητα της ποσοτικής ανάλυσης και είναι απαραίτητο να βελτιστοποιούνται πριν από αυτήν, παρουσιάζονται ακολούθως.

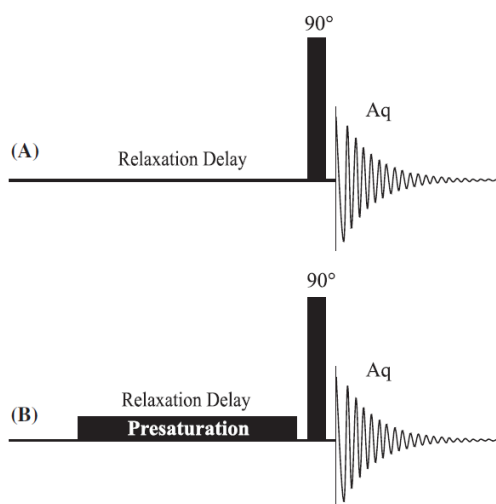
4.4.1 Παλμική ακολουθία

Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται κυρίως πειράματα NMR ενός παλμού. Η ακολουθία που χρησιμοποιείται περιλαμβάνει ένα χρονικό διάστημα το οποίο ονομάζεται relaxation delay και αποτελεί τον χρόνο αναμονής μεταξύ των επαναλήψεων. Στη συνέχεια ακολουθεί ένας παλμός 90° και η διαδικασία ολοκληρώνεται με την καταγραφή του σήματος (acquisition).

Στην περίπτωση που ο προσδιοριζόμενος αναλύτης βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση τότε η ακρίβεια της μεθόδου επηρεάζεται σημαντικά από το ισχυρό σήμα του διαλύτη. Για να επιτευχθεί καλύτερος λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N) και για την καλύτερη ακρίβεια και πιστότητα χρησιμοποιούνται τεχνικές εξάλειψης του

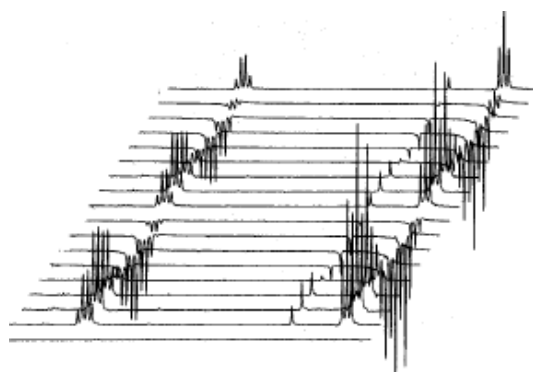
σήματος του διαλύτη. Η πιο απλή τεχνική είναι ο κορεσμός της συχνότητας του διαλύτη (pre-saturation) πριν από την εφαρμογή του παλμού 90° . Το φάσμα που προκύπτει είναι σχεδόν απαλλαγμένο από το σήμα του διαλύτη.

Ο συνήθης παλμός που χρησιμοποιείται είναι αυτός των 90° . Φυσιολογικά θεωρείται ότι το δεδομένο εύρος αρκεί για την διέγερση όλων των πυρήνων και δίνει την μέγιστη ένταση. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα του παλμού ποικίλει ιδίως σε συχνότητες αρκετά απομακρυσμένες από την φέρουσα. Αυτό συμβαίνει λόγω της ύπαρξης ειδικών φίλτρων (low-pass frequency filter) τα οποία είναι υπεύθυνα για την απαλοιφή ανεπιθύμητου θορύβου από το εξωτερικό περιβάλλον. Συχνότητες κοντά στα άκρα ενός φάσματος “αισθάνονται” αυτήν την απόσβεση ισχυρότερα. Έτσι προκύπτουν λανθασμένες εντάσεις σήματος για τις συχνότητες αυτές. Για την καταπολέμηση αυτού του σφάλματος έχουν υπολογιστεί ειδικοί συντελεστές διόρθωσης της έντασης για κάθε συχνότητα.



Εικόνα 4.14 (A) Παλμική ακολουθία με παλμό 90° , (B) Παλμική ακολουθία με κορεσμό της συχνότητας του διαλύτη^[132]

Επίσης η αποτελεσματικότητα του παλμού 90° ενδέχεται να ποικίλει βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του δείγματος. Είναι σαφές λοιπόν ότι το μήκος του παλμού πρέπει να βαθμονομείται για κάθε δείγμα (calibration). Για την βαθμονόμηση των πρωτονιακών παλμών γίνεται λήψη ενός φάσματος πρωτονίου ρυθμίζοντας το μήκος του παλμού ούτως ώστε να ανταποκρίνεται σε μικρή γωνία (flip-angle). Αυτό επαναλαμβάνεται με μικρή αύξηση της γωνίας. Όταν το σήμα διέρχεται από το μηδέν τότε ο παλμός που εφαρμόζεται είναι αυτός των 180° . Έτσι ο παλμός των 90° μπορεί εύκολα να υπολογιστεί καθώς θα είναι στο μισό μήκος του παλμού των 180° .



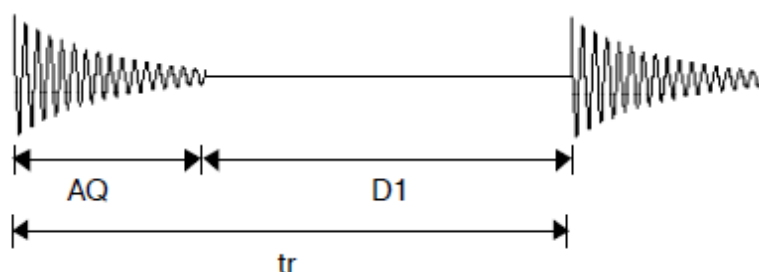
Εικόνα 4.15 Βαθμονόμηση του μήκους του παλμού. Το μήκος αυξάνεται κατά ένα σταθερό ποσό σε κάθε φάσμα^[132]

4.4.2 Παράμετροι λήψης φάσματος

Κατά την λήψη ενός φάσματος NMR η προσεκτική ρύθμιση παραμέτρων κρίσιμων για την ποιότητα του αποτελέσματος είναι απαραίτητη. Οι παράμετροι αυτές επιδρούν στην ευαισθησία, στην διακριτική ικανότητα, στην αναπαραγωγικότητα, στην ακρίβεια και την πιστότητα των ποσοτικών μετρήσεων.

Ο ολικός χρόνος που απαιτείται για την λήψη ενός φάσματος NMR μίας σάρωσης ορίζεται ως “**repletion time**” (T_R) και περιλαμβάνει τον χρόνο δειγματοποίησης της FID (acquisition time) και τον χρόνο αναμονής (relaxation delay) ανάμεσα σε δύο παλμούς. Ο χρόνος T_R εξαρτάται από τον χρόνο T_1 και μάλιστα από τον μεγαλύτερο T_1 εξ αυτών του δείγματος. Για να μετρηθεί το 99% της μαγνήτισης στην κατάσταση ισορροπίας *πρέπει ιδανικά ο T_R να είναι πέντε φορές μεγαλύτερος από τον μεγαλύτερο T_1 .*

Σε περίπτωση που η καταγραφή του σήματος γίνεται σε μικρότερους χρόνους T_1 χρησιμοποιούνται διορθωτικοί παράγοντες προκειμένου να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση με ακρίβεια.



Εικόνα 4.16 T_R συνολικός χρόνος λήψης φάσματος, AQ χρόνος δειγματοποίησης της FID, D_1 χρόνος αναμονής μεταξύ δύο παλμών^[132]

Η δειγματοποίηση της FID προκειμένου να μετατραπεί στη ψηφιακή της μορφή γίνεται σε συγκεκριμένα σημεία. Ο αριθμός των σημείων που συλλέγονται για την ψηφιοποίηση της FID ονομάζεται **time domain (TD)** και επηρεάζει την ποσοτική ανάλυση με NMR. Πολύ μικρός αριθμός σημείων μπορεί να οδηγήσει σε κακή διακριτική ικανότητα και απώλεια ποσοτικής πληροφορίας κορυφών με μικρή επικάλυψη. Ο αριθμός των σημείων εξαρτάται από το μέγεθος της μνήμης του υπολογιστή.

Ο συνολικός χρόνος κατά τον οποίο δειγματοποιείται η FID αποτελεί τον χρόνο καταγραφής σήματος (**acquisition time, AQ**). Ο συνολικός χρόνος καταγραφής εξαρτάται από τον αριθμό των σημείων (TD) και από το χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο σημεία (dwell time, DW) και η εξάρτηση δίνεται από την σχέση $AQ = DW \times TD$. Σύμφωνα με το θεώρημα του Nyquist η συχνότητα συλλογής (δηλαδή $1/DW$) πρέπει να είναι τουλάχιστον διπλάσια από την μεγαλύτερη συχνότητα που μετράται στο φάσμα, η οποία δίνεται από το SW (spectral width) δηλαδή $2SW=1/DW$. Συνεπώς ο συνολικός χρόνος λήψης του φάσματος δίνεται ως συνάρτηση της μνήμης του υπολογιστή (εμμέσως από το TD) και του εύρους συχνοτήτων :

$$AQ = DW \times TD = TD / 2SW.$$

Ο χρόνος συλλογής της FID πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να υπάρχει πλήρης απόσβεση των σημάτων στο τέλος της FID. Ο χρόνος αυτός σχετίζεται με την σταθερά T_2 (παράγραφος 4.1). Σε περίπτωση που είναι μικρότερος από τον απαιτούμενο χάνεται το τελευταίο κομμάτι της FID και προκύπτει τεχνητή τροποποίηση της με αποτέλεσμα κακή διακριτική ικανότητα . Σε αντίθετη περίπτωση δηλαδή σε χρόνο πολύ μεγαλύτερο από τον T_2 η παράταση του χρόνου είναι ανώφελη διότι καταγράφεται μόνο θόρυβος.

Από τον συνολικό αριθμό των σημείων που καταγράφονται (TD) τα μισά χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση του φανταστικού και τα άλλα μισά για την απεικόνιση του πραγματικού μέρους της συνάρτησης συνεπώς η **ψηφιακή διακριτική ικανότητα** δίνεται από τον τύπο $DR = 2SW/TD$. Για ακριβείς ποσοτικές μετρήσεις αρκεί ψηφιακή διακριτική ικανότητα 0.1-0.5 Hz/σημείο (καταγραφή σε 32K data points).

Ο **λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N)** είναι ένα μέτρο της ευαισθησίας των πειραμάτων NMR (όπως επίσης και το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται). Ο λόγος S/N ποικίλει για διαφορετικές συχνότητες ενός μορίου ανάλογα με τον αριθμό των πρωτονίων για κάθε συχνότητα. Επίσης παρουσιάζει μία εκθετική εξάρτηση από

τον συνολικό χρόνο λήψης φάσματος (repetition time, T_R) όταν άλλες παράμετροι διατηρούνται σταθερές. Πιο συγκεκριμένα αυξανόμενου του χρόνου αναμονής (relaxation delay) αυξάνεται εκθετικά ο λόγος S/N. Στην περίπτωση που ο αναλύτης βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, αυξάνεται ο αριθμός των σαρώσεων (scans) προκειμένου ο λόγος S/N να αποκτήσει την βέλτιστη τιμή. Ομοίως ο λόγος S/N μπορεί να βελτιωθεί με τροποποίηση του συνολικού χρόνου λήψης του φάσματος (repetition time).

Για την επίτευξη μέγιστης έντασης σήματος είναι απαραίτητη η ρύθμιση της παραμέτρου RG (**receiver gain**). Η παράμετρος αυτή αποτελεί τη μεγέθυνση του σήματος. Η τιμή του RG πρέπει να είναι η βέλτιστη κάθε φορά. Όταν ρυθμίζεται πολύ ψηλά τα πρώτα σημεία της FID αποκόπτονται και οδηγούν σε καταστροφή της γραμμής βάσης. Αντίστοιχα όταν ρυθμίζεται πολύ χαμηλά δεν αξιοποιείται πλήρως το δυναμικό εύρος του οργάνου και πολύ χαμηλά σήματα ίσως χαθούν. Στα σύγχρονα όργανα η ρύθμιση του RG γίνεται με αυτόματη εντολή “auto receiver gain”, κατά την οποία εφαρμόζεται αρχικά ένας παλμός σε συγκεκριμένη γωνία με πλήρες RG. Εάν γίνεται υπερχειλίση το RG μειώνεται την επόμενη φορά κατά 10% και η διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου βρεθεί το κατάλληλο RG το οποίο δεν προκαλεί υπερχειλίση. Σε αυτό το βέλτιστο RG η ένταση του σήματος είναι μέγιστη και ο λόγος S/N παίρνει την επιθυμητή τιμή. Η βελτιστοποίηση του RG είναι απαραίτητη για την επίτευξη ακρίβειας και πιστότητας στην ποσοτική μέτρηση.

Η σωστή ρύθμιση των διαδικασιών “**shimming**” και “**tuning & matching**” οδηγεί σε αναπαραγωγίμα αποτελέσματα και αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Στην πρώτη περίπτωση η ομογενοποίηση του μαγνητικού πεδίου είναι κρίσιμη διαδικασία για την ποιότητα των φασμάτων και ως εκ τούτου για αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Κακή ομοιογένεια οδηγεί σε παραμόρφωση του σήματος και σε διεύρυνση κορυφών έχοντας ως συνέπεια κακή διακριτική ικανότητα και χαμηλό S/N. Μη σωστή ρύθμιση των διαδικασιών συντονισμού και προσαρμογής (tuning & matching) του ανιχνευτή επιδρά στην αποτελεσματικότητα του παλμού 90° με αποτέλεσμα διακυμάνσεις στις εντάσεις των σημάτων. Για επίτευξη αναπαραγωγιμότητας πρέπει να επιτυγχάνεται σωστός συντονισμός και προσαρμογή πριν από την λήψη φάσματος.

Δύο ακόμη παράγοντες που επιδρούν στην αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου είναι η θερμοκρασία και η ακρίβεια στα σωληνάκια NMR. Η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται σταθερή κατά την διάρκεια των μετρήσεων, ιδίως στην περίπτωση πολλαπλών δειγμάτων για συγκριτική ανάλυση. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας επηρεάζουν τις διαδικασίες αποδιέγερσης με αποτέλεσμα την διεύρυνση των κορυφών. Εκτός από την θερμοκρασία ένας ακόμη παράγοντας που “πλήττει” την

αναπαγωγιμότητα είναι η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στα σωληνάκια NMR που χρησιμοποιούνται για ποσοτική ανάλυση. Οι διακυμάνσεις στην διάμετρο προκαλούν σφάλμα στις ποσοτικές μετρήσεις ιδίως όταν τα αποτελέσματα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση.

Τέλος σε μείγματα οι δορυφόροι του ^{13}C των μεταβολιτών υψηλής συγκέντρωσης ενδέχεται να είναι ισοδύναμοι σε ένταση με τα σήματα μεταβολιτών χαμηλής συγκέντρωσης, δημιουργώντας έτσι ασάφειες στην ποσοτική ανάλυση. Τότε είναι απαραίτητη η **αποσύζευξη ευρείας ζώνης (broadband decoupling)**. Μέσω αυτής ακυρώνεται η σύζευξη των πρωτονίων με τους άνθρακες (με ταυτόχρονη ακτινοβόληση όλων των πρωτονίων της περιοχής από μία ευρεία ζώνη συχνοτήτων) και έτσι εξαλείφονται οι κορυφές του άνθρακα.

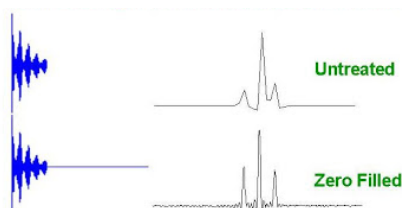
4.4.3 Παράμετροι επεξεργασίας φάσματος

Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η βέλτιστη παραμετροποίηση για την λήψη ενός αξιόπιστου φάσματος ακολουθείται μία σειρά βημάτων απαραίτητη προκειμένου το φάσμα να είναι αναγνώσιμο και πλήρως αξιοποιήσιμο για ποσοτική ανάλυση.

Αρχικά η FID πριν τον μετασχηματισμό Fourier πολλαπλασιάζεται με μία εκθετική συνάρτηση $W(t) = \exp(-lbt)$ προκειμένου να βελτιωθεί ο λόγος S/N και η διακριτική ικανότητα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **windowing** και στηρίζεται στο ότι ο ρυθμός με τον οποίο αποσβένει η εκθετική συνάρτηση καθορίζει την διεύρυνση των κορυφών. Η παράμετρος lb (line broadening) είναι αυτή η οποία ρυθμίζει τον ρυθμό απόσβεσης. Αυξανόμενου του lb επιτυγχάνεται αύξηση του λόγου S/N αλλά παράλληλα συμβαίνει σημαντική διεύρυνση κορυφών. Οι προτεινόμενες τιμές για το lb κυμαίνονται μεταξύ 0.3 - 1.0 Hz.

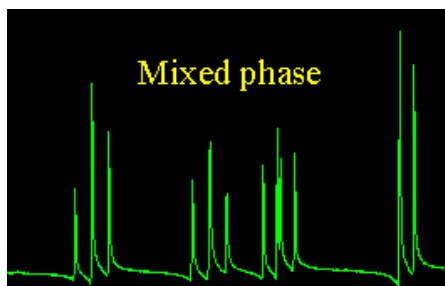
Εάν ο αριθμός των σημείων που χρησιμοποιείται για την ψηφιοποίηση του σήματος πριν από τον μετασχηματισμό Fourier είναι μικρότερος από τον αριθμό των σημείων στα οποία έχει γίνει η καταγραφή τότε το σήμα δεν ψηφιοποιείται σωστά και η διακριτική ικανότητα είναι πολύ χαμηλή. Από τον τύπο της ψηφιακής διακριτικής ικανότητας $DR = 2SW/TD$ παρατηρούμε ότι αυξανόμενου του αριθμού των σημείων TD, η ψηφιακή διακριτική ικανότητα βελτιώνεται. Για την αύξηση του αριθμού των σημείων χρησιμοποιείται η διαδικασία του **“zero filling”**. Δεδομένου του ότι η FID καταλήγει σε μηδενική τιμή, η προσθήκη μηδενικών στο τέλος της οδηγεί σε αύξηση της διακριτικής ικανότητας. Συγκεκριμένα όταν ο αριθμός των σημείων στην FID είναι 32 K τότε η προσθήκη μηδενικών κατά έναν παράγοντα 2 θα έχει ως αποτέλεσμα ο

αριθμός των σημείων μετά τον μετασχηματισμό Fourier να είναι 64 K. Έτσι με zero filling η τελική ψηφιακή διακριτική ικανότητα είναι αντίστοιχη των 64 K σημείων αντί των 32 K χωρίς.



Εικόνα 4.17 Μετασχηματισμός Fourier της FID (πάνω), μετασχηματισμός Fourier της FID αφού έχει γίνει προσθήκη μηδενικών (zero filling)^[131]

Η **διόρθωση φάσης** είναι απαραίτητη για την ακριβή μέτρηση της έντασης και ως εκ τούτου την σωστή ποσοτική ανάλυση. Σφάλμα στην φάση μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη μέτρηση αναλογίας κορυφών με αποτέλεσμα λανθασμένη απόλυτη ή σχετική συγκέντρωση. Είναι επιθυμητή η αποφυγή της αυτόματης διόρθωσης φάσης και προτείνεται η χειροκίνητη διότι στην πρώτη περίπτωση ενδέχεται πολύ μικρά σήματα να χαθούν.

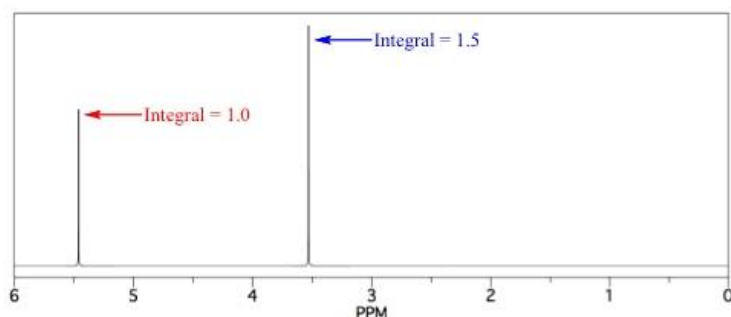


Εικόνα 4.18 Ανάμιξη πραγματικού με φανταστικό μέρος. Στο φάσμα δεν έχει γίνει διόρθωση φάσης.^[131]

Εκτός από την διόρθωση της φάσης είναι κρίσιμη και η **διόρθωση της γραμμής βάσης**. Μία λανθασμένη διόρθωση φάσης δύναται να εισάγει σημαντικό σφάλμα στην ποσοτική μέτρηση. Η αυτόματη διόρθωση γραμμής βάσης προτιμάται έναντι της χειροκίνητης και για αυτόν τον σκοπό έχουν σχεδιαστεί διάφοροι αλγόριθμοι.

Εφόσον ολοκληρωθούν οι παραπάνω ρυθμίσεις, πραγματοποιείται ολοκλήρωση μίας συγκεκριμένης περιοχής. Από την σταθερά ολοκλήρωσης λαμβάνεται πληροφορία για τον αριθμό των πυρήνων που είναι υπεύθυνοι για την συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού. Εδώ ενδέχεται να εισαχθεί το σφάλμα του αναλυτή διότι μπορεί να υπάρξουν διακυμάνσεις στην έκταση της περιοχής ολοκλήρωσης. Για τον λόγο αυτό η περιοχή ολοκλήρωσης πρέπει να επεκτείνεται τόσο ώστε να περιλαμβάνει το 99% της κορυφής. Η ολοκλήρωση επηρεάζεται σημαντικά από τις ατέλειες της γραμμής βάσης. Οι συντελεστές πρώτου και δευτέρου βαθμού της εξίσωσης που ορίζει την

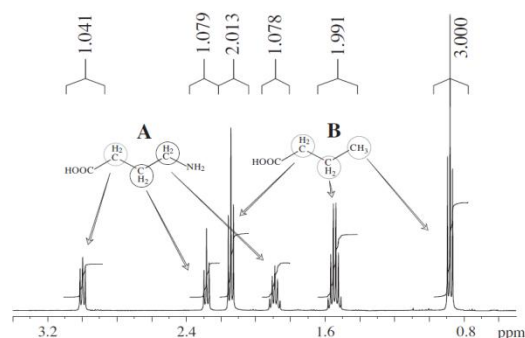
γραμμή βάσης (slope και bias) πρέπει να ρυθμίζονται χειροκίνητα για μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση. Προκειμένου να εξαλειφθεί το σφάλμα του αναλυτή, το πείραμα επαναλαμβάνεται ορισμένες φορές και λαμβάνεται ένας μέσος όρος των μετρήσεων.^{[131],[132]}



Εικόνα 4.19 Σταθερές ολοκλήρωσης

4.5 Φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης

Όπως προαναφέρθηκε, η τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην εύρεση δομής μικρών και μακρομορίων. Από το φάσμα πρωτονίου μέσω των χημικών μετατοπίσεων είναι δυνατό να αντληθούν πληροφορίες για τις ποσοτικές σχέσεις μεταξύ πρωτονίων μέσα στο ίδιο ή διαφορετικό μόριο. Αυτό γίνεται εφικτό μέσω ολοκλήρωσης των κορυφών στις αντίστοιχες μετατοπίσεις. Οι τιμές ολοκλήρωσης που προκύπτουν έχουν άμεση εξάρτηση από τον αριθμό των πυρήνων που συντονίζονται και από την συγκέντρωση. Για παράδειγμα στο μόριο Α της εικόνας 1 οι τιμές ολοκλήρωσης για τα τρία μεθυλένια είναι 1:1:1 (ενδομοριακή σχέση) εφόσον ολοκληρώνουν και οι τρεις αντίστοιχα για δύο πρωτόνια. Το ίδιο ισχύει και για τα μεθυλένια του μορίου Β, ενώ η αναλογία των μεθυλενίων του μορίου Β προς αυτά του Α είναι 2:1 γεγονός το οποίο υποδηλώνει διπλάσια συγκέντρωση.



Εικόνα 4.20 Φάσμα NMR πρωτονίου μίγματος^[132]

Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές, η ακρίβεια (accuracy) και η πιστότητα (precision) του ποσοτικού NMR επηρεάζονται άμεσα από τις παραμέτρους λήψης και επεξεργασίας ενός φάσματος NMR. Αυτός είναι μάλιστα και ο λόγος για τον οποίο ο προσδιορισμός πανομοιότυπων δειγμάτων σε διαφορετικά εργαστήρια παρουσιάζει απόκλιση η οποία αγγίζει το 90% όταν δεν ακολουθείται κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο. *Θεωρείται λοιπόν απαραίτητο ο αναλυτής να είναι εξοικειωμένος με τον τρόπο λήψης και επεξεργασίας ενός φάσματος.*

Με την σωστή επιλογή και εφαρμογή των παραμέτρων λήψης και επεξεργασίας των φασμάτων προκύπτουν αναπαραγώγιμα και ακριβή αποτελέσματα. Διαδικασίες επικύρωσης (πιστότητα, ακρίβεια, γραμμικότητα, αναπαραγωγιμότητα, ανθεκτικότητα, ειδικότητα και εκλεκτικότητα) έχουν αποδείξει ότι η εν λόγω τεχνική είναι μία πολύ καλή αναλυτική τεχνική για ποσοτική ανάλυση. ^[132]

4.5.1 Βασικές έννοιες του ποσοτικού NMR

Η πιο σημαντική και θεμελιώδης πληροφορία για το ποσοτικό NMR είναι η άμεση αναλογία έντασης σήματος (I_x) ως προς τον αριθμό των πυρήνων (N_x) που είναι υπεύθυνοι για μία συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού. Η εξάρτηση δίνεται από την σχέση :

$$I_x \propto N_x, \quad I_x = K_s \cdot N_x$$

όπου K_s είναι μία φασματοσκοπική σταθερά, ίδια για όλες τις συχνότητες ενός φάσματος NMR. Ωστόσο επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες όπως ο παλμός διέγερσης, ο χρόνος εφαρμογής του, και η αποσύζευξη ευρείας ζώνης (broadband decoupling) όπου η ένταση των κορυφών αυξάνεται λόγω του φαινομένου Nuclear Overhauser (NOE).

Η ποσοτικοποίηση αναλυτών με την μέθοδο αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους οι οποίοι είναι η σχετική και η απόλυτη ποσοτικοποίηση.

Στην μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης, υπολογίζεται πολύ εύκολα η μοριακή αναλογία (M_x/M_y) μεταξύ δύο ενώσεων X και Y από την σχέση :

$$\frac{M_x}{M_y} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x}$$

Εάν πρόκειται για μείγμα περισσότερων συστατικών (Z) τότε η ποσοστιαία αναλογία ενός συστατικού A δίνεται από την σχέση :

$$\frac{M_A}{\sum_{i=1}^Z n_i} = \frac{I_A N_A}{\sum_{i=1}^Z n_i} \cdot 100\%$$

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης ενός αναλύτη διακρίνονται δύο περιπτώσεις :

(α) εάν όλα τα υπόλοιπα συστατικά μπορούν να αποδοθούν δομικά και να μετρηθούν ποσοτικά, τότε η συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να υπολογιστεί ως μία διαφορά από το 100%.

(β) στην δεύτερη περίπτωση γίνεται χρήση μίας προτύπου ουσίας γνωστής συγκέντρωσης και η συγκέντρωση υπολογίζεται μέσω της σχέσης :

$$C_X = \frac{I_X}{I_{STD}} \cdot \frac{N_{STD}}{N_X} \cdot \frac{M_X}{M_{STD}} \cdot \frac{W_{STD}}{W} \cdot C_{STD}$$

όπου C, I, N, M, είναι αντίστοιχα η συγκέντρωση, η ένταση, ο αριθμός των πυρήνων, η μοριακή μάζα και το βάρος αναλύτη (X) και προτύπου (STD) αντίστοιχα. ^[132]

4.5.2 Εφαρμογές

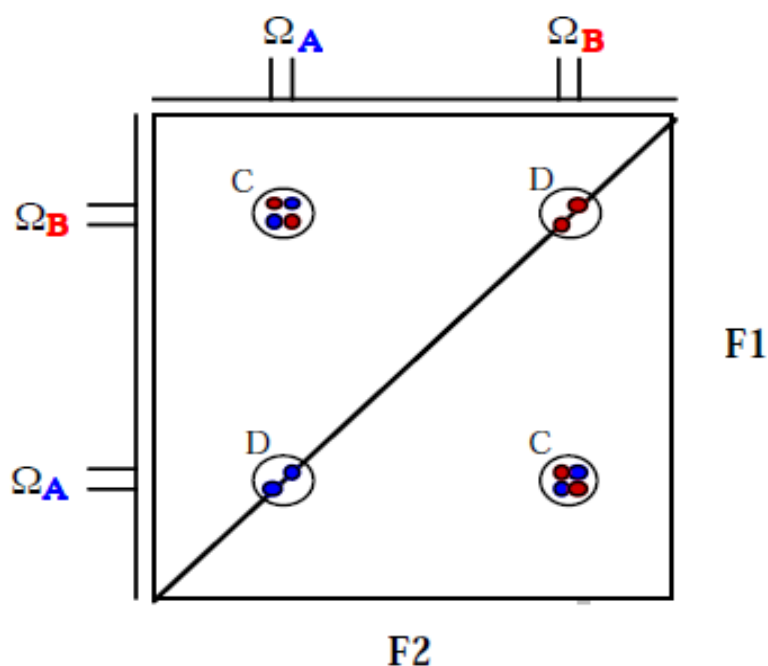
Η ποσοτική ανάλυση με την χρήση φασματοσκοπίας NMR έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Χρησιμοποιείται ευρέως στην οργανική σύνθεση για τον υπολογισμό της απόλυτης καθαρότητας των συστατικών ενός μείγματος παρέχοντας παράλληλα δομικές πληροφορίες χωρίς να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική στην ανάλυση φυσικών προϊόντων και στην μεταβολομική. Με την χρησιμοποίηση των CryoProbes καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση φυσικών προϊόντων και βιολογικών μορίων σε κλίμακα nMol. Μία ακόμα εφαρμογή αφορά στην παρακολούθηση αντιδράσεων και στην μελέτη κινητικών διεργασιών.

4.6 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων παρέχει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα. Αυτά είναι η κατανομή των σημάτων σε δύο ορθογώνιες διαστάσεις με αποτέλεσμα την εξάλειψη των επικαλύψεων, και η αναγνώριση των συσχετίσεων μεταξύ πυρήνων που συζεύγνυνται.

Ένα φάσμα δύο διαστάσεων αποτελείται από δύο άξονες συχνότητας που καλούνται άμεσος (F_2) και έμμεσος (F_1). Στον άμεσο άξονα οι συχνότητες των σημάτων προκύπτουν απευθείας από τον ανιχνευτή ενώ στον έμμεσο προκύπτουν από δεύτερο μετασχηματισμό Fourier.

Τα πειράματα δύο διαστάσεων διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στα φάσματα (α) ομοπυρηνικής σύζευξης (σήματα όμοιων πυρήνων και στους δύο άξονες) και (β) ετεροπυρηνικής σύζευξης (σήματα διαφορετικού πυρήνα σε κάθε άξονα).



Εικόνα 4.21 Ομοπυρηνικό φάσμα COSY με χαρακτηριστικά σήματα διαγωνίου (D) και κορυφές διασταύρωσης (D)^[131]

Επιπλέον, τα πειράματα δύο διαστάσεων διακρίνονται σε μικρότερες υποδιαιρέσεις (i) στα φάσματα τα οποία συσχετίζουν δύο πυρήνες μέσω της χημικής τους μετατόπισης, και (ii) στα φάσματα τα οποία συσχετίζουν την χημική μετατόπιση των πυρήνων με την σταθερά σύζευξης J (J-resolved).^[131]

Πίνακας 4.1 Επισκόπηση των πειραμάτων NMR δύο διαστάσεων ^[132]		
Κατηγορία	Πείραμα	Περιγραφή
Φάσματα ομοπυρηνικής σύζευξης	Μέσω μονοδιάστατων συζεύξεων	
	DQF-COSY	συζεύξεις geminal/vicinal πρωτονίων
	COSY-LR	μακρινές συζεύξεις πρωτονίων
	INADEQUATE	συζεύξεις άνθρακα - άνθρακα
	TOCSY	συσχέτιση όλων των πρωτονίων ενός συστήματος σπιν
	TQF-COSY	ταυτοποίηση υπολειμμάτων γλυκίνης σε πεπτίδια
	Μέσω διπολικών συζεύξεων	
	NOESY	
	ROESY	
	Φασματοσκοπία ανταλλαγής	
	EXSY	συσχέτιση ανταλλάξιμων πρωτονίων
Φάσματα ετεροπυρηνικής σύζευξης	Πειράματα ανίχνευσης ¹³C	
	hetcor	συσχέτιση απευθείας συνδεδεμένων άνθρακα/πρωτονίου
	COLOC	συσχέτιση άνθρακα/πρωτονίου μέσω μακρινών συζεύξεων
	Πειράματα ανίχνευσης ¹H	
	HMQC, HSQC	συσχέτιση απευθείας συνδεδεμένων άνθρακα/πρωτονίου
	HMBC	συσχέτιση άνθρακα/πρωτονίου μέσω μακρινών συζεύξεων
	H(S)MQC-TOCSY	Υβριδικές τεχνικές
	H(S)MQC-NOESY	
	H(S)MQC-COSY	
	Μέσω διπολικών συζεύξεων	
	HOESY	αλληλεπίδραση μεταξύ ετεροπυρηνικών διπολικών συζεύξεων
Πειράματα για την μέτρηση των σταθερών σύζευξης J J-resolved	Ομοπυρηνικά	
	Ετεροπυρηνικά	
	ECOSY	
	HMQC-J	

4.6.1 Πείραμα δύο διαστάσεων

Οι ακολουθίες παλμών οι οποίες χρησιμοποιούνται στα πειράματα δύο διαστάσεων περιέχουν τέσσερα βασικά στοιχεία.

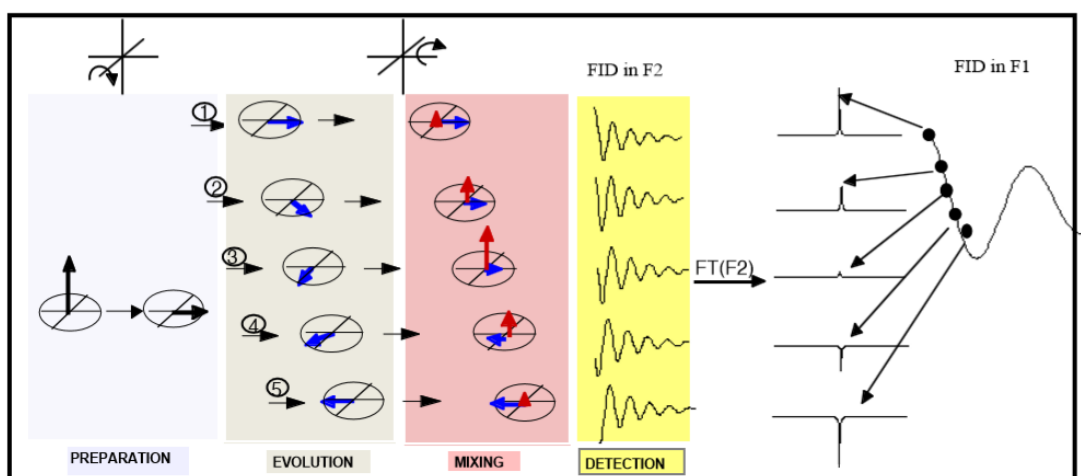
Αρχικά υπάρχει ένα χρονικό διάστημα (preparation period) κατά το οποίο επιτελείται η διέγερση του πυρήνα A. Στην περίπτωση της ομοπυρηνικής συσχέτισης μεταξύ

πρωτονίων το βήμα αυτό αποτελείται από έναν παλμό 90° . Εδώ πραγματοποιείται η μεταφορά της μαγνήτισης στο επίπεδο xy .

Στη συνέχεια, ακολουθεί ένα χρονικό διάστημα (evolution period) στο οποίο επιτυγχάνεται η αποτύπωση του σήματος στην έμμεση διάσταση (άξονας F_1). Η συλλογή και καταγραφή του σήματος γίνεται όπως και στην άμεση διάσταση. Η διαφορά έγκειται στο ότι τα σημεία πλέον συλλέγονται σε διαφορετικά 1D πειράματα. Κατά την διάρκεια του πειράματος δύο διαστάσεων, μία σειρά από φάσματα 1D καταγράφεται. Σε κάθε ένα από αυτά αλλάζει, συγκεκριμένα αυξάνεται, ο χρόνος στον οποίο επιτρέπεται στην παρατηρούμενη μαγνήτιση να περιστραφεί περί του άξονα z . Έτσι αναλόγως του χρόνου, τροποποιείται η ένταση του σήματος που τελικά ανιχνεύεται στον άξονα z . Από τις διαδοχικές FIDs που προκύπτουν αυξανόμενου του χρόνου περιστροφής, η συχνότητα στον έμμεσο άξονα δειγματοποιείται με ανάλογο τρόπο με αυτόν στον άμεσο άξονα. Τα σήματα αυτά οδηγούν στις κορυφές της διαγωνίου.

Το επόμενο βήμα αποτελεί η μεταφορά της μαγνήτισης από τον πυρήνα A στον πυρήνα B (mixing process). Τα είδη πειραμάτων δύο διαστάσεων διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων. Σε ένα πείραμα ομοπυρηνικής σύζευξης πρωτονίων (COSY), στο βήμα αυτό, ένας παλμός 90° προκαλεί μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ πυρήνων οι οποίοι εμφανίζουν μεταξύ τους σύζευξη.^[131]

Τέλος επιτελείται καταγραφή της FID (detection period). Οι παραπάνω διεργασίες συνοψίζονται στο σχήμα 4.22.



Εικόνα 4.22 ^[131]

4.6.2 Ποσοτικοποίηση και εφαρμογές

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων για ποσοτικούς σκοπούς πλεονεκτεί έναντι της φασματοσκοπίας μίας διάστασης λόγω της δυνατότητας διάκρισης σημάτων τα οποία στην τελευταία επικαλύπτονται.

Η ποσοτικοποίηση με χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων επιτυγχάνεται με τρόπο αντίστοιχο με την φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης. Ωστόσο, υπάρχει μία ουσιαστική διαφορά. Στα φάσματα NMR δύο διαστάσεων δεν υπάρχει άμεση αντιστοίχιση μεταξύ του σήματος μίας κορυφής και της ποσότητας του αναλύτη, όπως συμβαίνει στην μία διάσταση. Αυτό αιτιολογείται από την επίδραση πολλών παραγόντων στη διαμόρφωση του όγκου μίας κορυφής όπως ο τρόπος αποδιέγερσης, η πολλαπλότητα της κορυφής και το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης. Παρόλα αυτά ο όγκος της κορυφής διασταύρωσης παρουσιάζει γραμμική εξάρτηση από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Έτσι για να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση με την χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την χρήση προτύπων ουσιών και εσωτερικού προτύπου. Στη συνέχεια μετρώντας την αναλογία του όγκου της κορυφής του αναλύτη ως προς τον αντίστοιχο του εσωτερικού προτύπου σε άγνωστα δείγματα, είναι δυνατή η αντιστοίχιση σε συγκεκριμένη ποσότητα αναλύτη μέσω της καμπύλης αναφοράς.

Εκτός από την ανάγκη κατασκευής καμπύλης αναφοράς υπάρχει ακόμη ένας περιορισμός στη χρήση αυτής της τεχνικής. Η εγγενής μικρή ευαισθησία της τεχνικής έχει ως συνέπεια την αύξηση του χρόνου λήψης του φάσματος (από μερικά λεπτά έως κάποιες ώρες), προκειμένου να γίνει η λήψη κατάλληλου αριθμού φασμάτων μίας διάστασης με αυξανόμενους χρόνους t_1 . Ο περιορισμός αυτός μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση σύγχρονων τεχνικών (ultrafast single-scan 2D method).

4.6.2.1 Εφαρμογές της ποσοτικής φασματοσκοπίας 2D NMR

Η ποσοτική φασματοσκοπία NMR 2D παρουσιάζει μεγάλη εφαρμοσιμότητα σε αρκετούς τομείς. Συγκριτικά με το ποσοτικό 1D NMR, είναι πιο απαιτητική τεχνική όσον αφορά σε θέματα ρύθμισης των πειραματικών παραμέτρων, επεξεργασίας του φάσματος και κόστους του χρόνου ανάλυσης. Ωστόσο ένα πείραμα NMR δύο διαστάσεων δύναται να παρέχει σημαντικά βελτιωμένη ευαισθησία ώστε να προκύπτουν ακόμη μικρότερα όρια ανίχνευσης. Χάρη στην καλύτερη διάκριση των σημάτων επιτυγχάνεται επίσης σημαντικά βελτιωμένη γραμμικότητα και ακρίβεια. Τέλος πλεονεκτεί έναντι του 1D NMR, στην ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων και μορίων μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Έτσι ενώ το ποσοτικό NMR μίας διάστασης

εξακολουθεί να παραμένει μία τεχνική ευρέως χρησιμοποιούμενη για πειράματα ρουτίνας, το 2D NMR έρχεται να προσφέρει λύσεις εκεί όπου η χρήση του πρώτου είναι περιορισμένη.

Η φασματοσκοπία NMR 2D βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην ποσοτική ανάλυση φυσικών προϊόντων και στην μεταβολομική. Για την ανάλυση φυτικών και ζωικών μεταβολιτών έχουν χρησιμοποιηθεί τα ακόλουθα πειράματα δύο διαστάσεων : 2D J-resolved, COSY, TOCSY και HSQC.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται στην ανάλυση τροφίμων και στον έλεγχο ποιότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση πειραμάτων 2D J-resolved NMR για την ανάλυση διαφόρων τύπων μπίρας και η χρήση του πειράματος HSQC στην ανάλυση οργανικών ουσιών στο γάλα.

Εκτός από την ανάλυση σχετικά μικρών μορίων, το ποσοτικό NMR δύο διαστάσεων βρίσκει επίσης εφαρμογή στην ανάλυση πολυμερών φυτικών προέλευσης όπως η λιγνίνη, με την χρήση πειραμάτων HSQC και HETCOR.

Τέλος, η ανάλυση διαφόρων τύπων λαδιών αποτελεί έναν τομέα στον οποίο η χρήση του NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) είναι διαδεδομένη. Σε μικρότερο βαθμό γίνεται χρήση της φασματοσκοπίας NMR 2D (TOCSY, 2D INEPT, HSQC).^[133]

Β' ΜΕΡΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

Στα πλαίσια της πρώτης πειραματικής ενότητας τέθηκε ως στόχος η μελέτη της χημικής σύστασης της Μεγαρίτικης ποικιλίας. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε προς μελέτη η συγκεκριμένη ποικιλία σχετίζεται με ορισμένες ασυνήθιστες ενδείξεις που παρατηρήθηκαν σε παλαιότερες μελέτες σχετικά με αυτήν. Συγκεκριμένα, από παλαιότερες μελέτες που αφορούσαν τον καρπό της ελιάς της συγκεκριμένης ποικιλίας, οι οποίες είχαν διεξαχθεί με την χρήση χρωματογραφικής αναλυτικής τεχνικής, είχε προκύψει ότι τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης στον εδώδιμο καρπό ήταν μη ανιχνεύσιμα^[1]. Σε αυτό ήρθε να προστεθεί και το γεγονός ότι στο ελαιόλαδο που προκύπτει από την συγκεκριμένη ποικιλία, τα επίπεδα των σεκοϊριδοειδικών παραγώγων ελαιασίνη, ελαιοκανθάλη, άγλυκο λιγκστροσίδη και άγλυκο ελευρωπαΐνης ήταν ιδιαίτερα χαμηλά^[2]. Επιπλέον η κατεργασία εκπίκρανσης των καρπών αυτής της ποικιλίας που γίνεται παραδοσιακά είναι ήπια, υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης – η οποία προσδίδει την πικρή γεύση – στον μη επεξεργασμένο καρπό είναι χαμηλότερα συγκριτικά με άλλες ποικιλίες. Οι παρατηρήσεις αυτές, δεδομένων των συνήθων υψηλών συγκεντρώσεων ελευρωπαΐνης που περιέχονται στον καρπό της ελιάς^{[3],[1]} δηλώνουν μία αρκετά διαφοροποιημένη συμπεριφορά στη συγκεκριμένη ποικιλία. Η διαφοροποίηση αυτή διερευνήθηκε πειραματικά και η περιγραφή αυτής της μελέτης γίνεται στη συνέχεια.

Προκειμένου να επιτευχθεί αυτή η διερεύνηση και να υπάρξει πλήρης έλεγχος όλων των βημάτων της διαδικασίας εκπίκρανσης, πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή παρασκευή βρώσιμου ελαιοκαρπού. Η συνολική διαδικασία περιελάμβανε τα βήματα της συγκομιδής των καρπών, της εκπίκρανσης με την χρήση νερού και την αποθήκευση στην άλμη. Όταν η παρασκευή ολοκληρώθηκε μελετήθηκαν τόσο τα υδατικά απόβλητα που προέκυψαν από την διαδικασία εκπίκρανσης όσο και ο τελικά εδώδιμος καρπός, ως προς την χημική τους σύσταση ενώ είχε προηγηθεί μελέτη του μεταβολικού προφίλ του μη επεξεργασμένου καρπού ως προς την ανίχνευση ελευρωπαΐνης. Αυτό έγινε δυνατό με την χρήση τεχνικών *προσυγκέντρωσης* και *χρωματογραφικού διαχωρισμού* με σκοπό την απομόνωση και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών της συγκεκριμένης ποικιλίας.

5.1 Οργανολογία

Στην παράγραφο αυτή θα περιγραφεί η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια αυτής της πειραματικής ενότητας για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου, προσυγκέντρωσης, χρωματογραφικού διαχωρισμού και απόδοσης δομής των φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν.

5.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για ποιοτικό έλεγχο και για σκοπούς καθαρισμού και απομόνωσης. Χρησιμοποιήθηκαν υάλινες πλάκες και πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F₂₅₄-Merck). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ως κινητή φάση για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων ήταν εξάνιο, κυκλοεξάνιο, διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη σε διάφορες αναλογίες. Η παρατήρηση των κηλίδων έγινε με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 και 356 nm) αρχικά και εν συνεχεία το χρωματογράφημα παρατηρήθηκε στο ορατό ύστερα από ψεκασμό με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση.

5.1.2 Ρητίνη προσρόφησης XAD-4

Για σκοπούς προσυγκέντρωσης έγινε χρήση τεχνικής προσρόφησης σε ρητίνη Amberlite XAD-4. Έγινε χρήση της τεχνικής στήλης και οι διαλύτες έκπλυσης και αναγέννησης ήταν αντίστοιχα H₂O και MeOH.

5.1.3 Υγρή χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης

Οι διαδικασίες χρωματογραφικού διαχωρισμού και απομόνωσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (Silica gel) διαμέτρου 40-63 μm (flash). Οι διαλύτες που αποτέλεσαν την κινητή φάση ήταν οι διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογίες από 100:0 έως 50:50.

5.1.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η αποτίμηση των δομών των συστατικών που απομονώθηκαν επετεύχθη με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευές Bruker Avance 800 και Avance 600 με cryoprobe στο University of California Davis και DRX 400 MHz (ΕΚΓΠΑ). Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ¹H NMR και άνθρακα ¹³C NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum

Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) και NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy).

5.1.5 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Τα χρωματογραφήματα ελήφθησαν σε συσκευή Hewlett-Packard 6890-5973 με στήλη HP-5 MS (DB-5) 30m x 0,25mm, πάχος μεμβράνης 0,25μm, πρόγραμμα θερμοκρασίας 60° C (5 min) σε 280° C με ρυθμό 3° C/min.

5.1.6 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS)

Τα χρωματογραφήματα ελήφθησαν σε συσκευή LC-MS (UC Davis) με στήλη PolymerX RP-1 (Phenomenex C18, Torrance, CA). Η μέθοδο βαθμωτής έκλουσης αντίστροφης φάσης, με διαλύτες ακετονιτρίλιο/νερό με 0,1% φορμικό οξύ διαρκούσε 30 λεπτά με ροή 250 μL/min. Το έκλουσμα ελεγχόταν για αρνητικά ιόντα μέσω του ανιχνευτή LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

5.1.7 Πολωσίμετρο

Για την μέτρηση της στροφικής ικανότητας των προϊόντων που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκε πολωσίμετρο Perkin Elmer Polarimeter 341, με λυχνία στα 589 nm.

5.2 Παρασκευή επιτραπέζιου ελαιοκάρπου

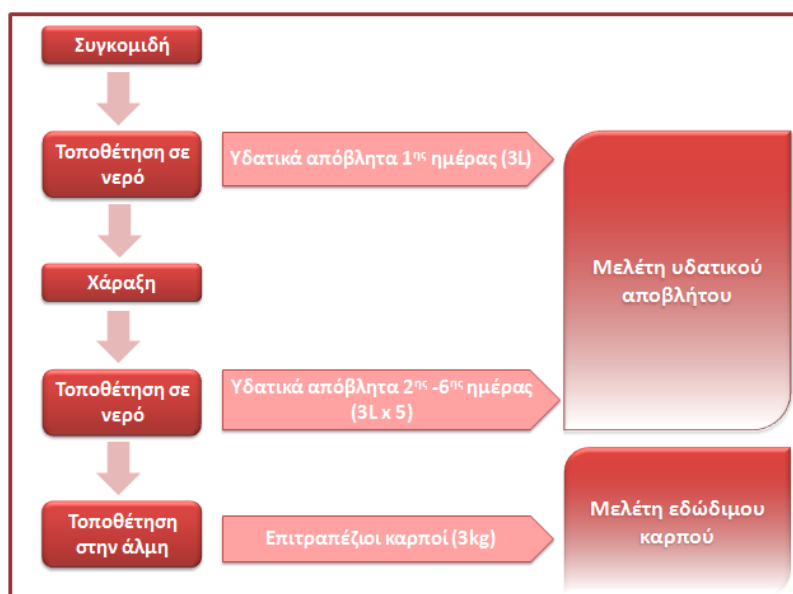
Η εργαστηριακή παρασκευή επιτραπέζιου ελαιοκάρπου Μεγαρίτικης ποικιλίας αποσκοπούσε στον προσεχτικό έλεγχο όλων των βημάτων που ακολουθούνται κατά την εκτίκρανση των καρπών της ελιάς. Τα βήματα αυτά περιλαμβάνουν την συγκομιδή, την εκτίκρανση και την αποθήκευση στην άλμη.

Η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε τον μήνα Νοέμβριο του έτους 2011 όταν οι καρποί βρισκόνταν σε στάδιο αλλαγής χρώματος (ελιές χρώματος στροφής). Οι καρποί συλλέχθηκαν από ελαιόδεντρα της Μεγαρίτικης ποικιλίας στην περιοχή Αμπελάκια Σαλαμίνας.

Συλλέχθηκαν συνολικά 3 Kg καρπών ελιάς, οι οποίοι εν συνεχεία τοποθετήθηκαν για μία ημέρα σε 3 L νερό. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε χάραξη αυτών και για τις επόμενες πέντε ημέρες ακολούθησε η διαδικασία της εκτίκρανσης. Συγκεκριμένα οι χαραγμένοι καρποί τοποθετούνταν σε 3 L νερού το οποίο άλλαζε ημερησίως για

πέντε ημέρες. Τα υδατικά απόβλητα που προέκυπταν αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά για κάθε ημέρα σε κατάψυξη θερμοκρασίας -20°C .

Όταν η διαδικασία εκπίκρυνσης ολοκληρώθηκε οι καρποί τοποθετήθηκαν σε 3L άλμης για λόγους συντήρησης. Η άλμη που χρησιμοποιήθηκε αποτελούσε υδατικό διάλυμα NaCl 10%. Οι καρποί ήταν κατάλληλοι προς κατανάλωση μετά το πέρας ενός μήνα.



Εικόνα 5.1 Διαγραμματική απεικόνιση της παρασκευής επιτραπέζιου ελαιοκάρπου

5.3 Μελέτη υδατικού αποβλήτου

Κατά την διαδικασία της εκπίκρυνσης εκτός από την απομάκρυνση των συστατικών που προσδίδουν πικρή γεύση στον καρπό, πραγματοποιείται επίσης διάχυση και άλλων υδατοδιαλυτών μεταβολιτών στο υδατικό μέσο. Η τοποθέτηση των καρπών της ελιάς σε νερό αποτελεί κατά μία έννοια περιορισμένη υδατική εκχύλιση αυτών και η μελέτη του υδατικού αποβλήτου εκπίκρυνσης ταυτίζεται σε ένα βαθμό με την μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος καρπών ελιάς. Στην παρούσα ενότητα περιγράφεται η απομόνωση αυτών των συστατικών που απομακρύνονται στο νερό κατά την διάρκεια των έξι ημερών.

5.3.1 Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης XAD-4

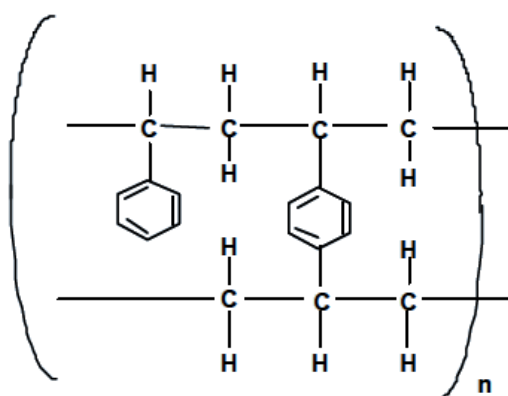
Μετά την παραλαβή των υδατικών αποβλήτων ακολούθησε διέλευση αυτών μέσω στήλης με ρητίνη προσρόφησης XAD-4. Το βήμα αυτό αποσκοπούσε στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών (π.χ. σάκχαρα) κατά την διέλευση του

αποβλήτου από την στήλη και στην προσυγκέντρωση φαινολικών συστατικών σχετικά μικρού μοριακού βάρους.

5.3.1.1 Ρητίνες προσρόφησης

Οι ρητίνες προσρόφησης αποτελούνται από μικρά, πορώδη και αδιάλυτα στο νερό και στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες, σφαιρίδια τα οποία σχηματίζονται γενικά κατά τον συμπολυμερισμό στυρολίου και διβινυλοβενζολίου. Η ύπαρξη του διβινυλοβενζολίου (συνήθως ~8%) βοηθά στην διασταυρούμενη σύνδεση, η οποία προσδίδει στα σωματίδια μηχανική σταθερότητα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πολυμερών ρητινών οι οποίες διαφέρουν ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και έχουν την δυνατότητα προσρόφησης διαφορετικών μορίων (π.χ. XAD-4, XAD-7, XAD-16 κλπ).

Η ρητίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ενότητα ήταν η ρητίνη προσρόφησης XAD-4. Η ρητίνη XAD-4 αποτελεί έναν πολυμερικό προσροφητή, ο οποίος διατίθεται υπό την μορφή λευκών αδιάλυτων σφαιριδίων. Είναι ένα μη ιονικό, διασταυρούμενο πολυμερές το οποίο οφείλει τις προσροφητικές του ιδιότητες στην μακροδικτυωτή δομή του, στην μεγάλη επιφάνεια που διαθέτει και στην αρωματική φύση που χαρακτηρίζει την επιφάνεια του. Η δομή αυτή εξασφαλίζει εξαιρετική φυσική, χημική και θερμική σταθερότητα. Η ρητίνη XAD-4 χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την προσρόφηση οργανικών ενώσεων σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους από υδατικά διαλύματα.



Εικόνα 5.2 Χημική δομή της ρητίνης προσρόφησης XAD-4^[4]

Ο μηχανισμός προσρόφησης των οργανικών μορίων στην επιφάνεια της ρητίνης στηρίζεται κυρίως σε δυνάμεις Van der Waals. Η ρητίνη XAD-4 αποτελείται από τη συνεχή φάση του πολυμερούς και από μία πορώδη φάση. Ο αρωματικός και

υδρόφοβος χαρακτήρας της ρητίνης προκαλεί την ανάπτυξη ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων της και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών ενώσεων. Έτσι το υδρόφοβο τμήμα του μορίου προσροφάται στην υδρόφοβη επιφάνεια ενώ το υδρόφιλο προσανατολίζεται στην υδατική φάση. Η εκλεκτικότητα και η έκταση της προσρόφησης οργανικών ουσιών στις ρητίνες αυξάνει με την αύξηση της υδροφοβικότητας του οργανικού μορίου.

Η τεχνική της προσυγκέντρωσης με την χρήση ρητίνης επιτυγχάνεται με δύο τρόπους, με την τεχνική της στήλης και την τεχνική του λουτρού. Αν και η τεχνική του λουτρού είναι πιο απλή, επιλέχθηκε η τεχνική στήλης καθώς στην περίπτωση αυτή συμβαίνουν πολυάριθμες τεχνικές λουτρού στα επάλληλα στρώματα της ρητίνης και έτσι η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης μπορεί να καταστεί ποσοτική. Στην περίπτωση της τεχνικής στήλης τα βήματα που ακολουθούνται περιλαμβάνουν : 1) την διαβίβαση του υδατικού δείγματος μέσω της στήλης κατά την οποία πραγματοποιείται προσρόφηση των μορίων εκείνων που παρουσιάζουν συγγένεια ως προς την ρητίνη ενώ εκείνα που δεν αλληλεπιδρούν με την ρητίνη απομακρύνονται μαζί με το διάλυμα που διέρχεται, 2) την εκρόφηση των μορίων που έχουν προσροφηθεί, με την χρήση κάποιου ή κάποιων διαλυτών έκλουσης κατά προτίμηση τμηματικά. Το δεύτερο βήμα αποτελεί την διαδικασία αναγέννησης της ρητίνης μετά το οποίο είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση της.

Πριν από την χρήση τους, οι ρητίνες προσρόφησης απαιτούν μία στοιχειώδη προετοιμασία. Οι ρητίνες εν γένει διατίθενται σε υδατικό μέσο το οποίο περιέχει άλατα χλωριούχου νατρίου (NaCl) και ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) για την αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων. Τα άλατα αυτά πρέπει να απομακρυνθούν από την ρητίνη πριν από την χρήση και αυτό επιτυγχάνεται με την έκπλυση με νερό. Επιπλέον είναι απαραίτητη η απομάκρυνση κάποιων υπολειμματικών μονομερών και oligομερών από το πολυμερικό υλικό και για να γίνει αυτό απαιτείται η χρήση του διαλύτη αναγέννησης. Εάν ο διαλύτης αναγέννησης είναι αλκοόλη, απαιτείται πριν από την έναρξη του κύκλου τροφοδότησης της στήλης να γίνει αντικατάσταση της αλκοόλης με νερό^[4].

Στην εικόνα 5.3 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά και οι προτεινόμενες συνθήκες χρήσης της ρητίνης XAD-4 (“product data sheet”).

PROPERTIES	
Matrix _____	Macroreticular crosslinked aromatic polymer
Physical form _____	White translucent beads
Moisture holding capacity ^[1] _____	54 to 60 %
Shipping weight _____	680 g/L
Specific gravity _____	1.01 to 1.03
Particle size _____	
Harmonic mean size _____	0.49 - 0.69 mm
Uniformity coefficient _____	≤ 2.0
Fines content ^[1] _____	< 0.350 mm : 5.0 % max
Coarse beads _____	> 1.18 mm : 5.0 % max.
Maximum reversible swelling _____	see Table 1
Surface area ^[2] _____	≥ 750 m ² /g
Porosity ^[2] _____	≥ 0.50 ml/ml

^[1] Contractual value
^[2] Values based on statistical quality control (SQC)
Test methods are available on request

SUGGESTED OPERATING CONDITIONS	
pH range _____	0 - 14
Maximum temperature limit _____	150°C
Minimum bed depth _____	75 cm
Flow rate _____	
Loading _____	2 to 16 BV*/h
Displacement _____	1 to 4 BV/h
Regeneration _____	1 to 4 BV/h
Rinse _____	2 to 16 BV/h

* BV (Bed Volume) – 1 m³ solution per m³ resin

Εικόνα 5.3 ^[4]

5.3.1.2 Εφαρμογή της τεχνικής προσυγκέντρωσης στα υδατικά απόβλητα εκπίκρασης ελαιοκάρπων

Ύστερα από παραλαβή των υδατικών αποβλήτων και διήθηση σε διηθητικό χαρτί έγινε διέλευση αυτών μέσω στήλης με ρητίνη προσρόφησης XAD-4. Χρησιμοποιήθηκε στήλη ύψους 65 cm και διαμέτρου 3.5 cm η πλήρωση της οποίας πραγματοποιήθηκε με 250g ρητίνης XAD-4. Ο όγκος που καταλάμβανε η ρητίνη μέσα στη στήλη (bed volume, BV) ήταν 375 mL. Ο συνολικός όγκος των υδατικών αποβλήτων ήταν 18 L, ενώ ημερήσια προέκυπταν από την διαδικασία εκπίκρασης 3 L. Ο κύκλος της τροφοδοσίας της στήλης γινόταν ανά 1.5 L.

Το πρώτο βήμα αποτελούσε η διέλευση 1.5 L υδατικού αποβλήτου από την στήλη με ροή (feeding flow rate) 750 mL/h ή 2BV/h. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης 1.5 L υδατικού αποβλήτου ήταν δύο ώρες.

Ύστερα από την προσρόφηση των οργανικών μορίων, η επόμενη φάση αφορούσε την διαδικασία αναγέννησης της στήλης και περιελάμβανε τρία βήματα. Στο πρώτο βήμα γινόταν έκπλυση της ρητίνης με απεσταγμένο νερό έως ότου το υγρό που εξέρχεται από την στήλη γίνει άχρωμο. Σε αυτό το βήμα, η προσθήκη νερού

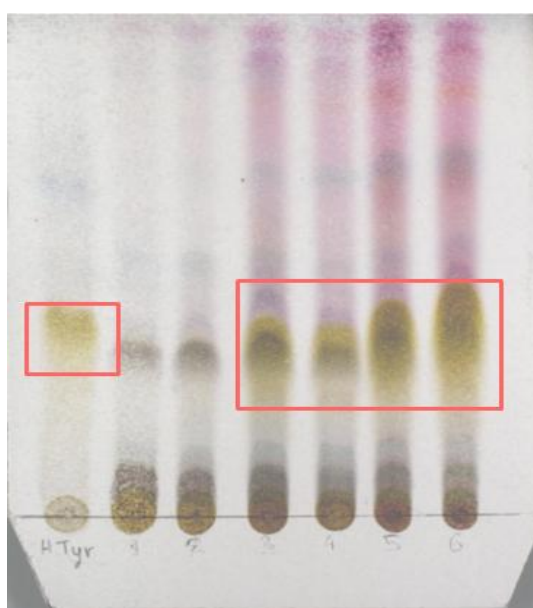
επιτυγχάνει την έκλυση σακχάρων και χρωστικών χωρίς να επηρεάζει καθόλου τα υπόλοιπα προσροφηθέντα μόρια. Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η έκλυση των μορίων που παραμένουν στην επιφάνεια της ρητίνης με την χρήση 500 mL μεθανόλης. Τέλος όταν ολοκληρωθεί η έκλυση, γίνεται έκπλυση της στήλης με απεσταγμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί η μεθανόλη και η ρητίνη να είναι κατάλληλη για επόμενη χρήση.

Από την ποσότητα του υδατικού αποβλήτου της κάθε ημέρας (3L) προέκυψαν 1000mL μεθανολικού εκλούσματος τα οποία συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού. Στον πίνακα 5.1 παρατίθενται τα βάρη των εκλουσμάτων που προέκυψαν.

Πίνακας 5.1 Δεδομένα βάρους για τα εκχυλίσματα που προκύπτουν από τις έξι ημέρες

Ημέρα	$W_{\text{εκλούσματος}}$ (g)
1 ^η	0.7927
2 ^η	2.2807
3 ^η	1.4233
4 ^η	1.2183
5 ^η	1.3102
6 ^η	0.7567

Παρατηρείται ότι την πρώτη ημέρα η ποσότητα του εκχυλίσματος που προκύπτει είναι σαφώς μικρότερη από τις αντίστοιχες των υπολοίπων ημερών (με εξαίρεση την τελευταία). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην χαραγή των καρπών που πραγματοποιήθηκε την δεύτερη ημέρα και η οποία επέτρεψε την διάχυση μεγαλύτερης ποσότητας μεταβολιτών. Στην εικόνα 5.4 παρατίθεται χρωματογράφημα



λεπτής στιβάδας όπου παρατηρείται το προφίλ των εκχυλισμάτων για τις έξι ημέρες στο συγκεκριμένο σύστημα ανάπτυξης. Ένας από τους κύριους μεταβολίτες που συναντάται στα υδατικά απόβλητα εκπύκνωσης ελαιοκάρπων, η υδροξυτυροσόλη φαίνεται να ανακτάται σε μεγάλες ποσότητες ιδίως τις τελευταίες ημέρες.

Εικόνα 5.4 TLC σε σύστημα 95-5% CH_2Cl_2 -MeOH. Μεθανολικά εκχυλίσματα από τις 6 ημέρες

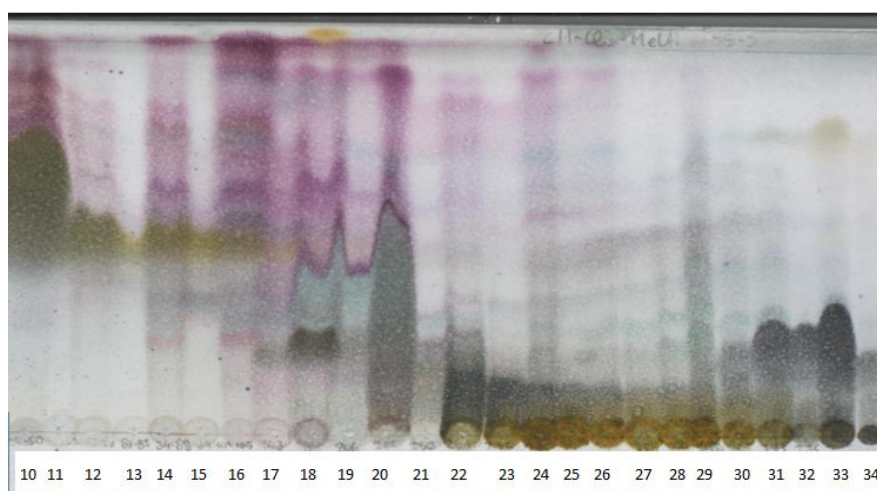
Η μελέτη της ποσοτικής σύστασης των υδατικών αποβλήτων ως προς συγκεκριμένους βιοδραστικούς μεταβολίτες όπως η υδροξυτυροσόλη πραγματοποιείται σε επόμενη ενότητα. Στη συνέχεια θα περιγραφεί η διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών από τα δείγματα των δύο πρώτων ημερών.

5.3.2 Διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών

Η μελέτη της χημικής σύστασης των υδατικών αποβλήτων εκπίκρυνσης πραγματοποιήθηκε στα δείγματα που προέκυψαν από τις δύο πρώτες ημέρες. Στα δείγματα αυτά περιέχονται οι περισσότεροι πολικοί μεταβολίτες συγκριτικά με τα δείγματα των επόμενων ημερών στα οποία γίνεται η απελευθέρωση των λιγότερο πολικών συστατικών. Οι διαδικασίες διαχωρισμού και απομόνωσης μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε κάνοντας χρήση χρωματογραφίας στήλης χαμηλής πίεσης και παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

5.3.2.1 Χρωματογραφική στήλη 1

Ποσότητα 2.34 g από την συνένωση των δειγμάτων των δύο πρώτων ημερών υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (5 cm) γέλης πυριτίου (silica gel) υπό χαμηλή πίεση. Οι διαλύτες έκλουσης ήταν μίγματα διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2) και μεθανόλης (MeOH) σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας από 99%-1% έως 50% - 50% CH_2Cl_2 -MeOH. Ο όγκος των κλασμάτων που παραλήφθηκαν ήταν 10mL και η εξέταση τους πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).



Εικόνα 5.5 Συγκεντρωτική TLC (95-5% CH_2Cl_2 -MeOH) για τα κλάσματα της στήλης 1

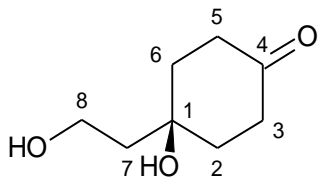
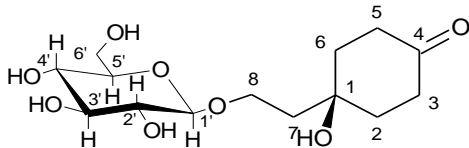
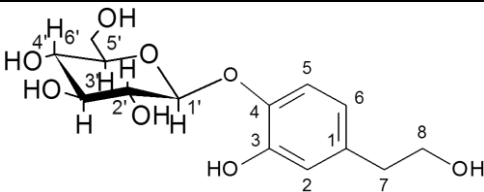
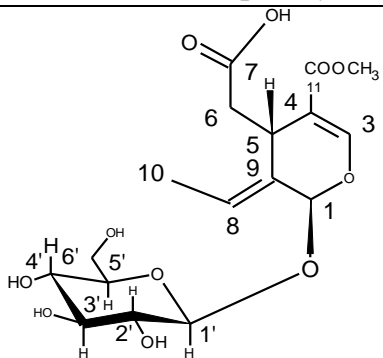
Πίνακας 5.2

α/α	Κλάσματα	Πολικότητα διαλυτών έκλουσης CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Βάρος (mg)	Παρατηρήσεις
1	1-50	99-1	-	
2	51-75	98-2	-	
3	76-80	98-2	18.7	
4	81-90	98-2	8.7	
5	91-105	98-2	5.1	
	106-110	97-3		
6	111-125	97-3	12.9	
7	126-130	97-3	12.4	
8	131-135	97-3	3.1	
9	136-140	97-3	1.8	
10	141-201	97-3	29.9	Rengyoxide
11	202-203	97-3	1.2	*
12	204-218	97-3	7.3	*
	219-231	96-4		
13	232-234	96-4	1.1	*
14	235-239	96-4	5.1	*
15	240-255	96-4	3.2	*
16	256-298	95-5	19.9	*
17	299-318	94-6	7.0	
18	319-356	94-6	21.9	
19	357-367	93-7	10.2	
20	368-408	93-7	78.3	
21	409-419	92-8	11.1	
22	420-426	92-8	32.6	Prep1A
23	427-445	92-8	61.9	
24	446-461	92-8	32.7	
25	462-468	92-8	21.5	
26	469-488	92-8	74.1	Hydroxytyrosol
				4-O-glucoside
27	489-518	92-8	20.8	
28	519-538	92-8	21.2	
29	539-555	90-10	54.7	
30	556-583	90-10	34.8	
31	584-633	90-10	58.8	
32	634-643	80-20	19.5	Prep1B
33	644-673	80-20	134.1	
34	674-723	50-50	332.8	

❖ Στα κλάσματα 202-298 διαπιστώθηκε μέσω των φασμάτων NMR η ύπαρξη σε μείγμα των μεταβολιτών υδροxyτυροσόλη και τυροσόλη. Παρόλο που δεν ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός και απομόνωση αυτών σημειώνεται η

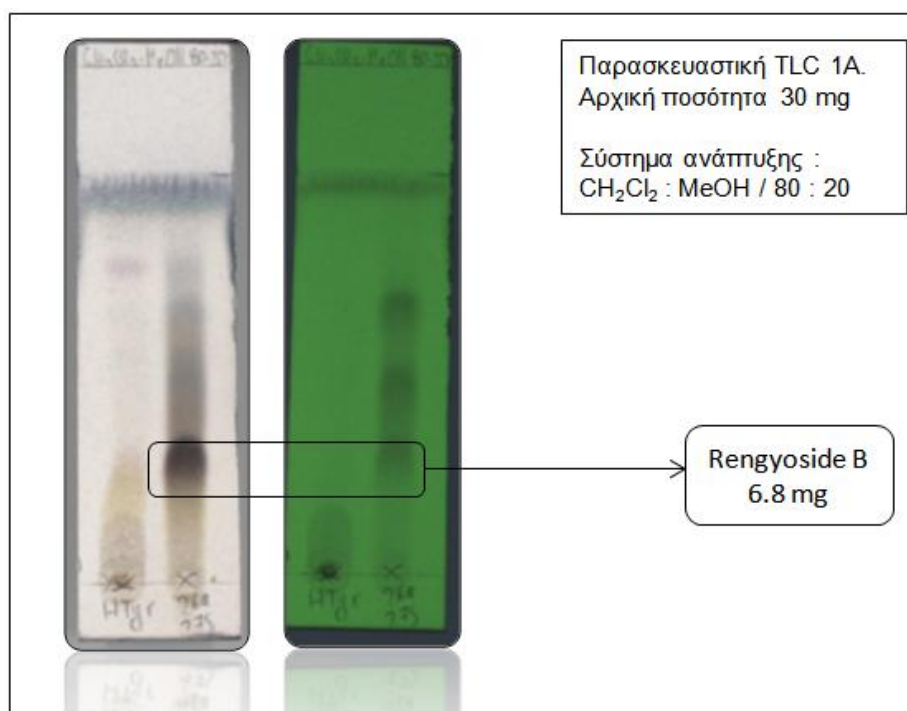
ύπαρξη τους καθώς σε επόμενο κεφάλαιο πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση αυτών στα δείγματα των υδατικών αποβλήτων.

Πίνακας 5.3

Κλάσμα	Prep. TLC	Σύστημα ανάπτυξης	Μεταβολίτης	
141-201	-	-	Rengyoxide	
420-226	1A	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 80 : 20	Rengyoside B	
469-488	-	-	Hydroxytyrosol 4-O-glucoside	
634-643	1B	CH ₂ Cl ₂ : EtOAc : MeOH 4 : 2 : 4	Oleoside 11-methyl ester	

5.3.2.2 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 1A

Το κλάσμα 420-426 υπέστη περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό προκειμένου να απομονωθεί σε καθαρή μορφή ο μεταβολίτης rengyoside B. Για τον διαχωρισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας κανονική φάσης, ενώ ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών ήταν CH_2Cl_2 : MeOH σε αναλογία 80 : 20.

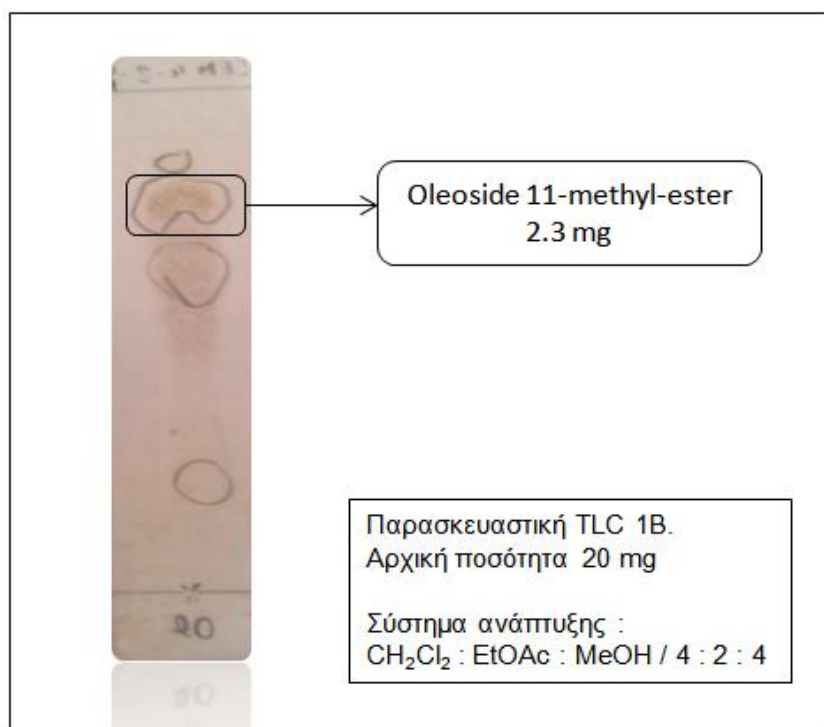


Εικόνα 5.6 Παρασκευαστική TLC 1A

Στην πλάκα τοποθετήθηκαν 30mg από το κλάσμα 420-426. Ακολούθησε διαχωρισμός των συστατικών του κλάσματος κατά μήκος της γυάλινης πλάκας. Μετά από παρατήρηση στο υπεριώδες (254 nm) και ψεκασμό μέρους της πλάκας με διάλυμα θειικής βανιλίνης πραγματοποιήθηκε απομόνωση της ζώνης που απεικονίζεται στην εικόνα 5.6. Από την ζώνη αυτή απομονώθηκαν 6.8 mg του μεταβολίτη rengyoside B. Η ταυτοποίηση του μορίου επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας NMR.

5.3.2.3 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 1B

Στα κλάσματα 634-643 και 644-673 παρατηρήθηκε με την βοήθεια των φασμάτων πρωτονίου η ύπαρξη, και μάλιστα σε μεγάλη ποσότητα, του μεταβολίτη 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη. Για την απομάκρυνση των προσμίξεων το κλάσμα 634-643 υπέστη περαιτέρω διαχωρισμό με χρήση της τεχνικής παρασκευαστικής TLC.



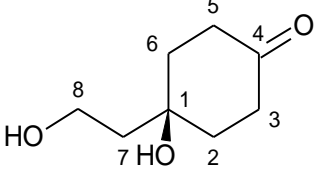
Εικόνα 5.7 Παρασκευαστική TLC 1B

Η διαδικασία ήταν η ίδια με αυτήν που περιγράφηκε στην παράγραφο 5.3.2.2. Το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος ήταν CH₂Cl₂ : EtOAc : MeOH σε αναλογία 4 : 2 : 4. Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε προς διαχωρισμό ήταν 20 mg από το κλάσμα 634-643. Η ζώνη η οποία απομονώθηκε ήταν αυτή που απεικονίζεται στην εικόνα 5.7 και από αυτήν προέκυψαν 2.3 mg.

5.3.3 Φασματοσκοπική μελέτη απομονωθέντων μεταβολιτών και βιολογικές ιδιότητες

Κατά την μελέτη της σύστασης των υδατικών αποβλήτων που προέκυψαν από τις δύο πρώτες ημέρες της διαδικασίας εκπίκρυνσης πραγματοποιήθηκε η απομόνωση δύο μεταβολιτών που απομονώνονται για πρώτη φορά από το είδος με ονόματα rengyoxide και rengyoside B. Επιπλέον απομονώθηκαν οι μεταβολίτες 4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης και ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται περιγραφή των φασματοσκοπικών δεδομένων για κάθε έναν από τους μεταβολίτες που απομονώθηκαν καθώς επίσης και παράθεση των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Τα φάσματα των απομονωθέντων μορίων παρατίθενται στο αντίστοιχο παράρτημα.

5.3.3.1 Rengyoxide

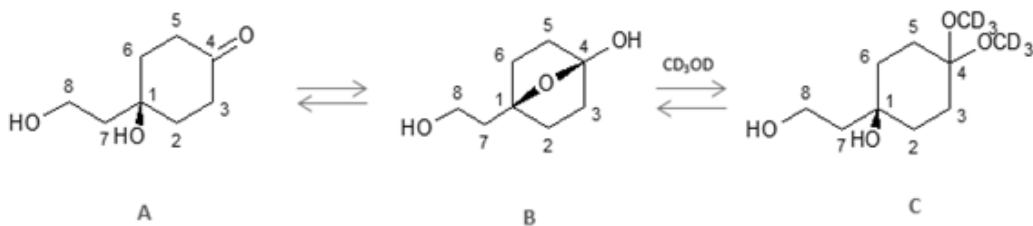
	M.B.	158.197
	Σ.Τ.	C ₈ H ₁₄ O ₃
	[α]_D	+0.16°
Συνώνυμα	<i>Cleroindicin B</i> , 4-(2-υδροξυ-αιθυλ)-κυκλοεξανόνη, 4-υδροξυ-4-(2-υδροξυ-αιθυλ)-κυκλοεξανόνη	

Ο μεταβολίτης *rengyoxide* απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος *Olea*. Γενικά, συναντάται σε φυτά των οικογενειών Oleaceae (*Forsythia suspensa*^[5]), Bignoniaceae (*Incarvillea mairei* var. *grandiflora*, *Incarvillea delavayi*, *Incarvillea arguta*^{[6],[7],[8]}), Verbenaceae (*Clerodendrum indicum*^[9]), Scrophulariaceae (*Halleria lucida*^[10]) και Plantaginaceae (*Isoplexis canariensis*^[11]).

5.3.3.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση αυτού του μεταβολίτη πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας NMR και πιο συγκεκριμένα των πειραμάτων ¹H-NMR, ¹³C-NMR και ¹³C-DEPT NMR, HSQC-DEPT. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε διαλύτες δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD). Τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν σύμφωνα με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.

Ωστόσο, κατά την διάλυση της στερεής ουσίας σε μεθανόλη και μετά την λήψη φάσματος NMR παρατηρήθηκε αλλαγή στην δομή. Συγκεκριμένα, στο φάσμα ¹³C-NMR, ενώ σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο παρατηρήθηκε η ύπαρξη καρβονυλικού άνθρακα, όταν έγινε λήψη σε δευτεριωμένη μεθανόλη το σήμα του καρβονυλικού άνθρακα είχε εξαφανιστεί και είχε προκύψει ένα νέο σήμα στα 99.75 ppm αντ' αυτού. Έτσι λοιπόν έγινε η υπόθεση ότι κατά την επαφή του μεταβολίτη αυτού με μεθανόλη πραγματοποιείται ο σχηματισμός ακετάλης που δικαιολογεί την εξαφάνιση του σήματος του καρβονυλίου και την εμφάνιση του σήματος διοξυγονωμένου άνθρακα. Η υπόθεση αυτή για το συγκεκριμένο μόριο επιβεβαιώθηκε και βιβλιογραφικά^[12].



Εικόνα 5.8 A : Rengyoxide. Σε πρώτο στάδιο σχηματίζεται η ημιακετάλη B, η οποία είναι ασταθής και παρουσία μεθανόλης η ισορροπία μετατοπίζεται προς την ακετάλη C

Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου και άνθρακα για το μόριο του μεταβολίτη rengyoxide σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD).

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται είναι οι ακόλουθες.

- Στα **4.01 ppm**, μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 8 τα οποία παρουσιάζουν σύζευξη με τα δύο πρωτόνια της θέσης 7 ($J = 5.7 \text{ Hz}$).
- Στα **2.77 ppm**, μία τριπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 3α και 5α. Κάθε ένα από αυτά παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια 3β, 2α/2β και 5β, 6α/6β αντίστοιχως. Οι geminal συζεύξεις δηλαδή αυτές μεταξύ των πρωτονίων 3α και 3β καθώς και των 5α και 5β έχουν σταθερά $J = 13.86 \text{ Hz}$. Η σταθερά σύζευξης των πρωτονίων 5α και 3α με τα πρωτόνια των θέσεων 6 και 2 αντίστοιχα είναι 6.1 Hz.
- Στα **2.25 ppm**, μία διευρυμένη διπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα 2H των θέσεων 3β και 5β. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρείται μόνο η σύζευξη με τα πρωτόνια σε geminal θέση δηλαδή τα 3α και 5α αντίστοιχως με σταθερά $J = 14.7 \text{ Hz}$. Αντιθέτως η σύζευξη των πρωτονίων 3β και 5β με τα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6 αντίστοιχα είναι πολύ μικρή και η σταθερά σύζευξης είναι μη μετρήσιμη. Για αυτό το λόγο η διπλή κορυφή παρουσιάζει διεύρυνση.
- Στα **2.12 ppm**, μία διπλή – τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H τα οποία αντιστοιχούν στις θέσεις 2α και 6α. Παρουσιάζουν αφενός μία geminal σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 2β και 6β αντίστοιχα με σταθερά $J = 14.0 \text{ Hz}$, αφετέρου παρατηρείται μικρότερη σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 3 και 5 αντίστοιχως με σταθερά $J = 3.1 \text{ Hz}$.
- Στα **1.83 ppm** μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H της θέσης 7 τα οποία παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 8 με σταθερά $J = 5.7 \text{ Hz}$.
- Τέλος στα **1.77 ppm** μία τριπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα 2H των θέσεων 2β και 6β. Η σύζευξη με τα αντίστοιχα πρωτόνια σε geminal θέση δηλαδή

τα 2α και 6α έχει σταθερά $J = 13.2$ Hz, ενώ η σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 3 και 5 αντίστοιχα έχει σταθερά $J = 4.9$ Hz.

Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ σε CDCl_3 παρατηρούνται οι ακόλουθες χημικές μετατοπίσεις.

- Στα **212.18 ppm** εμφανίζεται η κορυφή του καρβονυλικού άνθρακα της θέσης 4.
- Στα **70.49 ppm** παρατηρείται το σήμα του οξυγονωμένου άνθρακα της θέσης 1.
- Στα **59.96 ppm** και **41.68 ppm** παρατηρούνται οι χημικές μετατοπίσεις του οξυγονωμένου άνθρακα της θέσης 8 και του άνθρακα της θέσης 7 αντίστοιχα.
- Τέλος στα **37.19 ppm** εμφανίζονται μαζί οι άνθρακες των θέσεων 2 και 6, ενώ στα **36.84 ppm** οι άνθρακες των θέσεων 3 και 5.

Στο φάσμα HSQC-DEPT σε CDCl_3 , όπου γενικά παρατηρούνται οι συζεύξεις ανθράκων με τα πρωτόνια που φέρουν, εμφανίζονται ορισμένα χαρακτηριστικά σήματα :

- Δύο ζεύγη χαρακτηριστικών κορυφών διασταύρωσης ($\text{H}2\beta/\text{H}6\beta$, $\text{C}2/\text{C}6$), ($\text{H}2\alpha/\text{H}6\alpha$, $\text{C}2/\text{C}6$) και ($\text{H}3\beta/\text{H}5\beta$, $\text{C}3/\text{C}5$), ($\text{H}3\alpha/\text{H}5\alpha$, $\text{C}3/\text{C}5$) υποδεικνύουν τα ζεύγη των πρωτονίων που βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα.
- Παρατηρούνται επίσης οι συζεύξεις των πρωτονίων $\text{H}7$ και $\text{H}8$ με τους άνθρακες $\text{C}7$ και $\text{C}8$.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CD_3OD οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται είναι οι ακόλουθες.

- Στα **3.77 ppm** μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα 2H της θέσης 8 τα οποία παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 7 με σταθερά $J = 7.2$ Hz.
- Στα **1.74 ppm** μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H που αντιστοιχούν στην θέση 7 και παρουσιάζουν όπως αναφέρθηκε σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 8 με σταθερά $J = 7.2$ Hz.
- Τα πρωτόνια της θέσης 3 (2H) καθώς και αυτά της θέσης 5 (2H) εμφανίζονται ως μία πολλαπλή κορυφή στην περιοχή **1.76 – 1.78 ppm**.
- Τα πρωτόνια των θέσεων 2α,6α και 2β,6β εμφανίζονται ως δύο τριπλές κορυφές στα **1.62 ppm** και **1.55 ppm** αντίστοιχα.

Η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ σε CD_3OD περιγράφεται ακολούθως.

- Στα **99.75 ppm** εντοπίζεται το σήμα του διοξυγονωμένου άνθρακα της θέσης 4

- Στα **69.89 ppm** παρατηρείται η χημική μετατόπιση του οξυγονωμένου άνθρακα της θέσης 1.
- Οι άνθρακες των θέσεων 8 και 7 εμφανίζονται στα **57.74 ppm** και **43.49 ppm** αντίστοιχα.
- Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων στις θέσεις 2 και 6 συμπίπτουν στα **32.27 ppm**.
- Τέλος στα **27.56 ppm** εμφανίζονται οι άνθρακες των θέσεων 3 και 5.

Στο φάσμα ^{13}C -DEPT εξαφανίζεται το σήμα των τεταρτοταγών ανθράκων C-4 και C-1 ενώ παρατηρούνται τα σήματα των ανθράκων :

- C-8 στα 57.73 ppm
- C-7 στα 43.43 ppm
- C-6 και C-2 στα 33.32 ppm
- C-5 και C-3 στα 27.56 ppm

Στο φάσμα HSQC-DEPT σε CD_3OD εμφανίζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά σήματα :

- Αντιθέτως με αυτό που παρατηρείται στο αντίστοιχο φάσμα σε CDCl_3 , τα ζεύγη των κορυφών διασταύρωσης ($\text{H}3\beta/\text{H}5\beta$, C3/C5), ($\text{H}3\alpha/\text{H}5\alpha$, C3/C5) δεν διαχωρίζονται πλέον αλλά απεικονίζονται ως μία κορυφή διασταύρωσης.
- Παρατηρείται επίσης των ζεύγος των κορυφών διασταύρωσης ($\text{H}2\beta/\text{H}6\beta$, C2/C6), ($\text{H}2\alpha/\text{H}6\alpha$, C2/C6) το οποίο υποδηλώνει τα ζεύγη των πρωτονίων που βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα, και
- Τέλος παρατηρούνται οι συζεύξεις των πρωτονίων H7 και H8 με τους άνθρακες C7 και C8.

Στο φάσμα HMBC σε CD_3OD παρατηρούνται οι συζεύξεις :

- του πρωτονίου της θέσεως 8 με τους άνθρακες 7 (^2J) και 1 (^3J),
- των πρωτονίων της θέσης 5 με τους άνθρακες 6 (^2J), 4 (^2J), 1 (^3J), 3 (^3J) και 2 (^4J),
- των πρωτονίων της θέσης 3 με τους άνθρακες 2 (^2J), 4 (^2J), 1 (^3J), 5 (^3J) και 6 (^4J),
- του πρωτονίου της θέσης 7 με τους άνθρακες 1 (^2J), 8 (^2J), 2 (^3J) και 6 (^3J),
- των πρωτονίων της θέσης 2 με τους άνθρακες 3 (^2J), 1 (^2J), 4 (^3J), 6 (^3J), 7 (^3J) και 5 (^4J),
- των πρωτονίων της θέσης 6 με τους άνθρακες 5 (^2J), 1 (^2J), 4 (^3J), 2 (^3J), 7 (^3J) και 3 (^4J),

Στους πίνακες 5.4 και 5.5 παρατίθενται συνοπτικά οι μετατοπίσεις πρωτονίου και άνθρακα του μορίου σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και δευτεριωμένη μεθανόλη αντίστοιχα.

Πίνακας 5.4 Φασματοσκοπική περιγραφή του μεταβολίτη Rengyoxide σε CDCl_3

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J Hz)
1	70.49	-
2a, 6a	37.19	2.12 (2H, dt, J = 14.0/ 3.1 Hz)
2b, 6b		1.77 (2H, td, J = 13.2/ 4.9 Hz)
3a, 5a	36.84	2.77 (2H, td, J = 13.9 / 6.1 Hz)
3b,5b		2.25 (2H, d, J = 14.7 Hz)
4	212.18	-
7	41.68	1.83 (2H, t, J = 5.7 Hz)
8	59.96	4.01 (2H, t, J = 5.7 Hz)

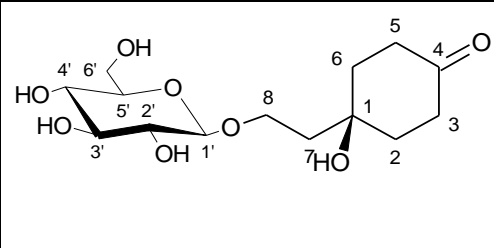
Πίνακας 5.5 Φασματοσκοπική περιγραφή του μεταβολίτη Rengyoxide σε CD_3OD

Άτομο	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ ppm)	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm)
1	69.89	-
2a, 6a	32.27	1.62 (2H, m)
2b, 6b		1.55 (2H, m)
3a, 5a	27.56	1.76 – 1.78 (4H, m)
3b,5b		
4	99.75	-
7	43.49	1.74 (2H, t, J = 7.2 Hz)
8	57.74	3.77 (2H, t, J = 7.2 Hz)

5.3.3.1.2 Βιολογικές ιδιότητες

Ο μεταβολίτης Rengyoxide συναντάται στους καρπούς του φυτού *Forsythia suspensa*. Οι καρποί αυτοί συνιστούν το ακατέργαστο φάρμακο “rengyo” το οποίο χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική ως αντιφλεγμονώδες και διουρητικό, ενώ έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει αντιβακτηριδιακή δράση^[5].

5.3.3.2 Rengyoside B

	M.B.	320.34
	Σ.Τ.	C ₁₄ H ₂₄ O ₈
	[α]_D	- 20.0°
Συνώνυμα	-	

Ο μεταβολίτης **Rengyoside B** αποτελεί την γλυκοσιδική μορφή του μεταβολίτη Rengyoxide B και απομονώνεται για πρώτη φορά από το γένος **Olea**. Γενικά έχει απομονωθεί από φυτά των οικογενειών Bignonaceae (φύλλα και κλαδιά του φυτού *Markhamia stipulata*^[13] και *Barnettia kerrii*^[14], *Tecoma carpensis*^[15] και *Millingtonia hortensis*^[16]) και Oleaceae (*Forsythia suspensa*^[17]).

5.3.3.2.1 Φασματοσκοπική περιγραφή

Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη rengyoside B πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας NMR και πιο συγκεκριμένα των πειραμάτων ¹H-NMR, ¹H-¹H COSY, HSQC-DEPT, HMBC. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD). Τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν σύμφωνα με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας. Η περιγραφή των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου και άνθρακα σε δευτεριωμένη μεθανόλη γίνεται ακολούθως.

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα ακόλουθα δεδομένα.

Όσον αφορά το άγλυκο :

- Στα **4.17 ppm**, μία διπλή – τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8β. Παρουσιάζει δύο συζεύξεις, μία με το πρωτόνιο της θέσης 8β και μία αυτό της θέσης 7 με σταθερές J = 10.0 / 6.5 Hz αντίστοιχα.

- Στα **3.80 ppm**, μία διπλή – τριπλή κορυφή ολοκληρώνει επίσης για 1H της θέσης 8α ενώ παρουσιάζει συζεύξεις με τα πρωτόνια 8β με σταθερά $J = 10.0$ Hz και με το πρωτόνιο 7 με σταθερά $J = 6.6$ Hz.
- Στα **2.71 ppm** μία τριπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα 2H των θέσεων 3α και 5α. Καθένα από αυτά παρουσιάζει μία geminal σύζευξη με τα πρωτόνια 3β και 5β με σταθερά $J = 15.3$ Hz, και μία πιο μικρή σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6 αντίστοιχα με σταθερά $J = 6.2$ Hz.
- Στα **2.23 ppm** μία διευρυμένη διπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα 2H των θέσεων 3β και 5β τα οποία παρουσιάζουν μία μεγάλη geminal σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 3α και 5α με σταθερά $J = 15.3$ Hz. Η σύζευξη με τα πρωτόνια 2 και 6 είναι μικρού μεγέθους και φαίνεται ως διεύρυνση της διπλής κορυφής.
- Στα **2.07 ppm** μία διπλή – τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα δύο πρωτόνια των θέσεων 2α και 6α. Παρουσιάζουν συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 2β και 6β με σταθερά $J = 14.0$ Hz και με τα πρωτόνια 3 και 5 με σταθερά $J = 3.1$ Hz αντίστοιχα.
- Στα **1.94 ppm** μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για τα 2H της θέσης 7 τα οποία παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 8 με σταθερά $J = 6.6$ Hz.
- Τέλος στα **1.89 ppm** μία τριπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H των θέσεων 2β και 6β. Αυτά παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 2α και 6α με σταθερά σύζευξης $J = 14.0$ Hz καθώς και με τα πρωτόνια των θέσεων 3 και 5 με σταθερά $J = 4.7$ Hz.

Όσον αφορά τη μονάδα της γλυκόζης :

- Στα **4.30 ppm** παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο (H-1') του σακχάρου. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης H-2' με σταθερά $J = 7.6$ Hz.
- Στα **3.89 ppm**, μία διπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της γλυκόζης 6'α. Παρουσιάζει δύο συζεύξεις, μία μεγάλη geminal με το πρωτόνιο 6'β και μία μικρή με το πρωτόνιο της θέσης 5'. Οι σταθερές σύζευξης είναι 11.7 Hz και 5.1 Hz αντιστοίχως.
- Στα **3.69 ppm**, μία διπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει επίσης για 1H της θέσης 6'β το οποίο παρουσιάζει δύο συζεύξεις, μία μεγάλη με το 6'α με $J = 11.7$ Hz και μία μικρή με το πρωτόνιο 5' με $J = 4.7$ Hz.
- Στα **3.38 ppm** παρατηρείται μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης H-3'. Αυτό παρουσιάζει συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων H-2' και H-1'.

- Στα **3.30 ppm** παρατηρείται επίσης μία πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί σε αυτά των θέσεων H-4' και H-5'. Αυτά παρουσιάζουν μία μεταξύ τους σύζευξη και δύο συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων H-3' και H-6' αντιστοίχως.
- Στα **3.19 ppm**, μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης H-2'. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων H-1' και H-3'. Η παρατηρούμενη σταθερά σύζευξης είναι κατά μέσο όρο 8.5 Hz.

Από τα φάσματα HSQC-DEPT και HMBC σε CD₃OD παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα άνθρακα.

Όσον αφορά το άγλυκο:

- Στα **213.11 ppm** παρατηρείται το σήμα του καρβονυλικού άνθρακα της θέσης 4.
- Ο οξυγονωμένος άνθρακας 1 εμφανίζεται στα **68.98 ppm**.
- Οι άνθρακες 8 και 7 εμφανίζονται αντίστοιχα στα **65.19** και στα **40.55 ppm**.
- Στα **36.42 ppm** συμπίπτουν τα σήματα των ανθράκων 3 και 5 ενώ στα **36.34 ppm** συμπίπτουν τα σήματα των ανθράκων 2 και 6.

Όσον αφορά τη μονάδα της γλυκόζης :

- Ο άνθρακας της ανωμερικής θέσης εμφανίζεται στα **102.78 ppm**.
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες 2', 3', 4' και 5' εμφανίζονται αντίστοιχα στα **73.59**, **76.70**, **76.54** και **70.17 ppm** αντίστοιχα.
- Στα **61.22 ppm** εμφανίζεται ο άνθρακας της θέσης 6'.

Στο φάσμα ¹H - ¹H COSY παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα :

- Οι geminal συζεύξεις (H-8α, H-8β), (H-6α', H-6β'), (H-5α/H-3α, H-5β/H-3β) και (H-6α/H-2α, H-6β/H-2β).
- Οι συζεύξεις των πρωτονίων 7 και 8 [(H-8α, H-7) και (H-8β, H-7)].
- Οι συζεύξεις του πρωτονίου H-2' με τα πρωτόνια H-1' και H-3'.
- Οι συζεύξεις του πρωτονίου H-3' με τα πρωτόνια H-2' και H-4'.
- Και τέλος η σύζευξη των πρωτονίων H-6'β και H-5'.

Στο φάσμα HSQC-DEPT παρατηρούνται οι εξής συζεύξεις :

Όσον αφορά το άγλυκο :

Παρατηρούνται οι συζεύξεις των 12 πρωτονίων του άγλυκου με τους έξι μεθυλενικούς άνθρακες και πιο συγκεκριμένα οι συζεύξεις των πρωτονίων H-8α και

H-8β με τον άνθρακα C-8 στα 65.19 ppm, των πρωτονίων H-2 και H-6 με τους άνθρακες C-2 και C-6 στα 36.35 ppm, των πρωτονίων H-3 και H-5 με τους άνθρακες C-3 και C-5 στα 36.42 ppm και τέλος των πρωτονίων H-7 με τον άνθρακα C-7 στα 40.55 ppm.

Όσον αφορά τη μονάδα της γλυκόζης :

- Παρατηρούνται οι συζεύξεις των πρωτονίων H-1' έως H-5' με τους μεθινικούς άνθρακες C-1' στα 102.78 ppm, C-2' στα 73.59 ppm, C-3' στα 76.70, C-4' στα 76.54 ppm και C-5' στα 70.17 ppm.
- Επίσης παρατηρείται η σύζευξη των πρωτονίων H-6'α και H-6'β με τον μεθυλενικό άνθρακα C-6' στα 61.22 ppm.

Στο φάσμα HMBC σε CD₃OD παρατηρούνται οι συζεύξεις των πρωτονίων :

- H-1' με τους άνθρακες C-8 (³J), C-3' (³J) και C-5'(³J),
- H-8α και H-8β με τους άνθρακες C-7 (²J), C-1 (³J) και C-1' (³J),
- H-6'α με τους άνθρακες C-5' (²J) και C-4'(³J),
- H-6'β με τους άνθρακες C-5' (²J), C-4' (³J) και C-1' (⁴J),
- H-3' με τους άνθρακες C-2' (²J) και C-5' (³J),
- H-4'/H-5' με τους άνθρακες C-6', C-5' και C-3'.
- H-2' με τους άνθρακες C-1' (²J), C-4' (³J) και C-5' (⁴J),
- H-3/H-5 με τους άνθρακες C-2/C-6, C-3/C-5, C-1 (³J) και C-4 (²J),
- H-2/H-6 με τους άνθρακες C-2/C-6, C-3/C-5, C-1 (²J) και C-4 (³J),
- H-7 με τους άνθρακες C-2/C-6 (³J),, C-3/C-5 (⁴J) και C-1 (²J).

Στον πίνακα 5.6 γίνεται συνοπτική απεικόνιση των φασματοσκοπικών δεδομένων πρωτονίου και άνθρακα σε δευτεριωμένη μεθανόλη για τον μεταβολίτη Rengyoside B.

Πίνακας 5.6 Φασματοσκοπική μελέτη του μεταβολίτη Rengyoside B σε CD₃OD

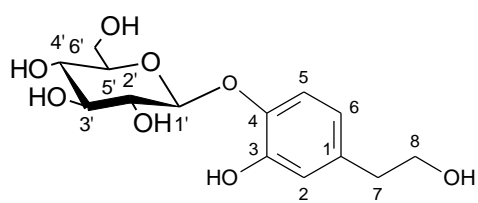
Άτομο	¹³ C-NMR (δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	68.98	-
2a, 6a	36.35	2.07 (2H, J = 13.96 / 3.1 Hz)
2b, 6b		1.89 (2H, td, J = 13.96 / 4.7 Hz)

3a, 5a	36.42	2.71 (2H, td, J = 15.26 / 6.2 Hz)
3b,5b		2.23 (2H, d, J = 15.3 Hz)
4	213.11	-
7	40.55	1.94 (2H, t, J = 6.6 Hz)
8a	65.19	3.80 (1H, dt, J = 10.0 / 6.6 Hz)
8b		4.17 (1H, dt, J = 10.0 / 6.5 Hz)
1'	102.78	4.30 (1H, d, J = 7.6 Hz)
2'	73.59	3.19 (1H, t, J = 8.5 Hz)
3'	76.70	3.38 (1H, m)
4'	76.54	3.30 (2H, m)
5'	70.17	
6'a	61.22	3.89 (1H, dd, J = 11.7 / 4.7 Hz)
6'b		3.69 (H, dd, J = 11.7 / 5.1 Hz)

5.3.3.2.2 Βιολογικές ιδιότητες

Ο φαινυλοαιθανοειδής γλυκοσίδης Rengyoside B αποτελεί συστατικό δύο ακατέργαστων φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούνται στην λαϊκή κινεζική ιατρική. Τα εν λόγω φάρμακα φέρουν την ονομασία “rengyo” και “reep”. Συγκεκριμένα το ακατέργαστο φάρμακο “rengyo” προέρχεται από τους καρπούς του φυτού *Forsythia suspensa* Vahl (Oleaceae) και χρησιμοποιείται ως αντιφλεγμονώδες και διουρητικό. Επιπλέον, ο μεταβολίτης Rengyoside B περιέχεται στο ακατέργαστο φάρμακο με τη ονομασία “reep” το οποίο παρασκευάζεται από τα άνθη του φυτού *Millingtonia hortensis* και η χρήση του γινόταν στην Ταϊλάνδη για την θεραπεία του άσθματος, της ιγμορίτιδας και ως χολαγωγό.^[18]

5.3.3.3 4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης

	M.B.	316
	Σ.Τ.	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
	[α]_D	-46.3°
Συνώνυμα	<i>4-O-β-D γλυκοπυρανοσίδης της β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλης</i>	

Αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του καρπού της ελιάς (*Olea europaea*, Oleaceae). Απομονώνεται επίσης από τα υδατικά απόβλητα της διαδικασίας εκτίκρανσης του καρπού καθώς και από τον πολτό της ελιάς ο οποίος προκύπτει κατά την διαδικασία της ελαιοποίησης. Ο μεταβολίτης αυτός συνεισφέρει σημαντικά στο ποσό της υδροξυτυροσόλης που περιέχεται τελικά στο ελαιόλαδο, ενώ αποτελεί σημαντική πηγή ζυμώσιμου σακχάρου στις επιτραπέζιες ελιές.

Συναντάται μαζί με άλλα δύο ισομερή του τον 3-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης και τον 8-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης. Εξ αυτών ο 4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης αποτελεί την επικρατέστερη μορφή γλυκοσίδη του μορίου αυτού και την δεύτερη πιο σημαντική πηγή υδροξυτυροσόλης του ελαιοκαρπού μετά την ελευρωπαΐνη. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι κατά την ωρίμανση του καρπού, όπου τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης μειώνονται, τα αντίστοιχα του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης αυξάνονται καθιστώντας τον πρώτο ως πηγή υδροξυτυροσόλης^[19].

5.3.3.3.1 Φασματοσκοπική περιγραφή

Η ταυτοποίηση του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας ¹H-NMR. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD). Τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν σύμφωνα με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα ακόλουθα δεδομένα.

Όσον αφορά το άγλυκο :

- Στα **7.13 ppm** παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου 5 το οποίο βρίσκεται σε ortho θέση ως προς το πρωτόνιο 6 και εμφανίζει σύζευξη μόνο με αυτό με σταθερά J = 8.2 Hz.
- Στα **6.76 ppm**, μία διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H της θέσης 2 του αρωματικού δακτυλίου. Το πρωτόνιο αυτό έχει μόνο μία σύζευξη meta με το πρωτόνιο της θέσης 6 με σταθερά J = 2.1 Hz.

- Το πρωτόνιο 6 που παρουσιάζει σύζευξη με τα δύο παραπάνω πρωτόνια, εμφανίζεται στα **6.68 ppm** ως μία διπλή – διπλή κορυφή. Η μεγάλη ortho σύζευξη με το H-5 χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 8.2$ Hz ενώ η μικρότερη meta σύζευξη από την σταθερά $J = 2.1$ Hz.
- Το πρωτόνιο της θέσης 8 εμφανίζεται στα **3.73 ppm** ως μία τριπλή κορυφή. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 7 με σταθερά $J = 7.3$ Hz.
- Επίσης, το πρωτόνιο της θέσης 7 εμφανίζεται στα **2.74 ppm** ως μία τριπλή κορυφή λόγω της σύζευξης του με το πρωτόνιο της θέσης 8 με σταθερά $J = 7.3$ Hz.

Όσον αφορά την μονάδα της γλυκόζης :

- Το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1') εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα **4.74 ppm**. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 2' η οποία χαρακτηρίζεται από τη σταθερά $J = 7.3$ Hz.
- Στα **3.92 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης H-6'β. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6α με σταθερά $J = 11.7$ ppm καθώς και με το πρωτόνιο της θέσης 5 με σταθερά $J = 1.6$ Hz.
- Στα **3.74 ppm**, μία διπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης H-6'α. Αυτό παρουσιάζει μία geminal σύζευξη με το πρωτόνιο H-6'β με σταθερά $J = 11.7$ Hz και μία μικρότερη σύζευξη με το πρωτόνιο 5' με σταθερά $J = 4.7$ Hz.
- Στα **3.72 ppm** παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου H-4'α.
- Στα **3.49 ppm**, εμφανίζεται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 2'α. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια H-1' και H-3' με σταθερές σύζευξης 7.4 Hz και 5.1 Hz αντίστοιχα.
- Στα **3.42 ppm**, μία διπλή κορυφή ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί σε αυτά των θέσεων 5' και 3'.

Πίνακας 5.7 Φασματοσκοπική μελέτη του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης σε CD₃OD

Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	-
2	6.76 (1H, d, $J = 2.1$ Hz)
3	-
4	-

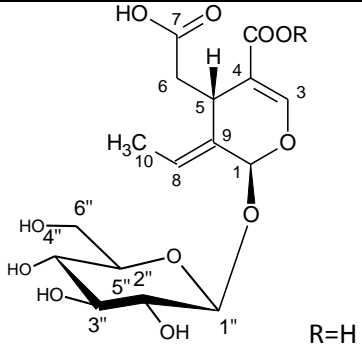
Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
5	7.13 (1H, d, J = 8.2 Hz)
6	6.68 (1H, dd, J = 8.2/2.1 Hz)
7	2.74 (1H, t, J = 7.3 Hz)
8	3.73 (1H, t, J = 7.3 Hz)
1'	4.74 (1H, t, J = 7.3 Hz)
2'	3.49 (1H, dd, J = 7.4/5.1 Hz)
3', 5'	3.42 (2H, dd, J = 6.7Hz)
4'	3.7
6'α	3.74 (1H, dd, J = 11.7 / 4.7 Hz)
6'β	3.92 (1H, dd, J = 11.7 / 1.6 Hz)

5.3.3.3.2 Βιολογικές ιδιότητες

Όπως προαναφέρθη, ο 4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης είναι ένα από τα σημαντικά φαινολικά συστατικά του καρπού της ελιάς καθώς αποτελεί την δεύτερη σημαντικότερη πηγή υδροξυτυροσόλης. Έχει διερευνηθεί η αντιμικροβιακή δράση κατά του βακτηρίου *Lactobacillus pentosus* και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά^[20].

Παρουσιάζει σημαντική in vitro δράση – μεγαλύτερη αυτής της ελευρωπαΐνης – κατά των καρκινικών κυττάρων P-388, L-1210, SNU-5 και HL-60^[128].

5.3.3.4 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη

	M.B.	404
	Σ.Τ.	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁
	[α]_D	-45°
Συνώνυμα	jaspolyside, μεθυλεστέρας του 4-καρβοξυμεθυλ-5-αιθυλιδεν-6-(3,4,5-τριυδροξυ-6-υδροξυμεθυλ-τετραυδροπυραν-2-υλοξυ)-5,6-διυδρο-4H-πυραν-3-καρβοξυλικό οξύ, 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη, 11-μεθυλολεοσίδη, ολεοσίδη	

Ο εν λόγω μεταβολίτης αποτελεί κυρίαρχο συστατικό των υδατικών αποβλήτων που προκύπτουν από την διαδικασία εκπίκρυνσης. Αυτό συμβαίνει καθώς αποτελεί το κύριο προϊόν της υδρολυτικής διάσπασης της ελευρωπαΐνης. Επιπλέον απομονώνεται από τους καρπούς του φυτού *Ligustrum lucidum* (*Oleaceae*)^[124], από τους σπόρους του φυτού *Fraxinus excelsior* L. (*Oleaceae*)^[125] και από τα φύλλα του *Jasminum nudiflorum* (*Oleaceae*)^[125].

5.3.3.4.1 Φασματοσκοπική περιγραφή

Η ταυτοποίηση του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας ¹H-NMR. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD). Τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν σύμφωνα με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα ακόλουθα δεδομένα.

Όσον αφορά το άγλυκο :

- Στα **7.54 ppm**, μία απλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 3.
- Στα **6.14 ppm**, παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου 8 ως μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H. Παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου 10, η οποία χαρακτηρίζεται από την σταθερά J = 6.8 Hz.
- Στα **5.99 ppm** παρατηρείται μία απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1.

- Στα **4.06 ppm**, μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H της θέσης 5. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 6. Οι συζεύξεις με τα πρωτόνια 6α και 6β χαρακτηρίζονται από τις σταθερές $J = 4.1$ Hz και $J = 9.7$ Hz αντίστοιχα.
- Στα **3.75 ppm** εμφανίζεται μία οξεία απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 3H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της καρβομεθοξυ – ομάδας CH₃O-12.
- Στα **2.73 ppm** μία διπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6α. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6β με σταθερά $J = 14.1$ Hz καθώς επίσης με το πρωτόνιο της θέσης 5 με σταθερά $J = 4.1$ Hz.
- Το πρωτόνιο της θέσης 6β εμφανίζεται στα **2.36 ppm** ως μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H. Παρουσιάζει συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 6α και 5 με σταθερές σύζευξης 14.1 Hz και 9.7 Hz αντίστοιχα.
- Τέλος στα **1.80 ppm** εμφανίζεται μία απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 3H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου 10.

Όσον αφορά την μονάδα της γλυκόζης :

- Στα **4.83 ppm** παρατηρείται το σήμα του ανωμερικού υδρογόνου (H-1') ως μία διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 1H. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 2' η οποία χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 8.0$ Hz.
- Στα **3.91 ppm** μία διπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H που αντιστοιχεί στην θέση 6'α. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει μία μεγάλη geminal σύζευξη με το πρωτόνιο 6'β ($J = 12.3$ Hz) και μία μικρή σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 5' ($J = 1.8$ Hz).
- Στα **3.69 ppm** παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου 6'β ως μία διπλή – διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 1H. Οι συζεύξεις του πρωτονίου αυτού με τα πρωτόνια 6'β και 5' χαρακτηρίζονται από τις σταθερές 12.3 Hz και 5.9 Hz αντίστοιχα.

Πίνακας 5.8 Φασματοσκοπική περιγραφή του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη σε CD₃OD

Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
1	5.99 (1H, s)
3	7.54 (1H, s)
4	-
5	4.06 (1H, dd, J = 9.7/4.1 Hz)

Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
6α	2.73 (1H, dd, J = 14.1/4.1 Hz)
6β	2.36 (1H, dd, J = 14.1/9.7 Hz)
7	-
8	6.14 (1H,q, J = 6.8 Hz)
9	-
10	1.80 (3H, d, J = 6.8 Hz)
11	-
CH ₃ O- 12	3.75 (3H, s)
1'	4.83 (1H, d, J = 7.9 Hz)
6'α	3.91 (1H, dd, J = 12.3/1.8 Hz)
6'β	3.69 (1H, dd, J = 12.3/5.9 Hz)

5.3.3.4.1 Βιολογικές ιδιότητες

Παρά την πληθώρα βιολογικών δράσεων της ελευρωπαΐνης, η οποία αποτελεί παράγωγο μόριο του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη, ο τελευταίος διαθετεί μικρό αριθμό δράσεων γεγονός που υποδεικνύει ότι οι δράσεις του πρώτου οφείλονται στην παρουσία της υδροξυτυροσόλης.

Μία από τις αναφερόμενες δράσεις του είναι η αντιδιαβητική δράση. Αυτή διενεργείται αναστέλλοντας την διαφοροποίηση των πρόδρομων λιποκυττάρων (3T3-L1)^[127]. Επιπλέον έχει ελεγχθεί in vitro η δράση του εν λόγω μεταβολίτη επί των καρκινικών κυττάρων P-388, L-1210, SNU-5 και HL-60 – στα οποία η ελευρωπαΐνη παρουσίαζε σημαντική δράση – αλλά η δράση του εμφανιζόταν σε συγκεντρώσεις άνω των 1000 mg/L^[128].

5.4 Μελέτη επιτραπέζιου ελαιοκαρπού

Το δεύτερο σκέλος της μελέτης της χημικής σύστασης της Μεγαρίτικης ποικιλίας είναι η μελέτη του επιτραπέζιου ελαιοκαρπού δηλαδή του τελικά εδώδιμου καρπού. Αυτός προκύπτει ύστερα από την διαδικασία εκπίκρασης και μετά το πέρας τουλάχιστον ενός μήνα από τη στιγμή που ο καρπός τοποθετηθεί στην άλμη.

Για να επιτευχθεί η μελέτη αυτή επιχειρήθηκε να προσομοιωθεί ο τρόπος παραλαβής των μεταβολιτών του καρπού με τον αντίστοιχο που εφαρμόστηκε στην περίπτωση του υδατικού αποβλήτου. Έτσι, έγινε αρχικά υδατική εκχύλιση της σάρκας της ελιάς, ακολούθησε η διαδικασία της προσυγκέντρωσης όπως και στην περίπτωση των υδατικών αποβλήτων με την χρήση ρητίνης XAD-4 και τελικά απομονώθηκαν τα συστατικά του επιτραπέζιου καρπού της ελιάς με χρήση χρωματογραφικών τεχνικών.

5.4.1 Παραλαβή υδατικού εκχυλίσματος

Στην περίπτωση του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου αυτό το οποίο επιλέχθηκε να μελετηθεί ήταν το υδατικό εκχύλισμα. Με αυτό τον τρόπο προσομοιώθηκε η παραλαβή των μεταβολιτών στην περίπτωση των υδατικών αποβλήτων. Επιπλέον αυτός ο τρόπος εκχύλισης εξασφάλισε ένα εκχύλισμα απαλλαγμένο σχεδόν από όλα τα λιπόφιλα συστατικά της ελιάς, τα οποία έμειναν στον καρπό. Έτσι προέκυψε ένα σχετικά αρκετά απλουστευμένο εκχύλισμα.

Συγκεκριμένα, έξι μήνες μετά από την προσθήκη στην άλμη, παρελήφθη 1 kg επιτραπέζιων ελαιοκάρπων από τους οποίους αφαιρέθηκε ο πυρήνας και πολτοποιήθηκε η σάρκα. Στη συνέχεια η εκχύλιση του πολτού έγινε με απεσταγμένο νερό (2L x 2) σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά. Συνολικά παραλήφθηκαν 4L υδατικού εκχυλίσματος.

5.4.2 Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης XAD-4

Μετά την παραλαβή και την διήθηση του υδατικού εκχυλίσματος ακολούθησε διέλευση αυτού μέσω στήλης με ρητίνη προσρόφησης XAD-4.

Χρησιμοποιήθηκε στήλη ύψους 65 cm και διαμέτρου 3.5 cm η πλήρωση της οποίας πραγματοποιήθηκε με 250g ρητίνης XAD-4. Ο όγκος που καταλάμβανε η ρητίνη μέσα στη στήλη (bed volume, BV) ήταν 375 mL. Ο συνολικός όγκος του υδατικού εκχυλίσματος ήταν 4L. Ο κύκλος της τροφοδοσίας της στήλης γινόταν ανά 0.5 L.

Το πρώτο βήμα αποτελούσε η διέλευση 0.5 L υδατικού εκχυλίσματος από την στήλη με ταχύτητα ροής (feeding flow rate) 750 mL/h ή 2BV/h. Ο συνολικός χρόνος διέλευσης 0.5 L υδατικού εκχυλίσματος ήταν 40 λεπτά.

Η αναγέννηση της ρητίνης πραγματοποιήθηκε ακριβώς όπως και στην περίπτωση των υδατικών αποβλήτων. Συγκεκριμένα, έγινε έκπλυση της ρητίνης με απεσταγμένο νερό έως ότου το υγρό που εξέρχεται από την στήλη γίνει άχρωμο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η έκλουση των μορίων που παραμένουν στην επιφάνεια της ρητίνης με την χρήση 500 mL μεθανόλης. Τέλος όταν ολοκληρώθηκε η έκλουση, έγινε έκπλυση της στήλης με απεσταγμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί η μεθανόλη και η ρητίνη να είναι κατάλληλη για επόμενη χρήση. Μετά από την διέλευση του συνόλου του υδατικού εκχυλίσματος και την έκλουση των προσροφηθέντων μορίων συλλέχθηκαν συνολικά 4 L μεθανολικού εκλούσματος το οποίο μετά από συμπύκνωση μέχρι ξηρού ζύγιζε 2.8872 g.

5.4.3 Διαδικασία απομόνωσης μεταβολιτών

Η μελέτη της χημικής σύστασης του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου πραγματοποιήθηκε στο υδατικό εκχύλισμα, η παραλαβή του οποίου περιγράφεται στην παράγραφο 5.4.2.

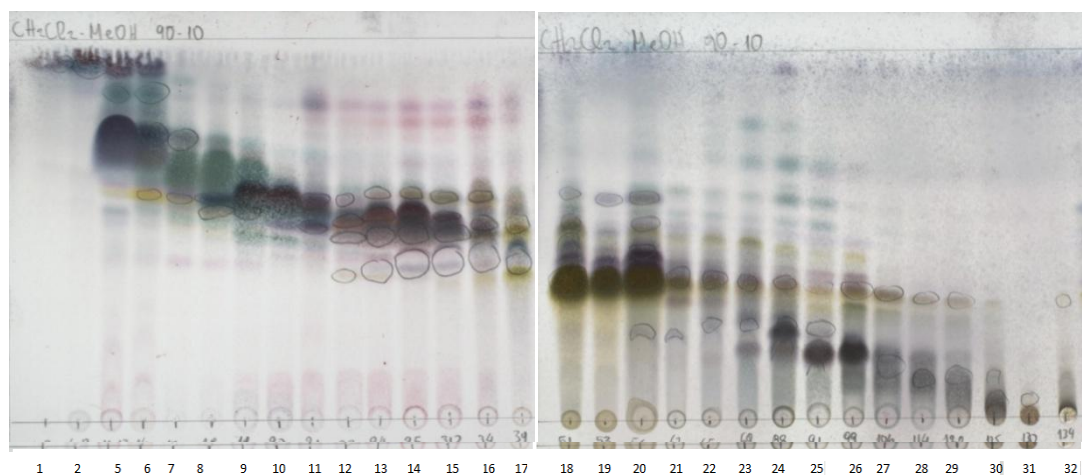
Οι διαδικασίες διαχωρισμού και απομόνωσης μεταβολιτών πραγματοποιήθηκαν με την χρήση χρωματογραφίας στήλης χαμηλής πίεσης και παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

5.4.3.1 Χρωματογραφική στήλη 2

Ποσότητα 1.98 g τα οποία προέκυψαν από την υδατική εκχύλιση επιτραπέζιων ελαιοκάρπων, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (5 cm) γέλης πυριτίου (silica gel) υπό χαμηλή πίεση. Οι διαλύτες έκλουσης ήταν μίγματα διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2) και μεθανόλης (MeOH) σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας από 99%-1% έως 50% - 50% CH_2Cl_2 -MeOH. Ο όγκος των κλασμάτων που παραλήφθηκαν ήταν 10mL και η εξέταση τους πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC).

Πίνακας 5.9

α/α	Κλάσματα	Πολικότητα διαλυτών έκλουσης CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Βάρος (mg)	Παρατηρήσεις
1	1-30	99-1	4.5	
2	31-70 71-75		8.9	
3	76-80	98-2	0.9	
4	81-85	98-2	1.0	
5	86-100	98-2	44.7	Prep2A
6	101-115	98-2	34.3	Prep2B
7	116-120	98-2	18.6	Prep2C
8	121-125	98-2	18.2	
9	126-135	98-2	20.9	Prep2D
10	136-145	98-2	10.3	
11	146-155	98-2	10.0	
12	156-165	98-2	13.2	Prep2E
13	166-175	98-2	15.5	
14	176-185	97-3	18.0	
15	186-193	97-3	9.8	
16	194-218	97-3	19.5	
17	219-228 229-248	97-3	30.3	Prep2F
		96-4		
18	249-263	96-4	65.2	
19	264-269	96-4	42.3	
20	270-309	96-4	68.5	
21	310-339	96-4	9.2	
22	340-379	96-4	11.9	
23	380-429 430-449	95-5	28.7	
		94-6		
24	450-479	94-6	35.2	
25	480-504	93-7	28.1	
26	505-539	93-7	32.3	
27	540-559	92-8	7.7	
28	560-564 565-574	92-8	15.9	
		90-10		
29	575-599	90-10	32.2	
30	600-604 605-634	90-10	79.5	
		80-20		
31	635-654 655-674	80-20	157.1	
		50-50		
32	675-714	50-50	122.4	



Εικόνα 5.9 Συγκεντρική TLC (90-10% CH₂Cl₂-MeOH) για τα κλάσματα της στήλης 2

Πίνακας 5.10

Prep. TLC	Σύστημα ανάπτυξης	Μεταβολίτης	
2A	CH ₂ Cl ₂ : n-Hexane : EtOAc 1 : 5 : 4	Megaritodilactone	
2B	EtOAc : CHex 70 : 30	Megaritolactonic acid	
2C	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 96.5 : 3.5	Megaritolactonic B methyl ester	
2D	CH ₂ Cl ₂ : MeOH 96 : 4	Megaritolactonol	
2E	EtOAc : CHex 90 : 10.	Tyrosol	
		Halleridone	
		Cleroidicin C	
2F	EtOAc : CHex 70 : 30	Hydroxytyrosol	
		Rengyoxide	

5.4.3.2 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 2A

Το κλάσμα 86-100 υπέστη περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό. 22mg από το κλάσμα αυτό τοποθετήθηκαν σε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας κανονική φάσης. Ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για το βέλτιστο διαχωρισμό ήταν CH_2Cl_2 : n-Hexane : EtOAc σε αναλογία 1 : 5 : 4 με προσθήκη 0.5% φορμικού οξέος. Από αυτήν την παρασκευαστική χρωματογραφία απομονώθηκαν 2 mg από το νέο φυσικό προϊόν με ονομασία Megaritolactone.

5.4.3.3 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 2B

Το κλάσμα 101 - 115 υπέστη περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό. 20mg από το κλάσμα αυτό τοποθετήθηκαν σε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας κανονική φάσης. Ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για το βέλτιστο διαχωρισμό ήταν EtOAc : CHex σε αναλογία 70 : 30. Από αυτήν την παρασκευαστική χρωματογραφία απομονώθηκαν 1.2 mg από τον νέο φυσικό προϊόν με ονομασία Megaritolactonic acid.

5.4.3.4 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 2C

Το κλάσμα 116 – 120 υπέστη περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό. 18 mg από το κλάσμα αυτό τοποθετήθηκαν σε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας κανονική φάσης. Ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για το βέλτιστο διαχωρισμό ήταν CH_2Cl_2 : MeOH σε αναλογία 96.5 : 3.5. Από αυτήν την παρασκευαστική χρωματογραφία απομονώθηκαν 2.0 mg από τον νέο φυσικό προϊόν με ονομασία Megaritolactonic B methyl ester.

5.4.3.5 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 2D

Το κλάσμα 126 – 135 υπέστη περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό. 20.9 mg από το κλάσμα αυτό τοποθετήθηκαν σε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας κανονική φάσης. Ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για το βέλτιστο διαχωρισμό ήταν CH_2Cl_2 : MeOH σε αναλογία 96 : 4. Από αυτήν την παρασκευαστική χρωματογραφία απομονώθηκαν 3.0 mg από τον νέο φυσικό προϊόν με ονομασία Megaritolactonol.

5.4.3.6 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 2E

Τα κλάσματα 156-165, 166-175, 176-185 και 186-193 υπέστησαν περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό. Μετά από συνένωση τους προέκυψαν 56.5 mg. Η ποσότητα διαιρέθηκε σε τρία τμήματα των 18.8 mg και κάθε ένα από αυτά τοποθετήθηκε σε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας

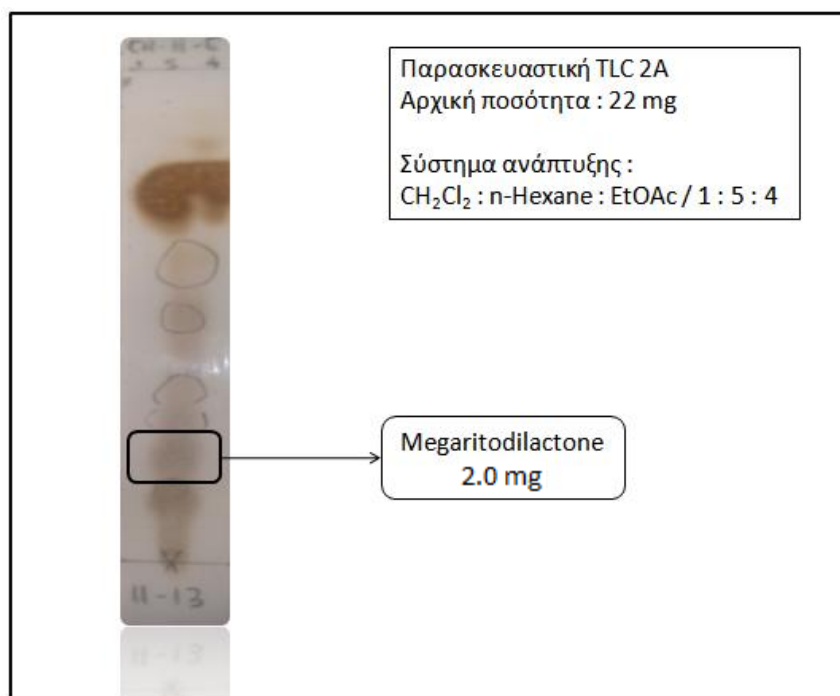
κανονική φάσης. Ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για το βέλτιστο διαχωρισμό ήταν EtOAc : CHex σε αναλογία 90 : 10.

Από αυτήν την παρασκευαστική χρωματογραφία απομονώθηκαν συνολικά 30.0 mg τυροσόλης, 9.7 mg Halleridone και 16.1 mg Cleroindicin C.

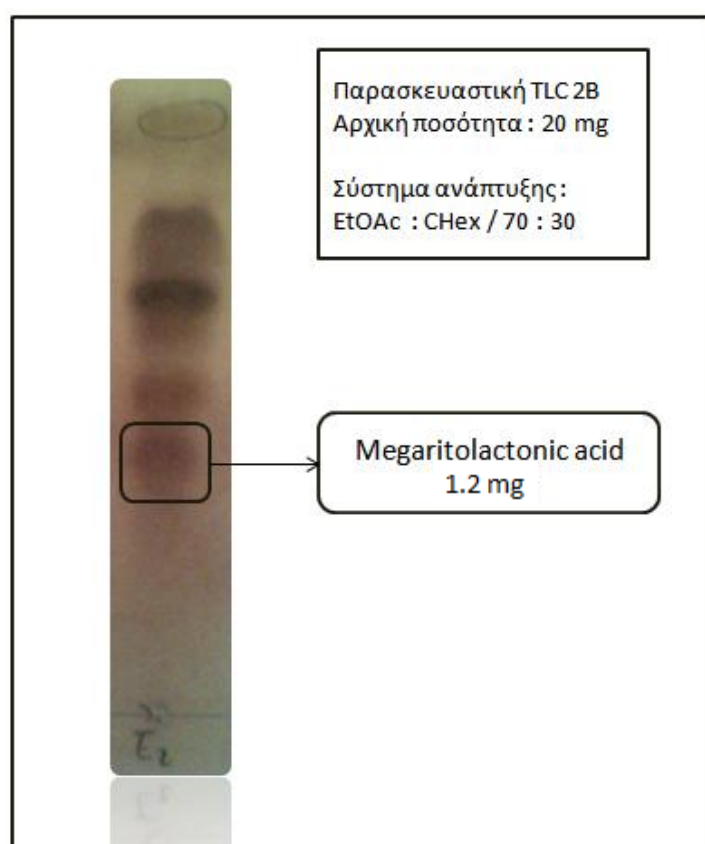
5.4.3.7 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας 2F

Τα κλάσματα 249-263, 264-269 και 270-309 υπέστησαν περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό. Μετά από συνένωση τους προέκυψαν 176 mg. Η ποσότητα διαιρέθηκε σε τρία τμήματα και κάθε ένα από αυτά τοποθετήθηκε σε παρασκευαστική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας κανονική φάσης. Ύστερα από δοκιμές το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών για το βέλτιστο διαχωρισμό ήταν EtOAc : CHex σε αναλογία 70 : 30.

Από αυτήν την παρασκευαστική χρωματογραφία απομονώθηκαν συνολικά 119.7 mg υδροξυτυροσόλης και 48.4 mg Rengyoxide.

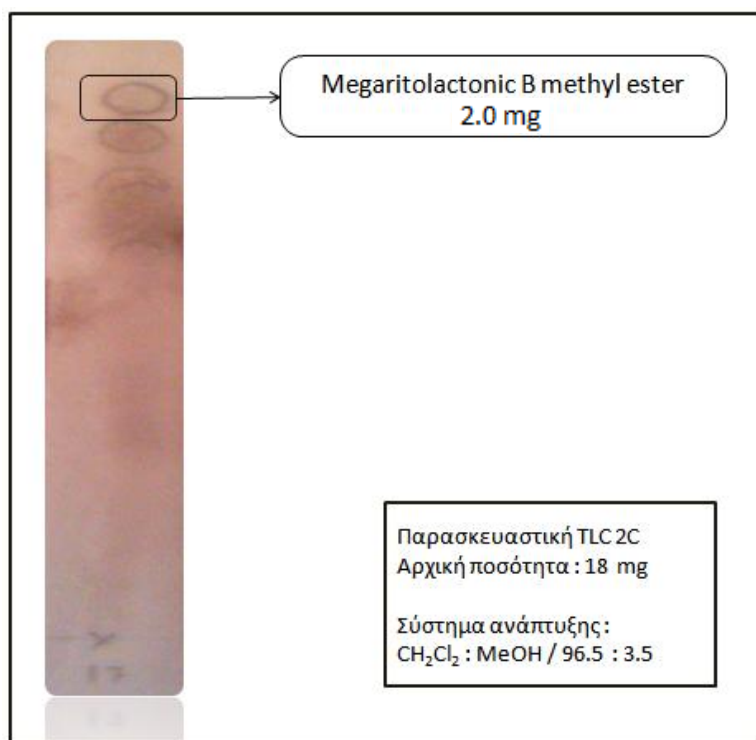


Εικόνα 5.10 Παρασκευαστική TLC 2A

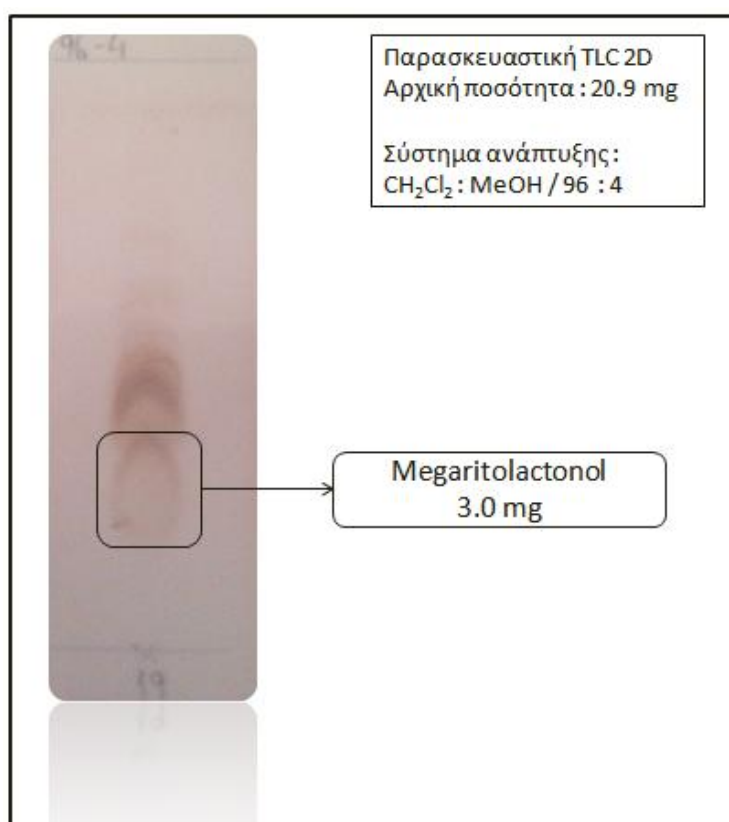


Εικόνα 5.11

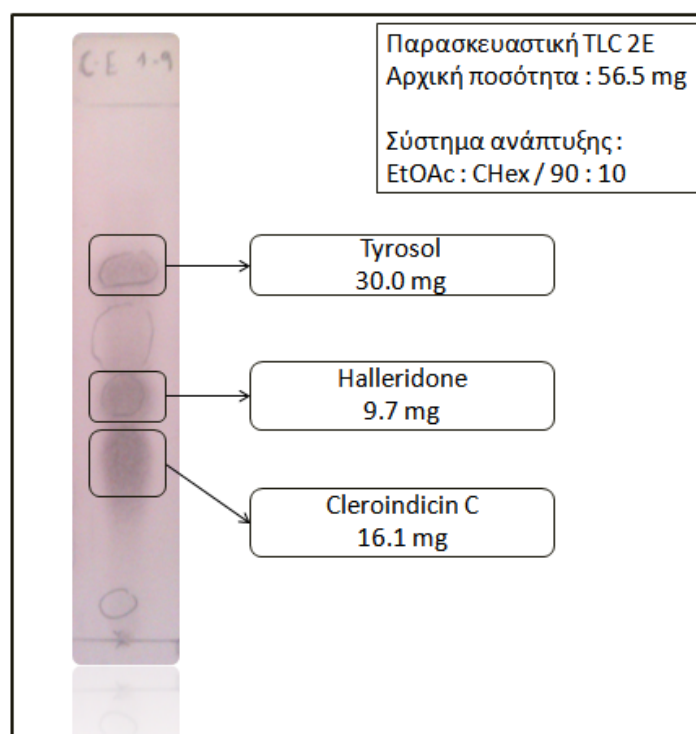
Παρασκευαστική TLC 2B



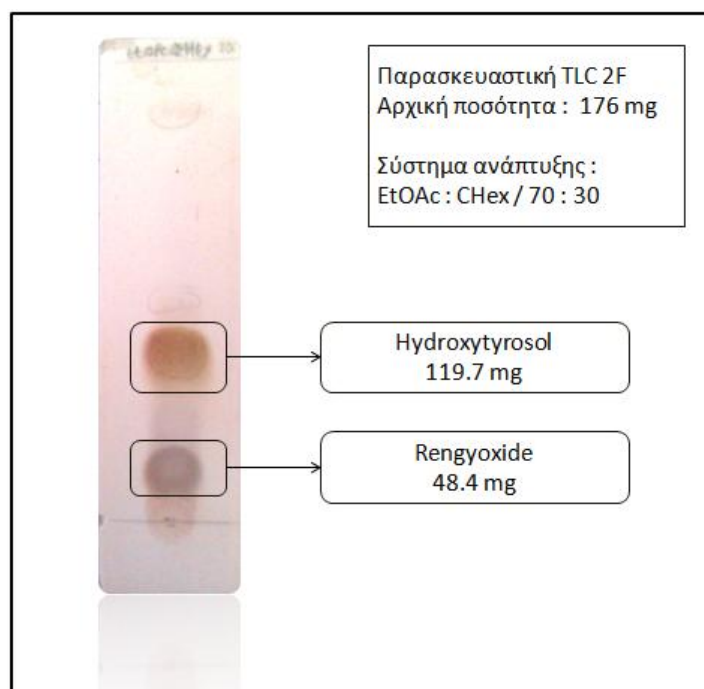
Εικόνα 5.12 Παρασκευαστική TLC 2C



Εικόνα 5.13 Παρασκευαστική TLC 2D



Εικόνα 5.14 Παρασκευαστική TLC 2E

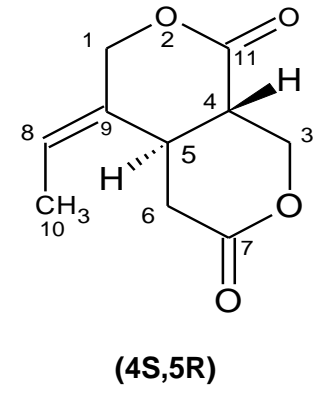


Εικόνα 5.15 Παρασκευαστική TLC 2F

5.4.4 Φασματοσκοπική μελέτη απομονωθέντων μεταβολιτών και βιολογικές ιδιότητες

Κατά την μελέτη της χημικής σύστασης του τελικά εδώδιμου καρπού προέκυψαν εννέα μεταβολίτες. Εξ αυτών τρεις μεταβολίτες απομονώνονται για πρώτη φορά από το είδος ενώ άλλοι τέσσερεις αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

5.4.4.1 Μεγαριτοδιλακτόνη (Megaritudilactone)

 <p>(4S,5R)</p>	M.B.	196.19
	Σ.Τ.	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
	HR-ESI-MS : m/z 195.0726 ,[M – H] ⁻ , [C ₁₀ H ₁₂ O ₄ – H] ⁻	

Ο μεταβολίτης Μεγαριτοδιλακτόνη δεν έχει απομονωθεί ξανά στην φύση και είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ως συστατικό του εδώδιμου καρπού της ελιάς.

5.4.4.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση του νέου αυτού μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Συγκεκριμένα, τα πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ¹H-NMR, ¹H - ¹H COSY, HSQC-DEPT και HMBC σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃). Λόγω μικρής ποσότητας του απομονωθέντος συστατικού δεν κατέστη δυνατή η μέτρηση της στροφικής ικανότητας.

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CDCl₃ παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **5.71 ppm** παρατηρείται μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H που αντιστοιχεί στο βινυλικό πρωτόνιο στην θέση 8. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 10 με σταθερά J = 7.2 Hz.
- Στα **4.94 ppm**, μία διπλή – διπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H της θέσης 3α. Παρουσιάζει δύο συζεύξεις, μία μεγάλη geminal σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 3β και μία μικρότερη με το πρωτόνιο της θέσης 4. Οι αντίστοιχες σταθερές σύζευξης είναι 11.8 και 3.1 Hz.

- Στα **4.80** και **4.77 ppm** παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H των θέσεων 1α και 1β αντίστοιχα. Οι χημικές μετατοπίσεις των δύο κορυφών έχουν πολύ μικρή διαφορά με αποτέλεσμα να υπάρχει επικάλυψη μεταξύ των συνιστωσών τους. Τα δύο πρωτόνια παρουσιάζουν μόνο μία μεταξύ τους geminal σύζευξη με σταθερά $J = 13.9$ Hz.
- Στα **4.46 ppm** παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου 3β ως μία διπλή – διπλή κορυφή με σταθερές σύζευξης $J = 11.8$ και 4.6 Hz οι οποίες χαρακτηρίζουν τις συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 3α και 4 αντίστοιχα.
- Στα **3.51 ppm**, μία διπλή – τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 5. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια 4, 6α και 6β. Όπως υποδεικνύεται από τις σταθερές σύζευξης το πρωτόνιο της θέσης 5 παρουσιάζει μία μεγάλη σύζευξη (τύπου αξονική – αξονική αλληλεπίδραση) με αυτό της θέσης 6β, ενώ με τα πρωτόνια 6α και 4 παρουσιάζει μικρότερες συζεύξεις της τάξεως των 6.4 Hz.
- Στα **3.11 ppm** παρατηρείται μία πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 4. Παρουσιάζει συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 3α, 3β και 5.
- Στα **2.84** και **2.29 ppm** παρατηρούνται τα σήματα των πρωτονίων 6α και 6β υπό τη μορφή διπλή – διπλής. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μία μεγάλη geminal σύζευξη μεταξύ ($J = 17.0$ Hz) και μικρότερες συζεύξεις με το πρωτόνιο 5 με σταθερά $J = 5.7$ Hz στην περίπτωση του πρωτονίου 6α και $J = 12.1$ Hz στην περίπτωση του πρωτονίου 6β.
- Στα **1.74 ppm** εμφανίζονται τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10 ως μία διπλή κορυφή. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν σύζευξη με το πρωτόνιο H-8 η οποία χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 7.2$ Hz.

Τα σήματα των ανθράκων του μορίου όπως προκύπτουν από τα φάσματα HSQC-Dept και HMBC σε CDCl_3 είναι τα εξής :

- Οι καρβονυλικοί άνθρακες 11 και 7 εμφανίζονται στα 169.7 και 167.9 ppm αντίστοιχα.
- Οι βινυλικοί άνθρακες 9 και 8 εμφανίζονται στα 130.1 και 125.17 ppm αντίστοιχα.
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες 1 και 3 εμφανίζονται στα 71.04 και 66.64 ppm αντίστοιχα.
- Οι άνθρακες 4 και 6 οι οποίοι βρίσκονται δίπλα σε καρβονύλιο εμφανίζονται στα 37.6 και 32.8 ppm αντίστοιχα.
- Οι περισσότερο θωρακισμένοι άνθρακες 5 και 10 εμφανίζονται στα 29.9 και 13.3 ppm αντίστοιχα.

Στο φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα :

- Οι geminal συζεύξεις (H-1α, H-1β), (H-3α, H-3β) και (H-6α, H-6β).
- Παρατηρείται επίσης η σύζευξη του βινυλικού πρωτονίου με το βινυλικό μεθύλιο (H-8, CH₃-10).
- Οι συζεύξεις του πρωτονίου 4 με τα H-5 και H-3α,β καθώς και του πρωτονίου 5 με τα H-4 και H-6α,β που παρατηρούνται στο φάσμα COSY αποδεικνύουν την συγκεκριμένη αλληλουχία των πρωτονίων 3,4,5,6 ενώ η απουσία συζεύξεων του πρωτονίου 1 δικαιολογεί την θέση του ανάμεσα στο οξυγόνο και στον βινυλικό άνθρακα 9.

Από το φάσμα HSQC-DEPT σε CDCl₃ παρατηρούνται οι ακόλουθες συζεύξεις:

- Τα πιο αποθωρακισμένα σήματα του φάσματος αφορούν τη σύζευξη του πρωτονίου H-8 με τον βινυλικό άνθρακα C-8 στα 125.17 ppm, καθώς επίσης και τις συζεύξεις των H-1 και H-3 με τους οξυγονωμένους άνθρακες C-1 και C-3 στα 71.04 και 66.64 ppm αντίστοιχα.
- Επιπλέον παρατηρούνται οι συζεύξεις των πρωτονίων 4 και 5 με τους άνθρακες C-4 και C-5 στα 37.6 και 29.9 ppm αντίστοιχα.
- Τα πρωτόνια 6α και 6β συζεύγνυνται με τον άνθρακα C-6 στα 32.8 ppm.
- Τέλος παρατηρείται η σύζευξη των πρωτονίων του μεθυλίου με τον άνθρακα C-8 ο οποίος συντονίζεται στα 13.3 ppm.

Στο φάσμα HMBC παρατηρούνται οι συζεύξεις :

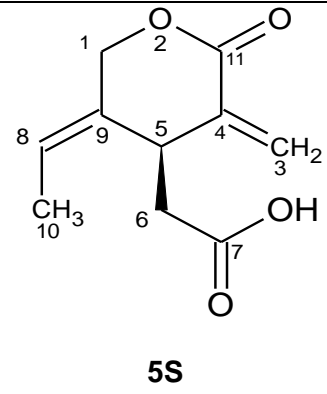
- του πρωτονίου της θέσεως 8 με τους άνθρακες 10 (²J), 1 (³J) και 5 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 3α με τους άνθρακες 4 (²J), 5 (³J), 7 (³J), 11 (³J) και 9 (⁴J) ,
- του πρωτονίου της θέσεως 1 με τους άνθρακες 9 (²J), 5 (³J), 8 (³J) και 11 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 3β με τους άνθρακες 5 (³J), 7 (³J) και 11 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 5 με τους άνθρακες 4 (²J), 6 (²J), 9 (²J), 1 (³J), 3 (³J), 8 (³J) και 11 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 4 με τους άνθρακες 3 (²J), 5 (²J), 11 (²J), 6 (³J) και 9 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 6α με τους άνθρακες 5 (²J), 7 (²J), 4 (³J), 9 (³J) και 3 (⁴J),
- του πρωτονίου της θέσεως 6β με τους άνθρακες 5 (²J), 7 (²J), 4 (³J) και 9 (³J),
- των πρωτονίων της θέσεως 10 με τους άνθρακες 8 (²J), 9 (³J), 1 (⁴J) και 5 (⁴J).

Άτομο	¹³ C-NMR (δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
1α	71.04	4.80 (1H, d, J = 13.9 Hz)
1β		4.77 (1H, d, J = 13.9 Hz)
2	-	-
3α	66.64	4.94 (1H, dd, J = 11.8 / 3.1 Hz)
3β		4.46 (1H, dd, J = 11.8 / 4.6 Hz)
4	37.6	3.11 (1H, m)
5	29.9	3.51 (1H, dt, J = 11.8 / 6.4 Hz)
6α	32.8	2.84 (1H, dd, J = 17.0 / 5.7 Hz)
6β		2.29 (1H, dd, J = 17.0 / 12.1 Hz)
7	167.9	-
8	125.17	5.71 (1H, q, J = 7.2 Hz)
9	130.1	-
CH ₃ -10	13.3	1.74 (3H, d, J = 7.2 Hz)
11	169.7	-

Πίνακας 5.11

Η επεξήγηση της στεreoχημείας του μορίου πραγματοποιείται στην παράγραφο 5.4.6.

5.4.4.2 Μεγαριτολακτονικό οξύ (Megaritolactonic acid)

 <p>5S</p>	M.B.	196.20
	Σ.Τ.	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
	HR-ESI-MS : m/z 195.0702 , [M - H] ⁻ , [C ₁₀ H ₁₂ O ₄ - H] ⁻	

Ο μεταβολίτης Μεγαριτολακτονικό οξύ δεν έχει απομονωθεί ξανά στην φύση και είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ως συστατικό του εδώδιμου καρπού της ελιάς.

5.4.4.2.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση του νέου αυτού μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Συγκεκριμένα, τα πειράματα

που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H} - ^1\text{H COSY}$, HSQC-DEPT και HMBC σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3).

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **6.41 ppm** και στα **5.72 ppm** παρατηρούνται δύο απλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 3α και 3β.
- Στα **5.715 ppm** μία τετραπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης H-8. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης CH_3 -10 με σταθερά $J = 6.8 \text{ Hz}$.
- Στα **4.97 ppm** παρατηρείται μία διπλή – τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 1α. Οι σχάσεις που παρατηρούνται οφείλονται στις συζεύξεις που παρουσιάζει το πρωτόνιο 1α αφενός με το πρωτόνιο 1β ($J = 12.9 \text{ Hz}$) αφετέρου δε με τα πρωτόνια CH_3 -10 ($J = 1.5 \text{ Hz}$).
- Στα **4.58 ppm** παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου 1β ως μία διπλή κορυφή. Η σχάση οφείλεται στην σύζευξη του πρωτονίου 1α με το 1β και χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 12.9 \text{ Hz}$.
- Στα **4.12 ppm**, μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 5. Παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 6 με σταθερά $J = 7.6 \text{ Hz}$.
- Στα **2.68 ppm** παρατηρείται το σήμα για τα πρωτόνια της θέσης 6 ως μία πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H. Στην πραγματικότητα το σήμα αυτό αποτελείται από την σύνθεση δύο κορυφών. Κάθε ένα από τα πρωτόνια 6α και 6β εμφανίζεται ως μία διπλή – διπλή κορυφή. Ωστόσο λόγω μικρής διαφοράς στις χημικές μετατοπίσεις παρατηρείται επικάλυψη ανάμεσα σε δύο συνιστώσες των κορυφών. Τα πρωτόνια 6α και 6β παρουσιάζουν μία μεγάλη σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά $J = 15.6 \text{ Hz}$ και μία μικρότερη με το πρωτόνιο 5 με σταθερά $J = 7.3 \text{ Hz}$.
- Τέλος στα **1.75 ppm**, παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή με η οποία ολοκληρώνει για 3H. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης CH_3 -10. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μία μεγάλη σχάση με το βινυλικό πρωτόνιο της θέσης 8 με σταθερά $J = 7.0 \text{ Hz}$ και μία μικρότερη με το πρωτόνιο της θέσης 1α με σταθερά $J = 1.5 \text{ Hz}$.

Τα σήματα των ανθράκων του μορίου όπως προκύπτουν από τα φάσματα HSQC-Dept και HMBC σε CDCl_3 είναι τα εξής :

- Οι καρβονυλικοί άνθρακες 7 και 11 εμφανίζονται στα 173.3 και 164.98 ppm αντίστοιχα.

- Οι βινυλικοί άνθρακες 4, 9, 3 και 8 εμφανίζονται στα 136.35, 129.11, 128.79 και 125.46 ppm αντίστοιχα.
- Ο οξυγονωμένος άνθρακας 1 εμφανίζεται στα 71.51 ppm.
- Οι αλειφατικοί άνθρακες 6 και 5 εμφανίζονται στα 38.07 και 36.25 ppm αντίστοιχα.
- Τέλος ο περισσότερο θωρακισμένος άνθρακας 10 του μεθυλίου εμφανίζεται στα 12.84 ppm.

Στο φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα :

- Οι geminal συζεύξεις (H-1α, H-1β) και (H-6α, H-6β).
- Παρατηρείται επίσης η σύζευξη του βινυλικού πρωτονίου με το βινυλικό μεθύλιο (H-8, CH₃-10) καθώς και των πρωτονίων H-5, H-6.

Στο φάσμα HSQC-DEPT σε CDCl₃ παρατηρούνται οι ακόλουθες συζεύξεις:

- Όσον αφορά τα σήματα στην περιοχή των διπλών δεσμών, παρατηρούνται οι συζεύξεις των βινυλικών πρωτονίων 3α και 3β με τον άνθρακα C-3 στα 128.79 ppm και του H-8 με τον C-8 στα 125.46 ppm.
- Έπειτα παρατηρείται η σύζευξη του οξυγονωμένου άνθρακα C-1 στα 71.51 ppm με τα πρωτόνια 1α και 1β.
- Τα πρωτόνια 6 και 5 παρουσιάζουν σύζευξη με τους άνθρακες στα 38.07 ppm (C-6) και 36.35 ppm (C-5).
- Τέλος παρατηρείται η σύζευξη των πρωτονίων του μεθυλίου CH₃-10 με τον άνθρακα στα 12.84 ppm (C-10).

Στο φάσμα HMBC σε CDCl₃ παρατηρούνται οι συζεύξεις :

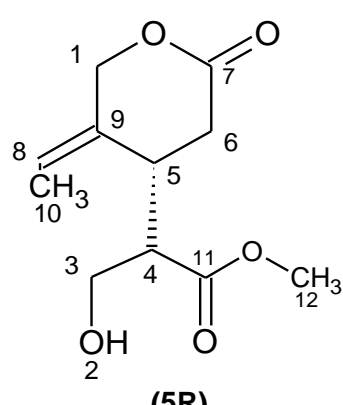
- του πρωτονίου της θέσεως 3β με τους άνθρακες 4 (²J), 5 (³J) και 11 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 3α με τον άνθρακα 5 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 1β με τους άνθρακες 9 (²J), 5 (³J), 8 (³J) και 11 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 5 με τους άνθρακες 9 (²J), 1 (³J) και 7 (³J),
- του πρωτονίου της θέσεως 6 με τους άνθρακες 5 (²J), 4 (³J) και 9 (³J) και
- τέλος των πρωτονίων της θέσεως 10 με τους άνθρακες 8 (²J) και 9 (³J).

Η επεξήγηση της στερεοχημείας του μορίου πραγματοποιείται στην παράγραφο 5.4.6.

Άτομο	¹³ C-NMR (δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
1α	71.51	4.97 (1H, dt, J = 12.9 / 1.5 Hz)
1β		4.58 (1H, d, J = 12.9 Hz)
2	-	-
3α	128.79	6.41 (1H, s)
3β		5.72 (1H, s)
4	136.35	-
5	36.35	4.12 (1H, t, J = 7.6 Hz)
6α	38.07	2.65 (1H, dd, J = 15.6 / 7.3 Hz)
6β		2.70 (1H, dd, J = 15.6 / 7.3 Hz)
7	173.3	-
8	125.46	5.175 (1H, q, J = 6.8 Hz)
9	129.11	-
CH ₃ -10	12.84	1.75 (3H, dd, J = 7.0 / 1.5 Hz)
11	164.98	-

Πίνακας 5.12

5.4.4.3 Μεθυλεστέρας του μεγαριτολακτονικού οξέος B (Megaritolactonic B methyl ester)

 <p>(5R)</p>	M.B.	228.24
	Σ.Τ.	C ₁₁ H ₁₆ O ₅
	HR-ESI-MS : m/z 227.0915 , [M – H] ⁻ , [C ₁₁ H ₁₅ O ₅ – H] ⁻	

Ο μεταβολίτης μεθυλεστέρας του Μεγαριτολακτονικού οξέος B δεν έχει απομονωθεί ξανά στην φύση και είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ως συστατικό του εδώδιμου καρπού της ελιάς.

5.4.4.3.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση του νέου αυτού μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Συγκεκριμένα, τα πειράματα

που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H} - ^1\text{H COSY}$, HSQC-DEPT και HMBC σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και δευτεριωμένη ακετόνη ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$). Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με την μέθοδο του ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο [MSESI, m/z: (M) $^+$ 228.10].

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **5.78 ppm** παρατηρείται μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H που αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης H-8. Παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 10 με σταθερά $J = 6.7 \text{ Hz}$.
- Στα **4.51 ppm** και **4.82 ppm** παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 1α και 1β. Παρουσιάζουν μία μεγάλη geminal σύζευξη μεταξύ τους η οποία χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 12.5 \text{ Hz}$.
- Στα **3.73 ppm** και στα **3.80 ppm** παρατηρούνται τα σήματα των πρωτονίων 3α και 3β αντίστοιχα ως δύο τριπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνουν για 1H. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν σύζευξη μεταξύ τους καθώς επίσης με το πρωτόνιο της θέσεως 4. Η μέση τιμή της σταθεράς σύζευξης που παρατηρείται είναι 7.8 Hz και 5.3 Hz αντίστοιχα.
- Στα **3.75 ppm** παρατηρείται μία οξεία κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 3H τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια της θέσεως 12 (**$\text{CH}_3\text{O-12}$**).
- Στα **3.32 ppm**, μία τετραπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 6 και 4. Ο μέσος όρος των σταθερών σύζευξης που παρατηρούνται είναι 7.2 Hz.
- Στα **2.90 ppm**, μία τετραπλή κορυφή ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 4. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 5 και 6 με μέσο όρο σταθεράς σύζευξης $J = 6.6 \text{ Hz}$.
- Στα **2.67 ppm** και **2.77 ppm** παρατηρούνται δύο διπλές – διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 6α και 6β. Αυτά εμφανίζουν μία μεγάλη σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά $J = 16.4 \text{ Hz}$. Επιπλέον παρουσιάζουν μία μικρότερη σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 5 με σταθερά σύζευξης 6.7 Hz και 7.0 Hz αντίστοιχα για τα πρωτόνια H-6α και H-6β.
- Στα **1.75 ppm** παρατηρείται το σήμα του μεθυλίου της θέσης 10 ως μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια. Παρατηρείται η σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 8 με σταθερά $J = 6.9 \text{ Hz}$, καθώς και μία μικρότερη σύζευξη ($J = 1.37 \text{ Hz}$) η οποία οφείλεται στο πρωτόνιο 1β.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **5.78 ppm** παρατηρείται μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10 η οποία χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 7.0 \text{ Hz}$.
- Στα **4.82 ppm** και στα **4.44 ppm** παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για τα πρωτόνια των θέσεων 1β και 1α αντίστοιχα. Τα πρωτόνια αυτά εμφανίζουν μία μεγάλη geminal σύζευξη μεταξύ τους η οποία χαρακτηρίζεται από την σταθερά σύζευξης $J = 12.8 \text{ Hz}$.
- Στα **3.79 ppm** και στα **3.72 ppm** δύο διπλές – διπλές κορυφές ολοκληρώνουν για 1H η κάθε μία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 3β και 3α. Αυτά παρουσιάζουν μία μεγάλη geminal σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά $J = 10.5 \text{ Hz}$ και μία σύζευξη με το πρωτόνιο 4 η χαρακτηρίζεται από την σταθερά $J = 6.4 \text{ Hz}$ για το πρωτόνιο 3α και 7.5 Hz για το πρωτόνιο 3β.
- Στα **3.67 ppm** μία οξεία απλή κορυφή ολοκληρώνει για 3H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 12.
- Στα **3.32 ppm** παρατηρείται μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H που αντιστοιχεί στην θέση 5. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 4 και 6 με σταθερά σύζευξης κατά μέσο όρο $J = 6.9 \text{ Hz}$.
- Στα **2.99 ppm** παρατηρείται μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H της θέσης 4. Αυτό παρουσιάζει συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 5 και 3 με σταθερά σύζευξης κατά μέσο όρο $J = 6.9 \text{ Hz}$.
- Στα **2.61 ppm** και **2.82 ppm** εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων 6α και 6β. Το σήμα του πρωτονίου 6β επικαλύπτεται από το σήμα του νερού της δευτεριωμένης ακετόνης. Το σήμα του πρωτονίου 6α εμφανίζεται ως μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H. Παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο 6β με σταθερά $J = 15.9 \text{ Hz}$ καθώς και με το πρωτόνιο της θέσεως 5 με σταθερά $J = 7.2 \text{ Hz}$.
- Τέλος στα **1.73 ppm** παρατηρείται το σήμα του μεθυλίου της θέσεως 10 ως μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 3H. Τα πρωτόνια του μεθυλίου παρουσιάζουν σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσεως 8 με σταθερά $J = 7.7 \text{ Hz}$.

Τα σήματα των ανθράκων του μορίου όπως προκύπτουν από τα φάσματα HSQC-Depf και HMBC σε $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ είναι τα εξής :

- Οι καρβονυλικοί άνθρακες 11 και 7 εμφανίζονται στα 173.7 και 171.5 ppm αντίστοιχα.

- Οι βινυλικοί άνθρακες 9 και 8 εμφανίζονται στα 133.4 ppm και 126.9 ppm αντίστοιχα.
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες 1 και 3 εμφανίζονται στα 71.8 ppm και 60.6 ppm αντίστοιχα.
- Ο άνθρακας της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 12 εμφανίζεται στα 50.9 ppm.
- Ο τριτοταγής άνθρακας 4 εμφανίζεται στα 50.1 ppm.
- Οι αλειφατικοί άνθρακες 6 και 5 εμφανίζονται στα 32.1 και 31.2 ppm αντίστοιχα.
- Τέλος ο περισσότερο θωρακισμένος άνθρακας 10 του μεθυλίου εμφανίζεται στα 12.7 ppm.

Στο φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα :

- Οι geminal συζεύξεις (H-1α, H-1β), (H-3α, H-3β) και (H-6α, H-6β).
- Παρατηρείται επίσης η σύζευξη του βινυλικού πρωτονίου με το βινυλικό μεθύλιο (H-8, CH₃-10) καθώς επίσης και του πρωτονίου 1β με τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10. Η τελευταία σύζευξη οφείλεται στον διπλό δεσμό ο οποίος μεσολαβεί μεταξύ των πρωτονίων.
- Οι συζεύξεις του πρωτονίου 4 με τα H-5 και H-3α,β καθώς και του πρωτονίου 5 με τα H-4 και H-6α,β.

Στο φάσμα HSQC-DEPT σε CDCl₃ παρατηρούνται οι ακόλουθες συζεύξεις:

- Του βινυλικού πρωτονίου H-8 με τον βινυλικό άνθρακα C-8 στα 126.9 ppm.
- Των πρωτονίων (1α, 1β), (3α, 3β) και (6α, 6β) με τους άνθρακες C-1 στα 71.8 ppm, C-3 στα 60.6 ppm και C-6 στα 32.1 ppm αντιστοίχως.
- Των πρωτονίων της μεθοξυ-ομάδας CH₃O-12 με τον άνθρακα C-12 στα 50.9 ppm.
- Των πρωτονίων H-4 και H-5 με τους άνθρακες C-4 στα 50.1 ppm και C-5 στα 31.2 ppm αντίστοιχα.
- Και τέλος των πρωτονίων της θέσης CH₃-10 με τον άνθρακα C-10 στα 12.7 ppm.

Στο φάσμα HMBC σε ((CD₃)₂CO) παρατηρούνται οι συζεύξεις :

- του πρωτονίου 8 με τους άνθρακες 10 (²J), 5 (³J) και 1 (³J),
- του πρωτονίου 1β με τους άνθρακες 9 (²J) και 8 (³J),
- του πρωτονίου 1α με τους άνθρακες 9 (²J), 5 (³J), 8 (³J) και 7 (³J),
- των πρωτονίων 3α και 3β με τους άνθρακες 4 (²J), 5 (³J) και 11 (³J),
- των πρωτονίων της μεθοξυ-ομάδας 12 με τον άνθρακα 11 (³J),

- του πρωτονίου 5 με τους άνθρακες 4 (²J), 6 (²J), 9 (²J), 3 (³J), 1 (³J), 8 (³J) και 11 (³J),
- του πρωτονίου 4 με τους άνθρακες 3 (²J), 11 (²J), 6(³J) και 9 (³J),
- των πρωτονίων 6α και 6β με τους άνθρακες 5 (²J), 7 (²J), 9 (³J), και 4 (³J), και
- τέλος των πρωτονίων του μεθυλίου 10 με τους άνθρακες 8 (²J) και 9 (³J).

Η επεξήγηση της στερεοχημείας του μορίου πραγματοποιείται στην παράγραφο 5.4.6.

Πίνακας 5.13 Χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου σε CDCl₃

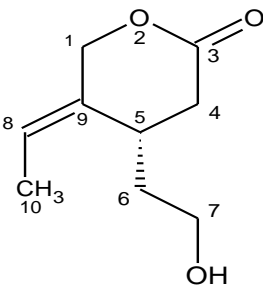
Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm)
1 ^α	4.51 (1H, d, J = 12.5 Hz)
1 ^β	4.82 (1H, d, J = 12.5 Hz)
2	-
3 ^α	3.73 (1H, t, J = 7.8Hz)
3 ^β	3.80 (1H, t, J = 5.3 Hz)
4	2.90 (1H, q, J = 6.6 Hz)
5	3.32 (1H, q, J = 7.2Hz)
6 ^α	2.67 (1H, dd, J = 16.4 / 7.0 Hz)
6 ^β	2.77 (1H, dd, J = 16.4 / 6.7 Hz)
7	-
8	5.78 (1H, q, J = 6.7 Hz)
9	-
CH ₃ -10	1.75 (3H, dd, J = 6.9 / 1.4 Hz)
11	-
CH ₃ O-12	3.75 (3H, s)

Πίνακας 5.14 Χημικές μετατοπίσεις άνθρακα και πρωτονίου σε (CD₃)₂CO

Άτομο	¹³ C-NMR(δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
1 ^α	71.8	4.44 (1H, d, J = 12.8 Hz)
1 ^β		4.82 (1H, d, J = 12.8 Hz)
2	-	-
3 ^α	60.6	3.72 (1H, dd, J = 10.5 / 6.4 Hz)
3 ^β		3.79 (1H, dd, J = 10.5 / 7.5 Hz)

Άτομο	¹³ C-NMR (δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
4	50.1	2.99 (1H, q, J = 6.9 Hz)
5	31.2	3.32 (1H, q, J = 6.9 Hz)
6α	32.1	2.61 (1H, dd, J = 15.9 / 7.2 Hz)
6β		2.82 (1H, dd, J = 15.9 / (-) Hz)
7	171.5	-
8	126.9	5.78 (1H, q, J = 7.0 Hz)
9	133.4	-
CH3-10	12.7	1.73 (3H, dd, J = 7.7 Hz)
11	173.7	-
CH ₃ O-12	50.9	3.67 (3H, s)

5.4.4.4 Μεγαριτολακτονόλη (Megaritolactonol)

 <p>5S</p>	M.B.	170
	Σ.Τ.	C ₉ H ₁₄ O ₃
	α²⁰_D (c 0.15, MeOH)	+ 8.0°
	HR-ESI-MS : m/z 169.0870 ,[M – H]⁻, [C₉H₁₄O₃ – H]⁻	

Ο μεταβολίτης Μεγαριτολακτονόλη (Megaritolactonol) δεν έχει απομονωθεί ξανά στην φύση και είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ως συστατικό του εδώδιμου καρπού της ελιάς.

5.4.4.4.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση του νέου αυτού μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Συγκεκριμένα, τα πειράματα

που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H} - ^1\text{H COSY}$, HSQC-DEPT , HMBC και NOESY σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το μοριακό βάρος του μορίου πιστοποιήθηκε με την μέθοδο του ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων [MSEI , m/z : $(\text{M})^+ 170$].

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **5.62 ppm** εμφανίζεται μία τετραπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8. Παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10 με σταθερά $J = 7.0 \text{ Hz}$.
- Στα **4.58 ppm** και **4.77 ppm** παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 1α και 1β αντίστοιχα. Αυτά παρουσιάζουν μία μεγάλη geminal σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά $J = 12.9 \text{ Hz}$.
- Στα **3.72 ppm** εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H τα οποία αντιστοιχούν στην θέση 7. Αυτά παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 6 με σταθερά $J = 6.3 \text{ Hz}$.
- Στην περιοχή του φάσματος **3.11 – 3.17 ppm** παρατηρείται μία πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 5. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια των θέσεων 4 και 6.
- Στα **2.58 ppm** και στα **2.72 ppm** παρατηρούνται δύο διπλές – διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 4α και 4β τα οποία παρουσιάζουν μία μεγάλη σύζευξη μεταξύ τους ($J = 15.85 \text{ Hz}$) και μία μικρότερη με το πρωτόνιο 5 ($J_{4\alpha,5} = 5.9 \text{ Hz} / J_{4\beta,5} = 6.5 \text{ Hz}$).
- Στις περιοχές του φάσματος **1.62 – 1.69 ppm** και **1.83 – 1.89 ppm** παρατηρούνται δύο πολλαπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Οι κορυφές αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 6α και 6β τα οποία εκτός από την μεταξύ του σύζευξη παρουσιάζουν επιπλέον συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 7 και 5.
- Τέλος στα **1.71 ppm** παρατηρείται το σήμα των πρωτονίων του μεθυλίου της θέσεως 10 ως μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 3H. Τα πρωτόνια παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 8 με σταθερά σύζευξης $J = 6.8 \text{ Hz}$.

Τα σήματα των ανθράκων του μορίου όπως προκύπτουν από τα φάσματα HSQC-Dept και HMBC σε CDCl_3 είναι τα ακόλουθα :

- Ο καρβονυλικός άνθρακας 3 εμφανίζεται στα 172.53 ppm.

- Οι βινυλικοί άνθρακες 9 και 8 εμφανίζονται στα 133.43 ppm και 124.20 ppm αντίστοιχα.
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες 1 και 7 εμφανίζονται στα 72.2 ppm και 60.05 ppm αντίστοιχα.
- Οι αλειφατικοί δευτεροταγείς άνθρακες 6 και 4 εμφανίζονται στα 37.08 ppm και στα 35.47 ppm αντιστοίχως.
- Ο τριτοταγής άνθρακας 5 εμφανίζεται στα 29.55 ppm και ο τεταρτοταγής άνθρακας 10 εμφανίζεται στα 13.56 ppm.

Στο φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα :

- Οι geminal συζεύξεις (H-1α, H-1β), (H-4α, H-4β) και (H-6α, H-6β).
- Παρατηρείται επίσης η σύζευξη του βινυλικού πρωτονίου με το βινυλικό μεθύλιο (H-8, CH₃-10) καθώς επίσης και των πρωτονίων 1α και 1β με τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 10. Η τελευταία σύζευξη οφείλεται στον διπλό δεσμό ο οποίος μεσολαβεί μεταξύ των πρωτονίων.
- Τέλος παρατηρούνται οι συζεύξεις του πρωτονίου 7 με τα H-6α,β καθώς και του πρωτονίου 5 με τα H-4α,β και H-6α,β.

Στο φάσμα NOESY σε CDCl₃ παρατηρούνται δύο χαρακτηριστικά σήματα τα οποία υποδεικνύουν την θέση του μεθυλίου στον διπλό δεσμό του μορίου. Συγκεκριμένα τα σήματα αυτά είναι :

- Η κορυφή διασταύρωσης του πρωτονίου H-5 με τα πρωτόνια του μεθυλίου CH₃-10 και
- η κορυφή διασταύρωσης των πρωτονίων της θέσης 1 με το πρωτόνιο του διπλού δεσμού H-8.

Στο φάσμα HSQC-DEPT σε CDCl₃ παρατηρούνται οι ακόλουθες συζεύξεις:

- Του βινυλικού πρωτονίου H-8 με τον βινυλικό άνθρακα C-8 στα 124.2 ppm.
- Των πρωτονίων (1α, 1β), (6α, 6β) και (4α, 4β) με τους άνθρακες C-1 στα 72.2 ppm, C-6 στα 37.08 ppm και C-4 στα 35.47 ppm αντιστοίχως.
- Των πρωτονίων της θέσεως 7 με τον οξυγονωμένο άνθρακα C-7 στα 60.05 ppm.
- Των πρωτονίων H-5 και H-10 με τους άνθρακες C-5 στα 29.55 ppm και C-10 στα 13.56 ppm αντίστοιχα.

Στο φάσμα HMBC σε CDCl₃ παρατηρούνται οι συζεύξεις :

- του πρωτονίου 8 με τους άνθρακες 10 (^2J), 5 (^3J) και 1 (^3J),

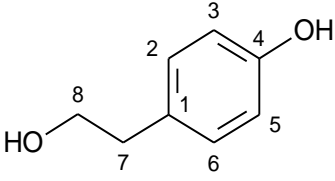
- των πρωτονίων 1α, 1β με τους άνθρακες 9 (²J) και 3 (³J), 5 (³J) και 8 (³J),
- του πρωτονίου 7 με τους άνθρακες 6 (²J) και 5 (³J),
- του πρωτονίου 5 με τους άνθρακες 4 (²J), 9 (²J), 1 (³J), 3 (³J), 7 (³J) και 8(³J),
- των πρωτονίων 4α, 4β με τους άνθρακες 3 (²J), 5 (²J), 6 (³J) και 9 (³J),
- των πρωτονίων 6α,6β με τους άνθρακες 5 (²J), 7 (²J), 4 (³J), 9 (³J) και 10 (³J),
- των πρωτονίων του μεθυλίου της θέσης 10 με τους άνθρακες 8 (²J), 9 (³J) και 1 (⁴J).

Η επεξήγηση της στερεοχημείας του μορίου πραγματοποιείται στην παράγραφο 5.4.6.

Πίνακας 5.15 Χημικές μετατοπίσεις άνθρακα και πρωτονίου σε CDCl₃

Ατομο	¹³ C-NMR(δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
1α	72.20	4.58 (1H, d, J = 12.9 Hz)
1β		4.77 (1H, d, J = 12.9 Hz)
2	-	-
3	172.53	-
4α	35.47	2.58 (1H, dd, J = 15.9/5.9 Hz)
4		2.72 (1H, dd, J = 15.9/6.5 Hz)
5	29.55	3.11 – 3.17 (1H, m)
6α	37.08	1.62 – 1.69 (1H, m)
6β		1.83 – 1.89 (1H, m)
7	60.05	3.72(2H, t, J = 6.3 Hz)
8	124.20	5.62 (1H, q, J = 7.0 Hz)
9	133.43	-
10	13.56	1.74 (3H, d, J = 6.8 Hz)

5.4.4.5 Τυροσόλη (Tyrosol)

	M.B.	138.16
	Σ.Τ.	C ₈ H ₁₀ O ₂
	α_D	0°
Συνώνυμα	4-υδροξυ-φαινυλαιθυλ-αλκοόλη, 4-(2'-υδροξυαιθυλ)-φαινόλη, 4-υδροξυ-β-φαινυλαιθυλ-αλκοόλη	

Η τυροσόλη αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο φυσικό προϊόν το οποίο απομονώνεται από μία πληθώρα φυτικών οργανισμών.

5.4.4.5.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση αυτού του μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και συγκεκριμένα με το πείραμα ¹H-NMR σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD).

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **7.06 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί σε αυτά των θέσεων 3 και 5. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μία ortho – σύζευξη με τα πρωτόνια 2 και 6 αντίστοιχα με σταθερά J = 8.5 Hz καθώς και μία meta – σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά J = 2.1 Hz.
- Στα **6.73 ppm** εμφανίζεται το σήμα των πρωτονίων 2 και 6 ως μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μία ortho σύζευξη με τα πρωτόνια 3 και 5 αντίστοιχα με σταθερά J = 8.5 Hz καθώς και μία meta – σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά J = 2.1 Hz.
- Στα **3.71 ppm** παρατηρείται μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 8. Αυτά παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 7 με σταθερά J = 7.2 Hz κατά μέσο όρο.
- Τέλος στα **2.74 ppm** παρατηρείται επίσης μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 7. Αυτά παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 8 με σταθερά J = 7.2 Hz κατά μέσο όρο.

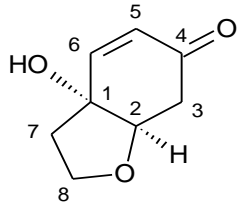
Πίνακας 5.16 Χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου σε CD₃OD

Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm)
1	-
2,6	6.73 (2H, dd, J = 8.5 / 2.1 Hz)
3,5	7.06 (2H, dd, J = 8.5 / 2.1 Hz)
4	-
7	2.74 (2H, t, J = 7.2 Hz)
8	3.71 (2H, t, J = 7.2 Hz)

5.4.4.5.2 Βιολογικές ιδιότητες

Οι βιολογικές δράσεις της τυροσόλης παρατίθενται στην παράγραφο 3.2.1 .

5.4.4.6 *Halleridone*

	M.B.	154.16
	Σ.Τ.	C ₈ H ₁₀ O ₃
	[α]_D	+0.26°
Συνώνυμα	(+)rengyolone, cleroidicin F	

Έχει απομονωθεί από το φυτό *Forsythia suspensa*^[5] και από άλλα φυτά της οικογένειας *Oleaceae*. Επιπλέον έχει απομονωθεί από υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων.

5.4.4.6.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση αυτού του μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και συγκεκριμένα με την χρήση των πειραμάτων ¹H-NMR σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD) και ¹H-NMR, ¹H - ¹H COSY, HSQC-DEPT και HMBC σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃).

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **6.82 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6. Αυτό παρουσιάζει μία σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 5 με σταθερά J = 10.1 Hz και μία μικρότερη σύζευξη με το πρωτόνιο 2 (διευθέτηση W) με σταθερά J = 1.8 Hz.

- Στα **5.99 ppm** παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6 με σταθερά $J = 10.0$ ppm.
- Στα **4.18 ppm** παρατηρείται μία τριπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2. Παρουσιάζει συζεύξεις με τα πρωτόνια των θέσεων 3 και 6 με αντίστοιχες σταθερές σύζευξης $J = 4.6$ Hz και $J = 1.8$ ppm.
- Στα **4.03 ppm** παρατηρείται μία τριπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8β. Αυτό παρουσιάζει μία μεγάλη σύζευξη με το πρωτόνιο 8α με σταθερά $J = 7.9$ Hz και μία με τα πρωτόνια της θέσης 7 με σταθερά $J = 5.9$ Hz.
- Στα **3.88 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 8α. Αυτό παρουσιάζει μία σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 8β με σταθερά $J = 7.9$ Hz και μία με τα πρωτόνια της θέσης 7 με σταθερά $J = 7.3$ Hz.
- Στα **2.80 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3β. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο 3α με σταθερά $J = 16.7$ Hz και με το πρωτόνιο 2 με σταθερά σύζευξης $J = 4.3$ Hz.
- Στα **2.60 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3α. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο 3β με σταθερά $J = 16.7$ Hz και με το πρωτόνιο 2 με σταθερά $J = 4.7$ Hz.
- Στις περιοχές **2.20 – 2.26 ppm** και **2.28 – 2.34 ppm** παρατηρούνται δύο πολλαπλές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 7α και 7β. Αυτά παρουσιάζουν σύζευξη μεταξύ τους καθώς και με τα πρωτόνια της θέσης 8.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **6.76 ppm** παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 6. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 5 με σταθερά $J = 9.9$ Hz.
- Στα **6.02 ppm** παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6 με σταθερά $J = 10.2$ Hz.
- Στα **4.25 ppm** εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου 2 ως μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H. Παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 3 με σταθερά σύζευξης $J = 5.3$ Hz.

- Στα **3.96 ppm** και **4.08 ppm** εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων 8α και 8β ως δύο τετραπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνουν για 1H. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μία μεταξύ τους σύζευξη και μία σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 7. Ωστόσο για κάθε κορυφή παρατηρείται μία σταθερά σύζευξης η οποία είναι κατά μέσο όρο 7.7 Hz για την κορυφή του πρωτονίου 8α και 8.1 Hz για την κορυφή του πρωτονίου 8β.
- Στα **2.78 ppm** εμφανίζεται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3β. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 3α με σταθερά $J = 16.7$ Hz και μία μικρότερη σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 2 με σταθερά $J = 5.8$ Hz.
- Στα **2.60 ppm** εμφανίζεται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει επίσης για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3α. Αυτό παρουσιάζει μία σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 3β με σταθερά $J = 16.7$ Hz καθώς και μία μικρότερη σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 2 με σταθερά $J = 5.8$ Hz.
- Στην περιοχή **2.17 – 2.26 ppm** εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου 7α ως μία πολλαπλή κορυφή. Ομοίως στην περιοχή **2.27 – 2.34 ppm** εμφανίζεται μία ακόμη πολλαπλή κορυφή η οποία αποτελεί το σήμα του πρωτονίου 7β.

Τα σήματα των ανθράκων του μορίου όπως προκύπτουν από τα φάσματα HSQC-Dept και HMBC σε CDCl_3 είναι τα εξής :

- Ο καρβονυλικός άνθρακας 4 εμφανίζεται στα 196.33 ppm.
- Οι βινυλικοί άνθρακες 6 και 5 εμφανίζονται αντίστοιχα στα 147.47 ppm και 128.88 ppm.
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες 2, 1 και 8 εμφανίζονται αντίστοιχα στα 81.24 ppm, 75.54 ppm και 66.06 ppm.
- Οι δευτεροταγείς άνθρακες 3 και 7 εμφανίζονται στα 40.12 ppm και στα 33.77 ppm αντίστοιχα.

Στο φάσμα $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY σε CDCl_3 παρατηρούνται τα ακόλουθα σήματα :

- Οι geminal συζεύξεις (H-2α, H-2β), (H-7α, H-7β) και (H-8α, H-8β).
- Οι συζεύξεις του πρωτονίου 2 με τα γειτονικά πρωτόνια H-3α και H-3β.
- Παρατηρείται επίσης η σύζευξη των βινυλικών πρωτονίων H-5 και H-6.

Στο φάσμα HSQC-DEPT σε CDCl_3 παρατηρούνται οι ακόλουθες συζεύξεις:

- Των βινυλικών πρωτονίων H-6 και H-5 με τους βινυλικούς άνθρακες C-6 στα 147.47 ppm και C-5 στα 128.88 ppm.

- Του πρωτονίου της θέσεως 2 με τον οξυγονωμένο άνθρακα C-2 στα 81.24
- Των πρωτονίων (8α, 8β), (3α, 3β) και (7α, 7β) με τους άνθρακες C-8 στα 66.06 ppm, C-3 στα 40.12 ppm και C-7 στα 33.77 ppm αντιστοίχως.

Στο φάσμα HMBC σε CDCl₃ παρατηρούνται οι συζεύξεις :

- του πρωτονίου 6 με τους άνθρακες 2 (³J), 4 (³J) και 3 (⁴J),
- του πρωτονίου 5 με τους άνθρακες 1(³J), 3 (³J) και 2 (⁴J),
- των πρωτονίων 8α και 8β με τους άνθρακες 1 (³J), 2 (³J) και 3(⁴J),
- των πρωτονίων 3α και 3β με τους άνθρακες 2 (²J), 4 (²J) και 1 (³J),
- των πρωτονίων 7α και 7β με τους άνθρακες 1 (²J), 8(²J), 2(³J) και 6 (³J).

Πίνακας 5.17 Χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου σε CD₃OD

Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm)
1	-
2b	4.18 (1H, td, J = 4.6 / 1.8 Hz)
3a	2.60 (1H, dd, J = 16.7 / 4.7 Hz)
3b	2.80 (1H, dd, J = 16.7 / 4.3 Hz)
4	-
5	5.99 (1H, d, J = 10.0 Hz)
6	6.82 (1H, dd, J = 10.1/1.8 Hz)
7a	2.20 – 2,26 (1H, m)
7b	2.28 – 2.34 (1H, m)
8a	3.88 (1H, dd, J = 7.9 / 7.3 Hz)
8b	4.03 (1H, td, J = 7.9 / 5.9 Hz)

Πίνακας 5.18 Χημικές μετατοπίσεις άνθρακα και πρωτονίου σε CDCl₃

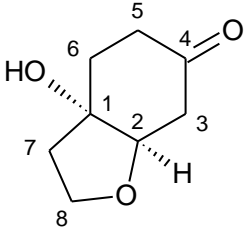
Άτομο	¹³ C-NMR (δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
1	75.54	-
2b	81.24	4.25 (1H, t, J = 5.3 Hz)
3a	40.12	2.60 (1H, dd, J = 16.7/5.8 Hz)
3b		2.78 (1H, dd, J = 16.7/4.8 Hz)

Άτομο	¹³ C-NMR (δ ppm)	¹ H-NMR (δ ppm)
4	196.33	-
5	128.88	6.02 (1H, d, J = 10.2 Hz)
6	147.47	6.76 (1H, d, J = 9.9 Hz)
7a	33.77	2.17 – 2.26 (1H, m)
7b		2.27 – 2.34 (1H, m)
8a	66.06	4.08 (1H, q, J = 8.1 Hz)
8b		3.96 (1H, q, J = 7.7 Hz)

5.4.4.6.1 Βιολογικές ιδιότητες

Ο μεταβολίτης Halleridone παρουσιάζει δράση κατά των καρκινικών σειρών P-388 (λυμφοκυτταρική λευχαιμία ποντικών) και HeLa (καρκίνωμα της ανθρώπινης μήτρας)^[129].

5.4.4.7 Cleroindicin C

	M.B.	156.18
	Σ.Τ.	C ₈ H ₁₂ O ₃
	[α]_D	-38°
Συνώνυμα	cleroindicin C, cleroindin C	

5.4.4.7.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση αυτού του μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και συγκεκριμένα με την χρήση των πειραμάτων ¹H-NMR σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD) και σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃).

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **3.94 ppm** παρατηρείται μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2. Αυτό παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 3 με σταθερά σύζευξης J = 4.1 Hz.
- Στα **3.86 ppm** παρατηρείται μία τριπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8α. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει μία

σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 8β με σταθερά $J = 7.3$ Hz και μία σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 7 με σταθερά $J = 8.8$ Hz.

- Στα **3.95 ppm** παρατηρείται το σήμα του πρωτονίου 8β το οποίο επικαλύπτεται εν μέρει από το σήμα του πρωτονίου 2.
- Στα **2.51 ppm** και στα **2.78 ppm** παρατηρούνται τα σήματα των πρωτονίων 3α και 3β αντίστοιχα, ως δύο διπλές – διπλές κορυφές κάθε μία από τις οποίες ολοκληρώνει για 1H. Τα πρωτόνια αυτά παρουσιάζουν μία μεγάλη σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά $J = 15.9$ Hz καθώς και μικρότερες συζεύξεις με το πρωτόνιο της θέσης 2 με σταθερές σύζευξης $J_{3\alpha,2} = 4,1$ Hz και $J_{3\beta,2} = 4.6$ Hz.
- Στα **2.24 ppm** και στα **2.47 ppm** παρατηρούνται δύο κορυφές με πολλαπλότητα διπλή – διπλή – διπλή. Κάθε μία από αυτές ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 7α και 7β αντίστοιχα. Αυτά παρουσιάζουν μία μεγάλη σύζευξη μεταξύ τους με σταθερά $J = 17.6$ Hz καθώς επίσης και μικρότερες συζεύξεις με τα πρωτόνια 8α και 8β με σταθερές $J_{7\alpha,8\alpha} = 8.2$ Hz, $J_{7\alpha,8\beta} = 5.6$ Hz, $J_{7\beta,8\alpha} = 7.6$ Hz και $J_{7\beta,8\beta} = 7.3$ Hz.
- Στην περιοχή 2.05 – 2.15 ppm παρατηρείται μία πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 4H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 5 και 6.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CDCl_3 , οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του μορίου είναι παρεμφερείς με τις αντίστοιχες στο φάσμα σε CD_3OD και παρατίθενται στον πίνακα 5.19.

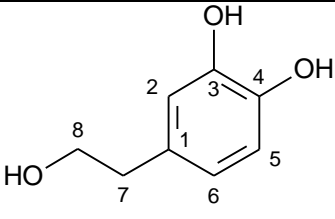
Πίνακας 5.19 Χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου σε CD_3OD και CDCl_3

Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm) / CD_3OD	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm) / CDCl_3
1	-	-
2	3.94 (1H, t, $J = 4.1$ Hz)	3.95 (1H, t, $J = 4.6$ Hz)
3a	2.51 (1H, dd, $J = 15.9 / 4.1$ Hz)	2.55 (1H, dd, $J = 16.0 / 4.6$ Hz)
3b	2.78 (1H, dd, $J = 15.8 / 4.6$ Hz)	2.72 (1H, dd, $J = 16.0 / 4.8$ Hz)
4	-	-
5	2.05-2.15 (4H, m)	2.06 - 2.14 (4H, m)
6		
7a	2.24 (1H, ddd, $J = 17.6 / 8.2 / 5.6$ Hz)	2.26 (1H, ddd, $J = 17.8 / 8.2 / 5.5$ Hz)
7b	2.47 (1H, ddd, $J = 17.6 / 7.6 / 7.3$ Hz)	2.48 (1H, ddd, $J = 17.8 / 8.5 / 4.4$ Hz)
8a	3.86 (1H, dt, $J = 8.8 / 7.3$ Hz)	3.88 (1H, q, $J = 8.4$ Hz)
8b	3.95 (1H, dt, $J = 8.8 / 4.1$ Hz)	3.96 (1H, q)

5.4.4.7.1 Βιολογικές ιδιότητες

Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τις βιολογικές δράσεις αυτού του μεταβολίτη.

5.4.4.8 Υδροξυτυροσόλη (*Hydroxytyrosol*)

	M.B.	154.16
	Σ.Τ.	C ₈ H ₁₀ O ₃
	α_D	
Συνώνυμα	3,4-διυδροξυφαινυλ-αιθανόλη, 3-υδροξυτυροσόλη, 2-(3',4'-διυδροξυφαινυλ)-αιθανόλη	

Όπως και η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη αποτελεί ένα φυσικό προϊόν ευρέως διαδεδομένο. Σημαντική πηγή υδροξυτυροσόλης αποτελούν τα φύλλα του φυτού *Olea europaea*.

5.4.4.8.1 Φασματοσκοπική μελέτη

Η ταυτοποίηση αυτού του μεταβολίτη επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και συγκεκριμένα με το πείραμα ¹H-NMR σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD).

Στο φάσμα ¹H-NMR σε CD₃OD παρατηρούνται τα εξής σήματα :

- Στα **6.71 ppm** παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 5. Αυτό παρουσιάζει ortho – σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6 με σταθερά J = 7.9 Hz.
- Στα **6.69 ppm** παρατηρείται μία διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 2. Παρουσιάζει meta – σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 6 με σταθερά J = 1.5 Hz.
- Στα **6.55 ppm** παρατηρείται μία διπλή – διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί σε αυτό της θέσης 6. Το πρωτόνιο αυτό παρουσιάζει ortho – σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 5 και meta – σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 2. Οι αντίστοιχες σταθερές σύζευξης είναι 7.9 ppm και 1.5 ppm.

- Στα **3.71 ppm** μία τριπλή κορυφή ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί σε αυτά της θέσης 8. Αυτά παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 7 με σταθερά J = 7.3 Hz.
- Τέλος στα **2.69 ppm** παρατηρείται το σήμα των πρωτονίων της θέσης 7, ως μία τριπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 2H. Παρουσιάζουν σύζευξη με τα πρωτόνια της θέσης 8 με σταθερά J = 7.3 Hz.

Πίνακας 5.20 Χημικές μετατοπίσεις πρωτονίου σε CD₃OD

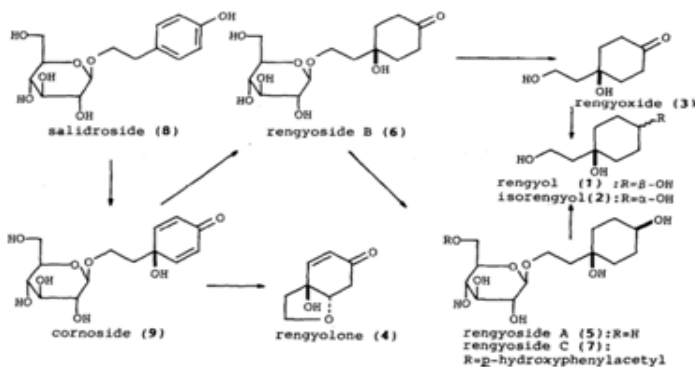
Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm)
1	-
2	6.69 (1H, d, J = 1.5 Hz)
3	-
4	-
5	6.71 (1H, d, J = 7.9 Hz)
6	6.55 (1H, dd, J = 7.9/1.5 Hz)
7	2.69 (2H, t, J = 7.3 Hz)
8	3.71 (2H, t, J = 7.3 Hz)

5.4.4.8.2 Βιολογικές ιδιότητες

Οι βιολογικές ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης παρατίθενται στην παράγραφο 3.2.1

5.4.5 Βιοσύνθεση απομονωμένων μεταβολιτών με σκελετό C6-C2

Οι αρωματικοί μεταβολίτες της ελιάς τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη βιοσυντίθενται όπως είναι γνωστό μέσω της οδού του σικιμικού οξέος. Συγκεκριμένα από το τελευταίο σχηματίζεται το πρεφαινικό οξύ και μέσω αυτού τα φαινυλοπροπανοειδή παράγωγα (C6-C3). Τέλος αποκαρβοξυλίωση του p-υδροξυ-φαινυλοπυροσταφυλικού οξέος οδηγεί στα φαινυλοαιθανοειδή παράγωγα (C6-C2) όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγα αυτών.

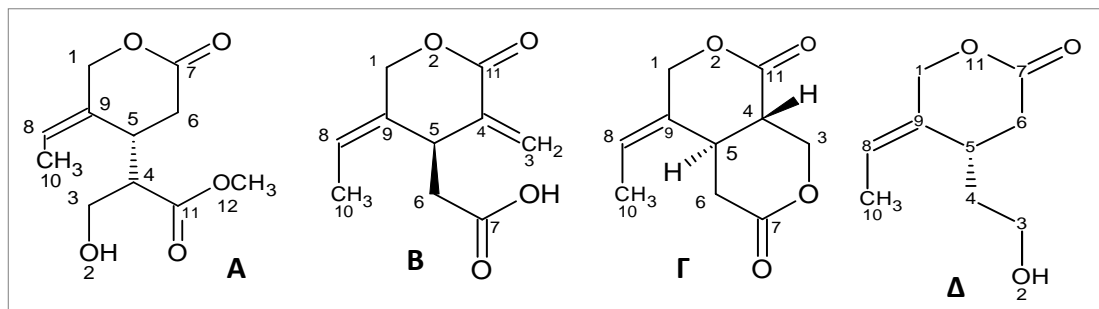


Οι μεταβολίτες “rengyoxide”, “rengyoside B”, “halleridone” και “cleroindicin C” οι οποίοι απομονώνονται για πρώτη φορά από το φυτό της ελιάς προέρχονται επίσης από την παραπάνω αναφερόμενη οδό.

Εικόνα 5.17^[134]

5.4.6 Προϊόντα μεταβολικής διάσπασης της ελευρωπαΐνης

Στην παρούσα πειραματική ενότητα επιτεύχθηκε η απομόνωση τεσσάρων νέων μεταβολιτών από τον βρώσιμο καρπό της ελιάς. Τα τέσσερα νέα φυσικά προϊόντα ανήκουν στην ίδια χημική οικογένεια, τις λακτόνες. Τα εν λόγω μόρια, αποτελούνται από 11 (Megaritolactonic B methyl ester), 10 (Megaritolactonic acid, Megaritodilactone) και 9 (Megaritolactonol) άτομα άνθρακα.



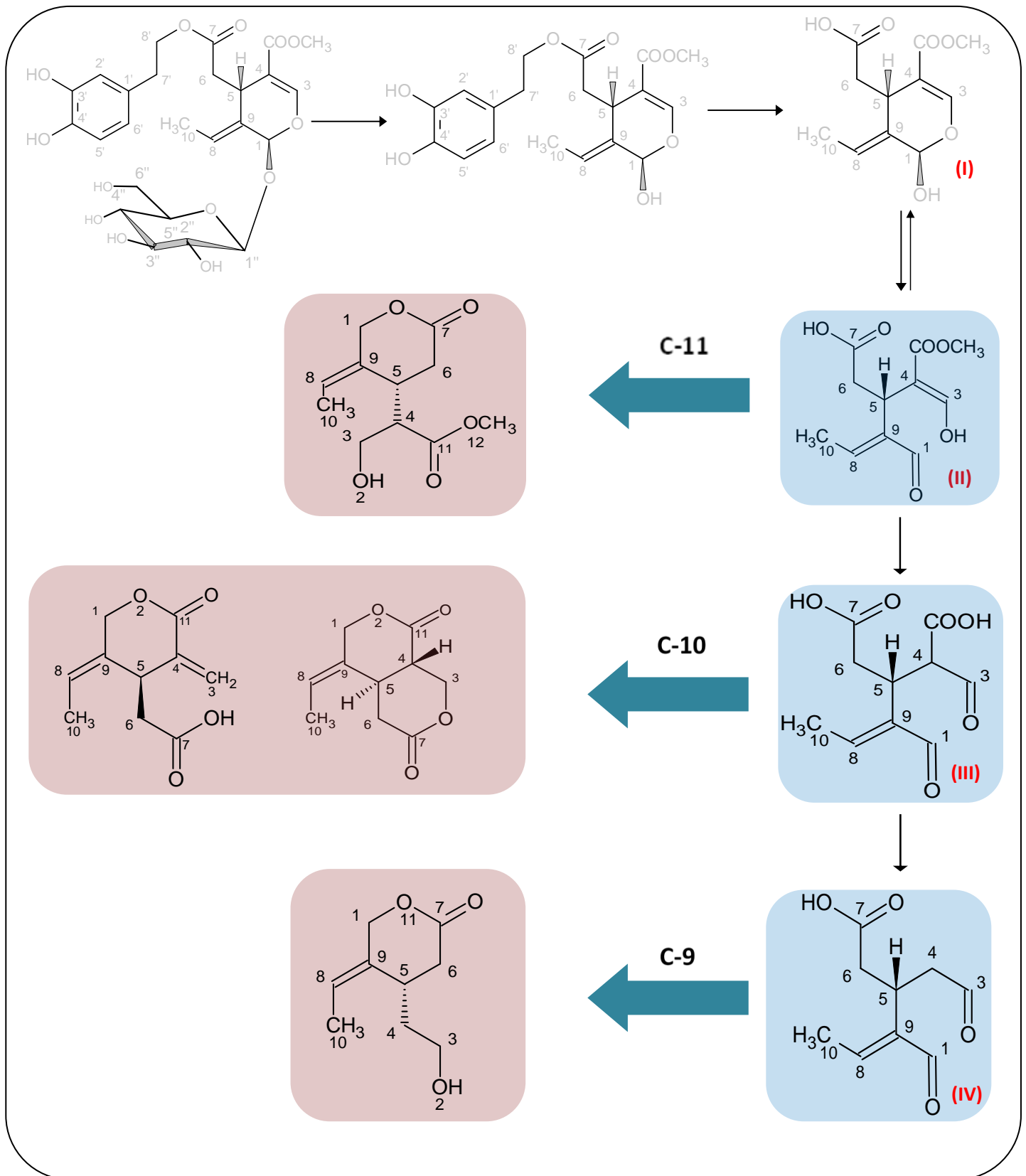
Εικόνα 5.16 **A.**Megaritolactonic B methyl ester (C-11), **B.**Megaritolactonic acid (C-10), **Γ.**Megaritodilactone (C-10) και **Δ.**Megaritolactonol (C-9)

Με προσεκτική παρατήρηση των ανωτέρων χημικών δομών γίνεται κατανοητό ότι με διάνοιξη και επανασχηματισμό του λακτονικού δακτυλίου είναι δυνατή η αλληλομετατροπή των τεσσάρων μορίων έχοντας ως βιοσυνθετικό πρόδρομο το μόριο της ελευρωπαΐνης όπως περιγράφεται στο σχήμα 5.17.

Από βιβλιογραφικά δεδομένα, προτείνεται ότι από το μόριο της ελευρωπαΐνης υπό την δράση του ενζύμου β-γλυκοζιδάση προκύπτουν οι ενδιάμεσες δομές (II) – (IV) συζευγμένες με το μόριο της υδροξυτυροσόλης^[130].

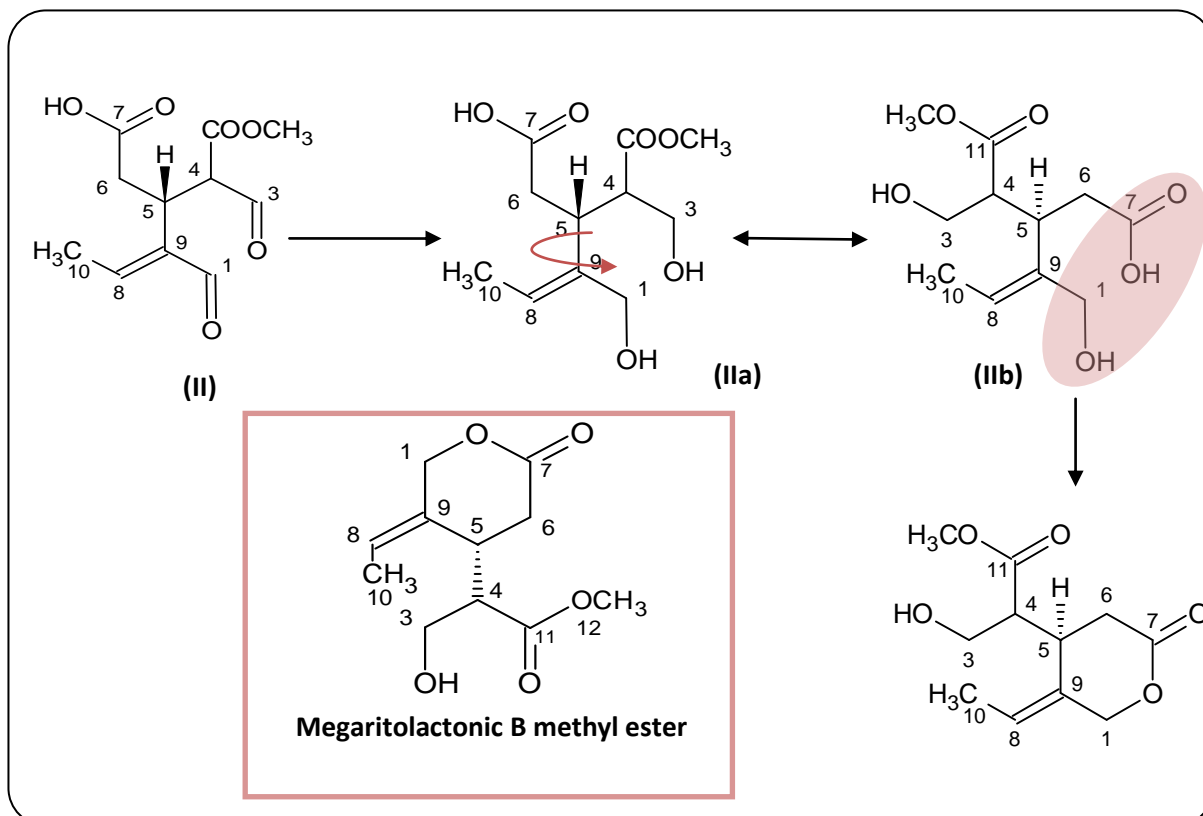
Εάν ωστόσο υδρολυθεί ο εστερικός δεσμός, προς απομάκρυνση της υδροξυτυροσόλης, και διανοιχθεί ο δεδμός μεταξύ του άνθρακα 1 και του γειτονικού οξυγόνου, προκύπτει η ενδιάμεση μορφή (I). Από αυτήν σχηματίζονται στα επόμενα τρία βήματα τρεις ενδιάμεσες μορφές με 11 (I), 10 (III) και 9 (IV) άτομα άνθρακα αντιστοίχως. Οι δομές αυτές αποτελούν βιοσυνθετικά πρόδρομα των τεσσάρων νέων φυσικών προϊόντων.

Κάθε ένα από τα τρία μονοπάτια περιγράφεται αναλυτικά ακολούθως όπως εμείς προτείνουμε.



Εικόνα 5.18

1. Όταν η ισορροπία ενόλης – κετόνης μετατοπισθεί προς την κετονική δομή του μορίου (I), τότε προκύπτει η ενδιάμεση μορφή (II) με 11 άτομα άνθρακα, η οποία αποτελεί βιοσυνθετικό πρόδρομο του μορίου μεθυλεστέρας του μεγαριτολακτονικού οξέος B.

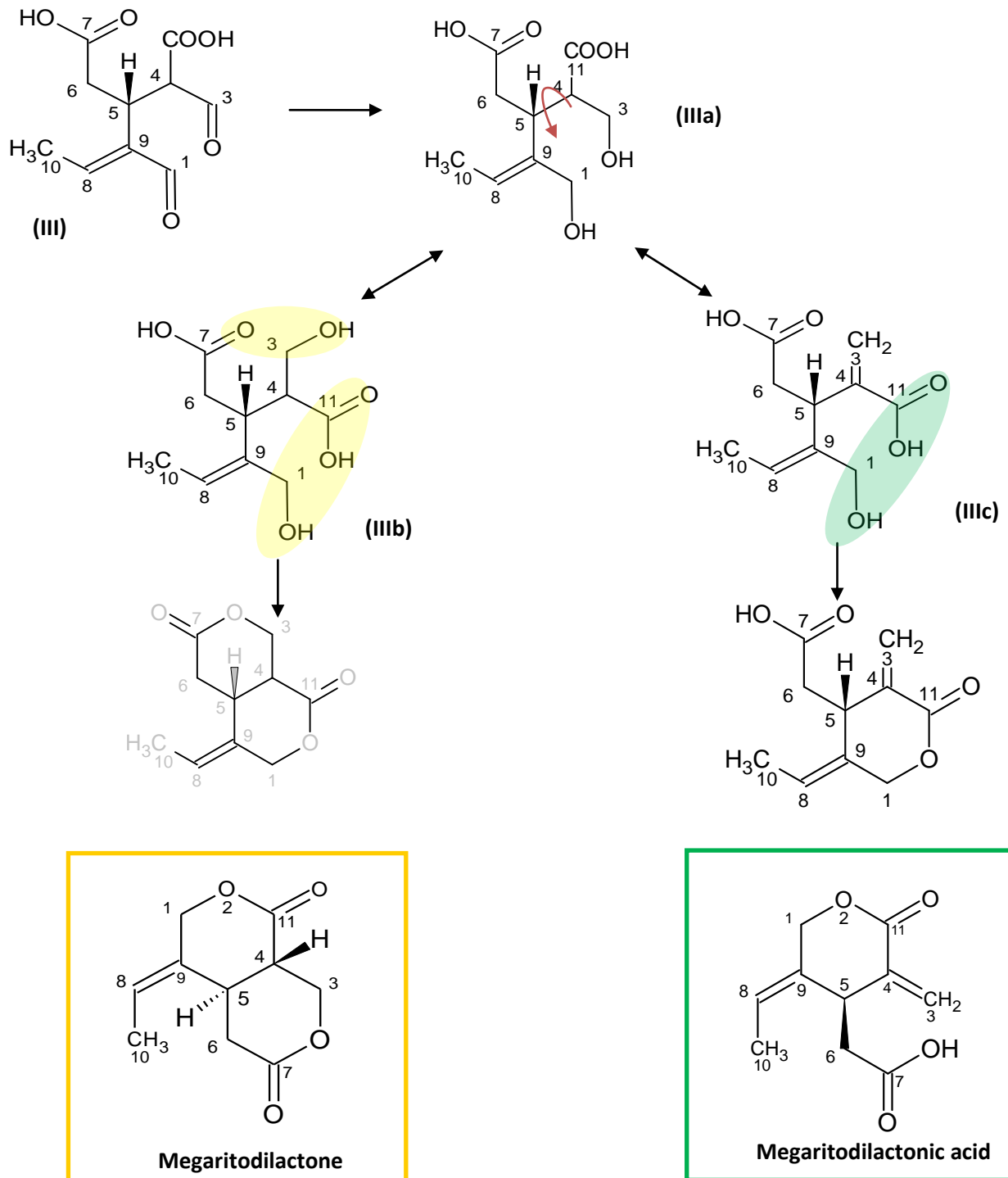


Εικόνα 5.19 Πορεία σχηματισμού του μεταβολίτη μεθυλεστέρας του μεγαριτολακτονικού οξέος B

Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 5.19, από την δομή (II) με αναγωγή των καρβονυλικών ανθράκων 1 και 3 προκύπτει η δομή (IIa). Μέσω περιστροφής 180° περί τον δεσμό C5-C9 σχηματίζεται η δομή (IIb). Τέλος ο μεταβολίτης μεθυλεστέρας του μεγαριτολακτονικού οξέος B προκύπτει έπειτα από εστεροποίηση της υδροξυλομάδας 1 με την καρβοξυλομάδα στην θέση 7.

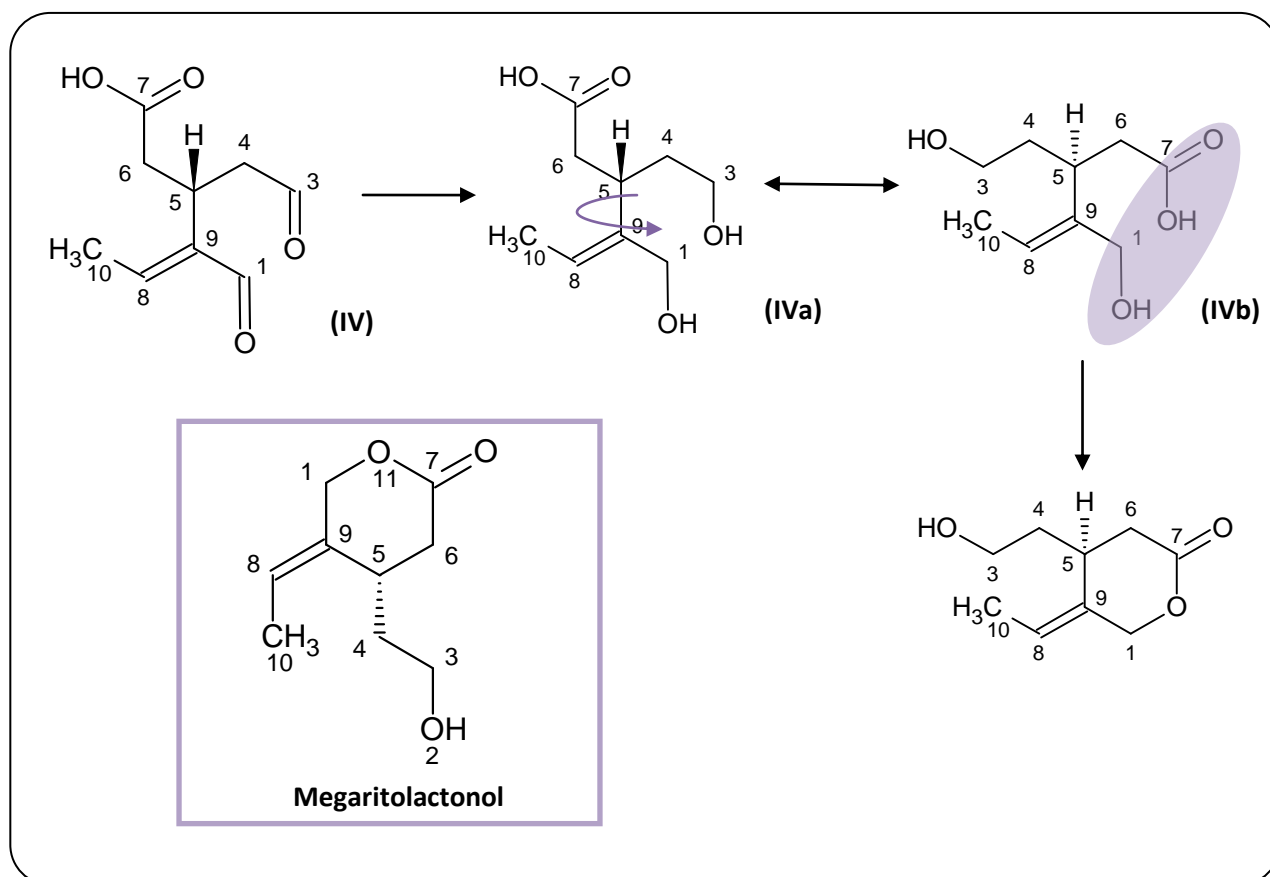
2. Με υδρόλυση του εστερικού δεσμού στην θέση 12 της δομής (II), προκύπτει η ενδιάμεση μορφή (III) με 10 άτομα άνθρακα. Αυτή αποτελεί βιοσυνθετικό πρόδρομο των μορίων μεγαριτολακτονικό οξύ και μεγαριτοδιλακτόνη. Μετά από αναγωγή στις θέσεις 1 και 3 προκύπτει η δομή (IIIa) όπως φαίνεται στην εικόνα 5.18. Όταν το μόριο περιστραφεί κατά 180° περί του δεσμού C5-C4 (IIIb) καθίσταται δυνατή η εστεροποίηση των υδροξυλομάδων 1 και 3 με τις καρβοξυλομάδες 11 και 7 αντίστοιχα προς σχηματισμό του μεταβολίτη μεγαριτοδιλακτόνη. Επιπλέον μετά από περιστροφή όμοια με την προαναφερθείσα και αναγωγή του άνθρακα 3 προκύπτει η

ενδιάμεση δομή (IIIc), από την οποία μετά από εστεροποίηση στις θέσεις 1 και 11 προκύπτει ο μεταβολίτης μεγαριτοδιλакτονικό οξύ.



Εικόνα 5.18 Πορεία σχηματισμού των μεταβολιτών μεγαριτοδιλакτόνη και μεγαριτολακτονικό οξύ

3. Τέλος με αποκαρβοξυλίωση στην θέση 4 λαμβάνεται η ενδιάμεση μορφή (IV) με 9 άτομα άνθρακα η οποία προτείνεται ως βιοσυνθετικό προδρομο του μορίου μεγαριτολακτονόλη.



Εικόνα 5.19 Πορεία σχηματισμού του μεταβολίτη μεγαριτολακτονόλη

Έπειτα από αναγωγή στις θέσεις 1 και 3 προκύπτει η ενδιάμεση δομή (IVa). Περιστροφή 180° περί του δεσμού C5-C9 οδηγεί στην δομή (IVb) καθιστώντας δυνατή την εστεροποίηση μεταξύ των θέσεων 1 και 7 οδηγεί στο φυσικό προϊόν μεγαριτολακτονόλη.

Μέσω των παραπάνω βιοσυνθετικών σχημάτων αποδεικνύεται ότι η στεreoχημεία των τεσσάρων νέων μορίων – μεθυλεστέρας του μεγαριτολακτονικού οξέος B, μεγαριτολακτονικό οξύ, μεγαριτοδολακτόνη και μεγαριτολακτονόλη – είναι αντίστοιχα η (4S,5R), (5R), (4S,5R) και (5S). Το κομβικό σημείο για την επιβεβαίωση των βιοσυνθετικών σχημάτων αποτελεί η γεωμετρία του διπλού δεσμού στην θέση C8-C9, η οποία διαπιστώθηκε με πείραμα NOESY (παράγραφος 5.4.4.1) ενδεικτικά για το μόριο της μεγαριτολακτονόλης. Στο πείραμα αυτό αποδεικνύεται η θέση του μεθυλίου στον διπλό δεσμό καθώς παρατηρείται η συσχέτιση του σήματος του

μεθυλίου (CH_3 -10) με το σήμα του πρωτονίου στην θέση 5 και όχι με το σήμα των πρωτονίων της θέσης 1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΠΕΝΤΕ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

Στην δεύτερη ενότητα έγινε η ανάπτυξη μεθοδολογίας με την χρήση της τεχνικής NMR προκειμένου να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση πέντε σημαντικών μεταβολιτών της ελιάς. Αυτοί ήταν οι υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη, 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης και ελευρωπαΐνη.

Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με εξαιρετική γραμμικότητα με την χρήση φασματοσκοπίας NMR τόσο μίας και δύο διαστάσεων. Ο λόγος για τον οποίο κατασκευάστηκαν και οι δύο τύποι καμπύλης αναφοράς, είναι οι σημαντικοί περιορισμοί που προκύπτουν από την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων με την φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης.

6.1 Εισαγωγή

Η ελιά – τόσο ο καρπός της όσο και το έλαιο της – περιέχει σημαντικές ποσότητες υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης, είτε ελεύθερες είτε συζευγμένες υπό την μορφή άλλων παραγώγων όπως είναι η ελευρωπαΐνη. Από την υδρόλυση του τελευταίου μορίου προκύπτει υδροξυτυροσόλη και 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη. Από την υδρόλυση άλλων παραγώγων όπως ο λιγκστροσίδη, ο οποίος βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες, προκύπτει τυροσόλη.

Τα πέντε συστατικά, όπως έχει παρατεθεί σε προηγούμενες παραγράφους, παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις και στο σύνολο τους παρέχουν προστασία στον ανθρώπινο οργανισμό έναντι διαφόρων παθήσεων. Αποτελούν έτσι χαρακτηριστικούς δείκτες που καθορίζουν σε έναν βαθμό την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η ανάπτυξη μίας μεθόδου η οποία να εξασφαλίζει τον άμεσο και ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των πέντε αυτών συστατικών. Αυτό επιτεύχθη στα πλαίσια της παρούσας εργασίας με δύο τρόπους. Αρχικά αναπτύχθηκε μεθοδολογία με την χρήση της τεχνικής NMR μίας διάστασης και στην συνέχεια αναπτύχθηκε μία καινοτόμος στον χώρο των φυσικών προϊόντων, μεθοδολογία με τη χρήση της τεχνικής NMR δύο διαστάσεων.

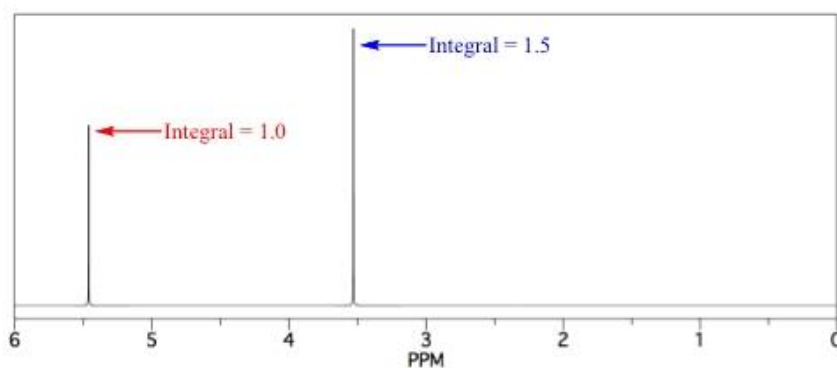
6.2 Οργανολογία

Η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε έναν από τους πέντε μεταβολίτες επετεύχθη με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευή 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy).

6.3 Καμπύλες αναφοράς ουσιών με χρήση NMR 1D

Ακολούθως περιγράφεται η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε ένα από τα πέντε μόρια με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR μίας διάστασης. Για κάθε ένα από αυτά κατασκευάζεται εξίσωση παλινδρόμησης της μορφής $y=ax+\beta$, η οποία συσχετίζει την μάζα (x) σε mg του εκάστοτε αναλύτη με την αναλογία (y) σήματος αναλύτη προς το σήμα του εσωτερικού προτύπου όπως υπολογίζεται με την χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Συγκεκριμένα η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου λαμβάνει την τιμή ένα. Στη συνέχεια η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του αναλύτη αντιστοιχίζεται στην μάζα του αναλύτη προκειμένου να κατασκευαστεί η εξίσωση παλινδρόμησης.



Εικόνα 6.1 Παράδειγμα ποσοτικοποίησης σε φάσμα NMR 1D με I.S.

Έτσι σε ένα άγνωστο διάλυμα υπολογίζοντας την αναλογία αυτή γίνεται άμεσα αντιστοίχιση στην μάζα του αναλύτη μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης.

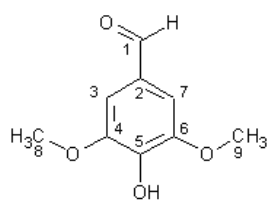
6.3.1 Πρότυπες ουσίες αναφοράς και εσωτερικό πρότυπο

Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς των έξι μορίων απομονώθηκαν εργαστηριακά. Οι πρότυπες ουσίες υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, 4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης και ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδης απομονώθηκαν από τις χρωματογραφικές στήλες 1 και 2, η περιγραφή των

οποίων έγινε στα αντίστοιχα κεφάλαια. Η απομόνωση επετεύχθη με χρωματογραφία στήλης και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Ο βαθμός καθαρότητας εξετάστηκε με την χρήση φασματοσκοπίας NMR. Η πρότυπη ουσία ελευρωπαΐνη είχε απομονωθεί παλαιότερα στο εργαστήριο της Φαρμακογνωσίας.

Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των πέντε μεταβολιτών ήταν η συριγγαλδεΐδη (ή 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde).

Πίνακας 6.1 Φασματοσκοπική περιγραφή συριγγαλδεΐδης σε MeOD

	Άτομο	¹H-NMR (δ ppm, J Hz)
	1	9.75 (1H,s)
	3,7	7.27 (2H,s)
	8,9	3.95 (6H, s)

Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο πρότυπο ήταν η ιδιαίτερα αποθωρακισμένη χημική μετατόπιση του αλδεϋδικού πρωτονίου 1 στα 9.75 ppm. Στην αλδεϋδική περιοχή δεν υπάρχει επικάλυψη από σήματα άλλων συστατικών των δειγμάτων που μελετώνται και έτσι καθίσταται δυνατή η χρήση του σήματος αυτού για την ποσοτικοποίηση κάθε άλλου συστατικού του μείγματος. Το διάλυμα το οποίο παρασκευάστηκε είχε συγκέντρωση 0.5 mg/mL.

6.3.2 Προετοιμασία και λήψη φάσματος NMR

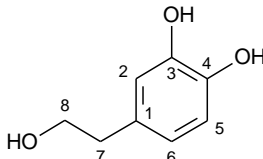
Για την κατασκευή των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς ακολουθείται η ακόλουθη διαδικασία. Από το διάλυμα παρακαταθήκης της πρότυπης ουσίας παραλαμβάνονται κατάλληλες ποσότητες ώστε να προκύψουν τα εκάστοτε σημεία της καμπύλης. Σε κάθε δείγμα γίνεται προσθήκη σταθερής ποσότητας εσωτερικού προτύπου και συγκεκριμένα 0.5 mL διαλύματος συριγγαλδεΐδης συγκέντρωσης 0.5 mg/mL ή 0.25 mg. Η ποσότητα του κάθε δείγματος μαζί με το εσωτερικό πρότυπο συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια γίνεται διάλυση σε 600 μL δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD – d4). Στο δείγμα αυτό πραγματοποιείται λήψη φάσματος NMR με συνολικό αριθμό scans 32. Στη συνέχεια γίνεται ολοκλήρωση των κορυφών. Η κορυφή του εσωτερικού προτύπου λαμβάνει την τιμή ένα και στην συνέχεια υπολογίζεται η αναλογία των υπολοίπων σημάτων του φάσματος συναρτήσει αυτού.

6.3.3 Καμπύλη αναφοράς υδροξυτυροσόλης

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της υδροξυτυροσόλης κατασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 2.75 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη. Από

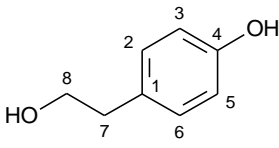
αυτό παραλήφθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να κατασκευαστούν έξι πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν 0.09, 0.18, 0.37, 0.75 και 1.5 mg υδροξυτυροσόλης. Σε κάθε ένα από αυτά γινόταν προσθήκη 0.5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου.

Η υδροξυτυροσόλη διαθέτει μία χαρακτηριστική διπλή – διπλή κορυφή στα 6.55 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6. Βάση αυτής της κορυφής κατασκευάζεται η εξίσωση παλινδρόμησης.

Πίνακας 6.2 Εξίσωση παλινδρόμησης της υδροξυτυροσόλης (1D NMR)	
ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ	
ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΚΟΡΥΦΗΣ	6.55 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.2812x + 0.0043$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.999

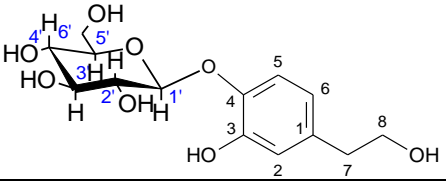
6.3.4 Καμπύλη αναφοράς τυροσόλης

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της τυροσόλης κατασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 2.0 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη. Από αυτό παραλήφθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να κατασκευαστούν πέντε πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν 0.09, 0.15, 0.4, 0.8 και 1.5 mg τυροσόλης. Σε κάθε ένα από αυτά γινόταν προσθήκη 0.5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου. Η κορυφή η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ήταν μία διπλή στα 7.06 ppm η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 3 και 5.

Πίνακας 6.3 Εξίσωση παλινδρόμησης της τυροσόλης (1D NMR)	
ΤΥΡΟΣΟΛΗ	
ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΚΟΡΥΦΗΣ	7.06 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.1852x + 0.0024$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.998

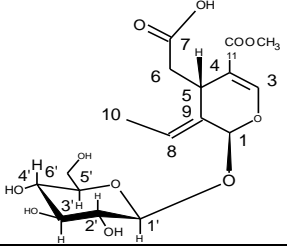
6.3.5 Καμπύλη αναφοράς 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης κατασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 2.0 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη. Από αυτό παραλήφθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να κατασκευαστούν επτά πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν 0.07, 0.14, 0.28, 0.56, 1.125, 2.25 και 4.5 mg 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης. Σε κάθε ένα από αυτά γινόταν προσθήκη 0.5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου. Για την κατασκευή της καμπύλης παλινδρόμησης αξιοποιήθηκε η κορυφή στα 6.69 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6.

Πίνακας 6.4 Εξίσωση παλινδρόμησης του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης (1D NMR)	
4-O-ΓΛΥΚΟΣΙΔΗΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ	
ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΚΟΡΥΦΗΣ	6.69 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.4908x + 0.0228$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	1

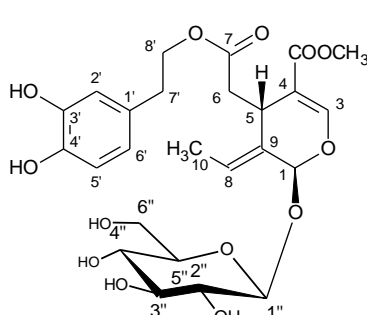
6.3.6 Καμπύλη αναφοράς 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη κατασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1.2 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη. Από αυτό παραλήφθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να κατασκευαστούν τέσσερα πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν 0.07, 0.42, 0.78 και 1.035 mg 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη. Σε κάθε ένα από αυτά γινόταν προσθήκη 0.5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου. Η κορυφή στα 5.99 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1, χρησιμοποιείται για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 6.5 Εξίσωση παλινδρόμησης του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (1D NMR)	
11-ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΤΟΥ ΟΛΕΟΣΙΔΗ	
ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΚΟΡΥΦΗΣ	5.99 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.4042x + 0.0144$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	1

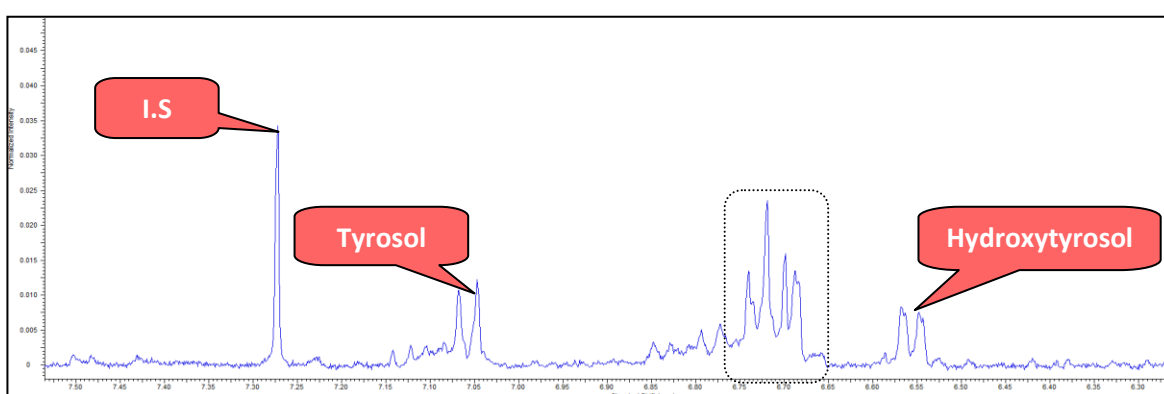
6.3.7 Καμπύλη αναφοράς ελευρωπαΐνης

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς της ελευρωπαΐνης κατασκευάστηκε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 2 mg/mL σε διαλύτη μεθανόλη. Από αυτό παραλήφθηκαν κατάλληλες ποσότητες ώστε να κατασκευαστούν επτά πρότυπα δείγματα τα οποία περιείχαν 0.07, 0.14, 0.28, 0.56, 1.125, 2.25 και 4.5 mg ελευρωπαΐνης. Σε κάθε ένα από αυτά γινόταν προσθήκη 0.5 mL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου. Η κορυφή στα 5.91 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1, χρησιμοποιείται για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 6.6 Εξίσωση παλινδρόμησης της ελευρωπαΐνης (1D NMR)	
ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ	
ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΚΟΡΥΦΗΣ	5.91 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.512x + 0.0904$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.995

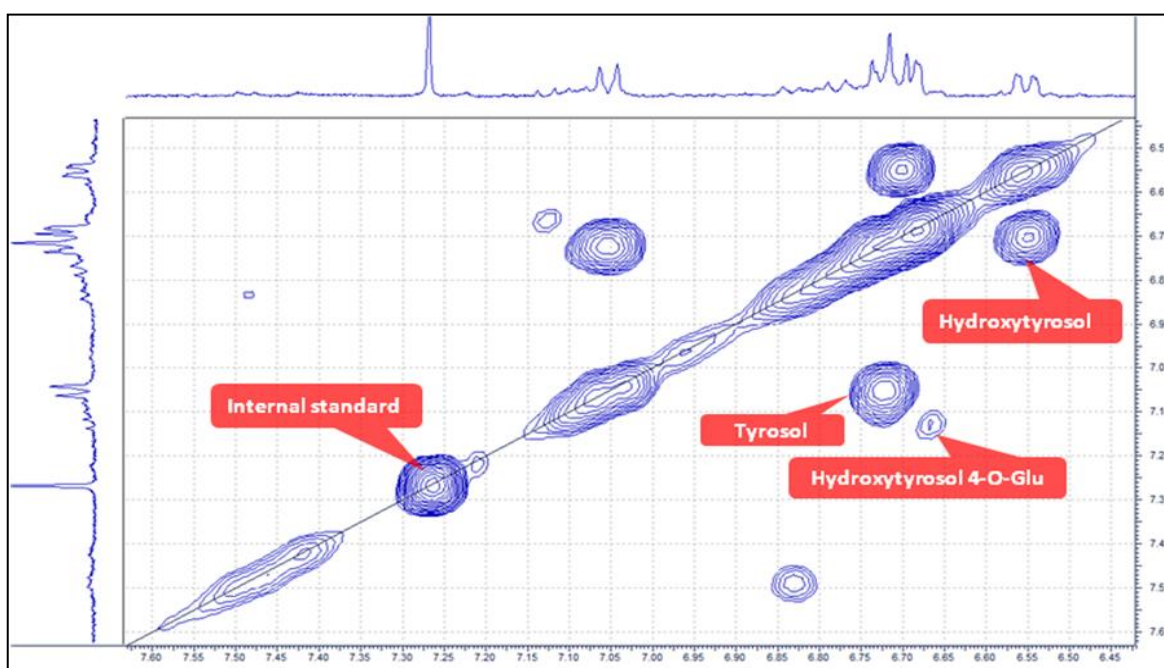
6.4 Καμπύλες αναφοράς ουσιών με χρήση NMR 2D

Στην ενότητα αυτή περιγράφεται η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε ένα από τα πέντε συστατικά που έχουν αναφερθεί με την χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων. Όπως έχει προαναφερθεί, ο λόγος για τον οποίο αναπτύχθηκε μεθοδολογία ποσοτικοποίησης 2D NMR είναι οι επικαλύψεις των κορυφών διαφόρων συστατικών του μείγματος. Ενδεικτικά παρατίθεται το ακόλουθο παράδειγμα. Στο φάσμα πρωτονίου (εικόνα 6.2) διακρίνονται η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη, ωστόσο ο 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης ο οποίος εμφανίζεται στα 6,69 ppm επικαλύπτεται από το πρωτόνιο 2 της υδροξυτυροσόλης.



Εικόνα 6.2 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (MeOD) εκχυλίσματος καρπού επεξεργασμένης ελιάς με I.S.

Εν αντιθέσει με το φάσμα πρωτονίου, στο φάσμα $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY είναι δυνατή η διάκριση των σημάτων και ως εκ τούτου η ποσοτικοποίηση του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης.

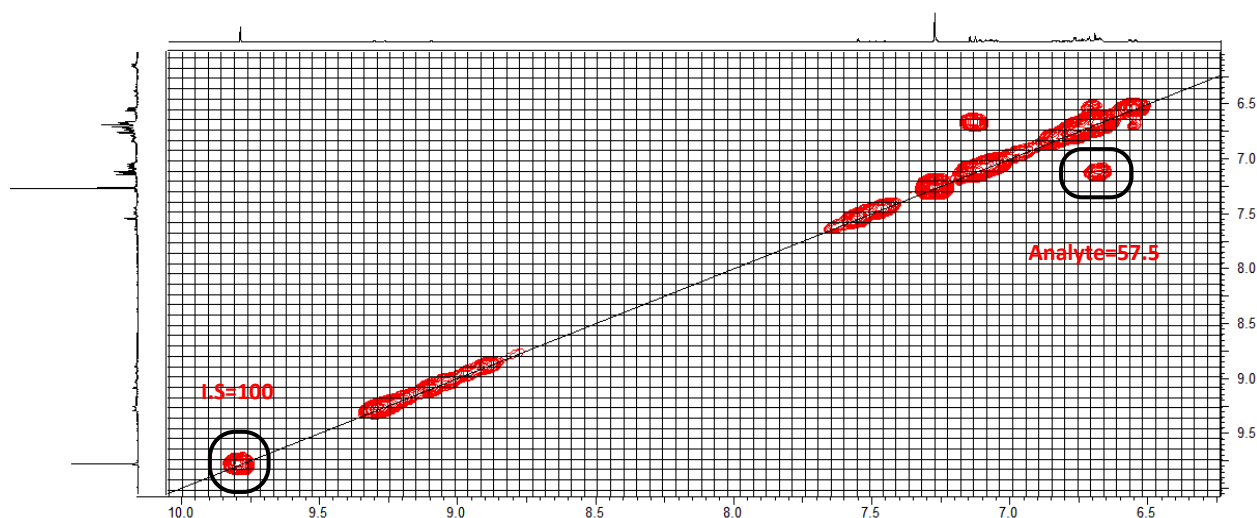


Εικόνα 6.3 Φάσμα $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY (MeOD) εκχυλίσματος καρπού επεξεργασμένης ελιάς με I.S.

Η κατασκευή των εξισώσεων παλινδρόμησης γίνεται όπως και στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR μίας διάστασης, δηλαδή αντιστοιχίζεται ξανά η μάζα του αναλύτη σε αναλογία σήματος αναλύτη προς εσωτερικό πρότυπο. Η διαδικασία που ακολουθείται στην συνέχεια είναι η προαναφερθείσα. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης παλινδρόμησης των πέντε μεταβολιτών με NMR δύο διαστάσεων περιείχαν ακριβώς τις ίδιες συγκεντρώσεις με την περίπτωση της ποσοτικοποίησης με NMR μίας διάστασης. Στις επόμενες παραγράφους παρατίθενται οι καμπύλες παλινδρόμησης για κάθε ένα από τα έξι μόρια.

6.4.1 Πείραμα δύο διαστάσεων

Το πείραμα το οποίο επιλέχθηκε για την ποσοτικοποίηση ήταν ομοπυρηνικής σύζευξης μεταξύ πρωτονίων $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν δέκα λεπτά και ο αριθμός των scans 2. Το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε λόγω του συνολικού χρόνου μέτρησης ο οποίος ήταν ο μικρότερος δυνατός συγκριτικά με αυτόν που απαιτούσαν άλλα πειράματα δύο διαστάσεων. Ουσιαστικά επιτυγχάνεται το επιθυμητό αποτέλεσμα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο.

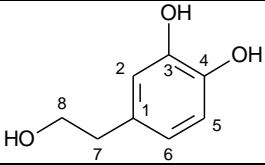


Εικόνα 6.4 Παράδειγμα ποσοτικοποίησης σε φάσμα NMR 2D με I.S.

Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται η κορυφή του εσωτερικού προτύπου πάνω στην διαγώνιο στα 9.75 ppm. Με την χρήση κατάλληλου λογισμικού ολοκληρώνεται η περιοχή του εσωτερικού προτύπου και λαμβάνει την τιμή εκατό. Συναρτήσσει αυτής υπολογίζεται η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής διασταύρωσης του εκάστως αναλύτη.

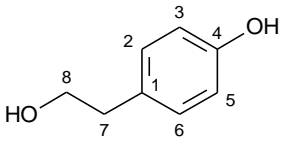
6.4.2 Καμπύλη αναφοράς υδροξυτυροσόλης

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε βάσει της κορυφής διασταύρωσης στα 6.55/6.69 ppm. Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 6 και 2 αντίστοιχα.

Πίνακας 6.8 Εξίσωση παλινδρόμησης της υδροξυτυροσόλης (2D NMR)	
ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ	
ΚΟΡΥΦΗ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ	6.55 ppm / 6.69 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.0068x - 0.0196$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.999

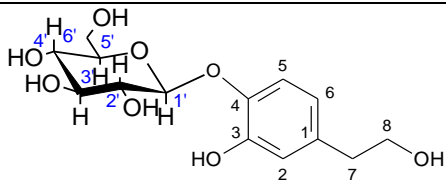
6.4.3 Καμπύλη αναφοράς τυροσόλης

Στην περίπτωση της τυροσόλης η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε βάση της κορυφής διασταύρωσης στα 6.72/7.06 ppm η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 2,6 και 3,5.

Πίνακας 6.9 Εξίσωση παλινδρόμησης της τυροσόλης (2D NMR)	
ΤΥΡΟΣΟΛΗ	
ΚΟΡΥΦΗ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ	6.72 ppm / 7.06 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.0026x + 0.0203$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.999

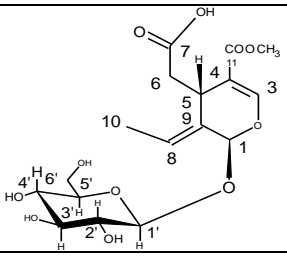
6.4.4 Καμπύλη αναφοράς 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης χρησιμοποιήθηκε η κορυφή διασταύρωσης στα 6.69/7.14 ppm η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 6 και 2.

Πίνακας 6.10 Εξίσωση παλινδρόμησης του 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης (2D NMR)	
4-O-ΓΛΥΚΟΣΙΔΗΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ	
ΚΟΡΥΦΗ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ	6.69 ppm / 7.14 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$\gamma = 0.0116x - 0.0198$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	1

6.4.5 Καμπύλη αναφοράς 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη

Η καμπύλη αναφοράς του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη κατασκευάστηκε βάσει της κορυφής διασταύρωσης στα 1.80/6.15 ppm. Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 10 και 8 αντιστοίχως.

Πίνακας 6.11 Εξίσωση παλινδρόμησης του 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη (2D NMR)	
11-ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΤΟΥ ΟΛΕΟΣΙΔΗ	
ΚΟΡΥΦΗ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ	1.80 ppm / 6.15 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$\gamma = 0.0025x - 0.0184$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.998

6.4.6 Καμπύλη αναφοράς ελευρωπαΐνης

Η καμπύλη αναφοράς της ελευρωπαΐνης κατασκευάστηκε βάσει της κορυφής διασταύρωσης στα 1.66/6.07 ppm. Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στα πρωτόνια των θέσεων 10 και 8 αντιστοίχως.

Πίνακας 6.11 Εξίσωση παλινδρόμησης της ελευρωπαΐνης (2D NMR)	
ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ	
ΚΟΡΥΦΗ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗΣ	1.66 ppm / 6.07 ppm
ΕΞΙΣΩΣΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ	$y = 0.0084x + 0.0454$
ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ r^2	0.999

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΑ ΥΔΑΤΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΚΠΙΚΡΑΝΣΗΣ

Στο κεφάλαιο 5 πραγματοποιήθηκε η περιγραφή της διαδικασίας παραλαβής των υδατικών αποβλήτων που προκύπτουν από την διαδικασία εκπίκρανσης του καρπού της ελιάς. Μέρος αυτών υποβλήθηκε σε ποιοτικό έλεγχο με την χρήση χρωματογραφίας στήλης. Για να επιτευχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυρίαρχων συστατικών που περιέχονταν στα δείγματα αυτά έγινε χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων. Στόχος αυτής της προσπάθειας ήταν αφενός μεν ο υπολογισμός της συνολικής ανάκτησης βιοδραστικών μεταβολιτών από τα απόβλητα της συγκεκριμένης κατεργασίας και ποικιλίας, αφετέρου δε η παρακολούθηση (monitoring) της απελευθέρωσης των συστατικών του καρπού κατά την διάρκεια της διαδικασίας εκπίκρανσης. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης και 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη, σε κάθε ένα από τα έξι δείγματα που προέκυψαν από τις έξι ημέρες της διαδικασίας εκπίκρανσης. Στη συνέχεια έγινε υπολογισμός της ανάκτησης των τεσσάρων βιοδραστικών μεταβολιτών από τη συνολική ποσότητα των αποβλήτων.

7.1 Πειραματική διαδικασία

Από την διαδικασία εκπίκρανσης, η περιγραφή της οποίας πραγματοποιήθηκε στο κεφάλαιο 5, προέκυψαν συνολικά 18 L υδατικών αποβλήτων. Από κάθε μία από τις έξι ημέρες κατά τις οποίες διήρκεσε η διαδικασία προέκυπταν 3 L υδατικού αποβλήτου τα οποία φυλάσσονταν ξεχωριστά. Εν συνεχεία, αυτά υποβλήθηκαν σε προσυγκέντρωση με την χρήση ρητίνης προσυγκέντρωσης και το μεθανολικό έκλουσμα κάθε ημέρας συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Τα έξι δείγματα που προέκυψαν από την διαδικασία αυτή αναλύθηκαν με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR 2D.

7.1.1 Οργανολογία

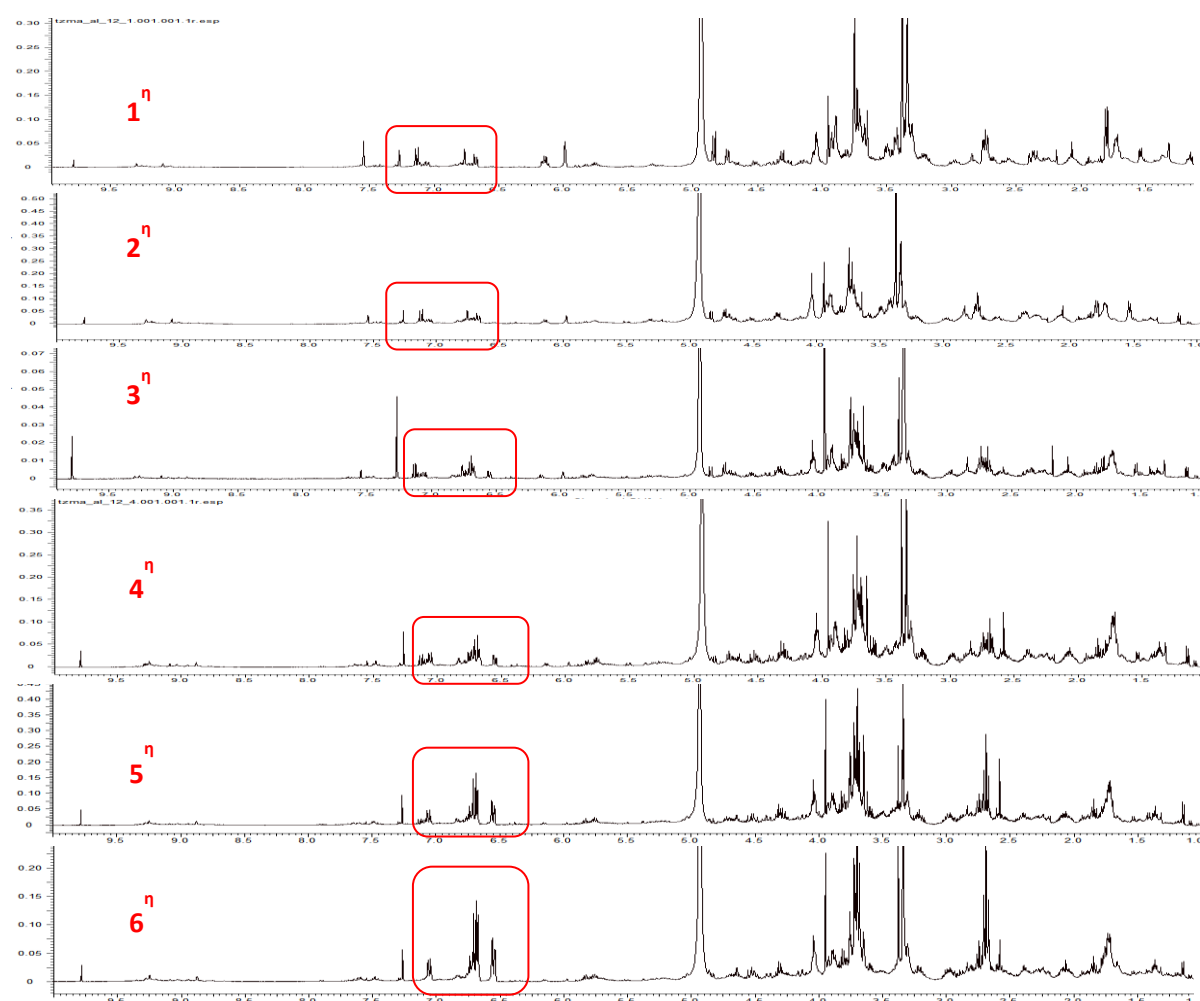
Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευή 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy).

7.1.2 Προετοιμασία δείγματος

Από κάθε ένα από τα έξι δείγματα που προέκυψαν από την διαδικασία εκπίκρυνσης ζυγίστηκαν 20 mg. Σε αυτά προστέθηκαν 0.5 mL εσωτερικού προτύπου συριγγαδεΐδης, συγκέντρωσης 0.5 mg/mL και ακολούθησε συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Στο ξηρό δείγμα προστέθηκαν 600 μ L δευτεριωμένης μεθανόλης και το όλον τοποθετήθηκε σε σωληνάκι NMR για την λήψη φάσματος.

7.1.3 Ανάλυση με NMR

Αρχικά η ανάλυση των έξι δειγμάτων επιχειρήθηκε να πραγματοποιηθεί με την χρήση φασματοσκοπίας NMR μίας διάστασης. Παρά το ότι οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς παρουσίαζαν εξαιρετική γραμμικότητα, δεν ήταν δυνατή η χρήση αυτών για ποσοτικοποίηση σε όλα τα δείγματα λόγω επικάλυψης μεταξύ ορισμένων κορυφών του μείγματος. Στην εικόνα 7.1 παρατίθενται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των έξι ημερών όπου παρατηρούνται στα περισσότερα δείγματα οι επικαλύψεις των κορυφών κυρίως στην αρωματική περιοχή.



Εικόνα 7.1 Προφίλ εκχυλισμάτων των έξι ημερών με $^1\text{H-NMR}$ (MeOD)

7.1.3.1 Ανάλυση με NMR 2D

Στα έξι δείγματα που κατασκευάστηκαν έγινε λήψη φάσματος ^1H - ^1H COSY συνολικής διάρκειας 10 λεπτών με 2 scans. Στην συνέχεια ακολούθησε η επεξεργασία των φασμάτων. Σε κάθε φάσμα πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών του εσωτερικού προτύπου και των αναλυτών. Η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου έλαβε την τιμή 100 και οι υπόλοιπες υπολογίστηκαν βάσει αυτής. Αντικαθιστώντας τις τιμές αυτές στις εξισώσεις παλινδρόμησης (πίνακας 7.1) υπολογίστηκε η ποσότητα του κάθε αναλύτη στα 20 mg εκχυλίσματος και στην συνέχεια έγινε αναγωγή στην συνολική ποσότητα (πίνακας 7.2) που προέκυψε από κάθε ημέρα.

Πίνακας 7.1 Εξισώσεις παλινδρόμησης των τεσσάρων μεταβολιτών (με την χρήση πειράματος COSY)

Μεταβολίτης	Εξίσωση παλινδρόμησης
Υδροξυτυροσόλη	$y = 0.0068x - 0.0196$
Τυροσόλη	$y = 0.0026x + 0.0203$
4-Ο-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης	$y = 0.0116x - 0.0198$
11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη	$y = 0.0025x - 0.0184$

Πίνακας 7.2

Ημέρα	$W_{\text{εκλούσματος}} \text{ (g)}$
1 ^η	0.7927
2 ^η	2.2807
3 ^η	1.4233
4 ^η	1.2183
5 ^η	1.3102
6 ^η	0.7567

Επιπλέον υπολογίστηκε η ανάκτηση κάθε μεταβολίτη από το σύνολο των υδατικών αποβλήτων και εκφράστηκε σε mg / L.

7.2 Αποτελέσματα

7.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων μεταβολιτών

Στα δείγματα που προέκυψαν από τις έξι ημέρες της διαδικασίας εκπίκρυνσης στα οποία έγινε λήψη φάσματος NMR, προσδιορίστηκε η αναλογία μορίων καθενός από τους τέσσερις αναλύτες προς το εσωτερικό πρότυπο. Μέσω των εξισώσεων παλινδρόμησης υπολογίστηκαν οι ποσότητες σε mg των αναλυτών που προέκυπταν από την κάθε ημέρα. Από την άθροιση των ποσοτήτων αυτών βρέθηκε η ποσότητα του μεταβολίτη που προέκυψε από το σύνολο των υγρών αποβλήτων. Τελικά εκφράστηκε η περιεκτικότητα του κάθε μεταβολίτη σε mg ανά L υγρού αποβλήτου.

Τα δεδομένα αυτά παρατίθενται στους πίνακες 7.3 – 7.6.

Πίνακας 7.3 Ποσοτικός προσδιορισμός υδροξυτυροσόλης

Ημέρα	m _{εκ/τος} (mg)	Αναλογία HT : I.S. (6.72, 7.06 ppm)	M (mg)	Ολική ανάκτηση (mg)	Περιεκτικότητα HT ανά μονάδα όγκου (mg/L)
1	792.70	0	0	233.96	12.99
2	2280.70	0	0		
3	1423.30	7.56	2.26		
4	1218.30	60.87	24.02		
5	1310.20	214.64	94.33		
6	756.70	443.45	113.35		

Πίνακας 7.4 Ποσοτικός προσδιορισμός τυροσόλης

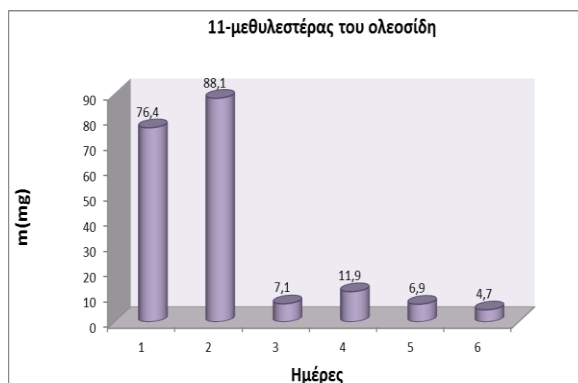
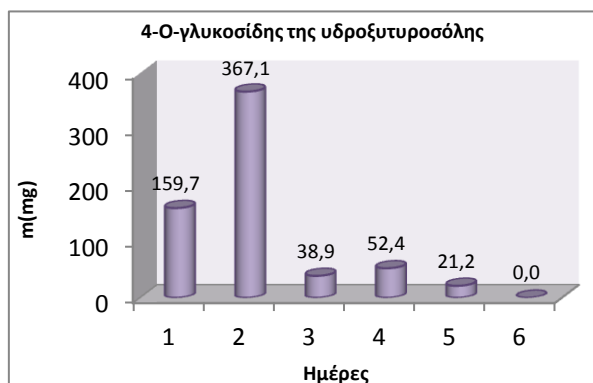
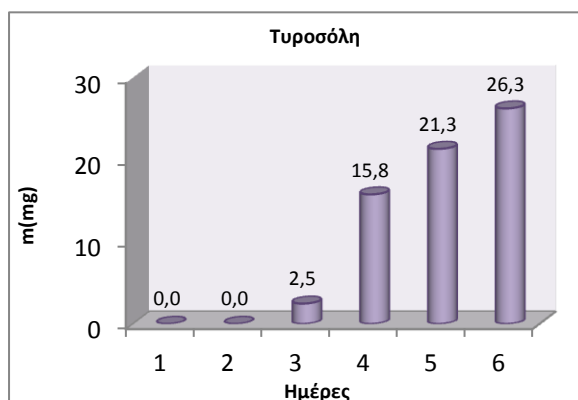
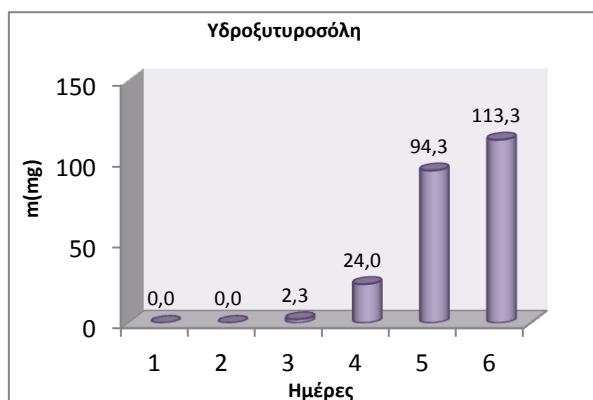
Ημέρα	m _{εκ/τος} (mg)	Αναλογία T : I.S. (6.72, 7.06 ppm)	m(mg)	Ολική ανάκτηση (mg)	Περιεκτικότητα T ανά μονάδα όγκου (mg/L)
1	792.70	-	0	65.84	3.66
2	2280.70	-	0		
3	1423.30	5.54	2.47		
4	1218.30	91.82	15.78		
5	1310.20	117.45	21.33		
6	756.70	259.13	26.26		

Πίνακας 7.5 Ποσοτικός προσδιορισμός 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης

Ημέρα	m _{εκ/τος} (mg)	Αναλογία ΗΤΓ:I.S. (6.68/7.14)	M (mg)	Ολική ανάκτηση(mg)	ΗΤΓ (mg/L wastewater)
1	792.70	348.96	159.66	639.21	35.51
2	2280.70	279.25	367.14		
3	1423.30	48.77	38.85		
4	1218.30	75.87	52.40		
5	1310.20	29.56	21.17		
6	756.70	-	0		

Πίνακας 7.6 Ποσοτικός προσδιορισμός 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη

Ημέρα	m _{εκ/τος} (mg)	Αναλογία Oisd:I.S. (6.15/1.8)	m(mg)	Ολική ανάκτηση (mg)	Περιεκτικότητα Oisd ανά μονάδα όγκου (mg/L)
1	792.70	778.77	76.44	195.06	10.84
2	2280.70	316.3	88.07		
3	1423.30	47.11	7.072		
4	1218.30	85.28	11.87		
5	1310.20	49.59	6.92		
6	756.70	57.02	4.70		



7.2.2 Ανάκτηση των τεσσάρων μεταβολιτών από τα υδατικά απόβλητα

Στον πίνακα 7.7 παρατίθενται τα δεδομένα ανάκτησης των τεσσάρων μεταβολιτών από το σύνολο των υδατικών αποβλήτων.

Πίνακας 7.7 Ανάκτηση των τεσσάρων μεταβολιτών από το σύνολο των υδατικών αποβλήτων

Βάρος καρπών	3kg			
Όγκος υδατικών αποβλήτων	18L			
Βάρος ξηρού εκχυλίσματος (από ρητίνη XAD-4)	7.78 g			
	11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη	Υδροξυτυροσόλη	Τυροσόλη	4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης
Ολική ανάκτηση (mg)	195.06	233.96	65.8	639.2
Περιεκτικότητα σε mg/l	10.8	12.9	3.7	35.5

7.3 Συμπεράσματα

Σε αυτή την πειραματική ενότητα επιτεύχθηκε ο υπολογισμός της ανάκτησης των βιοδραστικών μεταβολιτών που περιέχονται στα υδατικά απόβλητα. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν κινούνται γύρω από δύο βασικούς άξονες. Αυτοί είναι η ποικιλία που μελετήθηκε και ο τρόπος εκπίκρασης.

Η Μεγαρίτικη ποικιλία η οποία μελετήθηκε αποτελεί μία ποικιλία με χαμηλή περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη όπως έχει ήδη αναφερθεί. Αυτό επιβεβαιώθηκε στην παρούσα ενότητα. Δεδομένης της ύπαρξης σακχάρου, αναμένεται η διάχυση του μορίου αυτού στο υδατικό μέσο κατά την εκπίκραση. Βέβαια, εν συνεχεία το μόριο υφίσταται υδρόλυση και τα επίπεδα του μειώνονται. Η ιδιαιτερότητα αυτής της μεθόδου εκπίκρασης είναι η χρήση νερού και όχι κάποιου άλλου ισχυρότερου μέσου. Έτσι, από αυτό συνεπάγεται ότι οι υδρολύσεις που υφίστανται τα βιοδραστικά μόρια του καρπού πραγματοποιούνται σε μικρότερο βαθμό. Ωστόσο στα δείγματα που μελετήθηκαν η ελευρωπαΐνη δεν ήταν καν ανιχνεύσιμη.

Επιπροσθέτως, παρατηρείται ότι η απελευθέρωση των τεσσάρων συστατικών δεν επιτελείται με τον ίδιο τρόπο. Τα δύο γλυκοσινικά συστατικά (4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης και 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη) λόγω του υδρόφιλου

χαρακτήρα τους απελευθερώνονται με ταχύ ρυθμό κυρίως κατά τις δύο πρώτες ημέρες της εμβάπτισης των καρπών στο νερό. Ιδίως την δεύτερη ημέρα όπου πραγματοποιείται η χάραξη του καρπού η διάχυση είναι περισσότερο έντονη. Τις επόμενες τέσσερις ημέρες η απελευθέρωση των δύο αυτών συστατικών συνεχίζεται σε ποσότητες σημαντικά μικρότερες οι οποίες τείνουν να μηδενιστούν.

Αντίθετα, οι μεταβολίτες τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη ακολουθούν αντίθετη τάση. Τις δύο πρώτες ημέρες η απελευθέρωση τους είναι μηδενική ή τουλάχιστον γίνεται σε σημείο που δεν ανιχνεύονται. Αυτό αιτιολογείται, καθώς τα μόρια αυτά παρουσιάζουν περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα από τα προαναφερθέντα. Η διάχυση τους στο μέσο ακολουθεί εκθετική αυξητική τάση φθάνοντας σε μέγιστο την τελευταία ημέρα. Πιθανότατα εάν η διαδικασία της εκπίκρυνσης συνεχιζόταν, τα δύο μόρια θα συνέχιζαν να διαχέονται στο υδατικό μέσο.

Σημαντικό προτέρημα της διαδικασίας εκπίκρυνσης με την αποκλειστική χρήση νερού αποτελεί το γεγονός ότι το απόβλητο που προκύπτει είναι ένα «υδατικό εκχύλισμα» του καρπού της ελιάς. Δεν είναι επιβαρυμένο με καυστικό νάτριο το οποίο αυξάνει το pH των αποβλήτων όπως στην μέθοδο Ισπανικού τύπου, συνεπώς δύναται να επεξεργαστεί περαιτέρω χωρίς να μεσολαβήσουν ενδιάμεσα βήματα εξουδετέρωσης. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος εκπίκρυνσης εμφανίζει χρησιμότητα κυρίως σε ποικιλίες στις οποίες περιέχονται χαμηλά επίπεδα ελευρωπαΐνης, όπως η Μεγαρίτικη. Ως εκ τούτου δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις ποικιλίες και ιδίως σε αυτές που είναι πλούσιες σε ελευρωπαΐνη.

Επιπλέον λόγω του ήπιου χαρακτήρα της μεθόδου, η απελευθέρωση των μεταβολιτών γίνεται σταδιακά. Το γεγονός αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί για να γίνει στοχευμένη παραλαβή κάθε μεταβολίτη από συγκεκριμένο δείγμα αποβλήτου κάποιας ή κάποιων συγκεκριμένων ημερών.

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι το υδατικό απόβλητο που προκύπτει από την διαδικασία εκπίκρυνσης με την χρήση νερού, δύναται να αποτελέσει μία χρήσιμη πηγή φαινολικών συστατικών και σεκοϊριδοειδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΠΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

Σε αυτήν την πειραματική ενότητα πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης και 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη στον καρπό της Μεγαρίτικης ποικιλίας με την χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων. Σκοπός της διαδικασίας αυτής ήταν ο υπολογισμός των επιπέδων των τεσσάρων μεταβολιτών στον καρπό πριν και μετά την διαδικασία εκπίκρασης και η μεταξύ τους σύγκριση. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε τόσο ο φρέσκος όσο και ο επεξεργασμένος καρπός. Η εκχύλιση τους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο που αναφέρεται στην βιβλιογραφία. Για την ποσοτικοποίηση των τεσσάρων συστατικών έγινε χρήση των καμπύλων αναφοράς που κατασκευάστηκαν στο κεφάλαιο 6.

8.1 Πειραματική διαδικασία

8.1.1 Οργανολογία

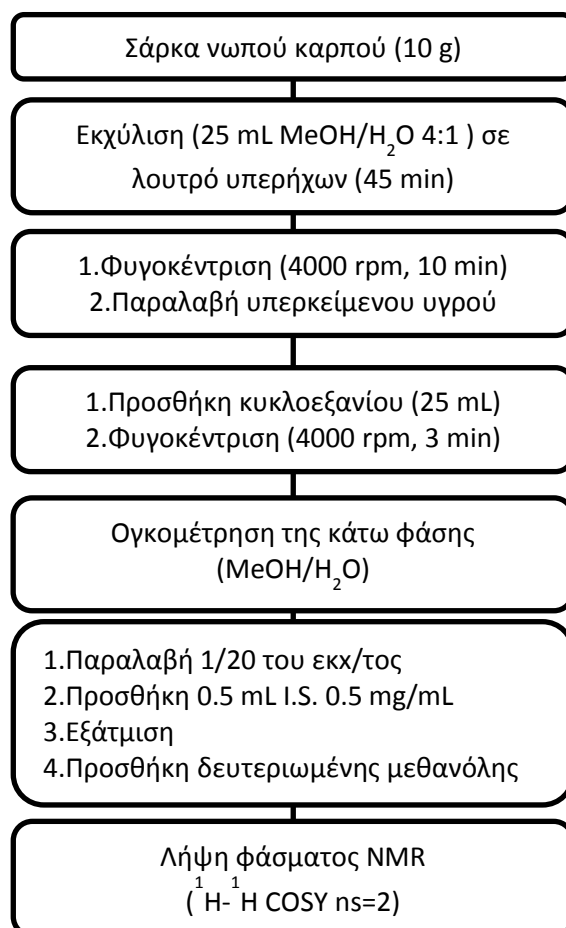
Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευή 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy).

8.1.2 Προετοιμασία δείγματος

Για την ανάλυση των φρέσκων καρπών επιλέχθηκαν να αναλυθούν υγιείς καρποί από το δέντρο της Μεγαρίτικης ποικιλίας η συλλογή των οποίων πραγματοποιήθηκε τον μήνα Νοέμβριο. Όσον αφορά του βρώσιμου καρπού, επιλέχθηκαν καρποί οι οποίοι είχαν παραμείνει στην άλμη για δύο μήνες.

Η διαδικασία εκχύλισης ήταν η ίδια και στις δύο περιπτώσεις. Αρχικά από τους καρπούς αφαιρείται ο πυρήνας και ακολούθως η σάρκα υφίσταται πολτοποίηση. Από τον πολτό που προκύπτει ζυγίζονται 10 g. Εν συνεχεία πραγματοποιείται εκχύλιση με 25 mL μείγματος διαλυτών MeOH/H₂O σε αναλογία 4:1 σε λουτρό υπερήχων για 45 λεπτά. Το μείγμα υφίσταται φυγοκέντριση (4000 rpm για 10 λεπτά) και έπειτα παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό. Σε αυτό γίνεται προσθήκη 25 mL Chex προς απομάκρυνση του ελαίου και το όλον φυγοκεντρείται (4000 rpm για 3 λεπτά). Η φάση

MeOH/H₂O ογκομετρείται και από αυτήν επιλέγεται το 1/20. Σε αυτό γίνεται προσθήκη 0.5 mL διαλύματος συριγγαλδεΐδης 0.5 mg/mL και στην συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Ακολούθως γίνεται προσθήκη 600 μL δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD-d₄) και σε αυτό γίνεται λήψης φάσματος NMR. Η διαδικασία παρατίθεται σχηματικά ακολούθως (εικόνα 9.1).



Εικόνα 8.1

8.1.3 Ανάλυση με NMR

Σε κάθε ένα από τα δείγματα που προέκυψαν έγινε λήψη φάσματος ¹H-¹H COSY συνολικής διάρκειας 10 λεπτών με 2 scans όπως και στην περίπτωση των υδατικών αποβλήτων. Στην συνέχεια ακολούθησε η επεξεργασία των φασμάτων. Σε κάθε φάσμα πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών του εσωτερικού προτύπου και των αναλυτών. Η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου έλαβε την τιμή 100 και οι υπόλοιπες υπολογίστηκαν βάσει αυτής. Αντικαθιστώντας τις τιμές αυτές στις εξισώσεις παλινδρόμησης (πίνακας 8.1) υπολογίστηκε η ποσότητα του κάθε αναλύτη στο 1/20 του εκχυλίσματος και στην συνέχεια έγινε αναγωγή ανά γραμμάριο καρπού και ανά καρπό .

Πίνακας 8.1 Εξισώσεις παλινδρόμησης των τεσσάρων μεταβολιτών (με την χρήση πειράματος COSY)

Μεταβολίτης	Εξίσωση παλινδρόμησης
Υδροξυτυροσώλη	$y = 0.0068x - 0.0196$
Τυροσώλη	$y = 0.0026x + 0.0203$
4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης	$y = 0.0116x - 0.0198$
11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη	$y = 0.0025x - 0.0184$

8.2 Αποτελέσματα

Στα φάσματα COSY που προέκυψαν για κάθε ένα από τα δείγματα καρπού έγινε ολοκλήρωση των κορυφών των τεσσάρων μεταβολιτών σύμφωνα με την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Από τις τιμές ολοκλήρωσης μέσω των εξισώσεων παλινδρόμησης προέκυψε η μάζα των τεσσάρων μεταβολιτών που περιέχεται στο 1/20 του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια η μάζα αυτή ανάγεται ανά γραμμάριο σάρκας και ανά καρπό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 8.2 και 8.3. Το μόριο της ελευρωπαΐνης δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις δύο περιπτώσεις και γ'αυτό το λόγο δεν συμπεριλαμβάνεται η ανάλυση του.

Πίνακας 8.2 Περιεκτικότητα (σε mg/g) των τεσσάρων μεταβολιτών στον καρπό της ελιάς

mg/g σάρκας	Υδροξυτυροσώλη	Τυροσώλη	4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης	11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη
Βρώσιμη ελιά	0,46	0,14	-	-
Φρέσκια ελιά	0,57	0,29	1,34	0,25

Πίνακας 8.3 Περιεκτικότητα (σε mg/καρπό) των τεσσάρων μεταβολιτών στον καρπό της ελιάς

mg/καρπό	Υδροξυτυροσώλη	Τυροσώλη	4-O-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσώλης	11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη
Βρώσιμη ελιά	1,42	0,42	-	-
Φρέσκια ελιά	1,51	0,77	3,59	0,68

8.3 Συμπεράσματα

Στην ενότητα αυτή επετεύχθη ο ποσοτικός προσδιορισμός τεσσάρων σημαντικών μεταβολιτών στον καρπού της ελιάς. Πραγματοποιώντας την ανάλυση αυτή τόσο σε φρέσκο όσο και σε επεξεργασμένο καρπό προέκυψαν ορισμένες αξιοσημείωτες παρατηρήσεις.

Τα επίπεδα των βιοδραστικών φαινολικών αλκοολών υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη είναι χαμηλότερα στον επεξεργασμένο καρπό, ωστόσο η μείωση δεν είναι δραματική, γεγονός το οποίο οφείλεται στην ήπια κατεργασία του καρπού με νερό. Τα επίπεδα της τυροσόλης όπως αναμένεται είναι χαμηλότερα από αυτά της υδροξυτυροσόλης τόσο στην βρώσιμη όσο και στην φρέσκια ελιά. Παρατηρείται επίσης ότι η διαφορά στην ποσότητα της τυροσόλης σε βρώσιμο και φρέσκο καρπό είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στα επίπεδα της υδροξυτυροσόλης. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται σε εμπλουτισμό του βρώσιμου καρπού σε υδροξυτυροσόλη λόγω υδρόλυσης συμπλόκων μορίων όπως γλυκοσίδες κλπ.

Σε αντίθεση με τα δύο προαναφερθέντα συστατικά, οι μεταβολίτες 4-Ο-γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης και 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στον φρέσκο καρπό αλλά δεν είναι ανιχνεύσιμα στον επεξεργασμένο καρπό. Το γεγονός αυτό αιτιολογείται από τον υδρόφιλο χαρακτήρα των συστατικών αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΕΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΜΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟ ΚΑΡΠΟ ΤΗΣ ΜΕΓΑΡΙΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

Το αρχικό κίνητρο αυτής της εργασίας ήταν η ασυνήθιστα χαμηλή περιεκτικότητα του επεξεργασμένου καρπού της Μεγαρίτικης ποικιλίας σε ελευρωπαΐνη συγκριτικά με καρπούς άλλων ποικιλιών, οι οποίες έχουν υποστεί την ίδια κατεργασία. Στα πλαίσια αυτά μελετήθηκε η σύσταση του επεξεργασμένου καρπού και των υδατικών αποβλήτων που προκύπτουν από την επεξεργασία αυτού. Σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκε ελευρωπαΐνη. Δεν ανιχνεύθηκε ωστόσο ούτε στον μη επεξεργασμένο καρπό, η συγκομιδή του οποίου έγινε τον μήνα Νοέμβριο (Κεφάλαιο 8) ή τουλάχιστον τα επίπεδα ήταν χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου δηλαδή 0.15 mg/g.

Προκειμένου να αποδοθεί μία ερμηνεία στο φαινόμενο και να διευκρινιστεί εάν αυτό οφείλεται στη μη δυνατότητα της ποικιλίας να βιοσυνθέσει την ελευρωπαΐνη ή σε πρόωρο καταβολισμό του μορίου πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη. Αναλύθηκαν καρποί ελιάς της εν λόγω ποικιλίας η συγκομιδή των οποίων έγινε σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά την διάρκεια της ωρίμανσης.

9.1 Πειραματική διαδικασία

9.1.1 Οργανολογία

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευή 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δύο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy).

9.1.2 Προετοιμασία δείγματος

Για την ανάλυση των φρέσκων καρπών επιλέχθηκαν να αναλυθούν υγιείς καρποί από το δέντρο της Μεγαρίτικης ποικιλίας η συλλογή των οποίων πραγματοποιήθηκε σε τρεις χρονικές περιόδους. Αυτές ήταν : (α) Αύγουστος, ο καρπός βρίσκεται στο στάδιο της αύξησης και δεν έχει αποκτήσει τις οριστικές του διαστάσεις (fully unripe),

(β) Οκτώβριος όπου ο καρπός βρίσκεται στο στάδιο της πράσινης ωρίμανσης (green mature), και (γ) Νοέμβριος όπου ο καρπός βρίσκεται σε στάδιο αλλαγής χρώματος (half green half violet color).

Το πρωτόκολλο εκχύλισης είναι το ίδιο με αυτό που παρατίθεται στην παράγραφο 8.1.2

9.1.3 Ανάλυση με NMR

Σε κάθε ένα από τα δείγματα που προέκυψαν έγινε λήψη φασμάτων πρωτονίου και $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY συνολικής διάρκειας 10 λεπτών με 2 scans όπως και στην περίπτωση των υδατικών αποβλήτων. Η ποσοτικοποίηση της ελευρωπαΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας μία διάστασης. Η επιλογή αυτή έγινε διότι η κορυφή που χρησιμοποιείται για την ανάλυση δεν επικαλύπτεται από άλλα συστατικά του μίγματος όπως αποδεικνύεται από πειράματα δύο διαστάσεων. Ως εκ τούτου η ανάλυση καθίσταται πιο απλή και πιο γρήγορη.

Στην συνέχεια ακολούθησε η επεξεργασία των φασμάτων. Σε κάθε φάσμα πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών του εσωτερικού προτύπου και του αναλύτη. Η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου έλαβε την τιμή 1 και οι υπόλοιπες υπολογίστηκαν βάσει αυτής. Αντικαθιστώντας τις τιμές αυτές στην εξίσωση παλινδρόμησης (πίνακας 9.1) υπολογίστηκε η ποσότητα του αναλύτη στο 1/20 του εκχυλίσματος και στην συνέχεια έγινε αναγωγή ανά γραμμάριο καρπού.

Πίνακας 9.1 Εξίσωση παλινδρόμησης ελευρωπαΐνης (με την χρήση φασματοσκοπίας μίας διάστασης)

Μεταβολίτης	Εξίσωση παλινδρόμησης
Ελευρωπαΐνη	$y = 0.512x + 0.0904$
Χημική μετατόπιση κορυφής	5.91 ppm

9.2 Αποτελέσματα

Στα φάσματα που προέκυψαν για κάθε ένα από τα δείγματα καρπού έγινε ολοκλήρωση της κορυφής της ελευρωπαΐνης σύμφωνα με την διαδικασία που έχει

ήδη περιγραφεί. Από τις τιμές ολοκλήρωσης μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης προέκυψε η μάζα της ελευρωπαΐνης που περιέχεται στο 1/20 του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια η μάζα αυτή ανάγεται ανά γραμμάριο σάρκας και ανά καρπό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 9.2.

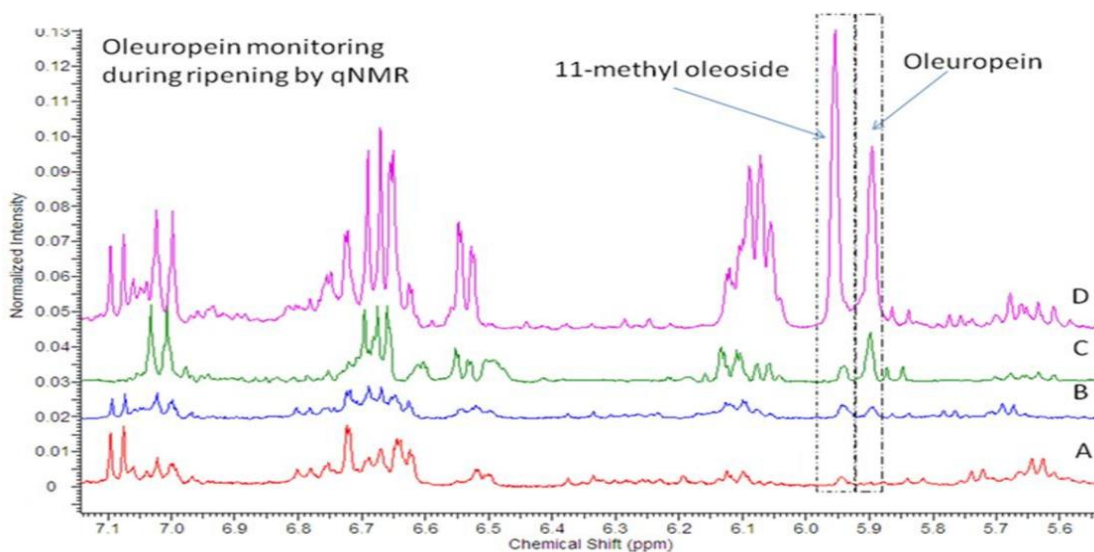
Πίνακας 9.2 Συγκέντρωση της ελευρωπαΐνης στον φρέσκο καρπό τριών σταδίων ωρίμανσης

Μήνας/Στάδιο ωρίμανσης	Συγκέντρωση ελευρωπαΐνης (mg/g)
Αύγουστος (fully unripe)	3.2
Οκτώβριος (green mature)	0.55
Νοέμβριος (half green half violet color, mature)	<0.15

9.3 Συμπεράσματα

Κατά την παρακολούθηση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης στα τρία διαφορετικά στάδια της ωρίμανσης του καρπού της Μεγαρίτικης ποικιλίας παρατηρήθηκε βαθμιαία μείωση έως την τελική μη ανίχνευση του μορίου. Στην εικόνα 9.1 παρατίθεται μία σειρά φασμάτων πρωτονίου από εκχυλίσματα μη επεξεργασμένων καρπών, στα οποία μπορεί να γίνει παρατήρηση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης μέσω της χαρακτηριστικής κορυφής της στα 5.91 ppm. Επιπλέον για λόγους σύγκρισης παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου εκχυλίσματος καρπών της ποικιλίας Θρούμπα Θάσου (D), η συγκομιδή της οποίας έχει πραγματοποιηθεί μέσα Νοεμβρίου. Το αντίστοιχο φάσμα πρωτονίου για την Μεγαρίτικη ποικιλία (A) διαθέτει ένα τελείως διαφορετικό προφίλ. Παρά το ότι η συγκομιδή των καρπών έχει συντελεστεί στο ίδιο χρονικό σημείο δηλαδή τον μήνα Νοέμβριο, οι καρποί της ποικιλίας Θρούμπα Θάσου διαθέτουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα (9.1 mg/mL) συγκριτικά με τα αντίστοιχα της Μεγαρίτικης τα οποία δεν είναι καν ανιχνεύσιμα (<0.15 mg/mL). Όταν ωστόσο ο καρπός μελετήθηκε αρκετά νωρίτερα στο στάδιο που ήταν πλήρως άωρος (Αύγουστος), τα επίπεδα της ελευρωπαΐνης ήταν υψηλότερα (3.2 mg/g) από αυτά του Νοεμβρίου. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ποικιλία δύναται να βιοσυνθέσει τον μεταβολίτη αυτό και τα παρατηρούμενα χαμηλά επίπεδα δεν οφείλονται σε κάποια δυσλειτουργία του μεταβολισμού του φυτού. Τέλος, κατά την ανάλυση του καρπού στις αρχές του Οκτωβρίου, τα επίπεδα

της ελευρωπαΐνης είχαν ήδη μειωθεί σημαντικά (0.55 mg/g) υποδεικνύοντας έναν πρώιμο καταβολισμό του μορίου.



Εικόνα 9.1 Παρακολούθηση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης σε φρέσκους καρπούς της Μεγαρίτικης ποικιλίας με $^1\text{H-NMR}$ σε MeOD. (A) Μεγαρίτικη (Νοέμβριος), (B) Μεγαρίτικη (Οκτώβριος), (Γ) Μεγαρίτικη (Αύγουστος), (D) Θρούμπα Θάσου (Νοέμβριος). (1) Ελευρωπαΐνη, (2) 11-μεθυλεστέρας του Ολεοσίδη.

Σε αντίθεση με την ελευρωπαΐνη, ο 11-μεθυλεστέρας του Ολεοσίδη – ο οποίος παρατηρείται στο φάσμα πρωτονίου στα 5.95 ppm – περιέχεται στον καρπό την περίοδο συγκομιδής (Νοέμβριος) σε μεγαλύτερες ποσότητες από την ελευρωπαΐνη γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι στην Μεγαρίτικη ποικιλία, η υδρόλυση του μορίου της ελευρωπαΐνης ενεργοποιείται πολύ νωρίτερα συγκριτικά με άλλες ποικιλίες. Ωστόσο αυτή η πρώιμη διάσπαση της ελευρωπαΐνης έχει ευεργετικές συνέπειες όσον αφορά την μετέπειτα χρήση του προϊόντος. Δεδομένου ότι το συστατικό το οποίο προσδίδει την πικρή γεύση στον καρπό, δηλαδή η ελευρωπαΐνη, απομακρύνεται εύκολα στην Μεγαρίτικη ποικιλία μέσω αυτής της φυσικής διεργασίας, η διαδικασία της εκτίκρανσης καθίσταται ως εκ τούτου ιδιαίτερα απλή. Το συστατικό που προσδίδει πλέον πικρή γεύση και πρέπει να απομακρυνθεί είναι ο 11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη, ο οποίος είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτός και η απομάκρυνση του από την σάρκα της ελιάς συντελείται με απλή επαφή του καρπού με νερό. Συνεπώς η Μεγαρίτικη ποικιλία χάρη σε αυτήν την ιδιαιτερότητα που την χαρακτηρίζει, παρουσιάζει επιπλέον τεχνολογικό ενδιαφέρον εφόσον για την εμπορική της αξιοποίηση ως επιτραπέζιος ελαιόκαρπος είναι απαραίτητη μόνο η κατεργασία με νερό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

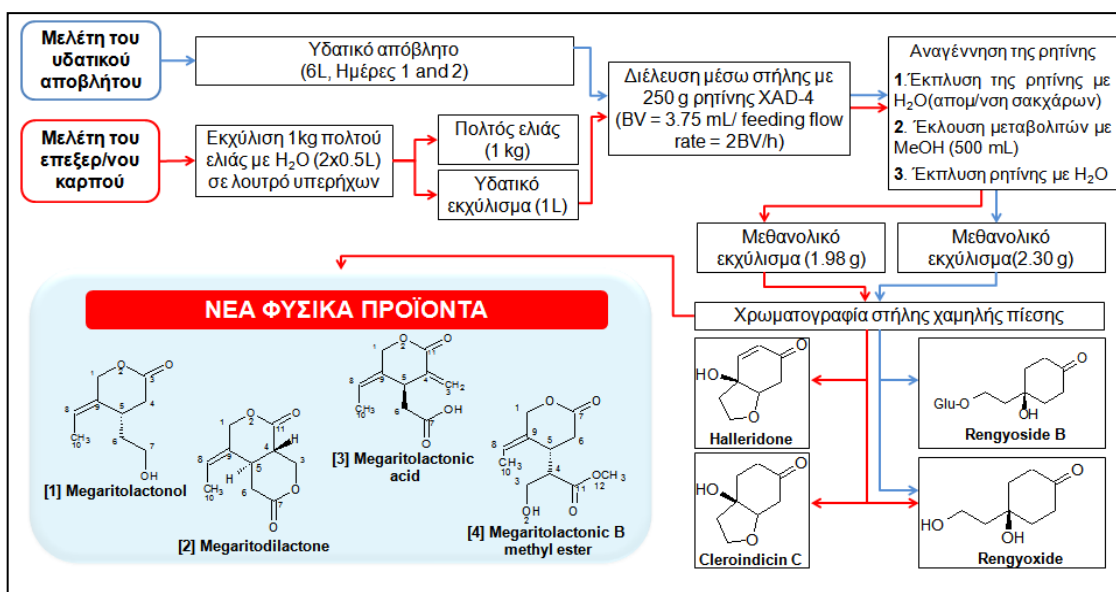
Μετά την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης προέκυψε μία σειρά αξιοσημείωτων συμπερασμάτων τα οποία παρατίθενται στη συνέχεια μαζί με μία συνοπτική αναφορά της μελέτης που προηγήθηκε.

Αρχικό έναυσμα για την μελέτη της Μεγαρίτικης ποικιλίας ήταν η ιδιαίτερα χαμηλή περιεκτικότητα του καρπού σε ελευρωπαΐνη, συγκριτικά με καρπούς άλλων ποικιλιών οι οποίοι στο ίδιο στάδιο ωρίμανσης και έχοντας υποστεί τον ίδιο τρόπο επεξεργασίας διέθεταν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες αυτής. Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη κάποιας μεταβολικής διαφοροποίησης θεωρήθηκε αναγκαία η μελέτη της χημικής σύστασης της εν λόγω ποικιλίας. Τα προϊόντα της ποικιλίας τα οποία επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν ο φρέσκος (μη επεξεργασμένος) και ο βρώσιμος (επεξεργασμένος) καρπός καθώς επίσης και τα υδατικά απόβλητα τα οποία προέκυψαν από την διαδικασία εκπίκρανσης. Για τον πλήρη έλεγχο όλων των συνθηκών και παραμέτρων που επηρεάζουν την τελική σύσταση του καρπού, έγινε εργαστηριακή παρασκευή επιτραπέζιου ελαιόκαρπου με την αποκλειστική χρήση νερού ως μέσο εκπίκρανσης.

Η μελέτη των προϊόντων της Μεγαρίτικης ποικιλίας, κινήθηκε γύρω από δύο επιμέρους άξονες, την ποιοτική μελέτη των μεταβολιτών της ποικιλίας βάσει χρωματογραφικών τεχνικών και τον ποσοτικό προσδιορισμό κυρίαρχων συστατικών κάνοντας χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Η μελέτη της χημικής σύστασης συντελέστηκε στον βρώσιμο καρπό και στα υδατικά απόβλητα. Από αυτήν την διαδικασία προέκυψαν γνωστοί για το είδος αυτό μεταβολίτες όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, ο 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης, ο 11-μεθυλεστέρας του Ολεοσίδη, μεταβολίτες οι οποίοι ανιχνεύονται για πρώτη φορά σε βρώσιμο καρπό όπως το “halleridone”, μεταβολίτες οι οποίοι απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το γένος *Olea* όπως οι “rengyoxide”, “rengyoside B” και “cleroindicin C”, και τέλος μεταβολίτες οι οποίοι αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και είναι οι “Megaritolactone”, “Megaritolactonol”, “Megaritolactonic acid” και “Megaritolactonic B methyl ester”.

Στην εικόνα 10.1 είναι δυνατή η παρατήρηση των μεταβολιτών που προέκυψαν κατά την μελέτη της χημικής σύστασης του υδατικού αποβλήτου και του βρώσιμου καρπού.



Εικόνα 10.1

Οι νέοι για το είδος μεταβολίτες “halleridone”, “cleroindicin C”, “rengyoside B” και “rengyoxide” με χαρακτηριστικό σκελετό C6-C2 βιοσυντίθενται, όπως και οι γνωστοί για την ελιά μεταβολίτες τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγα αυτών, μέσω της οδού του σικιμικού οξέος.

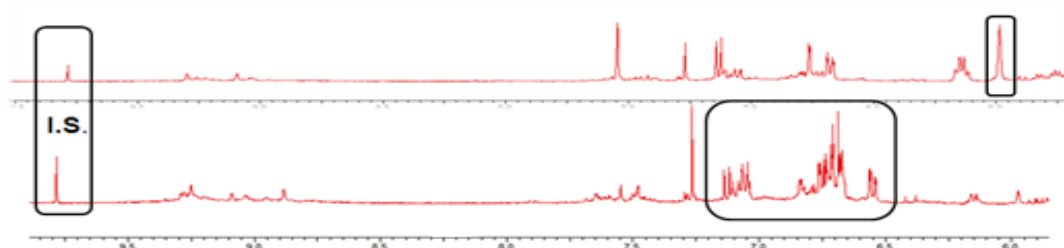
Ωστόσο η βιοσυνθετική προέλευση των τεσσάρων νέων φυσικών προϊόντων, τα οποία βρέθηκαν στον καρπό της ελιάς και ανήκουν στην χημική κατηγορία των λακτονών, δεν είναι ιδιαίτερα προφανής. Έπειτα από λεπτομερή ωστόσο παρατήρηση προκύπτει ότι τα μόρια αυτά αποτελούν προϊόντα διάσπασης του μορίου της ελευρωπαΐνης.

Το επόμενο σκέλος αυτής της εργασίας αποτέλεσε η ποσοτική μελέτη των κυρίαρχων μεταβολιτών. Αρχικός στόχος ήταν η ποσοτικοποίηση βιοδραστικών μεταβολιτών στα υδατικά απόβλητα που προκύπτουν από την διαδικασία εκπίκρυνσης. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης με φασματοσκοπία NMR για πέντε συστατικά. Έτσι κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για την υδροξυτυροσόλη, τη τυροσόλη, την ελευρωπαΐνη, τον 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και τον 4-O-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης με πολύ καλή γραμμικότητα.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στην παρακολούθηση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ποικιλία δύναται να βιοσυνθέσει το μόριο. Την περίοδο συνήθους

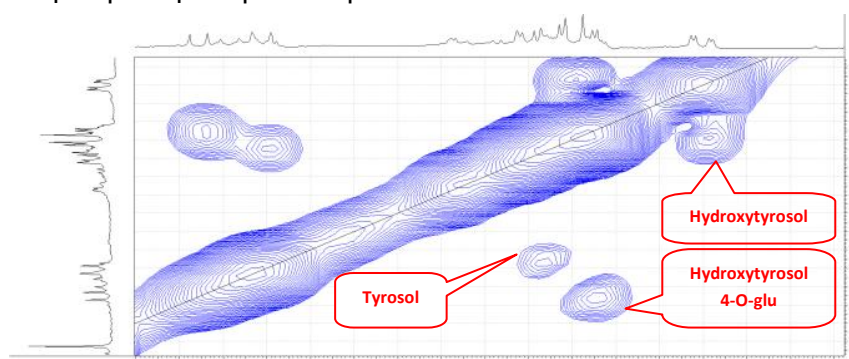
συγκομιδής (Νοέμβριος) τα επίπεδα στον καρπό της Μεγαρίτικης ποικιλίας ήταν σημαντικά μικρότερα συγκριτικά με άλλες επιτραπέζιες ποικιλίες. Ωστόσο μετά από ανάλυση του καρπού τον Αύγουστο και τον Οκτώβριο αποδείχθηκε η ύπαρξη του μορίου σε μεγαλύτερη ποσότητα από αυτή του Νοεμβρίου, ενώ διαπιστώθηκε πρόωμη ενεργοποίηση της διαδικασίας υδρόλυσης εφόσον τα επίπεδα είχαν ήδη μειωθεί στο 1/6 μέχρι τον Οκτώβρη.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με $^1\text{H-NMR}$ εφαρμόστηκε με επιτυχία στα δείγματα του φρέσκου καρπού, ωστόσο η ανάλυση των υδατικών αποβλήτων κατέστη αδύνατη λόγω πολυπλοκότητας και ως εκ τούτου επικάλυψης μεταξύ των κορυφών των διαφόρων συστατικών στα φάσματα NMR.



Εικόνα 10.2 Στο πρώτο φάσμα (επάνω) είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση, η κορυφή είναι ευδιάκριτη. Στο δεύτερο φάσμα (κάτω) συνυπάρχουν η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και ο γλυκοσίδης της υδροξυτυροσόλης, οι κορυφές επικαλύπτονται και η ποσοτικοποίηση είναι αδύνατη.

Η πολυπλοκότητα των δειγμάτων έθεσε μία σοβαρή πρόκληση στην ανάλυση με $^1\text{H-NMR}$. Η αυξημένη διακριτική ικανότητα της τεχνικής NMR δύο διαστάσεων επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών τα οποία δεν ήταν δυνατό λόγω επικαλύψεων να ποσοτικοποιηθούν σε φάσμα μίας διάστασης. Οι καμπύλες αναφοράς με την χρήση πειράματος COSY διάρκειας μόλις 10 λεπτών παρουσίασαν εξαιρετική γραμμικότητα και για τα πέντε συστατικά. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην βελτιωμένη διακριτική ικανότητα.



Εικόνα 10.3 Διάκριση των συστατικών που επικαλύπτονται στο φάσμα της εικ. 10.2

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στα υδατικά απόβλητα εκπίκρανσης και από την ανάλυση προέκυψε ότι αυτά αποτελούν μία αξιόλογη πηγή σεκοϊριδοειδών και φαινολικών συστατικών καθώς ανακτήθηκαν σημαντικές ποσότητες υδροξυτυροσόλης,

τυροσόλης, 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης. Ο ήπιος τρόπος εκπίκρυνσης ο οποίος χρησιμοποιήθηκε καθιστά τα υδατικά απόβλητα ευκολότερα διαχειρίσιμα συγκριτικά με άλλες ισχυρότερες μεθόδους εκπίκρυνσης. Επιπλέον λόγω του ήπιου χαρακτήρα της εκπίκρυνσης η διάχυση και υδρόλυση των βιοδραστικών συστατικών του καρπού πραγματοποιούνται με μικρότερο ρυθμό, γεγονός το οποίο δίνει πρόσθετη αξία στο απόβλητο αυτό.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιπλέον στον φρέσκο και τον επεξεργασμένο καρπό της Μεγαρίτικης ποικιλίας. Ο φρέσκος καρπός διέθετε σημαντικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, 11-μεθυλεστέρα του ολεοσίδη και 4-Ο-γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης. Ο επεξεργασμένος καρπός εξακολουθούσε να διαθέτει υψηλά επίπεδα υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης ωστόσο δεν ανιχνεύθηκαν οι άλλοι δύο υδρόφιλοι μεταβολίτες λόγω απώλειας στο νερό.

Εν κατακλείδι, η ελευρωπαΐνη – ο σημαντικότερος μεταβολίτης του καρπού της ελιάς (ιδίως του μη επεξεργασμένου) – στον καρπό της Μεγαρίτικης ποικιλίας υδρολύεται πρώιμα, γεγονός το οποίο συμπίπτει με την απομόνωση των νέων λακτονών οι οποίες αποτελούν προϊόντα διάσπασης αυτής. Η Μεγαρίτικη ποικιλία χάρη στην ιδιαιτερότητα των καρπών της να χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ελευρωπαΐνης αποκτά ένα επιπλέον πλεονέκτημα συγκριτικά με άλλες ποικιλίες, στην ευκολία με την οποία θα καταστεί βρώσιμη. Η απλή χρήση νερού για την εκπίκρυνση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα και η συντήρηση σε άλμη αρκούν για την παραγωγή ενός άμεσα και εμπορικά αξιοποιήσιμου προϊόντος. Η διαχείριση του όγκου των υδατικών αποβλήτων που προκύπτουν δεν αποτελεί πρόβλημα καθώς αποτελούν απλά ένα υδατικό εκχύλισμα του καρπού. Έτσι μετά από προσυγκέντρωση με την χρήση ρητίνης XAD-4 είναι δυνατό να αποτελέσουν μία πλούσια πηγή βιοδραστικών συστατικών άμεσα αξιοποιήσιμη.

Τέλος όσον αφορά την χρήση της αναλυτικής τεχνικής αξίζει να τονιστεί ότι η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων αποτελεί μία εξαιρετική και ελκυστική εναλλακτική λύση στην περίπτωση που τα πειράματα μίας διάστασης καθίστανται ανεπαρκή.

Βιβλιογραφία

- [1] Zoidou E., Melliou E., Gikas E., Tzarbopoulos A., Magiatis, P., Skaltsounis A.-L., Identification of throuba thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein (2010). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (1), pp. 46-50.
- [2] Karkoula E., Skantzari A., Melliou, E., Magiatis P., Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative ¹H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (47), (2012), pp. 696-703.
- [3] Omar S.H., Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78 (2010), pp. 133–154.
- [4] <http://www.amberlyst.com/literature/us/xad4>
- [5] Endo, K.; Hikino, H. *Can. J. Chem.* 1984, 62, 2011–2014
- [6] Su, Y.-Q., Shen, Y.H.Tang, J., Zhang, W.-D. Chemical constituents of *Incarvillea mairei* var. *Grandiflora*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2010 46 (1) , pp. 109-111
- [7] Shen, Y.H., Lu, T., Tang, J., Liu, R.H., Li, H.L., Zhang, W.D. Chemical constituents from *Incarvillea delavayi*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (2), (2010), pp. 305-307.
- [8] Tan, Qin-Gang; Cai, Xiang-Hai; Tao, Feng; Du, Zhi-Zhi; Luo, Xiao-Dong. A new cyclooxygenase inhibitor from *incarvillea arguta*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, Chemical Sciences*, 2009 , vol. 64, p. 439 – 442
- [9] Tian, Jun; Zhao, Qin-Shi; Zhang, Hong-Jie; Lin, Zhong-Wen; Sun, Han-Dong. New Cleroindicins from *Clerodendrum indicum*. *Journal of Natural Products*, 1997, vol. 60, # 8 p. 766 – 769.
- [10] Abdullahi, Hawa; Nyandat, E.; Galeffi, C.; Messana, I.; Nicoletti, M.; Bettolo, G. B. Marini. CYCLOHEXANOLS OF *HALLERIA LUCIDA*. *Phytochemistry (Elsevier)*, 1986 , vol. 25, # 12 p. 2821 – 2824
- [11] BretQn, J. L.; Llera, L. D.; Navarro, E.; Trujillo, J. Photochemical synthesis of halleridone, hallerone, renyol and derivatives. *Tetrahedron* 1987, 43, 4447
- [12] Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier Science B.V (1995) Vol16 586.
- [13] Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K. Phenolic glycosides from *Markhamia stipulata*. *Phytochemistry* 59, 557-563 (2002).
- [14] Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K. Phenolic glycosides from *Barnettia kerrii*. *Phytochemistry* 59, 565-570 (2002).
- [15] M. Guiso et al., Iridoid and phenylpropanoid glucosides from *Tecoma carpensis*. *Phytochemistry*, 45(1), 1997, pp. 193-194.
- [16] Hase T., Kawamoto, Y., Ohtani, K., Koaie, R., Yamasaki, K., and Pichaensoonthon, C. (1995) Cyclohexylethanoids and related glucosides from *Millingtonia hortensis*. *Phytochemistry* 39(1): 235-241.
- [17] Seya K, et al. Structures of renygosides A, B and C, three glucosides of *Forsythia suspensa* fruits. *Phytochemistry* . 1989;28:1495.
- [18] A Soriente, A Della Rocca, G Sodano, A Trincone (1997) Chemoenzymatic synthesis of Rengyoside -A, -B, Isorengyoside and synthesis of their aglycones *Tetrahedron* 53: 13. 4693-4702
- [19] Romero C, Brenes M, Garcia P and Garrido A, Hydroxytyrosol 4-β-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J Agric Food Chem* 50:3835–3839 (2002).
- [20] José G. Fernández-Bolaños, Óscar López, M. Ángeles López-García and Azucena Marset (2012). *Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives, Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/biological-properties-of-hydroxytyrosol-and-its-derivatives>
- [21] R. Ghanbari, F. Anwar, K.M. Alkharfy, A.-H. Gilani, N. Saari Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) – a review *International Journal of Molecule Science*, 13 (2012), pp. 3291–3340

- [22] Boskou, D. History and characteristics of the olive tree (1996) Olive Oil Chemistry and Technology. Boskou, D., Ed.; Am. Oil Chem. Soc. Press: Champaign, IL, USA
- [23] Ryan, D., Robards, K. Phenolic compounds in olives (1998) *Analyst*, 123 (5), pp. 31R-44R.
- [24] Bull, William E., "The Olive Industry of Spain," *Economic Geography*, Vol. 12, No. 2 (Apr., 1936), 141
- [25] <http://www.internationaloliveoil.org/projects/paginas/Section-a.htm>
- [26] Μπαλατσούρας, Γ. Η επιτραπέζια ελιά. Αθήνα. (1992)
- [27] <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8267.pdf>
- [28] Bianchi G., Lipids and phenols in table olives, *European Journal of Lipid Science and Technology* 105 (2003), pp. 229–242.
- [29] Gooch, E. Ten plus one things you may not know about olive. *Epikouria Magazine*, Fall/Spring 2005. Available online: <http://www.epikouria.com/issue1/10+1-things-olives.php>
- [30] Soler-Rivas, C.; Epsin, J.C.; Wichers, H.J. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1013–1023
- [31] FAOSTAT Crops Processed Data for Olive Oil; FAO: Rome, Italy, 2009. [32] Fernández, A.G.; Díez, M.J.F.; Adams, M.R. *Table Olives: Production and Processing*; Chapman & Hall: London, UK, 1997; p. 478.
- [33] Παπαναστασίου Δ. (1966), Σύγχρονη ελαιουργεία. Η τεχνολογία των ελαίων. Εκδοτικός οίκος Σπύρος Σπύρου και Υιός, Αθήνα.
- [34] N. Frega, G. Lercker: La composizione dei lipidi della drupadi olivo durante la maturazione. *Agrochimica* 29 (1985) 300-307.
- [35] N. Frega, F. Bocci, G. Lercker: Composizione lipidica della drupa di olivo di due cultivars della zona del Chianti in funzione della maturazione. Nota I: trigliceridi ed acidi grassi. *Riv. Ita. Sost. Grasse* 68 (1991) 69-74.
- [36] Guinda Angeles, Mirela Rada, Teresa Delgado, Pilar Gutierrez-Adanez and Jose Maria Castellano Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010) 58 (17), 9685-9691.
- [37] M.J. Amiot, A. Fleuriet, J.J. Machiex: Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 823-826.
- [38] M.J. Amiot, A. Fleuriet, J.J. Macheix: Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* 28 (1989) 67-69.
- [39] E. Ragazzi, G. Veronese, A. Guiotto: Demetiloleuropeina, nuovo glucoside isolato da olive mature. *Ann. Chim.* 63 (1973) 13-27.
- [40] R. Limiroli, R. Consonni, A. Ranalli, G. Bianchi L. Zetta: ¹H NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *Olea europaea*: similarities and differences. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2040-2048.
- [41] L. Di Giovacchino: Olive harvesting and olive oil extraction. In *Olive oil. Chemistry and Technology*. Ed. D. Boskou AOCs Press, Champaign, IL (USA) 1996, 12-51.
- [42] S.H. Omar Oleuropein in olive and its pharmacological effects *Scientia Pharmaceutica*, 78 (2010), pp. 133–154
- [43] Bianco, A., Scalzo, R.L., Scarpati, M.L. Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone (1993) *Phytochemistry*, 32 (2), pp. 455-457.
- [44] Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E. Phenolic Compounds in Different Olive Varieties (1998) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1), pp. 32-35.
- [45] International Olive Oil Council (IOOC): Unified Qualitative Standard Applying to table olives in international trade. Madrid 1982.
- [46] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996R1263:EL:HTML>
- [47] Fooks Richard, (1990). «Το βιβλίο της ελιάς», Εκδόσεις Ψύχαλου Αθήνα.
- [48] CODEX STANDARD FOR TABLE OLIVES CODEX STAN 66-1981
- [49] P. Goupy, A. Fleuriet, M.J. Amiot, J.J. Macheix: Enzymatic browning, oleuropein content, and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 92-95.
- [50] M. Brenes Balbuena, P. Garcia Garcia, A. Garrido Fernandez: Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1192-1196.
- [51] V. Marsilio, C. Campestre, L. Lanza: Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry* 74 (2001) 55-60.
- [52] Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. Pentacyclic triterpenes acids in olives. *Phytochemistry* 1994, 37, 205–207.

- [53] Montilla M.P., A. Gil, M.C. Navarro, M.I. Jiménez, A. García-Granados, A. Parra, M.M. Cabo, Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*, *Planta Med.* 69 (2003) 472–474.
- [54] Allouche Yosra; Gabriel Beltran; Jose Juan Gaforio; Marino Uceda; Marva D. Mesa. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology* (2010) 48 2885–2890.
- [55] Martín, A.M., De La Puerta Vázquez, R., Fernández-Arche, A., et al. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res* 40(3) 295-302 (2006).
- [56] Marquez-Martin, A.; De La Puerta, R; Fernandez-Arche, A.; Ruiz-Gutierrez, V.; Yaqoob, P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine.* (2007) 36:211–7.
- [57] De Pablos LM, dos Santos MF, Montero E, Garcia-Granados A, Parra A, Osuna A. Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular, Campus de Fuentenueva, Edif. Mecenas, Universidad de Granada, Granada, Spain 2010 Aug;107(3):601-4.
- [58] Xu, H.X., Zeng, P.Q., Wan, M., Sim, K.Y., 1996. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.* 59, 643–645.
- [59] Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L.A., 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* 64, 97–109.
- [60] Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomares, E. R.; Lupianez, J. A.; Cascante, M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway *Cancer Lett.* 2009, 273, 44– 54
- [61] Martín R., J. Carvalho, E. Ibeas, M. Hernández, V. Ruiz-Gutiérrez and M.L. Nieto. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation, *Cancer Res.* 67 (2007), pp. 3741–3751.
- [62] Allouche Yosra; Fernando Warleta; Maria Campos; Cristina Sanchez-Quesada; Marino Uceda; Gabriel Beltran; and Jose Juan Gaforio; Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011) 59 (1), 121-130
- [63] Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, Takamatsu Y, Ito H, Hatano T, Sakagami H, Tokuda H, Nishino H, Sugita D, Shimura S and Yoshida T. (2002). Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry* 59: 315–323.
- [64] Rodriguez-Rodriguez R, Perona JS, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V. Triterpenic compounds from “orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.* 2006; 54:2096–102
- [65] Liu J, Sun H, Duan W, Mu D, Zhang L: Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. *Biol Pharm Bull* 2007, 30:2075-2078.
- [66] Tang XZ, Guan T, Qian YS, et al. Effects of maslinic acid as a novel glycogen phosphorylase inhibitor on blood glucose and hepatic glycogen in mice [J]. *Chin J Nat Med*, 2008. 6(1): 53-56.
- [67] Liu, J.; Sun, H.; Wang, X.; Mu, D.; Liao, H.; Zhang, L. Effects of oleanolic acid and maslinic acid on hyperlipidemia *Drug Dev. Res.* 2007 68 261 266
- [68] V. Marsilio, B. Lanza, C. Campestre, M. De Angelis: Ovendried table olives: textural properties as related to pectic composition. *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1271-1276.
- [69] V. Marsilio, B. Lanza: Effect of lye treatment on the nutritional and microstructural characteristics of table olives (*Olea europaea* L.). *Rev. Esp. Ciencia Tecnologia Alimentos* 35 (1995) 178-190.
- [70] J. Beltran-Heredia, J. Torregrosa, J.R. Dominguez, J. Garcia Aerobic biological treatment of black olive washing wastewaters: effect of an ozonation stage *Proc. Biochem.*, 35 (2000), pp. 1183–1190
- [71] C.I. Piperidou, C.I. Chaidou, C.D. Stalikas, K. Soulti, G.A. Pilidis, C. Balis Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii* *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000), pp. 1941–1948
- [72] M. Kotsou, A. Kyriacou, K. Lasaridi, G. Pilidis Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton's reagent for the processing of green table olive wastewater *Proc. Biochem.*, 39 (11) (2004), pp. 1653–1660

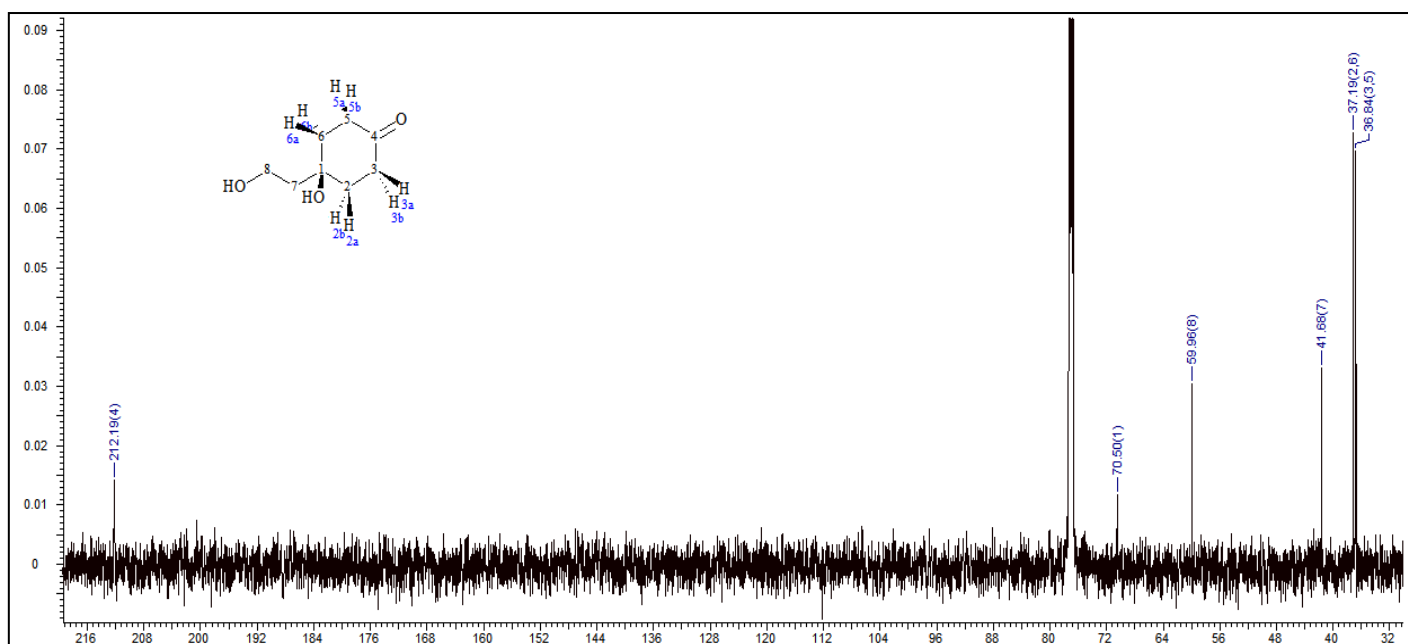
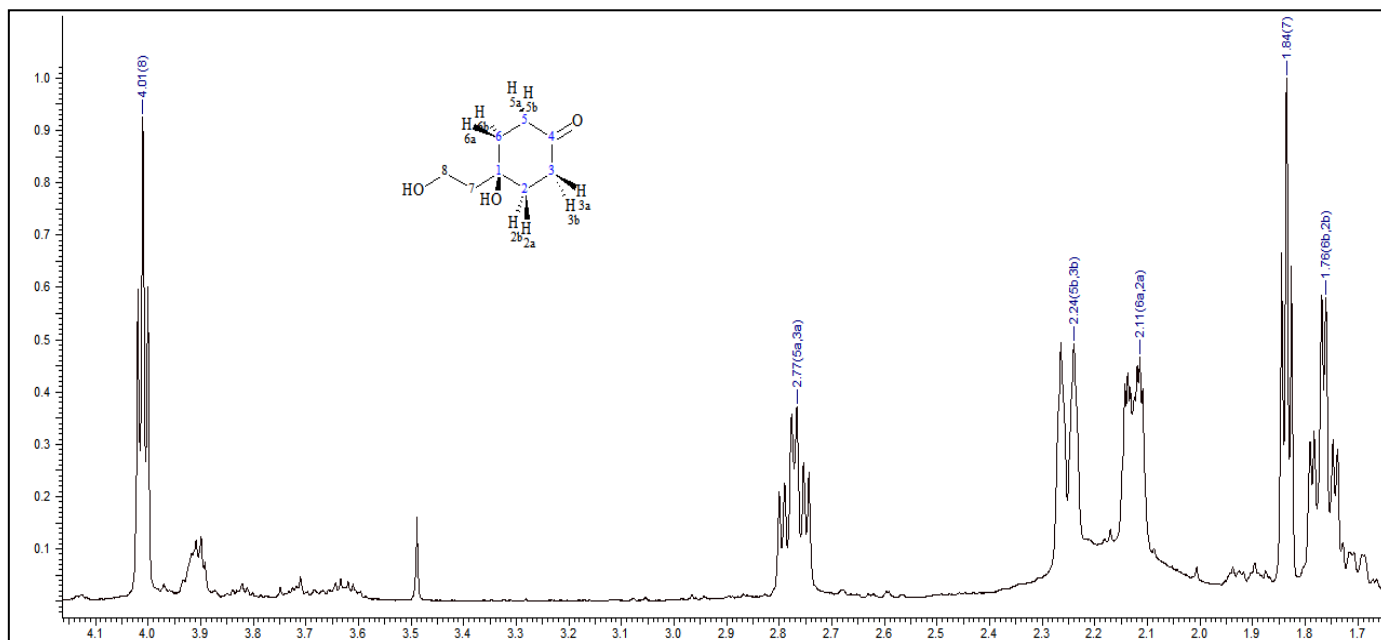
- [73] G.C. Kopsidas Wastewaters from the preparation of table olives *Water Res.*, 26 (5) (1992), pp. 629–631
- [74] G.G. Aggelis, H.N. Gavala, G. Lyberatos Combined and separate aerobic and anaerobic biotreatment of green olive debittering wastewater *J. Agric. Eng. Res.*, 80 (2001), pp. 283–292
- [75] C.S. Parinos, C.D. Stalikas, Th.S. Giannopoulos, G.A. Pilidis Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing *Journal of Hazardous Materials*, Volume 145, Issues 1–2, 25 June 2007, Pages 339–343
- [76] F.J. Rivas, F.J. Beltrán, P. Alvarez, J. Frades, O. Gimeno Joint aerobic biodegradation of wastewater from table olive manufacturing industries and urban wastewater *Bioprocess. Eng.*, 23 (2000), pp. 283–286
- [77] F.J. Rivas, F.J. Beltrán, O. Gimeno Joint treatment of wastewater from table olive processing and urban wastewater. Integrated ozonation—aerobic oxidation *Chem. Eng. Technol.*, 23 (2) (2000), pp. 177–181
- [78] F.J. Rivas, F.J. Beltrán, O. Gimero, P. Alvarez Treatment of brines by combined Fenton's reagent-aerobic biodegradation II. *J. Hazard. Mater.* B96 (2003), pp. 277–290
- [79] F.J. Rivas, F.J. Beltrán, O. Gimero, P. Alvarez Optimization of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines *J. Hazard. Mater.*, B96 (2003), pp. 277–290
- [80] Mohamed Bouaziz, Saloua Lassoued, Zouhaier Bouallagui, Sana Smaoui, Adel Gargoubi, Abdelhafid Dhouib, Sami Sayadi Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 16, Issue 20, 15 October 2008, Pages 9238–9246
- [81] De la Puerta R, Guttierrez VR, Hoult JRS. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 445–449.
- [82] De la Puerta R, Guttierrez VR, Hoult JRS. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 445–449.
- [83] Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 334: 769–778.
- [84] Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2 - overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 2007; 7: 80.
- [85] Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999; 51: 971–974.
- [86] Aziz NH, Farag SF, Mousa LA, Abo-Zaid MA. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios.* 1998; 93: 43–54.
- [87] Fleming HP, Walter WM Jr, Etchells L. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl Microbiol.* 1973; 26: 777–782.
- [88] Furneri PM, Marino A, Saija A, Uccella N, Bisignano G. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 20: 293–296.
- [89] Caturla N, Perez Fons L, Estepa A, Micol V. Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem Phys Lipids.* 2005; 137: 2–17
- [90] Saija A, Uccella N. Olive biophenols: functional effects on human well-being. *Trends Food Sci Technol.* 2001; 11: 357–363.
- [91] Walter WM Jr, Fleming HP, Etchells JL. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl Microbiol.* 1973; 26: 773–776.
- [92] Tassou CC, Nychas GJE, Board RG. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotech Appl Biochem.* 1991; 13: 231–237.
- [93] Tranter HS, Tassou SC, Nychas GJ. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol.* 1993; 74: 253–259
- [94] Tassou CC, Nychas GJE. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in a model food system. *J Food Prot.* 1994; 57: 120–124.
- [95] Tassou CC, Nychas GJE. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Lett Appl Microbiol.* 1995; 20: 120–124.
- [96] Fredrickson, WR, F and S Group, Inc. Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves. U.S. Patent. 2000; 6: 117:884.

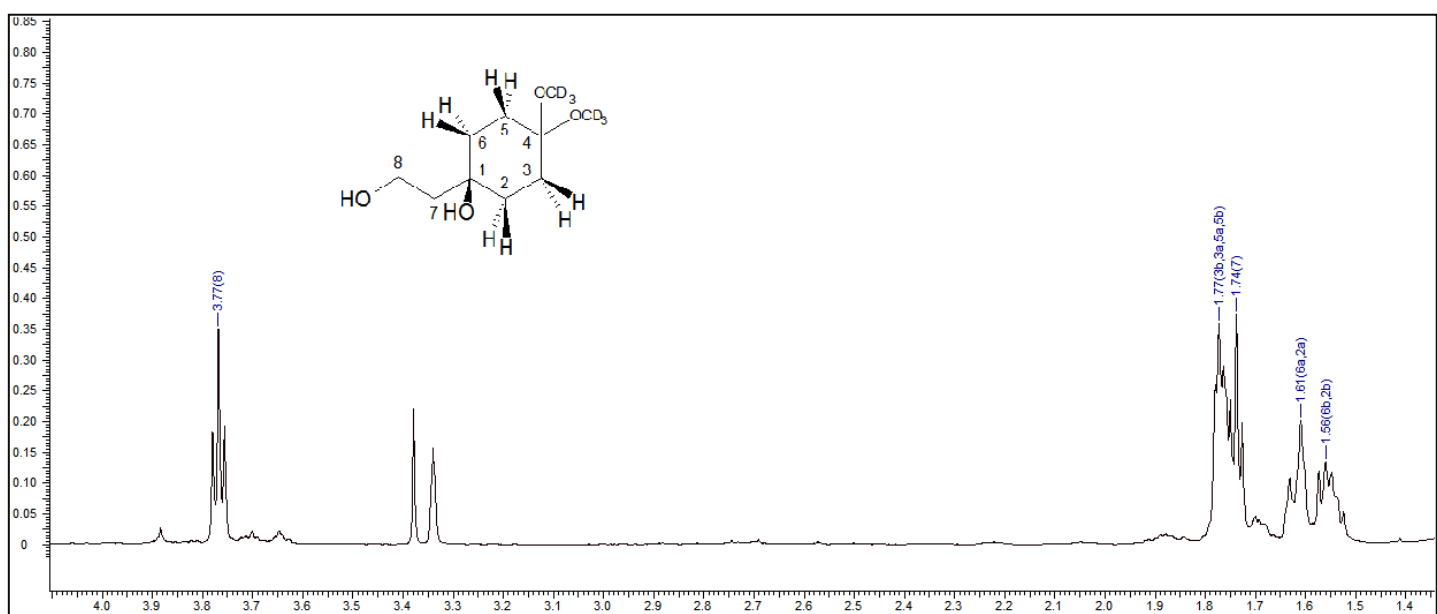
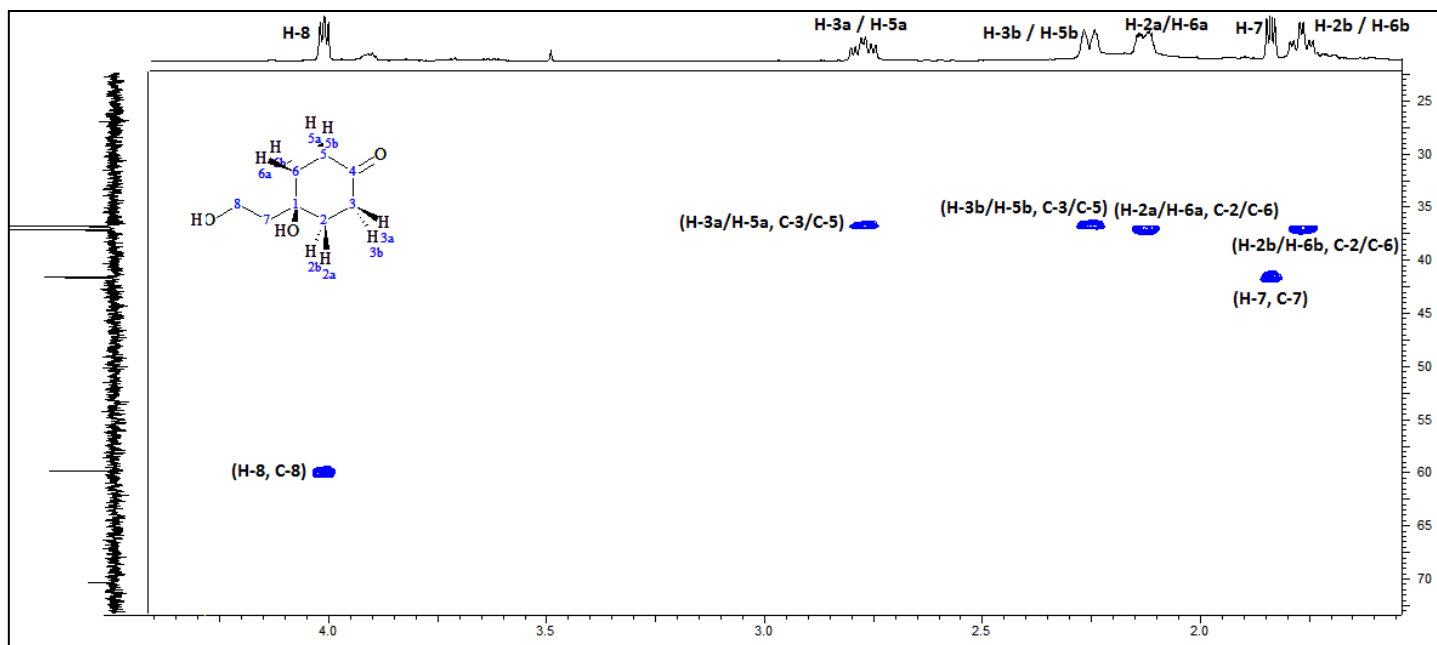
- [97] Ma SC, He ZD, Deng XL, But PP, Ooi VE, Xu HX, Lee SH, Lee SF. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem Pharm Bull.* 2001; 49: 1471–1473.
- [98] Ancora C, Roma C, Vettor M. Evaluation of cosmetic efficacy of oleuropein. Symposium on the New Frontiers of Dermo-cosmetology: Efficacy, Stability and Safety. Rome, Italy, November 4–6; 2004.
- [99] Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr.* 2009; 139: 2079–2086.
- [100] Bazoti FN, Bergquist J, Markides K, Tsarbopoulos A. Noncovalent Interaction between Amyloid- β -Peptide (1– 40) and Oleuropein Studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2006; 17: 568–575.
- [101] Naisheng Bai; Kan He; Alvin Ibarra; Antoine Bily; Marc Roller; Xiaozhuo Chen; Ralph Rühliridoids from *Fraxinus excelsior* with adipocyte differentiation-inhibitory and PPARalpha activation activity. *Journal of natural products* 2010; 73(1):2-6.
- [102] Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, Castro AD. In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem.* 2007 Feb 7;55(3):680-6
- [103] JA Menendez, A Vazquez-Martin, R Garcia-Villalba, A Carrasco-Pancorbo. Anti-HER2 (erbB-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO) *BMC cancer* 8 (1), 377
- [104] Jong Hoon Ahn, Eunjin Shin, Qing Liu, Seon Beom Kim, Kyeong-Mi Choi, Hwan-Soo Yoo, Bang Yeon Hwang, Mi Kyeong Lee. Secoiridoids from the stem barks of *Fraxinus rhynchophylla* with pancreatic lipase inhibitory activity. *Nat Prod Res.* 2012 Jul 30; 22840217
- [105] Vertuani S, Beghelli E, Scalambra E, Malisardi G, Copetti S, Dal Toso R, Baldisserotto A, Manfredini S. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules.* 2011 Aug 18; 16 (8):7068-80.
- [106] Hesham R. El-Seedi, Asmaa M. A. El-Said, Shaden A. M. Khalifa, Ulf Göransson, Lars Bohlin, Anna-Karin Borg-Karlson, and Rob Verpoorte, “Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 44, pp. 10877–10895, 2012.
- [107] Fortes, Carolina; García-Vilas, Javier A.; Quesada, Ana R.; Medina, Miguel Ángel. Evaluation of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. *Food Chemistry* vol. 134 issue 1 September 1, 2012. p. 134-140
- [108] Junkyu Han, Terence P. N. Talorete, Parida Yamada, Hiroko Isoda. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* (2009) 59:45–53
- [109] José G. Fernández-Bolaños, Óscar López, M. Ángeles López-García and Azucena Marset (2012). *Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives, Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), ISBN: 978-953-307-921-9, InTech.
- [110] Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, et al. (2006) Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr* 136: 614–619.
- [111] D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, et al. (2005) Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radic Biol Med* 38: 908–919.
- [112] Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, Daniel F, et al. (2006) Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 27: 1812–1827.
- [113] Quiles JL, Farquharson AJ, Simpson DK, Grant I, & Wahle KWJ. (2002) Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br J Nutr.* 88:225–234.
- [114] Furneri PM, Piperno A, Sajia A, & Bisignano G. (2004) Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4892–4894.
- [115] Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Zhang D, Zhang JZH, Chang YT, et al. (2009) Compositions and methods for treating obesity, obesity related disorders and for inhibiting the infectivity of human immunodeficiency virus. *US Pat Appl Publ US 20090061031 A1* 20090305.

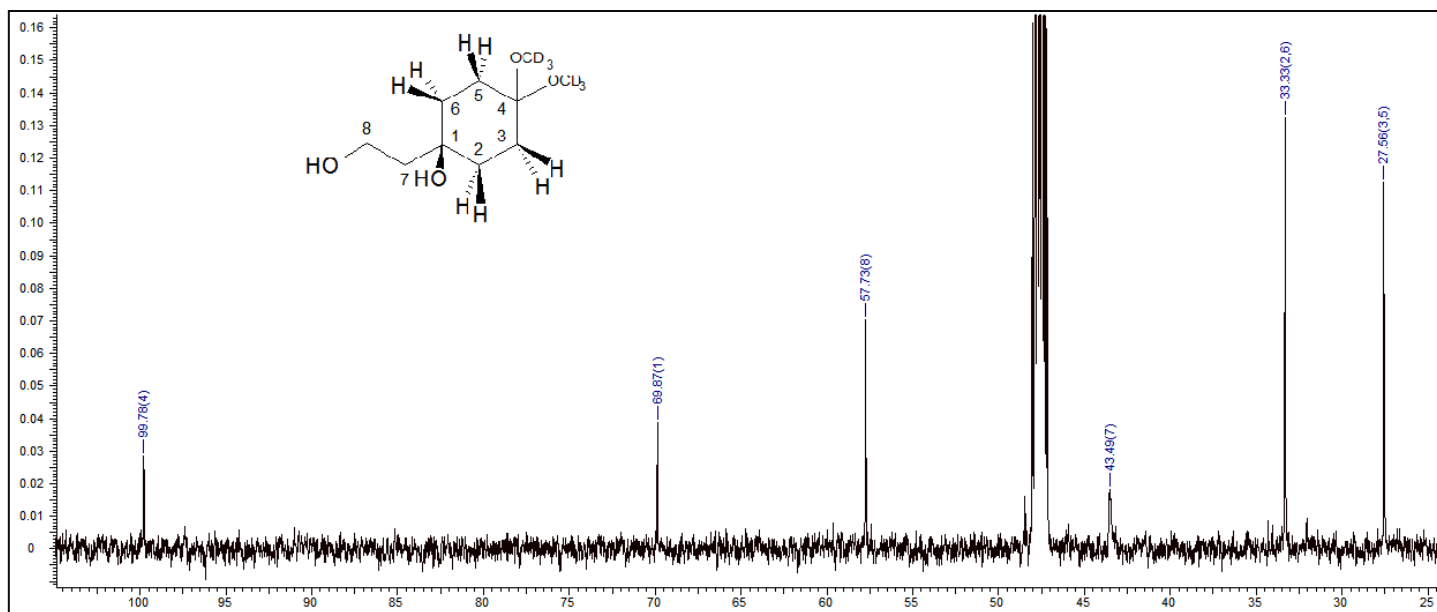
- [116] Visioli F, Poli A, & Galli C. (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 22: 65–75.
- [117] Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, & Hagiwara H. (2011) Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol* 662: 78–84.
- [118] Rauwald, H. W., O. Brehm, K. P. Odenthal (1994). "Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*". *Phytotherapy Research*, 8 (3), 135-140.
- [119] Maslova LV, Lishmanov IuB, Maslov LN. Cardioprotective effects of adaptogens of plant origin *Biull Eksp Biol Med*. 1993 Mar;115(3):269-71.
- [120] <http://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-health-news/olives-potential-source-of-probiotics/28077>
- [121] <http://www.oliveoiltimes.com/olive-oil-making-and-milling/reduced-salt-zinc-enriched-table-olives/32868>
- [122] López-Lázaro M. (2009) "Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin". *Mini Rev Med Chem*. 9 (1): 31–59.
- [123] Anabela Sousa; Albino Bento; Susana Casal; Ricardo Malheiro; M Beatriz P P Oliveira; José Alberto Pereira Chemical characterization of "alcaparras" stoned table olives from northeast Portugal. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2011; 16(11):9025-40.
- [124] Yang, Nian-Yun; Xu, Xiao-Hua; Ren, Dong-Chun; Duan, Jin-Ao; Xie, Ning; et al. *Helvetica Chimica Acta*, 2010, vol. 93, p. 65 – 71
- [125] Bai, Naisheng; He, Kan; Ibarra, Alvin; Bily, Antoine; Roller, Marc; Chen, Xiaozhuo; Ruehl, Ralph *Journal of Natural Products*, 2010, vol. 73, # 1 p. 2 – 6
- [126] Takenaka, Yukiko; Tanahashi, Takao; Taguchi, Hiromi; Nagakura, Naotaka; Nishi, Toyoyuki *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, vol. 50, # 3 p. 384 – 389
- [127] Bai, Naisheng; He, Kan; Ibarra, Alvin; Bily, Antoine; Roller, Marc; Chen, Xiaozhuo; Ruehl, Ralph *Journal of Natural Products*, 2010, vol. 73, # 1 p. 2 – 6
- [128] Park, Hee-Juhn; Lee, Myung-Sun; Lee, Kyung-Tae; Sohn, Il-Cheol; Han, Yong-Nam; Miyamoto, Ken-ichi *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1999, vol. 47, # 7 p. 1029 – 1031
- [129] Nishino C, Kobayashi K, Fukushima M. Halleridone, a cytotoxic constituent from *Cornus controversa*. *J Nat Prod* 1988;51(6):1281-1282.
- [130] Maurizio Servili, Roberto Selvaggini, Sonia Esposto, Agnese Taticchi, Gianfrancesco Montedoro, Guido Morozzi *Journal of Chromatography A*, Volume 1054, Issues 1–2, 29 October 2004, Pages 113–127
- [131] Scott Van Bramer, "An Introduction to NMR Concepts" retrieved from <http://science.widener.edu/~svanbram/>
- [132] S. Kumar Bharti, R. Roy *Quantitative 1H NMR spectroscopy Trends Anal. Chem.*, 35 (2012), pp. 5–26
- [133] Harri Koskela *Quantitative 2D NMR Studies Annual Report on NMR Spectroscopy*, 66 (2009)
- [134] Katsuya Endo, Kazuhiko Seya, Hiroshi Hikino Biogenesis-like transformation of salidroside to rengyol and its related cyclohexyletanoids of *Forsythia Suspensa* *Tetrahedron* Volume 45, Issue 12, 1989, Pages 3673–3682
- [135] Παπαναστασίου Δ. (1966), Σύγχρονη ελαιουργεία. Η τεχνολογία των ελαίων. Εκδοτικός οίκος Σπύρος Σπύρου και Υιός, Αθήνα.
- [136] Andreadou I., Iliodromitsis EK, Mikros E., Kremastinos D. The olive constituent Oleuropein exhibits anti-ischemic, anti-oxidative and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr* 2006; 2213-9

I. Παράρτημα φασμάτων

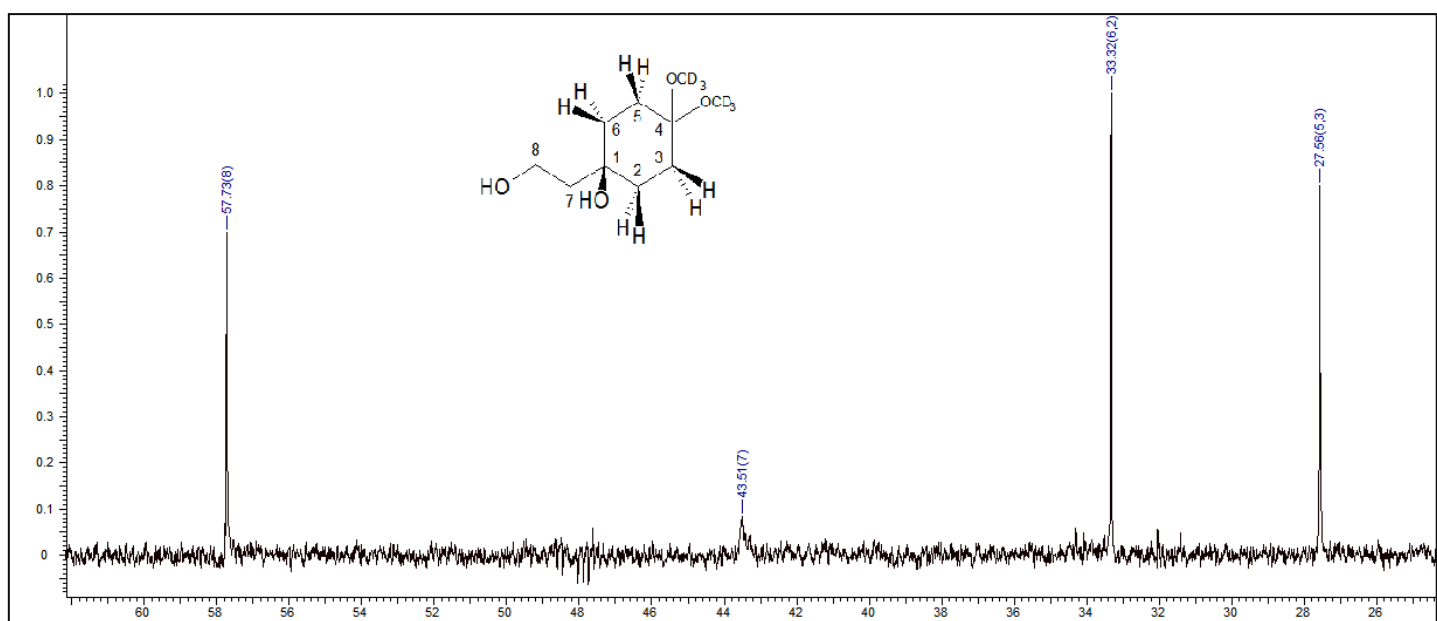
Rengyoxide



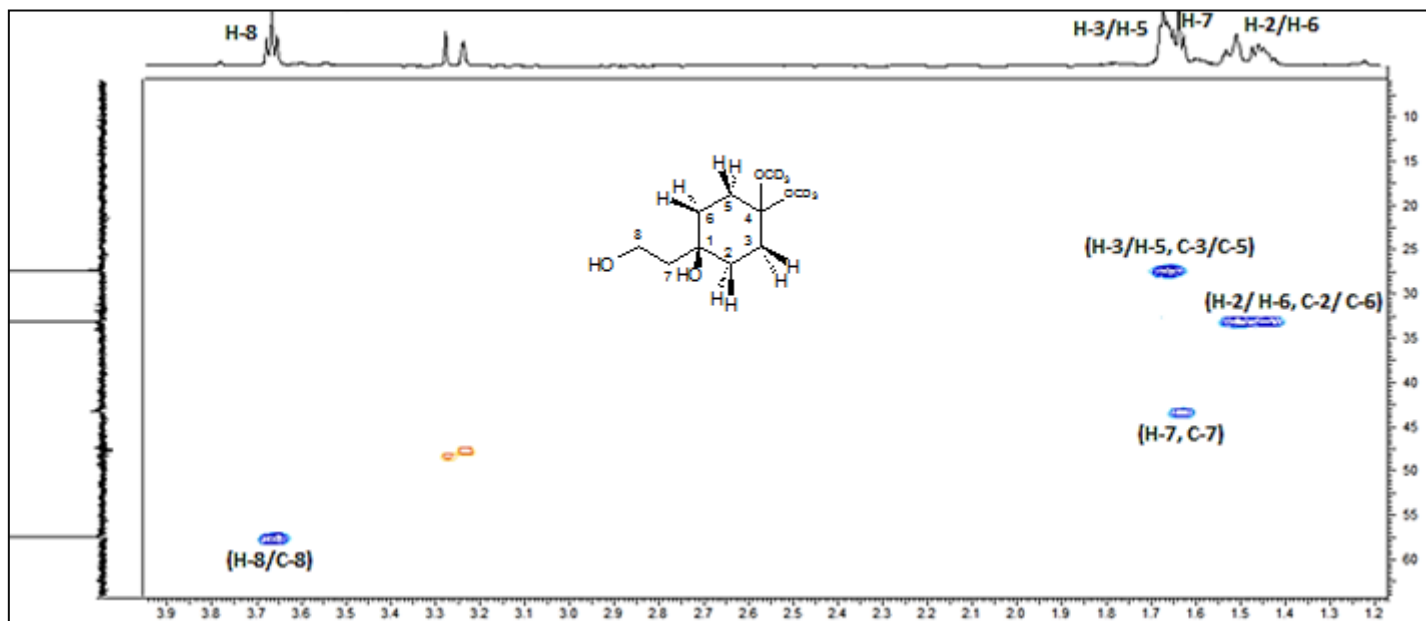




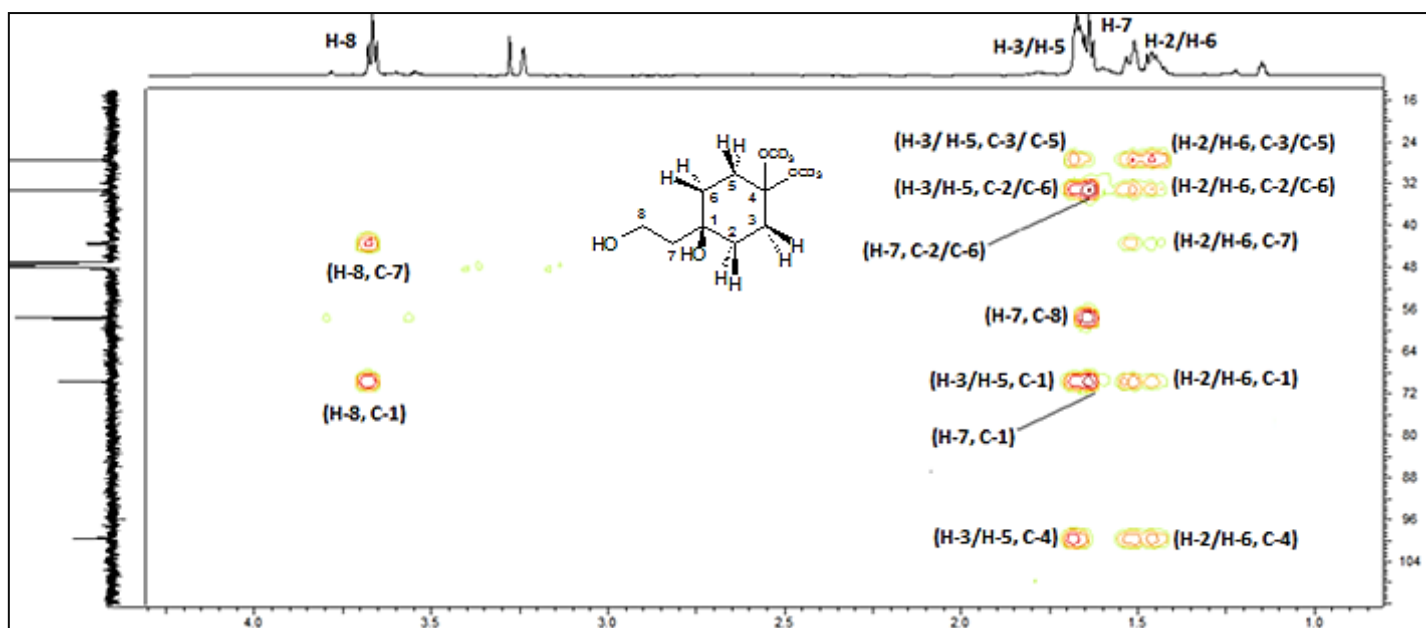
$^{13}\text{C-NMR (CD}_3\text{OD)}$



$^{13}\text{C-DEPT NMR (CD}_3\text{OD)}$

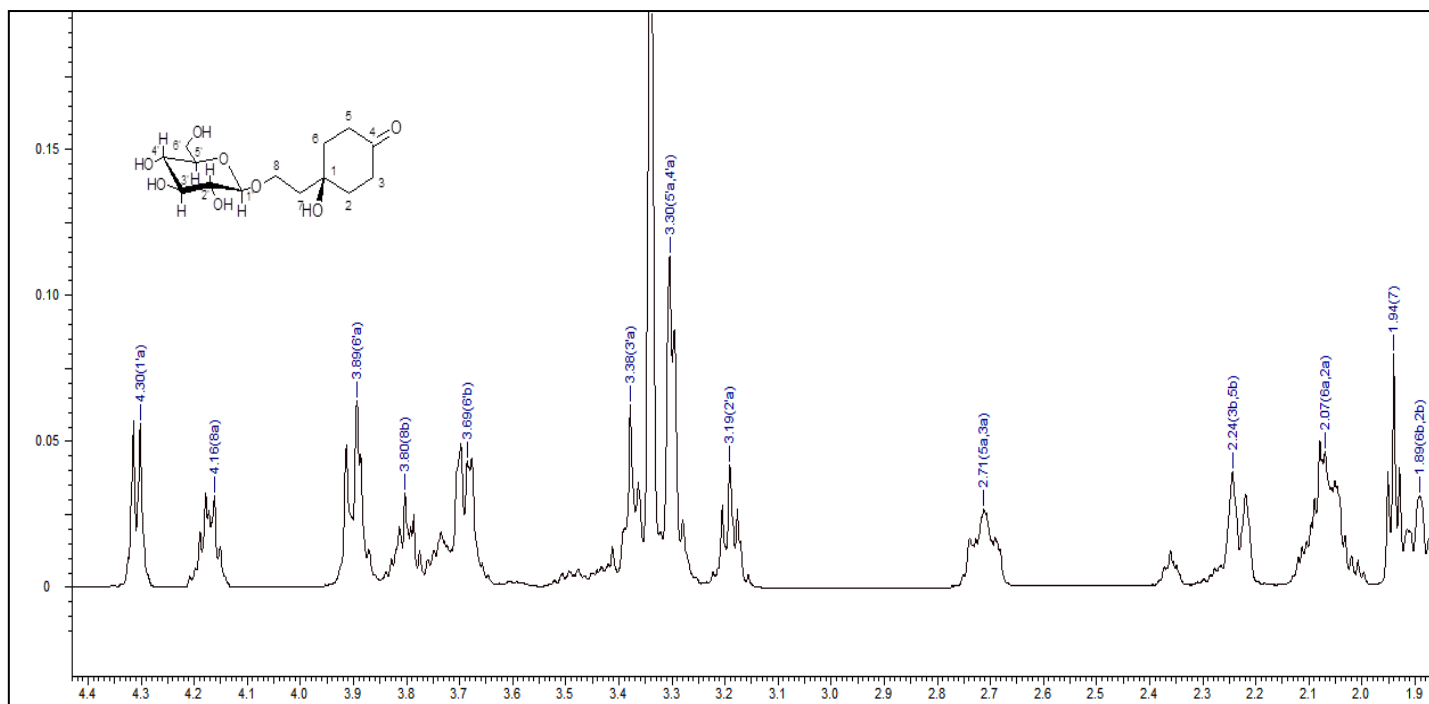


HSQC-DEPT (CD₃OD)

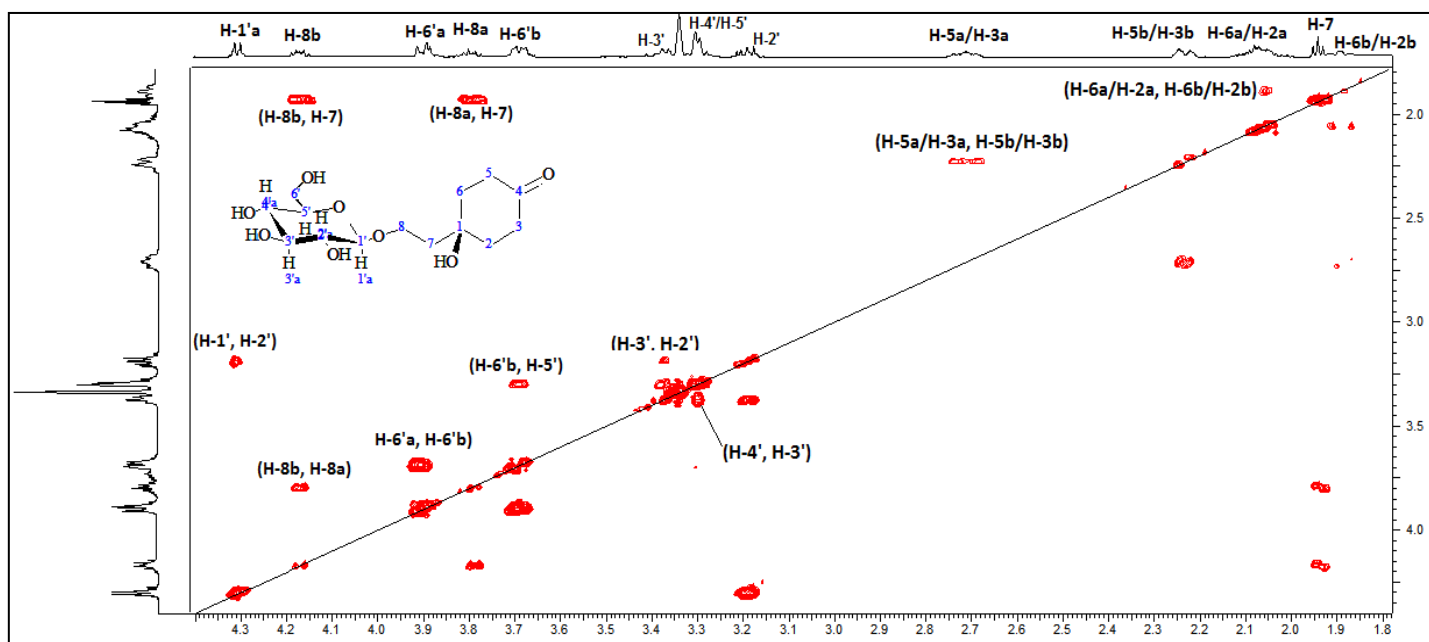


HMBC (CD₃OD)

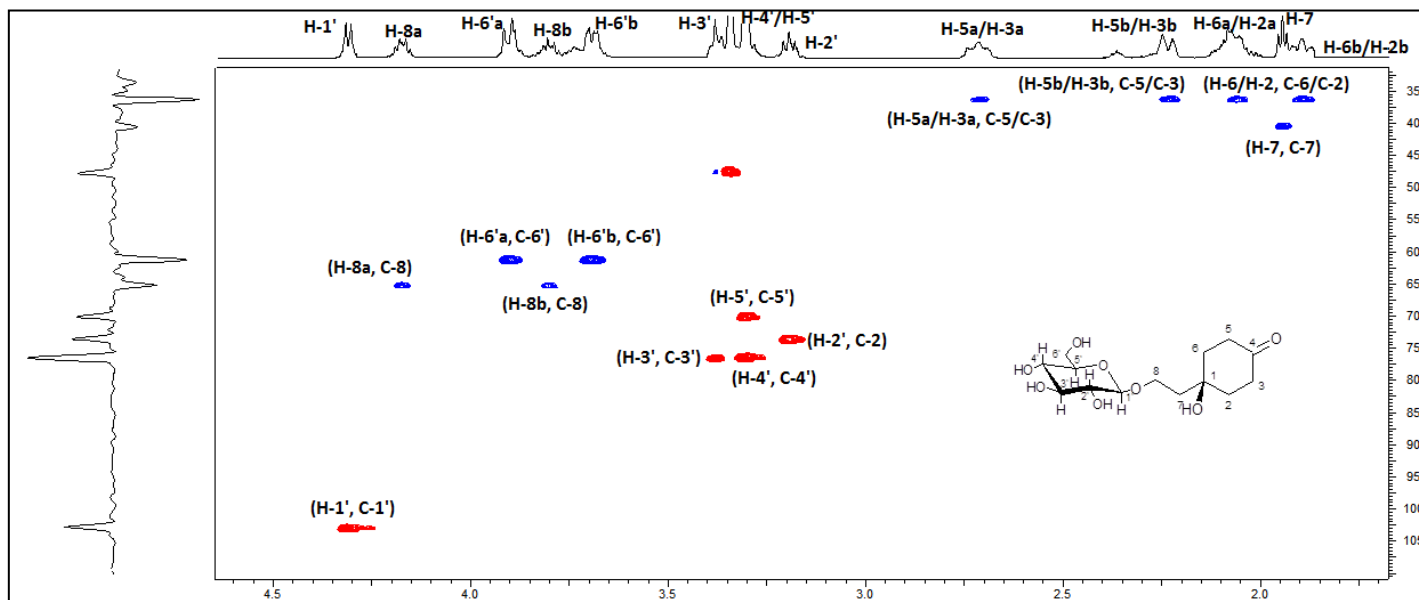
Rengyoside B



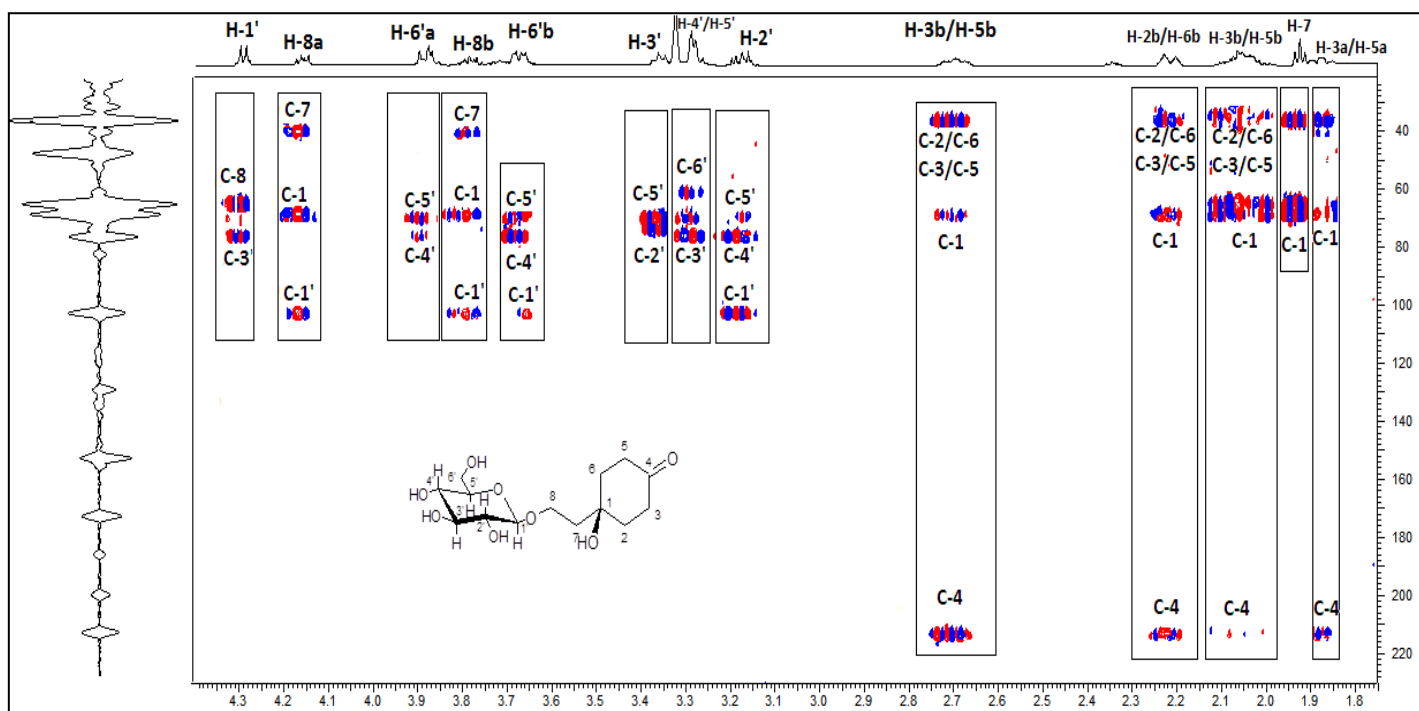
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD)



$^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ (CD_3OD)

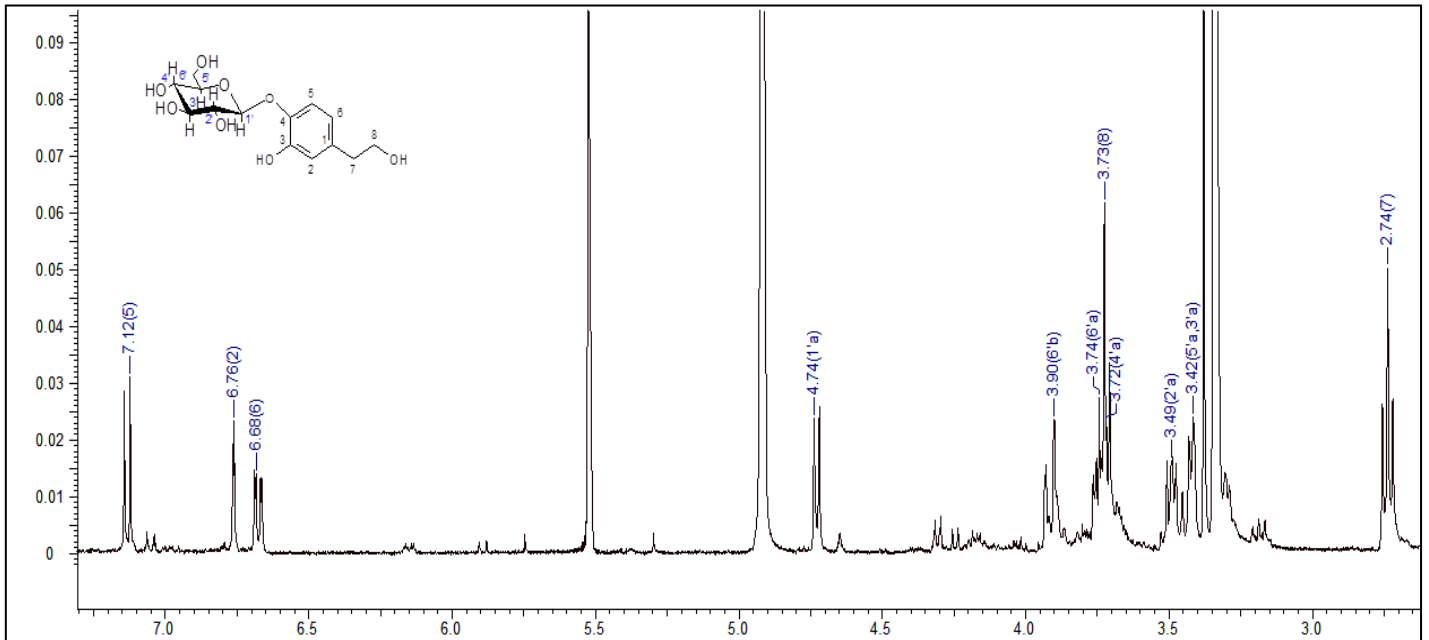


HSQC-DEPT (CD₃OD)

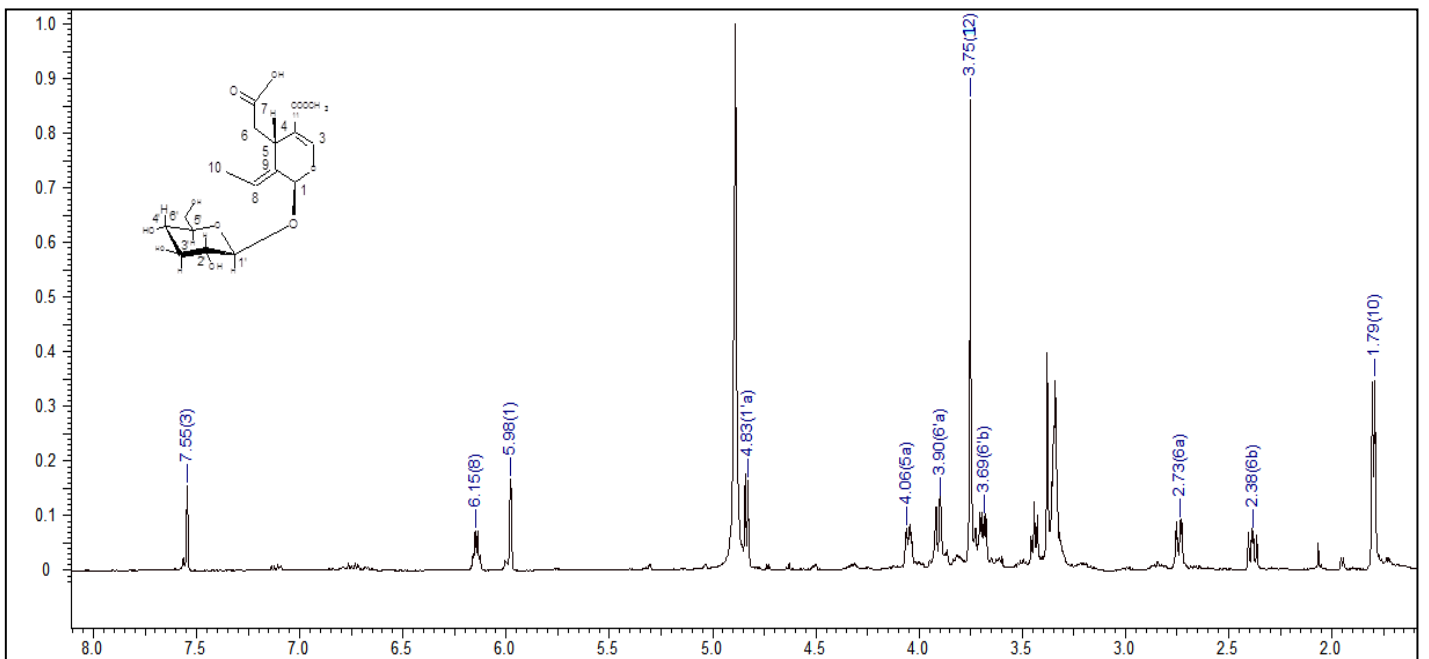


HMBC (CD₃OD)

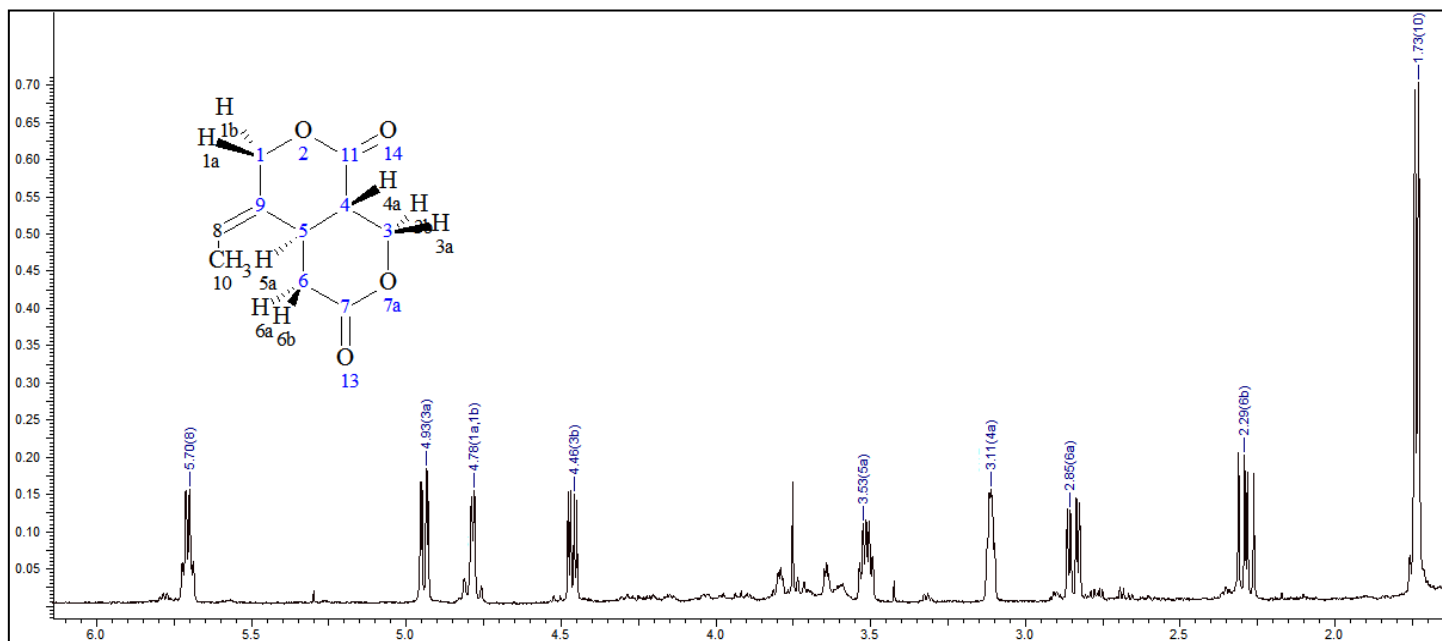
4-Ο-Γλυκοσίδη της υδροξυτυροσόλης



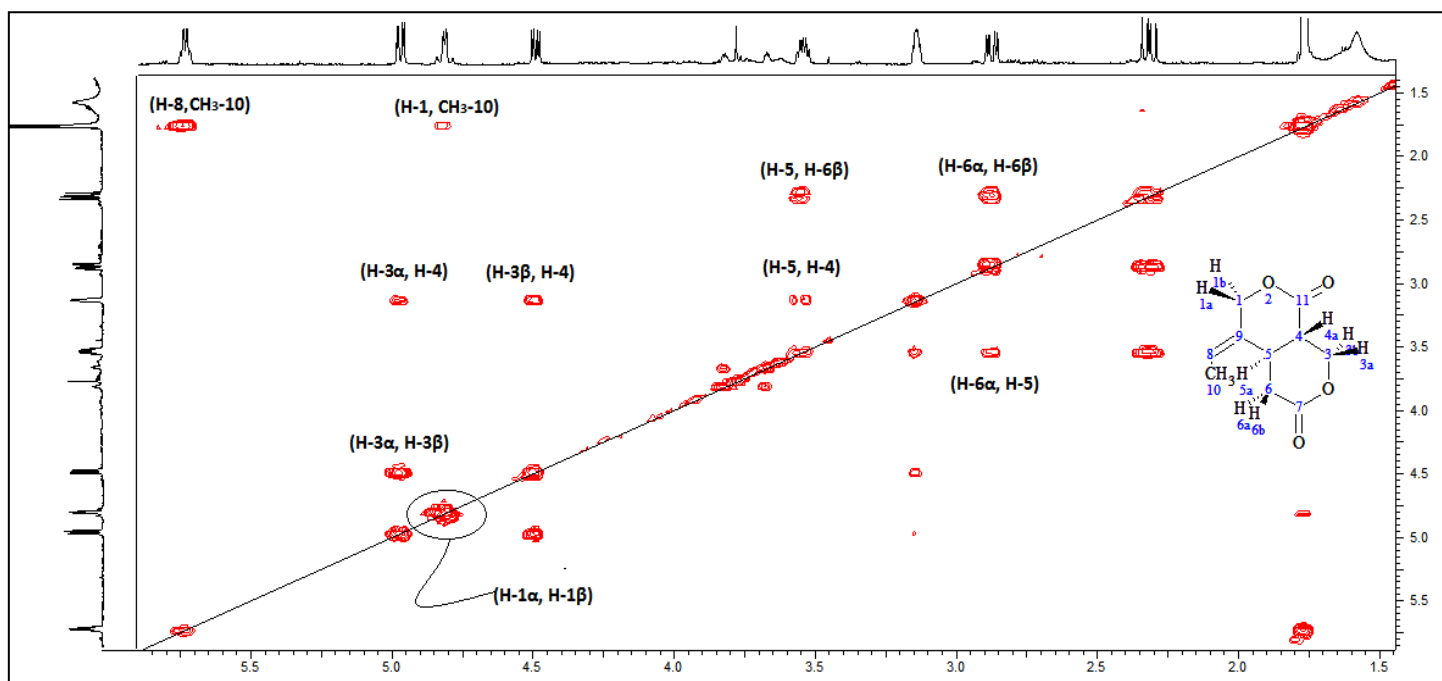
11-μεθυλεστέρας του ολεοσίδη



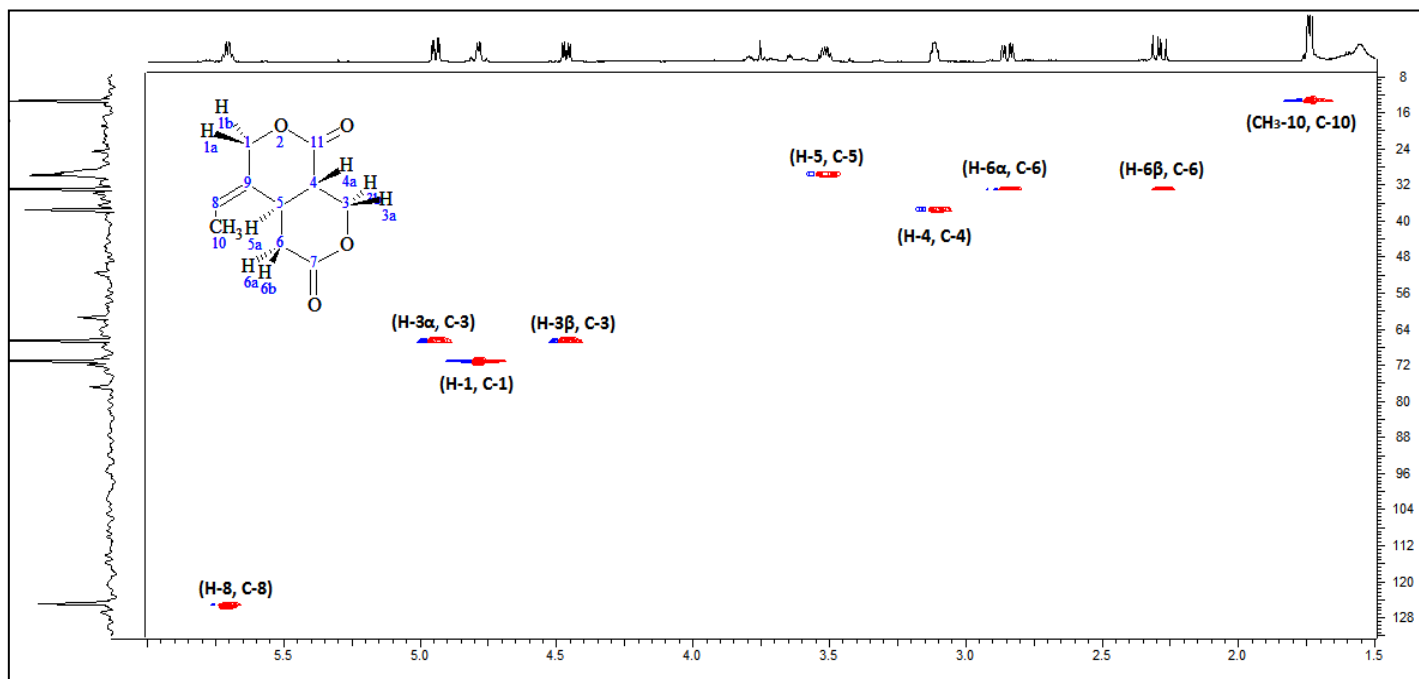
Megaritodilactone



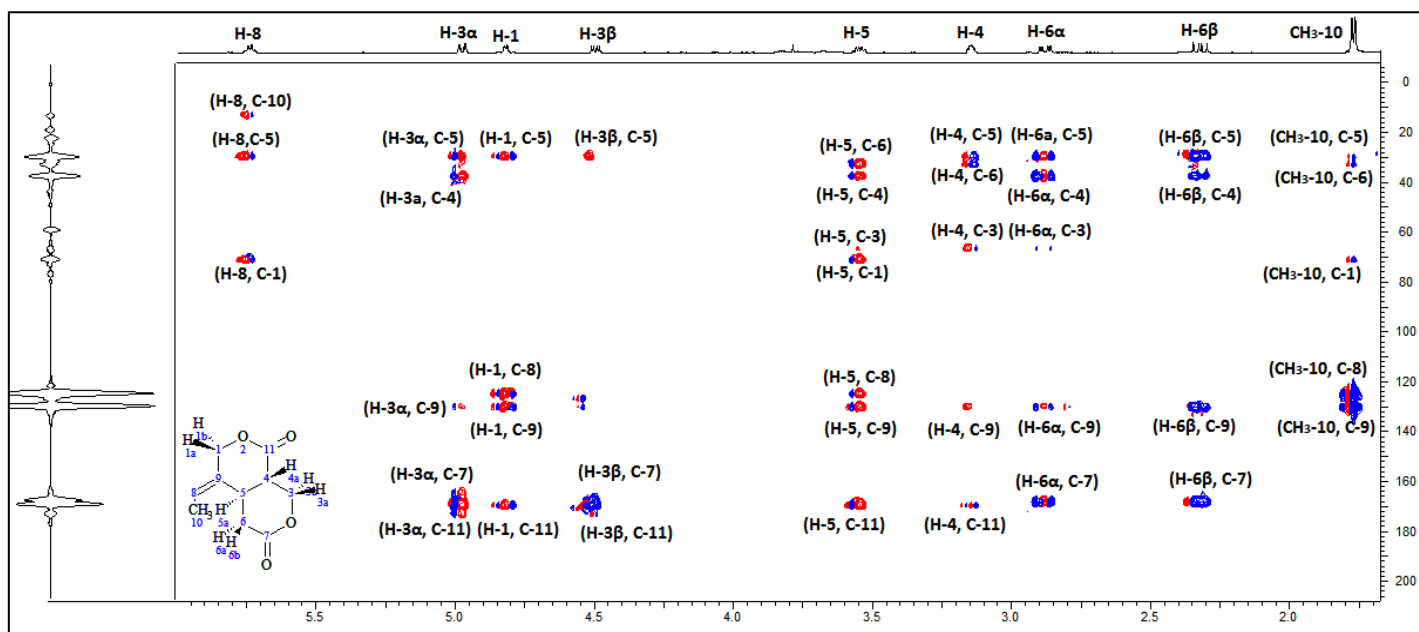
¹H-NMR (CDCl₃)



¹H-¹H COSY (CDCl₃)

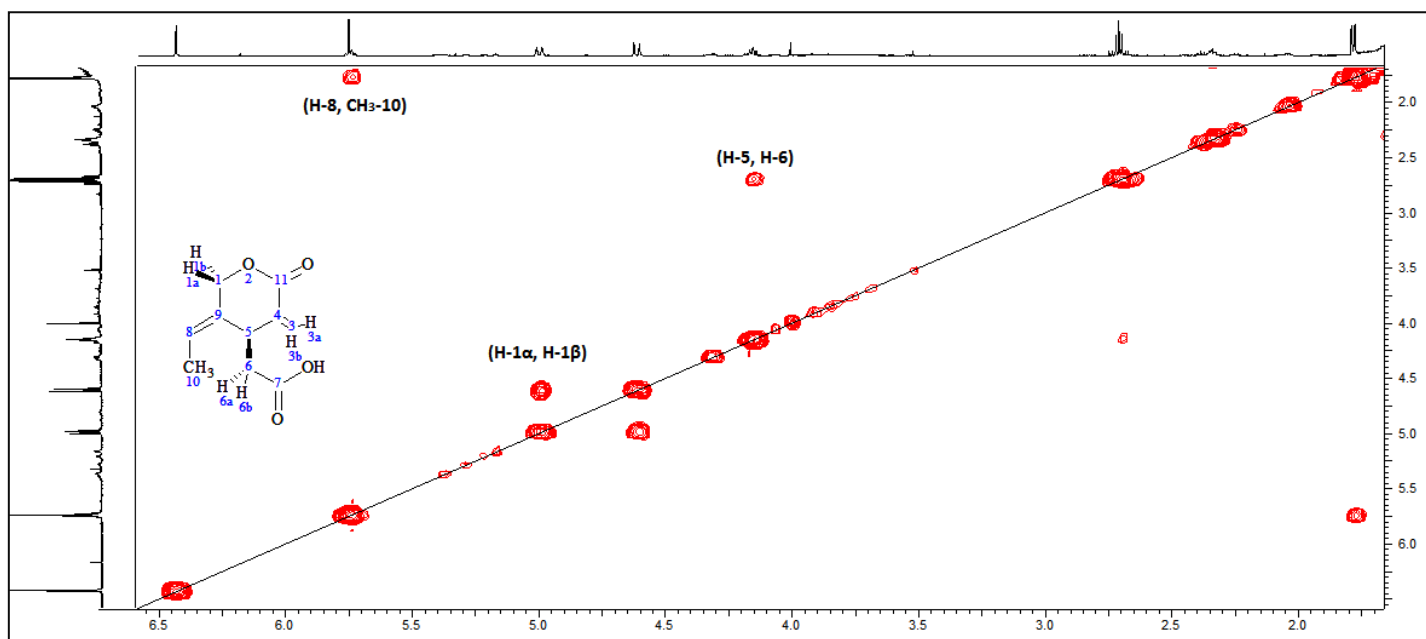
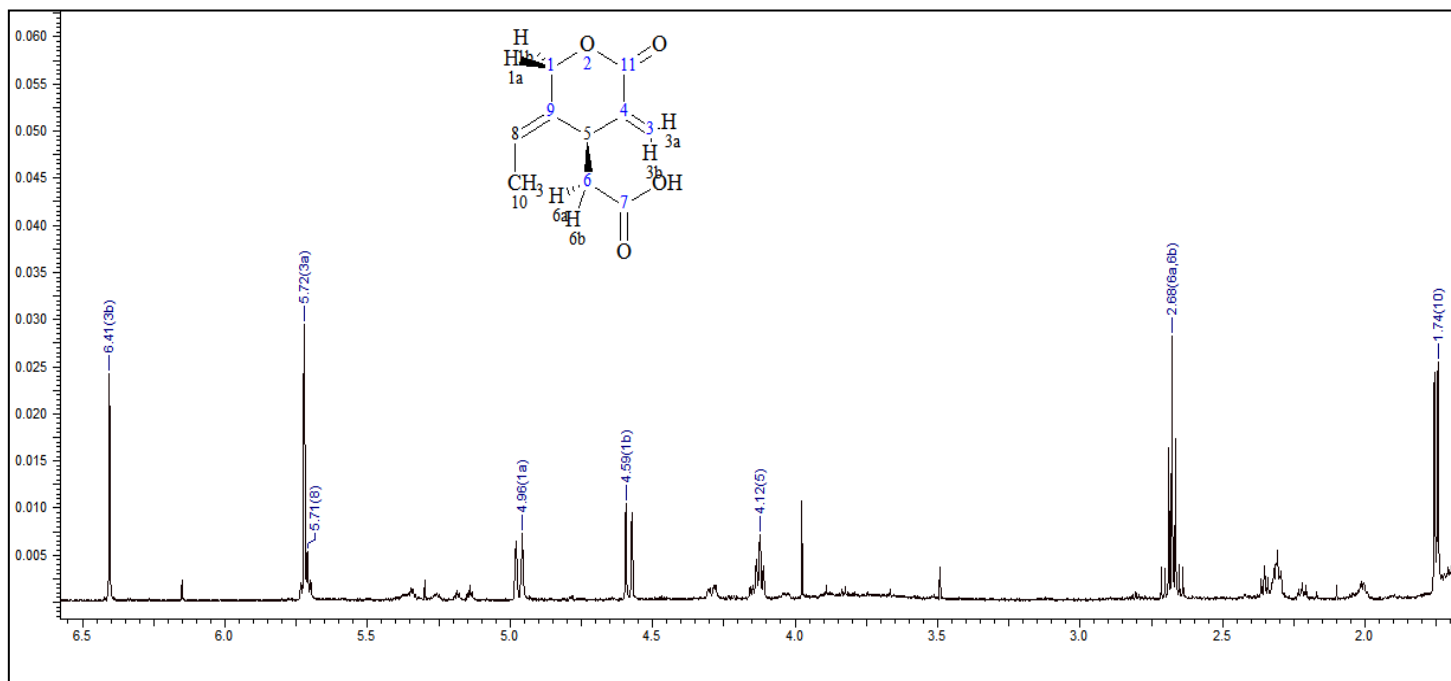


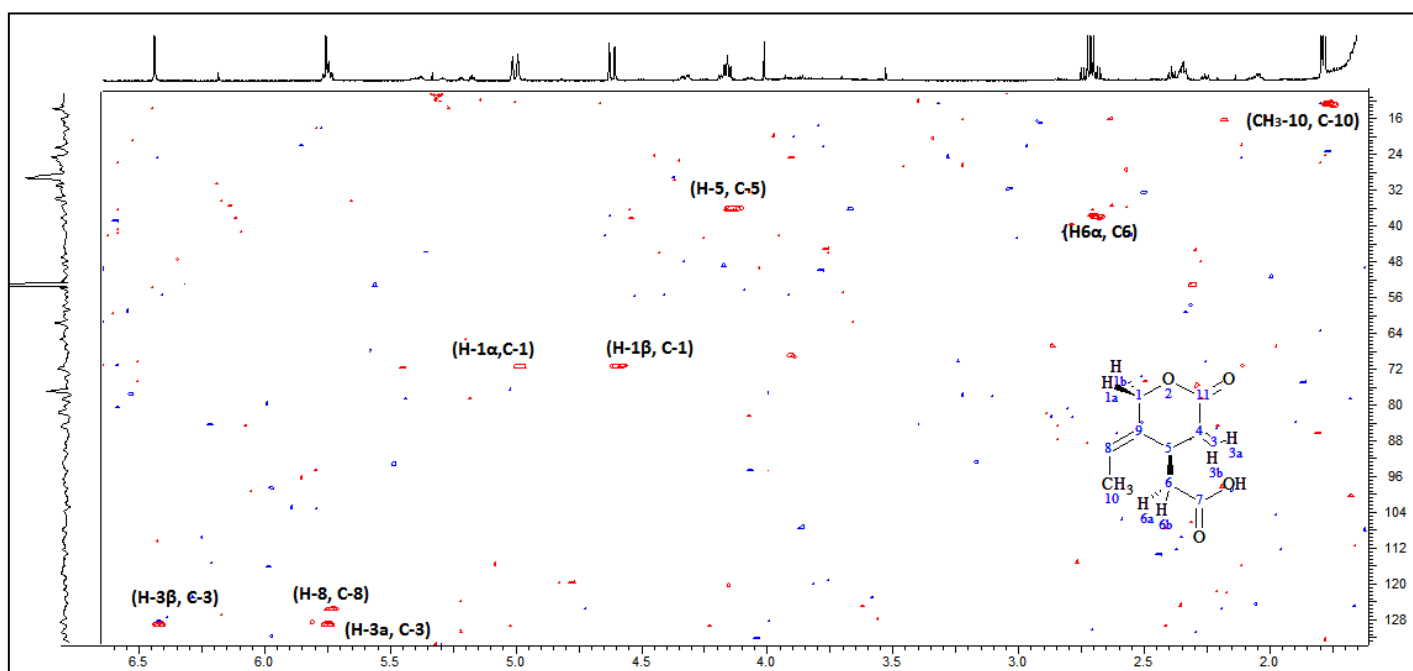
HSQC-DEPT (CDCl₃)



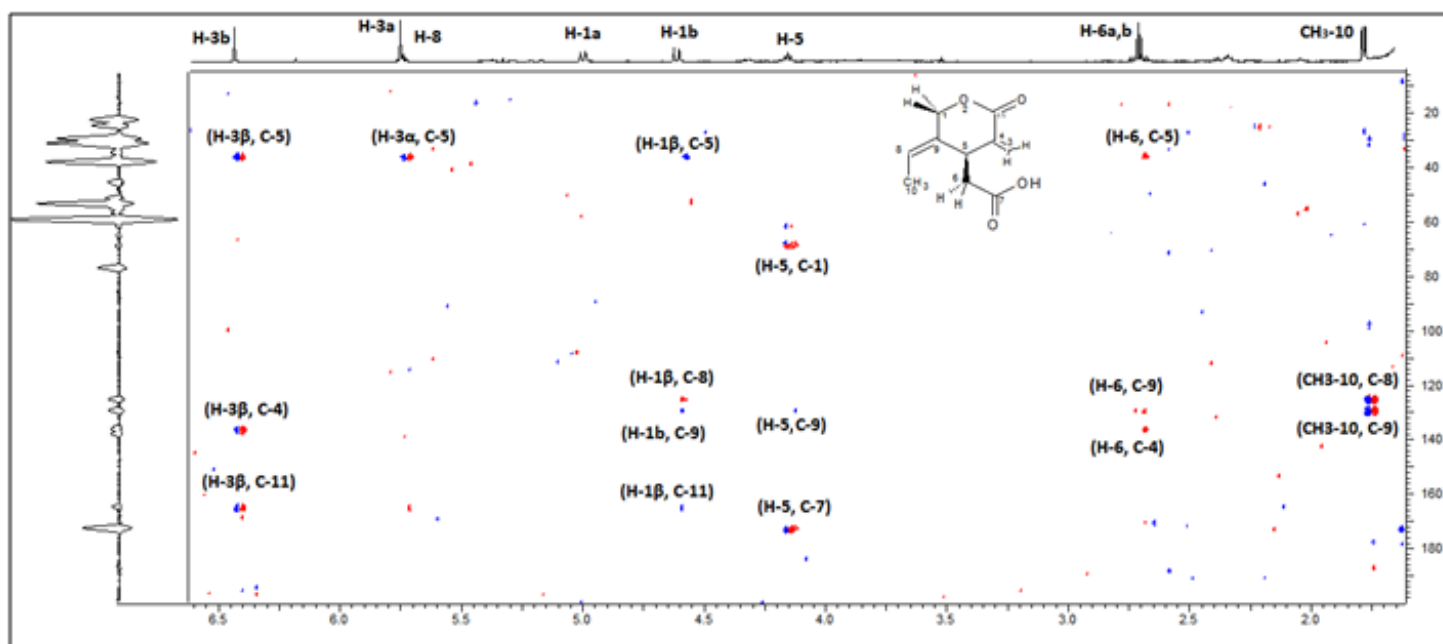
HMBC (CDCl₃)

Megaritolactonic acid



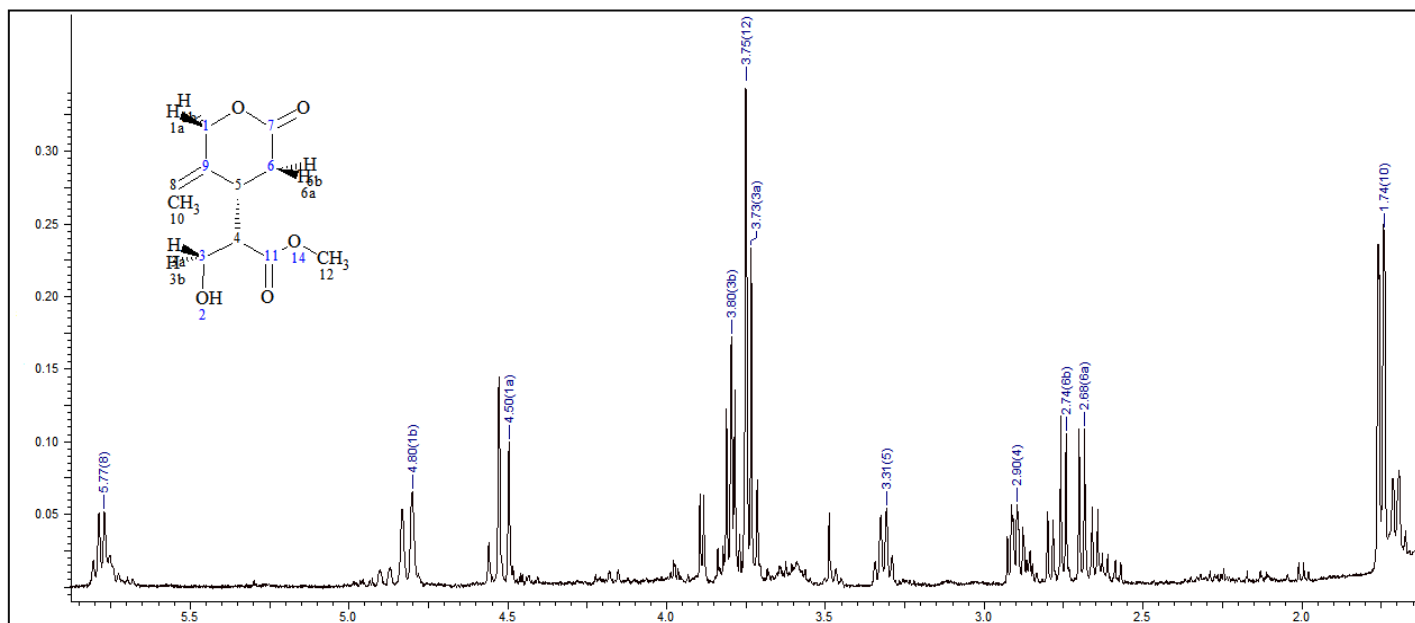


HSQC-DEPT (CDCl₃)

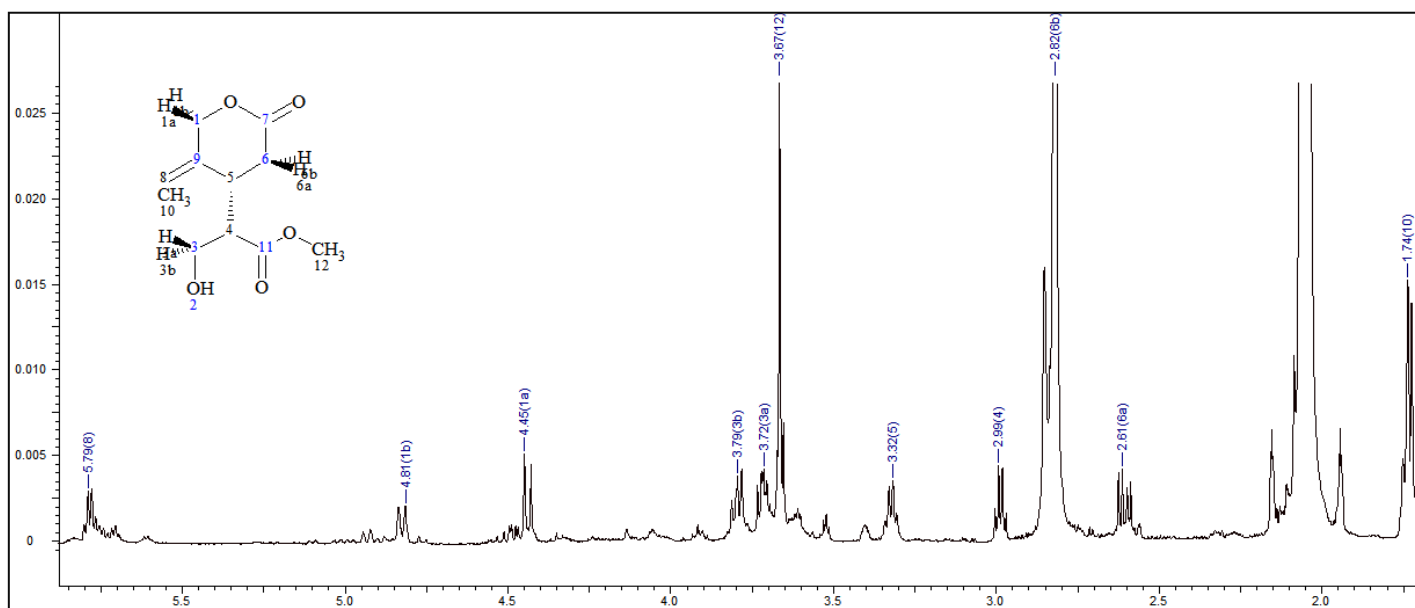


HMBC (CDCl₃)

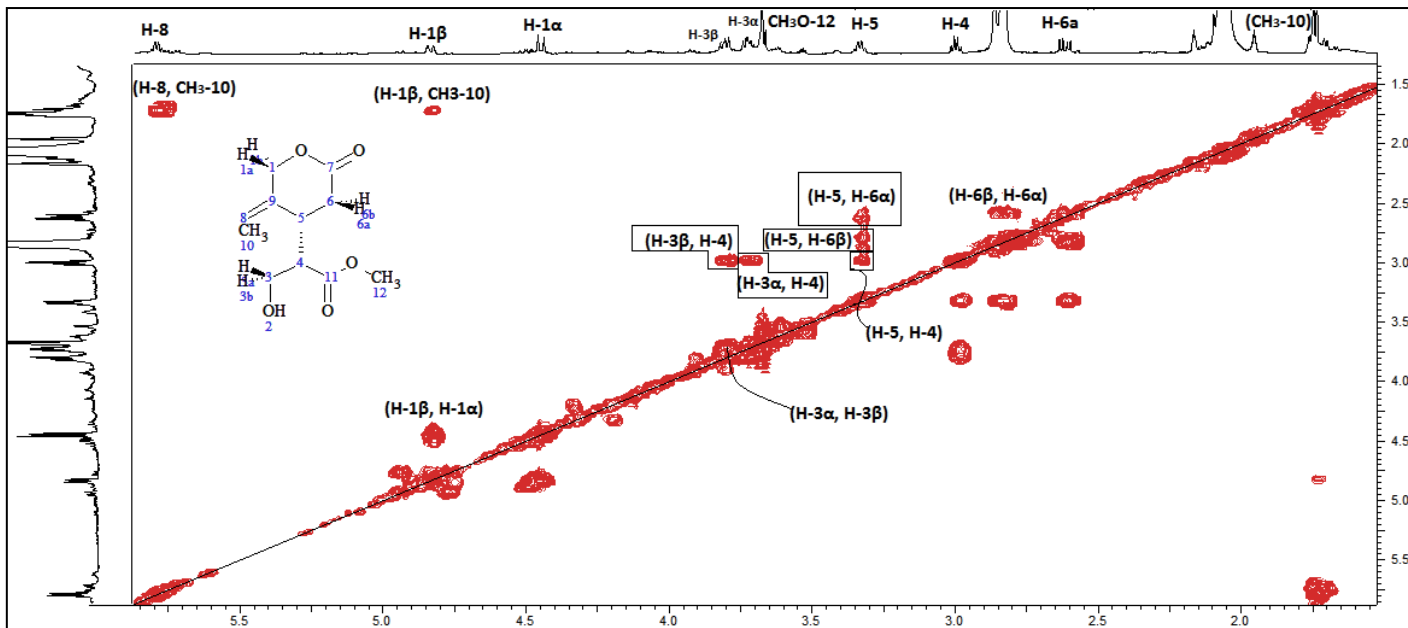
Megaritolactonic B methyl ester



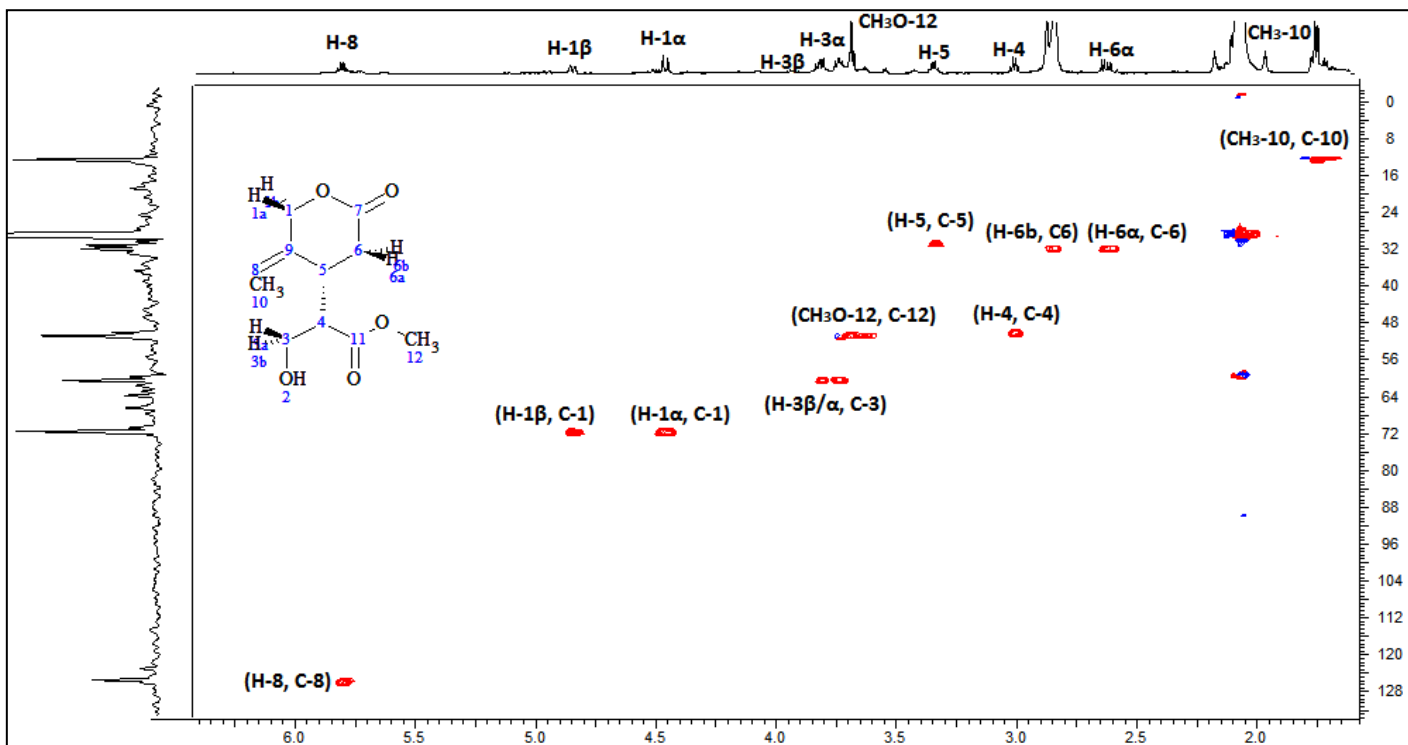
¹H-NMR (CDCl₃)



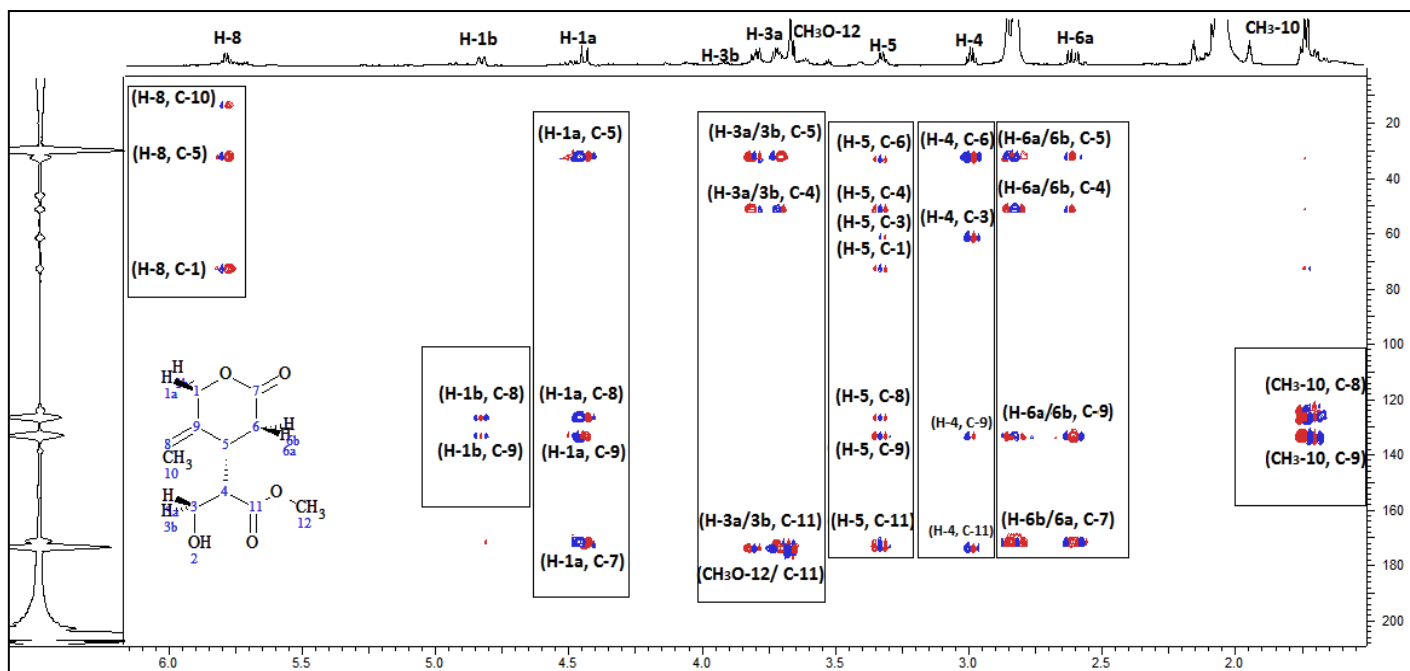
¹H-NMR ((CD₃)₂CO)



^1H - ^1H COSY ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

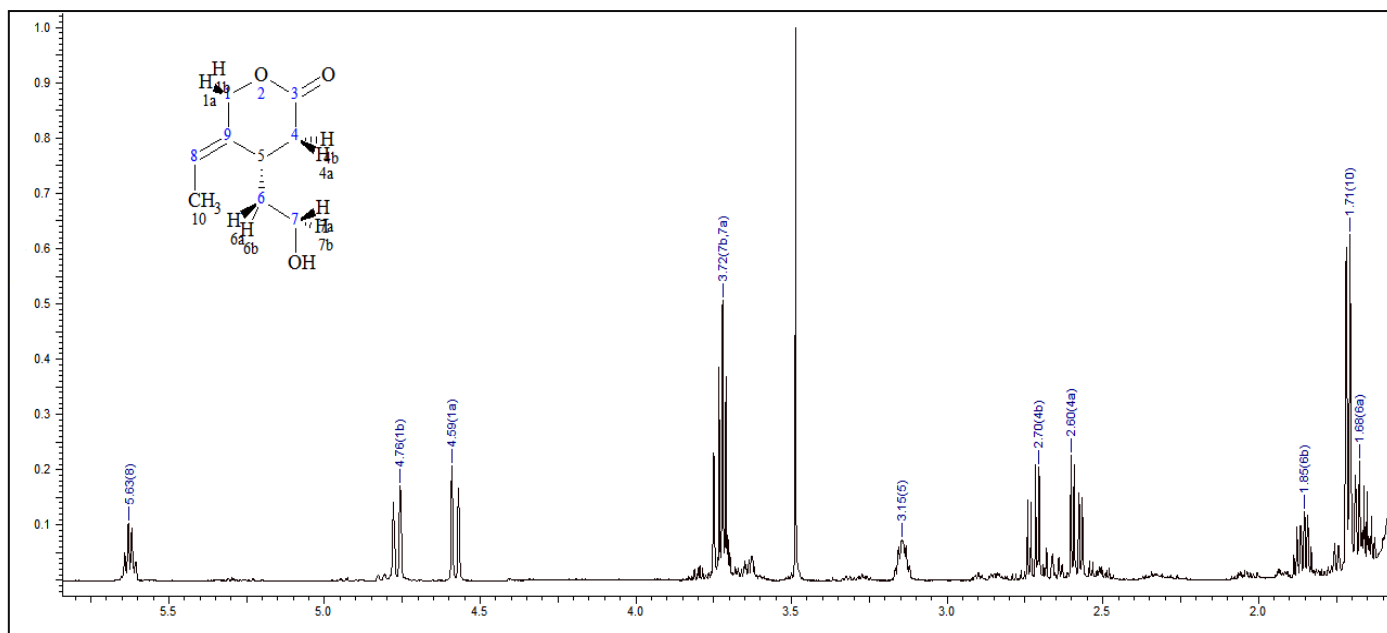


HSQC-DEPT ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

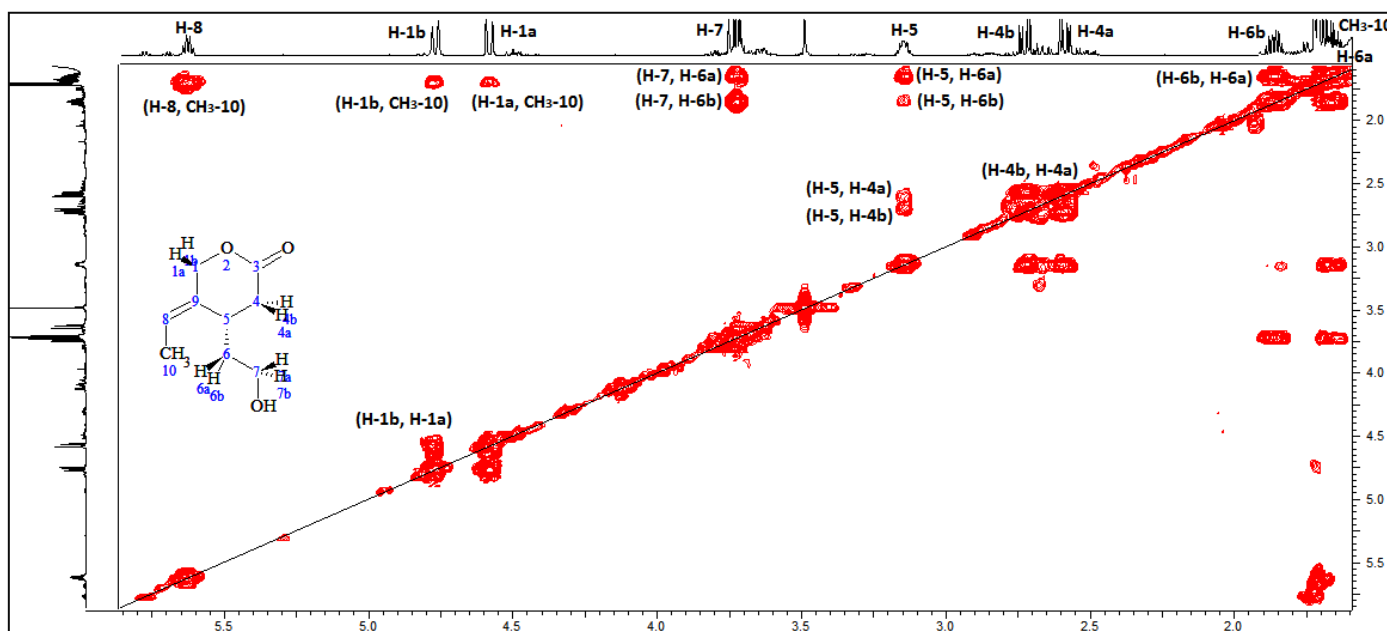


HMBC ((CD₃)₂CO)

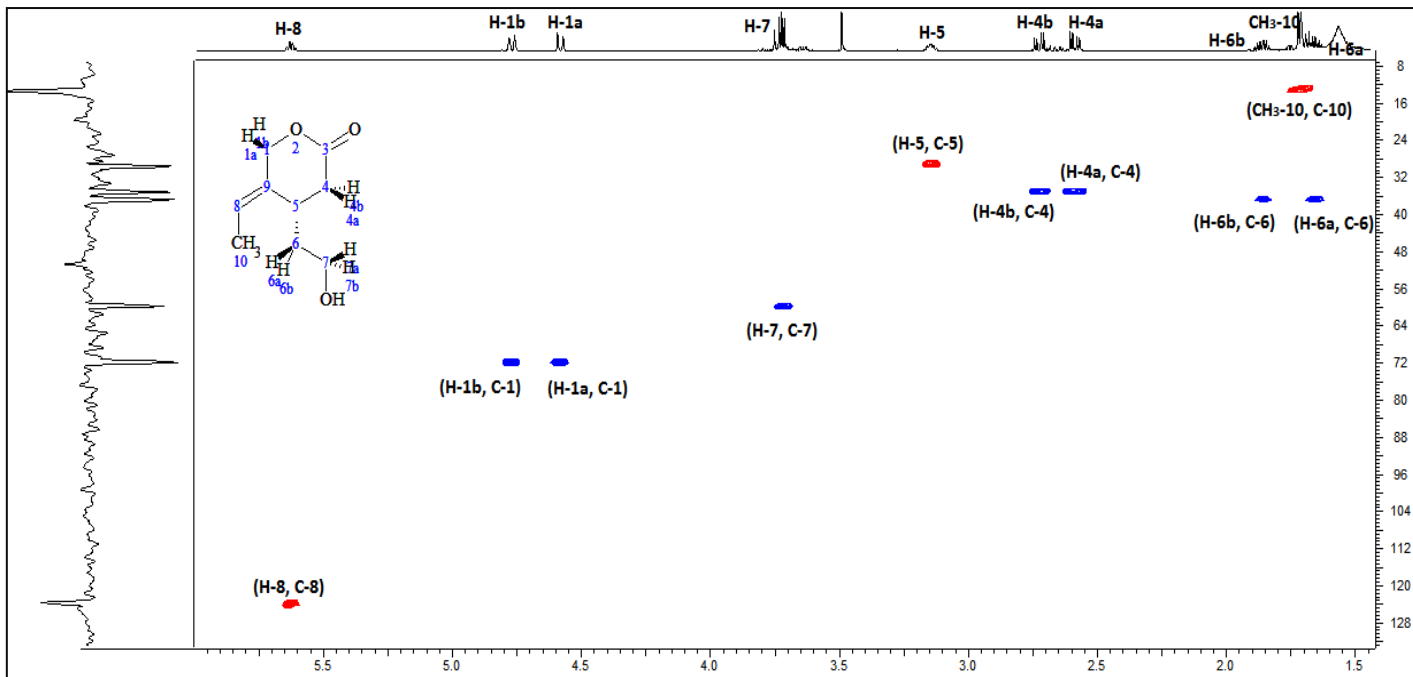
Megaritolactonol



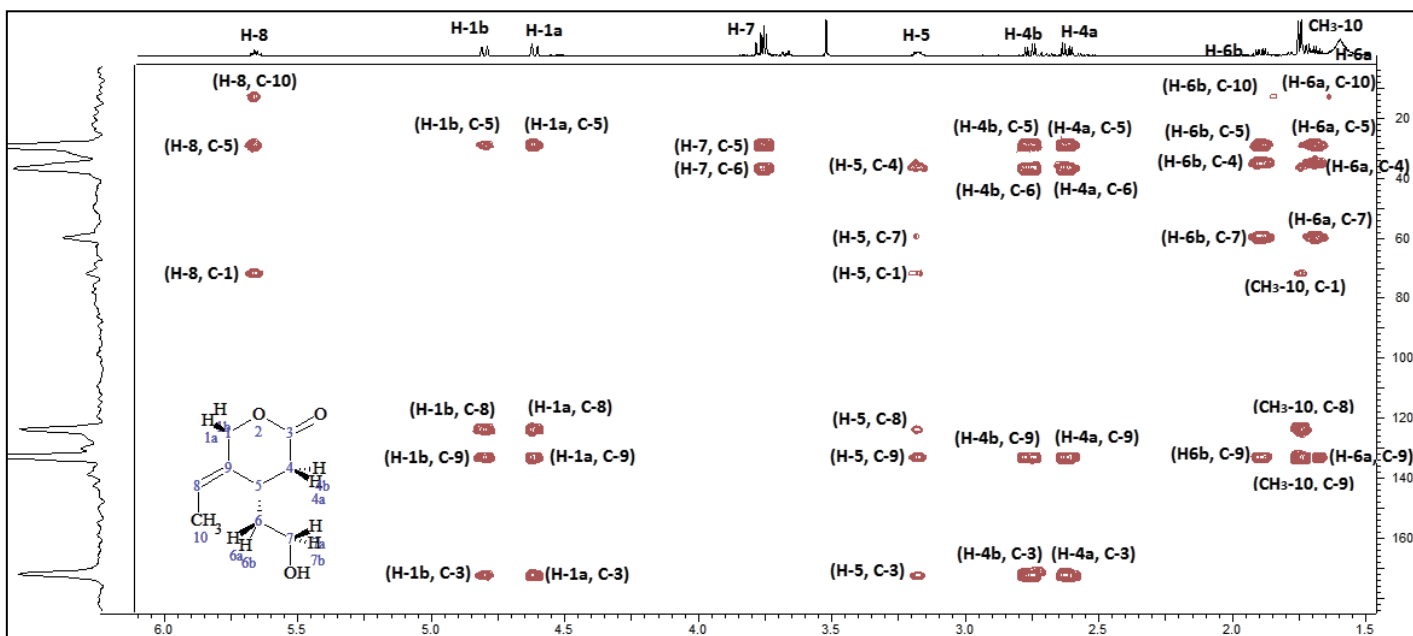
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)



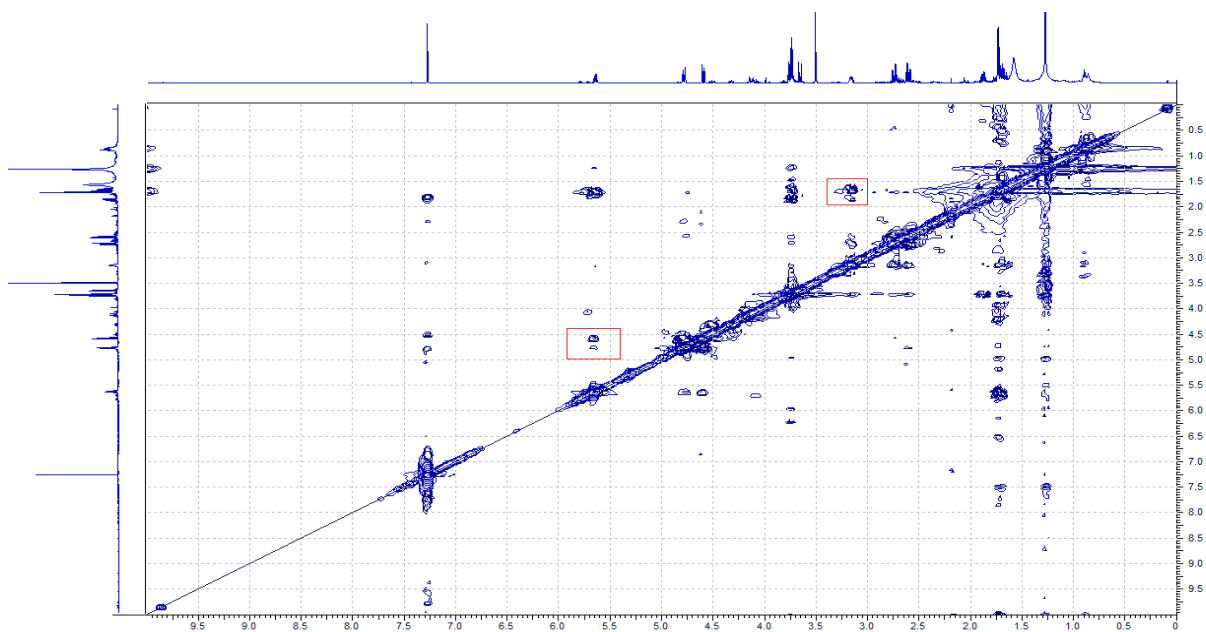
$^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (CDCl_3)



HSQC – DEPT (CDCl₃)

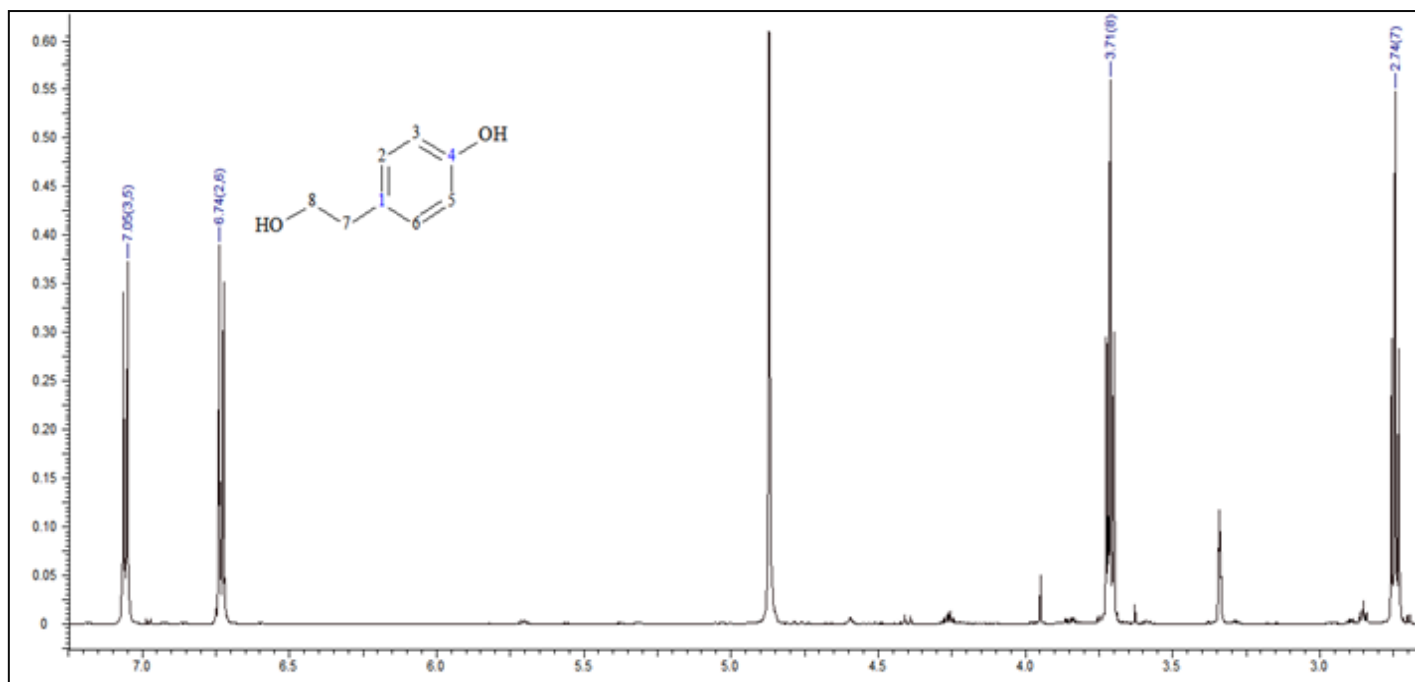


HMBC (CDCl₃)



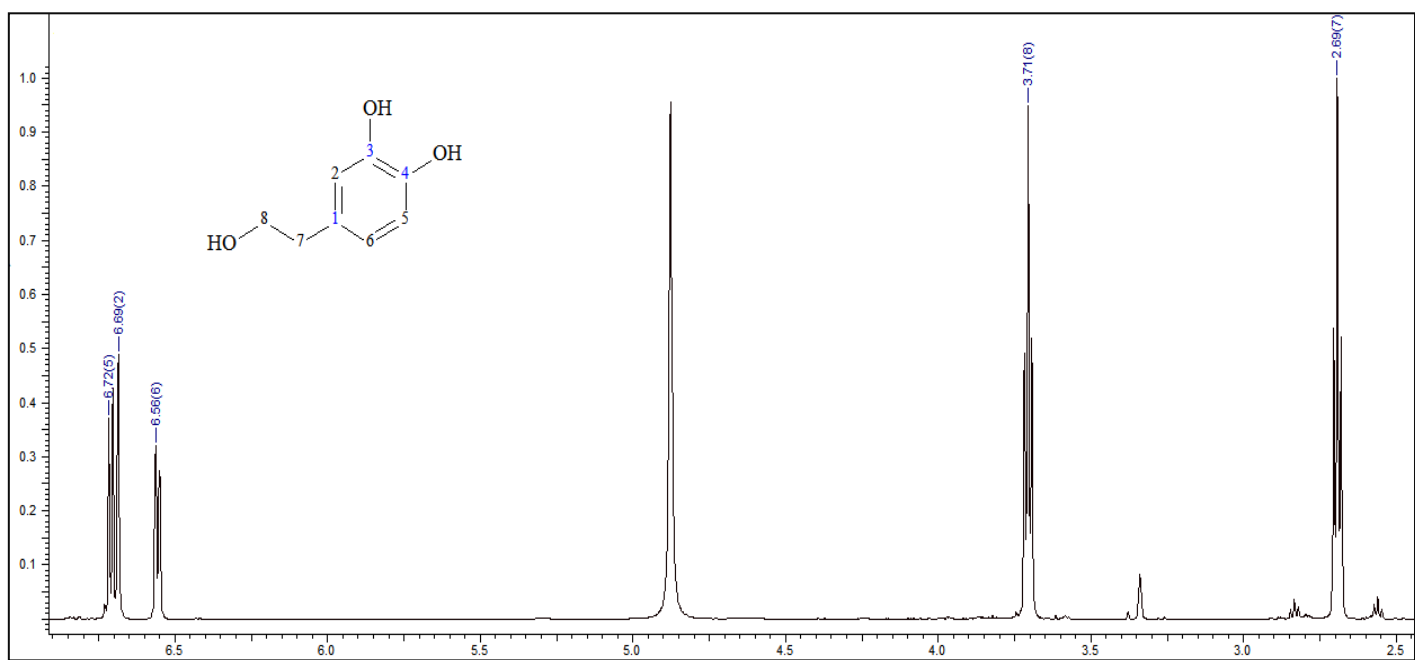
NOESY (CDCl₃)

Tyrosol



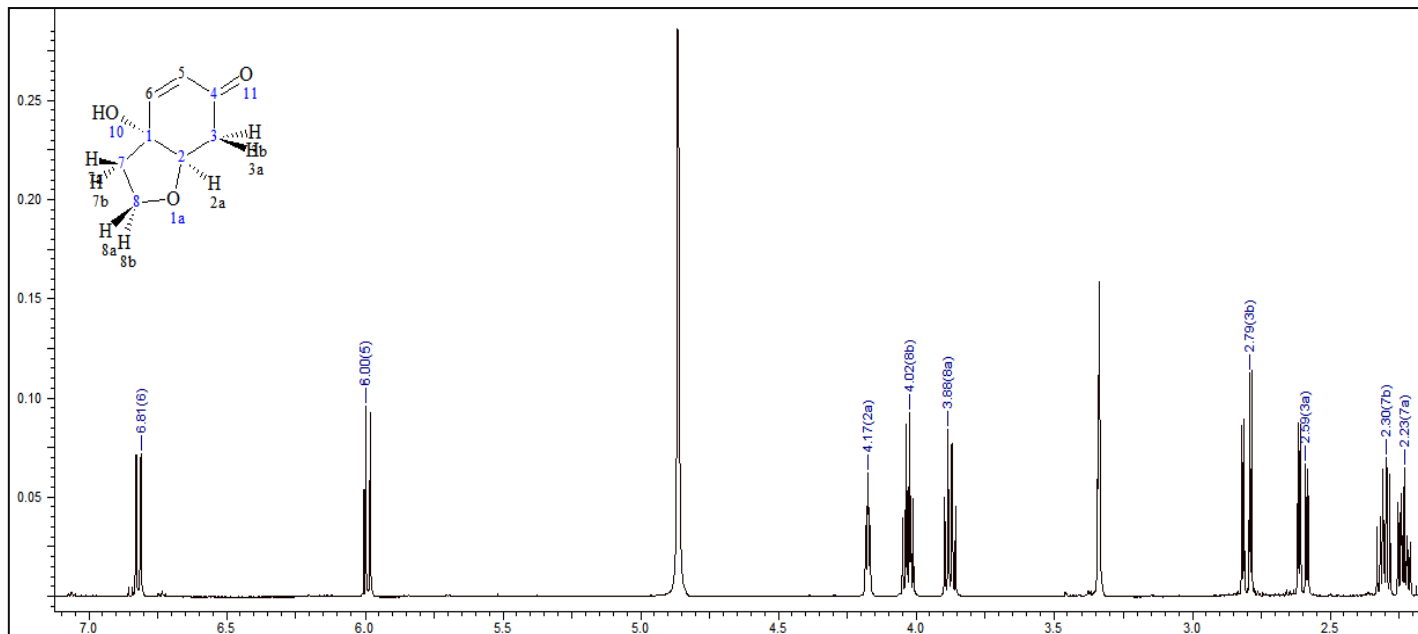
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD)

Hydroxytyrosol

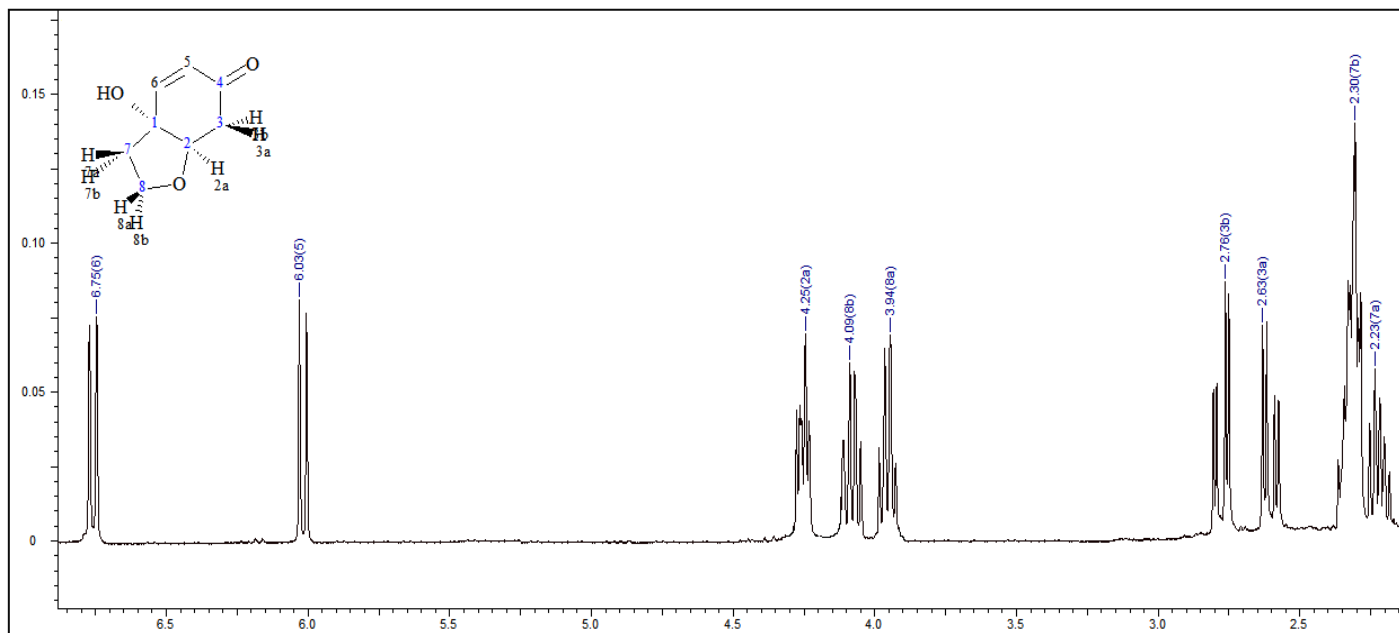


$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD)

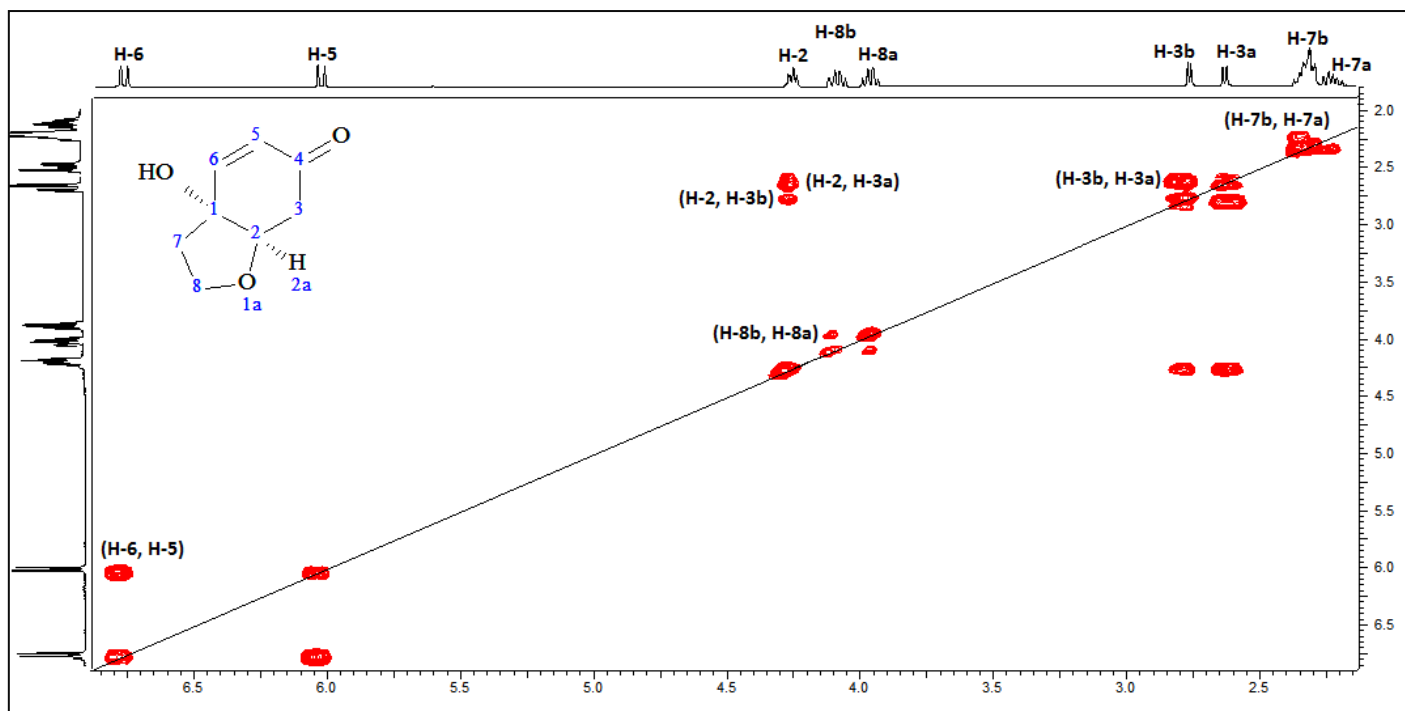
Halleridone



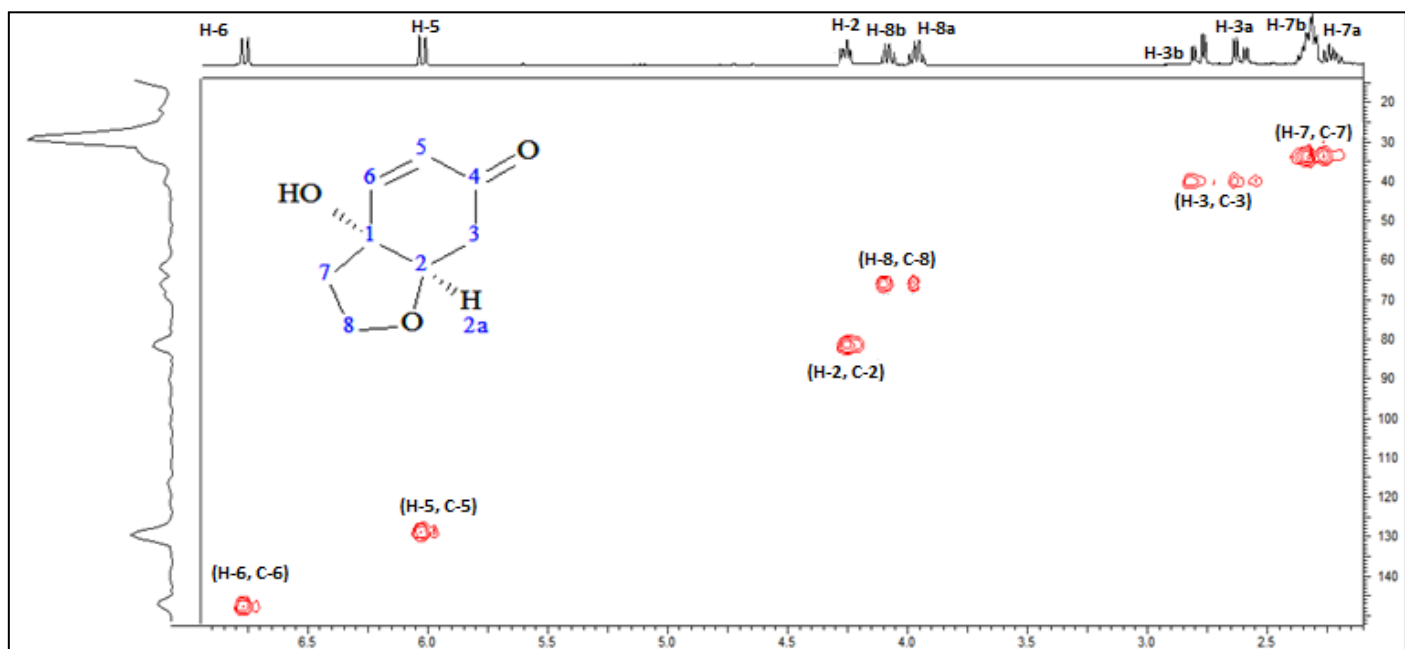
¹H-NMR (CD₃OD)



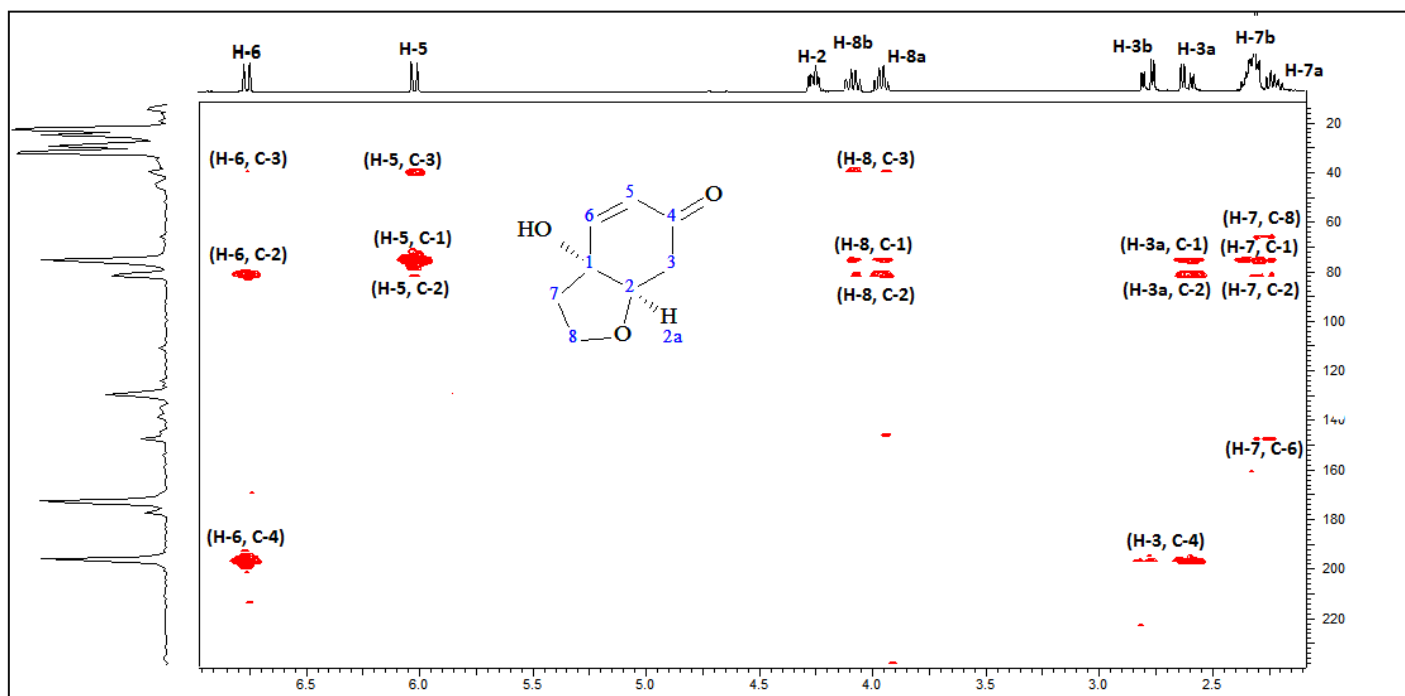
¹H-NMR (CDCl₃)



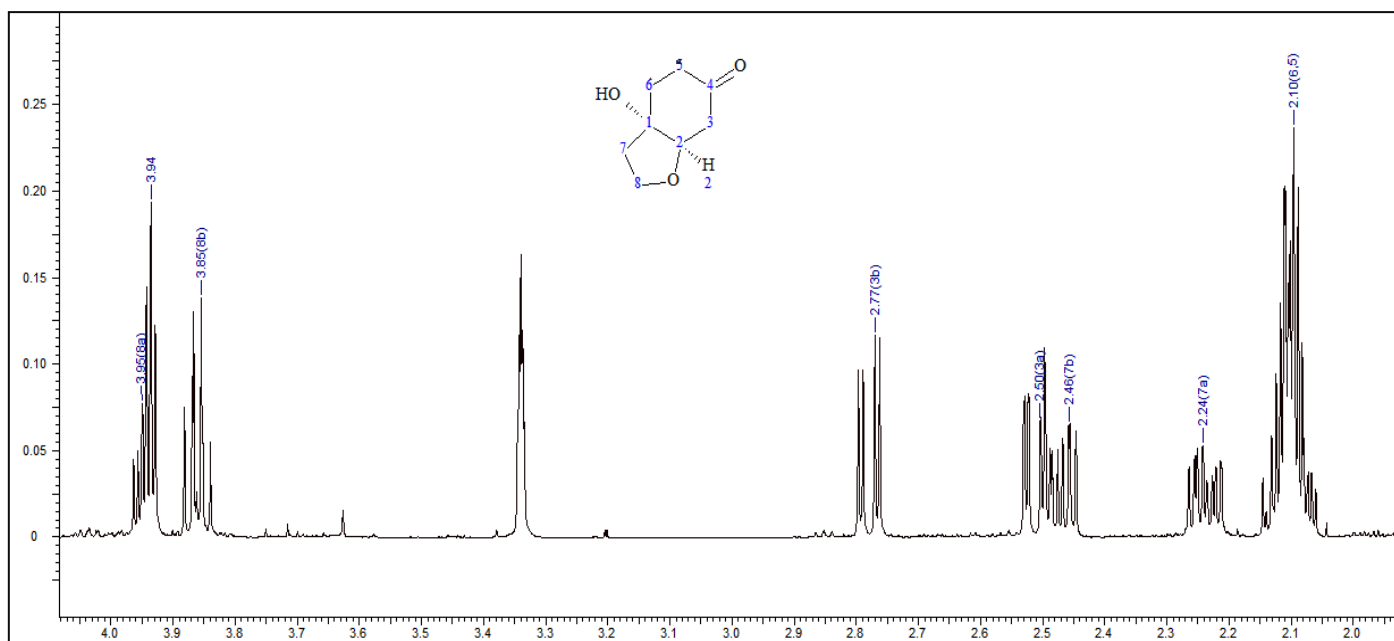
$^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (CDCl_3)

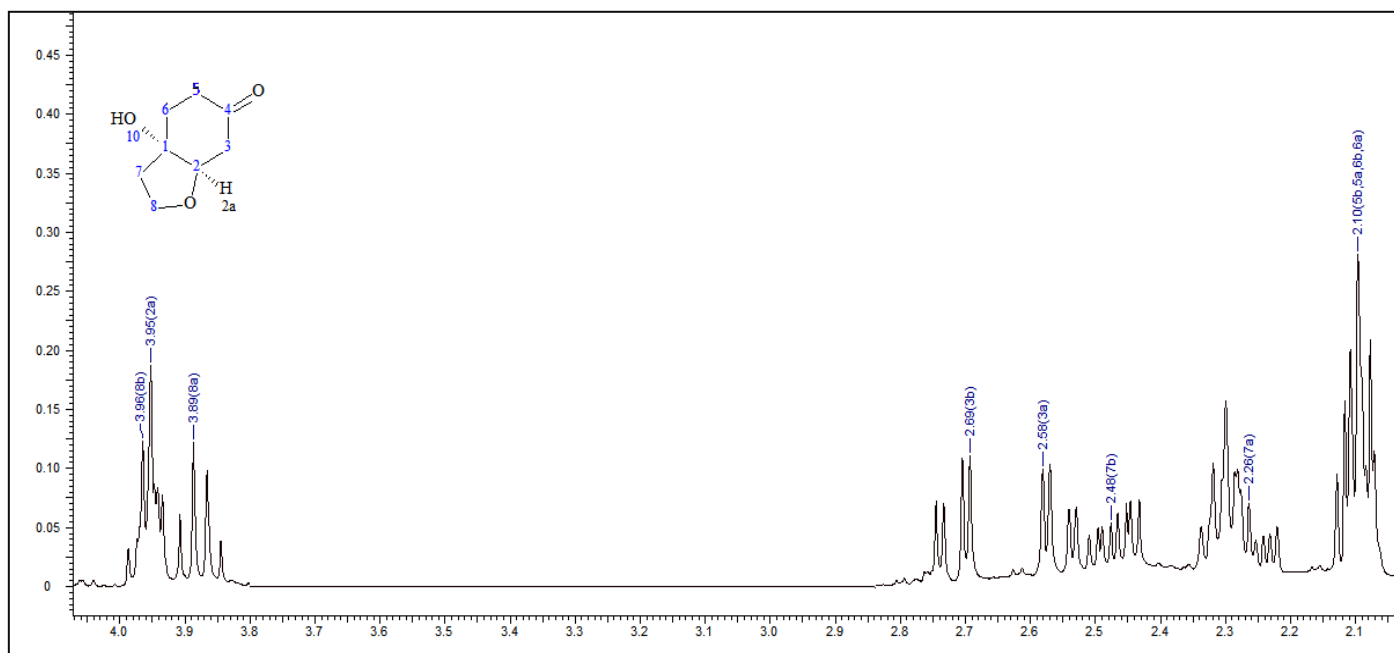


HSQC – DEPT (CDCl_3)



Cleroindicin C






$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD)

1 Isolation of Megaritolactones and Other Bioactive Metabolites from
2 'Megaritikí' Table Olives and Debittering Water

3 Evgenia Mousouri, Eleni Melliou, and Prokopios Magiatis*

4 Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis
5 Zografou, GR-15771 Athens, Greece6  Supporting Information7 **ABSTRACT:** 'Megaritikí' is an olive cultivar widely used in Greece for the production of low polyphenol olive oil and table
8 olives. To investigate possible metabolic differentiation in comparison with other varieties, the composition of 'Megaritikí' olive
9 fruits and wastewaters from the debittering procedure was studied. Moreover, the recovery of bioactive metabolites from
10 wastewater using adsorption resin was studied to exploit this byproduct. Metabolites in fruits and wastewaters were monitored
11 using NMR spectroscopy. The major constituents of wastewater were hydroxytyrosol-4-O-glucoside, 11-methyl-oleoside,
12 hydroxytyrosol, and tyrosol but not oleuropein. Furthermore, wastewater afforded renyoxoide and renyoxoside B, which are for
13 the first time isolated from olives. The final edible olives, besides hydroxytyrosol and tyrosol, contained renyoxoide and
14 cleroidicin C, which are the first isolated from the species, haleridone for the first time isolated from edible olives, and four
15 metabolites, which are the first reported as natural products, megaritodilactone, megaritolactonic acid, methyl ester of
16 megaritolactonic acid B, and megaritolaconol.17 **KEYWORDS:** *Olea europaea*, 'Megaritikí', table olives, iridoid, qNMR

18 ■ INTRODUCTION

19 Table olives are used as a typical part of the Mediterranean diet
20 since antiquity. They contain a large number of minor
21 constituents¹ with interesting bioactivities, which are mainly
22 dependent on the olive variety and the followed debittering
23 process.^{2,3} In general, olive fruits undergo a debittering
24 procedure that removes totally or partially the natural bitterness
25 that is mainly due to oleuropein, 1. A few years ago, we
26 performed a screening of the major table olive varieties found in
27 the Greek market, and we identified varieties with high
28 oleuropein, 1, and/or hydroxytyrosol, 2, content in the final
29 edible product.³ Both compounds have important antioxidant
30 activities, and they have been correlated with protection from
31 LDL oxidation.⁴ The role of hydroxytyrosol and oleuropein
32 derivatives has been recently recognized by the European
33 Union for olive oil but not yet for edible olives. A significant
34 observation⁵ concerning the olive debittering method was that
35 the use of dry salt and not brine can lead to table olives with
36 high oleuropein content and potentially increased health
37 protecting properties. However, one of the varieties that had
38 been included in the previous study and that had been treated
39 with dry salt without giving high oleuropein content was cv.
40 'Megaritikí'. This fact had been initially attributed to a possible
41 metabolic differentiation of that specific variety without further
42 study.43 Meanwhile, we studied extensively the olive oil produced by
44 the major olive oil producing varieties in Greece, and again we
45 found that the olive oil from cv. 'Megaritikí' presented very low
46 concentration of secoiridoid derivatives (oleocanthal, oleacein,
47 oleuropein aglycone, and ligstroside aglycone).⁵ This specific
48 variety is widely cultivated in regions like Attica for the
49 production of both table olives and olive oil (dual use variety).
50 The olive oil of that cultivar is known in the market as a low51 bitterness oil, which is in accordance with the low recorded
52 content of the usual secoiridoid derivatives responsible for
53 pungency and bitterness. Moreover, the table olives from that
54 variety belong to a group of cultivars that require traditionally
55 little processing to debitter, indicating that oleuropein levels in
56 the untreated fruit of this variety are lower comparatively to
57 others. A simple method, known since antiquity for the
58 debittering of this variety, is crushing and placement for a few
59 days in water. The olives produced with this method are
60 traditionally known as "klastades".61 All of the above observations led us to investigate that
62 specific variety for possible metabolic differentiation. For this
63 purpose, we studied the initial metabolic profile of the
64 untreated olive fruits for the presence of oleuropein, and in a
65 next step we studied the major compounds recovered from the
66 debittering wastewater, and finally we studied the chemical
67 constituents of the final edible product (Figure 1). 67

68 ■ MATERIALS AND METHODS

69 **General Experimental Procedures.** NMR spectra were recorded
70 on Avance 600 (with cryoprobe) and DRX400 spectrometers (Bruker,
71 Rheinstetten, Germany); chemical shifts are expressed in ppm
72 downfield from TMS. Column chromatography was performed on
73 columns containing Si gel 60 (40–63 μm) (Merck, Darmstadt,
74 Germany). Thin layer chromatography (TLC) was performed on
75 plates coated with Si gel 60 F₂₅₄ Merck, 0.25 mm. For HPLC–MS
76 analysis, the column used was a 150 mm × 2.0 mm i.d., 5 μm,
77 PolymerX RP-1 (Phenomenex, Torrance, CA). Samples (5 μL) were
78 dissolved in methanol and injected onto HPLC–MS. A standard

Received: October 17, 2013

Revised: December 30, 2013

Accepted: January 2, 2014