

Capitolo 1

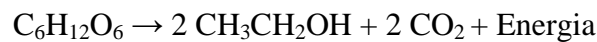
Gli aromi del vino

1.1 – Introduzione

1.1.1 – Composizione chimica del vino: sostanze principali

Dal punto di vista chimico, il vino è una soluzione idroalcolica formata da sostanze contenute negli acini di uva e da prodotti provenienti dalla fermentazione del mosto e delle vinacce. Tali sostanze concorrono all'insieme di sensazioni gustative, olfattive e tattili che costituiscono il cosiddetto *flavour* di ogni vino.

L'acqua è la componente principale negli acini d'uva; l'alcol invece non è naturalmente contenuto in essi, bensì è prodotto da un processo definito "fermentazione alcolica" ad opera di alcuni microorganismi, in maggioranza lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*, presenti in grande quantità sulle bucce degli acini:



Questa reazione conduce alla formazione di etanolo, l'alcol maggiormente contenuto nel vino, a partire dagli zuccheri fermentescibili quali glucosio e fruttosio. La fermentazione, tuttavia, può generare un'ampia serie di sottoprodotti, tra cui i più comuni sono glicerina, alcoli superiori e acidi organici, alcuni già di per sé presenti:

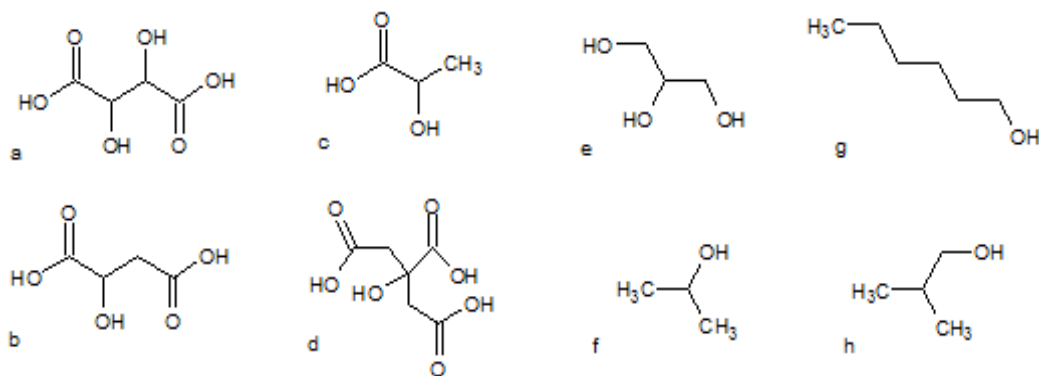


Figura 1.1 – Alcune molecole che possono essere ritrovate nel vino: a) acido tartarico; b) acido malico; c) acido lattico; d) acido citrico; e) glicerolo; f) isopropanolo; g) 1-esanolo; h) isobutanolo

I soluti presenti in maggior quantità nel vino (circa il 95%) sono sicuramente gli zuccheri, tra cui spiccano per abbondanza gli esosi glucosio e fruttosio; meno abbondanti sono il ramnosio, i pentosi arabinosio e xylosio, nonché alcuni saccaridi più complessi come il saccarosio e la pectina:

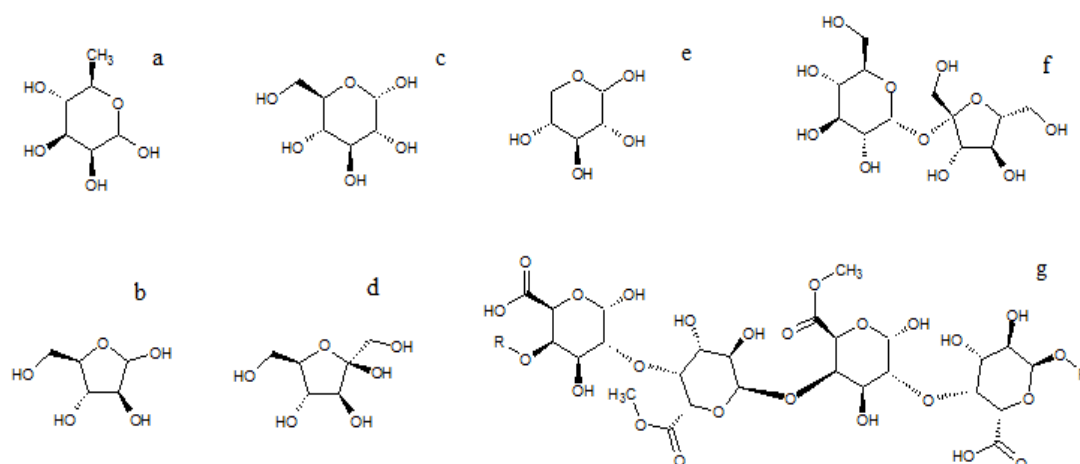


Figura 1.2 – Alcuni saccaridi presenti nel vino: a) ramosio; b) arabinosio; c) glucosio; d) fruttosio; e) xylosio; f) saccarosio; g) pectina

Generalmente gli zuccheri si trovano ciclizzati in anelli a cinque o sei atomi e prendono pertanto la denominazione di furanosidi e piranosidi. La ciclizzazione avviene per attacco nucleofilo di un ossidrile al carbonile; siccome quest'ultimo è libero di ruotare attorno al legame C-C, a seconda che l'attacco conduca ad avere il carbonio in configurazione R o S, si otterranno due diversi diastereoisomeri denominati anomero α e β , in equilibrio in soluzione (mutarotazione):

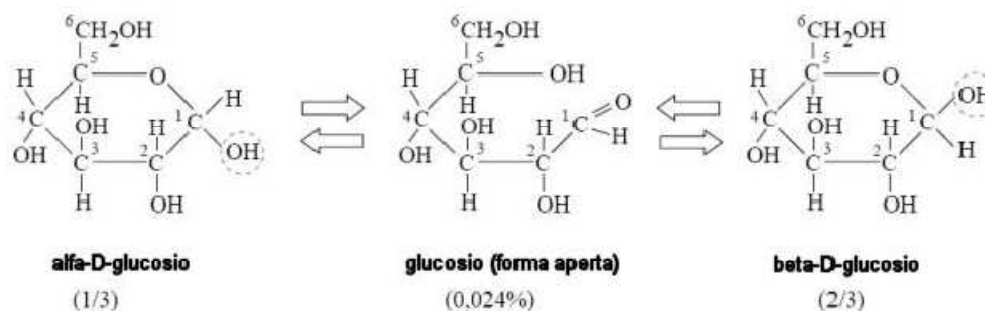


Figura 1.3 – Interconversione tra le diverse forme di D-glucosio

1.1.2 – Composizione chimica del vino: sostanze minoritarie

La complessità e la varietà degli aromi dei diversi vini è determinata dalla grande variabilità nella loro composizione chimica; in particolare, ciò che determina le differenti note e sensazioni che ogni aroma possiede è l'insieme dei componenti minoritari, cioè delle molecole contenute in piccola percentuale all'interno della matrice enologica. Le classi principali di tali molecole sono i polifenoli e gli isoprenoidi; altri composti che concorrono all'aroma sono composti tiolici e azotati, anche se tali molecole contribuiscono spesso con sentori non sempre piacevoli e quindi devono essere opportunamente controllate e miscelate.

Come suggerisce il nome, i polifenoli sono contraddistinti da due o più gruppi fenolici. All'interno della famiglia dei polifenoli si collocano gli acidi fenolici e i flavonoidi; tra questi ultimi sono famosi gli antociani, molecole responsabili del colore del vino. I polifenoli determinano appunto il colore, l'astringenza, l'amaro e concorrono all'aroma del vino, direttamente o in seguito ad interazioni con molecole come proteine, polisaccaridi o altri polifenoli. Tre importanti polifenoli presenti in vari vini sono:

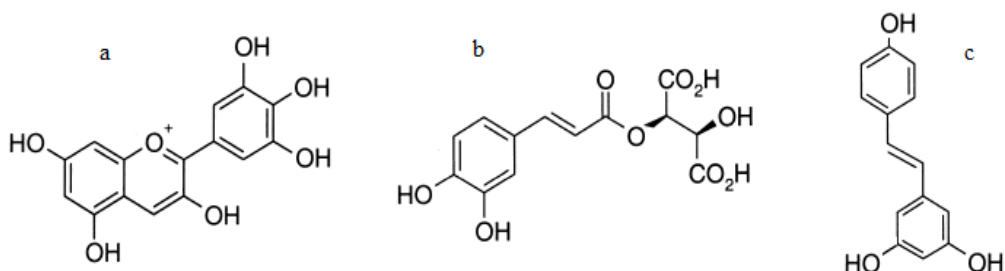


Figura 1.4 – Alcuni polifenoli ritrovabili nel vino: a) delphinidina; b) acido caftarico; c) resveratrolo

Spesso queste molecole sono presenti come glicosidi, cioè legati a saccaridi.

Le molecole derivanti da combinazioni di unità isopreniche sono principalmente i terpeni e i norisoprenoidi; questi ultimi derivano dalla degradazione ossidativa di tetraterpeni quali il carotene e il licopene. L'unità isoprenica è rappresentata in figura:

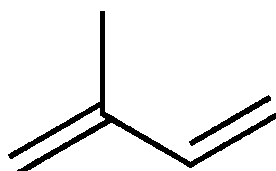


Figura 1.5 – 2-metil-1,3-butadiene, comunemente detto isoprene

I composti appartenenti a questa classe sono in molti casi molecole caratterizzate da un aroma specifico, che spesso è richiamato dal nome stesso della molecola: per

dell'epossido. In ambiente acido, come nel caso specifico di matrici enologiche, avviene l'attacco di una molecola d'acqua all'anello ossiranico, causandone l'apertura. Il pH basso poi induce la protonazione di un gruppo -OH, a cui segue la perdita di una molecola d'acqua; il gruppo ossidrilico in posizione "3" si lega al carbonio recante la carica positiva, libera H^+ e forma così un eterociclo a cinque o sei atomi:

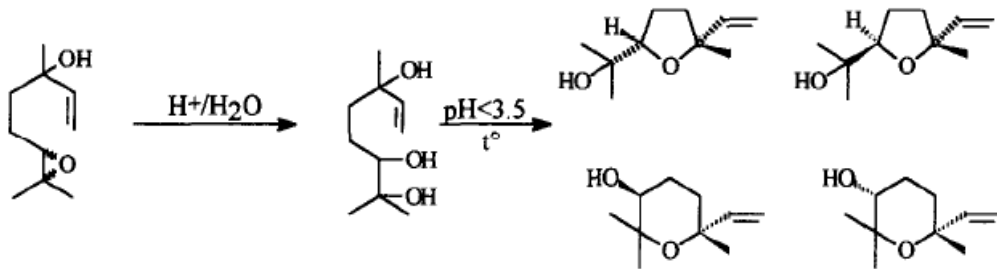


Figura 1.8 – Via biosintetica di formazione degli ossidi ciclici del linalolo

Nelle matrici enologiche anche i terpeni si ritrovano comunemente glicosilati; la via biosintetica preferenziale sembra essere la semplice formazione di legame per condensazione (con perdita di una molecola d'acqua) tra terpene e zucchero. Il saccaride trovato legato direttamente al terpene finora è sempre il glucosio, mentre zuccheri minoritari come fruttosio o mannosio, se presenti, sono trovati legati al glucosio e mai direttamente al terpene. La parte della molecola che concorre all'aroma è però il terpene stesso, che per essere percepito dai sensi deve essere liberato dal legame glucosidico. I terpeni glicosilati sono pertanto definiti essere "precursori dell'aroma": una volta che il succo d'uva diviene vino, queste molecole subiscono attività enzimatica, che scinde il legame tra le due specie liberando la componente sensorialmente attiva, definita pertanto aglicone.

1.2 – Scopo dell’elaborato

1.2.1 – Analisi del vino, stato dell’arte

La conoscenza delle caratteristiche aromatiche e delle possibili correlazioni tra le diverse specie libere e legate, nonché dei loro metaboliti, rappresenta una necessità fondamentale per chi opera nel settore enologico al fine di ottimizzare la qualità dei prodotti.

Gli studi analitici finora svolti mostrano l’utilizzo prevalente di tecniche cromatografiche e di massa (GC-EIMS, GC-CIMS, HPLC-MS/MS) per l’identificazione e la quantificazione delle molecole caratterizzanti l’aroma dei vini, spesso precedute da arricchimento. Anche nello studio dei precursori, e più in dettaglio dei terpeni glicosilati, le tecniche cromatografiche e di massa sono quelle più diffuse; in questi casi è prassi comune scindere a priori il legame glicosidico mediante idrolisi enzimatica o chimica, al fine di poter più facilmente separare i vari terpeni.

L’uso di tecniche NMR in ambito enologico non è molto diffuso, se si esclude l’ormai consolidata tecnica della distinzione geografica basata sull’analisi isotopica. In generale, l’applicazione di metodologie NMR a matrici alimentari è relativamente recente. Oltre alla intrinseca bassa sensibilità, il costo elevato della strumentazione NMR è responsabile della scarsa diffusione di questa tecnica in ambiti diversi da quelli di ricerca; tuttavia, gli sviluppi strumentali e la velocizzazione delle misure NMR portano ad una crescente utilizzazione per sfruttarne gli indubbi vantaggi. L’NMR, infatti, è in grado di fornire notevoli informazioni strutturali sui composti di interesse e può permettere pertanto di aggirare uno degli ostacoli principali che si possono incontrare utilizzando la spettrometria di massa: l’isomeria strutturale.

Nei lavori finora redatti, l’analisi mediante risonanza magnetica nucleare dei terpeni glicosilati, nei casi in cui è stata effettuata, è un passaggio successivo alla scissione del legame glicosidico e quindi si può definire un’analisi di agliconi e saccaridi in separata sede. Per poter analizzare gli zuccheri è usuale effettuare una derivatizzazione, spesso con gruppi acetato, per incentivare la solubilità di molecole polari nei solventi apolari solitamente usati all’NMR e al contempo per agevolare l’identificazione osservando proprio i segnali dei sostituenti legati. Tuttavia tale metodologia è applicabile in matrici relativamente semplici e non in una miscela dove siano presenti molti saccaridi. Gli zuccheri, infatti, rappresentano una classe di molecole particolarmente difficili da studiare mediante NMR: la maggior parte dei protoni dei saccaridi risuona entro i 3 e i 4ppm, comportando spesso sovrapposizioni che impediscono la facile interpretazione degli spettri.

È evidente che la complessità e la lunga durata dell’iter preparatorio e della successiva analisi dei campioni rende i terpeni glicosilati una classe di composti particolarmente difficile da studiare. Si ritrova infatti che in letteratura sono presenti pochi studi riguardanti applicazioni di tecniche spettroscopiche per la valutazione del contenuto in composti glicosilati all’interno matrici enologiche.

1.2.2 – Progetto PRIN

Il seguente elaborato è inserito nel Programma di Ricerca scientifica di rilevante Interesse Nazionale intitolato “Metodiche NMR e di spettrometria di massa per lo studio di matrici enologiche. Speciazione e classificazione delle specie coinvolte nello sviluppo dell’aroma con un approccio metabolomico.”. L’attività di questa ricerca prevede:

- sviluppo di metodiche cromatografiche, liquide e gassose con rivelazione a spettrometria di massa per la determinazione dei costituenti l’aroma, dei loro precursori e metaboliti, a livello di tracce;
- sviluppo di procedure NMR per la individuazione e quantificazione dei costituenti l’aroma, dei loro precursori e metaboliti, nelle matrici enologiche;
- sviluppo ed applicazione di metodi statistici robusti per comparare misure spettroscopiche (NMR) con quelle cromatografiche (GC-MS e LC-MS) per valutare effetti matrice, per validare (limiti di rivelabilità, incertezze, ecc.) le nuove procedure di analisi. Inoltre si cercherà di classificare le complesse matrici enologiche con “analisi cieche” che utilizzano misure NMR aspecifiche operando altresì un confronto con analoghe misure FT-IR.

Questo lavoro di tesi è focalizzato sul secondo punto del progetto, cioè sull’analisi NMR (affiancata da tecniche cromatografiche abbinate a spettrometria di massa) atta a individuare all’interno di matrici enologiche le molecole precursori dell’aroma e in particolare i terpeni glicosilati. Lo scopo è quello di riuscire a identificare ed assegnare quante più molecole possibili mediante un’analisi senza prelievi derivatizzazioni, per ovviare alle problematiche elencate nel precedente paragrafo.

Capitolo 2

Teoria e applicazioni della Risonanza Magnetica Nucleare

2.1 – Basi dell’NMR

2.1.1 – Momento magnetico di spin nucleare

Secondo la teoria quantomeccanica, ogni nucleo possiede un momento di spin nucleare \mathbf{I} ; i nuclei che hanno \mathbf{I} non nullo possiedono un momento angolare \mathbf{J} , il cui modulo è dato dall’equazione:

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

A \mathbf{J} è associato un momento di dipolo magnetico $\boldsymbol{\mu}$ a esso parallelo:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma\mathbf{J}$$

La costante γ , definita rapporto giromagnetico, è differente per ogni nucleo:

Nucleo	A. N. I. (%)	I	γ (10^7 rad T ⁻¹ s ⁻¹)
¹ H	99.99	1/2	26.75
² H	0.01	1	4.11
¹² C	98.90	0	/
¹³ C	1.10	1/2	6.73
¹⁴ N	99.63	1	1.93
¹⁵ N	0.37	1/2	-2.71
¹⁶ O	99.76	0	/
¹⁷ O	0.038	5/2	-3.63
¹⁹ F	100	1/2	25.18
³⁵ Cl	75.77	3/2	2.62
³⁷ Cl	24.23	3/2	2.18

Tabella 2.1 – Abbondanza naturale isotopica, numero quantico di spin nucleare e rapporto giromagnetico di alcuni dei nuclei più comuni in chimica organica

In presenza di un campo magnetico esterno \mathbf{B}_0 (per convenzione diretto lungo l’asse z in un sistema di riferimento cartesiano), l’interazione torcente tra \mathbf{B}_0 e $\boldsymbol{\mu}$ genera un movimento del vettore $\boldsymbol{\mu}$, che precede intorno all’asse z con una precisa frequenza detta frequenza di Larmor (ω_0):

$$\omega_0 = -\gamma\mathbf{B}_0$$

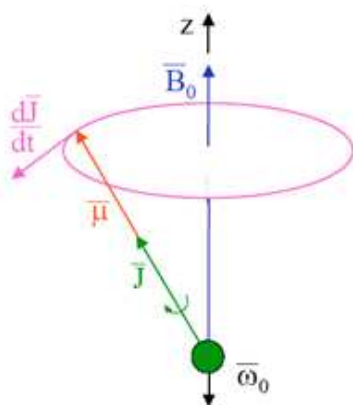


Figura 2.1 – Precessione di \mathbf{J} attorno all'asse di \mathbf{B}_0

In questa condizione, \mathbf{J} può assumere solo orientazioni tali per cui la sua proiezione su z sia pari al prodotto tra \hbar e \mathbf{m} , momento magnetico di spin, il cui modulo assume valori discreti compresi tra $+I$ e $-I$ ($-I, -I+1, \dots, I-1, I$):

$$\mathbf{J}_z = \mathbf{m}\hbar \quad \mu_z = \gamma\mathbf{m}\hbar$$

Per nuclei con I pari a $1/2$, come ^1H e ^{13}C , il modulo di \mathbf{m} assumerà pertanto solo i valori $+1/2$ e $-1/2$, rispettivamente associati ai due stati di spin nucleare α e β . Dall'equazione di Planck si ricava che:

$$E_m = m\hbar\omega = -m\gamma\hbar\mathbf{B}_0$$

e quindi la differenza in energia tra i due stati di spin è 0 (degeneri) in assenza di \mathbf{B}_0 , mentre in caso contrario sarà non nulla per effetto Zeeman:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = 1/2\gamma\hbar\mathbf{B}_0 - (-1/2\gamma\hbar\mathbf{B}_0) = \gamma\hbar\mathbf{B}_0$$

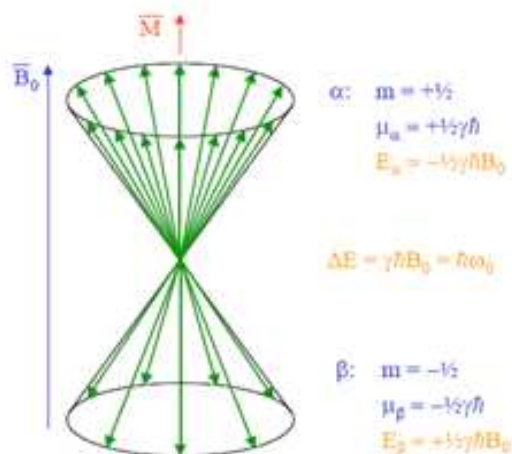


Figura 2.2 – Distribuzione di popolazione di spin tra i livelli α e β

In un sistema macroscopico di N spin, gli stati α a energia minore saranno più popolati degli stati β , secondo la distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-\gamma\hbar B_0}{kT}}$$

A temperatura ambiente lo scarto di popolazione fra i due stati è dell'ordine delle centinaia di parti per milione, poiché la differenza di energia tra i due stati di spin è molto piccola. Tale disuguaglianza si traduce in una sovrabbondanza di spin α , i quali precedono attorno a z senza coerenza; le componenti lungo x e lungo y sono pertanto annullate per entropia, mentre le componenti lungo z vanno a costituire la magnetizzazione macroscopica (\mathbf{M}). L'entità di \mathbf{M} dipende quindi dai nuclei in esame, dalla temperatura di lavoro e dal campo magnetico utilizzato. Generalmente si considera l'NMR una tecnica intrinsecamente poco sensibile, in quanto la differenza di popolazione nelle condizioni sperimentali ordinarie è minima; ne consegue che la concentrazione dei campioni deve generalmente essere alta, almeno millimolare, per poter avere buoni risultati. L'esperimento NMR si basa sull'osservazione delle transizioni indotte tra i livelli energetici di spin nucleare. Per indurre tali transizioni si deve generare un'interazione tra gli spin e il campo magnetico oscillante di una radiazione elettromagnetica, la quale deve avere una componente perpendicolare a \mathbf{B}_0 per rendere non nullo il momento di transizione. Le regole di transizione impongono che la variazione del modulo di \mathbf{m} sia unitaria, positiva o negativa, e quindi le transizioni permesse sono denominate SQC, coerenza a singolo quanto.

2.1.2 – Chemical shift

Ogni nucleo è circondato da elettroni, i cui moti originano degli effetti di schermo sui nuclei stessi:

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0(1 - \sigma)$$

Il campo magnetico effettivamente sentito da un nucleo non è \mathbf{B}_0 , bensì una sua variazione dovuta all'intorno chimico del nucleo stesso, rappresentato dalla costante di schermo σ . A seconda che σ sia positiva o negativa, in altre parole che i \mathbf{B}_{el} siano complessivamente concordi o discordi a \mathbf{B}_0 laddove interagiscono col nucleo d'interesse, l'effetto sarà rispettivamente di schermatura e di deschermatura. La variazione di frequenza di risonanza dovuta a questo fenomeno è definita *chemical shift* (δ), che sperimentalmente si indica come una differenza in ppm, parti per milione, rispetto a una frequenza standard:

$$\delta = \frac{\nu_0 - \nu_{\text{rif}}}{\nu_{\text{rif}}} 10^6$$

Il *chemical shift* è la proprietà che permette di distinguere nuclei uguali ma con intorni chimici diversi negli spettri NMR. La scala in ppm è creata assegnando usualmente il valore zero al *chemical shift* dei ^1H del TMS, tetrametilsilano, composto in cui i dodici protoni equivalenti sono molto schermati dall'atomo elettropositivo di Si e che solitamente è aggiunto ai solventi in quantità minime.

Il *chemical shift* è anisotropo, perché le differenti orientazioni della molecola provocano variazioni dell'effetto dei \mathbf{B}_{el} sui nuclei; tale anisotropia può essere descritta da un tensore, il quale in un opportuno sistema di riferimento, detto degli assi principali, può essere rappresentato come una matrice diagonale:

$$\tilde{\sigma} = \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{bmatrix}$$

Siccome la descrizione in un sistema totalmente anisotropo è complessa, per semplificare si considera che in prima approssimazione il sistema sia assiale e quindi che le componenti σ_{xx} e σ_{yy} siano uguali (σ_{\perp}) fra loro e diverse da σ_{zz} (σ_{\parallel}). Il valore $\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$ viene definito CSA, cioè anisotropia del *chemical shift*.

2.1.3 – Accoppiamento scalare

L'accoppiamento scalare (J) è un'interazione indiretta di polarizzazione "a catena" fra due nuclei trasmessa attraverso gli elettroni di legame e decresce rapidamente col numero di legami che separano i due nuclei. L'accoppiamento scalare è apprezzabile per nuclei distanziati da tre o meno legami, anche se esistono alcune eccezioni importanti come nel caso di molecole aromatiche o con doppi legami. Le interazioni che generano tale accoppiamento sono l'interazione di contatto di Fermi, il principio di esclusione di Pauli e la regola di massima molteplicità di Hund: il primo postulato assume che lo spin nucleare interagisce con gli spin elettronici, attraendo preferenzialmente quelli di segno opposto; il secondo enuncia che i due elettroni di un orbitale debbano avere spin diverso; il terzo afferma che quando più orbitali degeneri sono occupati da elettroni, questi hanno il medesimo spin.

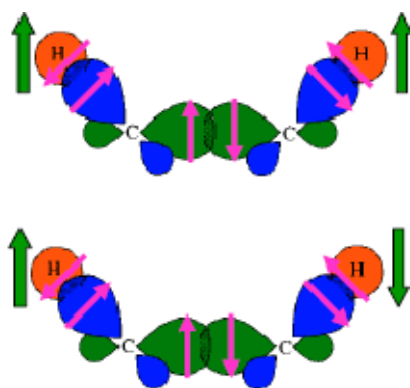


Figura 2.3 – Polarizzazione "a catena" degli spin elettronici dovuta alle tre regole fondamentali; nel primo caso ($H\alpha$ e $H\alpha$ o $H\beta$ e $H\beta$) l'interazione di Fermi è sfavorevole per il nucleo a destra, nel secondo ($H\alpha$ e $H\beta$ o viceversa) è favorevole

Dalla *figura 2.3* si evince che l'interazione tra due nuclei con spin nucleare uguale sia sfavorita, cioè a energia leggermente maggiore, rispetto all'interazione fra nuclei con spin nucleari diversi, a energia leggermente minore. Due nuclei A e X, protoni per esempio, che non sono accoppiati scalarmente possono essere rappresentati con il seguente diagramma:

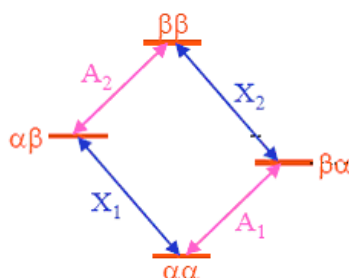


Figura 2.4 – Livelli energetici in un sistema di due spin, A e X, in assenza di accoppiamento scalare

dove con A_1, A_2, X_1, X_2 sono rappresentate le transizioni di spin dei due nuclei, che per uno stesso nucleo avvengono alla medesima frequenza ($A_1 = A_2$ e $X_1 = X_2$). L'energia del sistema può essere descritta secondo la formula:

$$E/h = -\sum_i \nu_i m_i$$

Nel caso in cui invece A e X siano accoppiati scalarmente tra loro si deve sommare all'energia canonica un termine ulteriore che dipende proprio dall'entità dell'accoppiamento e dagli spin nucleari:

$$E/h = -\sum_i \nu_i m_i + \sum_i \sum_{j>i} J_{ij} m_i m_j$$

Per nuclei con lo stesso m il termine aggiunto è positivo e quindi aumenta l'energia dello stato di spin; viceversa per nuclei con m discorde:

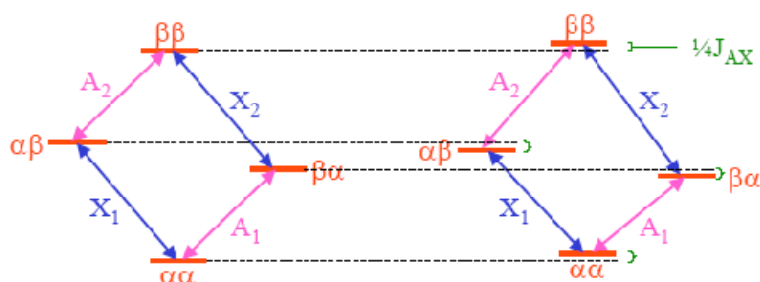


Figura 2.5 – Livelli energetici in un sistema di due spin, A e X, in cui è presente l'accoppiamento scalare

La variazione in energia è di $\pm 1/4 J$ per ogni stato di spin, poiché m in modulo è $1/2$ per i protoni; di conseguenza le energie delle transizioni risulteranno abbassate o incrementate di $1/2 J$. In conclusione, in un sistema AX dove i due nuclei non sono accoppiati le transizioni di spin sono degeneri e quindi ogni nucleo genera un unico segnale, “singoletto”; invece se l'accoppiamento scalare è presente le transizioni sono differenti in energia (e quindi in frequenza) e ogni segnale si presenta come un “doppietto” centrato alla frequenza di Larmor del nucleo generatore, dove la distanza fra i picchi è proprio la costante di accoppiamento J . In sistemi più complicati, ovviamente, le molteplicità saranno a loro volta più complesse.

2.1.4 – Accoppiamento dipolare

Quando due dipoli si trovano vicini nello spazio, si instaura un'interazione definita accoppiamento dipolare che dipende dall'entità dei dipoli stessi, dalla distanza interdipolo (r) e dalla loro orientazione relativa nello spazio (θ). Nel caso di un sistema costituito da più nuclei, si considerano come dipoli i momenti magnetici di spin nucleare, il cui modulo dipende dal rapporto giromagnetico e quindi dal tipo di nucleo:

$$D_{AB} \approx \frac{\hbar \gamma_A \gamma_B}{4\pi r_{AB}^3} (1 - \cos^3 \theta)$$

In soluzione i moti molecolari sono totalmente casuali, quindi si realizza una situazione di isotropicità in cui l'orientazione è mediata dai moti rotazionali e conseguentemente D si annulla. Normalmente negli esperimenti NMR condotti su campioni in soluzione l'interazione dipolare non è osservabile e quindi non si riescono a ricavare parametri spaziali in essa contenuti; tuttavia la mediazione non impedisce che l'accoppiamento dipolare origini campi magnetici fluttuanti, grazie alle diverse interazioni interdipolari che si instaurano durante i moti molecolari. Queste fluttuazioni sono quelle che rendono possibili alcune transizioni normalmente proibite dalle regole di selezione, le transizioni con $\Delta m = 2$ e $\Delta m = 0$ denominate rispettivamente DQC o W_2 e ZQC o W_0 (coerenza a doppio e a zero quanto). Considerando due nuclei I e S (per comodità di rappresentazione non accoppiati scalarmente, anche se nella realtà i due accoppiamenti possono coesistere), si possono riassumere le transizioni nel seguente schema:

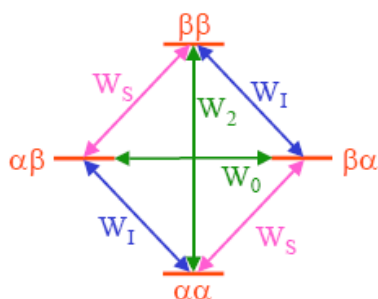


Figura 2.6 – Transizioni tra i livelli energetici in un sistema di due spin, I e S; in verde sono rappresentate le transizioni proibite dalle regole di transizione

Le probabilità di transizione sono proporzionali a r^{-6} , quindi la trattazione è efficace solo per nuclei spazialmente vicini. Le variazioni di popolazione tra i vari stati di spin possono essere trattate con un approccio cinetico, ottenendo le seguenti espressioni:

$$\begin{aligned}\frac{d\mathbf{I}_z}{dt} &\propto \frac{dN_{\alpha\alpha}}{dt} - \frac{dN_{\alpha\beta}}{dt} + \frac{dN_{\beta\alpha}}{dt} - \frac{dN_{\beta\beta}}{dt} \\ \frac{d\mathbf{S}_z}{dt} &\propto \frac{dN_{\alpha\alpha}}{dt} - \frac{dN_{\beta\alpha}}{dt} + \frac{dN_{\alpha\beta}}{dt} - \frac{dN_{\beta\beta}}{dt} \\ \frac{d\mathbf{I}_z}{dt} &\propto - (W_0 + 2W_1 + W_2) (\mathbf{I}_z - \mathbf{I}_0) - (W_2 - W_0) (\mathbf{S}_z - \mathbf{S}_0) \\ \frac{d\mathbf{S}_z}{dt} &\propto - (W_0 + 2W_S + W_2) (\mathbf{S}_z - \mathbf{S}_0) - (W_2 - W_0) (\mathbf{I}_z - \mathbf{I}_0)\end{aligned}$$

\mathbf{I}_0 e \mathbf{S}_0 sono le \mathbf{M} all'equilibrio di Boltzmann, mentre \mathbf{I}_z e \mathbf{S}_z sono le \mathbf{M} lungo l'asse z dei due nuclei. Da questa trattazione si deduce che transizioni normalmente proibite che interessano il nucleo S , accoppiato dipolarmente con I , provocano variazioni della \mathbf{M} di I e viceversa. Se si indicano con ρ_I e ρ_S (velocità di auto-rilassamento) il coefficiente della variazione di \mathbf{M} dei nuclei stessi e con φ (velocità di cross-rilassamento) il coefficiente della variazione di \mathbf{M} del nucleo accoppiato dipolarmente, le equazioni possono essere riscritte come:

$$\begin{aligned}\frac{d\mathbf{I}_z}{dt} &\propto - \rho_I (\mathbf{I}_z - \mathbf{I}_0) - \varphi (\mathbf{S}_z - \mathbf{S}_0) \\ \frac{d\mathbf{S}_z}{dt} &\propto - \rho_S (\mathbf{S}_z - \mathbf{S}_0) - \varphi (\mathbf{I}_z - \mathbf{I}_0)\end{aligned}$$

2.1.5 – Effetto nucleare Overhauser

Un metodo per osservare l'effetto dell'accoppiamento dipolare consiste nel saturare uno dei due nuclei accoppiati dipolarmente, cioè dare un impulso selettivo (di lunga durata) che corrisponda alla frequenza del nucleo scelto, per esempio S. Questo procedimento comporta che le popolazioni dei livelli di spin di S si eguaglino, ossia che il dislivello di popolazione $\frac{1}{2}\Delta N$ residuo dettato dall'altro nucleo I sia l'unico ΔN rimasto:

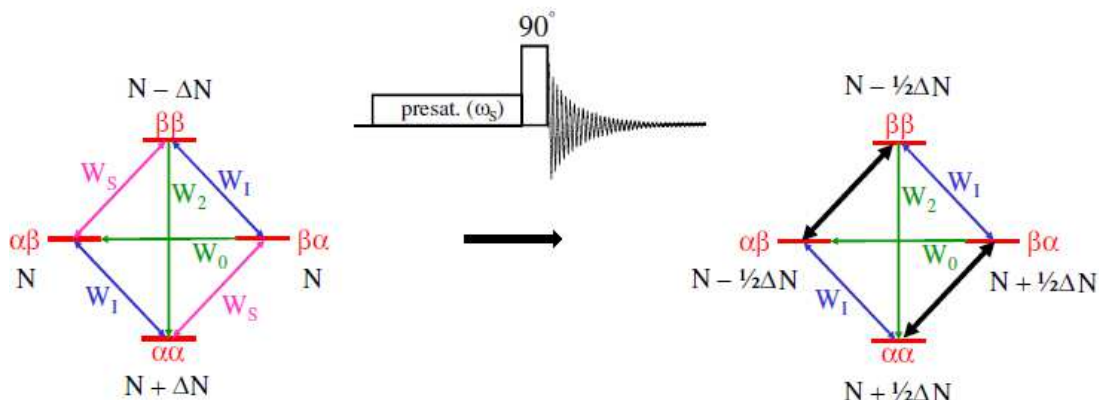


Figura 2.7 – Effetto della saturazione del nucleo S: le transizioni evidenziate in nero sono quelle tra stati con la stessa popolazione

Se i due nuclei I e S non sono accoppiati dipolarmente, W_2 e W_0 non avvengono e quindi lo spettro apparirà semplicemente come il solo picco relativo al nucleo I tale e quale a quello dello spettro senza saturazione alcuna. Se invece l'accoppiamento dipolare è diverso da zero, W_0 o W_2 contribuiscono a ritornare all'equilibrio di Boltzmann:

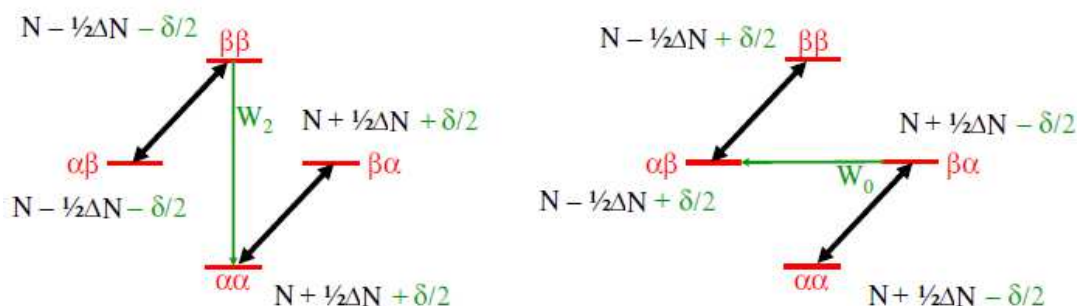


Figura 2.8 – Contributo di W_0 e W_2 : δ è la differenza di popolazione da esse generata, distribuita come $\delta/2$ sui diversi stati di spin

Per quanto riguarda le transizioni W_0 e W_2 , la prevalenza di una rispetto all'altra è determinata dalle dimensioni della molecola, in quanto tali transizioni dipendono dal

tempo di correlazione, cioè di moto molecolare: per molecole piccole in solventi non viscosi W_2 saranno preponderanti rispetto a W_0 e viceversa. Lo spettro risulterà modificato rispetto a quello in assenza di saturazione proprio dal δ : l'intensità del picco di I sarà leggermente maggiore nel caso di molecole piccole, mentre sarà leggermente inferiore nel caso di molecole grandi. L'entità di questa differenza è figurabile come l'influenza che ha una variazione della M del nucleo S sulla variazione di M del nucleo I, cioè:

$$\eta_I(S) = \frac{W_2 - W_0}{W_2 + 2W_1 + W_0} = \frac{\varphi_{IS}}{\rho_I}$$

Tale rapporto è definito effetto nucleare Overhauser (NOE).

2.2 – Esperimento NMR impulsato

2.2.1 – Impulso elettromagnetico

Per condurre un esperimento NMR impulsato si deve generare una perturbazione mediante un impulso elettromagnetico, applicato lungo l'asse x o l'asse y cartesiani, che contiene un intervallo di frequenze attorno alla ω_0 . L'interazione tra l'impulso e la \mathbf{M} conduce a uno spostamento di quest'ultima dalla propria posizione di equilibrio lungo l'asse z. In questa situazione, il vettore \mathbf{M} risente della forza esercitata anche da \mathbf{B}_0 , non essendo più allineata a esso e quindi il sistema diviene complicato da descrivere nel riferimento cartesiano classico.

Uno strumento matematico che si introduce è quindi il sistema di riferimento rotante, che consiste in un sistema cartesiano in cui il piano xy ruota alla frequenza ω_0 . In questa maniera, gli spin appaiono fermi e quindi l'effetto di \mathbf{B}_0 può essere trascurato. Scomponendo il campo oscillante in due vettori che ruotano alla frequenza ω_0 nei due sensi opposti, si ottiene che una delle due componenti risulta ferma mentre l'altra ruota con frequenza doppia in senso contrario; anche quest'ultima componente può essere trascurata poiché non interagisce con gli spin nucleari. Globalmente nel sistema di riferimento rotante si può considerare che la \mathbf{M} interagisca solamente con un campo magnetico statico \mathbf{B}_1 perpendicolare all'asse z.

L'esperimento consiste nel misurare la variazione nel tempo dell'intensità di \mathbf{M} grazie a un solenoide di raccolta del segnale. Esso è sistemato sul piano xy, cioè trasversale rispetto alla direzione di \mathbf{B}_0 : di conseguenza la \mathbf{M} deve essere portata dall'asse z al piano xy mediante l'impulso elettromagnetico, di cui si può modulare la durata. Questo spostamento di \mathbf{M} coincide con una rotazione di 90° ($\pi/2$) rispetto alla posizione iniziale di equilibrio; quindi se $\theta = \omega t$ (dove t è la durata dell'impulso), allora:

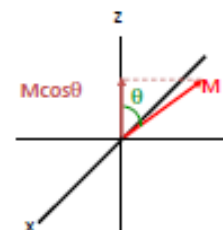
$$t_{90^\circ} = \pi(2\gamma B_0)^{-1}$$

Il fatto che \mathbf{M} sia portata sul piano xy implica che gli stati α e β divengono ugualmente popolati e che è indotta una coerenza di fase nel moto degli spin intorno a z. Infatti, ricordando che \mathbf{M} è proporzionale alla differenza di popolazione fra i due stati di spin:

$$\mathbf{M} \propto N_\alpha - N_\beta = \Delta N$$

$$N_\alpha + N_\beta = N \quad N_\alpha = (N + \Delta N)/2 \quad N_\beta = (N - \Delta N)/2$$

$$\mathbf{M}_z(t) = \mathbf{M}_z(0)\cos\theta \propto \Delta N\cos\theta$$



Se l'angolo è pari a 90° , il coseno si azzera e così anche la differenza di popolazione:

$$N_{\alpha} = N_{\beta} = N/2$$

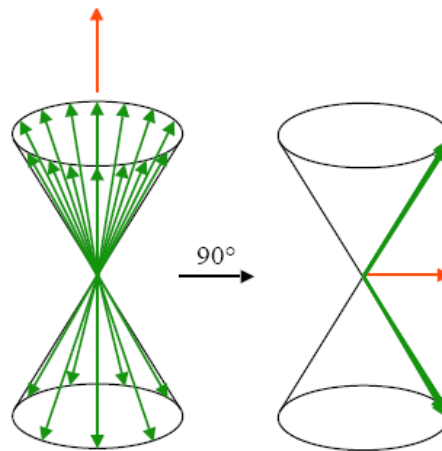


Figura 2.9 – Distribuzione di popolazione di spin tra i livelli α (sopra) e β (sotto) prima e dopo l'impulso a 90° ; in rosso è rappresentato il vettore \mathbf{M}

L'intervallo di frequenze eccitabile dall'impulso è determinato dal principio di Heisenberg:

$$\Delta E = h\Delta\nu \quad \Delta E\Delta t \approx h \quad \Delta\nu \approx \Delta t^{-1}$$

È possibile ottenere impulsi selettivi, al fine di selezionare un intervallo di frequenze ristretto, inviando impulsi lunghi e a bassa potenza; la forma non è mantenuta rettangolare, bensì sagomata con varie geometrie, per minimizzare distorsioni che non permettono di ottenere il profilo di eccitazione desiderato. Gli usi più comuni di questa tecnica sono: riduzione della dimensionalità di un esperimento, soppressione del solvente, selezione di frequenze d'interesse in un esperimento bidimensionale.

2.2.2 – Sintonia dello strumento e calibrazione dell'impulso

Per ottenere spettri di buona qualità, la componente elettronica dello strumento deve essere innanzitutto ottimizzata con una procedura di “sintonia”: la frequenza di risonanza del circuito deve essere aggiustata sulla frequenza di Larmor del nucleo in esame (“tuning”) e la trasmissione della potenza fra le varie componenti dello strumento deve essere massimizzata (“matching”). L'impulso deve essere calibrato, solitamente a 90° per portare il vettore \mathbf{M} esattamente sul piano xy ; la disomogeneità del campo, tuttavia, rende difficoltosa la perfetta calibrazione dell'impulso. Esistono poi fenomeni di rotazione fuori risonanza, causati dall'azione della componente residua di \mathbf{B}_0 nel caso di risonanza non perfetta di un nucleo:

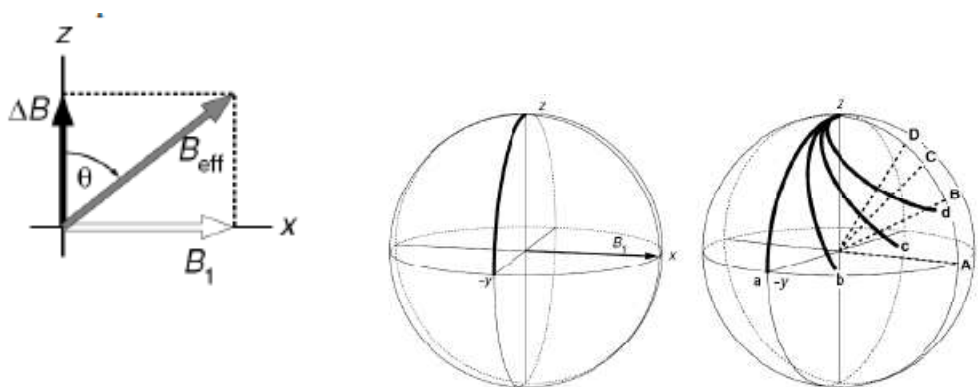


Figura 2.10 – Rotazione di \mathbf{M} dopo l'impulso intorno a diversi assi, corrispondenti ai differenti B_{eff} sentiti dal nucleo in esame

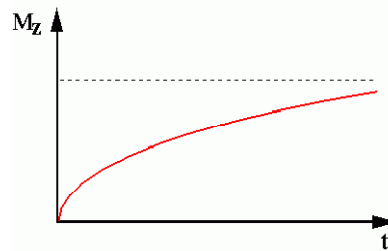
La calibrazione manuale è pertanto opportuna per l'impostazione corretta dell'angolo di rotazione in ogni esperimento e soprattutto in quelli multidimensionali; i parametri strumentali da inserire in corrispondenza alla durata e alla potenza ottimali dell'impulso sono comunemente denominati P1 e PL1. Anche il guadagno del ricevitore (RG), cioè l'amplificazione del segnale del FID, deve essere controllato, impostando un valore che massimizzi l'intensità del FID, senza però saturare il ricevitore.

2.2.3 – Fenomeni di rilassamento

Dopo l'impulso, la situazione creata è di non equilibrio e il vettore \mathbf{M} tenderà a ritornare allo stato di equilibrio mediante due processi di rilassamento, che in prima approssimazione si possono considerare derivanti da campi locali fluttuanti. Ognuno di questi fenomeni riguarda una diversa componente di \mathbf{M} : rilassamento spin-reticolo (componente longitudinale) e rilassamento spin-spin (componente trasversale).

Il rilassamento longitudinale consiste nel progressivo ritorno di \mathbf{M} lungo la direzione positiva dell'asse z , fenomeno che coincide con il ritorno all'equilibrio di Boltzmann tra le popolazioni degli stati α e β . Il rilassamento dipende da una costante denominata T_1 secondo la relazione:

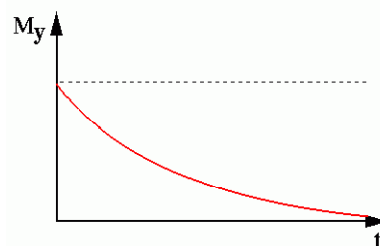
$$M_z(t) = M_z(0) (1 - e^{-t/T_1})$$



Questo fenomeno di rilassamento non è il preponderante, giacché i campi fluttuanti coprono un ampio intervallo di frequenze; sarebbe invece necessaria l'interazione specifica tra \mathbf{M} e ω_0 per avere un rilassamento longitudinale efficace, in quanto il ritorno da β ad α è una transizione che richiede energia e quindi una precisa frequenza della radiazione interagente.

Il rilassamento trasversale conduce all'annullamento della componente giacente sul piano xy di \mathbf{M} , fenomeno che coincide con la perdita di coerenza (sfasatura) nei moti di precessione degli spin. Il rilassamento dipende da una costante denominata T_2 secondo la relazione:

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0) e^{-t/T_2}$$



Questo processo di rilassamento ha origini entropiche, al contrario della natura entalpica del rilassamento longitudinale, ed è il più rapido tra i due: i campi fluttuanti portano i diversi spin a ruotare con frequenze non uguali, facendo aprire a ventaglio gli spin che prima erano allineati.

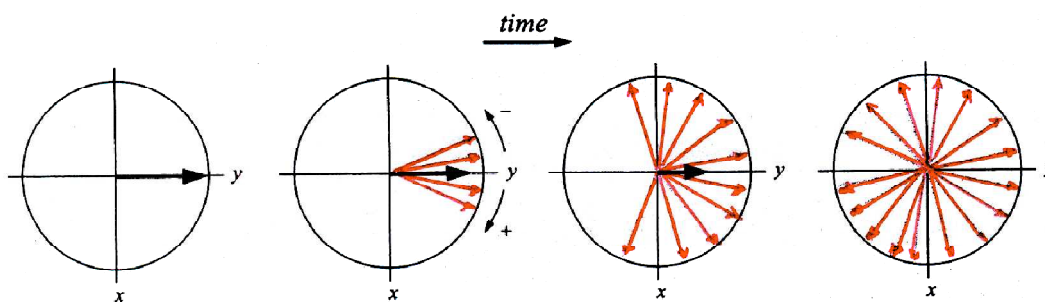


Figura 2.11 – Perdita di coerenza degli spin subito dopo l’impulso e a diversi tempi successivi; in nero è raffigurata la componente trasversale di \mathbf{M}

L’origine dei campi locali fluttuanti è riconducibile principalmente a due cause: all’anisotropia del tensore $\tilde{\sigma}$ (*chemical shift*) e in maggior misura all’interazione dipolare tra gli spin nucleari. Mediante studi quantomeccanici, è dimostrabile che T_1 e T_2 dipendono dalle diverse componenti del tensore $\tilde{\sigma}$ secondo equazioni piuttosto complesse; semplificando, in un sistema assiale si ha che la dipendenza dei tempi di rilassamento dalla CSA ($\Delta\sigma$) è:

$$T_1, T_2 \propto (\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^{-2}$$

La CSA varia con il modulo del campo applicato e diviene importante per frequenze elevate (1000MHz), mentre gli accoppiamenti dipolari sono indipendenti dalla forza del campo applicato.

2.2.4 – Raccolta e trattamento del segnale

Il vettore \mathbf{M} dopo l'impulso a 90° tende a ritornare alla sua posizione d'equilibrio con un moto complessivamente elicoidale dovuto ai due fenomeni di rilassamento. Il segnale NMR tuttavia è generato solo dalla variazione nel tempo della componente trasversale di \mathbf{M} , raccolta da una bobina rivelatrice posta proprio sul piano xy .

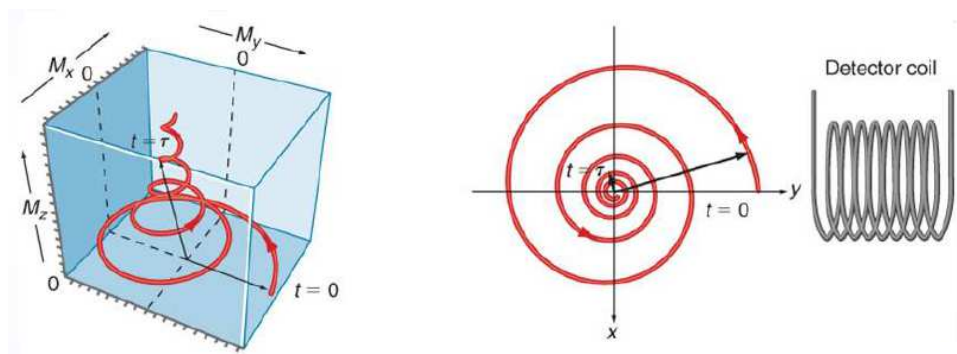


Figura 2.12 – Evoluzione di \mathbf{M} dopo l'impulso, in 3D (a sinistra) e in 2D (a destra)

Il segnale che si ottiene è un decadimento esponenziale denominato FID, una funzione nel dominio dei tempi:

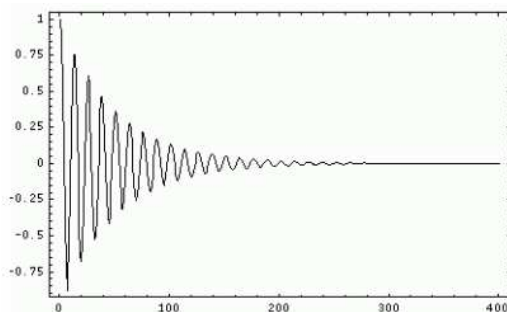


Figura 2.13 – Esempio di Free Induction Decay (FID)

L'equazione matematica che descrive il decadimento è:

$$M(t) = M_0 \cos(\omega_0 t) e^{-t/T_2^*}$$

dove T_2^* comprende sia T_2 sia un termine dovuto alla disomogeneità del campo minimizzabile con accorgimenti sperimentali, come spiegato in seguito. Nell'equazione del FID compare solo T_2 e non T_1 , poiché il segnale è raccolto lungo xy e quindi solo il rilassamento trasversale determina la variazione della componente di \mathbf{M} registrata. In realtà l'equazione del FID è modulata in coseno solo lungo uno dei due assi trasversali, mentre è modulata in seno lungo l'altro asse. Lo spettro NMR vero e proprio si ottiene applicando al FID un'operazione matematica, la

trasformata di Fourier, che trasforma una funzione nel dominio dei tempi in una funzione nel dominio delle frequenze:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt$$

Sostituendo a $f(t)$ la funzione del FID e utilizzando le formule di Eulero si ottiene un unico termine esponenziale:

$$S(t) = S_0 e^{i\omega_0 t} e^{-tR_2} = S_0 e^{(i\omega_0 - R_2)t}$$

$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} S_0 e^{(i\omega_0 - R_2)t} e^{-i\omega t} dt = \int_{-\infty}^{+\infty} S_0 e^{[i(\omega_0 - \omega) - R_2]t} dt$$

La FT di una funzione esponenziale è una Lorentziana centrata in ω_0 : più precisamente la parte in coseno genera una curva in assorbimento, mentre la parte in seno genera una curva in dispersione. Le equazioni di queste due curve dipendono dalla frequenza di rilassamento trasversale R_2 (corrispondente all'inverso di T_2) e dalla differenza tra ω_0 , la frequenza di Larmor, e ω , la frequenza del singolo nucleo:

$$S(\omega) = S_0 e^{[i(\omega_0 - \omega) - R_2]t} = S_0 \left| \frac{e^{[i(\omega_0 - \omega) - R_2]t}}{i(\omega_0 - \omega) - R_2} \right|_0^\infty = S_0 \frac{-1}{i(\omega_0 - \omega) - R_2}$$

$$S(\omega) = S_0 \frac{i(\omega_0 - \omega) + R_2}{(\omega_0 - \omega)^2 + R_2^2} = S_0 \left[\frac{R_2}{(\omega_0 - \omega)^2 + R_2^2} + \frac{i(\omega_0 - \omega)}{(\omega_0 - \omega)^2 + R_2^2} \right]$$

$$S(\omega) = \text{Abs}(\omega) + i \text{Disp}(\omega)$$

In uno spettro NMR si analizzano solo le parti reali delle curve, cioè quelle in assorbimento, per ovvie ragioni di visualizzazione: le code delle curve in dispersione si estendono e generano maggior sovrapposizione; inoltre la parte negativa di un segnale potrebbe annullarsi con la parte positiva di un altro segnale, nascondendo informazioni. Nello spettro, ognuna delle funzioni Lorentziane in assorbimento è definita picco ed è ciò che viene analizzato per ottenere informazioni.

L'uso della trasformata di Fourier implica che la tecnica usata in realtà deve essere definita FT-NMR; per comodità tale dicitura sarà in seguito sottointesa.

2.2.5 – Sensibilità e risoluzione

La sensibilità è definita come la minima quantità di materiale analizzabile in date condizioni sperimentali; tuttavia nell'ambito dell'NMR questo termine è spesso intercambiabile con la dicitura “rapporto tra segnale e rumore di fondo” (S/N). Aumentare la sensibilità quindi si traduce in una riduzione del rischio di perdere segnali confondendoli con il rumore. La sensibilità dipende da molti fattori, tra cui:

$$S/N \propto (NS)^{1/2} \gamma_{\text{exc}} (\gamma_{\text{obs}} B_0)^{3/2}$$

Ricordandosi che l'NMR è di per sé una tecnica poco sensibile (vedi *paragrafo 2.1.1*), si possono sfruttare alcuni accorgimenti sperimentali del tutto generali per massimizzare il rapporto S/N; il più intuitivo, ma anche il più limitato alle possibilità strumentali, è quello di lavorare a campi alti. Dato che ogni scansione dura pochi secondi, è usuale ripetere molte volte le scansioni (NS è il numero di scansioni) su uno stesso campione e poi sommare gli spettri ottenuti; così facendo, il rumore, essendo una fluttuazione casuale, si riduce per mediazione mentre i segnali veri e propri si sommano. Il tipo di nucleo eccitato e osservato influisce mediante il valore del proprio rapporto giromagnetico, quindi è preferibile sfruttare per quanto possibile il γ protonico eccitando e osservando sul canale del protone. Anche il tempo di acquisizione gioca un ruolo fondamentale: il segnale decade col tempo, quindi dopo un certo istante la **M** lungo xy sarà pressoché assente; al contrario, il rumore di fondo continua a essere presente anche dopo il riallineamento di **M** lungo z. Possono essere utilizzate anche alcune funzioni finestra che, moltiplicate per il FID, rendono più importante la parte del FID registrata nei primi istanti dell'acquisizione. Le più comuni funzioni finestra sono semplici decadimenti esponenziali, i quali permettono di “pesare” in maniera differente le varie parti del FID semplicemente modificando l'esponente, come mostrato in figura:

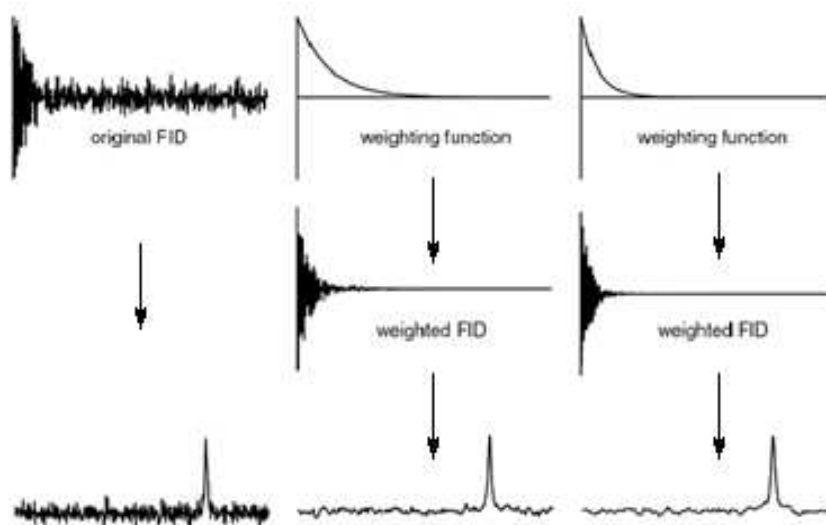


Figura 2.14 – Aumento progressivo di S/N con l’uso di funzioni finestra a decadimento esponenziale con coefficienti diversi

Si può notare che utilizzando questo sistema il picco è certamente definito in maniera più pulita, ma che esso progressivamente si allarga; questo è dovuto al fatto il T_2^* è virtualmente ridotto dalla funzione finestra. La larghezza a metà altezza (FWHM) del picco dipende proprio da T_2^* secondo l’espressione:

$$FWHM = \frac{1}{\pi T_2^*}$$

L’allargamento del picco può essere un problema nel caso in cui ci siano sovrapposizioni di picchi contigui; subentra perciò la necessità di avere anche una buona risoluzione per poter distinguere al meglio tutti i singoli segnali. Generalmente due picchi si dicono risolti se sono sovrapposti per una frazione minore di un valore di soglia, che di solito coincide con il 10% dell’altezza del picco. È chiaro perciò che per avere picchi ben separati, essi devono avere la minore FWHM possibile. Siccome la parte correggibile di T_2^* è imputabile alla disomogeneità del campo magnetico sentito dal campione, si può incrementare la qualità dello spettro mediante l’uso di alcune spire presenti nel probe poste attorno al campione: grazie a tali spire si possono indurre piccoli campi correttivi lungo gli assi cartesiani e lungo direzioni opportune, al fine di rendere \mathbf{B}_0 il più omogeneo possibile. Questa procedura è detta proprio “omogeneità”, ovvero “shimming”.

In generale, la risoluzione digitale viene definita come:

$$R = 2SW/N$$

Per ottenere picchi ben separati R deve essere il più bassa possibile. È evidente che ciò si può ottenere riducendo la finestra di acquisizione (SW) e aumentando il

numero di punti raccolti (N); tuttavia si deve considerare che questi accorgimenti determinano una maggiore durata dell'esperimento, poiché:

$$t_{aq} = N/2F$$

Uno stratagemma per aumentare la risoluzione digitale consiste nell'interpolare dei punti fittizi alla fine del FID (Zero-Filling), al fine di avere più punti registrati. L'area sottesa dal picco è costante e dipende dal numero di atomi equivalenti che generano il segnale; perciò è ovvio che se il picco si stringe conseguentemente si innalza (aumenta S/N al diminuire di FWHM?).

Nel caso in cui invece si abbia la necessità di avere dei picchi più stretti, anche a scapito del rapporto S/N, si possono usare funzioni finestra che diano maggior peso alla parte di FID registrata in tempi più lunghi, dove il segnale non è ancora scomparso del tutto, ma si confonde col rumore:

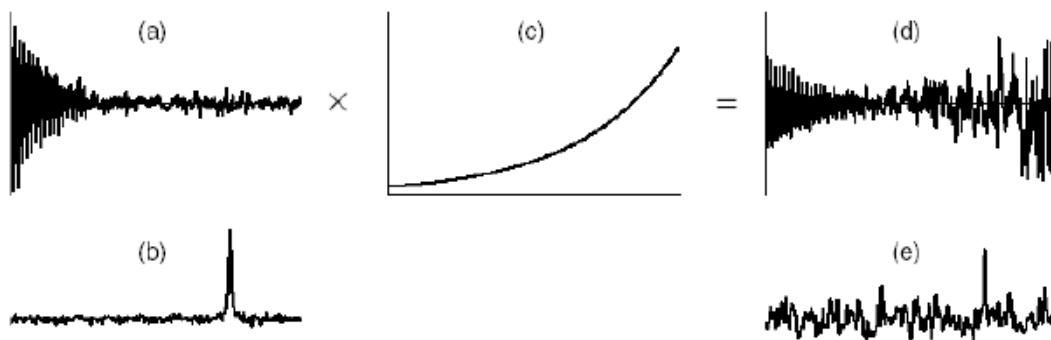


Figura 2.15 – Aumento della risoluzione con l'uso di una funzione finestra a incremento esponenziale

Generalmente, tuttavia, per evitare di perdere parte del segnale, spesso si usano funzioni finestra che diano pesi adeguati alle varie regioni del FID in modo da ottenere il miglior compromesso tra larghezza di riga e rapporto S/N; le più comuni sono funzioni Sine Bell, oppure funzioni ottenute moltiplicando un incremento e un decadimento esponenziali.

2.2.6 – Gradienti di campo magnetico

Si immagini che il campione sia suddiviso in tante fasce di volume sovrapposte, le quali normalmente sono influenzate da \mathbf{B}_0 tutte allo stesso modo grazie all'isotropicità del sistema, come rappresentato in *figura 2.16*, a sinistra.

I gradienti sono impulsi che possono essere generati lungo ogni direzione cartesiana, ma che solitamente sono programmati in modo tale da essere efficaci solo lungo l'asse z . Il loro effetto consiste nell'indurre una componente aggiuntiva a \mathbf{B}_0 , comunemente denominata \mathbf{g}_z , che produce una leggera variazione nel modulo del campo; ciò accade in maniera differente per ogni volume di campione, poiché l'effetto del gradiente cresce all'allontanarsi dal centro della soluzione. Ricordando che $\omega = \gamma B$, il risultato di tale procedura è che i nuclei precessono con diverse velocità a seconda della loro disposizione all'interno del campione; infatti la frequenza diviene $\omega = \gamma(B_0 + g_z)$, dove l'entità di g_z dipende proprio dalla propria posizione lungo l'asse z di ogni spin. A livello macroscopico questo si traduce in una perdita di coerenza di fase, o, in altre parole, che il segnale è totalmente defasato lungo il piano xy :

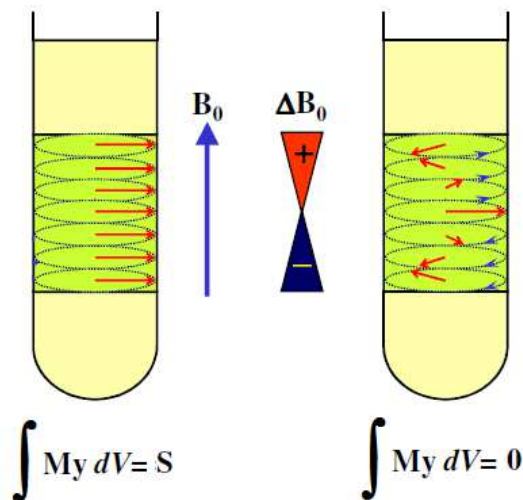


Figura 2.16 – \mathbf{M} prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'applicazione di un gradiente

In figura si può vedere come i vettori di spin nucleari (freccie rosse) si defasino a causa del gradiente. Gli integrali quantificano la \mathbf{M} netta: senza gradiente essa va a generare il segnale S , mentre con un gradiente applicato la somma vettoriale degli spin si annulla e quindi non risulta più registrabile alcun segnale. Si può considerare che dopo l'applicazione del gradiente la fase di \mathbf{M} sia:

$$\Phi_z = \gamma(B_0 + g_z)t = \gamma p S G_z L$$

dove p è l'ordine di coerenza, mentre S, G_z e L sono rispettivamente la forma, l'intensità e la durata del gradiente; questi ultimi sono i tre parametri impostabili. È

intuibile che se ad un gradiente si fa succedere un altro gradiente di segno opposto i due effetti si annullano e il segnale viene rifocalizzato; lo stesso risultato si ottiene inviando due gradienti uguali inframmezzati da un impulso a 180°, di inversione. In generale, l'effetto si annulla quando:

$$\Phi(G1) + \Phi(G2) = 0$$

La fase indotta si annulla pertanto se i due gradienti hanno combinazione di intensità e durata opportune. I gradienti possono essere sfruttati per diversi scopi, alcuni dei quali sono: eliminare picchi indesiderati, come ad esempio quelli dei solventi; eliminare componenti residue indesiderate di **M** lungo il piano xy; misurare il coefficiente di diffusione di composti anche in miscela; selezionare cammini di coerenza. In particolare, quest'ultima applicazione citata ha permesso lo sviluppo di molte sequenze NMR usate oggi.

2.2.7 – Spin-lock e BroadBand Decoupling

Lo spin-lock consiste nel mantenere **M** lungo una direzione voluta, inviando lungo tale direzione un'onda continua oppure una sequenza opportuna di impulsi. Solitamente lo spin-lock viene utilizzato dopo l'impulso a 90° che porta **M** sul piano xy, per contrastare temporaneamente il ritorno lungo l'asse z del segnale. L'uso di tale espediente sta alla base di molti esperimenti, alcuni dei quali sono citati in seguito. Le sequenze di spin-lock sono molteplici; tuttavia quelle più comunemente utilizzate sono MLEV (Malcolm-Levitt), soprattutto per esperimenti TOCSY (vedi *paragrafo 2.3.4* e *paragrafo 2.4.3*), o DIPSI (Decoupling In Presence of Scalar Interactions). Gli elementi che stanno alla base di sequenze MLEV sono rappresentati in figura:

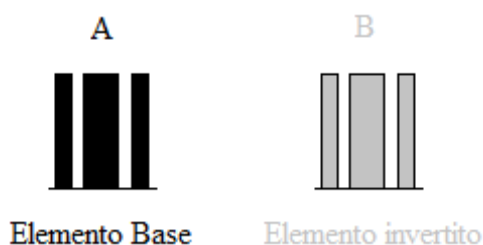


Figura 2.17 – Impulsi basilari in una sequenza MLEV:

$$A = 90_x - 180_y - 90_x \quad B = 90_{-x} - 180_{-y} - 90_{-x}$$

Lo schema più usato è MLEV-16, dove gli impulsi appena descritti sono inviati secondo il ciclo “AABB BAAB BBAA ABBA”, il quale viene ripetuto a seconda della durata desiderata. Nella sequenza MLEV-17 è inviato un ulteriore impulso a 60° lungo l'asse x, aggiunto in calce ai sedici descritti, per colmare possibili errori di fase.

In maniera del tutto analoga si possono usare sequenze di impulsi per annullare gli accoppiamenti scalari, attuando quindi un disaccoppiamento a banda larga (BroadBand Decoupling). In particolare, una sequenza che presenta un ampio intervallo di disaccoppiamento è GARP (Globally optimized Alternating phase Rectangular Pulse), che utilizza angoli differenti dai canonici 60, 90 e 180°:

$$R = 30.5_x - 55.2_{-x} - 257.8_x - 268.3_{-x} - 69.3_x - 62.2_{-x} - 85.0_x - 91.8_{-x} - 134.5_x - 256.1_{-x} - 66.4_x - 45.9_{-x} - 25.5_x - 72.7_{-x} - 119.5_x - 138.2_{-x} - 258.4_x - 64.9_{-x} - 70.9_x - 77.2_{-x} - 98.2_x - 133.6_{-x} - 255.9_x - 65.5_{-x} - 53.4_x$$

La sequenza GARP-1 è composta da quattro elementi RRRR, dove R è l'elemento invertito.

Il BBD è utilizzato nelle sequenze di molti spettri, fra cui nel monodimensionale al carbonio, per disaccoppiare il protone al fine di aumentare il rapporto S/N.

2.3 – NMR monodimensionale

2.3.1 – Esperimento al ^1H : sequenza e parametri d'acquisizione

L'esperimento più semplice è quello in cui si eccitano e si raccolgono i segnali dei soli ^1H (comunemente detti protoni) in un'unica dimensione di acquisizione. Lungo l'asse delle ascisse si trova la scala in ppm corrispondente alle frequenze dei nuclei, mentre lungo l'asse delle ordinate è riportata la scala delle intensità dei picchi, in unità arbitraria. Gli spettrometri standard generano un campo nell'intervallo dai 5T ai 21T, perciò ω_0 per il protone rientra nelle radiofrequenze (200-900MHz, anche se gli strumenti più moderni arrivano anche ai 1000 e più MHz utilizzando campi più potenti). L'esperimento monodimensionale al protone è il più utilizzato, perché il rapporto giromagnetico dei protoni è il più alto e questo si traduce in una maggiore sensibilità di un esperimento in cui si eccitano e si analizzano i ^1H rispetto ad altri nuclei. Si può notare in *tabella 2.1* che gli isotopi più abbondanti di C e O abbiano **I** pari a zero. Essi sono i nuclei più abbondanti nelle molecole organiche, assieme agli ^1H , e se fossero visibili all'NMR apporterebbero un maggior numero di dati nello spettro; tuttavia questo sarebbe enormemente più complicato da interpretare, se non addirittura indecifrabile a causa della sovrabbondanza di picchi e della loro minore altezza causata dagli accoppiamenti scalari. Per sfruttare informazioni derivanti da eteronuclei, si possono eseguire esperimenti più complessi grazie all'esistenza di isotopi minoritari quali ^{13}C o ^{15}N , che hanno $I = 1/2$, alcuni dei quali saranno trattati in seguito.

In un esperimento monodimensionale al protone la sequenza strumentale è la seguente:

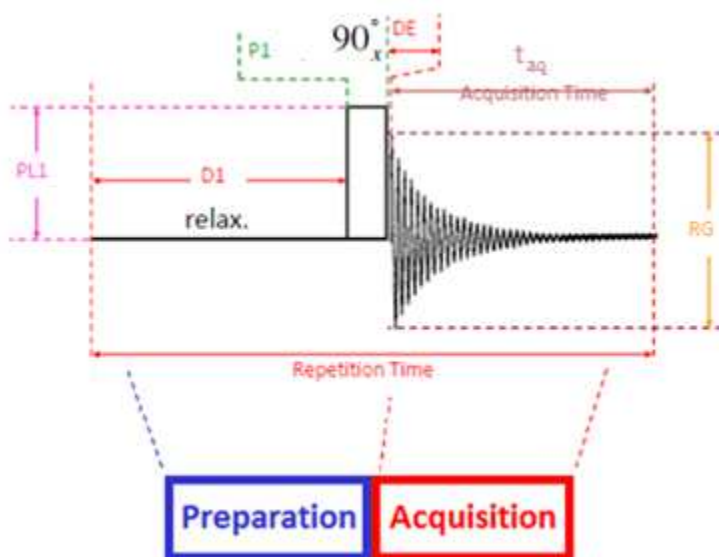


Figura 2.18 – Sequenza e parametri d'acquisizione in un esperimento ^1H 1D

La **M** è portata sul piano xy dall'impulso a 90° , di durata P1 e di potenza PL1; di seguito inizia l'acquisizione, che dura per un tempo denominato t_{aq} . La sequenza è ripetuta molte volte per aumentare il rapporto S/N; tra le varie scansioni viene inserito un tempo di rilassamento o preparazione (D1), necessario per permettere a **M** di tornare completamente lungo z prima di essere deflessa da un nuovo impulso. Tra l'impulso e l'inizio dell'acquisizione c'è un ritardo strumentale (DE) che porta **M** leggermente fuori dalla sua posizione originale a causa dell'inizio della precessione; questo fatto causa una sfasatura definita indipendente dalla frequenza, che può essere poi corretta durante l'elaborazione dello spettro con una modifica di fase di ordine zero. Il numero di punti registrati va a costituire la cosiddetta grandezza del FID (TD); come spiegato nel *paragrafo 2.2.5*, più punti presi implicano maggiore risoluzione nello spettro, ma anche maggiore durata di esso, giacché aumenta il t_{aq} in ogni scansione. Analogo discorso si può fare per l'ampiezza della finestra di acquisizione (SW), che determina l'estensione dello spettro: diminuendo l'ampiezza della finestra, la risoluzione migliora; tuttavia ciò comporta un aumento dell'intervallo temporale tra la registrazione di due punti consecutivi (DW) e quindi una maggiore durata globale. La centratura (O1P) definisce il centro dello spettro e permette di inviare impulsi selettivi su una frequenza scelta; questa tecnica può essere usata per ridurre un segnale particolarmente intenso, come quello del solvente (vedi *paragrafo 2.2.1*), al fine di incrementare l'RG e quindi di ottenere picchi più intensi. Tutti questi parametri si devono ottimizzare in base all'esperimento che si vuole eseguire. Si noti che le sigle riportate sono quelle utilizzate nel programma TOPSPIN.

2.3.2 – Esperimento al ^1H : integrazione e *chemical shift*

Le prime operazioni da fare su uno spettro sono la correzione della linea di base e la fasatura; quest'ultima consiste in due passaggi, definiti correzioni di ordine zero e di primo ordine. Tali accorgimenti permettono di visualizzare meglio i picchi e di elaborare integrazioni attendibili. Una prima informazione infatti è deducibile integrando l'area sottesa da ciascun picco, la quale è proporzionale al numero di protoni che generano tale segnale. Ciò permette di ottenere sia nozioni strutturali, sia di raggio più ampio, come l'abbondanza dei componenti di una miscela o la percentuale dei tautomeri in un equilibrio.

La seconda tipologia d'informazioni si ottiene osservando le ω_0 cui i picchi sono centrati, cioè il *chemical shift* dei protoni che generano i segnali. Il valore del *chemical shift* dipende dalla natura dell'intorno chimico di ciascun atomo: per esempio, i protoni aromatici, essendo deschermati dalla corrente d'anello concorde a \mathbf{B}_0 , risuonano generalmente tra i 6.5 e gli 8.5 ppm; oppure i protoni vicini a un carbonile, essendo deschermati per effetto induttivo, risuonano usualmente oltre i 9ppm. In *figura 2.19* sono evidenziate le regioni di risonanza di protoni con diverso intorno chimico:

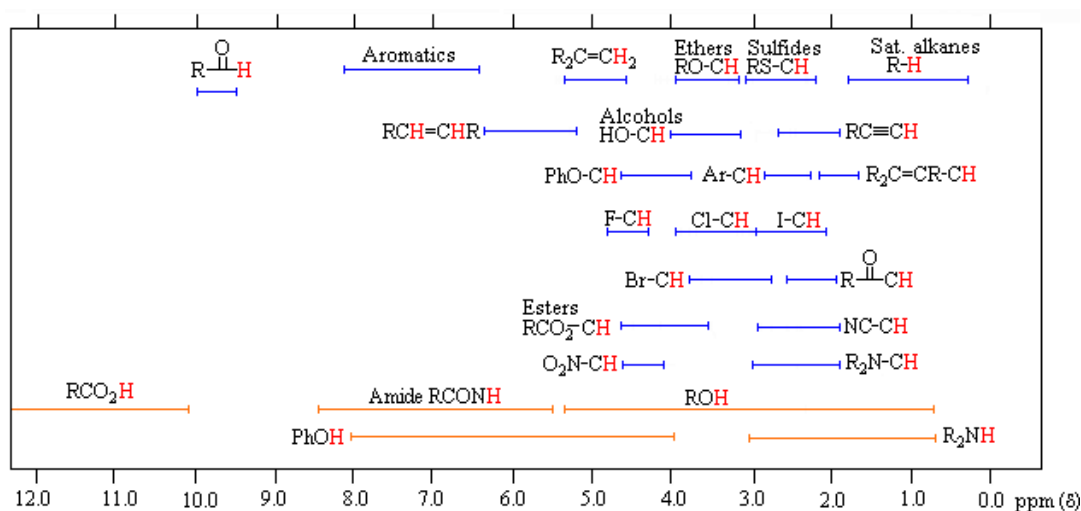


Figura 2.19 – Comuni valori di chemical shift per ^1H ; in arancione sono indicati i segnali che, laddove sia possibile, sono soliti scambiare col solvente

2.3.3 – Esperimento al ^1H : accoppiamento scalare

Un'ulteriore serie d'informazioni è ricavabile dalla presenza o meno di accoppiamento scalare. Come spiegato in precedenza, in assenza di accoppiamento, il picco si presenta come un singoletto centrato alla ω_0 del protone che l'ha generato. Considerando un semplice esempio costituito da due sistemi di protoni A e X, per cui vale che $\Delta\delta/J$ sia maggiore di 10, nel caso in cui J_{AX} sia diversa da zero, l'accoppiamento scalare genera una molteplicità nei picchi che è uguale al numero di protoni equivalenti accoppiati al nucleo che genera il segnale aumentato di uno. Tale regola deriva dalla serie di combinazioni degli stati α e β degli spin accoppiati. I picchi assumono così la denominazione di doppietti, tripletti, ecc. le cui componenti hanno intensità relative dettate dall'espansione del triangolo di Pascal (1:1 in un doppietto, 1:2:1 in un tripletto e così via) In casi più complessi la situazione si complica, come nel caso in cui si ha un sistema AMX; il picco di M, per esempio correlato sia ad A sia a X, risente sia della J_{AM} sia della J_{MX} , pertanto assume una doppia molteplicità. Sono così generati i doppietti di doppietti, i tripletti di doppietti, i doppietti di tripletti, ecc. dove a J maggiore corrisponde distanza tra i picchi maggiore. Infatti la scala delle ascisse, pur essendo normalmente in ppm, può essere scritta in Hz; il valore di J è espresso in Hz e la distanza tra il centro dei picchi equivale alla costante di accoppiamento scalare tra i nuclei che generano tale picco e molteplicità. Normalmente, le J che generano molteplicità sono quelle tra protoni distanti tre legami; esse hanno valori compresi usualmente tra i 3 e i 15 Hz e sono denominate 3J . Capita talvolta che anche 4J e 5J siano abbastanza grandi in valore assoluto da poter essere visualizzate nello spettro; tuttavia di solito ciò accade solo nel caso in cui la conformazione della molecola sia particolare, come nel caso di doppi legami o di strutture rigide, come anelli aromatici (conformazione "a W"). Un altro caso particolare è quello delle 2J , solitamente apprezzabili poco meno delle 3J , che denotano un accoppiamento tra due protoni diastereoisomerici, oppure tra due protoni geminali in un doppio legame. Di seguito è riportata una tabella dei comuni valori di J_{HH} :

Costante	Geometria molecolare	Valore (Hz)
2J	catena alifatica	11-13
3J	catena alifatica	6-10
4J	catena alifatica	≈ 0
$^4J, ^5J$	scheletro rigido, bloccato (conformazione "a W")	0-10
$^3J_{\text{trans}}$	doppio legame	14-18
$^3J_{\text{cis}}$	doppio legame	10-12
$^2J_{\text{gem}}$	doppio legame	1-2

Tabella 2.2 – Alcuni dei comuni valori di J ritrovati in molecole organiche

Grazie all'accoppiamento scalare si può quindi teoricamente dedurre quali, con la J, e quanti, mediante la molteplicità, protoni sono fra loro accoppiati. Sperimentalmente ciò può essere difficile da stabilire, in quanto le J sono simili tra loro in valore assoluto e inoltre la sovrapposizione dei picchi, dove presente, rende spesso difficile se non impossibile la determinazione della molteplicità e di conseguenza anche delle stesse J.

Esiste poi un'ulteriore complicazione nell'analisi degli accoppiamenti scalari: ci sono dei sistemi definiti AB, dove il rapporto $\Delta\delta/J$ è inferiore a 10, che generano spettri del secondo ordine. In questi spettri l'intensità relativa dei picchi che compongono lo stesso multipletto non è vincolata dalla regola del triangolo di Pascal, bensì è presente una deformazione denominata effetto tetto; inoltre il *chemical shift* in questo caso non è più al centro del multipletto. Il sistema quindi non è analizzabile con semplicità, a meno che non si possa operare a campi più alti in modo da trasformare un sistema AB in un sistema AX: $\Delta\delta$ infatti aumenta al crescere di \mathbf{B}_0 mentre J rimane invariata.

2.3.4 – TOCSY selettivo

Siccome nello spettro monodimensionale protonico di una miscela di analiti compaiono molti picchi, che corrispondono a tante tipologie differenti di protoni, le costanti di accoppiamento scalare rappresentano una risorsa per capire se i diversi ^1H appartengono o meno a una stessa molecola; tuttavia le J sono spesso difficili da osservare a causa della scarsa risoluzione o di sovrapposizioni. Inizialmente perciò è utile provare che più protoni appartengono o no a uno stesso sistema di spin, cioè a una “catena” di idrogeni legati fra loro tramite successioni di accoppiamenti scalari. Da questa definizione, si intuisce che un sistema di spin è interrotto da un C carbonilico o quaternario, anche se possono esistere eccezioni dovute a particolari conformazioni molecolari, come riportato nel paragrafo precedente.

Il TOCSY selettivo è un esperimento monodimensionale che permette di osservare le correlazioni tra protoni appartenenti allo stesso sistema di spin grazie a un'eccitazione selettiva di un intervallo ristretto di frequenze. La sequenza è la seguente:

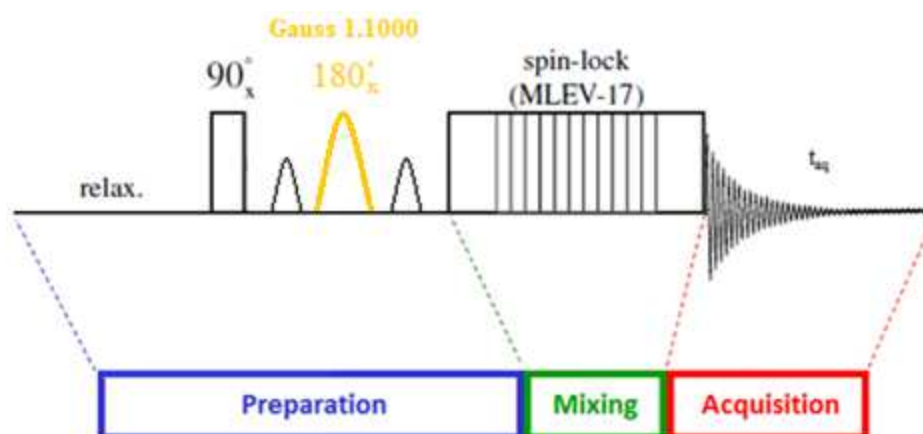


Figura 2.20 – Sequenza del TOCSY selettivo

Dopo il primo impulso a 90° è inserita una sequenza gradiente- 180° -gradiente: il primo gradiente defocalizza il segnale lungo tutto il piano xy, mentre l'impulso di inversione seguito da un gradiente identico al precedente produce lo stesso effetto di un gradiente di segno opposto, cioè rifocalizza **M**. Tale artificio sarebbe inutile se l'impulso centrale a 180° non fosse selettivo (giallo in figura 2.20); invece inviando un impulso di forma Gaussiana, di opportuna durata e intensità (vedi paragrafo 2.2.1) e centrato su un picco di interesse, si attua la rifocalizzazione selettiva degli idrogeni generatori del picco stesso. Ne risulta che alla fine della fase di preparazione solo il segnale dei protoni eccitati dall'impulso selettivo sarà oggetto degli impulsi successivi e dell'acquisizione. A questo punto si può notare che, a differenza di un normale monodimensionale, è inserita una sequenza di impulsi che mantiene **M** sul piano trasversale definita spin-lock (vedi paragrafo 2.2.7), la quale rende possibile un trasferimento di **M** stessa dal nucleo eccitato a nuclei ad esso scalarmente

accoppiati. Questi ultimi generano un segnale anche se le loro frequenze di risonanza non sono state direttamente eccitate dall'impulso; pertanto nello spettro sono presenti solamente i picchi degli idrogeni appartenenti allo stesso sistema di spin del nucleo eccitato, con intensità decrescente a mano a mano che la distanza da esso, in numero di legami, diminuisce. Si deve ricordare inoltre che il segnale decade col tempo e ogni impulso aggiuntivo presenta degli errori seppur minimi dovuti all'imprecisione strumentale, che comportano una parziale perdita di segnale all'aumentare della complessità della sequenza. L'utilità di questo esperimento, che solitamente genera spettri molto semplificati rispetto all'originale monodimensionale al ^1H , consiste nel trovare la correlazione fra idrogeni diversi anche non direttamente accoppiati scalarmente; inoltre spesso permette di visualizzare molto meglio le J e definire con maggior precisione i *chemical shift* dei picchi. Il limite maggiore di questo esperimento consiste nell'effettiva selettività dell'eccitazione: affinché l'impulso sia davvero selettivo lo si dovrebbe inviare su picchi isolati, rari da trovare, per non eccitare altre frequenze di risonanza indesiderate riconducibili a picchi adiacenti a quello d'interesse.

2.3.5 – Esperimento al ^{13}C : sequenza e sensibilità

Per indagare sullo scheletro di una molecola organica a volte il solo esperimento protonico non è sufficiente; in particolar modo se si vuole assegnare un *chemical shift* ad ogni atomo di una molecola incognita non ci si può limitare all'assegnazione dei soli idrogeni. Il primo costituente dello scheletro molecolare di molecole organiche è indubbiamente il carbonio, ma l'NMR applicato allo studio di questo elemento comporta alcuni inconvenienti, tra cui i due principali sono il basso valore del γ_{C} e la scarsa abbondanza naturale dell'isotopo ^{13}C con $I = 1/2$, circa l'1%. La sensibilità di un esperimento al ^{13}C è quindi certamente molto inferiore rispetto a un esperimento al ^1H ; tuttavia si può effettuare lo spettro monodimensionale impostando un numero molto elevato di scansioni e utilizzando il BBD (vedi *paragrafo 2.2.7*) per aumentare l'intensità dei picchi, inviando una serie di impulsi sul canale del protone affinché l'accoppiamento scalare tra ^1H e ^{13}C sia annullato per rifocalizzazione. L'area sottesa dal picco è costante, pertanto ottenendo solo singoletti anziché multipletti si registrano picchi più alti a spese dell'informazione sulla molteplicità. Nel caso in cui si disponga di analiti marcati al ^{13}C è possibile registrare spettri in minor tempo e con rapporto S/N nettamente migliore.

La sequenza è la seguente:

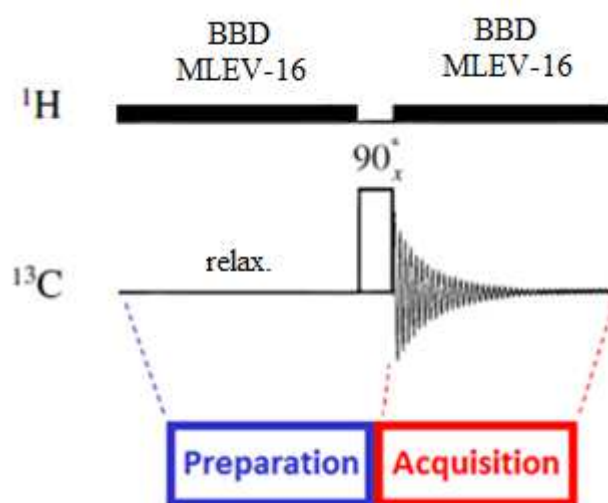


Figura 2.21 – Sequenza d'impulsi in un esperimento ^{13}C NMR

Si nota che la sequenza è simile a quella dello spettro protonico, ma in questo caso il segnale è inviato sul canale del carbonio, mentre sul canale del protone è inviata la sequenza di BBD.

2.3.6 – Esperimento al ^{13}C : informazioni ricavabili dallo spettro

Contrariamente allo spettro protonico, l'esperimento ^{13}C non permette di ricavare informazioni sugli accoppiamenti scalari, essendo disaccoppiato. Nemmeno l'integrazione è affidabile, poiché l'area dei picchi dei carboni tetrasostituiti (o carbonilici non aldeidici) risulta solitamente inferiore rispetto a quelli degli altri carboni. Questa incongruenza è dovuta alla presenza o meno di idrogeni direttamente legati al carbonio: saturando i protoni con il BBD, subentra l'effetto NOE (*paragrafo 2.1.5*) che sfalsa le aree sottese dai picchi aumentando le intensità dei segnali riconducibili a carboni non quaternari. L'unica informazione che rimane è quella relativa ai *chemical shift* dei carboni, che, in analogia alla speculazione a proposito dei *chemical shift* dei protoni, possono essere classificati in base alla loro frequenza di risonanza:

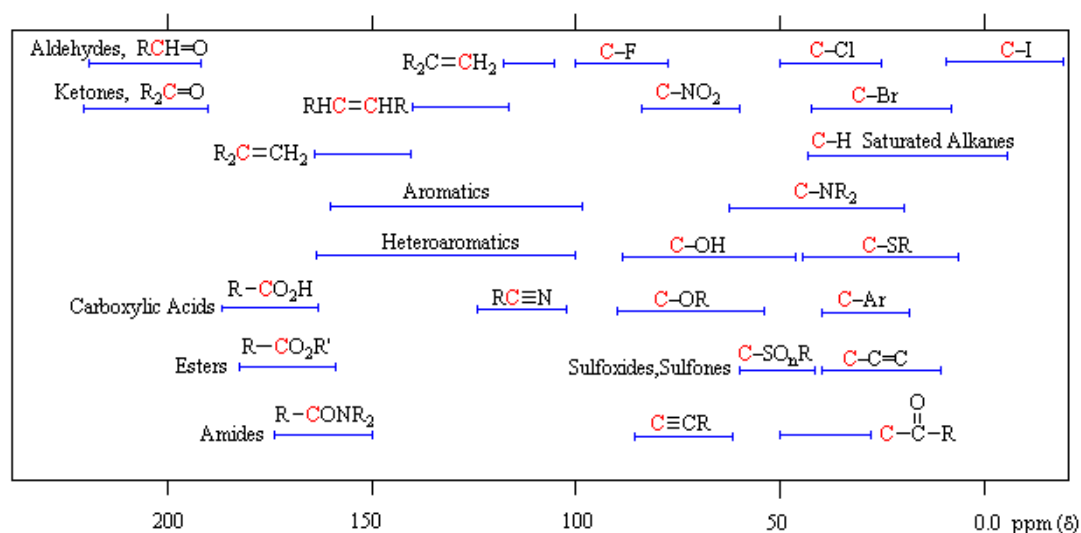


Figura 2.22 – Comuni valori di *chemical shift* per ^{13}C

Nell'ipotizzare una struttura molecolare, il problema è collegare ogni carbonio al suo o ai suoi protoni direttamente legati avendo solo informazioni sul *chemical shift*. Inoltre nel caso di C tetrasostituiti o carbonilici, essi non possono essere relazionati in alcun modo ai protoni mediante l'uso dei soli esperimenti monodimensionali. Un tale tipo di informazioni viene ottenuto con l'uso dell'NMR bidimensionale, come illustrato in seguito.

2.4 – NMR bidimensionale

2.4.1 – Introduzione della dimensione indiretta

Grazie agli esperimenti NMR monodimensionali si possono ottenere numerose informazioni utili, tuttavia essi sono insufficienti per poter identificare e assegnare una molecola incognita, soprattutto se essa è in miscela. Si ricorre pertanto all’NMR bidimensionale, che grazie a sequenze più complesse permette di effettuare esperimenti contenenti informazioni essenziali allo scopo sopra descritto. L’introduzione di una seconda dimensione, definita indiretta, è il fulcro di questa tipologia di esperimenti: rispetto a una sequenza monodimensionale, in cui erano iterate preparazione e acquisizione, nei 2D-NMR sono aggiunti i passaggi di evoluzione e mescolamento. Ciò che differenzia i vari esperimenti è proprio la modalità con cui questi due passaggi vengono effettuati nella sequenza; in essa generalmente è presente un tempo di evoluzione (t_{ev}) che viene variato nelle diverse acquisizioni. Accade quindi che in ciascuna acquisizione il segnale muta in intensità secondo una funzione sinusoidale accompagnata dal decadimento esponenziale di \mathbf{M} , analogamente a un FID:

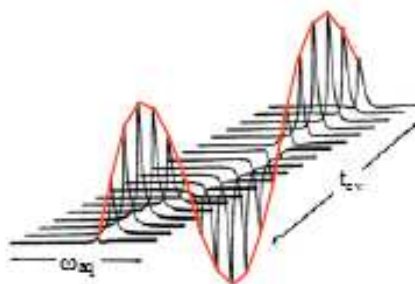


Figura 2.23 – Variazione dell’intensità del segnale al cambiare di t_{ev} che va a costituire l’interferogramma (in arancione)

Si crea così parametricamente una seconda dimensione temporale, che con la FT andrà a costituire la seconda dimensione di frequenze sull’asse y, mentre lungo l’asse x è presente la prima dimensione reale delle frequenze e lungo l’asse z si osserva l’intensità dei picchi. Il periodo di mescolamento è costituito da varie sequenze di impulsi che servono per indurre un trasferimento di \mathbf{M} tra nuclei diversi, dando così vita all’interazione tra di essi. Nella registrazione di spettri bidimensionali vanno quindi ad aggiungersi alcuni nuovi parametri d’acquisizione: il tempo di evoluzione t_{ev} ; il tempo di mescolamento t_{mix} ; TD, SW e O1P per il secondo nucleo osservato. In molte sequenze sono inseriti gradienti, principalmente per selezionare gli ordini di coerenza, ma essi non sono stati inseriti nelle figure delle sequenze, poiché non necessari alla comprensione della meccanica con cui avviene l’esperimento stesso.

2.4.2 – Correlation Spectroscopy: COSY

Il più semplice esperimento bidimensionale è il COSY, che si basa sull'interazione scalare tra protoni, cioè tra nuclei uguali, e pertanto è definito esperimento omonucleare; la sequenza è la seguente:

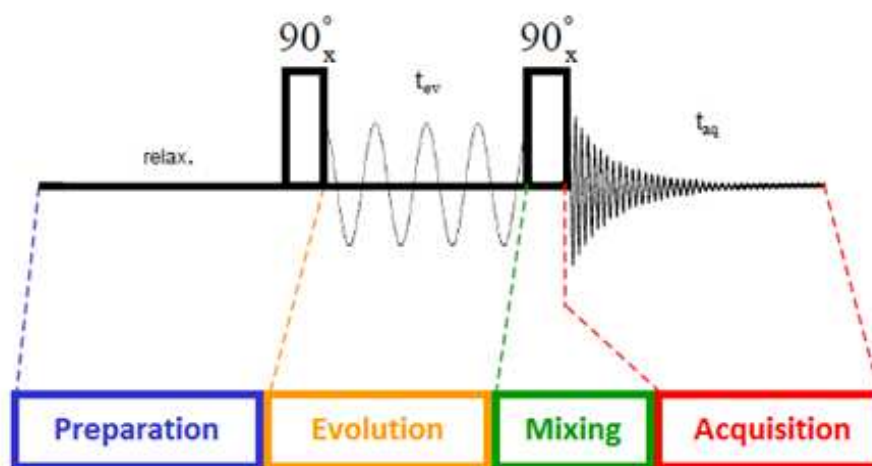


Figura 2.24 – Sequenza dell'esperimento COSY

Per comprendere facilmente il trasferimento di M è conveniente operare idealmente con un sistema semplice di tipo AX con J_{AX} diversa da zero, il cui spettro monodimensionale è costituito da due doppietti. Come spiegato nel *paragrafo 2.1.3*, le due transizioni riferite al protone A non hanno la stessa energia a causa dei diversi stati di spin del protone X: per le molecole in cui X è nello stato α avviene la transizione meno energetica (A^-); se invece X è nello stato β , avviene la transizione più energetica (A^+):

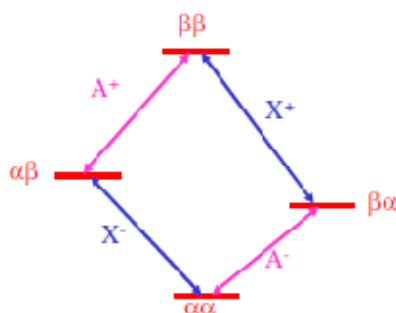


Figura 2.25 – Transizioni in presenza di accoppiamento scalare tra A e X

Si possono indicare con i vettori A^+ e A^- le sommatorie dei momenti magnetici relativi alla corrispondente transizione, ottenendo così due componenti distinte di M_A . Entrambe le componenti A^+ e A^- sono portate sul piano xy dal primo impulso a 90° e cominciano a precessare con frequenze diverse, poiché J_{AX} viene aggiunta in un caso e sottratta nell'altro. Se si assume di operare in un sistema di assi rotanti alla

frequenza ω_A , questi due vettori ruotano con la stessa velocità ma con verso opposto. Per un tempo di evoluzione nullo, A^+ e A^- sono allineate lungo x e il secondo impulso a 90° comporta una globale inversione di M ; tale processo non genera acquisizione di segnale in quanto M non presenta componente trasversale. Per un tempo di evoluzione diverso da zero, A^+ e A^- precedono e in qualsiasi istante si possono scomporre in una componente lungo x e una lungo y, definite rispettivamente “in fase” e “in antifase”:

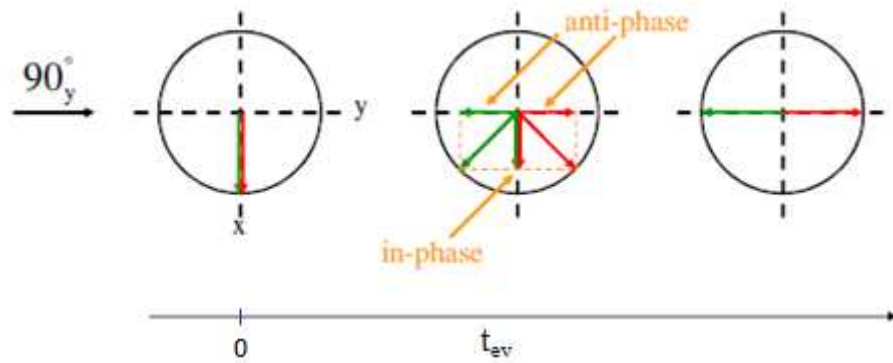


Figura 2.26 – Precessione di A^+ (in rosso) e A^- (in verde) al crescere di t_{ev}

Le componenti in fase non sono alterate dal secondo impulso a 90° , poiché sono già lungo x; perciò durante l’acquisizione esse generano un segnale che in entrambe le dimensioni ha la stessa frequenza ω_A . Dalla trasformata di Fourier di questo segnale si ricava uno spettro monodimensionale diretto lungo la diagonale del piano xy che non contiene informazioni aggiuntive rispetto all’esperienza classica.

Le componenti in antifase sono quelle che differenziano A^+ da A^- ; inoltre bisogna ricordare che A^+ è stata definita come transizione in cui X è nello stato β e viceversa per A^- . Si può quindi associare M generata da $X(\beta)$ ad A^+ e M generata da $X(\alpha)$ ad A^- , le quali ruoteranno assieme dopo il secondo impulso a 90° :

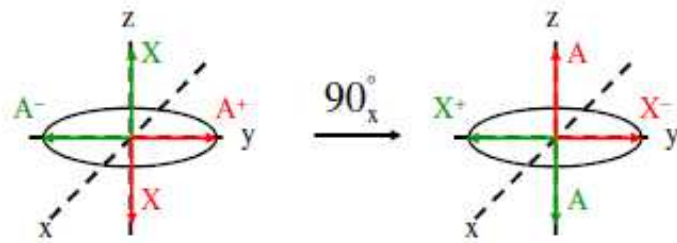


Figura 2.27 – Effetto del secondo impulso a 90° sulle magnetizzazioni di A e X

Per quanto riguarda la componente in antifase, ciò che viene acquisito è il segnale determinato da M di X, poiché è l’unica che si trova sul piano trasversale (A non lo è più). La trasformata di Fourier di questo segnale genera quindi cross-picchi di

coordinate ω_A e ω_X , situati fuori dalla diagonale e contenenti informazioni aggiuntive rispetto ai picchi dello spettro monodimensionale: ogni cross-picco indica un accoppiamento scalare diretto fra due protoni. Siccome questa trattazione è del tutto uguale per gli altri nuclei, anche partendo da X si otterrà un cross-picco con A e così via per il resto dei protoni; i cross-picchi sono pertanto generati a coppie speculari rispetto alla diagonale.

2.4.3 – Total Correlation Spectroscopy: TOCSY

L'esperimento COSY permette di vedere solo i protoni direttamente accoppiati scalarmente ed è utile per assegnare protoni legati allo stesso carbonio o a carboni consecutivi. Se però si vuole avere uno spettro in cui si osservano le correlazioni di un intero sistema di spin si può ricorrere a uno esperimento TOCSY, la cui sequenza è:

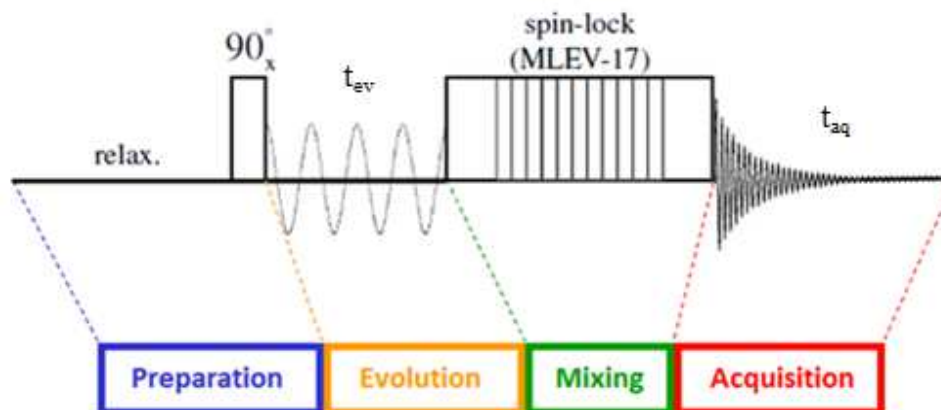


Figura 2.28 – Sequenza dell'esperimento TOCSY

Rispetto all'esperimento COSY, nella sequenza del TOCSY è mutato solo il tempo di mescolamento, costituito qui dallo spin-lock inserito dopo il tempo di evoluzione. Durante lo spin-lock il vettore \mathbf{M} è costantemente mantenuto sul piano xy e ha quindi il segnale ha il tempo di essere trasferito ai nuclei anche non direttamente accoppiati scalarmente, mediante una catena di accoppiamenti scalari nell'intero sistema di spin:

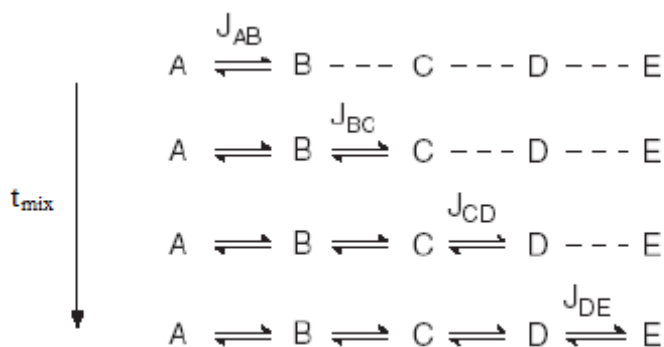


Figura 2.29 – La propagazione del trasferimento di \mathbf{M} aumenta all'aumentare della durata dello spin-lock

Eccezione fatta per il numero di cross-picchi, l'aspetto di uno spettro TOCSY è molto simile a quello di uno spettro COSY: in entrambi i cross-picchi derivano da

interazioni di tipo scalare e sono simmetrici rispetto alla diagonale. Il TOCSY presenta il vantaggio di essere molto sensibile e di poter visualizzare l'intero sistema di spin a cui un protone appartiene, mentre lo svantaggio principale consiste nell'impossibilità di determinare l'ordine di consecutività all'interno del sistema stesso; tuttavia si può facilmente ovviare a questo inconveniente mediante l'analisi congiunta di uno spettro COSY.

Nel *paragrafo 2.3.4* è illustrata una variante monodimensionale di questo esperimento, il TOCSY selettivo: mediante tale esperimento si possono ricavare nozioni su un singolo sistema di spin, mentre lo spettro bidimensionale restituisce informazioni su tutti i sistemi di spin presenti nel campione analizzato, a spese ovviamente dell'estesa quantità di tempo aggiuntivo necessario e della minore risoluzione.

2.4.4 – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy: NOESY

Mentre gli esperimenti TOCSY e COSY si basano sull'accoppiamento scalare fra protoni, l'esperimento NOESY è originato dall'effetto Overhauser fra protoni vicini nello spazio. La sequenza dell'esperimento è la seguente:

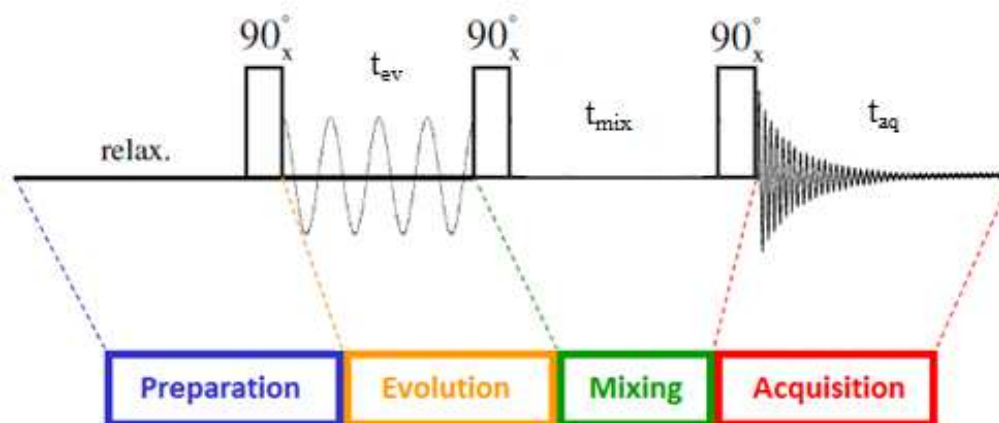


Figura 2.30 – Sequenza dell'esperimento NOESY

\mathbf{M} viene portata sul piano trasversale dal primo impulso a 90° , esattamente come negli esperimenti già visti in precedenza; durante il tempo di evoluzione il segnale precessa secondo il *chemical shift* e l'accoppiamento scalare e poi il successivo impulso a 90° riporta lungo l'asse z le componenti lungo y di \mathbf{M} . Prendendo ad esempio una coppia di protoni che ruotano con frequenze differenti la situazione creata è visualizzabile in questo modo:

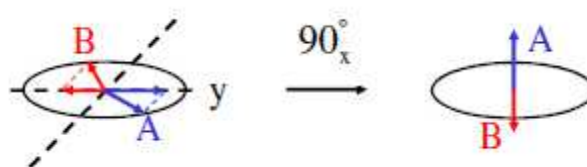


Figura 2.31 – \mathbf{M}_A e \mathbf{M}_B ($\omega_A \neq \omega_B$) lungo z dopo il secondo impulso a 90°

Si deve ricordare che è presente anche una componente lungo x di \mathbf{M} , che in *figura 2.31* non è rappresentata; tale componente genererà poi la diagonale nello spettro finale. A questo punto, in una situazione chiaramente di non equilibrio, è inserito nella sequenza il tempo di mescolamento che permette alle \mathbf{M} dei diversi nuclei di evolvere. Se essi sono dipolarmente accoppiati si influenzano a vicenda mediante transizioni W_0 o W_2 : ciò che si ottiene è una variazione di intensità nella magnetizzazione dei nuclei analogamente a quanto accade in un esperimento di saturazione selettiva (vedi *paragrafo 2.1.5*):

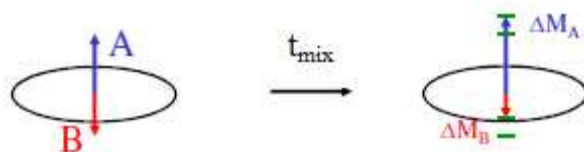


Figura 2.32 – Variazione di M_A e di M_B lungo z dopo il tempo di mescolamento

Infine, l'ultimo impulso a 90° permette di portare le componenti lungo z di M_A e di M_B lungo il piano trasversale al fine di registrare il segnale con l'acquisizione del FID. La trasformata di Fourier restituisce uno spettro in cui si trovano alcuni cross-picchi che hanno in entrambe le dimensioni la stessa frequenza, cioè la diagonale, e altri cross-picchi che invece hanno come coordinate le frequenze dei due nuclei dipolarmente accoppiati. Analogamente agli altri esperimenti omonucleari, anche nel NOESY i segnali sono simmetrici rispetto alla diagonale. Come spiegato nel *paragrafo 2.1.4*, le transizioni normalmente proibite dalle regole di transizione possono avvenire laddove sono presenti interazioni dipolari e la loro probabilità dipende anche da r^{-6} , cioè decresce molto rapidamente con la distanza internucleare; ne risulta che nello spettro NOESY è possibile visualizzare cross-picchi tra nuclei che distano 5 \AA o meno. Questo esperimento è molto importante perché permette di ottenere informazioni essenziali per l'identificazione di molecole incognite: la correlazione dipolare non è vincolata dal sistema di spin e quindi un cross-picco NOE permette di collegare i vari sistemi di spin di una stessa molecola; inoltre nei casi migliori tali informazioni spaziali possono permettere di definire la conformazione e la disposizione tridimensionale di una struttura complessa.

2.4.5 – Esperimenti eteronucleari: HMQC e HMBC

Per avere informazioni che permettano di correlare eteronuclei si deve ricorrere a sequenze che permettano alla **M** di evolvere con le frequenze dei vari nuclei da esaminare. La sequenza dell'esperimento che si basa sulla coerenza eteronucleare a multiplo quanto, HMQC, fra nuclei scalarmente accoppiati è la seguente:

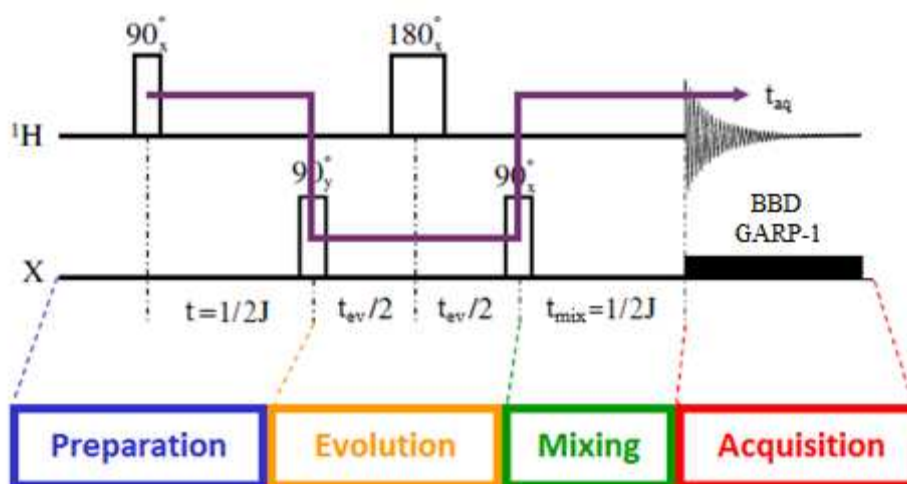


Figura 2.33 – Sequenza dell'esperimento HMQC; in viola è evidenziato il trasferimento di **M** dal protone all'eteronucleo X (solitamente ^{13}C o ^{15}N) e viceversa

Siccome il rapporto giromagnetico del ^1H è maggiore di quello degli altri nuclei, il primo impulso a 90° è inviato sul protone per avere maggiore sensibilità (vedi paragrafo 2.2.5). Il tempo successivo al primo impulso permette la creazione di un termine di **M** definito in antifase del protone rispetto all'eteronucleo, dove questi ultimi sono scalarmente accoppiati; avere una componente in antifase, ovvero coerenza a singolo quanto, significa che esiste un termine di **M** che per il protone è sul piano trasversale, mentre per l'eteronucleo è diretta lungo z. In particolare, per un tempo pari alla metà del reciproco della J_{HX} l'unico termine rimanente è proprio quello in antifase appena originato: questo accorgimento permette di non sprecare segnale, lasciandone parte nella componente in fase residua. Il secondo impulso a 90° è inviato su X per far avvenire il trasferimento di **M** dal protone all'eteronucleo stesso mediante la creazione di un termine definito coerenza a multiplo quanto, cioè in cui **M** per entrambi i nuclei è sul piano trasversale. Durante il tempo di evoluzione **M** precessa con la frequenza di X, per poi essere riportato a un termine di coerenza a singolo quanto con un altro impulso a 90° su X. Il tempo di mescolamento è impostato in maniera identica al tempo tra i primi due impulsi; questo accorgimento, congiuntamente all'invio di un impulso a 180° sul protone a metà del tempo di evoluzione, permette di annullare ogni precessione dovuta alla frequenza del protone e all'accoppiamento scalare tra ^1H e X. A questo punto il segnale viene acquisito e, trovandosi sul canale del protone, **M** ritorna all'equilibrio proprio con la frequenza di ^1H . Sul canale dell'eteronucleo è inviata una sequenza d'impulsi per attuare il BBD,

in quanto la molteplicità ridurrebbe la già scarsa sensibilità dell'esperimento e complicherebbe spettri solitamente già di per sé affollati. La trasformata di Fourier genera quindi dei cross-picchi di coordinate ω_H e ω_X laddove H e X sono accoppiati scalarmente, permettendo così di ottenere informazioni su correlazioni eteronucleari. Variando il tempo di mescolamento e il tempo ad esso coniugato si possono selezionare J differenti: una J di circa 150Hz, corrispondente a un tempo di 3.33ms, è usuale fra un protone e il carbonio a cui esso è direttamente legato; invece una J di circa 10Hz, corrispondente a un tempo di 50ms, è solita tra un protone e un carbonio distante due o tre legami. Gli esperimenti che permettono di visualizzare tali informazioni sono denominati rispettivamente HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence); in quest'ultimo è presente un filtro che permette di non visualizzare nello spettro i cross-picchi dovuta alle $^1J_{HX}$.

L'esperimento $^1H/^{13}C$ HMQC permette inoltre di avere maggior sensibilità di un esperimento ^{13}C 1D, con l'inconveniente tuttavia di non poter visualizzare i carboni quaternari; l'esperimento HMBC invece non presenta questo problema, rappresentando così una alternativa più sensibile, sebbene significativamente più complessa da analizzare, al semplice monodimensionale al carbonio.

Capitolo 3

Esperimenti preliminari e strumentazione utilizzata

3.1 – Procedura sperimentale e strumentazione

La preparazione iniziale dei campioni descritta in seguito è stata effettuata dal professor Michele D'Ambrosio dell'Università degli studi di Trento. Tutti i solventi di cui non siano specificate le caratteristiche hanno purezza di grado analitico (per HPLC).

Tre litri di succo d'uva Moscato Giallo fresco sono stati centrifugati a 3000giri/min per 15 minuti a temperatura ambiente. Il liquido soprastante, suddiviso in tre contenitori da un litro, è stato fatto passare per tre volte in una colonnina (cm 25x4) riempita di resina Amberlite XAD-2 (Fluka Chemie, Büchs, Svizzera); i lavaggi sono stati effettuati con due litri d'acqua e due litri di etanolo per HPLC (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia) per eliminare gli zuccheri. I tre eluati sono poi stati raccolti e seccati sotto vuoto, ottenendo circa 2g di residuo organico.

Per eliminare i flavonoidi dal residuo, esso è stato sottoposto in aliquote a cromatografia flash, utilizzando cianopropil-silica (LiChroprep® CN 40-63 µm, Merck, Darmstadt) come fase stazionaria: con 200mL di acetato di etile al 60% in esano si è ottenuta la frazione 1; con 400mL di acetato di etile la frazione 2; con 200mL di etanolo al 5% in acetato di etile la frazione 3; con 200mL di etanolo la frazione 4. Le frazioni 2 e 3 sono quindi state riunite (850mg) e poi disciolte in 40mL di metanolo, con l'aggiunta di 2.5g di Pb(OAc)₂ (Merck, Steinheim, Germania). La miscela è stata mescolata per due ore a temperatura ambiente e quindi centrifugata a 3000giri/min per 15 minuti; il precipitato è stato lavato via con metanolo. A questo punto un cucchiaino di fase stazionaria ODS (LiChroprep® RP-18 40-63 mm, Merck, Darmstadt) è stato versato nella soluzione limpida e il solvente è stato allontanato per evaporazione; quindi il tutto è stato trasferito nella colonna ODS (cm 8x4) ed è stato eluito con un gradiente di metanolo in acqua. Le frazioni centrali, eluite con una concentrazione di metanolo compresa tra il 15% e il 70%, sono state dissolte in etanolo e purificate con HPLC a fase inversa. Gli eluenti usati sono stati una miscela al 50% di acqua ed etanolo (A) e acqua al 100% (B); il gradiente è stato mantenuto inizialmente al 60% di A, per poi essere portato con variazione lineare all'80% di A in trenta minuti con flusso di 5mL/min. L'apparato strumentale usato per HPLC preparativa è Merck Hitachi, pompa L-7100, rilevatore UV L-7400 con λ di acquisizione impostata a 210nm, integratore D-7500 and iniettore manuale Rheodyne equipaggiato con valvola di 200µL, colonna Synergi Hydro, mm 150x10, diametro particelle 4 µm, dimensione dei pori 80 Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Le frazioni ottenute, contenenti teoricamente solo i terpeni glicosilati, sono quindi state spedite al Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli studi di Padova al fine di effettuare le analisi di risonanza magnetica e cromatografiche, accoppiate ad analisi di massa.

Le analisi di cromatografia liquida e di massa sono svolte dalla professoressa Gabriella Favaro, con la collaborazione della dottoressa Sara Tosi. Per la cromatografia liquida è adoperato lo strumento LC-MS-MS Agilent (Santa Clara, CA, USA), U-HPLC 1200 con rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi. Gli

eluenti utilizzati sono acetato d'ammonio 5 mM in acqua (C) e acetato d'ammonio 5 mM in metanolo (D) con il seguente gradiente: 0-5' 20% D, 5-25' dal 20 al 100% di D, 25-30' al 100% di D, 30-31' dal 100 al 20% di D, 31-36' al 20% di B (condizionamento della colonna); il flusso è mantenuto a 0.2mL/min. Sono iniettati 10 μ L in colonna, (Kinetex C18, mm 100x2.1, 2.6 μ m di diametro, core shell, Phenomenex, Torrance, CA, USA), la cui temperatura è mantenuta costante a 30°C.

Lo spettrometro di massa è QTOF 6520: capillare a 350°C, gas di asciugatura N₂ (11L/min), gas di nebulizzazione N₂ (35psig), potenziale applicato al capillare di 3500V, frammentazione (declustering) di 120 V, gas per la camera di collisione N₂, CID (energia di collisione) per MS-MS pari a 10eV. Le condizioni sperimentali conducono prevalentemente ad addotti formati da uno ione sodio, potassio o ammonio legato alla molecola.

Le soluzioni per l'analisi di risonanza magnetica nucleare sono preparate sciogliendo le frazioni in 600 μ L di CD₃OD (Aldrich, purezza maggiore del 99.8%) e quindi trasferite in un tubo NMR. Lo strumento usato è un Bruker AVANCE DMX 600 con il software TOPSPIN come programma di controllo ed elaborazione preliminare. Per interpretare gli spettri accuratamente si sono utilizzati i software ACD con ChemSketch e MestReC.

3.2 – Analisi preliminare

Gli spettri monodimensionali protonici delle otto frazioni analizzate e della miscela di partenza sono riportati, sovrapposti, in figura:

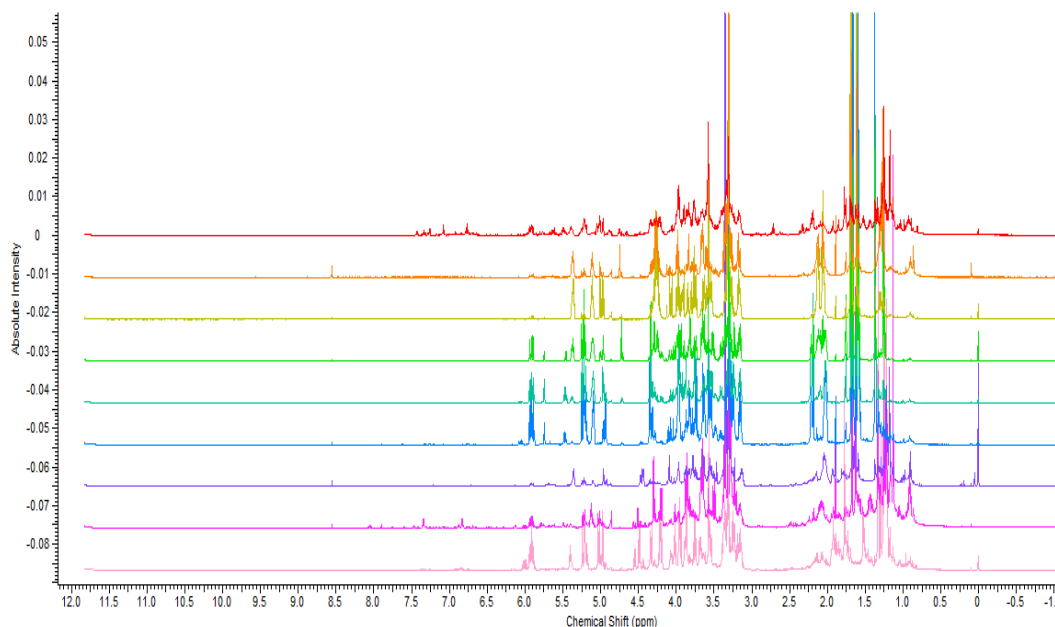


Figura 3.1 – Sovrapposizione degli spettri ¹H 1D di tutte le frazioni e della miscela di partenza (dall'alto: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, miscela)

Dall'osservazione, spiccano subito due regioni particolarmente ricche di segnali: la zona intorno ai 3.5ppm, che raccoglie gran parte dei picchi generati dagli idrogeni degli zuccheri ed è molto affollata; la zona centrata a 1.5ppm, dove sono presenti meno sovrapposizioni, comprende molti segnali relativi ai protoni terpenici. Si è partiti con l'analisi della Frazione 2, rossa in *figura 3.1*.

Capitolo 4

Procedura sperimentale

4.1 – Frazione 2

4.1.1 – Prima analisi dell'esperimento monodimensionale protonico

Lo spettro monodimensionale protonico è acquisito con i seguenti parametri d'acquisizione: NS = 16, TD = 32768, SW = 14ppm, O1P = 4.87ppm, D1 = 1s, TE = 298K (salvo eccezioni segnalate, tutti gli spettri sono stati registrati a 298K). Si utilizza una sequenza con presaturazione per ridurre l'intensità del segnale e quindi ottenere una miglior digitalizzazione dei segnali dei composti ad intensità più bassa. Precisamente il centro dello spettro (O1P) è impostato sul picco dell'ossidrile del metanolo, alla cui frequenza viene inviata un'onda continua prima dell'impulso a 90°. L'RG è regolato poi in base alla concentrazione del campione. Lo spettro ottenuto è elaborato a partire dal FID con il programma ACD, svolgendo le seguenti operazioni:

- il Points Count è impostato a 131072;
- la funzione finestra utilizzata è un'esponenziale decrescente con fattore LB = 0.5;
- si esegue la trasformata di Fourier;
- la fase è ottimizzata tramite correzione di ordine zero e primo ordine;
- si sistema la linea di base mediante correzione manuale a punti;
- il picco del TMS è posto pari a 0ppm ed è quindi utilizzato come riferimento.

Lo spettro ottenuto è il seguente:

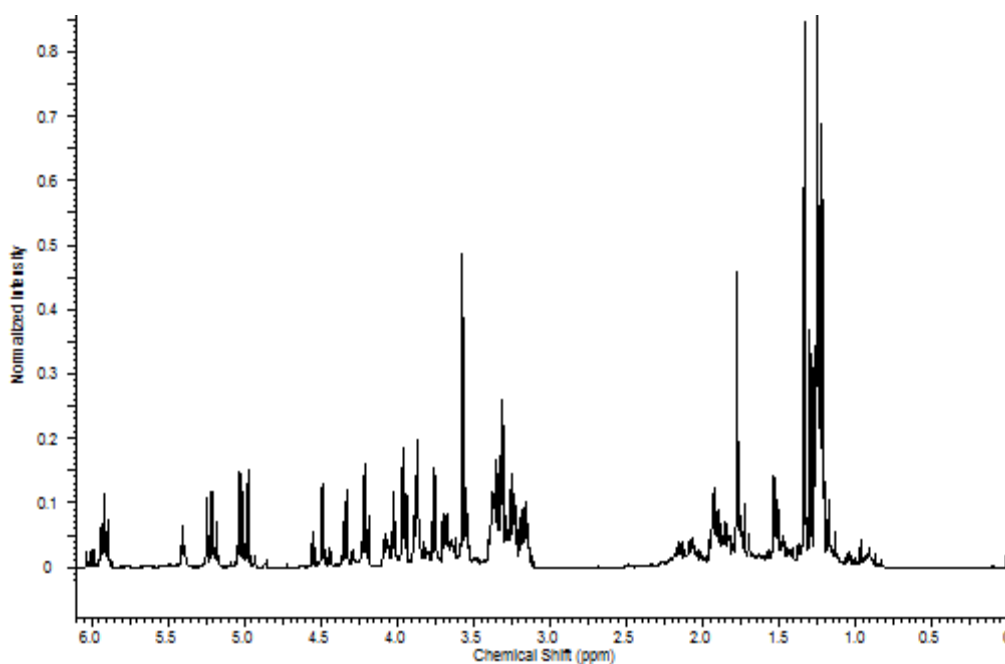


Figura 4.1 – Spettro ^1H 1D

Lo spettro è riportato solo tra 0 e 6.1ppm, poiché oltre tale *chemical shift* non sono presenti picchi di intensità apprezzabile.

Si focalizza l'attenzione sulla zona a circa 6ppm, dove risuonano i segnali terpenici:

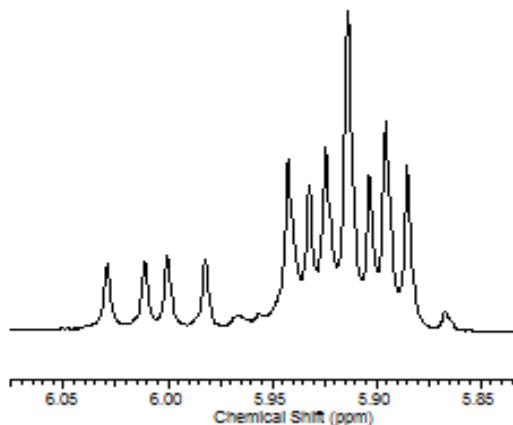


Figura 4.2 – Ingrandimento a circa 6ppm nello spettro ^1H 1D

Il sistema di picchi a circa 6ppm appare come un doppietto di doppietti. A circa 5.92ppm invece è presente un multipletto che a prima vista potrebbe sembrare un settetto; tuttavia un'ipotesi più accreditabile è che sia un multipletto ottenuto dalla sovrapposizione di due doppietti di doppietti simili a quello centrato a 6.01ppm. Questi tre segnali sono attribuibili a tre protoni distinti, molto simili in quanto a intorno chimico, che possono appartenere alla stessa molecola o a due o tre molecole diverse. Siccome i valori di *chemical shift* indicano che si tratta probabilmente di protoni legati a carboni olefinici e inoltre la molteplicità suggerisce che tale doppio legame sia terminale, cioè abbia tre posizioni su quattro occupate da protoni, è plausibile che le molecole in esame siano proprio tre entità differenti: molti terpeni presenti nel vino infatti possiedono un doppio legame di questo genere, ma praticamente nessuno ne presenta due. Sulla base di queste speculazioni, si procede con l'identificazione delle tre molecole principali (in termini di abbondanza) a partire proprio da questi picchi. I valori esatti di *chemical shift* riportati in tutto l'elaborato sono quelli evinti dai monodimensionali al ^1H e al ^{13}C .

4.1.2 – Altri esperimenti NMR

Di seguito sono riportati i parametri d'acquisizione degli esperimenti registrati; negli esperimenti eterocorrelati i parametri relativi all'eteronucleo sono evidenziati in grassetto:

Esperimento	NS	TD	SW (ppm)	O1P (ppm)	D1 (s)	1/2J (s)	t _{mix} (s)
¹³ C 1D	8192	262144	195.5	96.77	8	/	/
COSY	165	2048/400	13	6.3	1	/	/
TOCSY	128	2048/512	13	4.87	2	/	/
NOESY	214	2048/512	14	6.5	1.3	/	0.7
HMBC	256	2048/ 130	13/ 200	6/ 100	1.5	0.06667	/
HMQC	180	2048/ 130	13/ 200	4.87/ 100	2	0.00345	/
HMQCfold30	300	2048/ 130	11/ 50	4.87/ 30	2	0.00345	/
HMQCfold80	300	2048/ 180	11/ 50	4.87/ 80	2	0.00345	/
HMQCfold125	300	2048/ 180	11/ 50	4.87/ 125	2	0.00345	/

Tabella 4.1 – Parametri d'acquisizione degli esperimenti NMR

Lo spettro monodimensionale al carbonio è calibrato assegnando il valore di 49.15ppm al picco del solvente. Per il processamento degli spettri NMR bidimensionali si effettua la FT, la correzione della fase, la correzione della linea di base e la calibrazione con i programmi TOPSPIN e MestReC.

È riportata l'immagine di ciascuno spettro, escludendo le regioni prive di segnali.

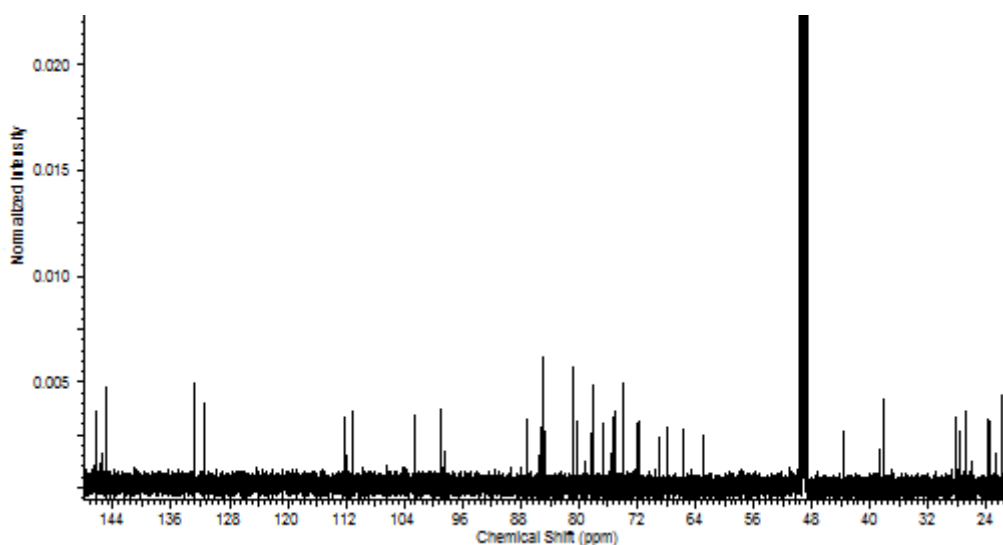


Figura 4.3 – Ingrandimento nello spettro ¹³C 1D

Questo esperimento ^{13}C monodimensionale è eseguito con una sequenza leggermente diversa da quella riportata nel *paragrafo 2.3.5*: il BBD è inviato solo durante l'acquisizione e non anche durante il tempo di rilassamento, per tentare di rendere più attendibili gli integrali, in particolar modo quelli dei picchi generati da carboni carbonilici e quaternari. Il D1 viene ottimizzato, per permettere al segnale del carbonio, che rilassa più lentamente rispetto al protone, di riallinearsi completamente all'asse z. Il risultato di questa diversa sequenza è uno spettro con rapporto S/N modesto, poiché avendo D1 lungo le scansioni impostate non sono moltissime al fine di evitare tempi d'acquisizione troppo lunghi.

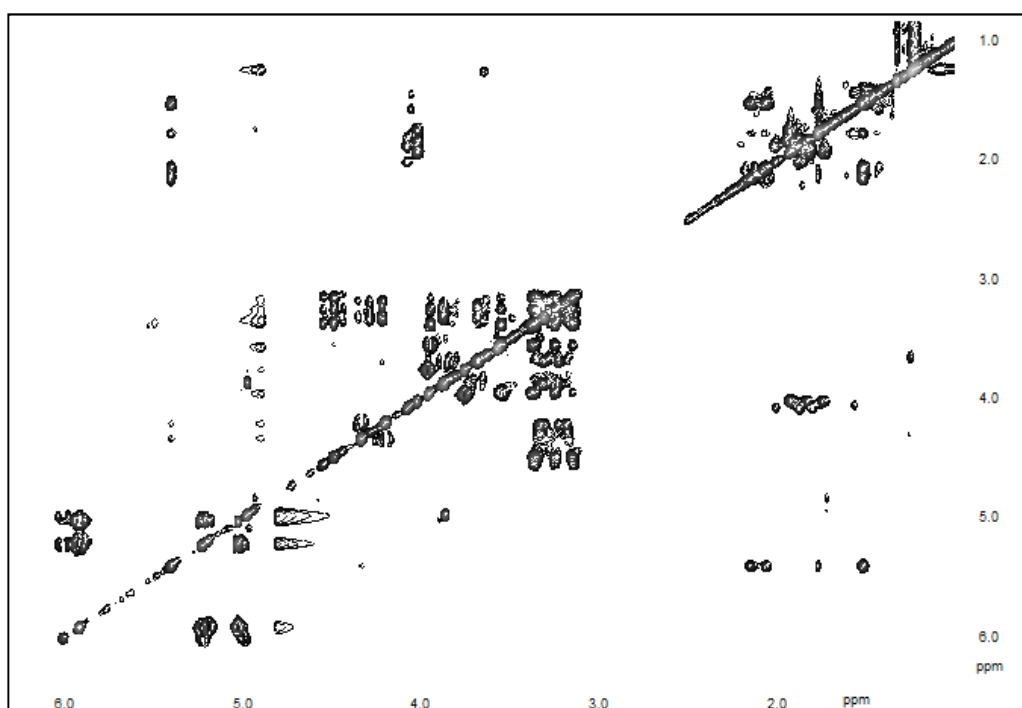


Figura 4.4 – Ingrandimento nello spettro TOCSY

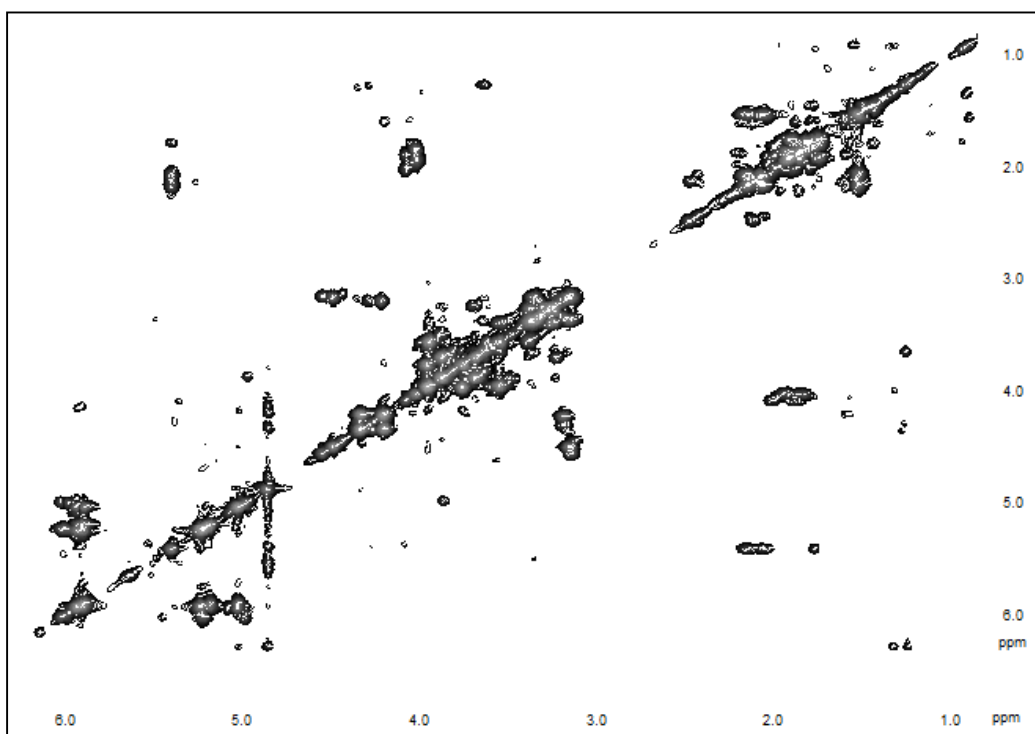


Figura 4.5 – Ingrandimento nello spettro COSY

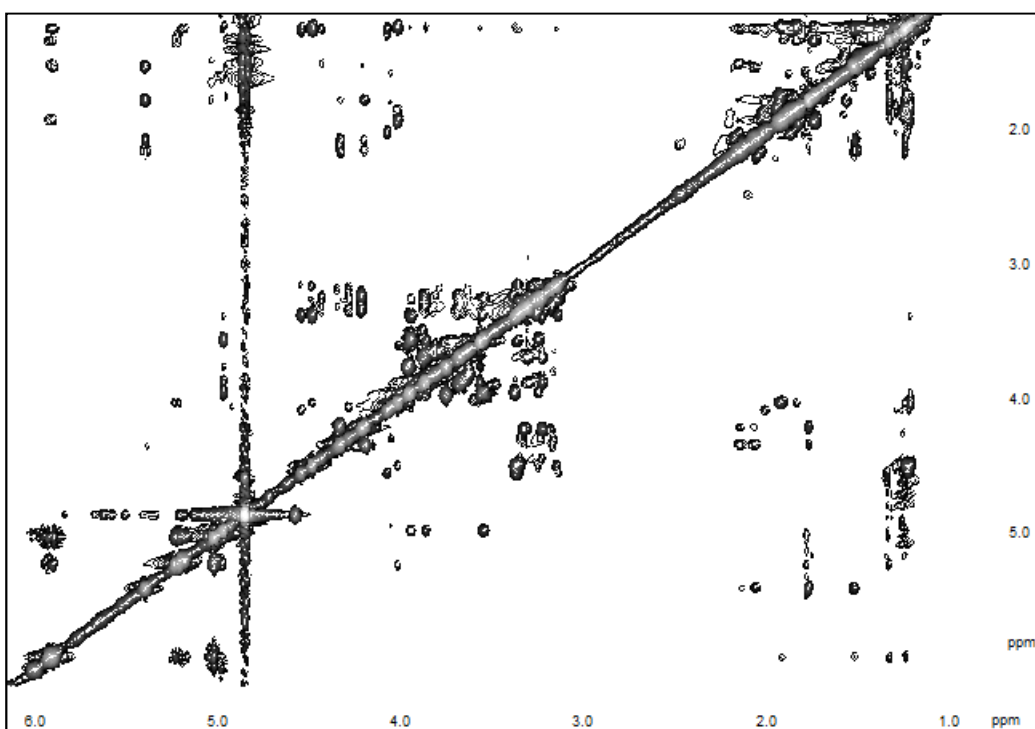


Figura 4.6 – Ingrandimento nello spettro NOESY

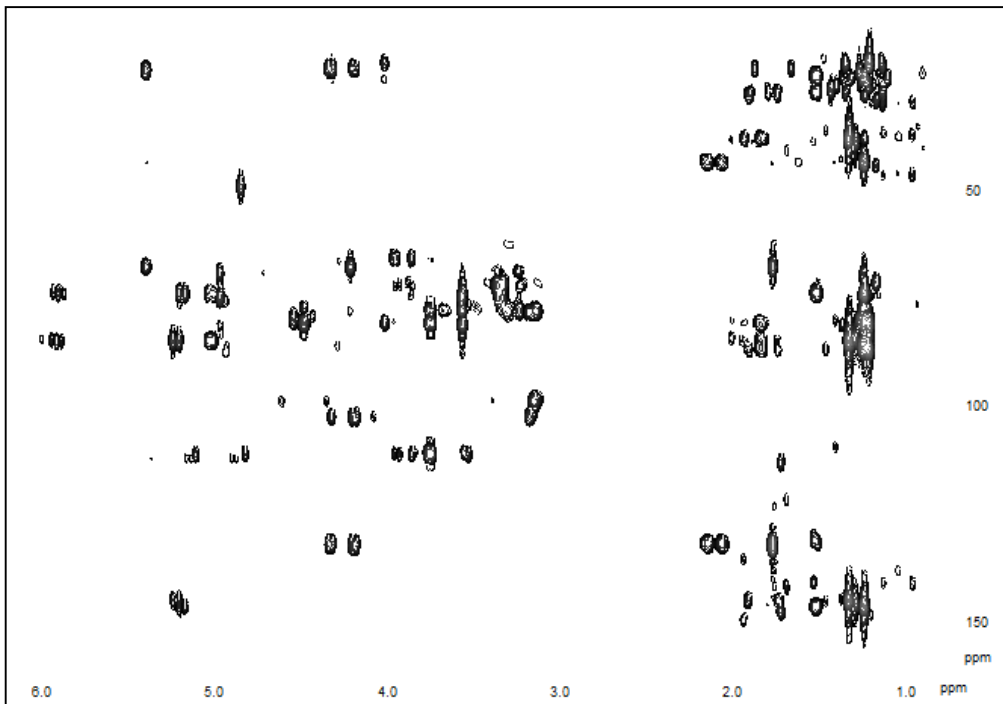


Figura 4.7 – Ingrandimento nello spettro HMBC

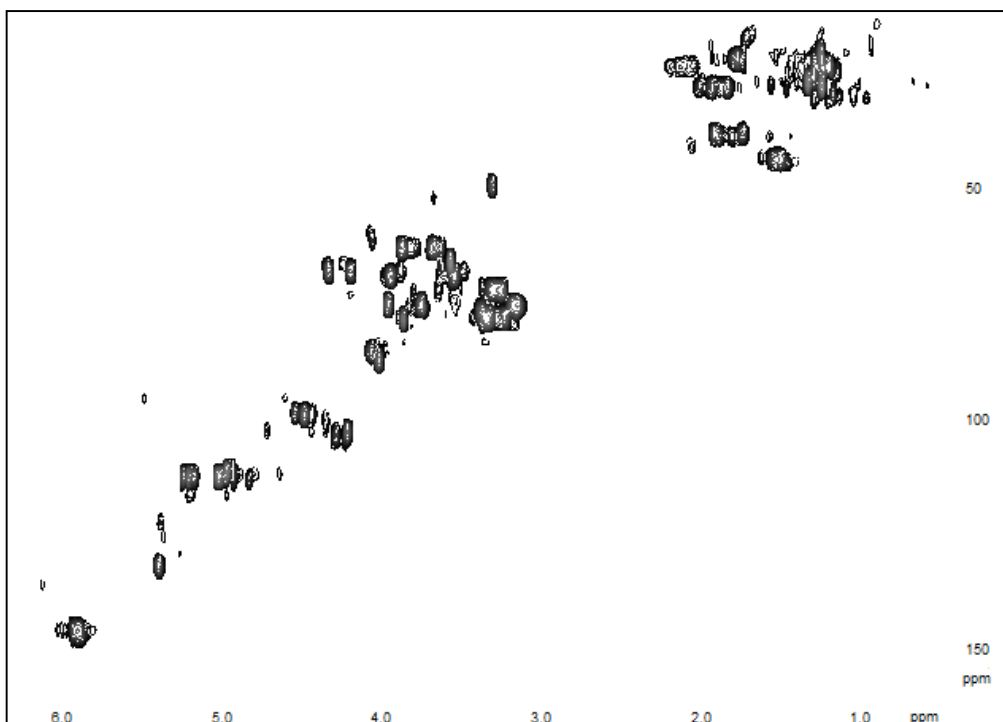


Figura 4.8 – Ingrandimento nello spettro HMQC

Si nota che nello spettro HMQC ci sono due zone particolarmente affollate intorno ai 30 e agli 80ppm: i cross-picchi sono talmente sovrapposti da rendere difficile l'assegnazione. Si è incrementata la risoluzione registrando uno spettro dove è diminuita drasticamente la finestra di acquisizione (SW) nella dimensione del carbonio. Gli inconvenienti principali a questa metodologia sono due: l'aumento della durata complessiva dell'esperimento e la possibilità di ritrovare nello spettro dei picchi "foldati". Tali artefatti sono cross-picchi che non si trovano realmente all'interno della finestra ridotta, ma sono specchiati al suo interno rispetto al margine della finestra stessa. L'osservazione congiunta dell'HMQC totale e degli HMQC definiti pertanto "foldati" è necessaria per ovviare a questo problema. Sono stati registrati tre differenti HMQC foldati per avere maggiori informazioni sui legami carbonio-idrogeno:

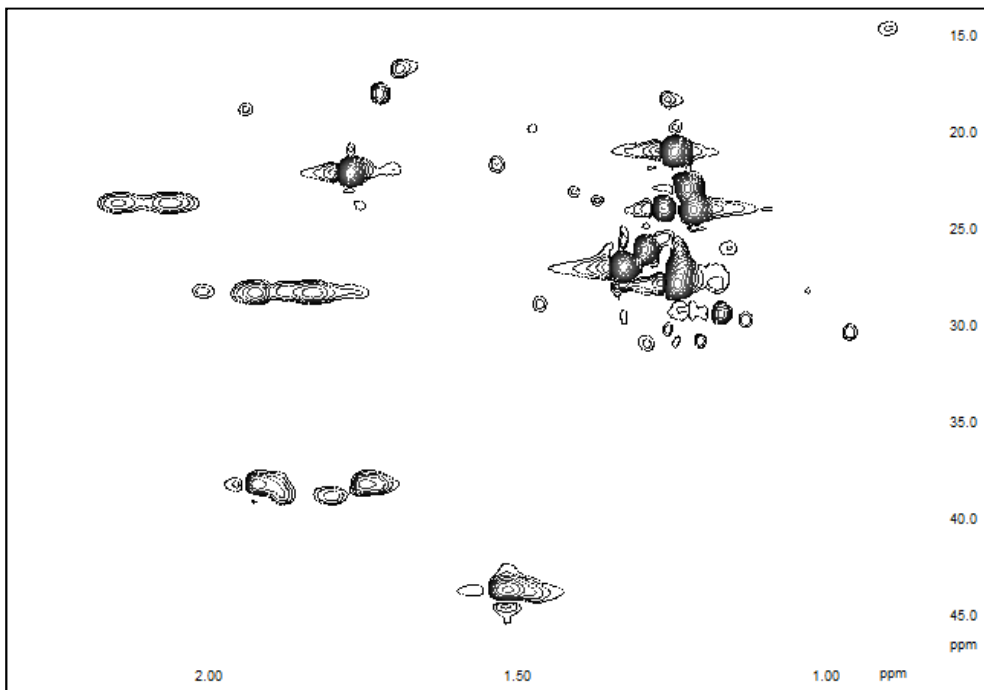


Figura 4.9 – Ingrandimento nello spettro HMQC foldato centrato a 30ppm

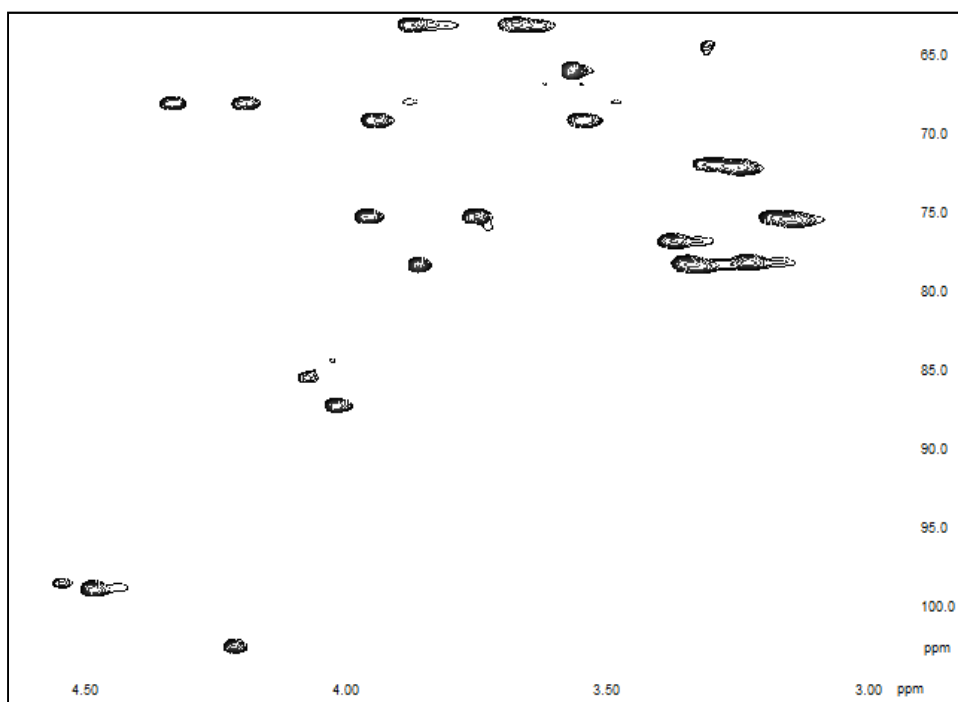


Figura 4.10 – Ingrandimento nello spettro HMQC foldato centrato a 80ppm

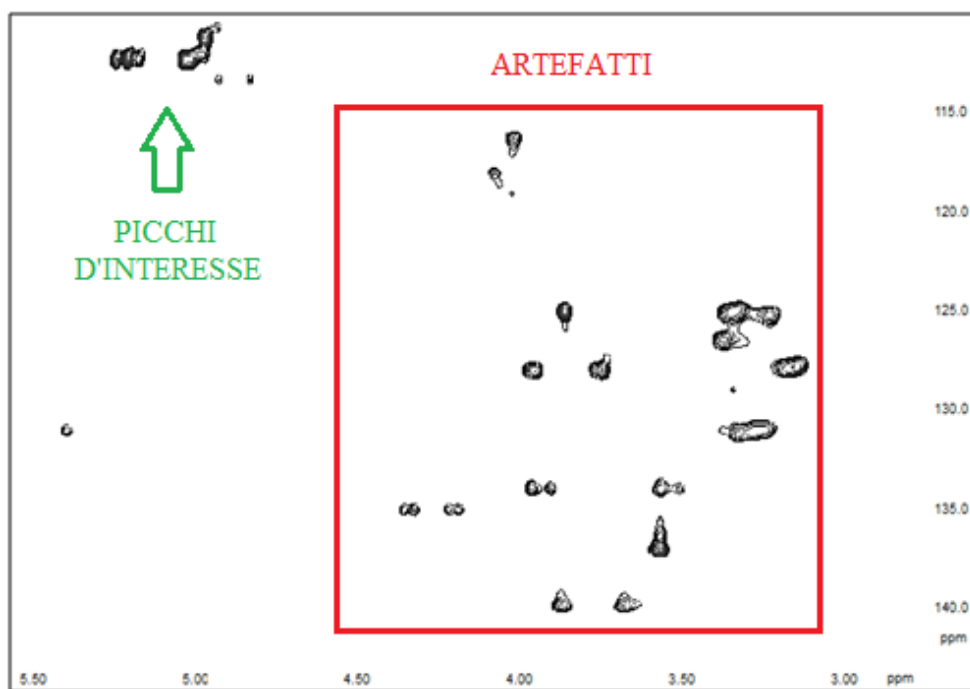


Figura 4.11 – Ingrandimento nello spettro HMQC foldato centrato a 125ppm

4.1.3 – Spettri di massa

Si riporta lo spettro di massa registrato:

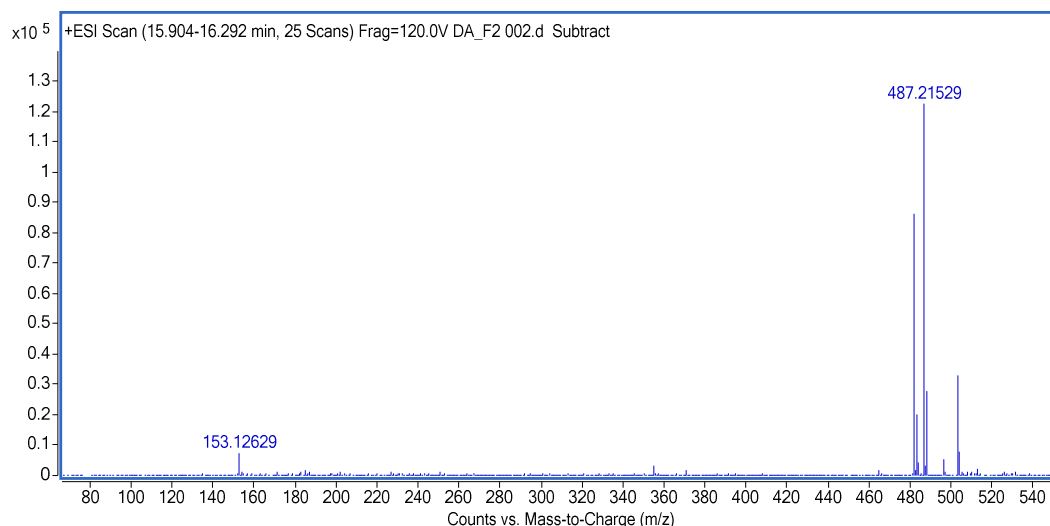


Figura 4.12 – Spettro ESI-MS

Lo spettro MS-MS in cui è visibile la frammentazione dello ione con m/z pari a 482 è il seguente:

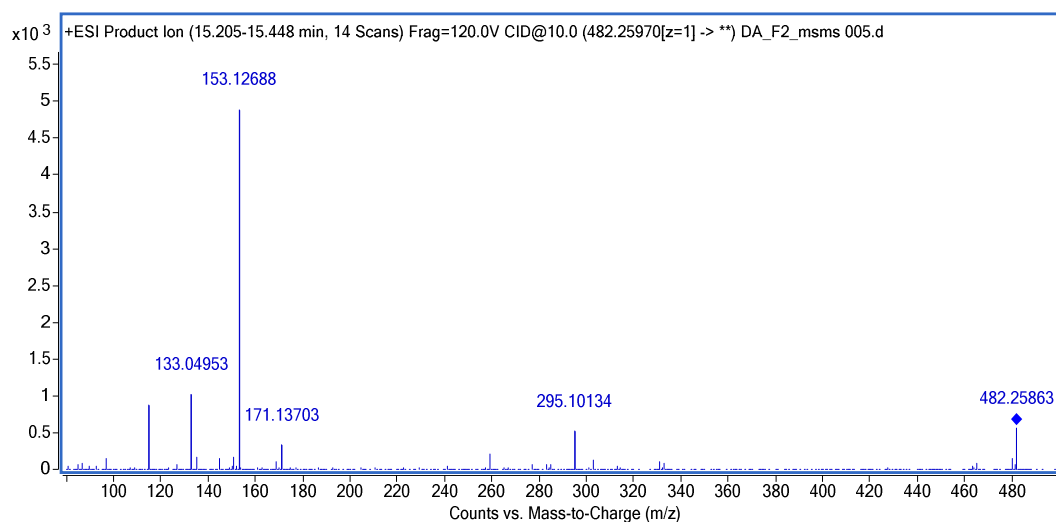


Figura 4.13 – Spettro di massa tandem ottenuto dalla frammentazione dello ione di m/z pari a 482

Nello spettro di massa appare evidente che il picco base è quello a $487m/z$, accompagnato da un picco molto intenso a $482m/z$. Questi due picchi sono presumibilmente lo ione sodiato e lo ione ammoniato di una o più molecole di massa pari a $464g/mol$ (arrotondata alle unità). Il picco molto debole a $153m/z$ è compatibile con il peso di un terpene protonato.

4.1.4 – Distinzione degli analiti principali

L'analisi delle correlazioni presenti in alcune zone degli esperimenti TOCSY, NOESY ed HMBC ha permesso di identificare tre distinti sistemi di spin, evidenziati in seguito con colori diversi:

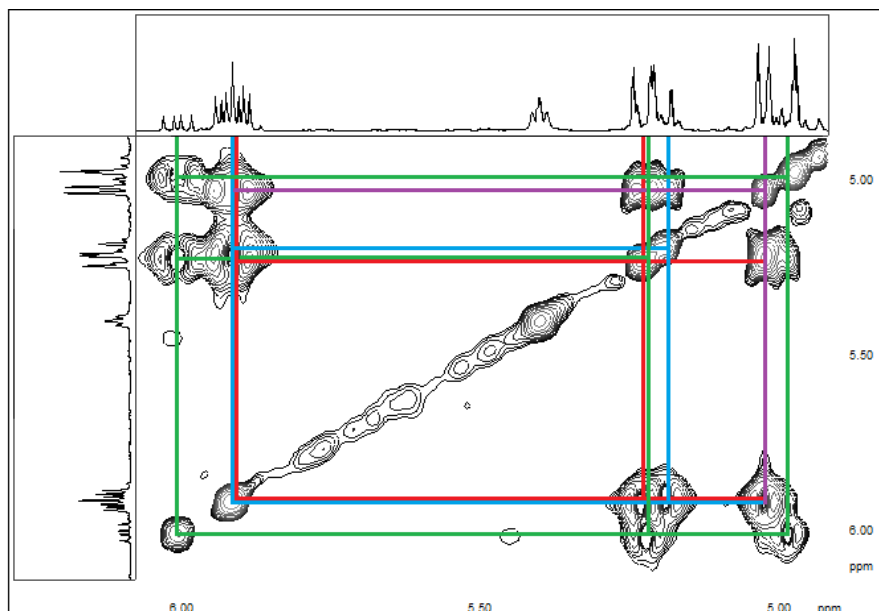


Figura 4.14 – Ingrandimento nello spettro TOCSY: in verde, blu e rosso sono evidenziati i tre sistemi di spin; in viola sono evidenziate le correlazioni con due protoni che cadono pressoché alla stessa frequenza.

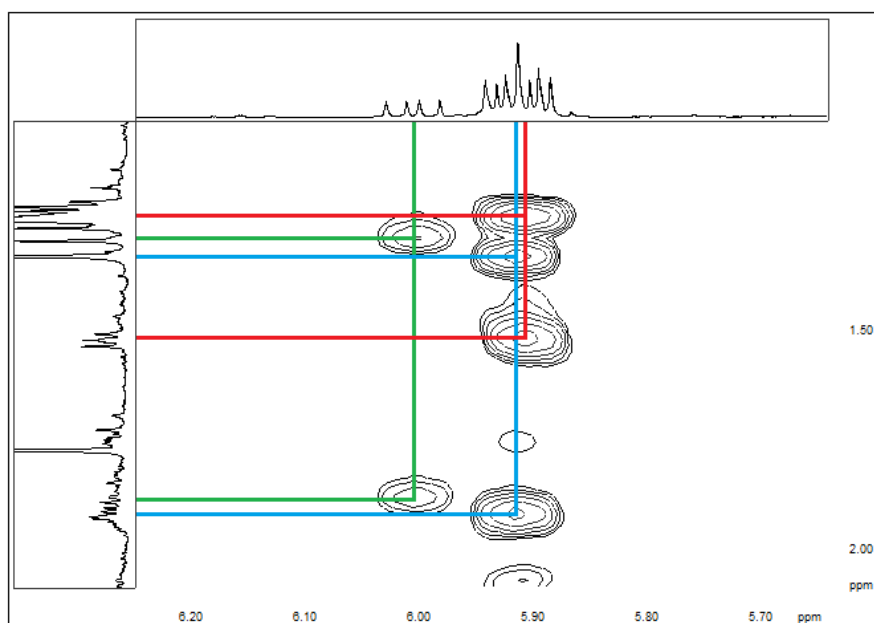


Figura 4.15 – Ingrandimento nello spettro NOESY, i tre colori indicano i tre protoni

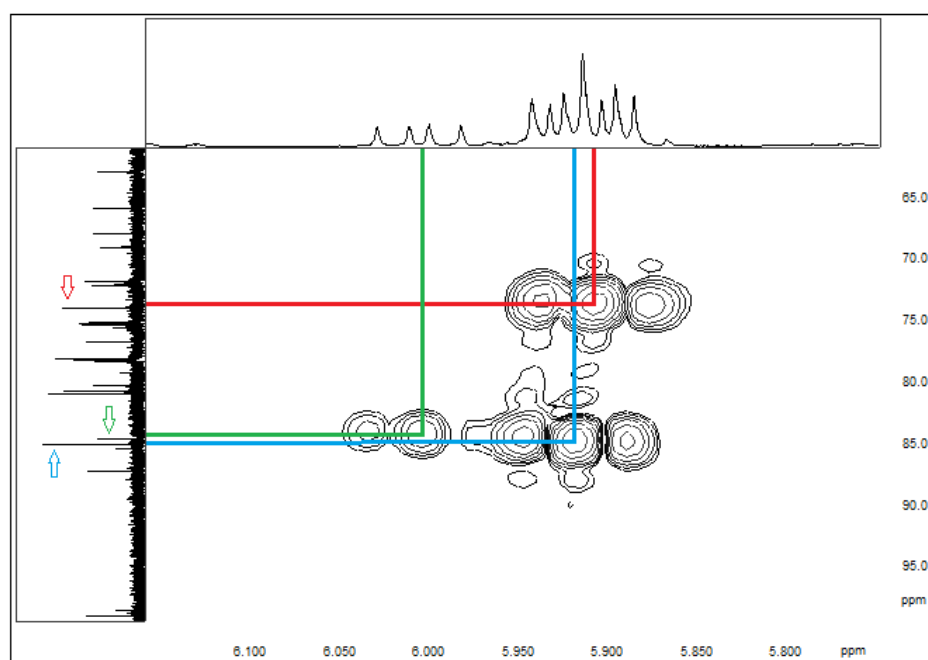


Figura 4.16 – Ingrandimento nello spettro HMBC, le frecce colorate evidenziano l'accoppiamento con carboni differenti

Per comodità, inizialmente si denominano i tre composti in base al protone da cui si è cominciato ad analizzarli: 6.01, 5.92 e 5.91ppm, rispettivamente verde, blu e rosso nelle figure soprastanti.

4.1.5 – “Molecola 6.01”, identificazione del terpene (Z)-linalossido

Un’analisi mirata dello spettro in *figura 4.14* mostra che il sistema di spin del protone a 6.01ppm è formato da altri due protoni. Il valore esatto di *chemical shift* è difficilmente ottenibile dal monodimensionale protonico e ancor meno nel TOCSY. Sono quindi registrati tre TOCSY selettivi monodimensionali con impulso centrato a ppm leggermente differenti:

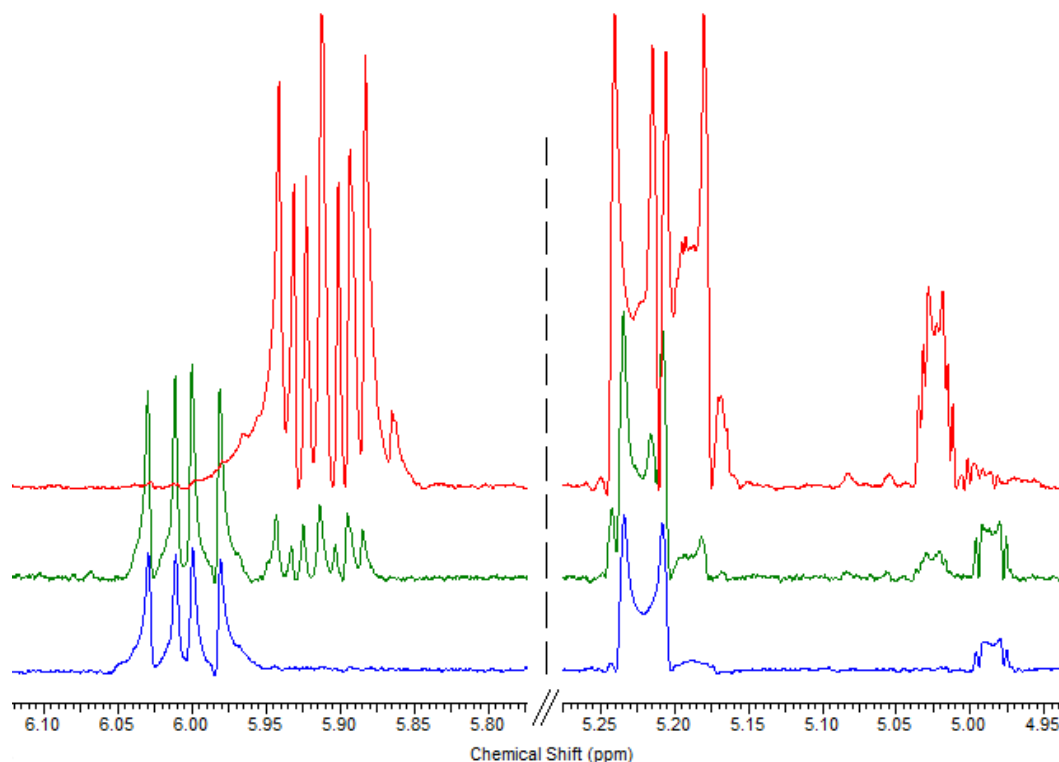


Figura 4.17 – Sovrapposizione tra i TOCSY selettivi con OIP impostato a 6.05ppm (blu, in basso), 6.00ppm (verde, al centro) e 5.88ppm (rosso, in alto)

In riferimento alla figura soprastante, nello spettro blu si può osservare che sono i protoni a 5.22 e a 4.99ppm che costituiscono il sistema di spin del protone a 6.01; nello spettro rosso si vedono i sistemi di spin degli altri due protoni a 5.92 e 5.91ppm. Nello spettro verde si possono osservare tutti i sistemi, anche se quello del protone a 6.01ppm spicca in intensità; questo è dovuto al fatto che l’impulso è stato inviato a 6.00ppm. Questi spettri di fatto non sono integrabili, ma le differenze di intensità dei segnali possono permettere di trarre comunque informazioni interessanti, se analizzate con attenzione; per esempio nello spettro verde a circa 5.22ppm si può osservare che sono presenti due diversi doppietti, uno più intenso dell’altro e corrispondenti ai due doppietti distinti negli spettri blu (5.22ppm) e rosso (5.23ppm).

Dallo spettro HMQC foldato centrato a 125ppm si ricava che il carbonio olefinico legato ai protoni a 5.22 e 4.99ppm risuona a 112.08ppm, mentre grazie all’HMQC si trova che il carbonio legato al protone a 6.01ppm risuona a 145.56ppm. La

conformazione è stabilita grazie alle costanti di accoppiamento scalare nello spettro monodimensionale e nel TOCSY selettivo. Le J trovate sono rispettivamente di 17.41Hz, di 10.75Hz e 1.54Hz (vedi *tabella 2.2*) e pertanto questa parte di molecola è rappresentabile in questo modo:

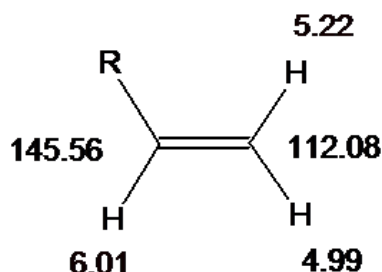


Figura 4.18 – Doppio legame terminale presente nella molecola

Il sistema di spin è interrotto, quindi il carbonio a 145.56ppm deve essere legato a un carbonio tetrasostituito o a un eteronucleo; si sa infatti dal monodimensionale al ^{13}C e dallo spettro HMBC che non sono presenti carbonili. Si ricorda che una classe di composti nella quale ci sono molte molecole che presentano un doppio legame terminale è proprio quella dei terpeni, illustrati brevemente nel *paragrafo 1.1.2*. A questo punto si deve ricorrere agli spettri NOESY ed HMBC per procedere con l'assegnazione (come mostrato in *figura 4.15* e *figura 4.16*). Nella tabella sottostante sono riassunte le informazioni salienti ricavate:

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)	HMBC (ppm)
4.99	/	84.60
5.22	/	84.60 (sovrapp.)
6.01	1.29; 1.86	26.01; 38.82; 84.60

Spettro ^{13}C 1D (ppm)	HMBC (ppm)
145.56	1.86; 1.80; 1.29

Tabella 4.2 – Cross-picchi fondamentali per congiungere il doppio legame terminale al resto della molecola

Si noti che in questa tabella e in tutte le tabelle a seguire non sono riportati tutti i cross-picchi NOE, bensì solo quelli che forniscono informazioni aggiuntive rispetto agli altri esperimenti. È evidente che c'è un carbonio tetrasostituito che risuona a 84.60ppm; tale *chemical shift* implica che probabilmente esso è legato anche ad un ossidrile. Gli altri due sostituenti potrebbero essere i due carboni alifatici legati ai protoni che risuonano a 1.29 e 1.86ppm; nell'HMQCfold30 è riscontrato che essi risuonano a 26.01 e 28.16ppm. Il passo successivo è trovare con lo spettro TOCSY i sistemi di spin dei protoni appena identificati:

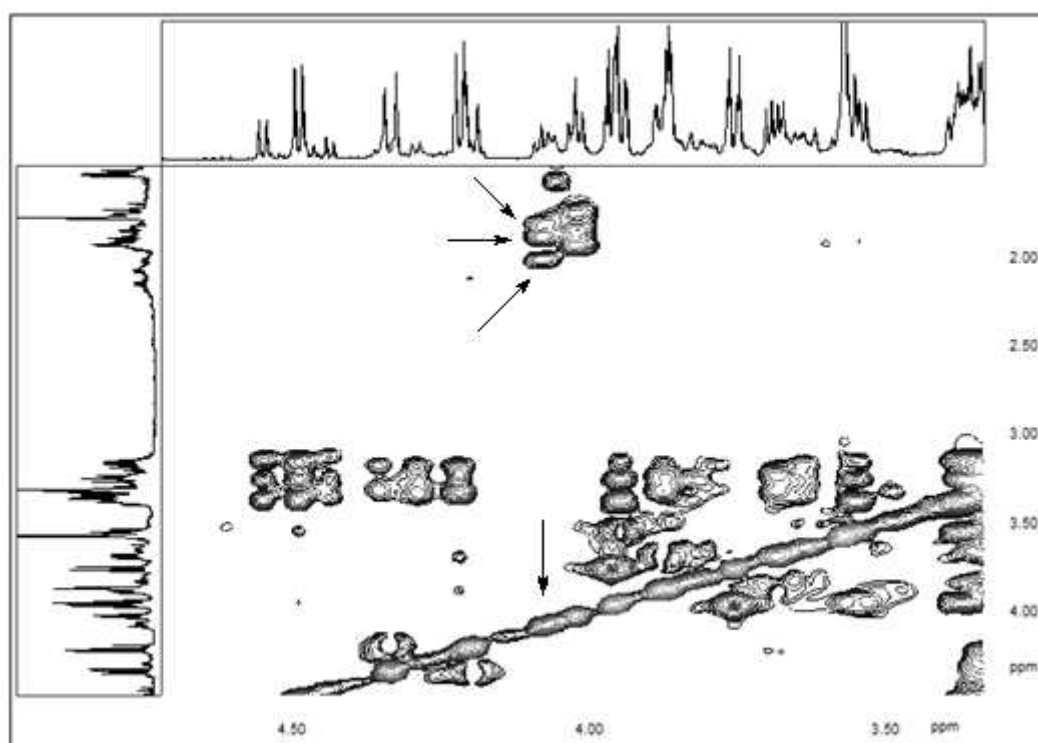


Figura 4.19 – Sistema di spin del protone a 1.86

Spettro ^1H 1D (ppm)	TOCSY (ppm)
1.29	/
1.86	4.07; 1.80; 2.01

Tabella 4.3 – Sistemi di spin dei protoni a 1.29 e 1.86ppm

Il protone a 1.29ppm nello spettro ^1H 1D genera un singoletto di integrale triplo rispetto al segnale a 6.01ppm e pertanto si ipotizza che sia un sostituito metilico, legato ad un carbonio quaternario. I picchi nello spettro ^1H 1D attribuibili ai protoni a 4.07, 2.01, 1.86 e 1.80ppm presentano una molteplicità complessa da interpretare e conseguentemente si presentano come picchi molto allargati, che inevitabilmente si sovrappongono ad altri segnali e quindi non sono integrabili. L'analisi congiunta degli spettri HMQC ed HMQCfold30 rivela che i protoni a 1.86 ppm in realtà sono due idrogeni distinti a 1.86 e 1.87ppm; infatti il protone che cade a 1.86ppm è legato allo stesso carbonio (a 38.82ppm) del protone a 1.80ppm, mentre il protone che cade a 1.87ppm è legato allo stesso carbonio (a 28.16ppm) del protone a 2.01ppm. Si tratta perciò di due coppie di protoni diastereotopici; il fatto che essi accoppino anche tra loro stessi spiega i multipletti complessi ritrovati nello spettro monodimensionale. Il protone a 4.07ppm è legato a un carbonio a 85.37ppm; ne consegue che si ipotizza che anche in questo caso ci sia un gruppo ossidrilico legato. Riassumendo le nozioni apprese finora si può visualizzare questa struttura parziale:

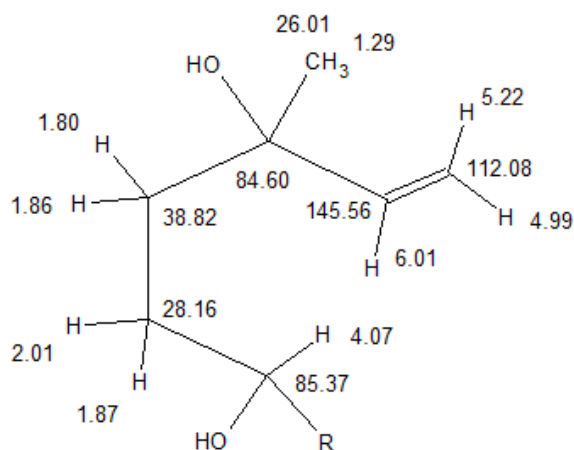


Figura 4.20 – Ipotesi di struttura parziale del terpene

È evidente che deve trovarsi un atomo che blocchi il sistema di spin, quindi un O oppure un altro C tetrasostituito, legato al carbonio che risuona a 85.37ppm. La prima ipotesi è scartabile, in quanto due ossigeni legati allo stesso atomo deschermerebbero C e H direttamente legati rispettivamente a più di 90 e 4.5ppm; inoltre i terpeni sono normalmente costituiti da un altro segmento finale. In analogia a quanto fatto in precedenza, si analizzano i cross-picchi del protone a 4.07ppm:

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)	HMBC (ppm)
4.07	1.23; 1.27; 1.29; 4.55	80.20

Tabella 4.4 – Principali correlazioni in HMBC e NOESY del protone a 4.07ppm

I picchi a 1.27 e a 1.23ppm sono del tutto simili a quello a 1.29ppm nello spettro monodimensionale; osservando le loro correlazioni negli spettri HMQC e TOCSY si può affermare che siano due sostituenti metilici. I due carboni metilici cadono a 23.87 e 22.79ppm; il carbonio a 80.20ppm è quindi quello tetrasostituito, di nuovo con un ossidrilico legato. Il cross-picco nel NOESY tra i protoni a 4.07 e a 1.29ppm indica che essi sono vicini nello spazio; se la molecola fosse costituita solo da legami singoli liberi di ruotare, tale interazione non si dovrebbe vedere. Si ipotizza perciò che la struttura sia chiusa ad anello, in accordo con l'elevato *chemical shift* di due carboni (ben oltre 80ppm), e che i protoni metilici a 1.29ppm e il protone a 4.07 siano dalla stessa parte dello pseudo-piano molecolare. I protoni che generano cross-picchi NOE sono vicini nello spazio e quindi, nel caso di una molecola che presenta restrizioni di configurazione, essi possono fornire informazioni essenziali per determinare la geometria esatta. Grazie ad un'analisi accurata dello spettro NOESY, il ritrovamento di alcuni picchi permette di assegnare un configurazione anche agli altri idrogeni dell'anello:

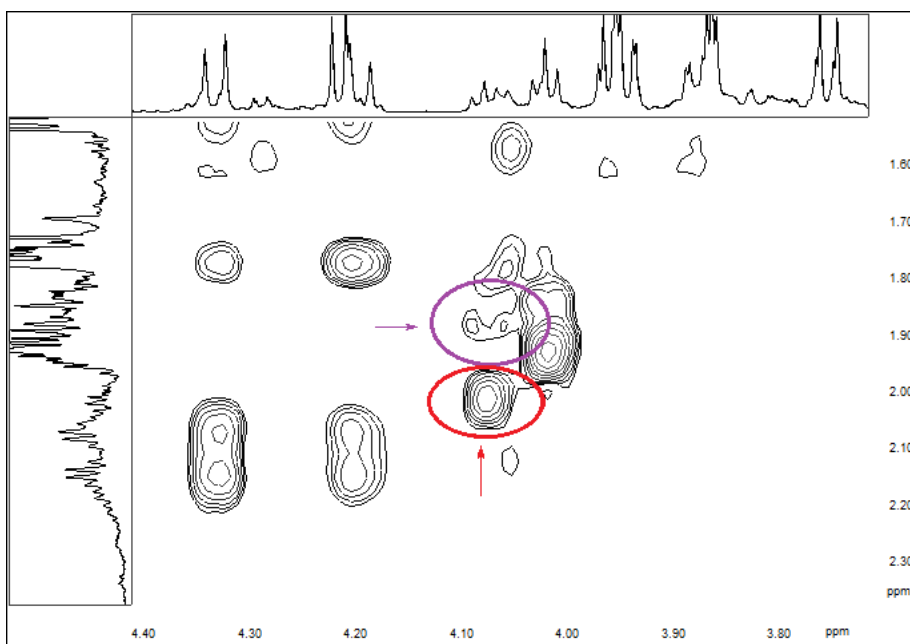


Figura 4.21 – Ingrandimento a circa 4ppm dello spettro NOESY in cui si nota la differenza di intensità tra i due picchi evidenziati

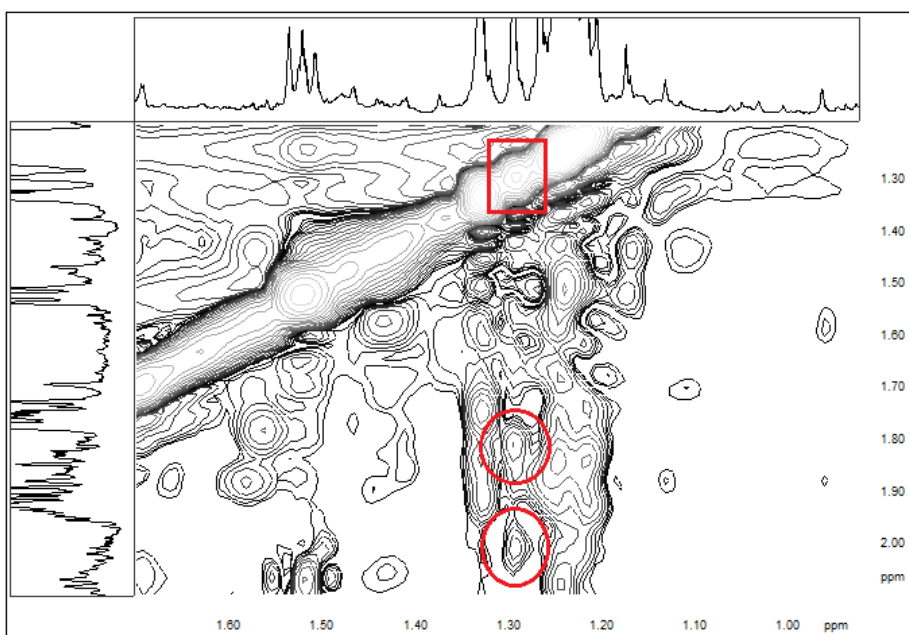


Figura 4.22 – Ingrandimento intorno a 1.30ppm dello spettro NOESY

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)
4.07	2.01 intenso; 1.87 debole
1.29	2.01; 1.80

Tabella 4.5 – Principali correlazioni nel NOESY dei protoni a 1.29 e 4.07ppm

Per la molecola in esame, i vincoli spaziali sono dettati dalla presenza del ciclo a cinque atomi: grazie ai dati in *tabella 4.4* e in *tabella 4.5*, si apprende che i protoni che risuonano a 1.80 e 2.01ppm sono pertanto dalla stessa parte del ciclo rispetto ai protoni a 1.29 e 4.07ppm. La molecola così trovata è l'isomero "Z" del linalolo ossido in forma furanosidica:

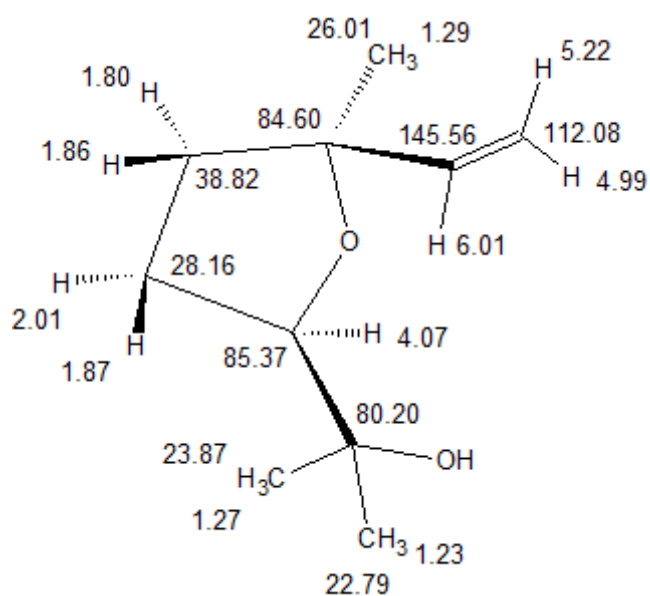


Figura 4.23 – Struttura dello (Z)-linaloloossido

Questa molecola è comune in natura in entrambe le forme enantiomeriche; in seguito sarà sempre rappresentato per comodità secondo la configurazione (S,R) dei carboni rispettivamente a 84.60 e 85.37ppm in *figura 4.23*.

4.1.6 – “Molecola 6.01”, identificazione del saccaride glucosio

In *tabella 4.3* è riportato un cross-picco tra il protone a 4.07ppm e un protone a 4.55ppm; quest'ultimo inoltre correla dipolarmente anche con gli idrogeni a 1.23 e 1.27ppm dando un unico cross-picco allargato. Tali correlazioni costituiscono la prova che la molecola in esame sia proprio un terpene glicosilato; la massa elevata riscontrata nello spettro ESI di *figura 4.12*, permette di ipotizzare che il legante sia un disaccaride. Si ricorda che basandosi sulle condizioni sperimentali, si assume che gli ioni che si formano in prevalenza siano $(M + H)^+$, $(M + Na)^+$ e $(M + NH_4)^+$ e quindi la carica ionica è supposta essere unitaria. La giunzione tra terpene e zucchero si trova grazie allo spettro HMBC, poiché in esso è presente un cross-picco tra il protone a 4.55ppm e il carbonio a 80.20ppm. Il valore elevato di *chemical shift* del primo protone dello zucchero fa supporre che esso sia il protone anomero, in quanto esso è l'unico idrogeno il cui carbonio è legato a due gruppi ossidrilici. Con gli spettri TOCSY e TOCSY selettivo centrato a 4.57ppm si ottiene il sistema di spin, che, in accordo a quanto ci si aspetta per un saccaride, è costituito da una lunga serie di protoni:

Spettro 1H 1D (ppm)	TOCSY selettivo (ppm)
4.55	3.14; 3.26; 3.37; 3.39; 3.55

Tabella 4.6 – Sistema di spin del glucide legato al terpene

La minore quantità di picchi nel TOCSY selettivo permette di evidenziare una correlazione tra i protoni a 3.37 e 3.39ppm, che nel TOCSY non si sono distinti. Per assegnare i carboni dello zucchero, con *chemical shift* molto simili, è indispensabile utilizzare soprattutto l'esperimento HMQCfold80 assieme allo spettro HMQC, ottenendo i seguenti dati:

Spettro 1H 1D (ppm)	HMQC ed HMQCfold80 (ppm)
4.55	98.52
3.14	75.49
3.26	71.95
3.37	78.20
3.39	76.70
3.56	68.95

Tabella 4.7 – Correlazioni dirette tra protoni e carboni del glucide legato al terpene

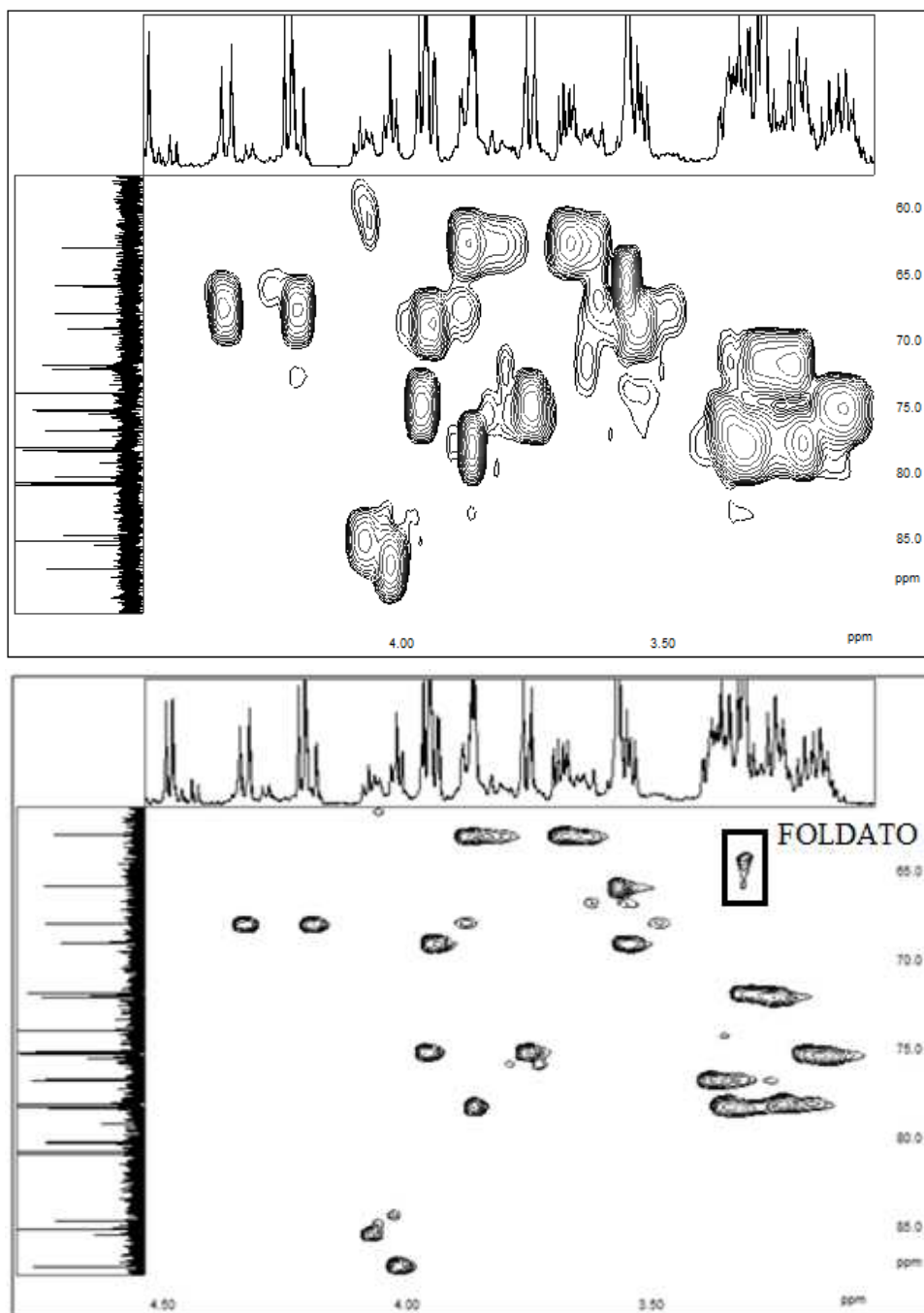


Figura 4.24 – Confronto tra HMQC (sopra) ed HMQC foldato a 80ppm (sotto) nella zona tra 60 e 85ppm e tra 3.0 e 4.5ppm

Proprio dall'analisi dell'esperimento foldato è scoperta un'anomalia rispetto ai dati raccolti negli altri spettri: il protone a 3.56ppm è legato allo stesso carbonio di un altro protone, che cade a 3.95ppm. Il sistema di spin quindi comprende un ulteriore protone non visibile nel TOCSY e nemmeno nel COSY, ma di cui ci si aspetta l'esistenza: il carbonio del protone a 3.56ppm diversamente dagli altri risuona a meno di 70ppm, perciò si può supporre che sia quello di un gruppo $-CH_2OH$ non

facente parte dell'anello. Anche in questo caso quindi sono trovati due protoni diastereotopici, così diversi da presentare *chemical shift* largamente discostato e persino J totalmente differenti. L'analisi degli spettri COSY ed HMBC confermano la struttura finale del primo zucchero, visualizzato nella seguente figura, dove il legame tra i due saccaridi, se presente, è evidenziato in due diverse posizioni possibili (secondo i dati di letteratura):

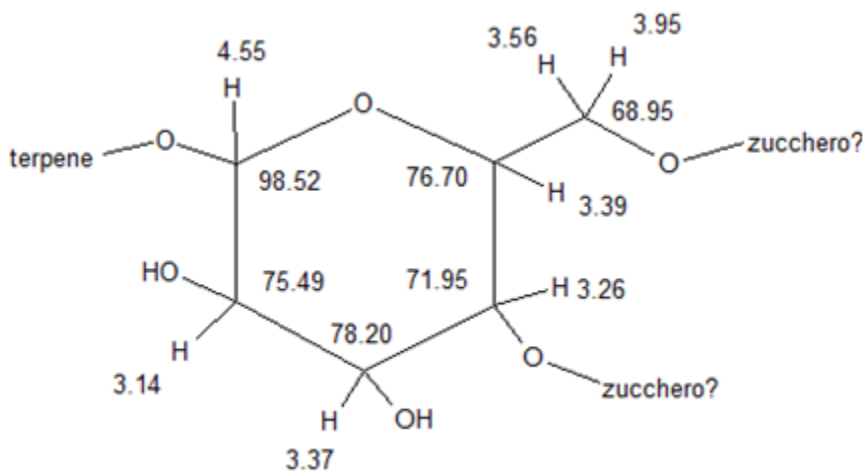


Figura 4.25 – Struttura dell'esoso legato al terpene

Normalmente il legame tra i due zuccheri si forma tra i carboni 1 e 6.

È evidente che lo zucchero in esame è un esoso, presumibilmente un glucopiranosio (vedi *paragrafo 1.1.2*). Per ottenere informazioni a livello di configurazione R o S degli atomi del ciclo si dovrebbero osservare le costanti di accoppiamento scalare e le interazioni dipolari, come riportato in numerosi studi di NMR sugli zuccheri. Purtroppo sia lo spettro NOESY sia lo spettro monodimensionale protonico sono particolarmente affollati e difficilmente interpretabili per quanto riguarda la zona degli accoppiamenti tra i protoni dei saccaridi, quindi circa tra i 3.00 e i 4.50ppm. Sulla base degli studi precedenti, si suppone quindi che lo zucchero sia D-glucosio e che l'anomero in esame sia quello più stabile, cioè il β .

4.1.7 – “Molecola 6.01”, identificazione del saccaride apiosio

I seguenti spettri permettono di identificare la posizione di legame del secondo saccaride:

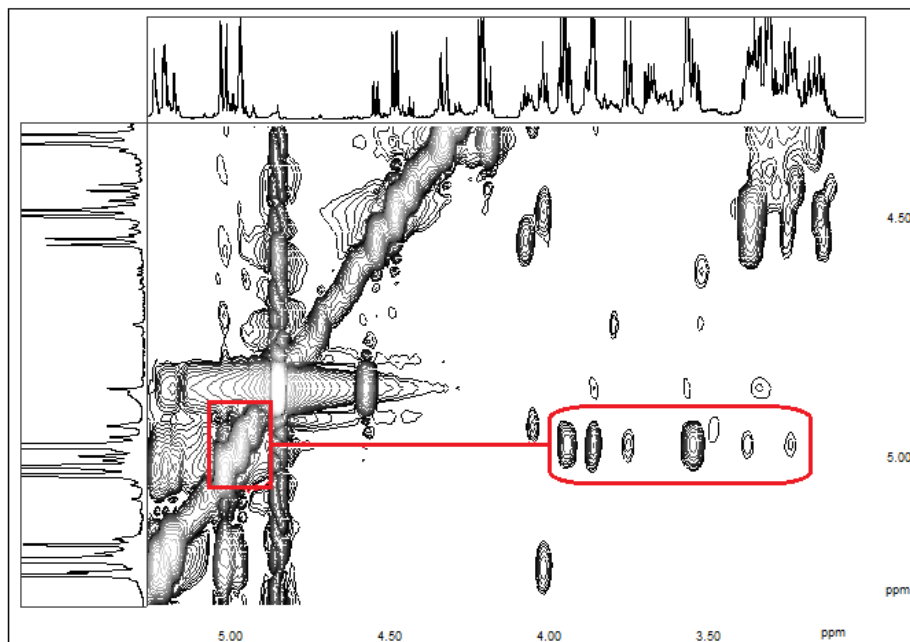


Figura 4.26 – Cross-picchi nel NOESY del protone a 4.97ppm

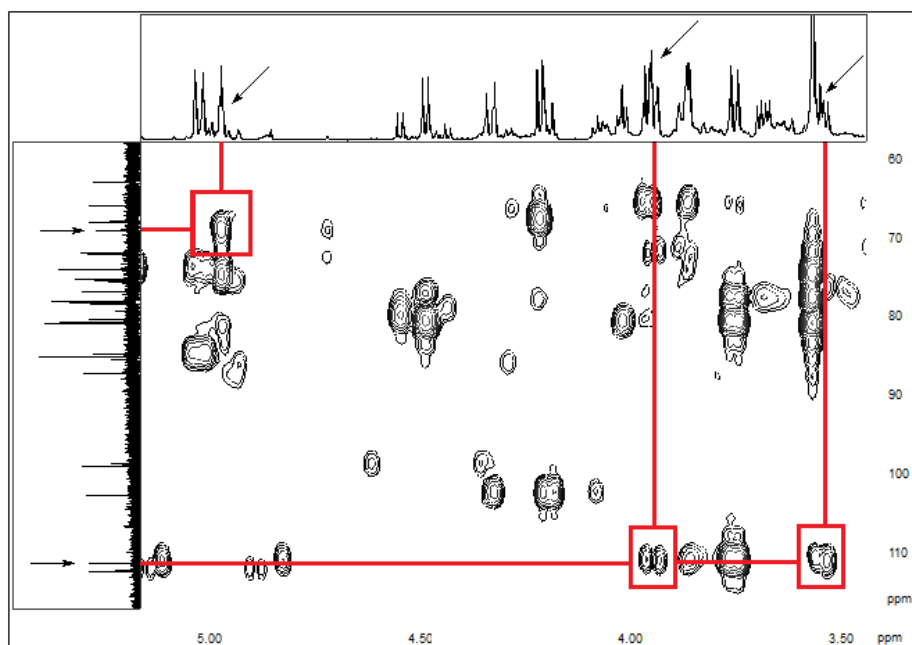


Figura 4.27 – Cross-picchi importanti nello spettro HMBC che permettono di identificare gli elementi di giunzione dei due zuccheri

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)	HMBC (ppm)
3.95; 3.56	4.97	111.16
3.26; 3.39; 3.76	4.97 debole	/

Spettro ^{13}C 1D (ppm)	HMBC (ppm)
68.95	4.97

Tabella 4.8 – Correlazioni evidenziate negli spettri sopra riportati

Si assegna il protone anomero del secondo zucchero al segnale che cade a 4.97ppm. Prendendo ancora una volta in considerazione lo spettro di massa in *figura 4.12*, ci si aspetta che il secondo zucchero sia un pentoso, per arrivare così alla massa di 464m/z; tuttavia le informazioni ricavabili dallo spettro TOCSY non corrispondono a quanto ci si aspetta:

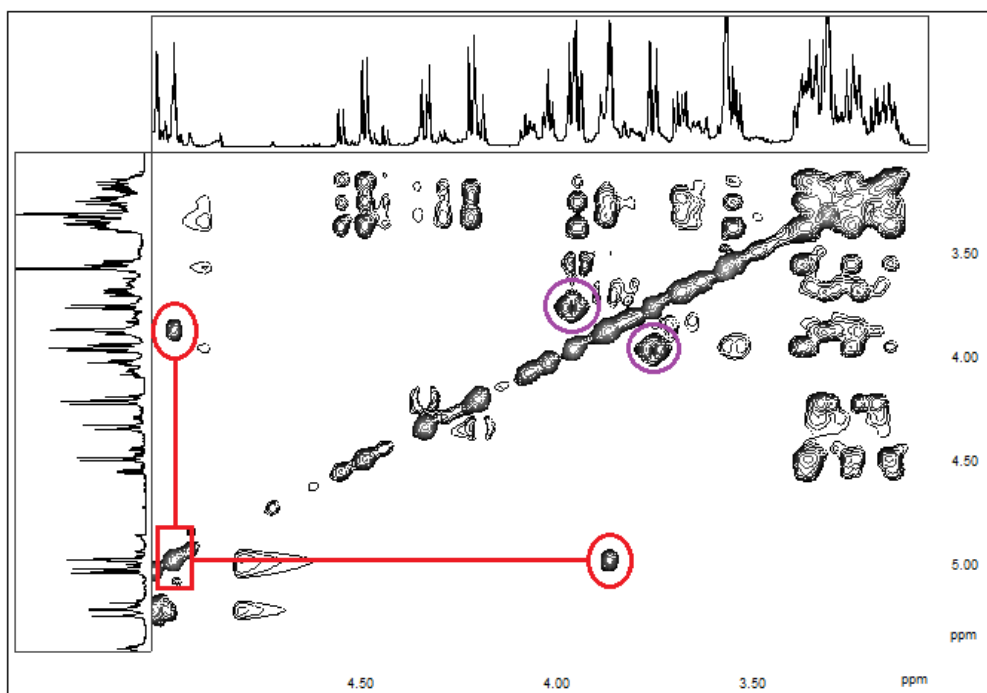


Figura 4.28 – Ingrandimento dello spettro TOCSY tra 3 e 5ppm

In rosso è evidenziato l'unico protone, risonante a 3.87ppm, che costituisce il sistema di spin assieme al protone a 4.97ppm. Tale sistema non può essere quello di uno zucchero classico, in quanto deve essere presente un carbonio quaternario che blocca la catena di accoppiamenti scalari dopo il carbonio del protone a 3.87ppm. Dall'analisi dei vari spettri bidimensionali si evince che nella molecola ci sono altri tre tipi di protoni differenti, suddivisi in due sistemi di spin: il primo è formato dai due protoni diastereotopici a 3.75 e 3.96ppm, mentre il secondo è costituito da altri due protoni diastereotopici non risolti, che cadono entrambi a 3.55ppm. A seguito dell'elaborazione di molte ipotesi di struttura, l'unica formulazione che soddisfa tutti

i requisiti sperimentalmente osservati è quella dell'apiosio: uno zucchero tetrosio ramificato diffuso in natura in configurazione D, anche se solitamente presente in quantità ridotte rispetto ad altri saccaridi più comuni. L'assegnazione è la seguente:

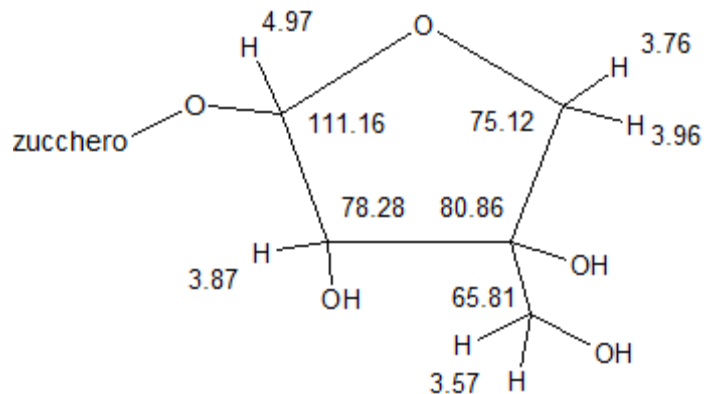
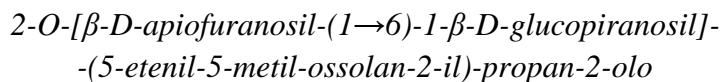


Figura 4.29 – Assegnazione degli atomi dell'apiosio

In accordo a quanto ritrovato in letteratura, si ipotizza che anche questo zucchero sia presente come anomero β , essendo il più abbondante. Lo spettro in *figura 4.26* mostra che i cross-picchi tra il protone a 4.97ppm e i protoni a 3.76 e 3.96ppm hanno intensità differenti; si suppone pertanto che il protone che risuona a 3.96ppm sia dalla stessa parte dell'idrogeno anomero.

4.1.8 – “Molecola 6.01”, assegnazione completa

La molecola è pertanto stata caratterizzata completamente ed è denominata:



Il suo peso molecolare è 464m/z, in accordo con lo spettro di massa; nella figura sottostante è visualizzabile la struttura finale:

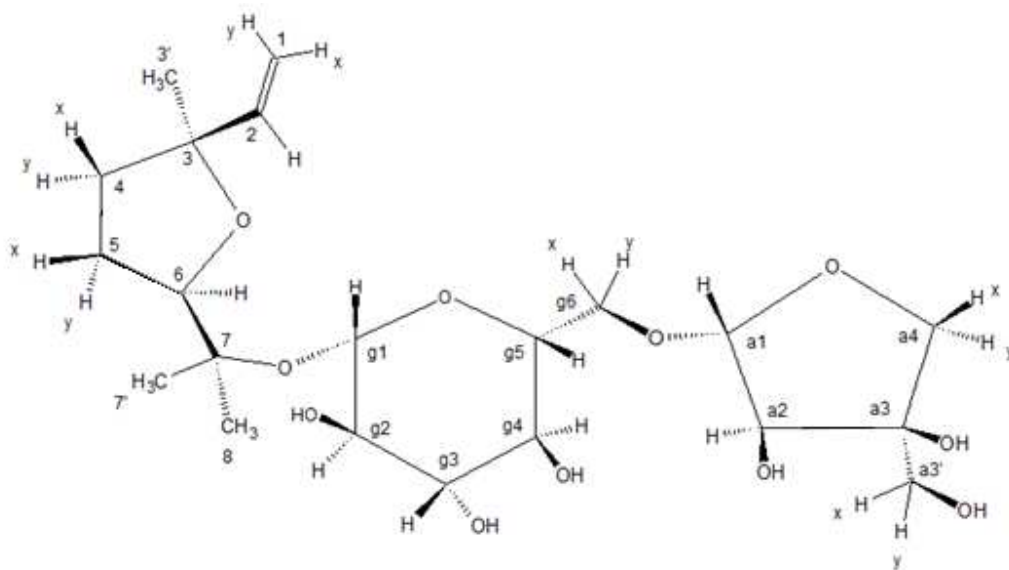
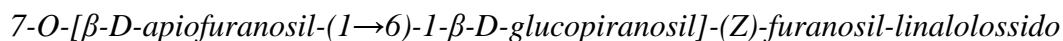


Figura 4.30 – Struttura completa della “molecola 6.01”

Si noti che in questa e nelle prossime figure rappresentanti strutture finite la numerazione non rispecchia la nomenclatura IUPAC, bensì è redatta al fine di rendere più chiara possibile l’assegnazione.

Secondo tale numerazione, la molecola può essere più comunemente denominata:



Nella tabelle riassuntive le sigle rappresentano: s = singoletto, d = doppietto, dd = doppietto di doppietti (ecc...), t = tripletto, m = multipletto complesso; nel caso di molteplicità ritrovate diverse da quelle previste, considerando sempre regimi di accoppiamento debole, queste ultime sono indicate tra parentesi. I valori delle J sono riportati laddove sono evincibili dallo spettro monodimensionale protonico o da un esperimento TOCSY selettivo.

Per la molecola descritta l’assegnazione è la seguente:

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	molteplicità	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	x: 4.99	d (dd)	1.54; ?	112.08
	y: 5.22	dd	17.41; 1.54	
2	6.01	dd	17.41; 10.75	145.56
3	/	/	/	84.60
3'	1.29	s	/	26.01
4	x: 1.86	m (ddd)	?	38.82
	y: 1.80	m (ddd)	?	
5	x: 1.87	m (dddd)	?	28.16
	y: 2.01	m (dddd)	?	
6	4.07	dd	7.17; 6.91	85.37
7	/	/	/	80.20
7'	1.27	s	/	23.87
8	1.23	s	/	22.79
g1	4.55	d	7.68	98.52
g2	3.14	m (dd)	?	75.49
g3	3.37	m (dd)	?	78.20
g4	3.26	m (dd)	?	71.95
g5	3.39	m (ddd)	?	76.70
g6	x: 3.56	dd	11.62; 5.04	68.95
	y: 3.95	dd	8.96; 1.79	
a1	4.97	d	2.30	111.16
a2	3.87	d	2.30	78.28
a3	/	/	/	80.86
a3'	x: 3.96	d	9.73	65.81
	y: 3.76	d	9.73	
a4	x,y: 3.57	s (d)	?	75.12

Tabella 4.9 – Assegnazione completa della “molecola 6.01”

4.1.9 – “Molecola 5.92”, identificazione della struttura

Partendo dal picco a 5.92ppm evidenziato in *figura 4.2* si svolge un procedimento di identificazione analogo a quello svolto in precedenza per la molecola già trovata. Il primo passo quindi è la ricerca del sistema di spin con il TOCSY, in quanto essendoci un picco a 5.92ppm e un picco a 5.91ppm i TOCSY selettivi di *figura 4.17* non permettono un’assegnazione univoca. Si ricava che il sistema di spin cercato è formato dai protoni che risuonano a 5.92, 5.23 e 5.03ppm, ricalcando il caso precedente. Le differenze salienti sono poche e denotano solamente una differente configurazione dei carboni con quattro sostituenti diversi:

Spettro ¹ H 1D (ppm)	NOESY (ppm)
4.02	5.92; 5.23; 1.93 intenso; 1.85 debole
1.92	5.92
1.75	1.33

Tabella 4.10 – Cross-picchi NOE che rivelano le differenze di conformazione rispetto alla molecola analizzata in precedenza

Siccome il protone a 4.02ppm è dalla stessa parte del doppio legame terminale rispetto al piano creato dall’anello furanosidico, l’ossido in esame è in questo caso l’isomero “E”. In letteratura si trova che anche questo isomero è diffuso in natura in entrambe le forme enantiomeriche (3R,6R) e (3S,6S), ma per comodità di rappresentazione verrà raffigurato solamente uno dei due stereoisomeri. La formazione dei due ossidi trovati avviene in natura mediante epossidazione del linalolo nelle posizioni 6 e 7, con successiva apertura che conduce a una coppia di ossidrili; la differenza tra isomero “furanosidico” e “piranosidico” deriva proprio dalla protonazione dei due diversi ossidrili, mentre ciò che determina la geometria “Z” e “E” è la direzione dell’attacco dell’ossidrile in posizione 3.

Col procedere dell’analisi si scopre che anche in questo caso il terpene è legato a un disaccaride e per di più gli zuccheri sono i medesimi trovati in precedenza; in maniera particolare per questa molecola, l’uso dei TOCSY selettivi è stato di fondamentale importanza nell’assegnazione dei protoni degli zuccheri, poiché i *chemical shift* sono molto simili a quelli già trovati nell’altro composto.

4.1.10 – “Molecola 5.92”, assegnazione completa

La struttura finale è la seguente:

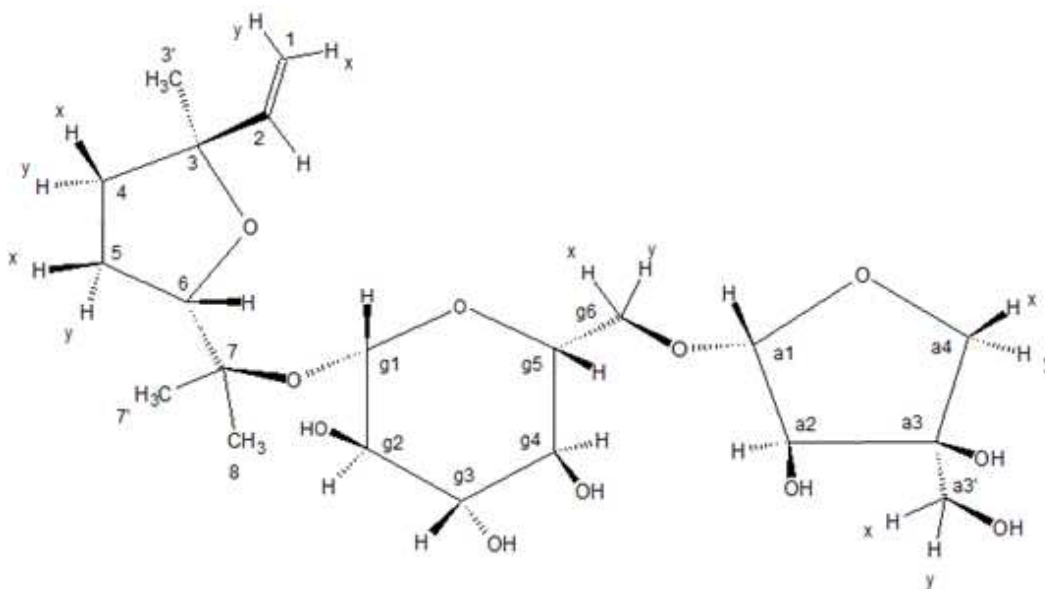


Figura 4.31 – Struttura completa della “molecola 5.92”

Il nome IUPAC è il medesimo della molecola precedente, salvo che per la configurazione dei carboni, che determina la geometria “E”. La molecola può essere denominata altresì:

7-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-1-β-D-glucopiranosil]-(E)-furanosil-linalolossido

L’assegnazione è riassunta nella seguente tabella:

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	molteplicità	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	x: 5.03	d (dd)	10.75; ?	112.25
	y: 5.23	dd	17.15; 1.28	
2	5.92	dd	17.15; 10.75	144.96
3	/	/	/	85.06
3'	1.33	s	/	26.94
4	x: 1.92	m (ddd)	?	38.21
	y: 1.75	m (ddd)	?	
5	x: 1.93	m (dddd)	?	28.25
	y: 1.85	m (dddd)	?	
6	4.02	dd	7.17; 6.91	87.17
7	/	/	/	80.69
7'	1.25	s	/	20.92
8	1.21	s	/	23.92

g1	4.49	d	7.68	98.92
g2	3.15	m (dd)	?	75.27
g3	3.35	m (dd)	?	78.20
g4	3.25	m (dd)	?	72.06
g5	3.38	m (ddd)	?	76.69
g6	x: 3.55	dd	11.62; 5.04	69.01
	y: 3.94	dd	8.96; 1.79	
a1	4.97	d	2.30	111.11
a2	3.86	d	2.30	78.28
a3	/	/	/	80.86
a3'	x: 3.96	d	9.73	65.81
	y: 3.75	d	9.73	
a4	x,y: 3.57	s (d)	?	75.11

Tabella 4.11 – Assegnazione completa della “molecola 5.92”

In analogia a quanto spiegato per l'altro isomero del linalolossido, non è ricavata la configurazione assoluta (3R,6R) o (3S,6S). Si nota che l'intensità relativa dei picchi riconducibili all'isomero “E” è maggiore rispetto all'intensità di quelli riconducibili all'isomero “Z” negli spettri monodimensionali al ^1H e al ^{13}C ; ciò rispecchia le abbondanze naturali relative dei terpeni liberi, imputabili al fatto che il primo è stericamente meno ingombrato del secondo.

La massa della molecola è 464m/z, come la precedente, e rispetta pertanto l'ipotesi della presenza di isomeri strutturali nella Frazione 2.

L'assegnazione dei picchi nello spettro MS-MS di *figura 4.13* è:

- 295: (disaccaride + H – H₂O)⁺
- 171: (terpene + H)⁺
- 153: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 133: (apiosio + H – H₂O)⁺
- 115: perdita di una molecola d'acqua dal precedente

4.1.11 – “Molecola 5.91”, identificazione del terpene 8-idrossilinalolo

L'ultima molecola presente in grande quantità nella Frazione 2 è analizzata a partire dal picco caratteristico a 5.91ppm. Procedendo con le analisi come per le molecole precedenti si trova subito una differenza a livello di *chemical shift* del carbonio quaternario adiacente al doppio legame: esso infatti risuona a 73.92ppm, cioè nell'intervallo di frequenze attribuibili a un carbonio legato ad un gruppo -OH, non facente però parte di un anello. A confermare tale ipotesi, è visibile poi che le due coppie di protoni diastereotopici risuonano a *chemical shift* abbastanza differenti una dall'altra (circa 1.5ppm contro circa 2.1ppm), diversamente dall'evidenza sperimentale nei terpeni già trovati. Il sistema di spin si trova facilmente nel TOCSY ed è visualizzabile con precisione nel TOCSY selettivo centrato a 5.40ppm:

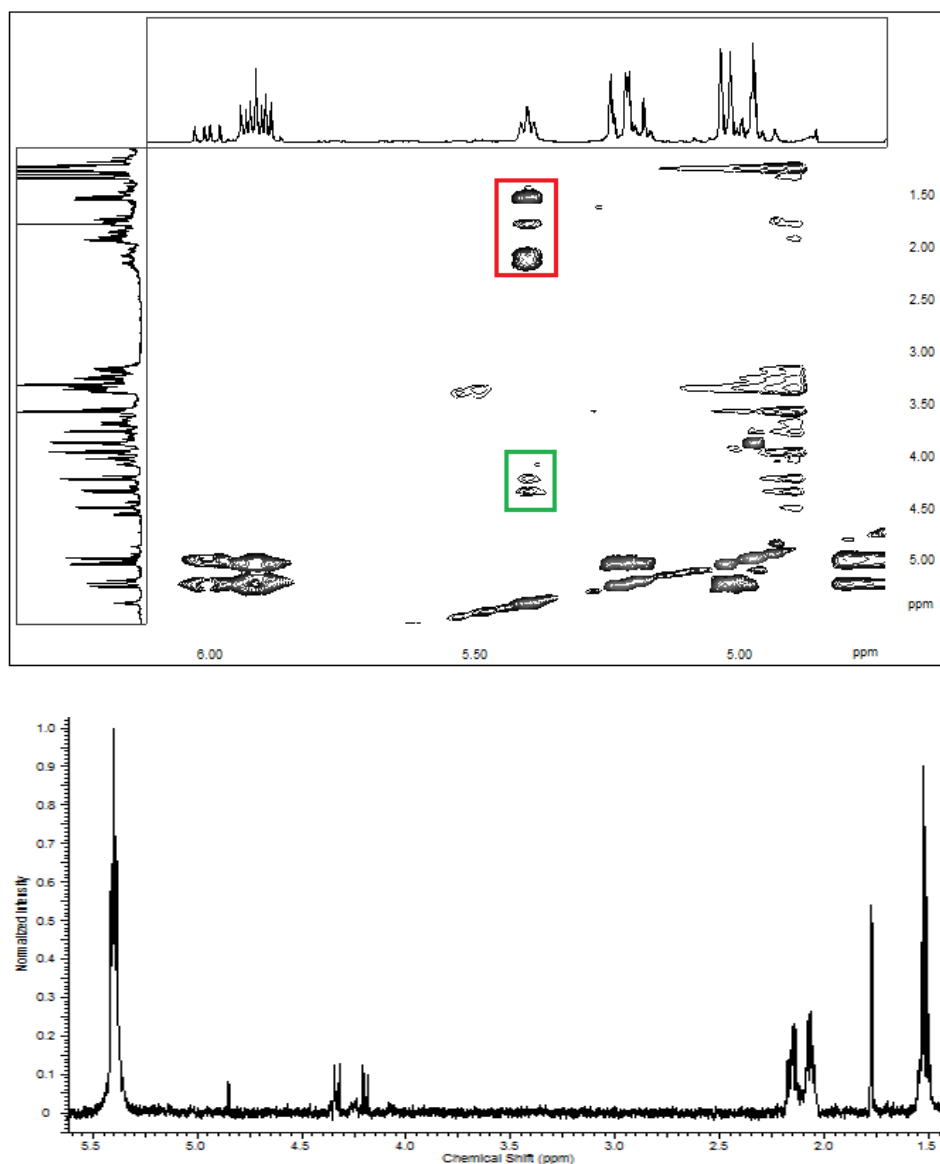


Figura 4.32 – Sistema di spin del protone a 5.40, contenente le coppie di protoni diastereotopici, nel TOCSY (sopra) e nel TOCSY selettivo a 5.40ppm (sotto)

Con lo spettro HMQC si conferma che questa molecola non è in forma ciclica:

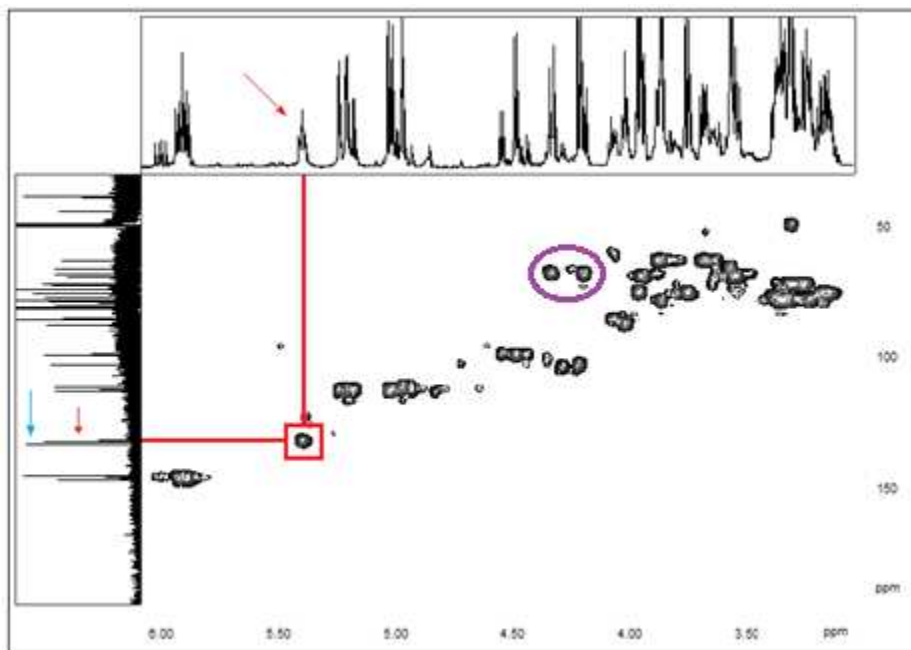


Figura 4.33 – Ingrandimento dello spettro HMQC

Il protone a 5.40ppm è legato ad un carbonio olefinico che risuona a 131.56ppm (evidenziati con una freccia rossa); l'altro carbonio di questo doppio legame risuona a 132.78ppm (marcato con una freccia blu) ed è ritrovabile solo grazie allo spettro monodimensionale al ^{13}C . Tale carbonio infatti è l'unico che non presenta correlazioni né all'HMQC, pertanto è tetrasostituito, né all'HMBC; deve quindi essere assegnato per esclusione e affinità. In entrambi gli spettri di *figura 4.32* si può osservare che alcuni segnali sono intensi (riquadri in rosso nel TOCSY) mentre altri sono meno evidenti (riquadri in verde nel TOCSY); questi ultimi sono attribuibili ai due protoni diastereotopici a 4.20 e a 4.33ppm legati allo stesso carbonio (67.89ppm), come mostrato nell'HMQC di *figura 4.33* (cross-picchi cerchiati in viola), il cui *chemical shift* suggerisce che esso è legato ad un ossidrilico. È interessante osservare che nello spettro TOCSY, esperimento molto sensibile, si riescono a osservare (anche se deboli) tutte le ^4J diverse da zero dovute alla presenza del doppio legame. Completando le ultime assegnazioni, la struttura ipotizzata è la seguente:

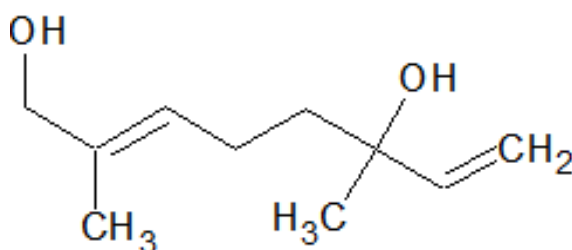


Figura 4.34 – Struttura ipotizzata per il terpene in esame

Grazie allo spettro HMBC si osserva subito che anche in questo caso il terpene è legato a uno zucchero, ma prima di passare all'assegnazione del glucide si analizza con attenzione lo spettro NOESY, perché esso fornisce molte informazioni utili per delineare la corretta geometria molecolare:

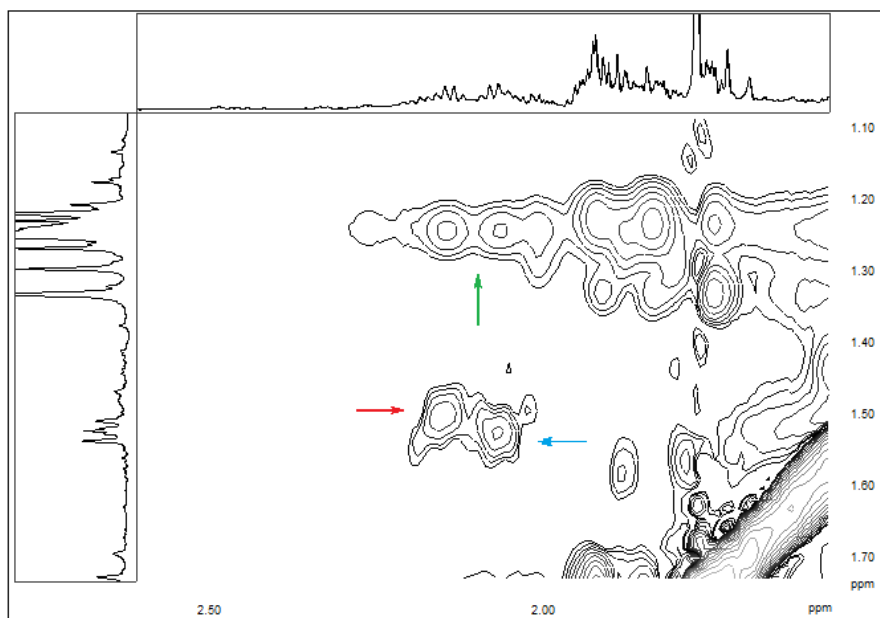


Figura 4.35 – Ingrandimento dello spettro NOESY tra circa 1 e 2ppm

In primis grazie a NOESY, HMQC ed HMBC si assegna il metile vicino al primo doppio legame analizzato, mediante il cross-picco segnalato con una freccia verde in figura 4.35. Solo in questo spettro è possibile poi osservare una differenza tra i *chemical shifts* dei due protoni diastereotopici a circa 1.5ppm. Infatti, sebbene in teoria ci sia libera rotazione tra i carboni delle due coppie di protoni diastereotopici, in figura 4.35 è visibile come essi accoppino dipolarmente solo a due a due: 1.50ppm con 2.15ppm e 1.53ppm con 2.07ppm, rispettivamente evidenziati con una freccia rossa e una freccia blu. Probabilmente la molecola, essendo di grandi dimensioni, presenta qualche ingombro sterico e tale cross-picco evidenzia una conformazione preferenziale. Sono riportati di seguito altri due ingrandimenti dello spettro NOESY molto informativi:

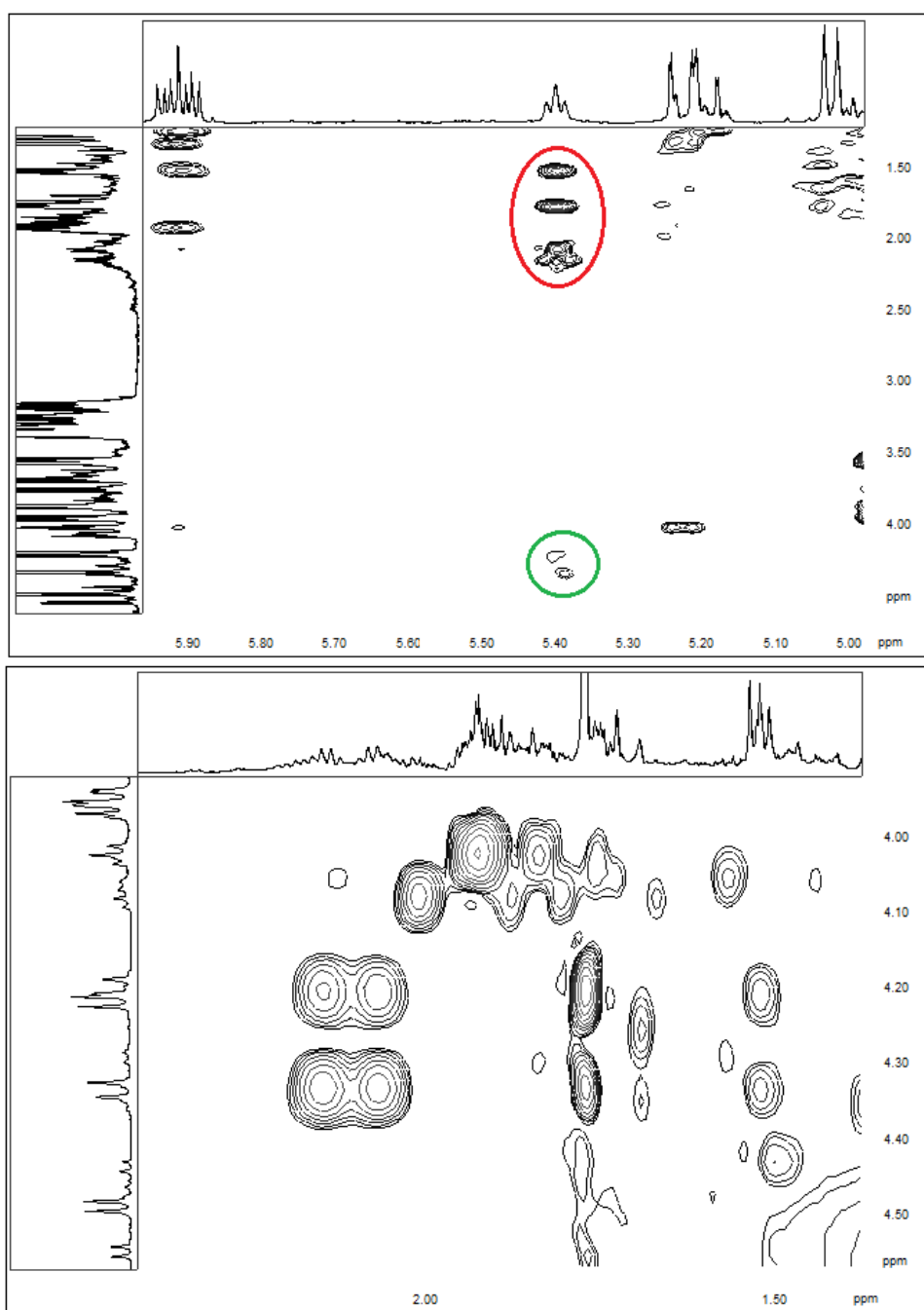


Figura 4.36 – Ingrandimenti del NOESY a circa 5.5ppm(sopra) e 1.8ppm (sotto)

Le due coppie di protoni a circa 2.1 e 1.5ppm correlano dipolarmente coi protoni a circa 4.3ppm e non coi protoni metilici a 1.77ppm; ci sono inoltre cross-picchi NOE molto intensi tra il protone a 5.40ppm e i protoni a circa 2.1, 1.5 e a 1.77ppm, cerchiati in rosso in *figura 4.36*, mentre i cross-picchi tra il protone a 5.40ppm e i protoni diastereotopici a circa 4.3ppm, cerchiati in verde sempre in *figura 4.36*, sono così poco intensi da essere quasi scambiati per rumore di fondo. Gli ingrandimenti soprastanti provano che il terpene in esame non è l'isomero "E", bensì l'isomero "Z",

sebbene secondo dati di letteratura l'8-idrossilinalolo sia stato più comunemente ritrovato come isomero "E". La struttura ipotizzata è riportata nella seguente figura:

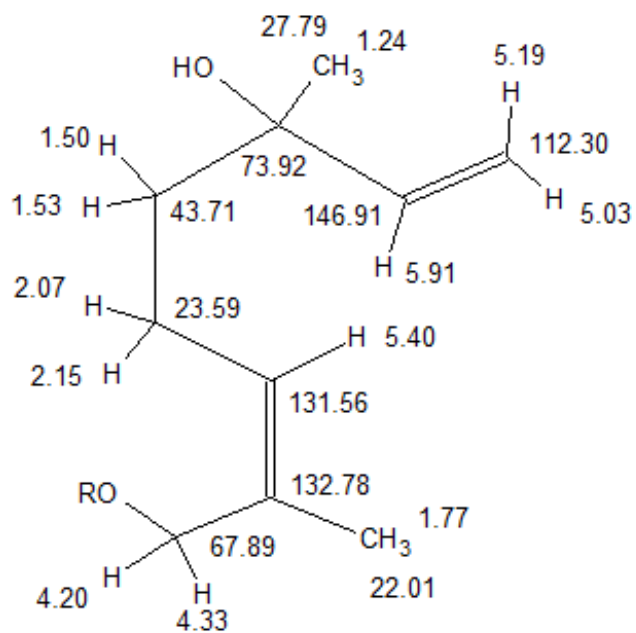


Figura 4.37 – Struttura ipotizzata per il terpene (Z)-8-idrossilinalolo

4.1.12 – “Molecola 5.91”, identificazione del glucosio

I cross-picchi nello spettro HMBC della seguente figura dimostrano che anche in questa molecola lo zucchero, simboleggiato dal sostituito “R” in figura 4.37, è legato in posizione terminale al terpene:

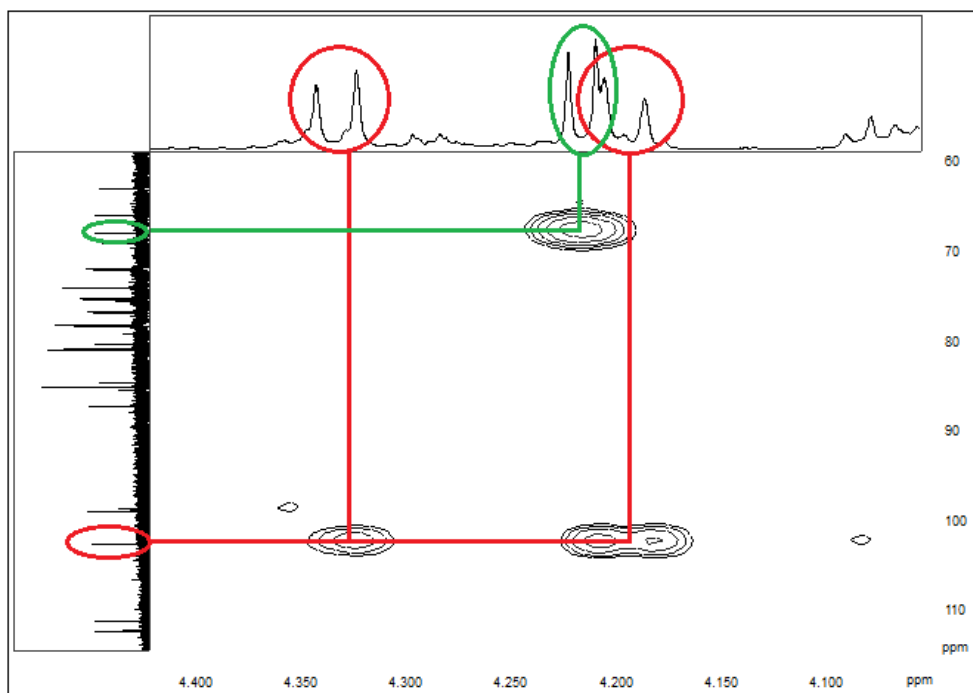


Figura 4.38 – Correlazioni che permettono di legare lo zucchero al terpene

Spettro ^1H 1D (ppm)	HMBC (ppm)	Rif. in figura 4.38
4.20; 4.33	102.55	rosso

Spettro ^{13}C 1D (ppm)	HMBC (ppm)	Rif. in figura 4.38
67.89	4.22	verde

Tabella 4.12 – Assegnazione degli atomi che generano i cross-picchi di giunzione

Il glucide in esame è un esoso e si suppone che sia glucosio in analogia alle altre molecole; le evidenze sperimentali dimostrano che tale zucchero è in questo caso un monosaccaride.

4.1.13 – “Molecola 5.91”, assegnazione completa

La struttura ipotizzata è la seguente:

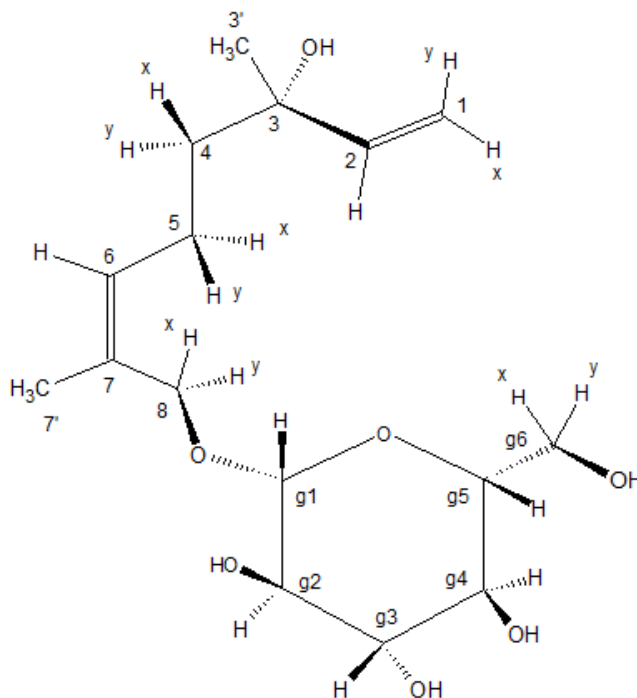


Figura 4.39 – Struttura completa della “molecola 5.91”

ed è denominata:

(Z)-8-O-[1-β-D-glucopiranosil]-3,7-dimetilotta-1,6-dien-3-olo

o più semplicemente:

(Z)-8-O-[1-β-D-glucopiranosil]-idrossilinalolo

La seguente tabella riassume le assegnazioni:

	δ ^1H (ppm)	molteplicità	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	x: 5.03	d (dd)	10.75; ?	112.30
	y: 5.19	dd	17.41; 1.28	
2	5.91	dd	17.15; 11.01*	146.91
3	/	/	/	73.92
3'	1.24	s	/	27.79
4	x: 1.53	m (ddd)	?	43.71
	y: 1.50	m (ddd)	?	
5	x: 2.15	m (dddd)	?	23.59
	y: 2.07	m (dddd)	?	

6	5.40	t	7.42	131.56
7	/	/	/	132.78
7'	1.77	s	/	22.01
8	x: 4.33	d	11.26	67.89
	y: 4.20	d	11.52	
g1	4.22	d	7.68	102.55
g2	3.19	m (dd)	?	75.17
g3	3.34	m (dd)	?	78.20
g4	3.23	m (dd)	?	71.81
g5	3.31	m (ddd)	?	78.04
g6	x: 3.88	dd	11.78; 2.05	62.88
	y: 3.69	dd	11.78; 5.38	

Tabella 4.13 – Assegnazione completa della “molecola 5.91”

Il peso molecolare del composto è 332g/mol. Il motivo per cui non è ritrovato tale picco nello spettro di *figura 4.13* è probabilmente dovuto alla sovrapposizione nel cromatogramma dei segnali corrispondenti agli ioni ammoniato delle tre molecole. Grazie all'analisi NMR si è scoperta la presenza di una molecola di peso molecolare inferiore, che ha portato ad ulteriori accertamenti nelle analisi di LC-MS; è risultato che, se cercati ad hoc, sono facilmente ritrovati addotti con il sodio e il potassio di m/z pari a 355.17 e 371.15, confermando pertanto le ipotesi formulate.

4.1.14 – “Molecola 5.91”, studi di dinamica

A differenza delle altre due molecole presenti nella Frazione 2, per questo composto lo spettro NOESY mostra correlazioni anche tra i protoni non terminali del terpene e i protoni del glucosio:

Spettro ¹ H 1D (ppm)	NOESY (ppm)
2.07; 2.15	3.23 (debole); 3.88 (debolissimo)
1.50; 1.53	3.23 (media intensità)

Tabella 4.14 – Alcune correlazioni dipolari tra protoni terpenici e glucidici

È evidente che la rappresentazione bidimensionale di *figura 4.39* non rende conto di tali cross-picchi, che avrebbero senso solamente se il terpene fosse ripiegato sul saccaride. Si decide quindi di formulare un'ipotesi di struttura tridimensionale, ricorrendo al programma di calcolo MOE che si basa sulla dinamica molecolare. Sapendo infatti che il volume dei cross-picchi del NOESY dipende dalla distanza tra gli atomi che lo generano secondo la funzione:

$$V_1/V_2 = (d_2/d_1)^6$$

è possibile utilizzare gli integrali nello spettro NOESY per determinare le distanze interatomiche. A tale scopo si sono innanzitutto integrati alcuni dei cross-picchi notevoli di questa molecola. Per correlare i valori numerici a un valore sensato di distanza interatomica, si decide innanzitutto di fissare un riferimento; a tale scopo si scelgono i segnali generati da due protoni diastereotopici, poiché in tale geometria la distanza tra gli atomi generatori è nota ($1.78 \text{ \AA} \pm 10\%$). Grazie a questo, si convertono quindi i valori degli integrali in distanze interatomiche.

F1 (ppm)	F2 (ppm)	Integrale normalizzato	Distanza interatomica (Å)
1,24	5,91	1,50	3,06
1,50	2,15	2,71	2,77
1,51	3,23	0,36	3,88
1,52	4,21	0,65	3,52
1,52	4,33	0,50	3,68
1,52	5,40	3,37	2,68
1,52	5,91	1,48	3,07
1,52	2,07	3,27	2,69
2,06	3,22	0,18	4,36
2,06	3,88	0,05	5,40
2,06	4,33	3,56	2,65
2,07	4,21	1,71	3,00

2,14	4,21	2,04	2,91
2,14	3,22	0,12	4,66
2,15	4,33	4,48	2,55
2,15	3,88	0,07	5,10
3,67	3,87	46,32	1,73
4,19	4,33	38,75	1,78
4,21	5,39	0,49	3,69
4,21	3,21	12,22	2,16
4,21	3,33	7,85	2,32
4,33	4,20	39,66	1,77
4,34	5,39	0,40	3,82

Tabella 4.15 – Integrali dei cross-picchi NOE e valori calcolati di distanza interatomica sulla base del riferimento (evidenziato in grassetto)

Grazie ai calcoli con il programma MOE condotti dal dottor Mattia Sturlese sui dati raccolti, si ottiene infine questa struttura:

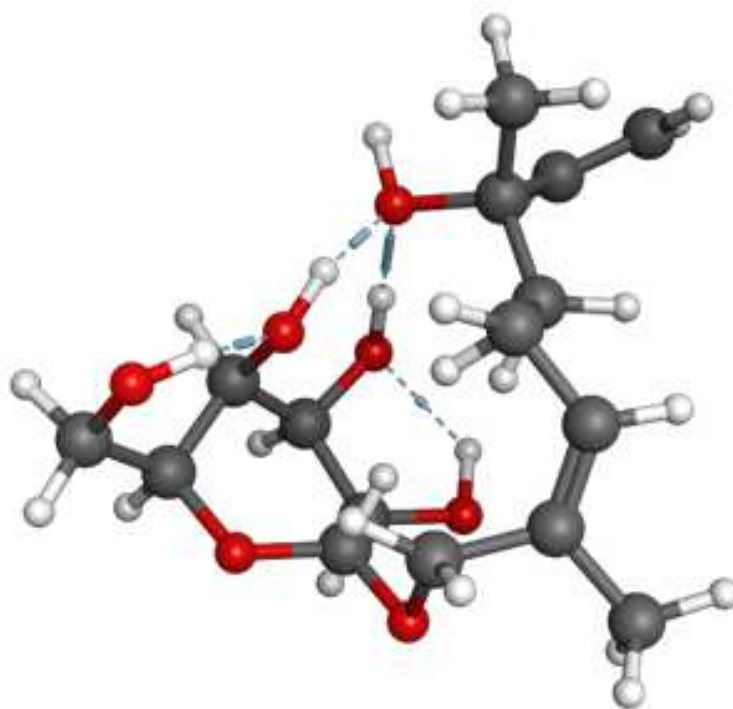


Figura 4.40 – Struttura tridimensionale calcolata; gli H sono visualizzati in bianco, i C in grigio e gli O in rosso, mentre i legami a idrogeno sono rappresentati come segmenti azzurri tratteggiati

La figura mostra che l'8-idrossilinalolo (a destra) è ripiegato sul glucosio (a sinistra), grazie alla formazione di legami a idrogeno tra l'ossidrilico libero del terpene e alcuni ossidrili dello zucchero.

4.1.15 – Sequenza “Pure Shift”

Sono stati registrati alcuni spettri ^1H monodimensionali con una sequenza ottimizzata denominata “Pure Shift” messa a punto dal professor Marco Tessari dell’Università di Nijmegen (Olanda), nei quali i picchi appaiono disaccoppiati e quindi senza struttura fine. In uno spettro di questo tipo si perde l’informazione delle costanti di accoppiamento; infatti i segnali appaiono come singoletti e ne risulta uno spettro più semplice e meno sovrapposto rispetto al monodimensionale convenzionale. Sono stati analizzati questi spettri al fine di capire se questa metodologia NMR apporta qualche vantaggio sostanziale nell’indagine in corso.

Nelle figure seguenti sono selezionati alcuni ingrandimenti che mettono a confronto gli spettri Pure Shift (PS in seguito) e lo spettro monodimensionale:

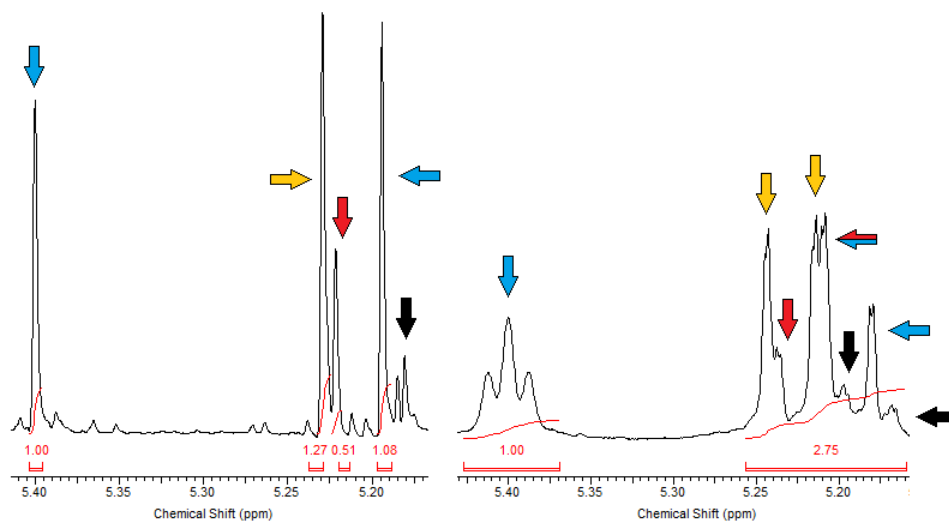


Figura 4.41 – Confronto “PS - ^1H 1D” tra 6.05 e 5.95ppm

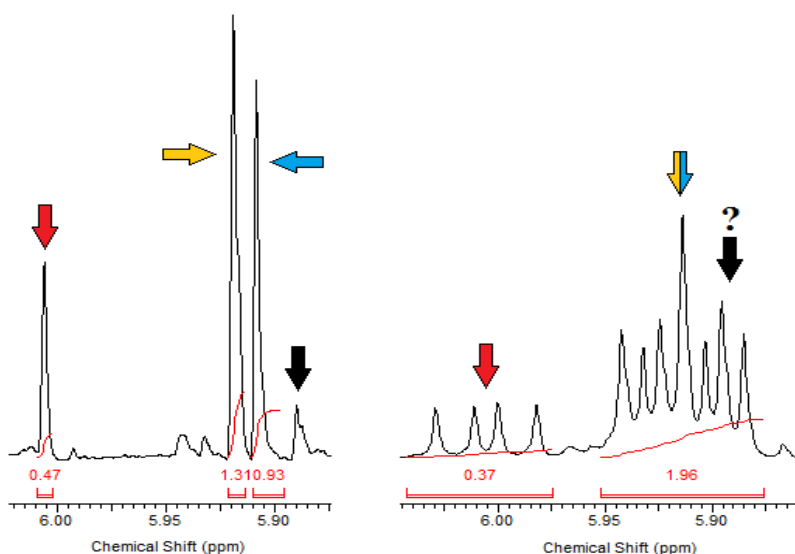


Figura 4.42 – Confronto “PS - ^1H 1D” tra 5.45 e 5.15ppm

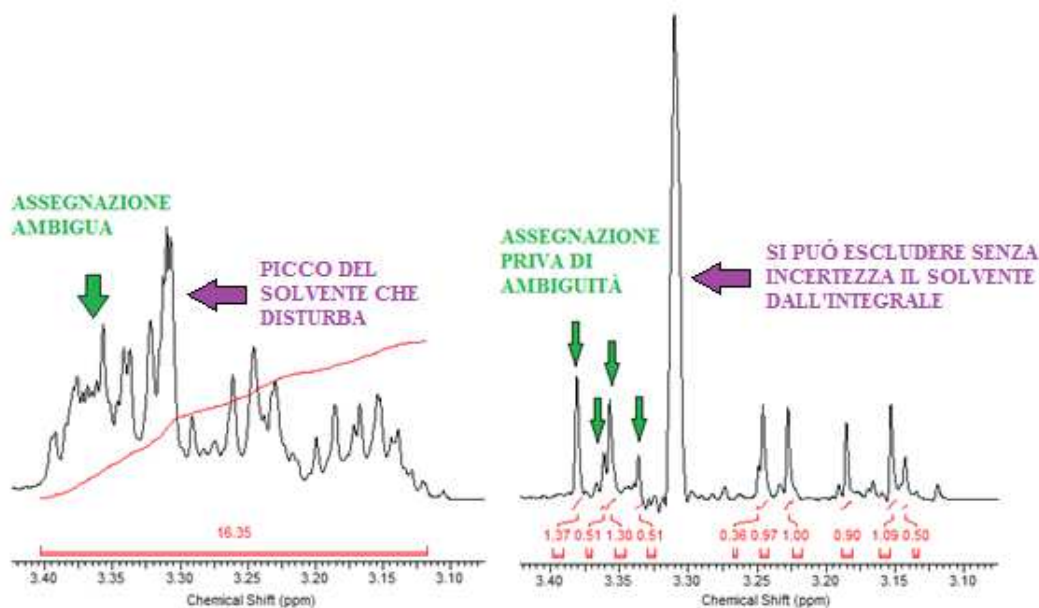


Figura 4.43 – Confronto “PS-¹H 1D” tra 3.40 e 3.10ppm

Le frecce di ugual colore indicano i picchi appartenenti alla stessa molecola: frecce rosse, composto dello (Z)-linalolossido; frecce gialle, composto dell’ (E)-linalolossido; frecce azzurre, composto dell’idrossilinalolo. I picchi indicati con una freccia nera appartengono a una quarta molecola non identificata, poiché notevolmente meno concentrata.

In figura 4.41 si può osservare come i due doppietti di doppietti a 5.91 e 5.92ppm siano risolti perfettamente, consentendo quindi un’integrazione più accurata; analoga considerazione si può fare per i picchi a circa 5.20ppm in figura 4.42. Ponendo che la concentrazione di riferimento, indicata come 100%, sia quella della molecola più abbondante (indicata da frecce gialle nelle figure soprastanti), le concentrazioni relative delle altre due molecole risultano essere il 38% e il 78%.

Un’enorme semplificazione si nota nella regione degli zuccheri, in figura 4.43, dove le molteplicità complesse dei multipletti rendono molto difficili sia l’assegnazione che l’integrazione nel canonico spettro protonico monodimensionale.

Si può quindi trarre la conclusione che gli spettri PS offrano un valido aiuto sia per l’identificazione di molecole in miscele ricche di componenti, grazie alla maggiore precisione nell’integrazione, sia per l’assegnazione delle molecole, in termini di accuratezza di *chemical shift*.

Gli spettri PS completi sono riportati in Appendice.

4.2 – Frazione 3

4.2.1 – Separazione in colonna ed esperimenti NMR

Prima di registrare gli esperimenti bidimensionali, si tenta di purificare la miscela di analiti mediante un'estrazione acqua-cloroformio: gli estratti in acqua sono ridisciolti in CD_3OD , mentre gli estratti in cloroformio sono ridisciolti in $CDCl_3$. Sono quindi acquisiti gli spettri monodimensionali protonici utilizzando parametri identici a quelli impostati per l'analogo spettro nella Frazione 2 (vedi *paragrafo 4.1.1*); purtroppo tale prova non ha prodotto risultati soddisfacenti:

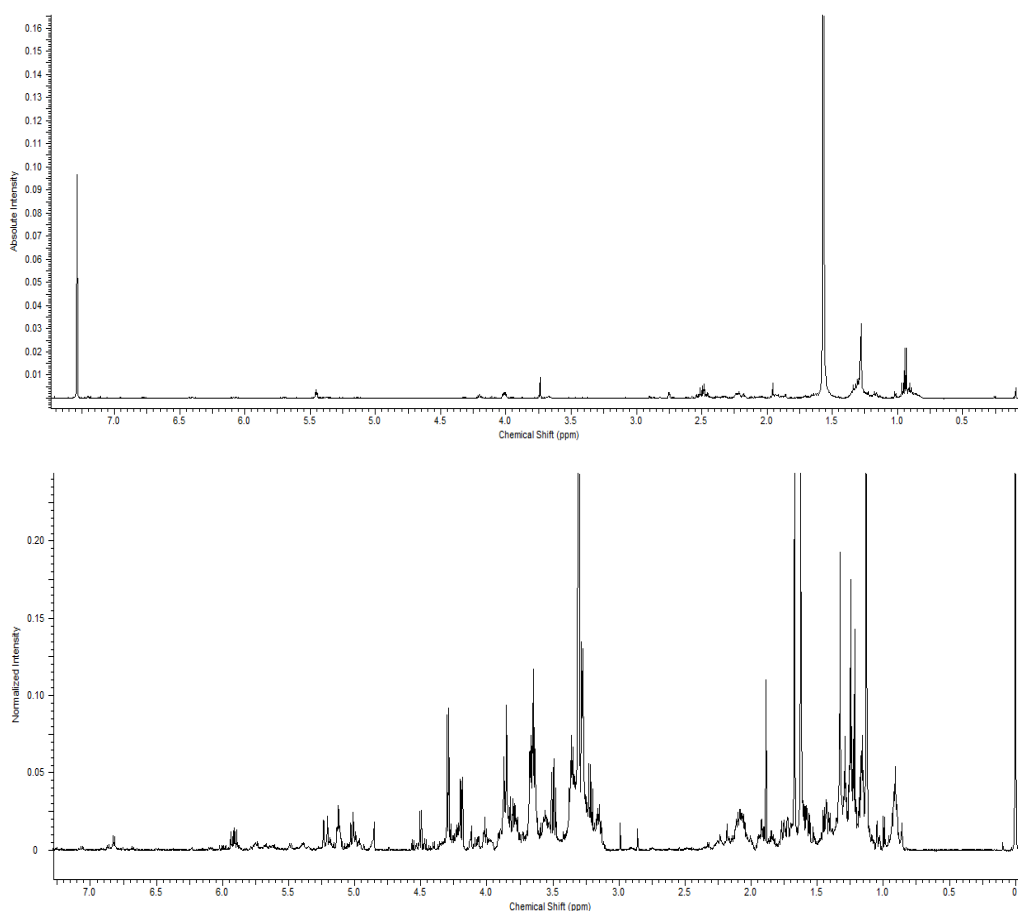


Figura 4.44 – Spettri 1H 1D dell'estratto in $CDCl_3$ (sopra) e in CD_3OD (sotto)

Tutti i composti appaiono insolubili in cloroformio, in quanto nello spettro soprastante non è presente quasi alcun picco; lo spettro sottostante infatti è pressoché identico al monodimensionale protonico acquisito prima del tentativo di purificazione. Sulla frazione disciolta in metanolo si sono quindi registrati i seguenti esperimenti, di cui si riportano solamente i parametri d'acquisizione (le figure sono riportate in Appendice):

Esperimento	NS	TD	SW (ppm)	O1P (ppm)	D1 (s)	1/2J (s)	t _{mix} (s)
¹³ C 1D	72000	65536	200	99	2.5	/	/
COSY	174	2048/360	13	6.3	1	/	/
TOCSY	84	2048/512	10	4.87	1.65	/	/
NOESY	216	2048/512	14	6.5	1.5	/	0.7
HMBC	360	2048/ 136	10/ 220	4.7/ 110	1.85	0.06667	/
HMQC	304	2048/ 128	13/ 200	4.87/ 100	2	0.00345	/
HMQCfold24	320	2048/ 136	8/ 20	4.87/ 24	2	0.00345	/
HMQCfold69	296	2048/ 104	8/ 24	4.87/ 69	1.62	0.00345	/

Tabella 4.16 – Parametri d’acquisizione degli esperimenti NMR

4.2.2 – Spettri di massa

Spettro di massa:

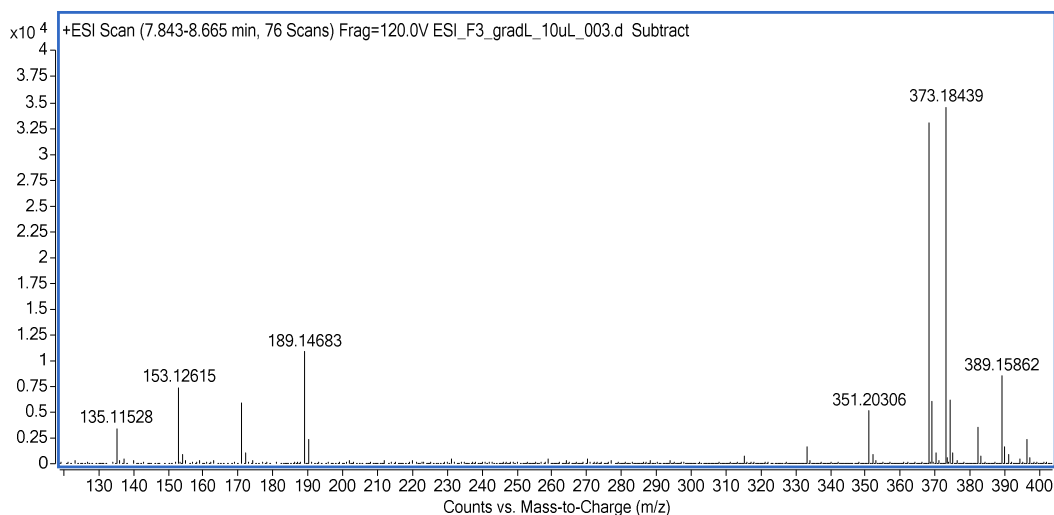


Figura 4.45 – Spettro ESI-MS

Frammentazione dello ione con m/z pari a 368:

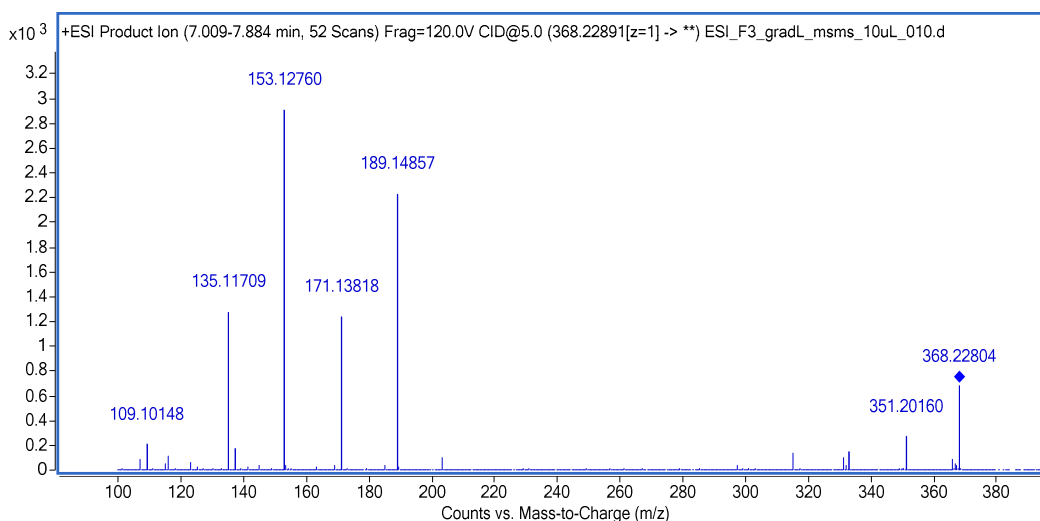


Figura 4.46 – Spettro di massa tandem ottenuto dalla frammentazione dello ione di m/z pari a 368

Nello spettro di figura 4.45 i segnali più intensi sono riconducibili a una coppia di picchi separati di cinque unità, che corrispondono quindi allo ione sodiato e ammoniato di una molecola di peso pari a 350g/mol. I picchi a bassi valori di m/z sono attribuibili ai terpeni, unici frammenti visibili (protonati). In figura 4.46 si vedono la perdita dell'ammoniaca (351m/z) e i picchi della frammentazione del terpene, di massa pari a 188g/mol. Lo zucchero, per differenza, pesa 162g/mol, cioè proprio il peso del glucosio senza una molecola d'acqua (persa nella condensazione).

4.2.3 – Confronto con la Frazione 2: analiti principali

In figura si confrontano gli spettri monodimensionali delle Frazioni 3 e 2:

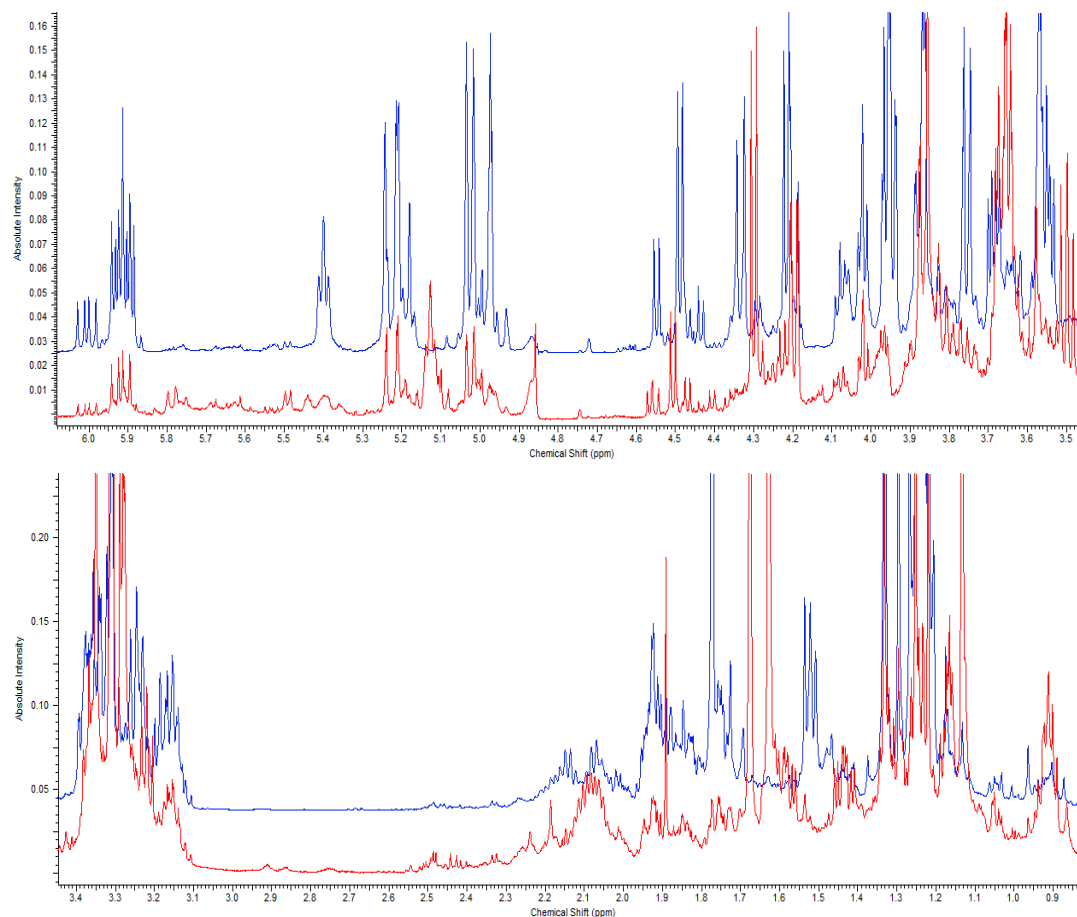


Figura 4.47 – Sovrapposizioni degli spettri ^1H 1D delle Frazioni 2 (blu) e 3 (rosso)

I due spettri presentano regioni molto simili, soprattutto quella dove risuonano gli zuccheri; le maggiori differenze, invece, si notano nei segnali terpenici. Si comincia l'analisi anche in questa frazione dai picchi a circa 6ppm:

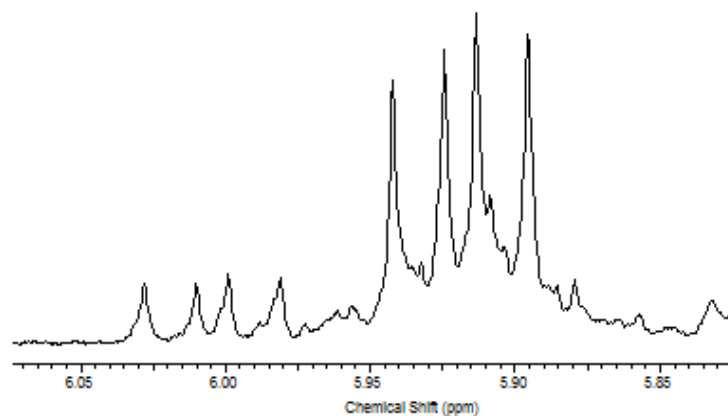


Figura 4.48 – Ingrandimento a circa 6ppm dello spettro ^1H 1D della sola Frazione 3

Le molecole che generano questi segnali sembrano essere principalmente due; grazie alla sovrapposizione di *figura 4.47* si osserva che i due doppietti di doppietti coincidono quasi alla perfezione con gli analoghi segnali dei due ossidi del linalolo trovati nella Frazione 2. È plausibile pensare che tali due molecole siano presenti anche in questa frazione, ma seguendo questa ipotesi un picco molto intenso a 5.12ppm non avrebbe assegnazione; ne consegue che le molecole principali possono essere tre, oppure una delle due non è uguale a una delle precedenti. Lasciando inizialmente in secondo piano i picchi a circa 6ppm, l'attenzione è focalizzata proprio sul segnale a 5.12ppm: esso è assente nella Frazione 2 e perciò appartiene sicuramente a una nuova molecola da trovare.

4.2.4 – “Molecola 5.12”, studio del terpene 1,2-diidrossilinalolo

Il sistema di spin del protone a 5.12 è facilmente trovato grazie allo spettro TOCSY:

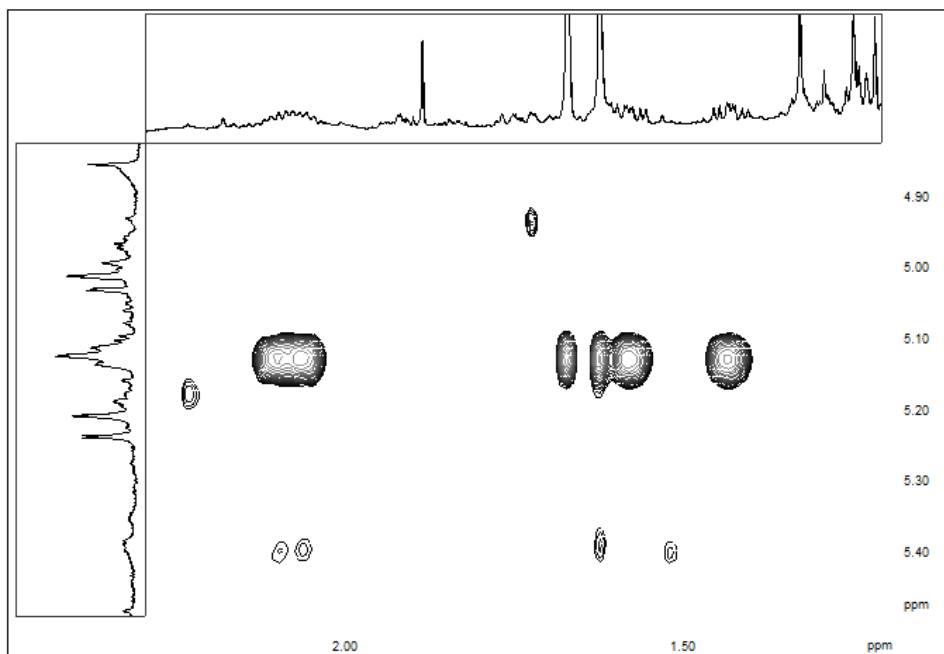


Figura 4.49 – Sistema di spin del protone a 5.12ppm

Spettro ^1H 1D (ppm)	TOCSY (ppm)
5.12	1.42; 1.58; 1.62; 1.67; 2.06; 2.10

Tabella 4.17 – Assegnazione del sistema di spin del protone a 5.12ppm

Dall'integrazione si riconosce che i picchi a 1.62 e 1.67ppm sono dei gruppi metilici; la loro correlazione scalare con il protone a 5.12ppm deve essere pertanto una ^4J osservabile a causa di una geometria particolare. Il *chemical shift* stesso del protone capostipite rivela che è presente un doppio legame; tuttavia la conferma si ha grazie agli spettri eterocorrelati, che permettono di disegnare parte della molecola:

Spettro ^1H 1D (ppm)	HMQC (ppm)	HMBC (ppm)
5.12	125.98	17.85; 22.93; 26.02
1.67	26.02	17.85; 125.98; 132.26
1.62	17.85	26.02; 125.98; 132.26
2.06; 2.10	22.93	40.27; 125.98; 132.26
1.42; 1.58	40.27	22.45; 22.93; 75.45 ; 77.21 ; 125.98

Tabella 4.18 – Correlazioni all'HMQC e all'HMBC del sistema di spin trovato

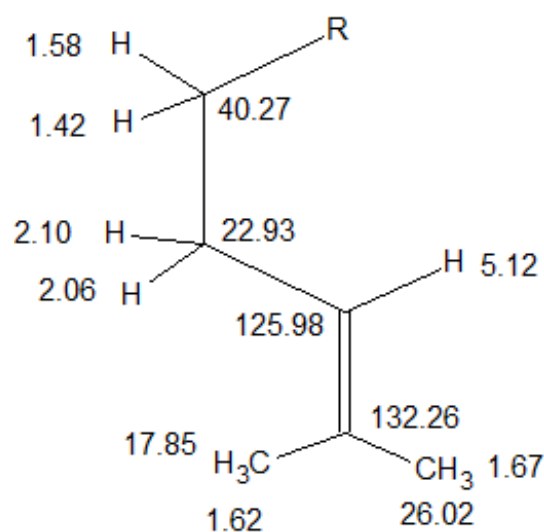


Figura 4.50 – Sistema di spin del protone a 5.12ppm

I cross-picchi NOE permettono di stabilire quale dei due metili sia “Z” rispetto all’idrogeno a 5.12ppm; inoltre alcune correlazioni mettono in evidenza che anche in questo caso le due coppie di protoni diastereotopici sono accoppiate in maniera particolare:

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)
5.12	1.67
1.58	1.62; 2.10; 1.13 ; 3.65 ; 4.19
1.42	1.62; 2.06; 1.13 ; 3.49 ; 3.65 ; 4.19

Tabella 4.19 – Correlazioni significative nel NOESY del sistema di spin trovato

Per identificare il gruppo R presente in figura 4.50 si usano i cross-picchi nell’HMBC e nel NOESY: in tabella 4.18 e tabella 4.19 sono segnalate in grassetto le correlazioni con atomi non ancora disegnati e che quindi appartengono al secondo segmento di molecola. Il secondo sistema di spin della molecola è formato dai tre protoni che risuonano a 3.49, 3.65 e 4.19ppm; si assegnano subito anche i relativi carboni, trovando così che anche in questo caso sono presenti due protoni diastereotopici (3.49 e 4.19ppm). Per ottimizzare l’assegnazione del terpene si ricercano altre correlazioni di tipo NOE:

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)
1.13	1.42 > 1.58; 3.65; 3.49 > 4.19
3.65	3.49 < 4.19

Tabella 4.20 – Correlazioni significative nel NOESY del secondo sistema di spin

Il terpene ritrovato è denominato 1,2-diidrossilinalolo:

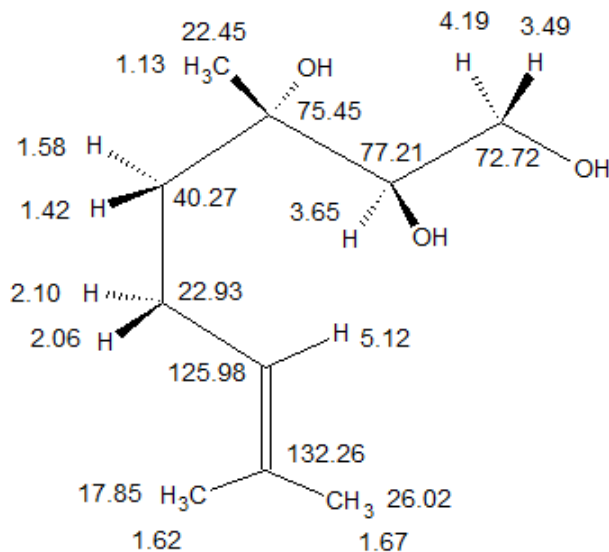


Figura 4.51 – Formula di struttura del nuovo terpene trovato

Questa particolare forma ossidata del linalolo non risulta essere mai stata trovata in precedenza, né come terpene libero, né in forma glicosilata; è invece conosciuta la forma isomerica già rappresentata in figura 1.7 e riportata di seguito:

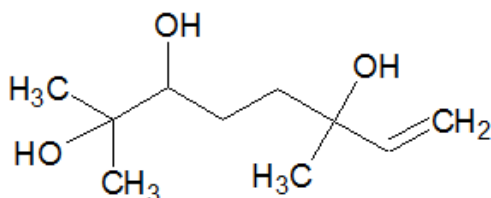


Figura 4.52 – Formula di struttura del 6,7-diidrossilinalolo

Si ipotizza per la molecola nuova una via di sintesi affine a quella enunciata nella figura 1.8 per il 6,7-diidrossilinalolo:

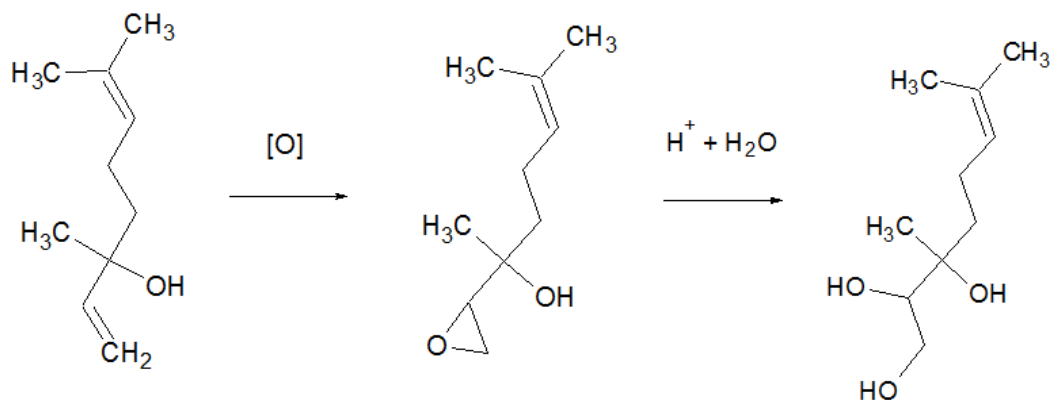


Figura 4.53 – Possibile via di sintesi dell'1,2-diidrossilinalolo

4.2.5 – “Molecola 5.12”, identificazione del glucosio e struttura finale

Si ricercano all’HMBC e al NOESY cross-picchi che permettano di stabilire a quale dei tre ossigeni dell’1,2-diidrossilinalolo sia legato il glucide; i risultati sono i seguenti:

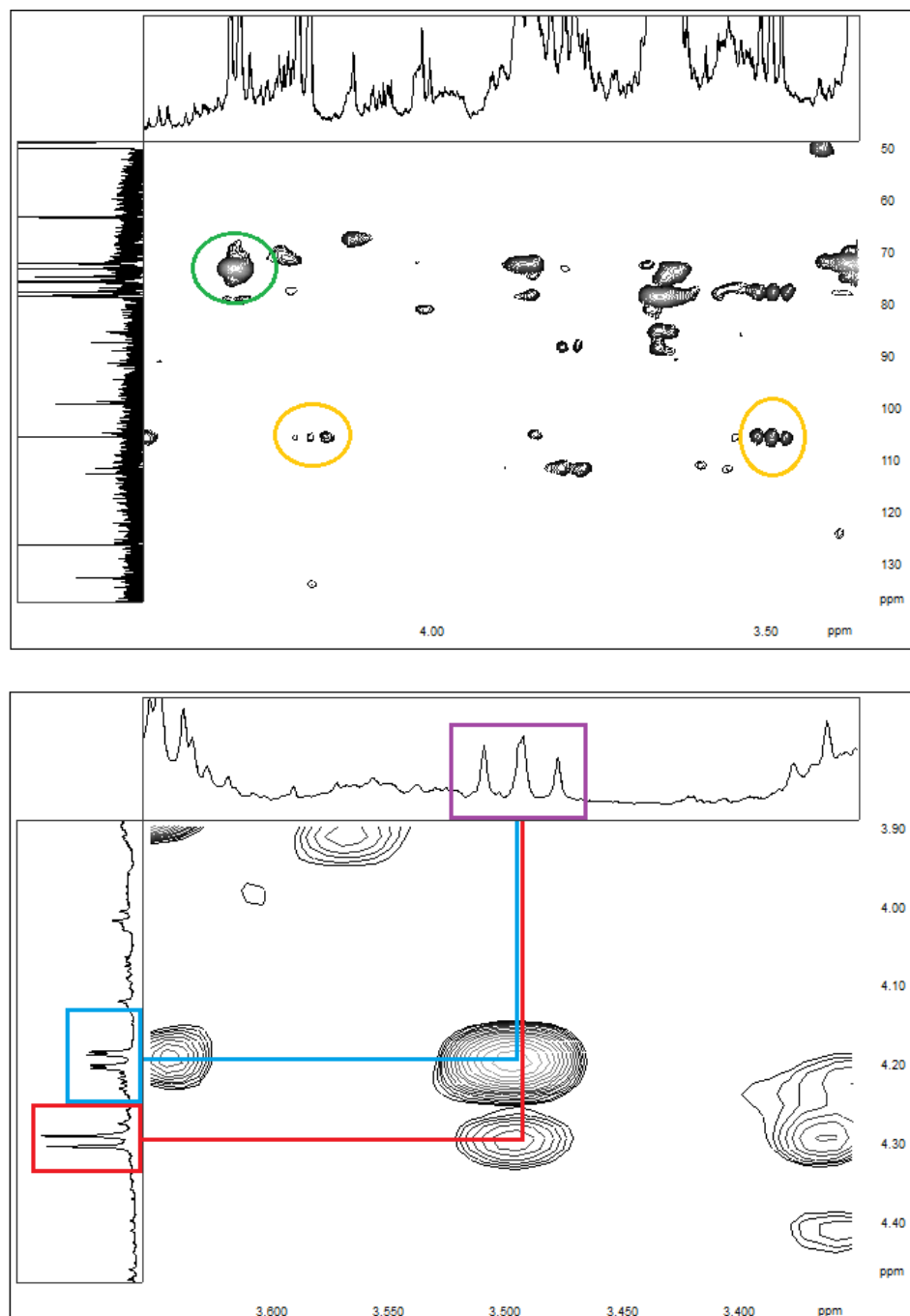


Figura 4.54 – Cross-picchi di giunzione tra terpene e zucchero nell’HMBC (sopra) e nel NOESY (sotto)

Spettro ^1H 1D (ppm)	NOESY (ppm)	HMBC (ppm)
3.49 (blu); 4.19 (rosso)	4.29 (viola)	105.16 (giallo)
4.29	/	72.72 (verde)

Tabella 4.21 – Assegnazione dei cross-picchi di giunzione tra terpene e zucchero

Si procede con l'assegnazione degli atomi dello zucchero, trovando l'ormai noto glucosio, come ipotizzato nel paragrafo 4.2.2:

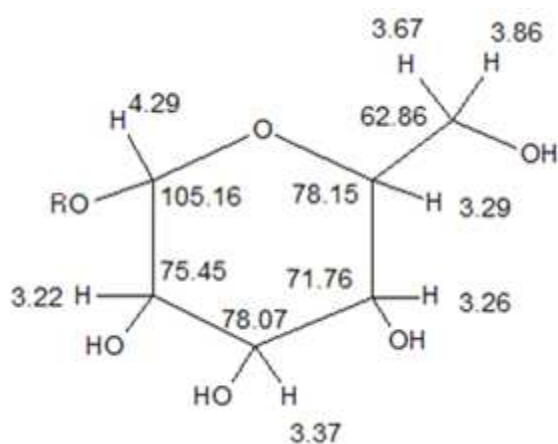


Figura 4.55 – Assegnazione del glucosio legato all'1,2-diidrossilinalolo

Complessivamente, la molecola è la seguente:

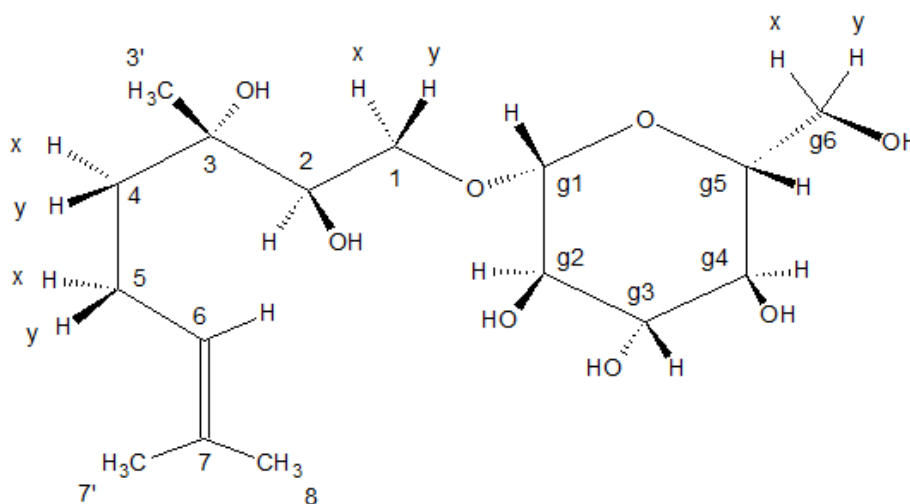


Figura 4.56 – Struttura finale della “molecola 5.12”

Nella seguente tabella è riportata l'assegnazione completa della molecola

1-O-[1-β-D-glucopiranosil]-3,7-dimetilotta-6-ene-2,3-diolo

ovvero *1-O-[1-β-D-glucopiranosil]-2-diidrossilinalolo:*

	δ ¹ H (ppm)	molteplicità	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
1	x: 4.19	dd	2.24; 10.03	72.72
	y: 3.49	dd	9.14; 10.03	
2	3.65	m	?	77.21
3	/	/	/	75.45
3'	1.13	s	/	22.45
4	x: 1.58	ddd*	5.00; 11.87; 13.54	40.27
	y: 1.42	ddd*	5.28; 12.00; 13.76	
5	x: 2.10	m (dddd)	?	22.93
	y: 2.06	m (dddd)	?	
6	5.12	m (ddqq)**	?	125.98
7	/	/	/	132.26
7'	1.62	s	/	17.85
8	1.67	s	/	26.02
g1	4.29	d	7.78	105.16
g2	3.22	dd	7.81; 9.15	75.45
g3	3.37	t (dd)	8.93	78.07
g4	3.26	m (dd)	?	71.76
g5	3.29	m (ddd)	?	78.15
g6	x: 3.86	dd	1.63; 12.13	62.86
	y: 3.67	m (dd)	?	

Tabella 4.22 – Assegnazione completa della “molecola 5.12”

*: questi multipletti rappresentano uno dei rari casi tra tutti quelli studiati in questo lavoro in cui una molteplicità complessa è distinguibile e analizzabile. Nella figura seguente si possono visualizzare le tre diverse J:

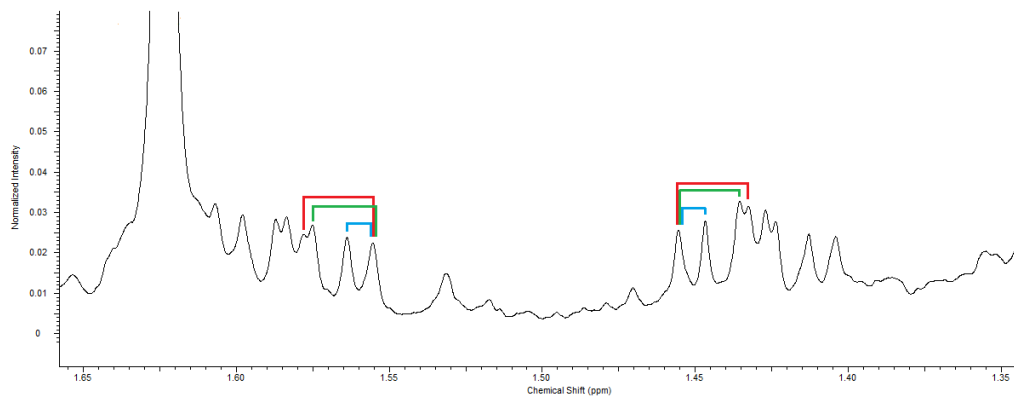


Figura 4.57 – Ingrandimento dello spettro monodimensionale protonico centrato sui multipletti a circa 1.5ppm

***: nello spettro COSY si osserva che:

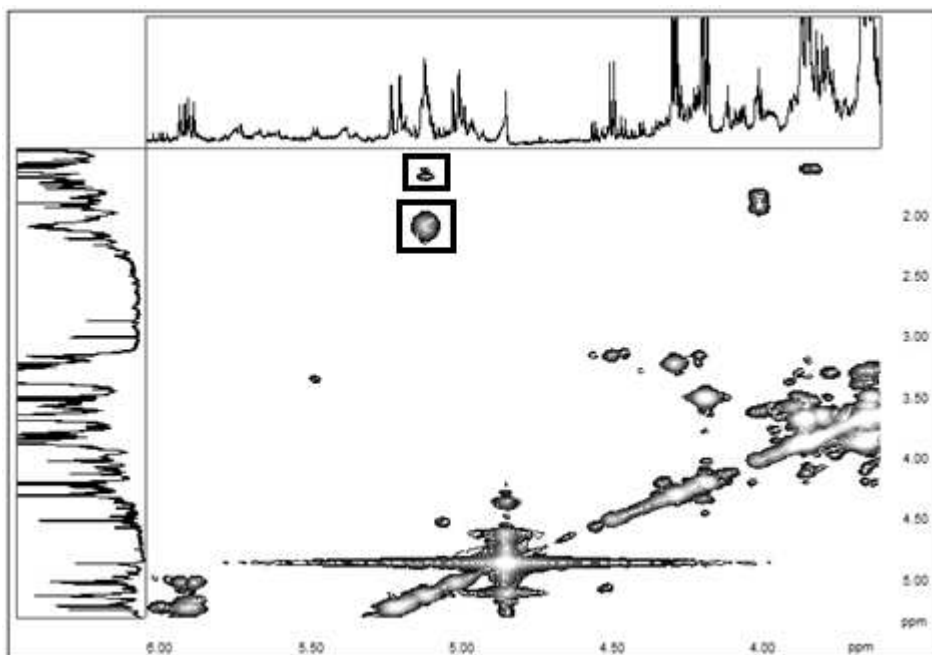


Figura 4.58 – Ingrandimento dello spettro COSY a circa 5ppm

Spettro 1D (ppm)	COSY (ppm)
5.12	2.06; 2.10; 1.62; 1.67

Tabella 4.23 – Correlazioni nel COSY del protone a 5.12ppm

Teoricamente il segnale a 5.12ppm dovrebbe essere un multipletto molto complesso composto da doppietti e quartetti; se però si considera che le J siano simili nei due casi, la molteplicità si approssima a un tripletto di settetti, che è proprio la forma intravista nello spettro monodimensionale.

Il peso del composto è 350g/mol, in accordo coi dati di spettrometria di massa. L'assegnazione dei picchi nello spettro MS-MS di figura 4.46 è:

- 351: $(M + H)^+$
- 189: $(\text{terpene} + H)^+$
- 171: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 153: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 135: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 109: perdita di una molecola di acetilene dal precedente

4.2.6 – “Molecola 5.91”, identificazione e assegnazione

Si analizzano gli esperimenti 1D e 2D raccogliendo le seguenti informazioni:

Spettro ¹ H 1D (ppm)	TOCSY (ppm)	COSY (ppm)
5.91	5.22; 5.02	5.22; 5.02
5.22	5.91; 5.02	5.91; 5.02
5.02	5.91; 5.22	5.91; 5.22
1.33	/	/
1.90	1.74; 1.94; 1.84; 4.02	1.74; 1.84; 1.94
1.74	1.90; 1.94; 1.84; 4.02	1.84; 1.90; 1.94
1.94	1.74; 1.90; 1.84; 4.02	1.74; 1.84; 1.90; 4.02
1.84	1.74; 1.90; 1.94; 4.02	1.74; 1.90; 1.94; 4.02
4.02	1.74; 1.90; 1.94; 1.84	1.84; 1.94
1.25	/	/
1.22	/	/

NOESY (ppm)	HMQC* (ppm)	HMBC (ppm)
1.33; 1.90; 1.94	144.98	85.07
1.33	112.27	85.07; 144.98
/	112.27	85.07
/	26.92	38.21; 85.07; 144.98
4.02 intenso	38.21	26.92; 28.27; 87.13; 144.98
/	38.21	28.27; 87.13
4.02 intenso	28.27	38.21; 87.13
4.02 debole	28.27	38.21; 80.81; 87.13
1.22 > 1.25	87.13	20.93; 80.81
4.50 intenso	20.93	23.92; 80.81; 87.13
4.50 debole	23.92	20.93; 80.81; 87.13

Tabella 4.24 – Mappatura completa delle correlazioni nei bidimensionali; nella colonna del NOESY sono riportati solo i picchi che forniscono informazioni aggiuntive rispetto a TOCSY e COSY

*: anche HMQC foldati con O1P impostato a 24 e 69ppm.

Si nota che i carboni a 80.81 e 85.07ppm non hanno cross-picchi all’HMQC, quindi sono tetrasostituiti; questo comporta un’intensità ridotta di tali atomi nello spettro monodimensionale al ¹³C (vedi *paragrafo 2.3.6*). I due carboni risultano difficili da individuare nel ¹³C 1D, quindi per assegnarli in questo caso si è preferito ricorrere allo spettro HMBC. Confrontando tutti questi dati con quelli della Frazione 2 si desume che il terpene in esame sia nuovamente l’(E)-linalolossido.

Come ci si aspettava, sono ritrovate due correlazioni, in grassetto in *tabella 4.24*, che rivelano la presenza del saccaride glucosio legato in posizione terminale; a differenza dell'analogia molecola trovata nella Frazione 2, in questa non è presente l'apiosio:

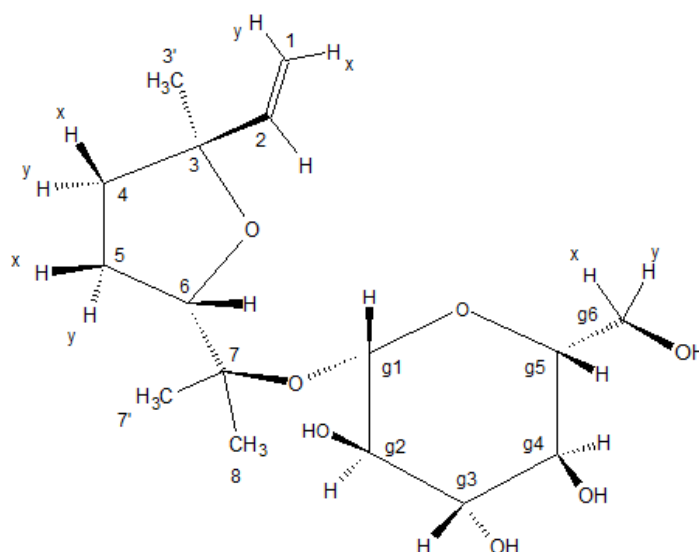


Figura 4.59 – Struttura finale della “molecola 5.91”

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	molteplicità	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	x: 5.02	dd	1.34; 10.82	112.27
	y: 5.22	dd	1.47; 17.35	
2	5.91	dd	10.69; 17.28	144.98
3	/	/	/	85.07
3'	1.33	s	/	26.92
4	x: 1.90	m (ddd)	?	38.21
	y: 1.74	m (ddd)	?	
5	x: 1.94	m (dddd)	?	28.27
	y: 1.84	m (dddd)	?	
6	4.02	t (dd)	7.07	87.13
7	/	/	/	80.81
7'	1.25	s	/	20.93
8	1.22	s	/	23.92
g1	4.50	d	7.74	98.92
g2	3.15	dd	7.81; 9.28	75.30
g3	3.34	t (dd)	?	78.09
g4	3.24	m (dd)	?	71.89
g5	3.27	m (ddd)	?	77.78
g6	x: 3.85	m (dd)	?	62.96
	y: 3.66	m (dd)	?	

Tabella 4.25 – Assegnazione completa della “molecola 5.91”

Il nome IUPAC della molecola è

2-O-[1-β-D-glucopiranosil]-(5-etenil-5-metil-ossolan-2-il)-propan-2-olo

ovvero: *7-O-[1-β-D-glucopiranosil]-(Z)-furanosil-linalolossido*

Non disponendo degli spettri Pure Shift, la concentrazione relativa delle due molecole è stimata con il rapporto delle aree sottese dai picchi che presentano meno sovrapposizioni; da tale calcolo si stima che la concentrazione del composto dell' (E)-linalolossido sia all'incirca il 55% rispetto alla concentrazione del composto del diidrossilinalolo.

4.2.7 – “Molecola 6.00” e altri composti minoritari

Dall'analisi degli spettri bidimensionali si ipotizza che la molecola a cui appartiene il protone che risuona a 6.00ppm sia uno Z-linalolossido glicosilato. Emerge dagli spettri inoltre che è presente anche l'apiosio: sono presenti infatti vari segnali attribuibili a tale zucchero, che potrebbe far parte della stessa molecola del terpene appena ipotizzato o a un altro composto. Purtroppo la scarsa intensità dei segnali di questa molecola non permette di proseguire con l'identificazione.

4.3 – Frazione 6

4.3.1 – Esperimenti NMR

I parametri d'acquisizione degli esperimenti registrati è schematizzata in seguito:

Esperimenti	NS	TD	SW* (ppm)	O1P (ppm)	D1 (s)	1/2J (s)	t _{mix} (s)
¹ H 1D	32	32768	14	4.87	1	/	/
¹³ C 1D	65600	65536	220	110	2.5	/	/
COSY	112	2048/400	6	3.5	1.1	/	/
TOCSY	80	2048/512	10	4.87	1.8	/	/
NOESY	200	2048/512	6	3.5	1.5	/	0.7
HMBC	360	2048/ 136	10/ 220	4.7/ 110	1.85	0.06667	/
HMQC	304	2048/ 128	10/ 170	4.87/ 85.4	2	0.00345	/
HMQCfold70	312	2048/ 128	8/ 34	4.87/ 70	1.9	0.00345	/

Tabella 4.26 – Parametri d'acquisizione degli esperimenti NMR

*: sono registrati alcuni spettri bidimensionali con finestra d'acquisizione ridotta, per migliorare la risoluzione.

Le figure sono riportate in Appendice.

4.3.2 – Spettri di massa

Lo spettro di massa è riportato in figura:

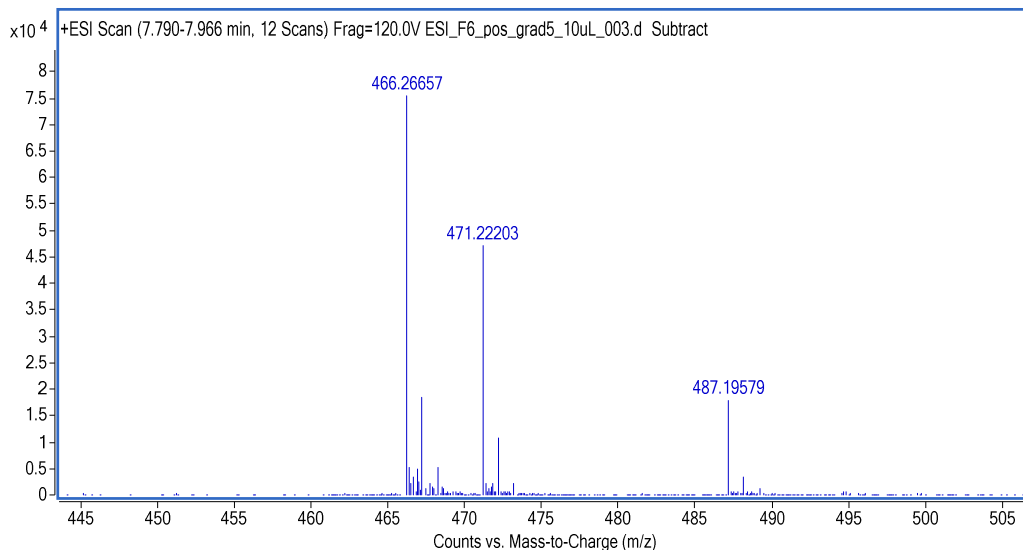


Figura 4.60 – Spettro ESI-MS

La frammentazione dello ione con m/z uguale a 466 è visualizzabile di seguito:

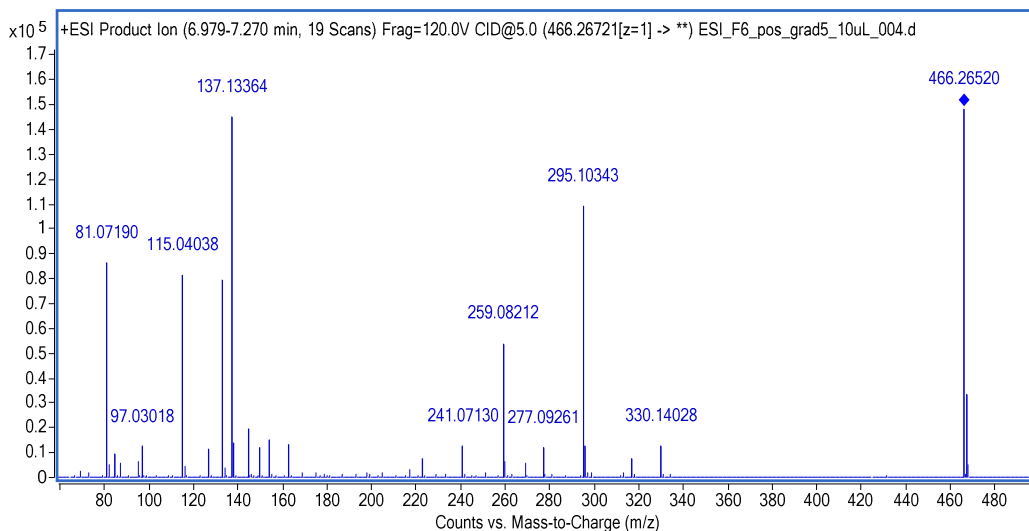


Figura 4.61 – Spettro di massa tandem ottenuto dalla frammentazione dello ione di m/z pari a 466

Grazie alla coppia di picchi con m/z pari a 471 e 466, si ricava il peso della molecola contenuta in maggiore quantità: 448g/mol. La frammentazione non è interpretabile con immediatezza.

4.3.3 – Distinzione dell'analita principale

A differenza delle altre frazioni, questa volta sembra che tutti i picchi che risaltano in intensità nello spettro monodimensionale protonico siano riconducibili a un'unica molecola: si distinguono chiaramente i picchi relativi al terpene (5.90-5.00ppm e 2.10-1.30ppm) e a due zuccheri (5.00-3.00ppm), come mostrato in seguito:

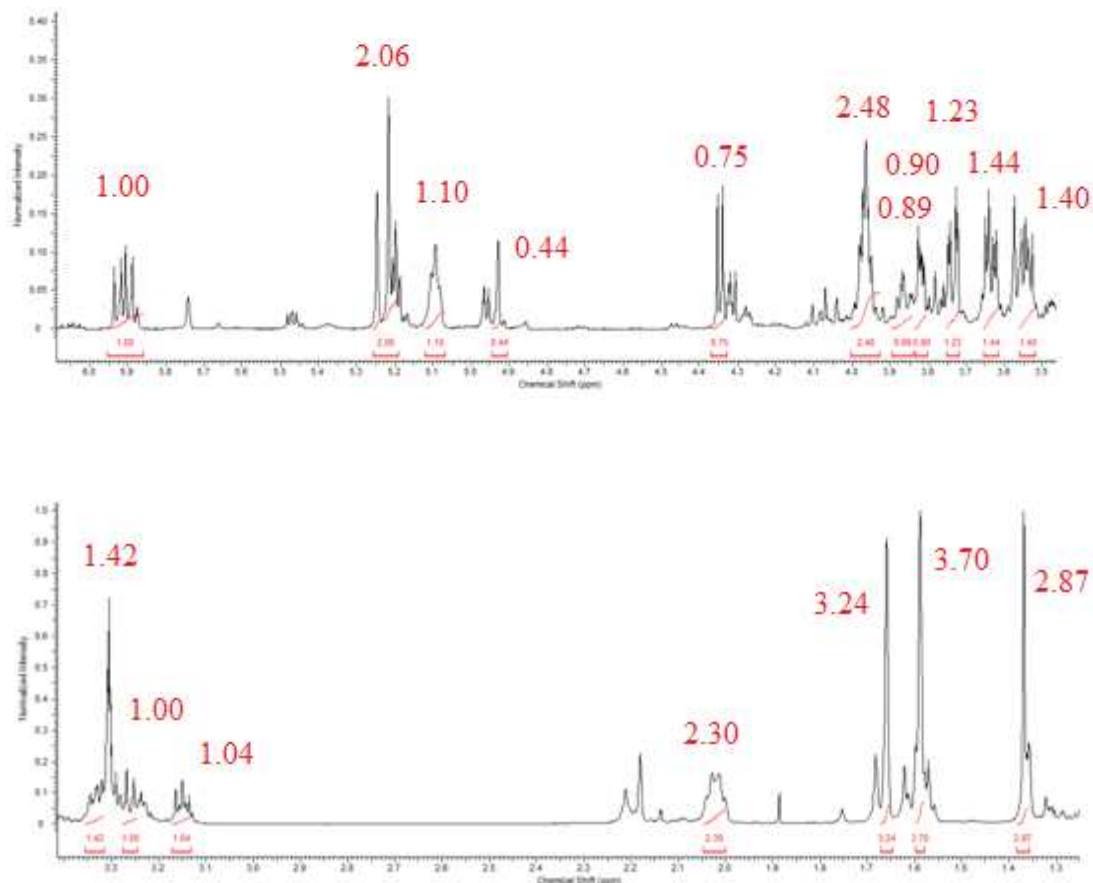


Figura 4.62 – Ingrandimenti dello spettro ¹H 1D, con integrali

Gli integrali, anche se non del tutto precisi, sembrano confermare questa ipotesi. Si procede pertanto all'identificazione della molecola più concentrata della Frazione 6, un terpene legato a un disaccaride (secondo la massa), partendo dal doppietto di doppietti a 5.91ppm.

4.3.4 – “Molecola 5.91”, identificazione del linalolo e del glucosio

I cross-picchi che permettono di ipotizzare la struttura del terpene sono i seguenti:

Spettro ^1H 1D (ppm)	TOCSY (ppm)	COSY (ppm)
5.91	5.23; 5.21	5.23; 5.21
5.23	5.91; 5.21	5.91; 5.21
5.21	5.91; 5.23	5.91; 5.23
1.36	/	/
1.60	1.57; 1.59; 1.66; 2.02; 5.09	1.57; 2.02
1.57	1.59; 1.60; 1.66; 2.02; 5.09	1.60; 2.02
2.02	1.57; 1.59; 1.60; 1.66; 5.09	1.57; 1.60; 5.09
5.09	1.57; 1.59; 1.60; 1.66; 2.02	1.59; 1.66; 2.02
1.66*	1.57; 1.59; 1.60; 2.02; 5.09	1.59; 5.09
1.59*	1.57; 1.60; 1.66; 2.02; 5.09	1.66; 5.09

NOESY (ppm)	HMQC (ppm)	HMBC (ppm)
1.36; 4.35	144.52	23.38; 42.81; 81.69
1.36; 4.35	116.06	42.81; 81.69; 144.52
1.36; 4.35	116.06	42.81; 81.69; 144.52
3.97>3.54;4.35	23.38	42.81; 81.69
4.35 ; 5.21; 5.23; 5.91	42.81	23.38; 23.81; 81.69; 144.52
5.21; 5.23; 5.91	42.81	23.38; 23.81; 81.69; 144.52
4.35 debole	23.81	81.69; 125.84; 132.29
1.66>1.59**	125.84	17.87; 23.81; 26.00; 42.81
/	26.00	17.87; 42.81; 125.84; 132.29
/	17.87	26.00; 125.84; 132.29

Tabella 4.27 – Correlazioni salienti negli spettri bidimensionali

*: i gruppi metilici sono scolarmente accoppiati al protone a 5.09 con ^4J non nulle, a causa della geometria particolare della molecola.

** : correlazione fondamentale per stabilire quale dei due metili sia dalla stessa parte del protone a 5.09ppm rispetto al doppio legame.

Si deduce che il terpene in esame sia il linalolo. Dall’HMBC si evince che sono presenti due carboni, risonanti a 81.69 e 132.29ppm, identificabili come quaternari grazie all’assenza del cross-picco nello spettro HMQC. Nella tabella precedente e in quella seguente sono riportati in grassetto i cross-picchi che rivelano la giunzione tra terpene e zucchero. Quest’ultimo presenta solamente un sistema di spin ed è assegnato come glucosio. In seguito sono riportate le correlazione identificate:

Spettro ¹ H 1D (ppm)	COSY (ppm)	HMQC* (ppm)	HMBC (ppm)
4.35	3.15	99,70	81.69
3.15	3.30; 4.35	75,35	72.21; 78.34; 99.70
3.30	3.15; 3.26**	78,34	72.21
3.26	3.30**; 3.34	72,21	68.34; 76.48; 78.34
3.34	3.26; 3.54>3.97	76,48	68.34; 72.21; 78.34
3.54	3.34; 3.97	68,34	72.21; 76.48; 110.11
3.97	3.34; 3.54	68,34	72.21; 76.48; 110.11

Tabella 4.28 – Correlazioni che permettono di identificare il glucosio

*: anche HMQC foldato con O1P impostato a 70ppm.

** : essendo a ridosso della diagonale non è perfettamente visibile

Complessivamente, questa parte di molecola è rappresentata in seguito:

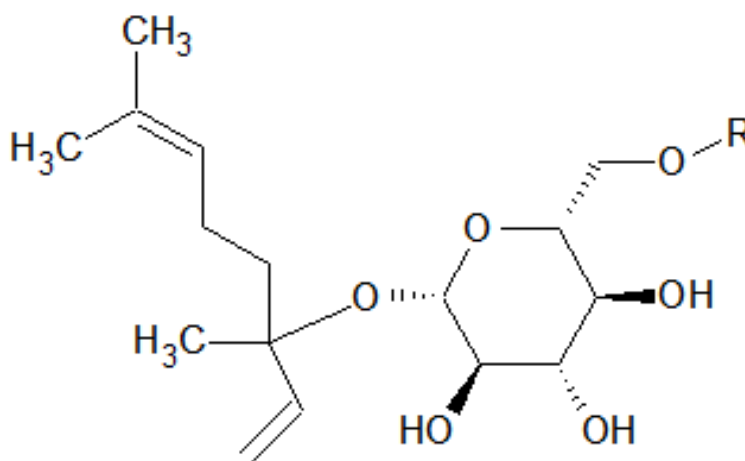


Figura 4.63 – Struttura parziale della molecola “5.91”, dove R rappresenta il secondo glucide

Le correlazioni in corsivo in *tabella 4.28* sono quelle che permettono di procedere con l’assegnazione del secondo glucide; inoltre nel NOESY sono visibili i cross-picchi tra i due protoni diastereotopici terminali del glucosio e un protone non ancora identificato che cade a 4.93ppm, probabilmente l’idrogeno anomero.

4.3.5 – “Molecola 5.91”, identificazione del saccaride arabinosio

L’apiosio è il primo zucchero ipotizzato come sostituente nella *figura 4.63*; tuttavia tale saccaride, avendo uno scheletro ramificato, dovrebbe presentare tre distinti sistemi di spin. Ciò non è verificato per questo zucchero nell’analisi dello spettro TOCSY:

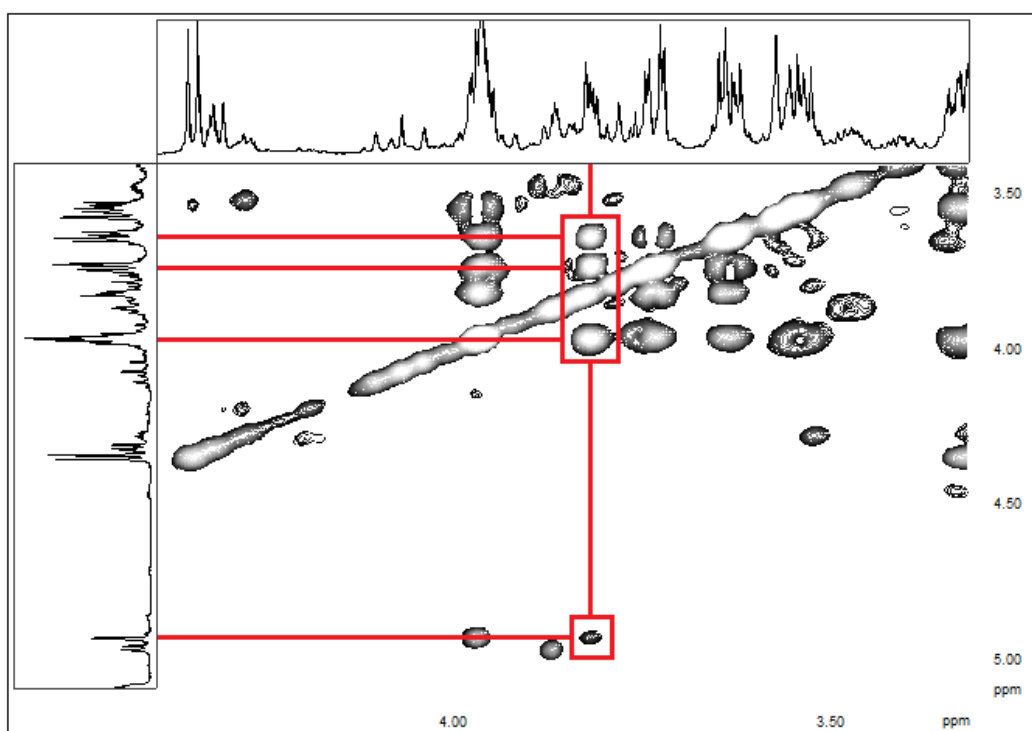


Figura 4.64 – Sistema di spin del secondo glucide

È evidente che l’unico sistema di spin presente è formato da vari protoni e quindi lo zucchero non può essere ramificato; di seguito è riportata l’assegnazione ricavata dall’analisi dello spettro COSY e degli spettri eterocorrelati:

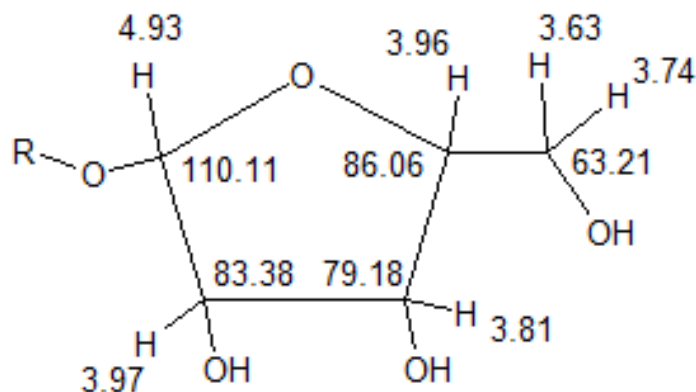
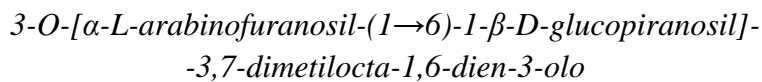


Figura 4.65 – Assegnazione del secondo glucide

Come spiegato in precedenza, lo zucchero non può essere univocamente identificato con certezza; pertanto, in analogia a quanto ipotizzato per il glucosio, ci si affida ai dati di letteratura e si suppone che questo glucide sia l' α -L-arabinosio. Questo zucchero è il più comune tra i pentosi ritrovati nelle matrici di vino ed è anche un noto componente di terpeni glicosilati già identificati in lavori passati.

4.3.6 – “Molecola 5.91”, assegnazione completa

La struttura finale del



ovvero: *3-O-[α-L-arabinofuranosil-(1→6)-1-β-D-glucopiranosil]-linalolo*

è la seguente:

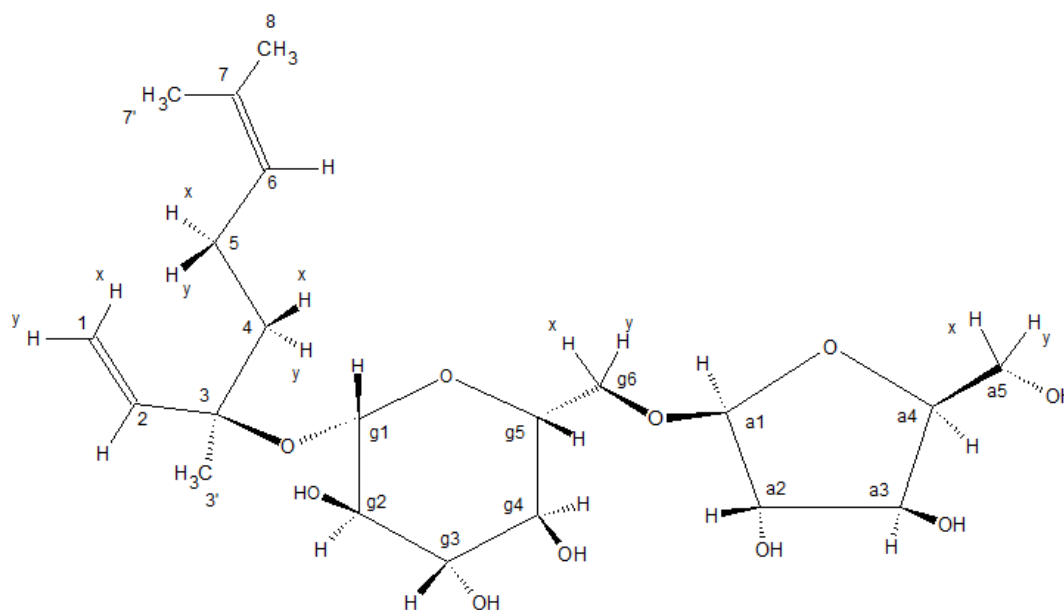


Figura 4.66 – Struttura finale della “molecola 5.91”

Gli atomi sono assegnati nella seguente tabella:

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	molteplicità	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	x: 5.23	d (dd)	17.46	116.06
	y: 5.21	dd	1.02; 10.98	
2	5.91	dd	10.98; 17.79	144.52
3	/	/	/	81.69
3'	1.36	s	/	23.38
4	x*: 1.57	m (ddd)	?	42.81
	y*: 1.60	m (ddd)	?	
5	x,y: 2.02	m (dddd)	?	23.81
6	5.09	t** (ddqq)	7.17; 6.91	125.84
7	/	/	/	132.29
7'	1.59	s	/	17.87
8	1.66	s	/	26.00

g1	4.35	d	7.87	99.70
g2	3.15	dd	7.97; 8.90	75.35
g3	3.30	m (dd)	?	78.34
g4	3.26	m (dd)	?	72.21
g5	3.34	m (ddd)	?	76.48
g6	x: 3.54	dd	6.05; 10.98	68.34
	y: 3.97	m (dd)	?	
a1	4.93	s (d)	?	110.11
a2	3.97	m (dd)	?	83.38
a3	3.81	dd	3.10; 5.70	79.18
a4	3.96	m (ddd)	?	86.06
a5	x: 3.63	dd	5.34; 11.90	63.21
	y: 3.74	dd	3.26; 11.90	

Tabella 4.29 – Assegnazione completa della “molecola 5.91”

*: non si è riusciti a provare se esista una geometria preferenziale del terpene per la molecola in esame, quindi queste etichette x e y sono intercambiabili tra i due protoni diastereotopici esattamente come per tutti i protoni diastereotopici degli zuccheri.

** : analogamente a quanto detto riguardo alla nota di *tabella 4.22*, questo “tripletto” in realtà racchiude una molteplicità molto complessa, dovuta al fatto che la geometria olefinica permetta l'accoppiamento scalare del protone a 5.09ppm anche coi protoni dei due metili.

La frammentazione dello ione molecolare del composto di massa pari a 448g/mol mostra i seguenti picchi:

- 330: $(M + NH_4 - \text{terpene})^+$
- 295: $(\text{disaccaride} + H - H_2O)^+$
- 277: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 259: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 241: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 137: $(\text{terpene} + H - H_2O)^+$
- 133: $(\text{apiosio} + H - H_2O)^+$
- 115: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 97: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 81: frammentazione specifica del terpene, consistente nella perdita di butadiene, a cui segue la perdita di una molecola di idrogeno

4.3.7 – Composti minoritari

Dagli spettri HMQC, di cui in *figura 4.67* si riporta una regione allargata, e monodimensionali si evince che nella Frazione 6 sono presenti altri terpeni in concentrazioni inferiori al composto precedentemente assegnato.

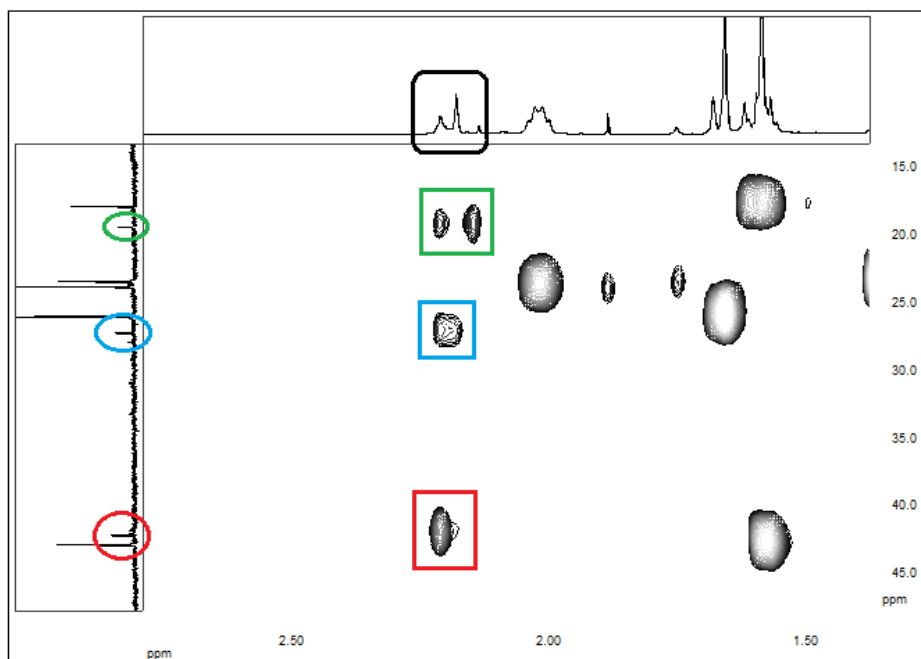


Figura 4.67 – Ingrandimento dello spettro HMQC a circa 2ppm

In uno spettro HMQC un protone non può ovviamente avere due carboni diversi legati; è evidente quindi che ci sono almeno tre idrogeni differenti che generano i picchi a circa 2.20ppm nel monodimensionale protonico. Conoscendo le geometrie di base di questa tipologia di molecole, si suppone che tali protoni siano quelli diastereotopici, in analogia a quelli della posizione 4 o 5 in *figura 4.66*. Si presume che siano presenti almeno altri due terpeni glicosilati, che presentano molteplici correlazioni uguali negli esperimenti bidimensionali; risulta perciò praticamente impossibile discriminare una molecola dall'altra. Lo spettro di massa non fornisce ulteriori informazioni determinanti.

4.4 – Frazione 8

4.4.1 – Esperimenti NMR e spettri di massa

I parametri d'acquisizione degli esperimenti NMR registrati (figure in Appendice) sono:

Esperimenti	NS	TD	SW (ppm)	O1P (ppm)	D1 (s)	1/2J (s)	t _{mix} (s)
¹ H 1D	16	32768	14	4.87	1	/	/
¹³ C 1D	65600	65536	220	110	2.5	/	/
COSY	112	2048/512	6	3.5	1.1	/	/
TOCSY	88	2048/512	7	3.5	1.5	/	/
NOESY	216	2048/512	7	3.5	1.5	/	0.7
HMBC	360	2048/136	7/150	3.5/80	1.85	0.06667	/
HMQC	304	2048/128	8/150	4/80	2	0.00345	/
HMQCfold28	320	2048/136	8/30	4.87/28	1.85	0.00345	/
HMQCfold71	312	2048/128	8/34	4.87/71	2	0.00345	/

Tabella 4.30 – Parametri d'acquisizione degli esperimenti NMR

Gli spettri di massa sono riportati in seguito:

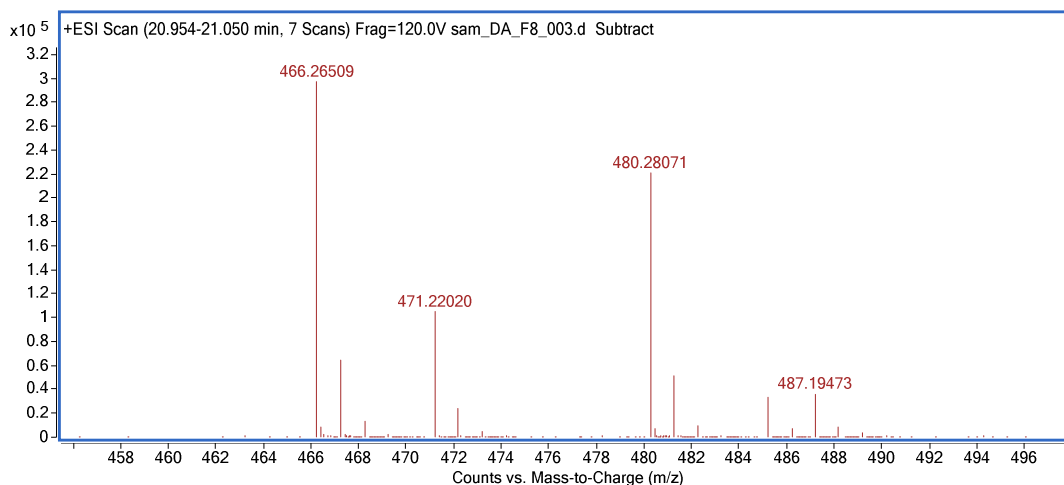


Figura 4.68 – Spettro ESI-MS

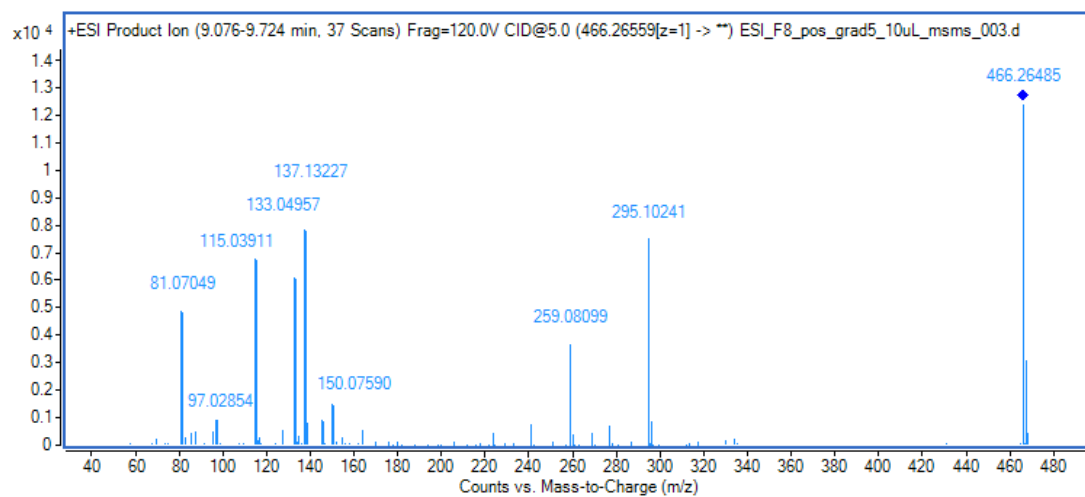
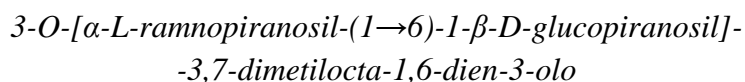


Figura 4.69 – Spettro di massa tandem ottenuto dalla frammentazione dello ione a 466m/z

4.4.2 – Assegnazione completa dei precursori ritrovati

Seguendo la procedura svolta per le altre frazioni, si ritrovano tre composti principali; la prima molecola identificata, di massa pari a 462g/mol, è denominata



ovvero: *3-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→6)-1-β-D-glucopiranosil]-linalolo*

La struttura e l'assegnazione complete sono riportate in seguito:

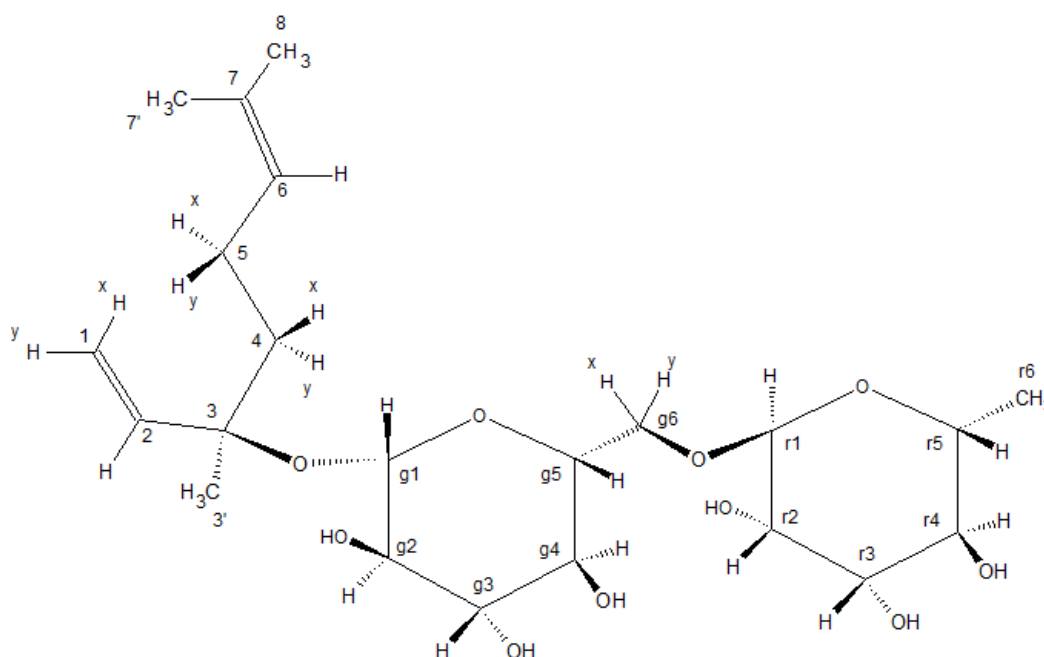


Figura 4.70 – Struttura completa del primo precursore trovato nella Frazione 6

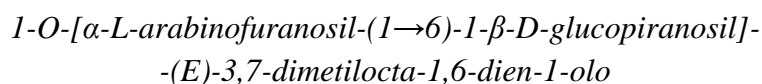
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	molteplicità	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	x: 5.24	dd	0.86; 17.63	116.12
	y: 5.21	dd	0.83; 10.98	
2	5.91	dd	10.94; 17.73	144.48
3	/	/	/	81.64
3'	1.36	s	/	23.44
4	x*: 1.58	m (ddd)	?	42.84
	y*: 1.60	m (ddd)	?	
5	x,y: 2.02	m (dddd)	?	23.80
6	5.09	tm (ddqq)	7.20	125.81
7	/	/	/	132.31
7'	1.66	s	/	26.01

8	1.59	s	/	17.87
g1	4.33	d	7.81	99.70
g2	3.16	m (dd)	?	75.36
g3	3.30	m (dd)	?	78.43
g4	3.23	d (dd)	9.02	72.04
g5	3.28	m (ddd)	?	76.68
g6	x: 3.51	dd	6.62; 10.98	68.23
	y: 3.94	dd	1.66; 10.98	
r1	4.72	d	1.22	102.28
r2	3.81	m (dd)	?	72.37
r3	3.65	m (dd)	?	72.52
r4	3.35	m (dd)	?	74.21
r5	3.64	m (dq)	?	69.91
r6	1.25	d	6.21	18.18

Tabella 4.31 – Assegnazione completa del primo precursore trovato nella Frazione 6

*: non si è riusciti a provare se esista una geometria preferenziale del terpene per la molecola in esame, quindi queste etichette x e y sono intercambiabili

La seconda molecola identificata, di massa pari a 448g/mol, è denominata



ovvero: *1-O-[α-L-arabinofuranosil-(1→6)-1-β-D-glucopiranosil]-geraniolo*

La struttura e l'assegnazione complete sono riportate in seguito:

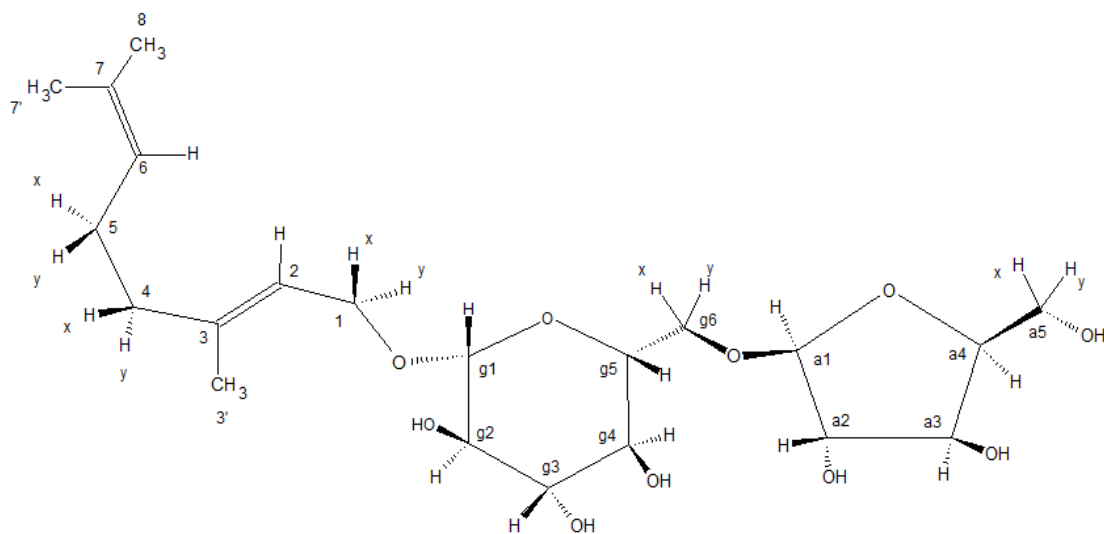


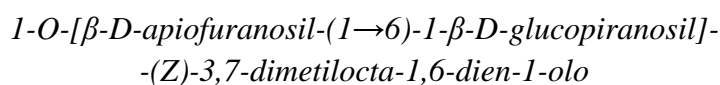
Figura 4.71 – Struttura completa del secondo precursore trovato nella Frazione 6

	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	molteplicità	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	x*: 4.31	m (dd)	?	66.49
	y*: 4.24	m (dd)	?	
2	5.36	t (ddq)	6.72	121.57
3	/	/	/	142.27
3'	1.69	s	/	16.68
4	x*: 2.06	m (dddd)	?	33.17
	y*: 2.12	m (dddd)	?	
5	x,y: 2.10	m (dddd)	?	27.58
6	5.11	tm (ddqq)	8.26	125.22
7	/	/	/	132.67
7'	1.61	s	/	17.87
8	1.68	s	/	26.06
g1	4.28	d	7.84	102.79
g2	3.17	m (dd)	?	75.17
g3	3.33	m (dd)	?	78.20
g4	3.29	m (dd)	?	72.12
g5	3.40	ddd	2.30; 5.98; 9.57	76.91
g6	x: 3.61	m (dd)	6.05; 10.98	68.23
	y: 4.02	dd	2.24; 11.01	
a1	4.96	d	0.90	110.12
a2	3.99	m (dd)	?	83.39
a3	3.82	m (dd)	?	79.10
a4	3.96	m (ddd)	?	86.02
a5	x: 3.64	m (dd)	?	63.22
	y: 3.74	m (dd)	?	

Tabella 4.32 – Assegnazione completa del secondo precursore trovato nella Frazione 6

*: non si è riusciti a provare se esista una geometria preferenziale del terpene per la molecola in esame, quindi queste etichette x e y sono intercambiabili

La terza molecola è solamente ipotizzata, in quanto la sovrapposizione negli spettri NMR non permette l'univoca assegnazione di tutti gli atomi del glucosio; si tratta di



ovvero: $1\text{-O-}[\beta\text{-D-apiofuranosil-(1}\rightarrow\text{6)-1-}\beta\text{-D-glucopiranosil]}\text{-nerolo}$

Il terpene di tale composto è un isomero di quello presente nel secondo precursore citato in questo paragrafo, da cui differisce solamente per la posizione dei sostituenti in un doppio legame .

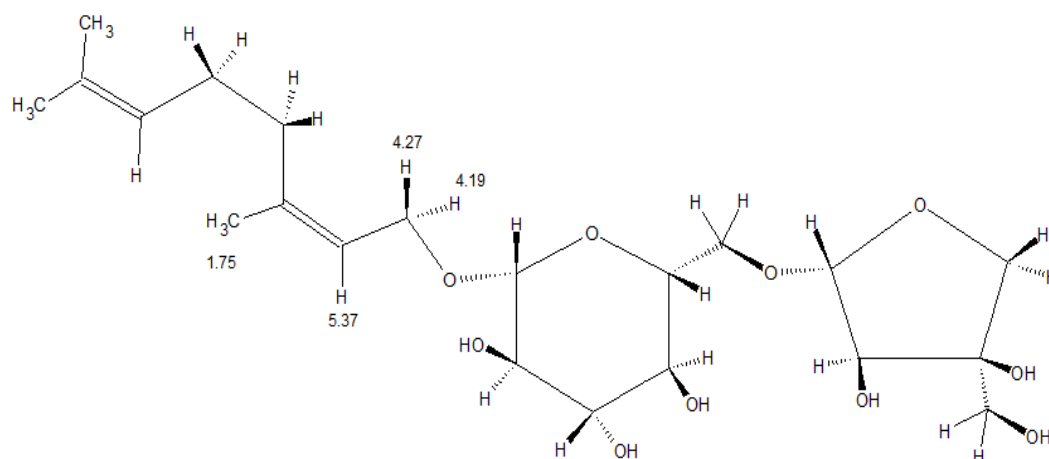


Figura 4.72 – Struttura completa ipotizzata per il terzo precursore trovato nella Frazione 6

Anche questa molecola presenta una massa di 448g/mol. La differenza tra i due isomeri “E” e “Z” del terpene è provata dalle correlazioni nello spettro NOESY degli idrogeni di cui si riporta il *chemical shift* in figura 4.72. Si può infatti osservare che in un caso il cross-picco tra il metile e l’idrogeno olefinico è ben marcato e allo stesso tempo è assente quello tra il metile stesso e i due protoni diastereotopici a circa 4.2ppm; viceversa per l’altro isomero:

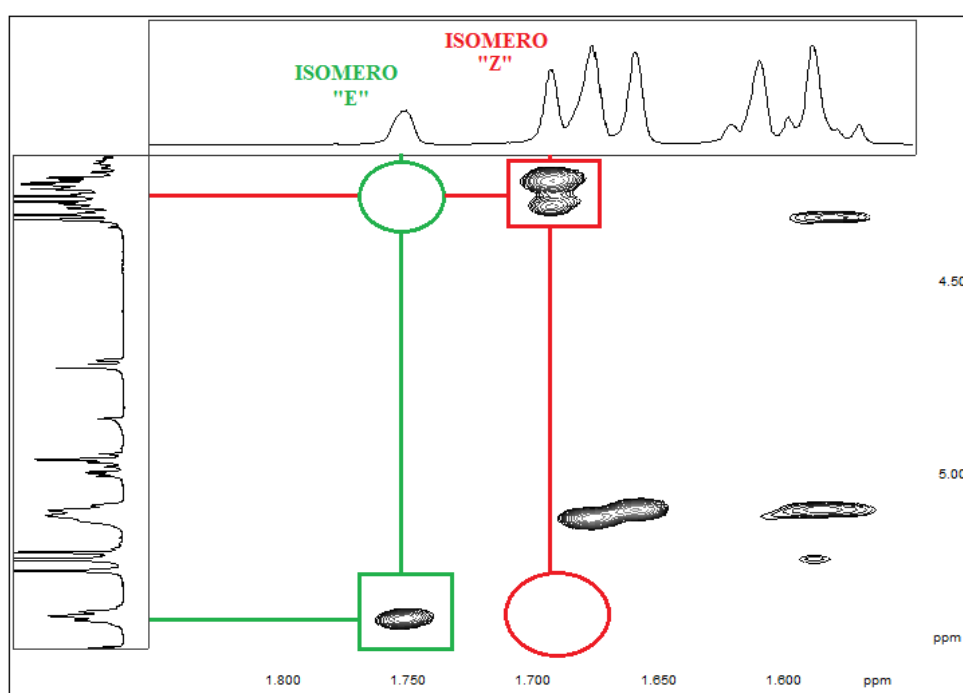


Figura 4.73 – Cross-picchi NOE che mostrano l’isomeria dei due terpeni

Le masse dei composti, con l'aggiunta di uno ione ammonio, combaciano coi picchi più intensi dello spettro di *figura 4.68*. La frammentazione riportata nello spettro di *figura 4.69* è stata così interpretata:

- 295: (disaccaride + H - H₂O)⁺
- 259: perdita di due molecole d'acqua dal precedente
- 137: (terpene + H - H₂O)⁺
- 133: (apiosio + H - H₂O)⁺
- 115: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 97: perdita di una molecola d'acqua dal precedente
- 81: frammentazione specifica del terpene, consistente nella perdita di butadiene, a cui segue la perdita di una molecola di idrogeno

Dall'analisi degli integrali risulta che il precursore con il linalolo è il più concentrato; in riferimento a tale dato, il composto del nerolo risulta essere circa il 50%, mentre la molecola con il geraniolo approssimativamente il 70%.

Capitolo 5

Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati estratti di succo d'uva Moscato al fine di caratterizzarne il contenuto in precursori d'aroma.

Questo elaborato è realizzato basandosi su un nuovo approccio all'analisi di matrici enologiche, non ritrovato in alcun lavoro presente in letteratura. Le procedure consolidate principalmente utilizzate di analisi diretta sulla matrice sono cromatografia, spettrometria di massa e NMR, quest'ultima applicata a composti precedentemente trattati con idrolisi e derivatizzazioni.

La metodologia NMR messa a punto in questo lavoro permette l'identificazione accurata direttamente su miscele di numerose molecole, spesso isomeriche e quindi particolarmente difficili da discriminare, evitando così passaggi che potrebbero modificare la composizione originaria del campione.

che potrebbero modificare la composizione originaria del campione.

Sono stati identificati composti già noti in letteratura e anche sostanze ancora sconosciute, facenti tutte parte della famiglia dei terpeni glicosilati. Nella *tabella 5.1* sono riassunte tutte le molecole trovate.

I risultati ottenuti hanno senza dubbio rafforzato e ampliato la conoscenza di questa classe di molecole; conoscenza che risulta ad oggi piuttosto limitata in letteratura. È stato inoltre confermato che i composti derivati dal linalolo sono i terpeni più presenti come precursori d'aroma nel vino Moscato Giallo; si è confermato inoltre che solo gli ossidi furanosidici del linalolo sono presenti come molecole glicosilate, mentre quelli piranosidici sono soliti essere presenti nel succo come terpeni liberi. Oltre al mero interesse scientifico legato alla scoperta di composti minoritari, in questo elaborato è presente una piccola banca dati, la quale può rappresentare il passo iniziale per la costituzione di un archivio, che permetta in futuro di svolgere analisi comparative anche fra differenti tipologie di vino.

Terpene	Primo saccaride	Secondo saccaride
8-idrossilinalolo	glucosio	/
(E)-furanosil-linalolossido	glucosio	apiosio
(Z)-furanosil-linalolossido	glucosio	apiosio
1,2-diidrossilinalolo	glucosio	/
(E)-furanosil-linalolossido	glucosio	/
linalolo	glucosio	arabinosio
linalolo	glucosio	ramnosio
geraniolo	glucosio	arabinosio
nerolo	glucosio	apiosio

Tabella 5.1 – Precursori d'aroma del vino ritrovati in questo lavoro

Appendice

I due spettri Pure Shift completi citati nel *paragrafo 4.1.15* sono i seguenti:

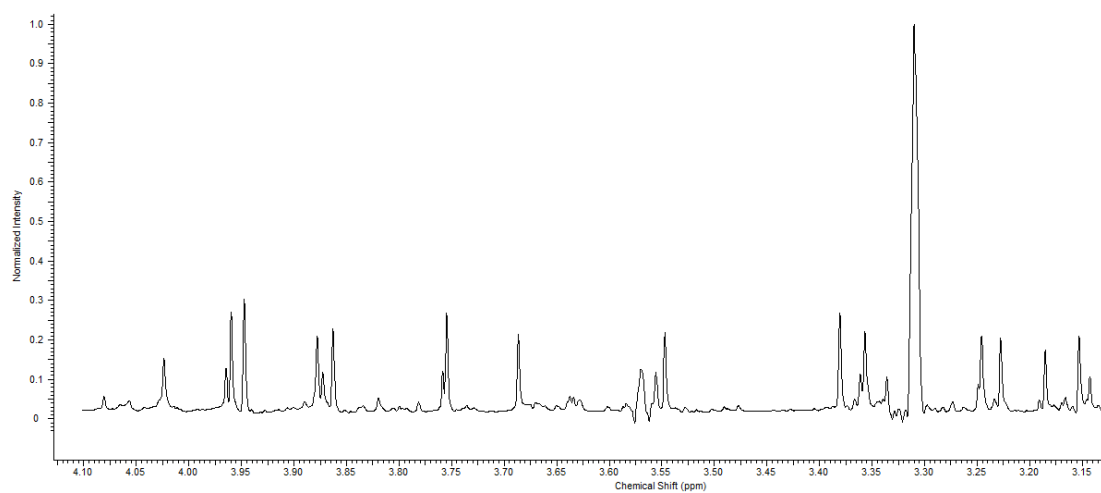


Figura A1 – PS tra 4 e 3ppm

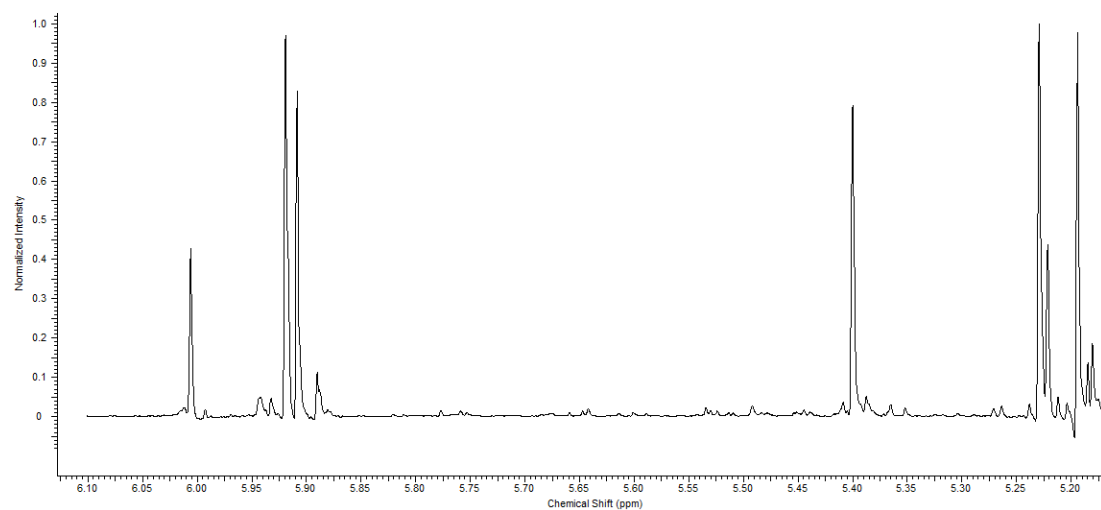


Figura A2 – PS tra 6 e 5ppm

Di seguito sono riportati gli spettri delle Frazioni 3, 6 e 8; i parametri sperimentali sono elencati rispettivamente nel *paragrafo 4.2.1*, nel *paragrafo 4.3.1* e nel *paragrafo 4.4.1*.

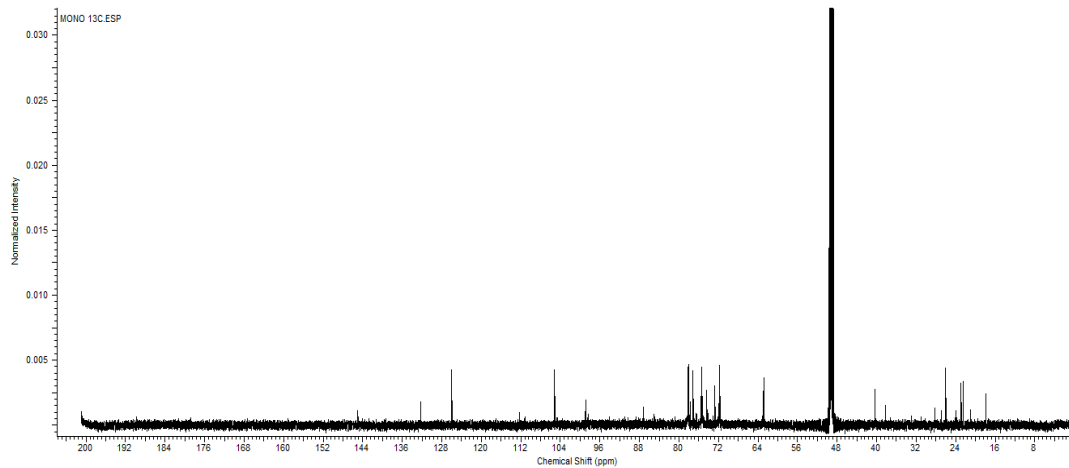


Figura A3 – ^{13}C 1D della Frazione 3

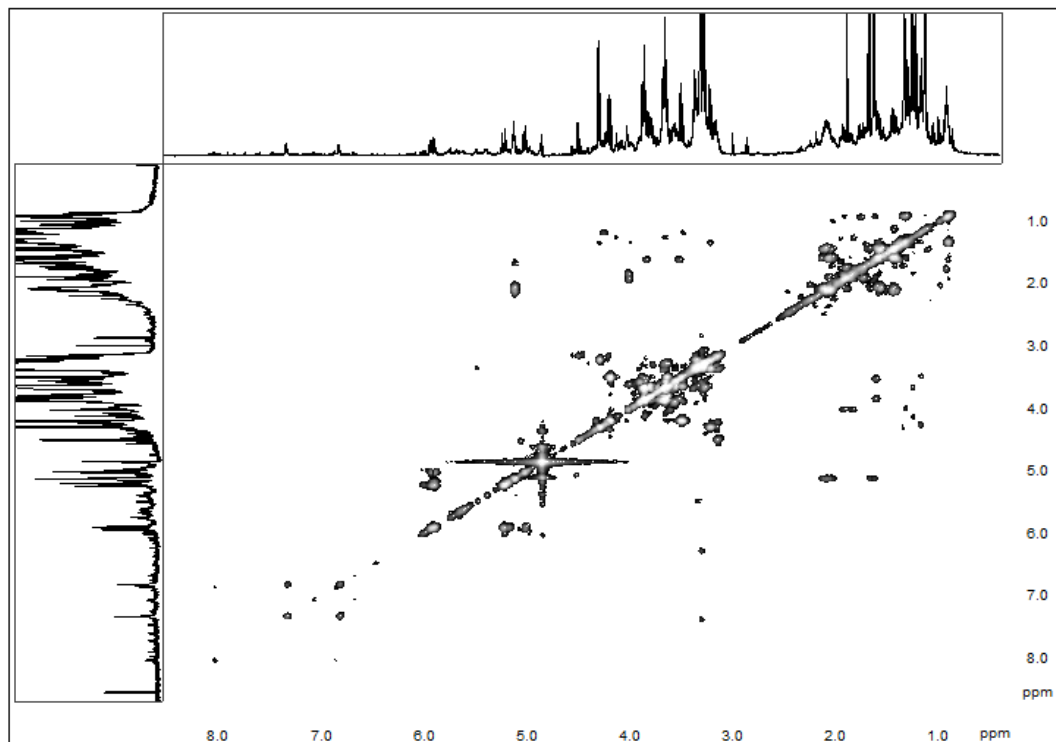


Figura A4 – COSY della Frazione 3

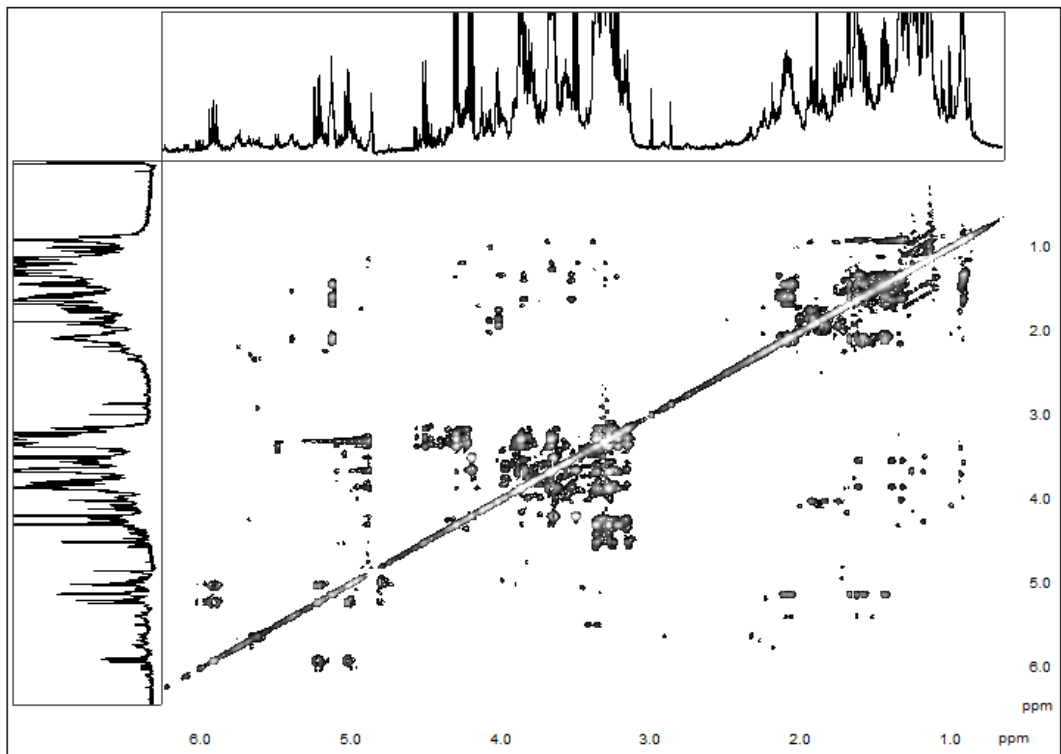


Figura A5 – TOCSY della Frazione 3

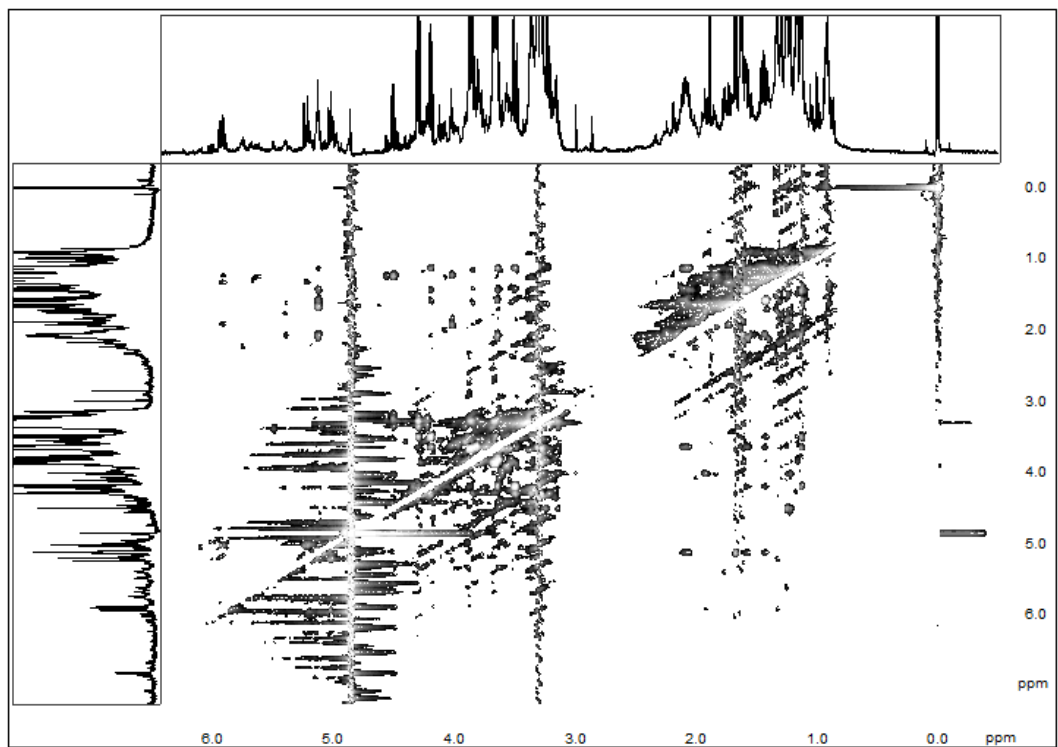


Figura A6 – NOESY della Frazione 3

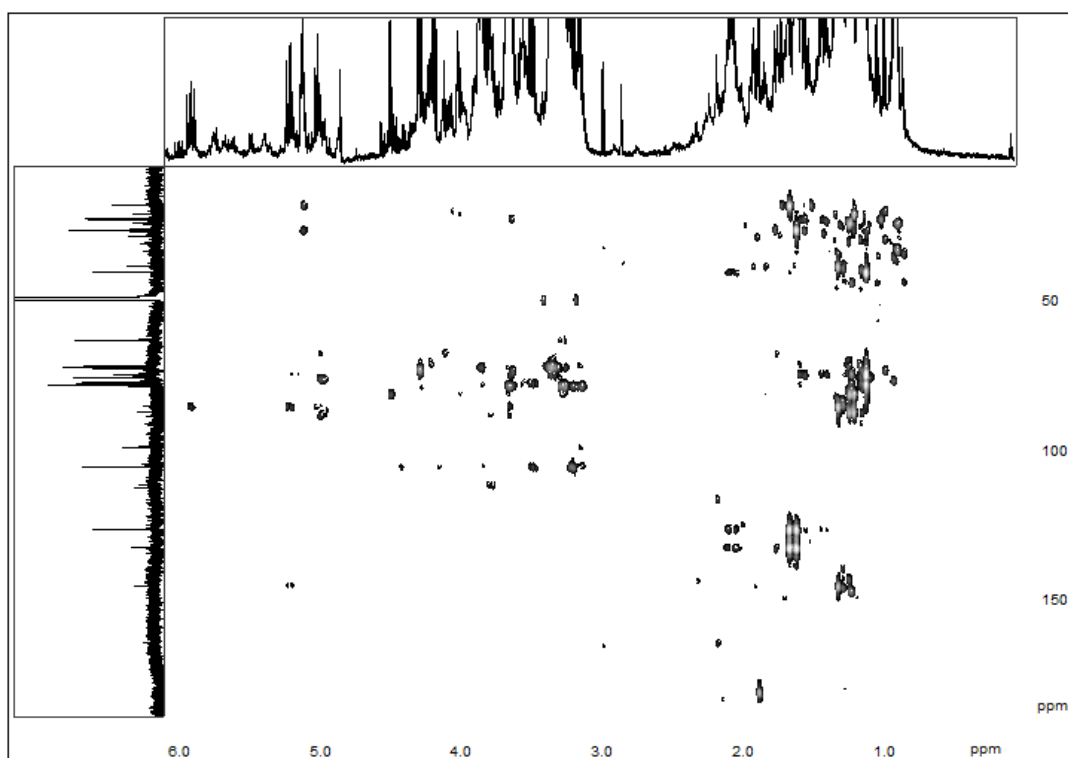


Figura A7 – HMBC della Frazione 3

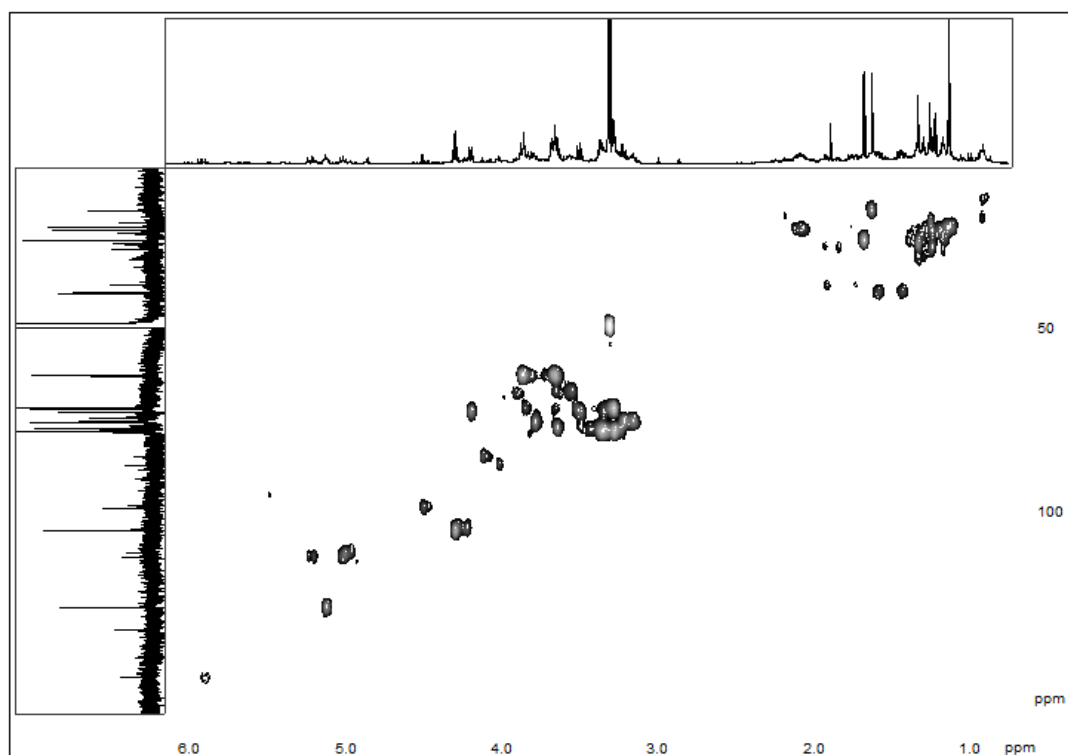


Figura A8 – HMQC della Frazione 3

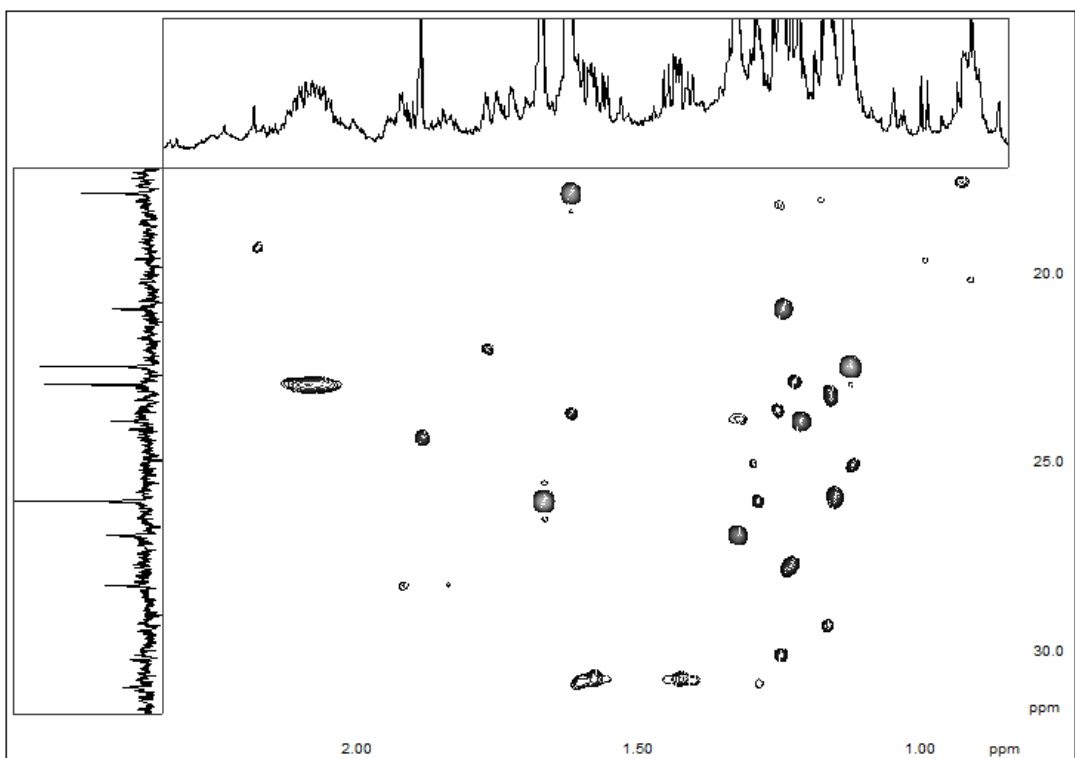


Figura A9 – HMQC foldato centrato a 24ppm della Frazione 3

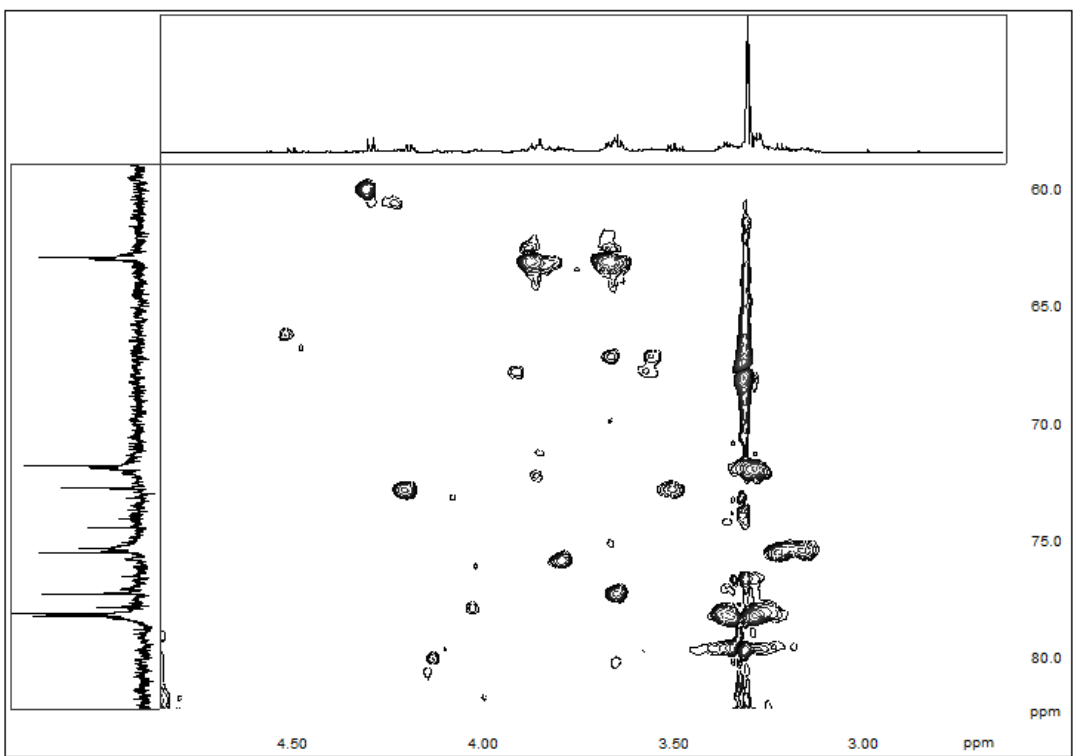


Figura A10 – HMQC foldato centrato a 69ppm della Frazione 3

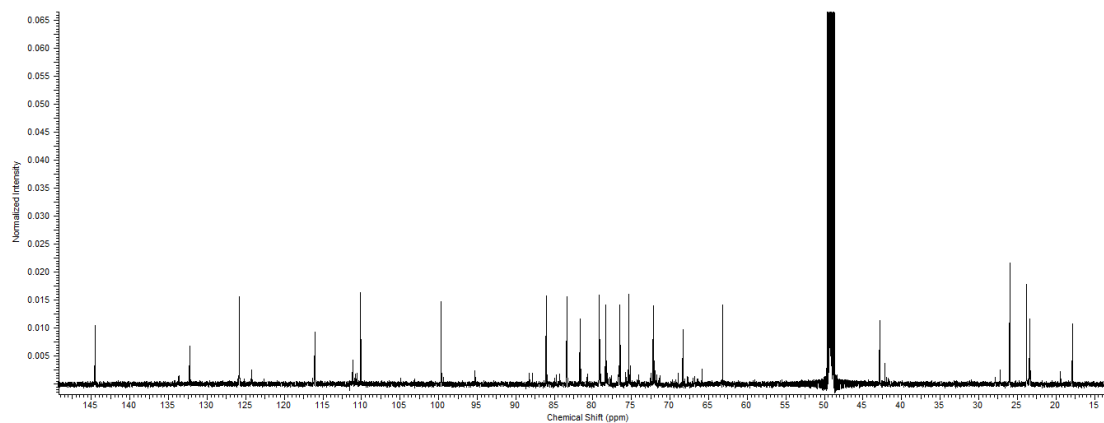


Figura A11 – ^{13}C 1D della Frazione 6

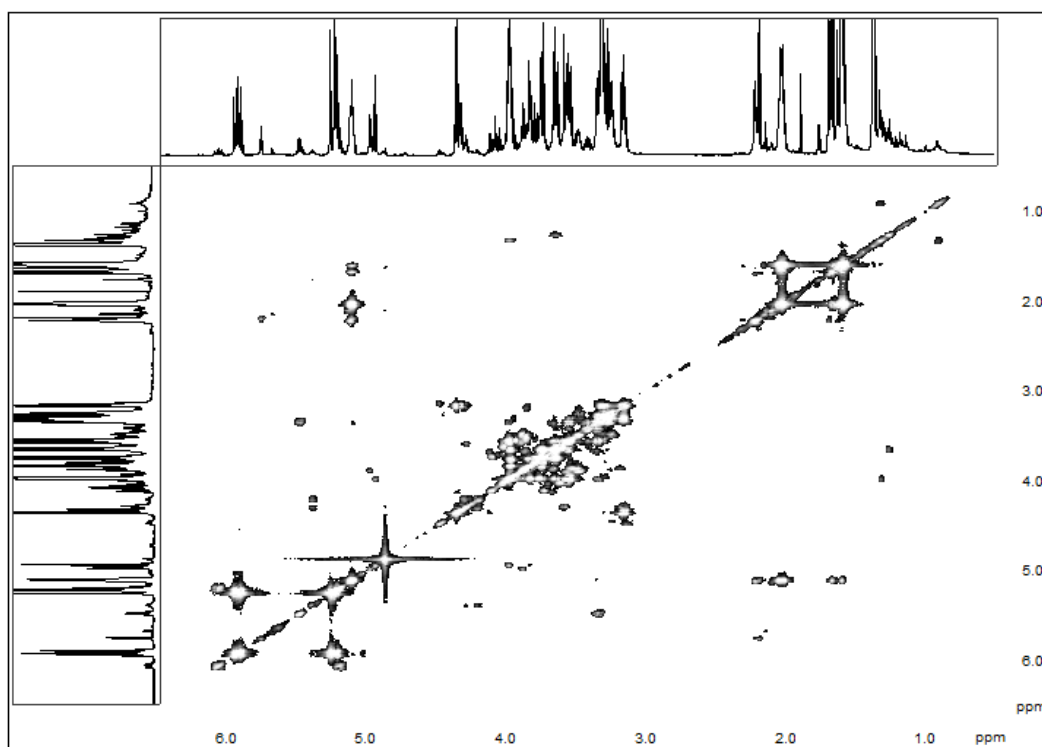


Figura A12 – COSY della Frazione 6

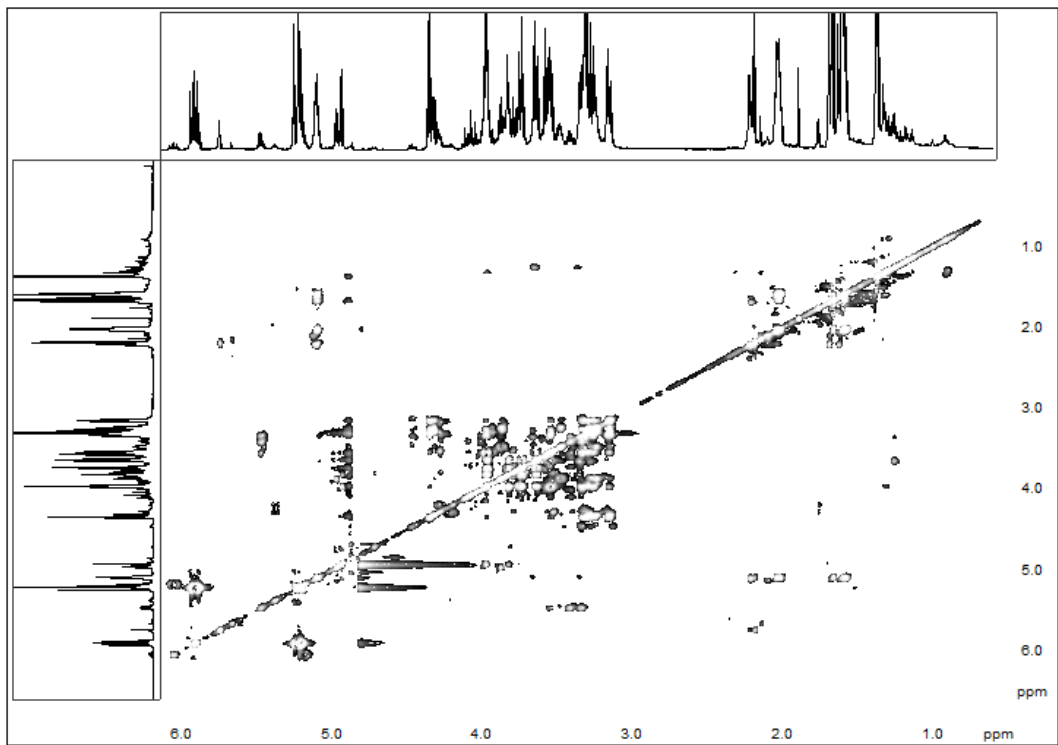


Figura A13 – TOCSY della Frazione 6

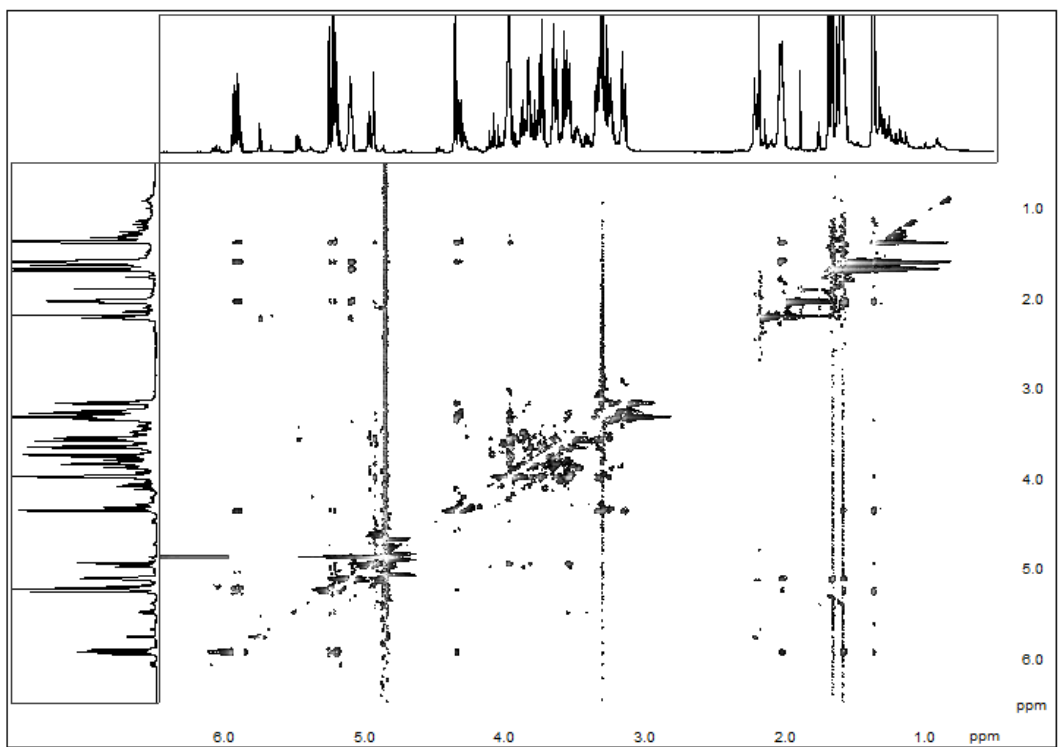


Figura A14 – NOESY della Frazione 6

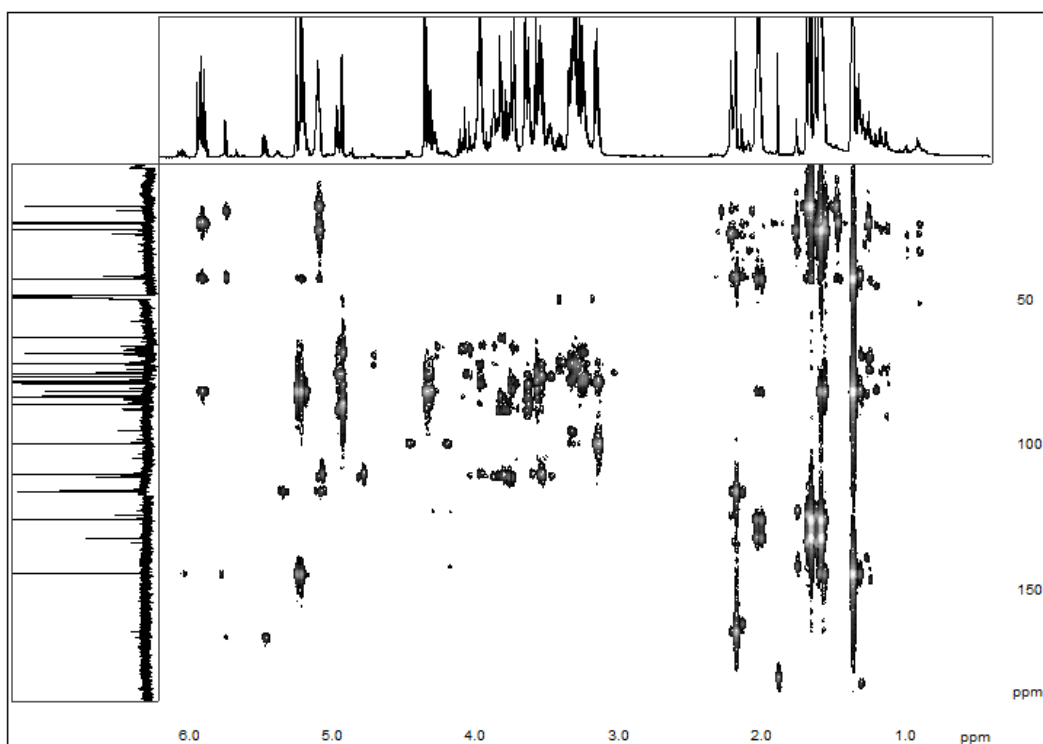


Figura A15 – HMBC della Frazione 6

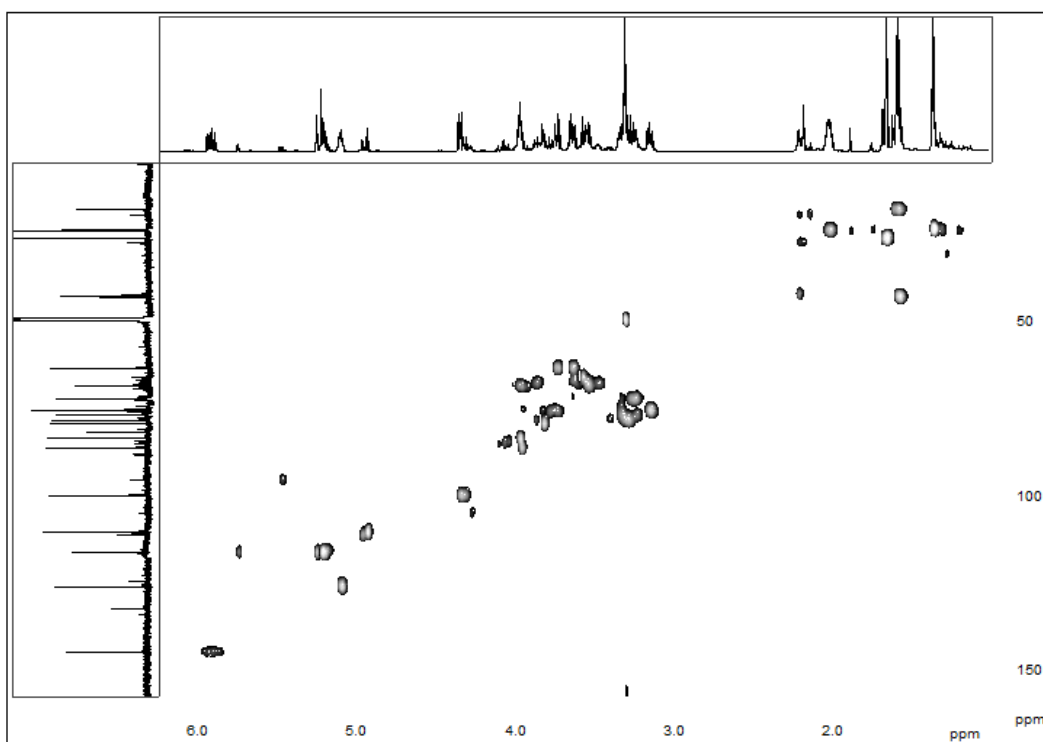


Figura A16 – HMQC della Frazione 6

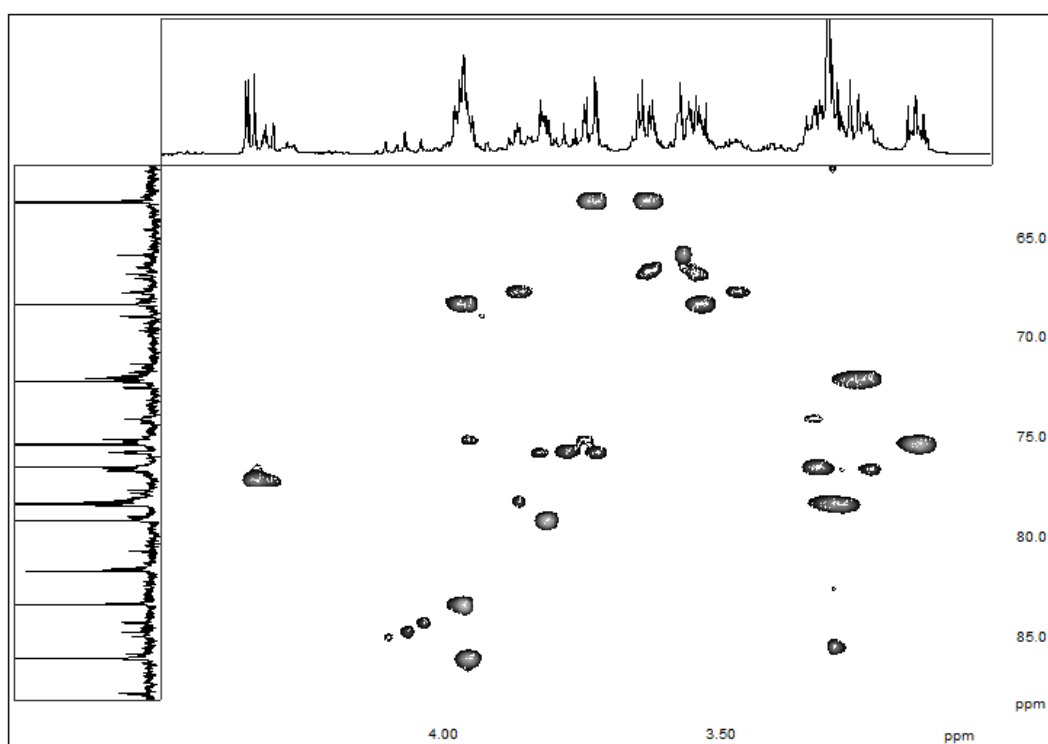


Figura A17 – HMQC foldato centrato a 70ppm della Frazione 6

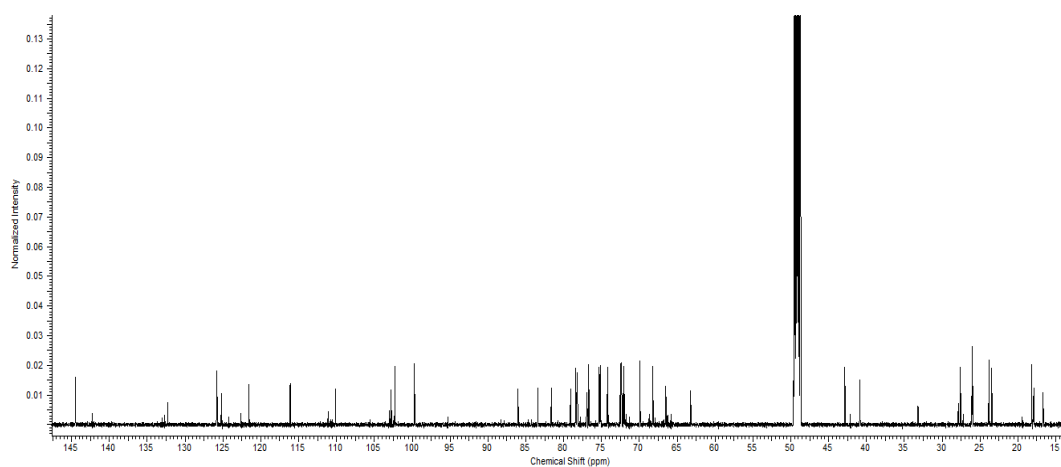


Figura A18 – ^{13}C 1D della Frazione 8

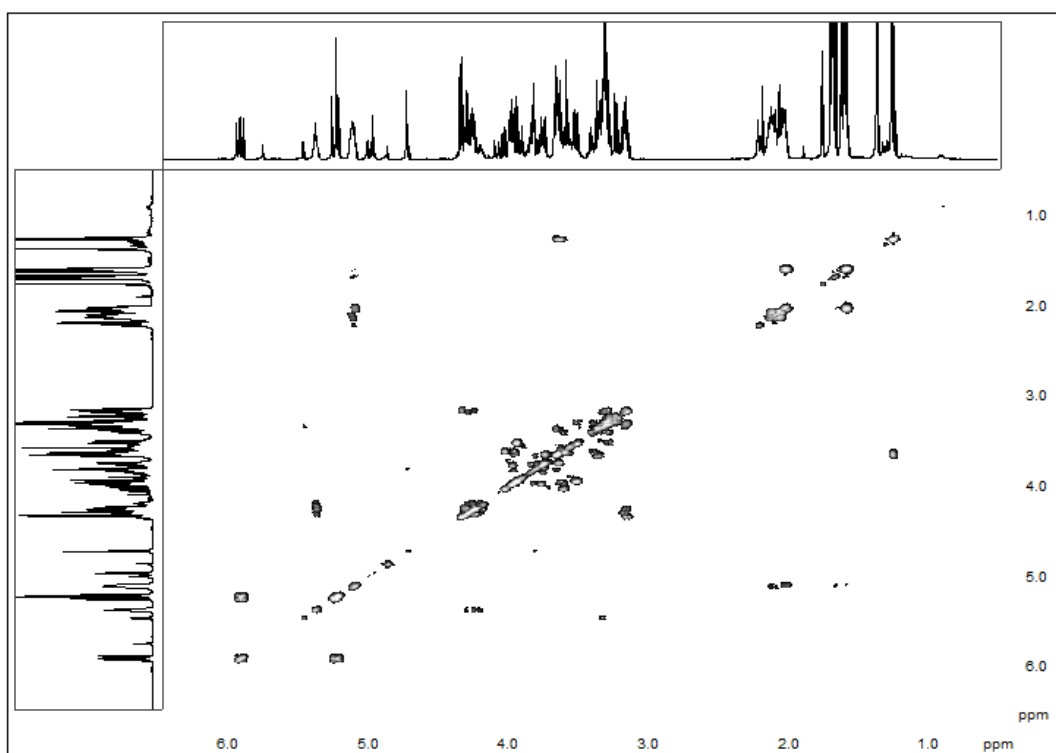


Figura A19 – COSY della Frazione 8

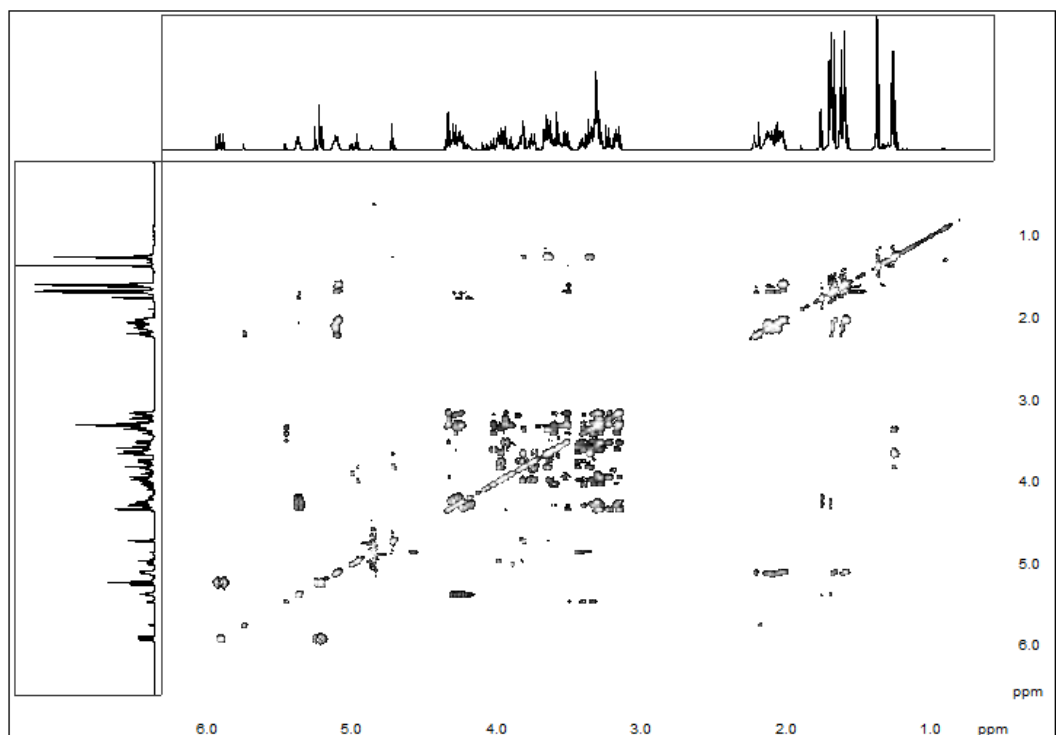


Figura A20 – TOCSY della Frazione 8

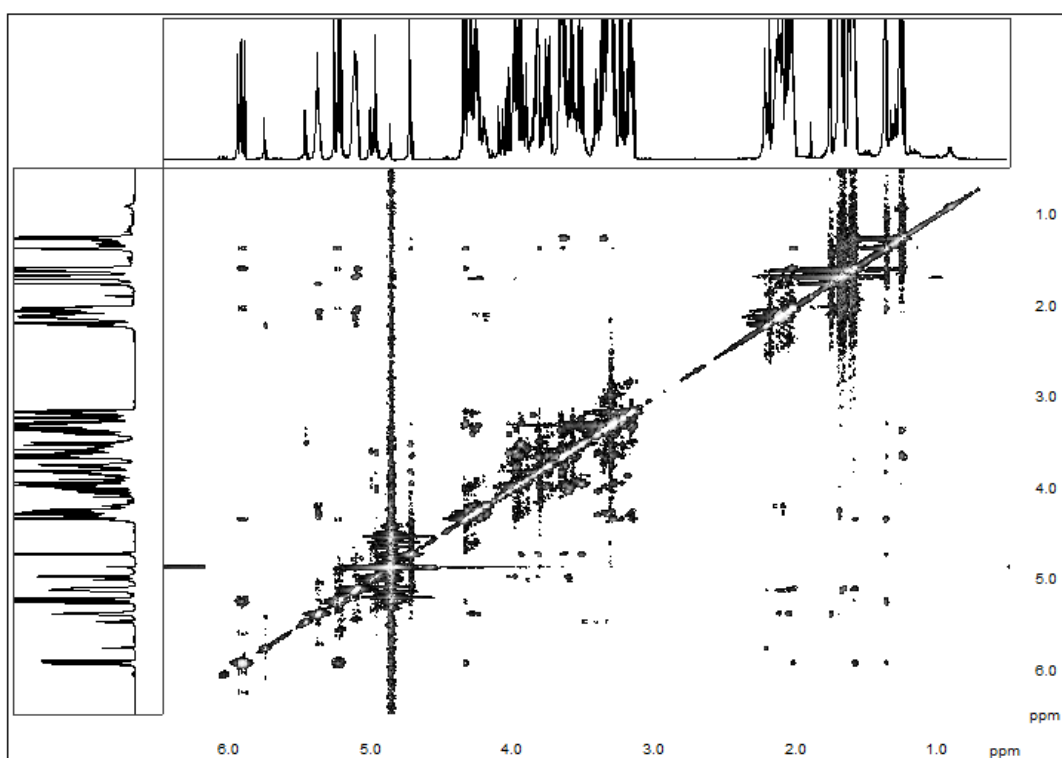


Figura A21 – NOESY della Frazione 8

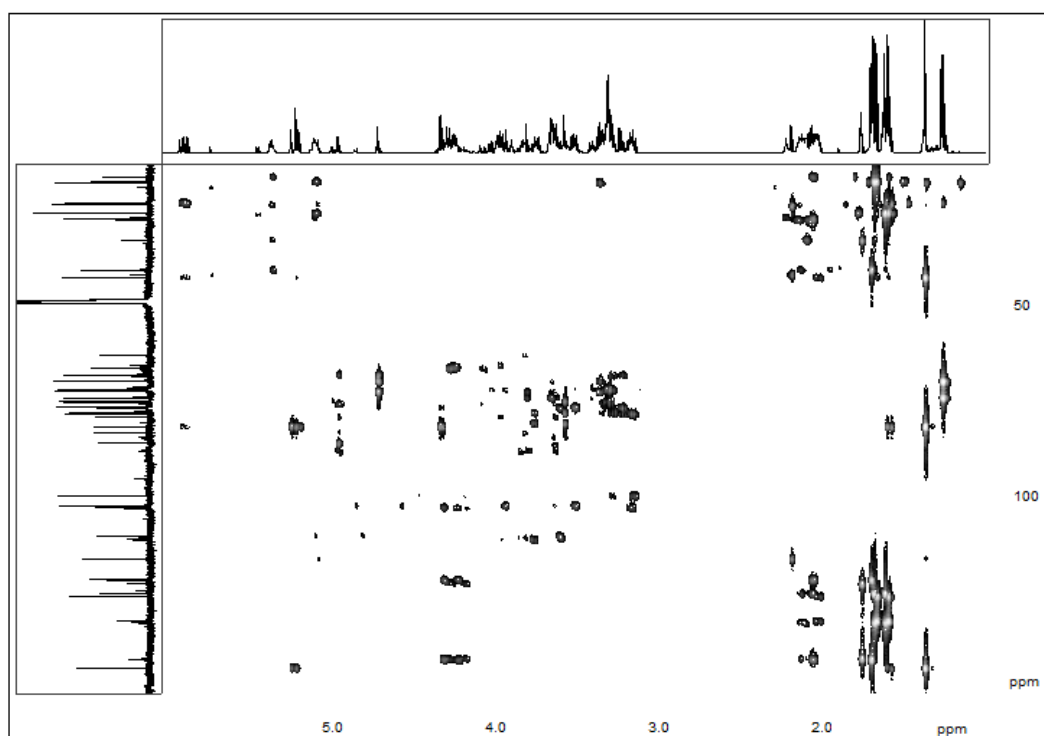


Figura A22 – HMBC della Frazione 8

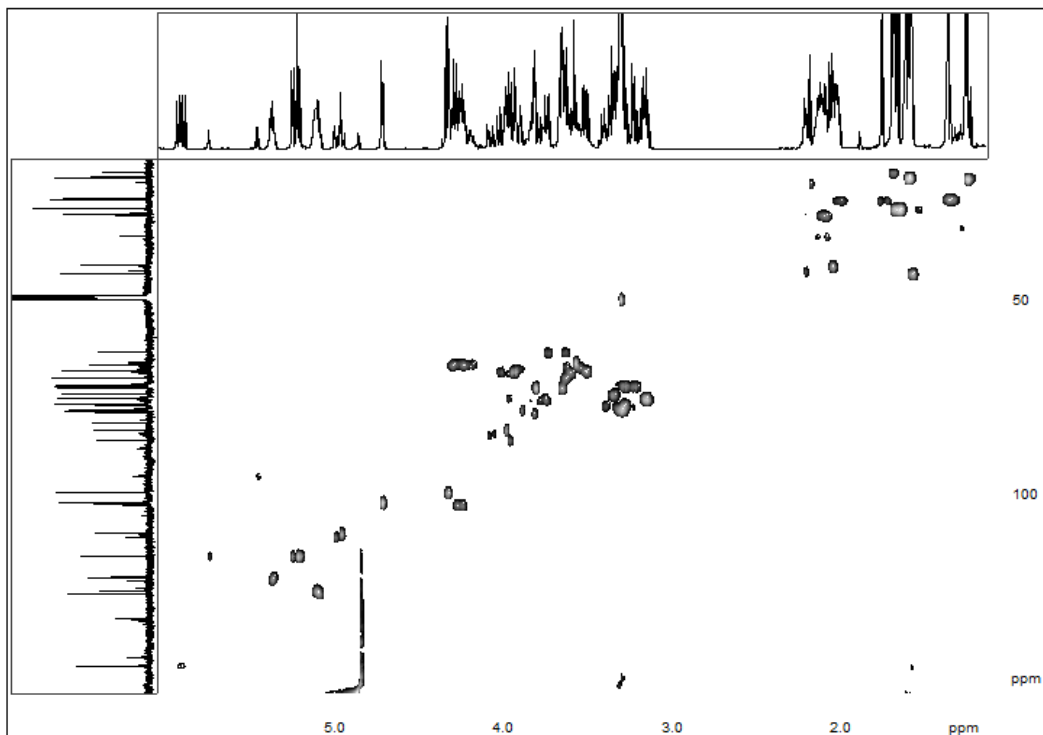


Figura A23 – HMQC della Frazione 8

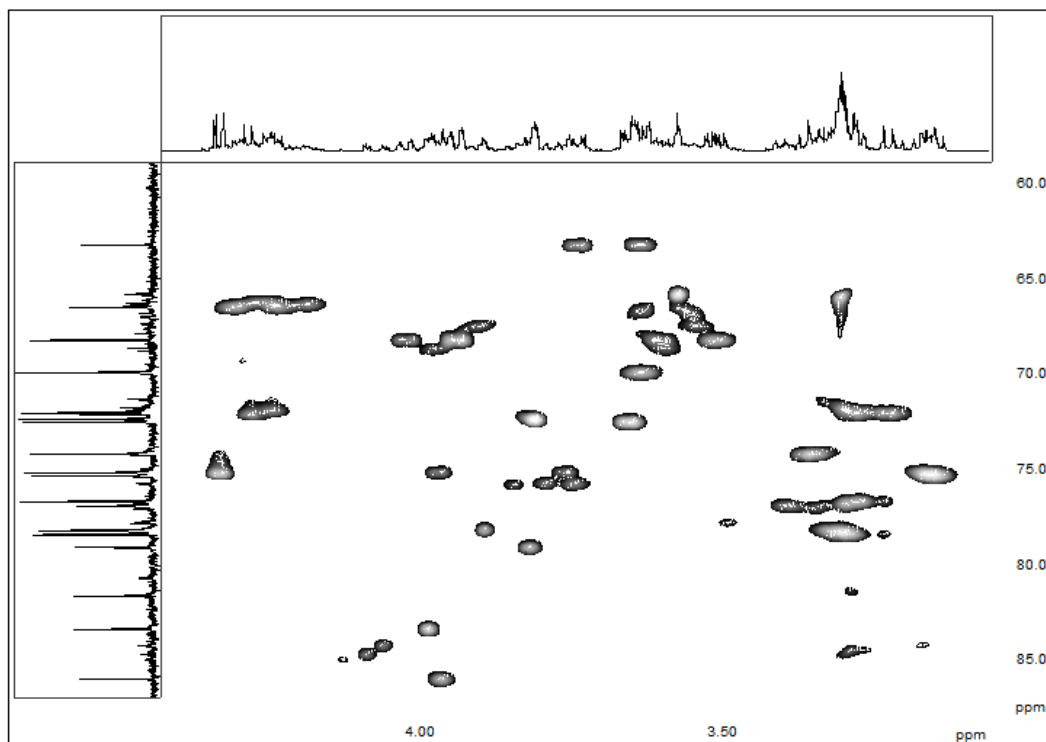


Figura A24 – HMQC foldato centrato a 71ppm della Frazione 8

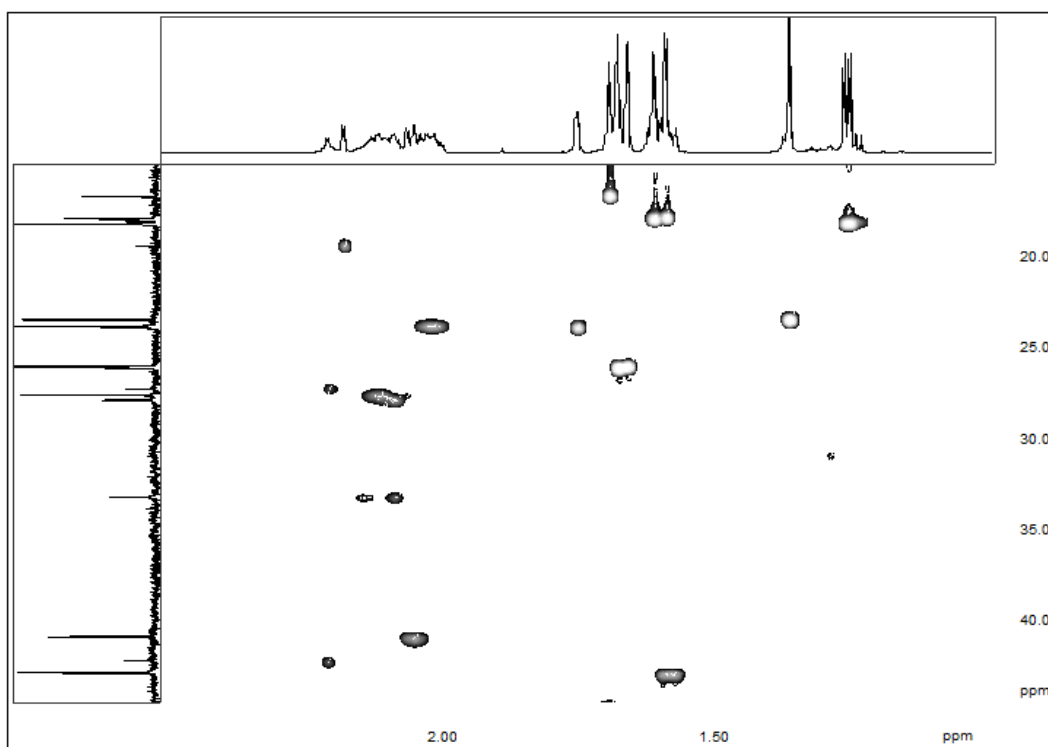


Figura A25 – HMQC foldato centrato a 28ppm della Frazione 8

Bibliografia

- AA. VV., *Preferred IUPAC Names*, **10**, (2004)
- Baderschneider B. and Winterhalter P., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2788-2798, (2001)
- Baek H.H. and Cadwallader K.R., *Journal Of Food Science*, **64/3**, (1999)
- Baltenweck-Guyot R. et alia, *Phytochemistry*, **43/3**, 621-624, (1996)
- Brillouet J. et alia, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 910-912, (1989)
- Bubb W.A., *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, **19A/1**, 1-19, (2003)
- Canet D., *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **30**, 101 (1997)
- Claridge T.D.W., “*High-Resolution NMR techniques in Organic Chemistry*”, prima edizione (1999)
- De Souza L.M. et alia, *Journal of Chromatography A*, **1207**, 101-109, (2008)
- Demyttenaere J.C.R. and Willemen H.M., *Phytochemistry*, **47/6**, 1029-1036, (1998)
- Derome E.A., “*Modern NMR Techniques for Chemistry Research*”, prima edizione (1987)
- Duquesnoy E., Castola V., Casanova J., *Carbohydrate Research*, **343**, 893-902, (2008)
- Günter H., “*NMR SPECTROSCOPY Based principles, concepts and application in chemistry*”, seconda edizione (1995)
- Harvey D.J., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **11**, 900-915, (2000)
- Kay L. E., *Current Biology Lett.*, **5**, 674 (1995)
- Khomenko T.M. et alia, *Russian Journal of Organic Chemistry*, **38/4**, 498-506, (2002)
- Kosir I. et alia, *Analisis*, **26**, 97-101, (1998)

- Luan F. et alia, *Analytica Chimica Acta*, **563**, 353-364, (2006)
- Marais J., *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **4/2**, (1983)
- Marinos V.A. et alia, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2486-2492, (1994)
- Mateo J.J. et alia, *Journal of Chromatography A*, **778**, 219-224, (1997)
- Matich A.J. et alia, *Phytochemistry*, **72**, 579-586, (2011)
- Menegazzo I., *Tesi di dottorato in Scienze Farmaceutiche*, (2003)
- Nasi A. et alia, *Food Chemistry*, **110**, 762-768, (2008)
- Oliveira J.M. et alia, *Analytica Chimica Acta*, **513**, 269-275, (2004)
- Panighel A., *Tesi di dottorato in Biotecnologie Agrarie*, (2005)
- Pisarnitskii A.F., *Applied Biochemistry and Microbiology*, **37/6**, 552-560, (2001)
- Sánchez Palomo E. et alia, *Food Chemistry*, **95**, 279-289, (2006)
- Sattler M. et alia, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **34**, 93 (1999)
- Sejer Pedersen D. et alia, *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 517-522, (2003)
- Skouroumounis G.K. et alia, *J. Agric. food Chem.*, **43**, 974-980, (1995)
- Vliegthar J., et alia, *NMR Spectroscopy and Computer Modeling of Carbohydrates*, **1**, (2006)
- Waterhouse A. L., *Wine phenolics (Ann. NY Acad. Sci.)*, **957**, 21-36, (2002)
- Weckerle B. et alia, *Eur. Food. Res. Technol.*, **216**, 6-10, (2003)
- Williams P.J. et alia, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1219-1223, (1982)

Ringraziamenti

Alla mia mamma, per esserci sempre stata, per l'incoraggiamento, per la soddisfazione, per aver tentato di capirci qualcosa di chimica fisica là dove io per primo stentavo a capire le dozzine di simboli strani, per avermi incitato sempre a proseguire e per mille altri motivi: GRAZIE. Ti voglio bene.

Mille grazie a Elisabetta Schievano, per avermi nuovamente accolto, accudito e sopportato durante questo periodo con rinnovata gentilezza e disponibilità.

Grazie ad Andrea, per aver condiviso con me il banco e per essere un amico prezioso, che ha saputo rendere divertenti questi cinque anni passati assieme ed è stato (e sarà!) uno strepitoso compagno di laboratorio e di mille avventure.

Un grazie enorme a papà, Ivo, Gaia, Luca, Alessandro e Valentina, le persone a cui voglio più bene al mondo, per tutto ciò che sempre fanno per me.

Grazie, grazie, grazie a tutti gli amici che hanno condiviso con me questi cinque anni di vita, dentro e fuori l'università, e che mi auguro continueranno a sopportarmi anche in tutti gli anni a venire.

Un sincero ringraziamento a tutti i collaboratori che hanno mi hanno supportato durante la stesura di questo elaborato, in particolare Elisa Morelato, Chiara Facchin, Emmanuel Ndoum, Manuel Boniolo, Mattia Sturlese, l'onnipresente Ileana Menegazzo, la gentilissima Gabriella Favaro e il carissimo Massimo Bellanda.

Infine, vorrei ringraziare chi, in un modo o nell'altro, mi è stato vicino in questi anni di università, che oggi mi sembrano volati in un soffio.

Ivan