

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
της Μπαλαμώτη Χριστίνας

"Μικροσυστατικά σε ελληνικά βότανα και αφεψήματα"



Επιβλέπων Καθηγητής:
Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Τριμελής Επιτροπή:
Ανδρικόπουλος Νικόλαος
Χίου Αντωνία
Κατσιφέρης Θεοφάνης

Αθήνα, Ιούνιος 2004

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
της Μπαλαμώτη Χριστίνας

**"Μικροσυστατικά σε
ελληνικά βότανα και αφεψήματα"**

Επιβλέπων Καθηγητής:
Ανδρικόπουλος Νικόλαος

Τριμελής Επιτροπή:
Ανδρικόπουλος Νικόλαος
Χίου Αντωνία
Κατσιφέρης Θεοφάνης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο	14
A.1. Χημεία φυσικών αντιοξειδωτικών.....	14
A.1.1. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών	14
A.1.2. Αντιοξειδωτικά	15
A. 1.2.1. Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών	16
A.1.2.2. Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών ουσιών	17
Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά	17
Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά	17
Ενώσεις με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση	18
Άλλοι παρεμποδιστές οξείδωσης λιπιδίων	19
A.1.3. Αντιοξειδωτικά στο τσάι	19
Φλαβανόλες.....	20
Φλαβονόλες.....	21
Θεαφλαβίνες και Θεαρουμπιγίνες	23
A.1.3.1. Επίδραση της προετοιμασίας του τσαγιού στην αντιοξειδωτική ικανότητα ...	25
A.1.3.2. Επίδραση των αντιοξειδωτικών του τσαγιού στις διάφορες ελεύθερες ρίζες	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο	28
A.2. Πηγές πολυφαινολών.....	28
A.2.1. Αφεψήματα	28
A.2.1.1. Τσάι.....	28
A.2.1.2. Άλλα αφεψήματα	29
A.2.1.3. Σοκολάτα	31
A.2.1.4. Καφές	32
A.2.2. Φρούτα και λαχανικά.....	32
A.2.3. Ελαιόλαδο	36
A.2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο	36

A.2.4. Αλκοολούχα.....	37
A.2.4.1. Κρασί.....	37
A.2.4.2. Μπύρα	37
A.2.5. Όσπρια	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο	39
A.3. Αντιοξειδωτικά και Υγεία	39
A.3.1. Αντιοξειδωτικά και καρκίνος.....	39
A.3.1.1. Μηχανισμοί καρκινογένεσης.....	39
A.3.1.2. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού	40
A.3.1.3. Καρκίνος δέρματος	41
A.3.1.4. Καρκίνος πνευμόνων.....	41
A.3.1.5. Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος και άλλες μορφές καρκίνου	42
Έναρξη	43
Προώθηση.....	43
Εξάπλωση	43
A.3.2. Αντιοξειδωτικά και καρδιαγγειακά νοσήματα	44
A.3.2.1. Υπέρταση	45
A.3.3. Προστατευτικές επιδράσεις του τσαγιού σε άλλες ασθένειες	46
A.3.3.1. Νεφρικές παθήσεις.....	46
A.3.3.2. Διαβήτης.....	46
A.3.3.3. Προστασία δέρματος και οφθαλμών	46
A.3.3.4. Αντιισταμινικές και αντιαρθρικές επιδράσεις του τσαγιού	47
A.3.3.5. Αντιβακτηριακές επιδράσεις του τσαγιού.....	47
A.3.3.6. Επιδράσεις του τσαγιού σε οδοντικά προβλήματα	48
A.3.3.7. Επιδράσεις του τσαγιού κατά των ιών	48
A.3.3.8. Μεταβολικές επιδράσεις του τσαγιού	48
A.3.3.9. Νευρολογικές και φυσιολογικές επιδράσεις τσαγιού	49
A.3.4. Χρήση τσαγιού ως πρόσθετο τροφίμων	49
A.3.5. Αντιοξειδωτικά και ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ).....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο	51
A.4. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών.....	51
A.4.1. Διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών	51
A.4.2. Πέψη πολυφαινολών	51
A.4.3. Απορρόφηση πολυφαινολών.....	52
A.4.4. Μεταβολισμός.....	55

A.4.5. Απόκριση	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο	58
A.5. Ανάλυση των πολυφαινολών των αφεψημάτων	58
A.5.1. Μέθοδοι ανάλυσης πολυφαινολών	58
A.5.2. Συνοπτική παρουσίαση μελετών	61
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	71
B.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών	71
B.1.1. Όργανα / Υλικά	71
B.1.2. Αντιδραστήρια	71
B.1.3. Εκτέλεση	72
B.1.4. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών για την ανάλυση με χρωματογραφία HPLC.	74
B.1.5. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών για την ανάλυση με χρωματογραφία GC/ MS.	76
B.2. Παρασκευή προτύπων μιγμάτων πολυφαινολών για την ανάλυση με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE, Solid Phase Extraction)	77
B.2.1. Όργανα / Υλικά	77
B.2.2. Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια	77
B.2.3. Εκτέλεση	78
B.3. Μελέτη της ανάκτησης πολυφαινολών με εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	81
B.3.1. Όργανα / Υλικά	81
B.3.2. Αντιδραστήρια	81
B.3.3. Εκτέλεση	82
B.4. Πειραματική πορεία για την εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	84
B.4.1. Όργανα / Υλικά	84
B.4.2. Αντιδραστήρια	84
B.4.3. Εφαρμογή της μεθόδου SPE	84
B.5. Επαναληπτική διαδικασία ανάκτησης πολυφαινολών από πρότυπα δείγματα.	86
B.5.1. Όργανα / Υλικά	86
B.5.2. Αντιδραστήρια	86
B.5.3. Εκτέλεση	86
B.6. Προετοιμασία των 8 προτύπων δειγμάτων επανάλυσης (μητρικά HPLC)	89
B.6.1. Όργανα / Υλικά	89
B.6.2. Αντιδραστήρια	89

B.6.3. Εκτέλεση	89
B.7. Προετοιμασία των 2 προτύπων δειγμάτων επανάληψης (μητρικά GC/ MS)	91
B.7.1. Όργανα / Υαλικά	91
B.7.2. Αντιδραστήρια	91
B.7.3. Εκτέλεση	91
B.8. Ανάλυση αφεψημάτων βοτάνων με τη μέθοδο SPE.....	93
B.8.1. Όργανα / Υαλικά	93
B.8.2. Αντιδραστήρια	93
B.8.3. Προετοιμασία βοτάνων	94
B.8.4. Εφαρμογή της μεθόδου SPE στα δείγματα από αφεψήματα βοτάνων και ξήρανση	94
B.8.5. Επανάληψη της μεθόδου SPE και της ξήρανσης σε 12 δείγματα από αφεψήματα βοτάνων	95
B.9. Ανάλυση των προτύπων δειγμάτων και των δειγμάτων από αφεψήματα βοτάνων με HPLC και GC/MS.....	96
B.9.1 Όργανα / Υλικά	96
B.9.2. Αντιδραστήρια	96
B.9.3. Εκτέλεση	96
B.10. Αποτελέσματα	100
B.10.1. Χρόνοι κατακράτησης και εμβαδό επιφάνειας κορυφής των πολυφαινολών στα πρότυπα διαλύματα με τη μέθοδο HPLC.....	100
B.10.2. Ανακτήσεις πολυφαινολών από τα πρότυπα διαλύματα	101
B.10.3. Προσδιορισθείσες ποσότητες πολυφαινολών στα αφεψήματα βοτάνων με τη μέθοδο SPE.....	104
B.10.4. Ποσότητες πολυφαινολών στα αφεψήματα βοτάνων με τη μέθοδο SPE βάσει της ανάκτησης	110
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	120

*Στους γονείς μου
Δημήτρη και Ελένη*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2003 – 2004 από την Μπαλαμώτη Χριστίνα, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ), τμήμα Εφαρμοσμένης Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας Τροφίμων, με θέμα "Μικροσυστατικά σε ελληνικά βότανα και αφεψήματα".

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε μία σειρά ανθρώπων, χωρίς τη βοήθεια των οποίων θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Ευχαριστώ θερμά τον κ. Νικόλαο Κ. Ανδρικόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Διαιτολογίας – Διατροφής για την ανάθεση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης. Η συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης ήταν διπλή, αφού εκτός από την πολύτιμη καθοδήγηση, προσέφερε και την αμέριστη βοήθειά του για την πραγμάτωση της σε κάθε στιγμή που τη χρειάστηκε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στη Δρ. Αντωνία Χίου, Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 για την οργάνωση του πειραματικού σκέλους, για τις εύστοχες υποδείξεις της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της μελέτης καθώς επίσης και για τη συνεισφορά της στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας. Ουσιαστικές και εύστοχες ήταν και οι παρεμβάσεις της κατά τη συγγραφή του θεωρητικού τμήματος.

Καταλυτική υπήρξε επίσης η βοήθεια της Δρ. Νατάσας Μυλωνά όσον αφορά στην ανάλυση των δειγμάτων της πειραματικής διαδικασίας και στην εφαρμογή εφαρμογή ορισμένων πειραματικών μεθόδων.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τον Δρ. Θεοφάνη Κατσιφέρη για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις του κατά τη συγγραφή του θεωρητικού σκέλους και για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης αυτής της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαργαρίτα Χρηστέα για τις κατατοπιστικές πληροφορίες όσον αφορά στα διάφορα σκευάσματα και σκεύη του Χημικού Εργαστηρίου και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για τη συνεργασία του.

Μπαλαμώτη Χριστίνα
Φοιτήτρια Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής
Αθήνα, Ιούνιος 2004

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον των τελευταίων ετών για μια κατηγορία ουσιών με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, τις πολυφαινόλες, έχει επιφέρει μια σειρά ανακαλύψεων σχετικά με το ρόλο αυτών των ουσιών στην υγεία του ανθρώπου. Ωστόσο, οι ακριβείς ποσότητες πρόσληψης των πολυφαινολών παραμένουν αδιευκρίνιστες. Τροχοπέδη αποτελούν οι ελλιπείς επιστημονικές γνώσεις όσον αφορά στην περιεκτικότητα των ίδιων των αφεψημάτων σε πολυφαινόλες, καθώς και η δυσκολία προσδιορισμού τους σε αφεψήματα βοτάνων, λόγω της έλλειψης μιας αντίστοιχης τυποποιημένης μεθόδου.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι να συμβάλλει στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας προσδιορισμού των πολυφαινολών σε αφεψήματα διαφόρων βοτάνων της ελληνικής υπαίθρου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών στα αφεψήματα, θα μπορούσε να επιτελέσει σημαντικό ρόλο στην εκπόνηση άλλων ερευνητικών και επιδημιολογικών μελετών, για τη διερεύνηση της ακριβούς αντιοξειδωτικής και βιολογικής δράσης των πολυφαινολών στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ενδιαφέρον για το ρόλο των αντιοξειδωτικών ενώσεων στην υγεία του ανθρώπου έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και η κατανάλωσή τους, κυρίως ως συμπληρώματα διατροφής, έχει παρουσιάσει σημαντική αύξηση. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη αναφέρεται η χημεία των αντιοξειδωτικών ουσιών, οι μηχανισμοί δράσης καθώς επίσης και οι πηγές τους. Ακόμη, αναφέρονται επιδημιολογικά και πειραματικά στοιχεία τα οποία οδηγούν στην άποψη της προστατευτικής δράσεως τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες στον καρκίνο, στα καρδιαγγειακά νοσήματα καθώς και σε πληθώρα άλλων παθήσεων. Συνοπτικά παρατίθενται παθοφυσιολογικά στοιχεία αναφορικά με τη δημιουργία και εξέλιξη των παθήσεων αυτών. Ακόμη περιγράφονται – στο βαθμό που είναι αυτό εφικτό με τις ως τώρα επιστημονικές γνώσεις – η πέψη, απορρόφηση, ο μεταβολισμός στο σώμα και η απέκκριση των πολυφαινολών του τσαγιού. Τέλος, παρατίθενται τα αποτελέσματα μελετών σχετικά με τις περιεχόμενες πολυφαινόλες σε διάφορα είδη βοτάνων. Η συγγραφή του θεωρητικού μέρους βασίστηκε σε μια εκτεταμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφεται αναλυτικά όλη η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών από αφεψήματα βοτάνων της ελληνικής υπαίθρου και σχολιάζονται κριτικά τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν πολυπρότυπα διαλύματα πολυφαινολών στα τα οποία έγινε ανάκτηση των πολυφαινολών με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE). Με τον τρόπο αυτό βλέπουμε το βαθμό ανάκτησης κάθε πολυφαινόλης με τη μέθοδο SPE. Εν συνεχεία παρασκευάστηκαν αφεψήματα από 12 διαφορετικά βότανα της ελληνικής υπαίθρου στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος SPE. Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των πολυφαινολών έγινε με HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) με ανιχνευτή UV (DAD)/FLD και με Τριχοειδή Αέρια Χρωματογραφία (CGC) με ανιχνευτή φασματοσκοπίας μάζας MSD (TIC).

ABSTRACT

The interest for the effects of antioxidants in human health has been dramatically increased within the last few years. In the same time, their consumption tends to be incremental. In the current thesis, the chemistry of antioxidants as well as their mechanisms of action and their sources are being discussed. Moreover, there are quoted epidemiological and experimental data, which confirm the protective effect of rich in antioxidants foods against cancer, coronary heart disease and other pathologies. Pathophysiological data concerning the onset and progression of these pathologies are briefly cited. Furthermore, there are described – in the degree that current scientific knowledge permits it – the digestion, absorption, metabolism and excretion of phenolic components of tea. Finally, there are cited results from various scientific studies concerning the polyphenol content of different herb species. The writing of the theoretical part resulted from a scrupulous literature review.

At the experimental part there is an analytical description of the whole experimental procedure that was enforced for the determination of polyphenols in beverages from greek herbs and the results are being critically annotated. More specifically, we created standard solutions of polyphenols in which we enforced solid phase extraction (SPE). In this way we saw the recapture degree of each polyphenol. Furthermore, we created beverages from 12 different greek herbs in which we enforced SPE. Polyphenol analysis, quantitative and qualitative, was carried out with HPLC (High Performance Liquid Chromatography) using UV (DAD)/FLD detector and with Capillary Gas Chromatography (CGC) using mass spectroscopy MSD (TIC) detector.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γεγονός ότι η πρόοδος που έχει σημειώσει η επιστήμη τα τελευταία χρόνια, έχει οδηγήσει σε αύξηση του μέσου όρου ζωής. Παράλληλα όμως, ως απόρροια του αυξημένου προσδόκιμου επιβίωσης, υπάρχει και μια σχετική αύξηση σε νοσήματα που εμφανίζονται σε μεταγενέστερα στάδια της ζωής μας, όπως είναι ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Για παράδειγμα, πάνω από το 60% των θανάτων σε άνδρες ηλικίας 55 έως 64 ετών αποδίδεται στην ύπαρξη καρκίνου, ενώ για άνδρες ηλικίας έως και 35 ετών το αντίστοιχο ποσοστό είναι 10%. Επιδημιολογικά στοιχεία αναφέρουν ότι η συστηματική κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης νοσημάτων φθοράς. Παρόλα αυτά, δεν είναι πλήρως γνωστό ποια είναι εκείνα τα συστατικά των φυτικών τροφίμων που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου και ποιος είναι ο μηχανισμός δράσης τους. Προστατευτικές ιδιότητες έχουν αποδοθεί σε διάφορα φυτοχημικά όπως είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, το σελήνιο, τα φυτο-οιστρογόνα κα. Παρά την τρέχουσα επιστημονική αβεβαιότητα που επικρατεί, μία μεγάλη ποικιλία προϊόντων πλούσιων σε φυτοχημικά είναι διαθέσιμα στο εμπόριο, τα οποία προωθούνται επικαλώντας τις προληπτικές και θεραπευτικές τους ιδιότητες.

Πρόσφατα το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε μία κατηγορία ενώσεων – τις πολυφαινόλες – που απαντώνται σε φυτικά προϊόντα, η κατανάλωση των οποίων έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία (Garry et al, 2003). Η μελέτη των πολυφαινολών ξεκίνησε το 1950 και μέχρι τις αρχές της επόμενης δεκαετίας ένα μεγάλο κομμάτι της χημείας των πολυφαινολών είχε γίνει γνωστό. Παρόλα αυτά, οι διαθέσιμες αναλυτικές τεχνικές και γνώσεις της εποχής δεν επέτρεπαν μια ολοκληρωμένη προσέγγιση πάνω στο θέμα αυτό (Depeint *et al*, 2002). Μόλις το 1976 αναλύθηκε η ποσότητα των πολυφαινολών στα τρόφιμα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), ενώ αρκετά αργότερα – το 1992 – μετρήθηκε το συνολικό περιεχόμενο σε αγλυκόνες από πέντε φλαβονόλες και φλαβόνες σε φρούτα και λαχανικά. Τον επόμενο χρόνο (1993) μετρήθηκε η ίδια παράμετρος και στα αφεψήματα (Vinson, 1999). Έκτοτε, έχουν αναγνωριστεί χιλιάδες διαφορετικά φλαβονοειδή και συνεχώς απομονώνονται καινούργια. Η τελειοποίηση των τεχνικών παραλαβής των πολυφαινολών από τις φυσικές τους πηγές αποτελεί μια σύγχρονη ερευνητική πρόκληση διότι αποτελεί σημαντικό βήμα για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους. Επιπλέον, παρέχεται η δυνατότητα *in vivo* μελέτης των αντιοξειδωτικών και εξαγωγής σημαντικών συμπερασμάτων για τις επιδράσεις των τελευταίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα *in vitro* πειράματα που έχουν αναφερθεί μέχρι

σήμερα αν και είναι αρκετά, περιορίζονται στην εξέταση συγκεκριμένων πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών κυρίως του ελαιολάδου και του τσαγιού (Κεϋλάνης). Για τα ελληνικά βότανα (αφεψήματα) δεν υπάρχουν αξιόλογες δημοσιεύσεις. Η μελέτη λοιπών των πολυφαινολών από αφεψήματα ελληνικών βοτάνων – που αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσης διατριβής – αναμένεται να εμπλουτίσει σημαντικά τις επιστημονικές γνώσεις στον τομέα αυτό και μπορεί ενδεχομένως να αποτελέσει έναυσμα για τη διεξαγωγή περαιτέρω μελετών, ώστε να μπορέσουν τα αντιοξειδωτικά να χρησιμοποιηθούν στην πρόληψη ή αντιμετώπιση πλήθους ασθενειών. Επίσης είναι πιθανή η αξιοποίηση των εκχυλισμάτων πολυφαινολών από τα ελληνικά βότανα από φαρμακευτικές εταιρείες.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

A.1. Χημεία φυσικών αντιοξειδωτικών

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες που εμποδίζουν τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την επιβλαβή δράση των τελευταίων (Krause, 2000).

Σύμφωνα με την υπόθεση των ελευθέρων ριζών, οι σχετιζόμενες με την ηλικία αλλαγές συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της αδυναμίας του οργανισμού να ανταπεξέλθει στο οξειδωτικό στρες που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της ζωής. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών σε βάρος των δεύτερων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκαλούνται οξειδωτικές βλάβες σε μόρια όπως το DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες. Επίσης, επί μακράν προσβολή ενός οργάνου από ελεύθερες ρίζες, το οποίο είναι ήδη ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες, παρατηρούνται οργανικές δυσλειτουργίες. Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να αυξηθούν από εξωμεταβολικές (π.χ. μόλυνση, ακτινοβολία, τοξίνες κ.τ.λ.) ή ενδομεταβολικές πηγές. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι αυτές που οδηγούν στη δημιουργία (O_2^-) από μεταφορά ηλεκτρονίων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες. Για τη μετατροπή του οξυγόνου σε νερό απαιτείται μεταφορά ηλεκτρονίων. Κατά τις αντιδράσεις αυτές παράγονται (HO_2) (υδροϋπεροξειδία), (H_2O_2) (υπεροξειδίο του υδρογόνου) και (OH^*) (ρίζα υδροξυλίου) που είναι το πιο δραστικό προ-οξειδωτικό. Άλλες κυτταρικές πηγές ελευθέρων ριζών είναι το ηπατικό μικρόσωμα και οι πυρηνικές μεμβράνες οι οποίες περιέχουν συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων που μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες (Prior and Cao, 1999).

A.1.1. Μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών

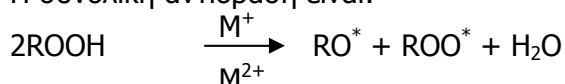
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή χημικής ένωσης που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης ("ελεύθερης") ύπαρξης και μπορεί να περιέχει ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια.

Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες, είναι ασταθείς ενώσεις, οι οποίες οξειδώνουν ένα συγκεκριμένο μόριο στόχο, κυρίως μακρομόριο. Ο μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών στηρίζεται στην ακόλουθη αρχή: Πρώτα, δημιουργείται με κάποιο τρόπο η ελεύθερη ρίζα

που αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα (έναρξη). Η προέλευση των ριζών που στη συνέχεια προκαλούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις αποτελεί έναν από τους πιο ενδιαφέροντες τομείς έρευνας. Η δημιουργία ελευθέρων ριζών πιθανόν να οφείλεται και σε μοριακό μηχανισμό από το οξυγόνο απλής διηγερμένης κατάστασης (singlet oxygen). Το τελευταίο σχηματίζεται με τη βοήθεια του φωτός παρουσία ενός φωτοευαίσθητοποιητή π.χ. χλωροφύλλης. Κατά τη μετάπτωση του οξυγόνου στην απλή διηγερμένη κατάσταση σχηματίζονται υδροϋπεροξειδία και συνεχίζεται η αντίδραση με το μηχανισμό των ελευθέρων ριζών. Επίσης, κάποια μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός προκαλούν το σχηματισμό νέων ριζών κι έτσι δρουν ως προοξειδωτικά.



Η συνολική αντίδραση είναι:



Από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών με μη ριζικά μόρια προκύπτουν νέες ελεύθερες ρίζες (διάδοση). Έτσι, με αυτόν τον τρόπο οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών τείνουν να είναι αλυσιδωτές δημιουργώντας συνεχώς νέα άτομα ή ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η αντίδραση θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν πλέον νέες ελεύθερες ρίζες.

Η αλληλουχία των αντιδράσεων μπορεί να παρασταθεί σχηματικώς ως εξής:

Έναρξη R^* (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση $R^* + O_2 \longrightarrow ROO^*$ (ρίζα υπεροξειδίου)

Τερματισμός $R^* + R^* \longrightarrow R-R$

$ROO^* + R^* \longrightarrow ROOR$

$ROO^* + ROO^* \longrightarrow ROOR + O_2$ (αδρανή προϊόντα που δεν προκαλούν
έναρξη ή διάδοση της αντίδρασης)

Με βάση τον ανωτέρω μηχανισμό πιστεύεται ότι επιτελείται η αυτοοξειδωση των λιπών και των ελαίων, δηλαδή η αντίδρασή τους με το οξυγόνο (Μπόσκου, 1997; Zhu *et al*, 2001).

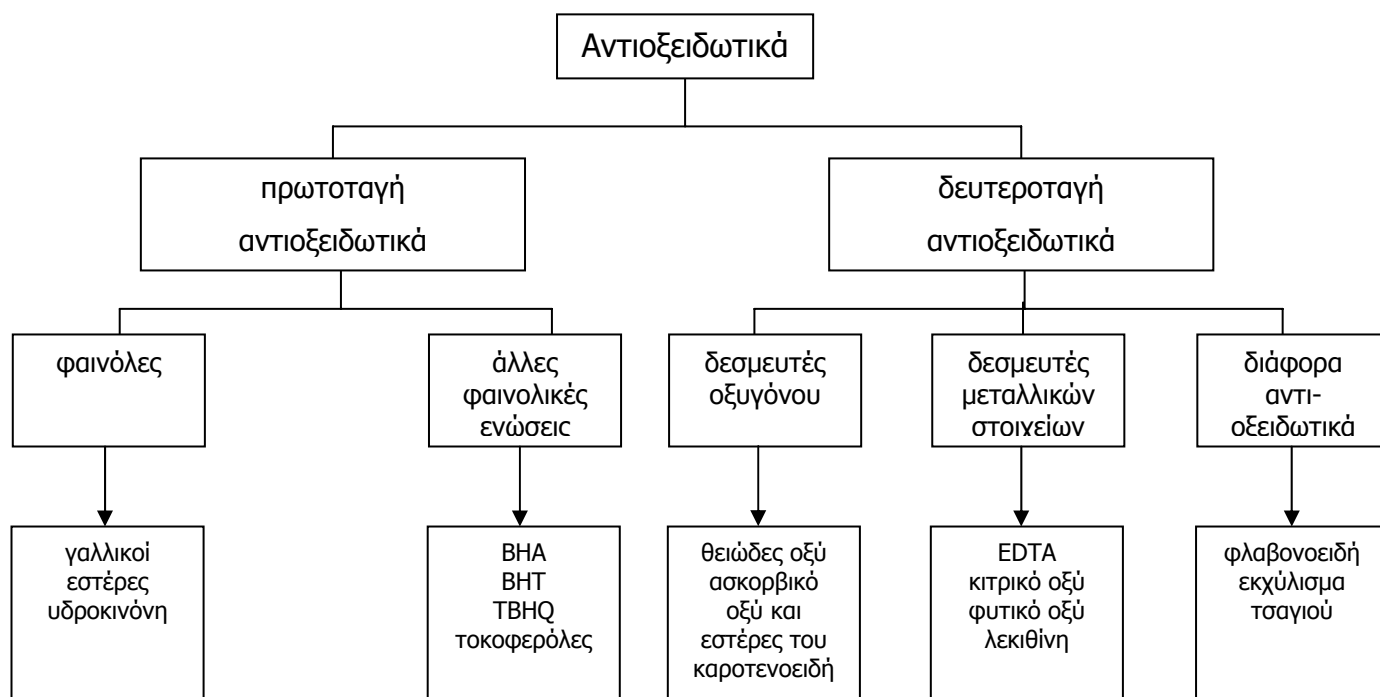
A.1.2. Αντιοξειδωτικά

Μια συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται για την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπών που περιέχονται στα λιπαρά τρόφιμα είναι η προσθήκη αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων προστατεύοντας τα από τη φθορά, την τάγγιση ή τον αποχρωματισμό που μπορεί να λάβει χώρα κατά την οξείδωση. Τα αντιοξειδωτικά δεν μπορούν να αντιστρέψουν την οξείδωση των ήδη ταγγισμένων ελαίων, ούτε είναι αποτελεσματικά έναντι της υδρολυτικής τάγγισης δηλαδή της ενζυματικά καταλυόμενης υδρόλυσης των λιπαρών ουσιών (Μπόσκου, 1997; http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_1.htm, 2001).

Ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες:

- Να είναι αποτελεσματικό σε πολύ μικρή περιεκτικότητα.
- Να μην έχει καμία βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου.
- Να μην προσδίδει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση.
- Να είναι έστω και ελάχιστα λιποδιαλυτό.
- Να είναι όσο γίνεται σταθερό στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου (Μπόσκου, 1997).

A. 1.2.1. Κατάταξη αντιοξειδωτικών ουσιών



A.1.2.2. Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών ουσιών

Πρωτοταγή αντιοξειδωτικά

Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά διακόπτουν τις αντιδράσεις διάδοσης των ελευθέρων ριζών παρέχοντας άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες.

Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται φαινολικές ενώσεις όπως ΒΗΑ (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), ΤΒΗQ (δι-τριπ.-βούτυλο-υδροκινόννη), ΡG (προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος), τοκοφερόλες, καφεϊκό οξύ, καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ κ.ά.

Οι τοκοφερόλες ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά. Τέσσερα ομόλογα είναι γνωστά – η α, β, γ και δ-τοκοφερόλη – που η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αυξάνεται από το α-ομόλογο προς το δ, εν αντιθέσει με τη βιταμινική τους δράση που ελαττώνεται κατά την ίδια σειρά.

Οι τοκοφερόλες δρουν ως βιολογικά αντιοξειδωτικά, δηλαδή προστατεύουν βιολογικά συστήματα όπως κύτταρα ή όργανα από βλάβες οι οποίες προκαλούνται από την έκθεση τους σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού στρες (Γάλαρης και Δούλιας, 2001).

Όσον αφορά στα φαινολικά αντιοξειδωτικά αυτά εμφανίζουν αυξημένη δράση όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Το φαινόμενο αυτό λέγεται συνέργεια ή συνεργισμός (Μπόσκου, 1997).

Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά

Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως αντιοξειδωτικά με την ευρύτερη έννοια του όρου.

Τα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά μπορεί να δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου, δηλαδή αντιδρούν με το οξυγόνο και ελαττώνουν τη συγκέντρωση του σε ένα κλειστό σύστημα. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του καθώς και τοθειώδες οξύ και τα άλατά του αλλά και τα καροτενοειδή.

Το ασκορβικό οξύ ως αναγωγικό μέσο μεταφέρει άτομα υδρογόνου στις κινόνες που σχηματίζονται κατά την ενζυμική αμαύρωση φαινολικών ουσιών και αυτό παρέχει μια προστασία στις πρόσφατα κομμένες επιφάνειες των φρούτων και λαχανικών. Επίσης, το ασκορβικό οξύ πιστεύεται ότι με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα αναγεννά τα φαινολικά αντιοξειδωτικά παρέχοντας υδρογόνο στις φαινοξυ ρίζες (A^*) κι έτσι έχει μια έμμεση αντιοξειδωτική δράση.

Το θειώδες οξύ και τα άλατα του αντιδρούν εύκολα με το οξυγόνο και παρέχουν μια σχετική προστασία στα αποξηραμένα φρούτα και λαχανικά.

Τα καροτενοειδή δρουν καταστέλλοντας το οξυγόνο απλής διεγερμένης κατάστασης (singlet oxygen) δηλαδή δρουν ως αποσβέστες διεγερμένου οξυγόνου.

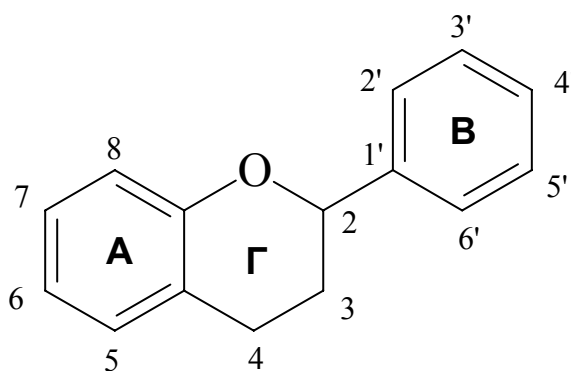
Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των δευτερογενών αντιοξειδωτικών είναι η δέσμευση μετάλλων τα οποία με μεταφορά ηλεκτρονίου δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Σ' αυτή την κατηγορία εντάσσονται οξέα ή παράγωγά τους που σχηματίζουν χημικές ενώσεις όπως EDTA, κιτρικό οξύ, φυτικό οξύ, λεκιθίνη.

Το EDTA και το κιτρικό οξύ σχηματίζουν χημικές ενώσεις με τα μέταλλα, κυρίως το σίδηρο και το χαλκό, τα οποία προκαλούν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. ενότητα Α.1.1.)

Ενώσεις με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση

Μια κατηγορία ενώσεων με ποικίλη αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή αποτελούν φαινολικά συστατικά των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι εμποδίζουν την υπεροξείδωση των λιπών, δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και το ενεργό οξυγόνο, δεσμεύουν ιόντα σιδήρου και απενεργοποιούν την λιποξυγενάση. Η βασική δομή των φλαβονοειδών φαίνεται στο σχήμα 1.

Μια άλλη κατηγορία ενώσεων είναι οι τανίνες οι οποίες περιλαμβάνουν τις κατεχίνες, τις λευκοανθοκυανίνες και ορισμένα υδροξυοξέα. Η κατεχίνη και η κερκετίνη έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιούν το λαρδί (Μπόσκου, 1997; http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_1.htm, 2001).



Σχήμα 1. Βασική δομή φλαβονοειδών

Άλλοι παρεμποδιστές οξειδωσης λιπιδίων

Υπάρχουν ορισμένα ένζυμα που απομακρύνουν τα ενεργά είδη οξυγόνου κι έτσι παρεμποδίζουν την οξειδωση των λιπιδίων. Εδώ ανήκουν η δισμουτάση σουπεροξειδίου, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης, η οξειδάση γλυκόζης και η καταλάση.

Μια άλλη κατηγορία παρεμποδιστών είναι η μεθυλοσιλικόνη και οι στερόλες με αιθυλιδενική πλευρική αλυσίδα οι οποίες εμποδίζουν τον οξειδωτικό πολυμερισμό σε θερμαινόμενα έλαια. Εδώ εντάσσονται τα πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο και η Δ^5 -αβεναστερόλη – κιτροσταδιενόλη.

Τέλος, υπάρχουν αντιοξειδωτικά με πολλαπλή ή μη πλήρως γνωστή δράση που παρεμποδίζουν την οξειδωση των λιπιδίων όπως είναι τα φωσφολιπίδια και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard.

A.1.3. Αντιοξειδωτικά στο τσάι

Το τσάι είναι το δεύτερο σε κατανάλωση αφέψημα ανά τον κόσμο μετά το νερό. Το τσάι σε αντίθεση με το νερό περιέχει οργανικά συστατικά ορισμένα εκ των οποίων φαίνεται ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία οι οποίες ήταν γνωστές στους κινέζικους πολιτισμούς από το 3000 π.Χ. (Beecher *et al*, 1999).

Το τσάι παράγεται από τα τρυφερά φύλλα δύο ποικιλιών του φυτού *Camellia sinensis: assamica και sinensis*. Υπάρχουν διάφορα είδη τσαγιού τα οποία κατατάσσονται σε 3 κυρίως τύπους: πράσινο τσάι (δεν έχει υποστεί ζύμωση), oolong (ημιζυμωμένο) και μαύρο τσάι (πλήρως ζυμωμένο).

Κατά την παραγωγή του πράσινου τσαγιού γίνεται απενεργοποίηση των ενζύμων είτε με τροφοδοσία φωτιάς είτε με ατμό. Το μαύρο τσάι παράγεται με καταλυτική οξειδωση των κατεχινών από μια οξειδάση πολυφαινόλων. Έτσι, οι κατεχίνες μετατρέπονται σε πιο πολύπλοκα μόρια τα οποία προσδίδουν στο μαύρο τσάι το τυπικό χρώμα και τη δυνατή γεύση. Στην περίπτωση του τσαγιού oolong τα φύλλα θερμαίνονται ελαφρώς κι έτσι γίνεται μερική ζύμωση με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά του να είναι μεταξύ πράσινου και μαύρου τσαγιού (Wang *et al*, 2000; Sava *et al*, 2001).

Το τσάι περιέχει φλαβονοειδή. Τα τελευταία είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και χωρίζονται σε έξι υποκατηγορίες: φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες και ανθοκυανίνες ανάλογα με την δομή του ετεροκυκλικού δακτυλίου οξυγόνου (δακτύλιος –C). Οι κύριες τάξεις φλαβονοειδών που απαντώνται στο τσάι είναι οι φλαβανόλες και οι φλαβονόλες.

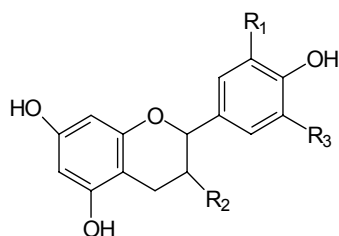
Φλαβανόλες

Οι κατεχίνες είναι δομικά φλαβανόλες οι οποίες αποτελούν το 20% του ξηρού βάρους του πράσινου τσαγιού, ενώ οι φλαβονόλες αποτελούν το 2-3% των υδατοδιαλυτών στερεών του τσαγιού (Wang *et al*, 2001). Οι κυριότερες κατεχίνες στα φρέσκα φύλλα τσαγιού και στο πράσινο τσάι είναι: (-) – εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), (-) – επιγαλλοκατεχίνη (EGC), (-) – εστέρας επικατεχίνης (ECG) και (-) – επικατεχίνη (EC). Η δομή των κυριότερων κατεχινών φαίνεται στο σχήμα 2.

Οι κατεχίνες είναι άχρωμα, υδατοδιαλυτά συστατικά που προσδίδουν στο πράσινο τσάι την πικρή και στυφή γεύση. Όλα τα χαρακτηριστικά του τσαγιού συμπεριλαμβανομένων της γεύσης, του χρώματος και του αρώματος, σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τροποποιήσεις των κατεχινών.

Έτσι, για παράδειγμα, μείωση στις περιεχόμενες κατεχίνες σχετίζεται με αύξηση της περιεκτικότητας σε μονοτερπενικές αλκοόλες κατά την παρασκευή μαύρου τσαγιού, γεγονός που βελτιώνει την αρωματική ποιότητα του τσαγιού.

Επιμερισμός των κατεχινών, δηλαδή μετατροπή στις ισομερείς τους μορφές μπορεί να συμβεί κατά την παραγωγή, το βράσιμο ή την αποθήκευση του τσαγιού. Μάλιστα σημαντικό ρόλο παίζει όχι μόνο η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος θέρμανσης του τσαγιού (Wang and Helliwell, 2000).



(+)-κατεχίνη και (-)-επικατεχίνη

R_{1,2}: OH, R₃: H

(-)-γαλλοκατεχίνη ή επιγαλλοκατεχίνη

R_{1,2,3}: OH

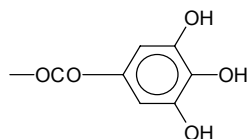
(-)-3-γαλλικός εστέρας της κατεχίνης ή επικατεχίνης

R₁: OH, R₃: H, R₂: G

(-)-3-γαλλικός εστέρας της γαλλοκατεχίνης ή επιγαλλοκατεχίνης

R₁: OH, R₃: OH, R₂: G

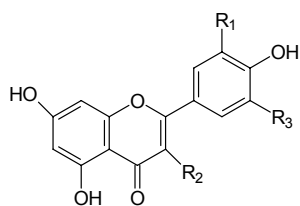
Όπου G:



Σχήμα 2. Δομή φλαβανολών

Φλαβονόλες

Οι κύριες φλαβονόλες στα φύλλα του τσαγιού είναι η κερκετίνη, η καιμπφερόλη και η μυρισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται κυρίως με τη μορφή γλυκοζιδίων παρά ως αγλυκόνες (μη γλυκοζυλιωμένες μορφές). Έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 14 γλυκοζίτες μυρισετίνης, κερσετίνης και καιμπφερόλης στο τσάι. Το γλυκό μέρος αποτελείται είτε από γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη ή φρουκτόζη. Μόνο-, δι- και τρι-γλυκοζίτες έχουν αναγνωρισθεί. Οι αγλυκόνες δεν απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες στα αφεψήματα τσαγιού διότι διαλύονται ελάχιστα στο νερό. Η δομή των φλαβονολών φαίνεται στο σχήμα 3 (Wang *et al*, 2000).



Απιγενίνη
R_{1,2,3}: H

Κερκετίνη
R_{1,2}: OH, R₃: H

Καιμπφερόλη
R₂: OH, R_{1,3}: H

Μυρσετίνη
R_{1,2,3}: OH

Σχήμα 3. Δομή φλαβονολών

Το περιεχόμενο σε φλαβονόλες των φύλλων του πράσινου και μαύρου τσαγιού φαίνεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Περιεχόμενες φλαβονόλες στα φύλλα του πράσινου και μαύρου τσαγιού (g/Kg ξηρού βάρους) (Wang, 2000)

Φλαβονόλες	Πράσινο τσάι	Μαύρο τσάι
Μυρσετίνη	0,83 – 1,59	0,24 – 0,52
Κερκετίνη	1,79 – 4,05	1,04 – 3,03
Καιμπφερόλη	1,56 – 3,31	1,72 – 2,31

Στον πίνακα 2 φαίνεται το περιεχόμενο κατεχινών και φλαβονολών σε τρία διαφορετικά αφεψήματα τσαγιού.

Πίνακας 2. Περιεχόμενο κατεχινών και φλαβονολών σε αφεψήματα τσαγιού (mg/Lt) (Wang *et al*, 2000)

Αφέψημα	1ο	2ο	3°	Σύνολο
<u>Κατεχίνες</u>				
(+) – GC	30,0	18,7	3,80	52,5
(-) – EGC	228	131	37,2	396,2
(+) – C	10,4	5,9	0,9	17,2
(-) – EGCG	306	223	2,3	531,3
(-) – EG	52,8	28,1	6,3	87,2
(-) – CGC	10,0	9,6	μη ανιχνεύσιμη	19,6
(-) – CG	76,8	52,0	0,5	129,3
<u>Φλαβονόλες</u>				
Μυρισετίνη	6,4	4,2	2,7	13,3
Κερκετίνη	23,9	15,9	10,0	49,8
Καιμπφερόλη	9,0	6,5	3,5	19,0
1° αφέψημα: 1gr σκόνης από φύλλα τσαγιού αναμίχθηκε με 100ml βραστό νερό για 5min και 70ml υγρού φιλτραρίστηκαν και αφέθηκαν να κρυώσουν μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου κάτω από τρέχον νερό. 2° αφέψημα: προστέθηκαν άλλα 70ml βραστού νερού στα φύλλα τσαγιού για 5min και φιλτραρίστηκαν 70ml υγρού τα οποία αφέθηκαν να κρυώσουν μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου κάτω από τρέχον νερό. 3° αφέψημα: ως άνω.				

Με βάση τα στοιχεία του πίνακα 2 παρατηρείται μείωση του περιεχομένου των πολυφαινολών καθώς πηγαίνουμε από το πρώτο στο τρίτο αφέψημα.

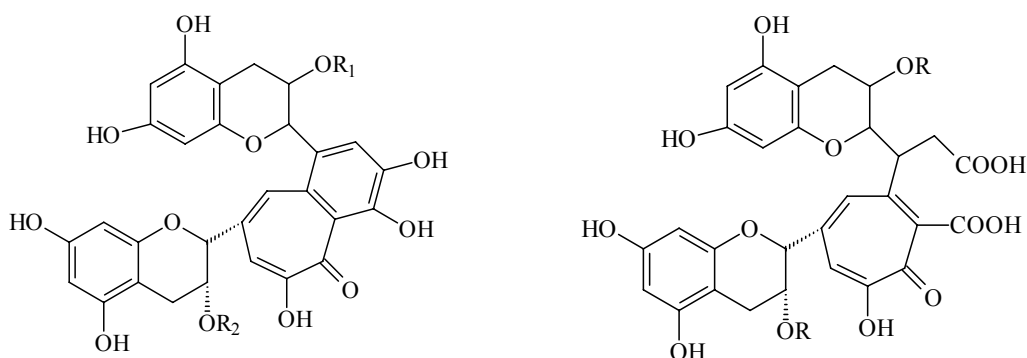
Θεαφλαβίνες και Θεαρουμπιγίνες

Κατά την παρασκευή μαύρου τσαγιού, οι κατεχίνες μπορεί να οξειδωθούν προς σχηματισμό του τυπικού χρώματος και γεύσης του μαύρου τσαγιού. Οι χρωστικές του μαύρου τσαγιού διακρίνονται στις πορτοκαλόχρωμες θεαφλαβίνες (TFs) και στις καφετί θεαρουμπιγίνες (TRs). Υπάρχουν 4 κύριες TFs στο μαύρο τσάι – θεαφλαβίνη, 3-γαλλική θεαφλαβίνη, 3'-γαλλική θεαφλαβίνη – οι οποίες σχηματίζονται κατά την αντίδραση κινονών

και γαλλοκατεχίνης. Η περιεκτικότητα του τσαγιού σε TFs αυξάνει όταν η εκχύλιση γίνεται σε χαμηλό pH (Liang and Xu, 2001).

Οι TRs είναι ένα ετερογενές γκρουπ φαινολικών χρωστικών. Το περιεχόμενο του μαύρου τσαγιού σε TFs είναι 0,3-2% επί του ξηρού βάρους, ενώ το κλάσμα των TRs αποτελεί το 10-20% του ξηρού βάρους του μαύρου τσαγιού. Οι TFs και TRs συντελούν στον καθορισμό των χαρακτηριστικών του τσαγιού όπως είναι το χρώμα, η ένταση και το σώμα (Wang, 2000).

Η δομή των θεαφλαβινών και θεαρουμπιγινών του μαύρου τσαγιού φαίνεται στο σχήμα 4.



Θεαφλαβίνες (TFs)

θεαφλαβίνη (TF-1)

R1,2: H

3-γαλλικός εστέρας της θεαφλαβίνης (TF-2α)

R1: G, R2: H

3'-γαλλικός εστέρας της θεαφλαβίνης (TF-2β)

R1: H, R2: G

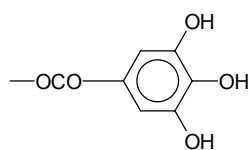
3,3'-διγαλλικός εστέρας της θεαφλαβίνης (TF-3)

R1: G, R2: G

Θεαρουμπιγίνες

R= G

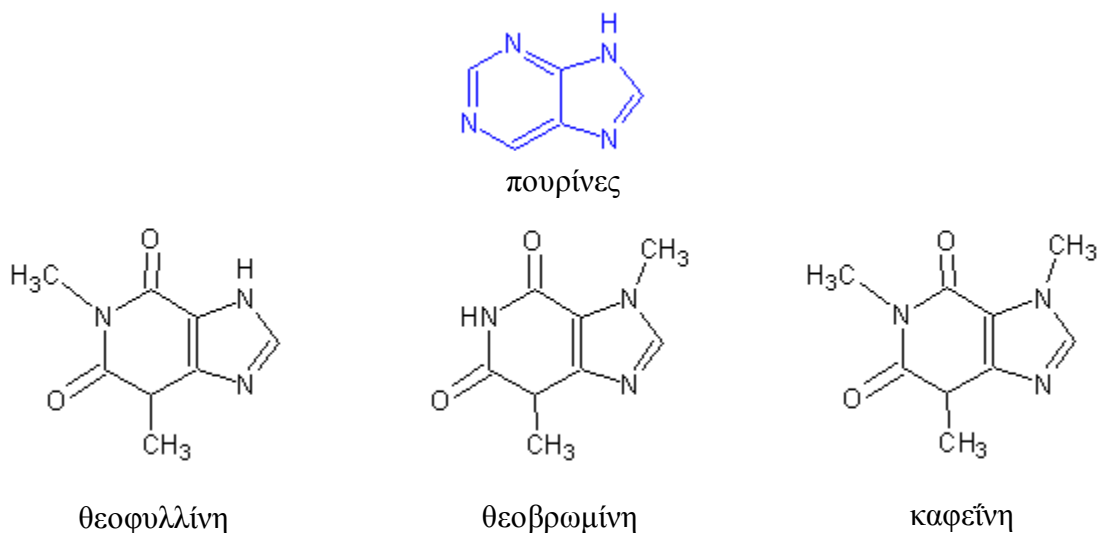
Όπου G:



Σχήμα 4. Δομή θεαφλαβινών και θεαρουμπιγινών μαύρου τσαγιού

Αλκαλοειδή

Το τσάι, καθώς επίσης ο καφές και το κακάο, περιέχουν αλκαλοειδή. Τα κυριότερα αλκαλοειδή –που περιέχουν δακτύλιο ξανθίνης- είναι η καφεΐνη, η θεοφυλλίνη και η θεοβρωμίνη, οι δομές των οποίων φαίνονται στο σχήμα 5 (Ανδρικόπουλος, 1998).



Σχήμα 5. Δομή αλκαλοειδών

A.1.3.1. Επίδραση της προετοιμασίας του τσαγιού στην αντιοξειδωτική ικανότητα

Σε μία εργασία του Langley – Evans (2000) μελετήθηκε η επίδραση της προετοιμασίας σε πράσινο τσάι, σε τσάι από φύλλα μαύρου τσαγιού και σε μαύρο τσάι σε φακελάκια. Τόσο το πράσινο, όσο και το μαύρο τσάι βρέθηκε ότι απελευθερώνουν σημαντικά ποσά αντιοξειδωτικών ουσιών στο ζεστό νερό μετά από 2 λεπτά βράσιμο. Η προετοιμασία του τσαγιού σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 20 έως 90° C έδειξε ότι παρόλο που απελευθερώνονταν πιο πολλά αντιοξειδωτικά στα πιο κρύα αφεψήματα, η αύξηση της θερμοκρασίας ίσως αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το μαύρο τσάι σε φακελάκια εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με το τσάι από τα φύλλα μαύρου τσαγιού σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 70° C. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το υλικό από το οποίο κατασκευάζονται τα φακελάκια ίσως εμποδίζει την εκχύλιση των φλαβονοειδών στο διάλυμα του τσαγιού. Η προσθήκη γάλατος στο τσάι φαίνεται ότι εξαλείφει την αντιοξειδωτική ικανότητα του μαύρου τσαγιού. Η επίδραση αυτή ήταν μεγαλύτερη όταν χρησιμοποιούνταν πλήρες αγελαδινό γάλα και φαίνεται ότι σχετίζεται με το περιεχόμενο λίπος του γάλατος που προστίθεται. Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα και άρα το μέγιστο όφελος για την υγεία επιτεύχθηκε όταν πράσινο

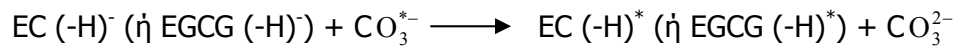
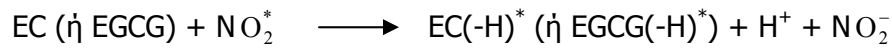
τσάι ή τσάι από φύλλα μαύρου τσαγιού προετοιμάστηκε στους 90° C για 2min και καταναλώθηκε είτε με άπαχο γάλα είτε χωρίς καθόλου γάλα.

Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Stach and Schmitz, 2001), με την αύξηση του χρόνου παραμονής του πράσινου τσαγιού μετά την παρασκευή, μειώνονταν το περιεχόμενο του σε κατεχίνες και καφεΐνη. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις των EGCG και EGC μειώθηκαν κατά 14% και 21% αντίστοιχα. Έτσι, η αποθήκευση του τσαγιού σε θερμός οδηγεί σε μείωση της αντιοξειδωτικής και αντικαρκινικής του ιδιότητας. Δεν υπήρχε σημαντική αλλαγή στις συγκεντρώσεις των ECG και EC, ενώ η ποσότητα της κατεχίνης (C) και της καφεΐνης αυξήθηκε με το χρόνο (53% και 48% αντίστοιχα, σε 60min). Λόγω της μικρής περιεκτικότητας των δειγμάτων τσαγιού σε C αυτή η αύξηση δεν ήταν σημαντική. Όσον αφορά στην αύξηση της καφεΐνης αυτή οφείλεται στη σταδιακή απελευθέρωση της καφεΐνης από τα σύμπλοκα της με πολυφαινόλες λόγω διάσπασης των συμπλόκων. Αυτός ίσως είναι και ο λόγος των διαφορετικών επιδράσεων ίδιας ποσότητας καφεΐνης που περιέχεται στον καφέ και στο τσάι. Η καφεΐνη στον καφέ δεν σχηματίζει σύμπλοκα με πολυφαινόλες και η εγρήγορση παρατηρείται αμέσως μετά την κατανάλωση. Στο τσάι αυτή η επίδραση επέρχεται πιο αργά αλλά διατηρείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

A.1.3.2. Επίδραση των αντιοξειδωτικών του τσαγιού στις διάφορες ελεύθερες ρίζες

Οι πολυφαινόλες του τσαγιού εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, ο EGCG μείωσε το ρυθμό έναρξης και παρέτεινε τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης της οξειδωσης που προκαλείτο από υπεροξειδική ρίζα σε ένα διφασικό μοντέλο (φωσφολιπιδιακό λιποσωμικό μοντέλο) *in vitro* (Hu and Kitts, 2001). Επίσης οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού EGCG και GGC αντιδρούν και παγιδεύουν τις υπεροξειδικές ρίζες που γεννώνται με θερμόλυση του 2,4-διμεθυλοβαλερονιτριλίου (AMVN) (Valcic *et al*, 2000; Caldwell, 2001).

Από την αντίδραση των EGCG και EGC με H₂O₂ προκύπτουν ορισμένα προϊόντα λόγω οξειδωσης και αποκαρβοξυλίωσης του Α-δακτυλίου στο μόριο των κατεχινών. Ενδεχομένως λοιπόν και ο Α-δακτύλιος να αποτελεί αντιοξειδωτική πλευρά (Zhu *et al*, 2000). Επιπροσθέτως, τα παράγωγα των πολυφαινολών (και κυρίως η EC και EGCG) έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικοί εκκαθαριστές της ρίζας του διοξειδίου του αζώτου (NO₂^{*}) και της ανθρακικής ρίζας (CO₃^{*}). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι:



(Miao *et al*, 2001)

Πρόσφατα, μια σχετικά σταθερή ρίζα η 2-2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κατεχινών. Η ικανότητα εκκαθάρισης της ρίζας DPPH από κατεχίνες ακολουθεί την εξής σειρά: EGCG>ECG>EGC>EC (Zhu *et al*, 2001). Η ίδια ρίζα (DPPH) χρησιμοποιήθηκε και για την αξιολόγηση της εκκαθαριστικής ικανότητας του ασκορβικού οξέος, της α-τοκοφερόλης, του γαλλικού αιθυλεστέρα και της κατεχίνης. Η σειρά που βρέθηκε είναι: ασκορβικό οξύ>α-τοκοφερόλη=γαλλικό αιθυλεστέρα> (+) – κατεχίνη (Sawai and Moon, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

A.2. Πηγές πολυφαινολών

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες μπορεί να υπάρχουν στα τρόφιμα είτε ως ενδογενείς παράγοντες, είτε ως πρόσθετα συντηρητικά (Shahidi, 2000).

Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην Τεχνολογία Συντήρησης Τροφίμων είναι:

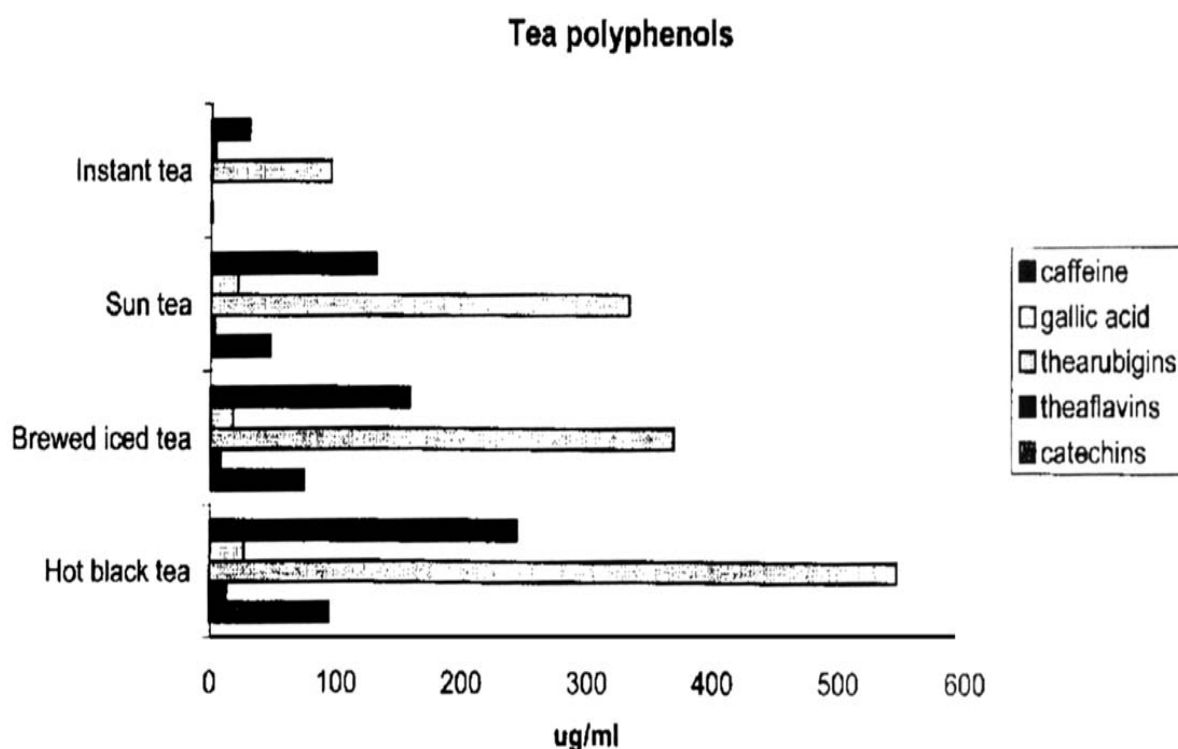
- α) Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA)
- β) Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT)
- γ) Εστέρες του γαλλικού οξέος όπως ο προπυλικός (PG), ο οκτυλικός και δωδεκυλικός
- δ) Η δι-τρι-βουτυλο-υδροκινόνη (TBHQ)

Παρόλα αυτά, για λόγους ασφαλείας έχει ενταθεί το ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιοξειδωτικά (Μπόσκου, 1997; Shahidi, 2000).

A.2.1. Αφεψημάτα

A.2.1.1. Τσάι

Το τσάι αποτελεί σημαντική πηγή φλαβονοειδών και κυρίως EC, ECG, EGC και EGCG. Σε μικρότερη αναλογία περιέχονται οι φλαβονόλες και γλυκοζίτες φλαβονολών. Οι φλαβανόλες και φλαβονόλες του τσαγιού αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά που μπορεί να είναι έως και 5 φορές πιο αποτελεσματικά από τις βιταμίνες C και E (Dreosti, 2000). Στο σχήμα 6 φαίνεται η σύσταση ορισμένων αφεψημάτων μαύρου τσαγιού.



Σχήμα 6. Σύσταση αφεψημάτων μαύρου τσαγιού (Hakim *et al*, 2000)

A.2.1.2. Άλλα αφεψήματα

Τα μίγματα βοτάνων *Essiac* και *Flor-Essence* πωλούνται ως διατροφικά συμπληρώματα και χρησιμοποιούνται από ασθενείς για τη θεραπεία χρόνιων καταστάσεων, κυρίως καρκίνου. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα βότανα αυτά μπορεί να έχουν αντιοξειδωτική δράση (Tomayo *et al*, 2000).

Το εκχύλισμα φύλλων από *Strobilanthes crispus* αποτελεί πλούσια πηγή υδατοδιαλυτών βιταμινών (C, B₁ και B₂) οι οποίες συνδράμουν στην υψηλή αντιοξειδωτική δράση των φύλλων. Τα φύλλα αυτά επίσης περιέχουν μέτριες ποσότητες κατεχινών, αλκαλοειδών, καφεΐνης, τανίνης που συνεισφέρουν επίσης στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Κατανάλωση 5g ημερησίως από αυτό το εκχύλισμα μπορεί να προμηθεύσει τον οργανισμό με τα επιπλέον θρεπτικά συστατικά και αντιοξειδωτικά που χρειάζεται για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (βλ. πίνακα 4).

Πίνακας 4. Χημική σύσταση 5 αφεψημάτων: *Strobilanthes crispus*, *Yerbamate*, Ινδικό, πράσινο και μαύρο τσάι (Maznah *et al*, 2000)

Analysis	Mean $\pm$ SD	Yerbamate ^a	Indian tea ^a	Green tea ^b	Black tea ^b
Proximate analysis					
Moisture content (%)	69.3 $\pm$ 0.1	9.00	9.3	— ^c	3.9–9.5
Total ash (%)	21.6 $\pm$ 0.1	6.7	—	6.1–9.2	4.9–6.5
Water-insoluble ash (%)	13.8 $\pm$ 1.0	—	—	5.2–7.2	—
Water-soluble ash (%)	7.9 $\pm$ 1.0	2.3	—	2.6–1.6	3.0–4.2
Alkalinity of soluble ash (mL acid/g)	6.5 $\pm$ 2.0	—	—	2.6–1.6	1.2–1.6
Acid-insoluble ash (%)	2.2 $\pm$ 0.8	—	—	0.05–0.9	0.2–0.4
Extractivities (%)	6.7 $\pm$ 0.4	33.1	—	33–45	30–50
Protein content	13.3 $\pm$ 0.9	9.8	14.1	—	5.0–6.2
Total carbohydrate (%)	4.3 $\pm$ 0.7	—	0.0	—	—
Crude fiber (%)	13.9 $\pm$ 0.6	15.5	—	9–15	—
Ether extract (%)	1.9 $\pm$ 0.7	2.1	—	—	14–18
Minerals (mg/100 g dried sample)					
Sodium	2,953 $\pm$ 60	1,112	44.5	—	—
Potassium	10,900 $\pm$ 498	2,227	2,160	—	—
Calcium	5,185 $\pm$ 359	664	426	—	—
Iron	255 $\pm$ 163	—	15.2	—	—
Phosphorus	201 $\pm$ 22	394	628	—	—
Vitamins (mg/100 g sample)					
Ascorbic acid (C)*	9.8 $\pm$ 1.2	—	0.0	—	—
Riboflavin (B ₂)	0.11 $\pm$ 0.04	—	0.9	—	—
Thiamin (B ₁)	0.14 $\pm$ 0.001	0.2	0.14	—	—
Other chemical components					
Caffeine (%)	0.0 (11)	0.6–1.4	2.5	1.5–4.3	10–11
Tannin (%)	1.0 $\pm$ 0.30	9.8	—	—	—
Alkaloid (%)	3.2 $\pm$ 0.60	4.4	—	—	—
Catechin (%)	1.18 $\pm$ 0.08	0.9	—	5.8	—

Ένα άλλο αφέψημα, το MitoLife που περιέχει μίγμα εκχυλίσματος από φρούτα, και τσάι έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αποτελεσματική προστασία έναντι της οξειδωσης της LDL-χοληστερόλης ανάλογη με αυτή του πράσινου τσαγιού (Weisburger *et al*, 2001).

Το *Salvia officinalis* (φασκόμηλο) αποτελεί ένα ευρέως καλλιεργούμενο βότανο το οποίο χρησιμοποιείται για μαγειρικούς σκοπούς. Οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες αποδίδονται κυρίως στην παρουσία του καρνοσικού και ροζμαρινικού οξέος, όμως περιέχει και ορισμένα φαινολικά συστατικά που προσδίνουν μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα. Το κυριότερο αντιοξειδωτικό που περιέχεται σε αυτό το βότανο είναι το L-σαλβιανολικό οξύ το οποίο είναι διμερές του ροζμαρινικού οξέος (Lu and Foo, 2001).

Τα εκχυλίσματα 6 διαφορετικών βοτάνων της οικογένειας Lamiaceae (δίκταμο, lemonbalm, μέντα, φασκόμηλο, τσάι βουνού και μαντζουράνα) βρέθηκε ότι είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά όπως υδροξυκιναμικό οξύ και φλαβονοειδή.

Επίσης έχει ανιχνευτεί ροζμαρινικό και καφεϊκό οξύ σε όλα τα εκχυλίσματα εκτός από τη μέντα και το τσάι βουνού. Ακόμη βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα μαντζουράνα, μέντα και δίκταμο συντελούν στην επιβράδυνση της οξειδωσης των λιπών (Triantaphyllou, Blekas and Boskou, 2001).

A.2.1.3. Σοκολάτα

Το κακάο αποτελεί πλούσια πηγή πολυφαινόλων και κυρίως κατεχινών και προκυανιδινών (Wollgast and Anklam, 2000). Το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες των προϊόντων του κακάο διαφέρει. Έτσι, για παράδειγμα, το ωμό κακάο περιέχει διαφορετικές πολυφαινόλες από τη σκόνη κακάο ή τη σοκολάτα τα οποία υπόκεινται σε ζύμωση, ξήρανση και ψήσιμο. Το ωμό κακάο είναι πλούσιο σε μονομερή φλαβονολών και προκυανιδίνες ενώ περιέχει σε μικρότερη ποσότητα κερκετίνη (φλαβονόλη), ισοβιτεξίνη (φλαβόνη), κλοβαμίδιο και δεοξυκλοβαμίδιο (φαινόλες) καθώς και ορισμένες ανθοκυανίνες που προσδίδουν στο ωμό κακάο το μοβ χρώμα του (Dreosti, 2000). Η σκούρα σοκολάτα έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα κατεχινών (53,5 mg ανά 100 gr) ενώ η σοκολάτα γάλακτος περιέχει 15,9 mg ανά 100 gr. Στον πίνακα 3 φαίνεται το περιεχόμενο ορισμένων προϊόντων κακάο σε πολυφαινόλες.

Πίνακας 3. Περιεχόμενες πολυφαινόλες σε σκόνη κακάο, σκούρα σοκολάτα και σοκολάτα γάλακτος (Wollgast and Anklam, 2000)

Source	Extraction solvent	Analysis method	Quantity
Cocoa powder	95% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	20 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders	Methanolic HCl	Folin-Ciocalteu (catechin standard)	65±19 mg/g Total polyphenols ^a
Cocoa powder (non-alkalinised)	70% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	Ca 58 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders (instant)	70% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	6.46±2.44 mg/g Total polyphenols
Cocoa powders	Methanolic HCl	RP-HPLC (catechin standards)	2.96-3.27 mg/g Catechin and epicatechin
Cocoa powder (non-alkalinised)	75% Aqueous acetone	RP-HPLC (epicatechin standard)	Ca 3 mg/g Epicatechin
Cocoa powder (instant)	75% Aqueous acetone	RP-HPLC (epicatechin standard)	0.26±0.05 mg/g Epicatechin
Dark chocolate	95% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	8.4 mg/g Total polyphenols
Dark chocolates	Methanolic HCl	Folin-Ciocalteu (catechin standard)	36.5±5 mg/g Total polyphenols ^a
Dark chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	1.7±0.08 mg/g total procyanidins
Dark chocolate	70% Aqueous methanol	RP-HPLC (catechin standards)	0.5 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	Methanolic HCl	RP-HPLC (catechin standards)	0.48-1.37 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	0.8±0.08 mg/g Catechin and epicatechin
Dark chocolate	n.a.	n.a.	2 mg/g Epicatechin
Milk chocolate	95% Aqueous methanol	Folin-Ciocalteu (gallic acid standard)	5 mg/g Total polyphenols
Milk chocolate	Methanolic HCl	Folin-Ciocalteu (catechin standard)	15±5.8 mg/g Total polyphenols ^a
Milk chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	0.7±0.17 mg/g Total procyanidins
Milk chocolate	70% Aqueous methanol	RP-HPLC (catechin standards)	0.16 mg/g Catechin and epicatechin
Milk chocolate	Methanolic HCl	RP-HPLC (catechin standards)	0.15-0.16 mg/g Catechin and epicatechin
Milk chocolate	70% Aqueous acetone	Modified NP-HPLC (procyanidin standards)	0.2±0.05 mg/g Catechin and epicatechin

Το 1994 η κατά κεφαλή κατανάλωση σοκολάτας στην Ευρωπαϊκή Ένωση κυμαίνονταν από 1,3 Kg ανά έτος στην Πορτογαλία έως 8,8 Kg ανά έτος στη Γερμανία. Γενικά στις Βόρειες χώρες καταναλώνεται περισσότερη σοκολάτα απ' ότι στις Νότιες, κι έτσι η σοκολάτα μπορεί να αποτελεί καλή πηγή αντιοξειδωτικών για ορισμένους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς (Wollgast and Anklam, 2000). Πρόσφατες εκτιμήσεις για τη συνεισφορά της σοκολάτας στη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών έδειξαν ότι 41 g σοκολάτας γάλακτος περιέχουν παρόμοια ποσότητα πολυφαινολών με ένα σερβίρισμα (μερίδα) κόκκινου κρασιού, ενώ 1 φλιτζάνι σοκολάτας παρέχει περίπου τα 2/3 αυτής της ποσότητας (Dreosti, 2000). Επιπροσθέτως, το περιεχόμενο της σοκολάτας σε κατεχίνες είναι τετραπλάσιο απ' αυτό του τσαγιού. Βέβαια, υπάρχει διαφορά ως προς τον τύπο των κατεχινών που περιέχονται στη σοκολάτα και στο τσάι. Έτσι, η σοκολάτα περιέχει μόνο (+) – κατεχίνη και (-) – επικατεχίνη, ενώ το τσάι περιέχει κυρίως (-) – γαλλικό εστέρα επικατεχίνης, (-) – γαλλικό εστέρα επιγαλλοκατεχίνης με μικρές συγκεντρώσεις (+) – κατεχίνης, (-) – επικατεχίνης, (-) – επιγαλλοκατεχίνης και (+) – γαλλοκατεχίνης (Arts *et al*, 1999).

A.2.1.4. Καφές

Ο καφές έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό για τις τανίνες που περιέχει επειδή η παρουσία των ενώσεων αυτών έχει ιδιαίτερη σημασία για την ποιότητα αυτών των προϊόντων (Μπόσκου, 1997). Μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει βρεθεί ότι έχουν τα μέσης σκουρότητας ψημένα αφεψήματα καφές (Nicolli *et al*, 1997).

A.2.2. Φρούτα και λαχανικά

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι δίαιτες πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά σχετίζονται με μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης λόγω των αντιοξειδωτικών που περιέχουν (Toit *et al*, 2001). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συστήνει την κατανάλωση τουλάχιστον 500g/ημέρα φρούτων και λαχανικών. Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν κύριες πηγές δύο μειζόνων διαιτητικών αντιοξειδωτικών: της βιταμίνης C και των καροτενοειδών (βλ. πίνακα 5).

Πίνακας 5. Κύριες πηγές βιταμίνης C και καροτενοειδών (Rice – Evans and Miller, 1995; Marken and Beecher, 2000)

	Βιταμίνη C (mg / 100g)	Καροτενοειδή (μg / 100g)
Πορτοκάλι	54 (εύρος: 44-79)	28
Λεμόνι	58	18
Φράουλα	77	8
Πιπέρι		
Πράσινο	120	265
Κόκκινο	140	3840
Σπανάκι	26	3535
Μπρόκολο	87	575
Ανοιξιδάτικα χόρτα	180	2630
Καρότα	6	8115 (εύρος: 4300-11000)
Τομάτα	17	640

Η βιταμίνη C βρίσκεται κυρίως σε ξινά φρούτα, στο πράσινο πιπέρι, στο λάχανο, στις φράουλες, στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Το β-καροτένιο απαντάται κυρίως στα καρότα, στα σκούρα φυλλώδη λαχανικά, στο πορτοκάλι και στα κίτρινα λαχανικά (Rice – Evans and Miller, 1995). Η μέση πρόσληψη βιταμίνης C και β-καροτένιου σε παιδιά φαίνεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Μέση πρόσληψη αντιοξειδωτικών σε παιδιά (Hassapidou and Bairaktari, 2001)

	Σύνολο παιδιών (n=65)	Αγόρια (n=41)	Κορίτσια (n=24)
βιταμίνη C (mg)	116 ± 123	104,3 ± 95,4	136,9 ± 160,7
β-καροτένιο (μg)	2.652,8 ± 2.560	2.584 ± 1.820	2.770 ± 3.527

Πολλά φρούτα και λαχανικά περιέχουν το τρίτο κατά σειρά κυριότερο αντιοξειδωτικό, δηλαδή βιταμίνη E αν και οι κύριες πηγές της είναι το ελαιόλαδο και οι ξηροί καρποί. Επίσης περιέχουν και άλλα αντιοξειδωτικά όπως είναι το λυκοπένιο το οποίο προσδίδει το κόκκινο χρώμα στις τομάτες και στις κόκκινες πιπεριές, η καψανθίνη που αποτελεί το κόκκινο συστατικό των πιπεριών καθώς και άλλα φλαβονοειδή (βλ. πίνακες 7 και 8).

Πίνακας 7. Περιεχόμενο φρούτων και λαχανικών σε καροτενοειδή (Rice – Evans and Miller, 1995)

Καροτενοειδή	Πηγή
Κανθαξανθίνη	Μανιτάρια
Καψανθίνη	Κόκκινα και κίτρινα πιπέρια, πορτοκάλια
α-καροτένιο και β-καροτένιο	Καρότα, κόκκινο φοινικέλαιο, γλυκοπατάτα, πορτοκάλι, μούρα ¹ , σταφύλια, μαύρες σταφίδες
α-καροτένιο	Πορτοκάλι, μπανάνα
β-καροτένιο	Μπανάνα, μάνγκο, παπάγια, καρπούζι, πάπρικα, πατάτα, κόκκινο πιπέρι
α-κρυπτοξανθίνη	Παπάγια, καρπούζι
β-κρυπτοξανθίνη	Μάνγκο ² , παπάγια, ροδάκινο, πορτοκάλι, μανταρίνι
Λουτεΐνη	Μπανάνα, πορτοκάλι, μανταρίνι, κίτρινο πιπέρι, πατάτα, μούρα, σταφύλια, μαύρες σταφίδες
Λυκοπένιο	Τομάτα, παπάγια, καρπούζι
Φυτοένιο	Κολοκύθα, μάνγκο, παπάγια
Φυτοφλουένιο	Βερίκοκο, ροδάκινο
Ζεαξανθίνη	Πάπρικα, κόκκινα και κίτρινα πιπέρια

¹ Στο χυμό των μούρων έχουν ανιχνευτεί 8 φλαβονόλες: 6 γλυκοζίτες κερσετίνης και 2 καιμπερόλης (Gil-Izquierdo and Mellenthin, 2001).

² Στον πυρήνα του Νιγηριανού μάνγκου έχει βρεθεί ότι περιέχονται ταννικό οξύ, γαλλικό οξύ και επικατεχίνη σε αναλογία 17:10:1 (Arogba, 2000).

Πίνακας 8. Διαιτητικές πηγές πολυφαινόλων (Rice – Evans and Miller, 1995)

Πολυφαινόλη	Διαιτητική πηγή	Οικογένεια
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	Τσάι, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	Τσάι, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Επιγαλλοκατεχίνη	Τσάι, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Κερκετίνη	Τσάι, κρεμμύδι, μήλα, κόκκινο κρασί, σταφύλια, μούρα, μπρόκολα, βατόμουρα	Φλαβονόλη
Μυρισετίνη	Μούρα, σταφύλια, κόκκινο κρασί	Φλαβονόλη
Ρουτίνη (ρουτινοσίδη κερκετίνης)	Μήλα	Φλαβόνη
Καιμπφερόλη	Μπρόκολα, ραδίκια, γκρέιπ φρουτ, τσάι	Φλαβονόλη
Ταξιφολίνη	Ξινά φρούτα	Φλαβανόνη
Απιγενίνη	Σέλινο, μαϊντανό	Φλαβόνη
Χρυσίνη	Φλούδα φρούτων	Φλαβόνη

Όσον αφορά στα άγρια εδώδιμα χόρτα, από την ανάλυση 7 διαφορετικών ειδών βρέθηκε το περιεχόμενο τους σε φλαβονοειδή και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Περιεχόμενα φλαβονοειδή σε 7 είδη Ελληνικών εδώδιμων άγριων χόρτων (Trichopoulos *et al*, 2000)

mg /100gr τρόφιμο	Μυρισετίνη	Κερκετίνη	Καιμπφερόλη	Ισορχαμνετίνη	Λουτεολίνη	Απιγενίνη
Μάραθο	19,8	46,8	6,5	9,3	0,1	<0,07
Αγριόπρασο	<0,03	10,4	12,5	8,5	0,3	<0,07
Ζόχος	3,6	16,0	3,8	0,7	6,5	3,8
Καυκαλίθρα	1,6	29,3	2,9	5,1	0,6	<0,08
Κουτσουνάδα	1,1	26,3	2,3	1,1	0,1	0,1

Λάπαθο	5,7	86,2	10,3	<0,03	<0,02	<0,05
Σταφυλίνakas	0,4	1,1	0,2	<0,06	34,1	12,6

Τα άγρια χόρτα, συνήθως καταναλώνονται με ελαιόλαδο που είναι το μόνο εδώδιμο λίπος που περιέχει πολυφαινόλες. Έτσι, τα πιάτα με άγρια χορταρικά περιέχουν μίγμα πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών. Αυτός ο συνδυασμός των άγριων χορταρικών με το ελαιόλαδο ίσως συνδράμει στις θετικές για την υγεία επιπτώσεις της Ελληνικής δίαιτας (Trichopoulos *et al*, 2000).

A.2.3. Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο εξάγεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικές διαδικασίες (Caronio *et al*, 2001). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος φαινολικών ουσιών που υπάρχουν στη σάρκα του καρπού να απομακρύνονται με τα απόνερα, ενώ ένα μικρό μέρος τους μεταβαίνει στο ελαιόλαδο.

Τα φαινολικά συστατικά τα οποία υπάρχουν στο ελαιόλαδο ονομάζονται πολυφαινόλες κι είναι μέρος του πολικού κλάσματος το οποίο συνήθως παραλαμβάνεται από το ελαιόλαδο με εκχύλιση με χρήση μίγματος μεθανόλης – νερού. Το κλάσμα αυτό είναι πολύπλοκο μίγμα και η χημική του φύση δεν έχει διευκρινιστεί εντελώς. Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, συνήθως αναφέρονται σαν κύρια συστατικά. Ακολουθούν τα οξέα ομοβανιλικό, πρωτοκατεχικό, συρινγικό και π-υδροξυ-φαινυλοξικό. Τόσο η τυροσόλη όσο και η υδρόξυ-τυροσόλη πιστεύεται ότι προέρχονται από την υδρόλυση της ολεωρωπαΐνης, ενώ οι άλλες (βενζοϊκό και κινamικό οξύ) από την υδρόλυση των φλαβονοειδών (ανθοκυάνες, φλαβόνες). Άλλα φαινολικά συστατικά τα οποία εμφανίζονται συχνά στους πίνακες της φαινολικής σύνθεσης του ελαιολάδου είναι η ολεωρωπαΐνη, το καφεϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, το συρινγικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το ο-κουμαρικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το σιναπικό οξύ, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το π-υδροξυφαινυλογαλακτικό οξύ και το ομοβανιλικό οξύ. Το κινamικό, ελεανολικό, σικιμικό και κουϊνικό οξύ αναφέρονται συχνά σαν φαινόλες του ελαιολάδου, παρ' όλο που τους λείπει μια φαινολική ομάδα ή ακόμα και ένας αρωματικός δακτύλιος.

A.2.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο

Είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν αξιόλογες ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές κατά τον βιολογικό κύκλο της ελιάς που έχουν σχέση με:

- την ποικιλία των ελιών
- την ωριμότητα του καρπού: έχειδειχθεί ότι στα ώριμα φρούτα το περιεχόμενο των πολυφαινόλων σχεδόν είναι το μισό εν συγκρίσει με αυτό των άγουρων φρούτων
- το σύστημα παραλαβής του ελαιολάδου: τα συστήματα πίεσης δίνουν ελαιόλαδο με υψηλότερο περιεχόμενο σε συνολικές πολυφαινόλες σε σχέση με το σύστημα φυγοκέντρωσης (Βεκιάρη, 2001).

A.2.4. Αλκοολούχα

A.2.4.1. Κρασί

Οι πολυφαινόλες του κρασιού βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο κόκκινο κρασί (1000-4000 mg/L) σε σχέση με το άσπρο κρασί (200-300 mg/L). Το κόκκινο κρασί περιέχει διάφορες υδατοδιαλυτές πολυφαινόλες όπως φαινολικά οξέα, το τρι-υδροξυ-στιλβένιο (ρεσβερατρόλη), φλαβονόλες, φλαβανόλες, προκυανιδίνες και ανθοκυανίνες (Dreosti, 2000). Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού όπως η ρεσβερατρόλη τροποποιούν το μεταβολισμό των λιπών και εμποδίζουν την οξειδωση της LDL- χοληστερόλης καθώς και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Frémont, 2000). Το κόκκινο κρασί έχει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το άσπρο κρασί η οποία σχετίζεται άμεσα με το φαινολικό του περιεχόμενο. Τα "νεαρά" κόκκινα κρασιά έχουν σχετικά υψηλά επίπεδα προκυανιδινών και ανθοκυανινών που προσδίδουν στο κρασί μια μοβ απόχρωση. Καθώς το κρασί ωριμάζει, αυτά τα επίπεδα μειώνονται καθώς σχηματίζονται πιο σταθερές κοκκινο-πορτοκαλόχρωμες χρωστικές. Η συσσώρευση προκυανινών συντελεί στην πτώση των ουσιών αυτών κι έτσι τα ώριμα κρασιά έχουν λιγότερο στυφή γεύση (Dreosti, 2000).

A.2.4.2. Μπύρα

Στη μπύρα περιέχονται διάφορα φαινολικά οξέα. Σε μεγαλύτερη αναλογία απαντώνται το μ-κουμαρικό, το φερουλικό, το ο-κουμαρικό, το π-κουμαρικό και το 3-υδρόξυ-βενζοϊκό. Σε μικρότερες ποσότητες βρίσκονται το βανιλικό, το χλωρογενικό, το ομοβανιλικό, το ρ-υδρόξυ-βενζοϊκό, το 2,6-διυδρόξυ-βενζοϊκό, το συρινγικό, το γαλλικό, το πρωτοκατεχικό, το καφεϊκό και το 3,5-διυδρόξυ-βενζοϊκό οξύ (Montanari *et al*, 2000).

A.2.5. Όσπρια

Οι φακές αποτελούν σημαντικό τρόφιμο για τους ανθρώπους στις μεσογειακές χώρες. Οι φακές είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες, σύνθετους υδατάνθρακες, άμυλο και διαιτητικές ίνες. Παρόλα αυτά περιέχουν και ορισμένους αντιδιατροφικούς παράγοντες όπως είναι οι αναστολείς θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, το φυτικό οξύ, οι συμπυκνωμένες τανίνες, σαπωνίνες κ.ά. Οι συμπυκνωμένες τανίνες ενώνονται με τις πρωτεΐνες της τροφής και έχουν ανασταλτική δράση έναντι των πεπτικών ενζύμων. Επίσης μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του περιεχομένου σιδήρου στις φακές. Παρόλα αυτά, η παρουσία των τανινών και γενικότερα των φαινολικών συστατικών έχει συσχετισθεί με προστατευτική δράση έναντι των οξειδωτικών βλαβών που συμβαίνουν στο ανθρώπινο σώμα. Στον πίνακα 10 φαίνεται η σύσταση της ωμής φακής σε φαινολικά συστατικά.

Πίνακας 10. Περιεχόμενα φαινολικά συστατικά στη φακή (Bartolomé *et al*, 1997)

Φαινολικό συστατικό	Ποσότητα (μg / g ξηρής ωμής φακής)
Πρωτοκατεχικό οξύ	$0,36 \pm 0,04$
Πρωτοκατεχική αλδεϋδη	$0,13 \pm 0,02$
π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	$1,48 \pm 0,10$
B ₃ [κατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη]	$8,65 \pm 0,69$
B ₁ [επικατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη]	$4,44 \pm 0,31$
T ₂ [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη-(4→8)-κατεχίνη]	$3,42 \pm 0,25$
(+) – κατεχίνη	$7,31 \pm 0,54$
Παράγωγο του π-κουμαρικού οξέος	$0,74 \pm 0,09$
T ₃ [επικατεχίνη-(4→6)-επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη]	$1,30 \pm 0,11$
B ₂ [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη]	$5,66 \pm 0,41$
Βανιλίνη	$0,12 \pm 0,02$
C ₁ [επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη-(4→8)-επικατεχίνη]	$0,22 \pm 0,04$
π-κουμαρικό οξύ	$7,51 \pm 0,62$
T ₄ (τετραμερές προκυανιδίνης)	$0,32 \pm 0,03$
Φερουλικό οξύ	$0,06 \pm 0,02$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

A.3. Αντιοξειδωτικά και Υγεία

Τα τελευταία 5 χρόνια έχουν γίνει πολλές έρευνες παγκοσμίως που αφορούν τις θετικές επιδράσεις της τροφής στην υγεία. Ολοένα αυξανόμενη έμφαση έχει δοθεί στις διεργασίες που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο (Colic and Pavelic, 2000). Ενδιαφέρον επίσης έχει αναπτυχθεί για το ρόλο της οξειδωτικής / αντιοξειδωτικής δραστηριότητας στη διαδικασία της γήρανσης και των εκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης. Τα εν δυνάμει ενεργά συστατικά φρούτων, λαχανικών, βοτάνων, ριζών και φύλλων έχουν μελετηθεί εκτεταμένως. Προσοχή έχει δοθεί στα μη διατροφικά συστατικά φυτικής προελεύσεως όπως τσάι, καρυκεύματα και βότανα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο πολυφαινόλης και ειδικά τα φλαβονοειδή έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δύναμη που προστατεύει τα κύτταρα από την βλαπτική επίδραση των ελεύθερων ριζών (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.1. Αντιοξειδωτικά και καρκίνος

Η καρκινογένεση εμπεριέχει μια παρατεταμένη συσσώρευση βλαβών σε διάφορα βιολογικά επίπεδα που περιλαμβάνουν τόσο γενετικές όσο και βιοχημικές αλλαγές στα κύτταρα. Σε καθένα από αυτά τα επίπεδα υπάρχει δυνατότητα παρέμβασης ώστε να εμποδιστεί, να μειωθεί ή και να σταματήσει η εκφύλιση των κυττάρων. Η τροποποίηση της διαίτας είναι ένας τρόπος παρέμβασης. Υπάρχουν διάφορα διατροφικά στοιχεία που έχουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες όπως βιταμίνες, ιχνοστοιχεία καθώς και μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η παρατήρηση ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου μειώνεται με την κατανάλωση διαιτών πλούσιων σε φρούτα, λαχανικά και πράσινο τσάι έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα φυτικά συστατικά έχουν προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης του DNA (Abdulla and Gruber, 2000). Μάλιστα, πιστεύεται ότι οι διαιτητικές πολυφαινόλες έχουν προστατευτικές και θεραπευτικές ικανότητες όσον αφορά στις σχετιζόμενες με οξειδωτικές βλάβες παθήσεις (Ciovannelli *et al*, 2000; Shankel *et al*, 2000).

A.3.1.1. Μηχανισμοί καρκινογένεσης

Υπάρχουν διάφορα μοντέλα πειραματικής καρκινογένεσης. Φαίνεται ότι ποικίλοι περιβαλλοντικοί, χημικοί και μεταβολικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στη μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει διάφορα στάδια με τα οποία:

- 1) το γενετικό υλικό του κυττάρου τροποποιείται (μέσω μεθυλίωσης ή οξειδώσεως των βάσεων του DNA) ή με τη δημιουργία σημειακών μεταλλάξεων ή προσθήκης βάσεων
- 2) τα ένζυμα επανορθώσεως του DNA τροποποιούνται και δεν μπορούν να δράσουν
- 3) ο μηχανισμός της κυτταρικής αποπτώσεως τροποποιείται ή / και καθίσταται ανενεργός
- 4) εκφράζονται διάφορα γονίδια (ογκογονίδια) τα οποία τροποποιούν το μηχανισμό διαβιβάσεως του σήματος
- 5) στην εξέλιξη της καρκινικής νόσου όλοι οι μηχανισμοί αυτοί αυτοτροφοδοτούνται και ενισχύονται.

Έτσι, η καρκινική νόσος θεωρείται ότι είναι μια πολυπαραγοντική συνάθροιση παραγόντων και μηχανισμών οι οποίοι οδηγούν στον άναρχο και απρογραμματίσιμο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενός ιστού (Καστανάς, 2002).

A.3.1.2. Μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης των πολυφαινολών του τσαγιού

Οι κατεχίνες του τσαγιού έχουν δείξει τη μεγαλύτερη αντικαρκινική ικανότητα (Colic and Pavelic, 2000).

Υπάρχουν 3 προτεινόμενοι μηχανισμοί αντικαρκινικής δράσης για τις κατεχίνες του τσαγιού:

- 1) Οι κατεχίνες, λόγω της κατεχολικής δομής τους δεσμεύουν τα μεταλλικά ιόντα και έτσι μειώνονται τα επίπεδα τα ελεύθερων κυτταρικών Fe^{+2} και Fe^{+3} τα οποία απαιτούνται για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών.
- 2) Οι κατεχίνες του τσαγιού είναι δεσμευτές των υπεροξειδικών και υδροξυλικών ριζών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA καθώς και σε άλλα μόρια.
- 3) Οι κατεχίνες παγιδεύουν τις υπεροξειδικές ρίζες και έτσι εμποδίζουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Zhu *et al*, 2001).
- 4) Τα φλαβονοειδή παρεμβαίνουν στον κυτταρικό κύκλο μέσω ρύθμισης της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης (Ren *et al*, 2003).

A.3.1.3. Καρκίνος δέρματος

Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι τοπική εφαρμογή ή ένεση με πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού ή EGCG εμποδίζουν την έναρξη της καρκινογένεσης και την προώθηση από χημικές καρκινογόνες ουσίες και UV ακτινοβολία. Επιπρόσθετα η καφεΐνη του τσαγιού έχει βρεθεί ότι έχει χημειοπροστατευτική δράση έναντι της προκαλούμενης από UVb ακτινοβολία καρκινογένεσης (Dufresne and Farnworth, 2001; Ichihashi *et al*, 2000; Katiyar *et al*, 2001). Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε ντεκαφεϊνέ μαύρο τσάι δε εμποδίστηκε η καρκινογένεση από UVb ακτινοβολία ή από χημικό προωθητή. Οι διαδικασίες απομάκρυνσης της καφεΐνης ίσως συντελούν στην παραγωγή τοξικών προϊόντων. Η βιοενεργοποίηση και ο μεταβολισμός μεταλλαξιογόνων και προμεταλλαξιογόνων που χορηγήθηκαν *per oz* σε ποντίκια ρυθμίζονται από το πράσινο και το μαύρο τσάι, και η καφεΐνη φαίνεται ότι είναι το ενεργό συστατικό. Τοπική εφαρμογή κλάσματος πολυφαινολών πράσινου τσαγιού σε δέρμα ποντικών μπορεί να μειώσει την μετατροπή των καλοήθων όγκων σε κακοήθεις. Η από του στόματος χορήγηση πράσινου τσαγιού, μαύρου τσαγιού ή EGCG εμπόδισε την περαιτέρω ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί και υποχώρηση του καρκίνου (Dufresne and Farnworth, 2001). Βάσει των θετικών επιδράσεων του πράσινου τσαγιού στο δέρμα ποντικών πολλές φαρμακευτικές εταιρείες και εταιρείες καλλυντικών ενισχύουν τα προϊόντα περιποίησης δέρματος με εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού (Katiyar and Elmets, 2001). Πιστεύεται ότι η χρήση αυτών των εκχυλισμάτων σε συνδυασμό με αντηλιακά και σωστή επιμόρφωση ίσως αποτελεί αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση της εμφάνισης καρκίνου του δέρματος σε ανθρώπους (Ahmad and Mukhtar, 2001).

A.3.1.4. Καρκίνος πνευμόνων

Μελέτες σε ποντίκια για την επίδραση του μαύρου και πράσινου τσαγιού στην ανάπτυξη καρκίνου των πνευμόνων έχουν δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Μάλιστα έχει παρατηρηθεί μείωση του αριθμού των πνευμονικών καρκίνων σε ποντίκια που τους δόθηκε πράσινο τσάι, μαύρο τσάι, EGCG ή ντεκαφεϊνέ τσάι πριν από την έναρξη της καρκινογένεσης. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και με χορήγηση ενός καρκινογόνου του καπνού [4-(μεθυλονιτροσάμινο)-1-(3-περιδουλ)-1-βουτανόνη, (NNK)] (Dufresne and

Farnworth, 2001; Yang *et al*, 1999). Οι EGCG, EGC και η διγαλλική-3-3'-θειαφλαβίνη είναι τα κυριότερα δραστικά συστατικά.

A.3.1.5. Καρκίνος γαστρεντερικού συστήματος και άλλες μορφές καρκίνου

Έχει προταθεί ότι η κατανάλωση τσαγιού έχει προστατευτική δράση έναντι των διαφόρων μορφών καρκίνου (Trevisanato and Kim, 2000). Μάλιστα επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση τσαγιού ίσως μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Hakim *et al*, 2001; Weisburger, 2000). Έτσι, υψηλές δόσεις θειαφλαβίνης, πολυφαινολών μαύρου και πράσινου τσαγιού ή EGCG μειώνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στον οισοφάγο ποντικών παρέχοντας αντικαρκινική προστασία στα τρωκτικά (Dufresne and Farnworth, 2001; Muto *et al*, 2001). Σε άλλη μελέτη πάλι, αναφέρθηκε η εμφάνιση και ο πολλαπλασιασμός του καρκίνου σε ποντίκια τα οποία λάμβαναν χαμηλές δόσεις ντεκαφεϊνέ μαύρου ή πράσινου τσαγιού (Dufresne and Farnworth, 2001). Το εύρημα αυτό ενισχύεται από τα αποτελέσματα μιας Ιαπωνικής έρευνας σύμφωνα με την οποία η κανονική κατανάλωση πράσινου τσαγιού δεν σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου (Nagano *et al*, 2001).

Δίαιτες με υψηλή πρόσληψη αλατιού και χαμηλή πρόσληψη λαχανικών και τσαγιού ίσως προκαλούν καρκίνο του στομάχου (Weisburger, 2000). Επιπροσθέτως, τα εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού εμποδίζουν τον χημικώς προκαλούμενο καρκίνο του στομάχου σε ποντίκια (Dufresne and Farnworth, 2001; Abdula and Gruber, 2000).

Όσον αφορά στον καρκίνο στο κόλον, μια μελέτη αναφέρει ότι το τσάι απέτυχε να μειώσει την εμφάνιση ή τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου στο κόλον, ενώ άλλες μελέτες δείχνουν μείωση των κακοήθων όγκων με κατανάλωση εκχυλίσματος μαύρου τσαγιού και υψηλής δόσης EGCG (Dufresne and Farnworth, 2001). Πάντως τα φλαβονοειδή έχουν αντιβλαστικές ιδιότητες έναντι των καρκινικών κυττάρων (Kuntz *et al*, 1999). Η EC έχει δείξει τη μικρότερη επίδραση σε σχέση με τις ECG και EGCG (Uesato *et al*, 2001). Το μαγειρεμένο κρέας περιέχει ετεροκυκλικές αμίνες που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση καρκίνου σε τρωκτικά και ανθρώπους. Αυτό μπορεί να παρεμποδιστεί με χορήγηση πολυφαινολών μαύρου και πράσινου τσαγιού καθώς και EGCG. Στο παχύ έντερο ποντικών η χορήγηση πολυφαινολών πράσινου τσαγιού μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου.

Οι ευεργετικές επιδράσεις του τσαγιού σε σχέση με τον καρκίνο του ήπατος έχουν παρατηρηθεί σε αρουραίους, ποντίκια ή χάμστερ (Dufresne and Farnworth, 2001). Συγκεκριμένα τα φαινολικά συστατικά του μαύρου τσαγιού και του κόκκινου κρασιού έχουν

προστατευτική δράση έναντι των οξειδωτικών βλαβών του DNA (Anderson *et al*, 2001; Lodovici *et al*, 2001; Russo *et al*, 2000; Shi *et al*, 2000).

Δύο άλλες μορφές καρκίνου στις οποίες επιδρά θετικά το τσάι είναι ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του προστάτη. Έχειδειχθεί ότι ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκια με EGCG – αλλά όχι άλλες κατεχίνες – εμποδίζει την αύξηση και μειώνει το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων σε στήθος και προστάτη (Dufresne and Farnworth, 2001). Επιπρόσθετα ασθενείς με καρκίνο μαστού που κατανάλωναν ημερησίως περισσότερα από 5 φλιτζάνια πράσινου τσαγιού είχαν μικρότερο ρυθμό επανεμφάνισης καρκίνου σε σχέση με αυτούς που κατανάλωναν λιγότερα από 4 φλιτζάνια (Fujiki, 1999; Suganuma, 1999). Όσον αφορά στον καρκίνο του προστάτη έχειδειχθεί ότι οι χορτοφάγοι έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης σε σχέση με μη χορτοφάγους (De la Taille *et al*, 2001; Norrish *et al*, 2000).

Στον πίνακα 11 συνοψίζονται οι επιδράσεις του τσαγιού και των συστατικών τους στα διάφορα στάδια του καρκίνου σε μοντέλα ζώων.

Πίνακας 11. Επιδράσεις τσαγιού στον καρκίνο (Dufresne and Farnworth, 2001)

Ανάπτυξη Καρκίνου		
→		
Καρκίνος Δέρματος		
<u>Έναρξη</u>	<u>Προώθηση</u>	<u>Εξάπλωση</u>
πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού	EGCG	EGCG
μαύρο τσάι	πράσινο τσάι	πράσινο τσάι
πολυφαινόλες τσαγιού	μαύρο τσάι	μαύρο τσάι
καφεΐνη		πολυφαινόλες μαύρου τσαγιού
Καρκίνος Πνευμόνων		
<u>Έναρξη</u>	<u>Προώθηση</u>	<u>Εξάπλωση</u>
	πράσινο τσάι	πράσινο τσάι
		μαύρο τσάι
Καρκίνος Πεπτικού Συστήματος / Άλλες Μορφές Καρκίνου		
<u>Έναρξη</u>	<u>Προώθηση</u>	<u>Εξάπλωση</u>

EGCG	EGCG	πολυφαινόλες πράσινου
	μαύρο τσάι	τσαγιού
	πράσινο τσάι	EGCG
		πολυφαινόλες μαύρου
		τσαγιού

Εκτός από το τσάι και τα συστατικά του σημαντική είναι η επίδραση και των πολυφαινόλων του ελαιολάδου στον καρκίνο. Υψηλή κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιολάδου το οποίο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φαινολικά αντιοξειδωτικά παρέχει σημαντική προστασία έναντι του καρκίνου διότι εμποδίζει το οξειδωτικό στρες (Owen *et al*, 2000).

A.3.2. Αντιοξειδωτικά και καρδιαγγειακά νοσήματα

Η εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες και μπορεί να ρυθμιστεί από τα συστατικά της διαίτας. Μια μεγάλη προοπτική έρευνα που διεξήχθη σε 7 χώρες έδειξε ότι η μέση πρόσληψη φλαβονόλων και φλαβόνων σχετίζεται αντιστρόφως με τη θνητότητα από στεφανιαία νόσο (Dufrense and Farnworth, 2001; Hirvonen *et al*, 2001). Πιστεύεται ότι η κατανάλωση τσαγιού ίσως έχει προστατευτική επίδραση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Αυτό συμβαίνει γιατί τα φλαβονοειδή του τσαγιού προστατεύουν την LDL-χοληστερόλη από οξειδωτικές βλάβες (Langley – Evans, 2001; Cheng, 2000; Giugliano, 2000; Hodgson, 2000; Vinson, 2000). Η σειρά της αντιοξειδωτικής ικανότητας έναντι της οξείδωσης της LDL είναι:

διγγαλική θειαφλαβίνη > θειαφλαβίνη ≥ γαλλικό εστέρα επιγαλλοκατεχίνης > επιγαλλοκατεχίνη > γαλλικό οξύ (Yoshida *et al*, 1999).

Παρόλα αυτά η κατανάλωση τσαγιού δεν είχε καμία επίδραση στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά σε καπνιστές (De Maat *et al*, 2000).

Η βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη κατανάλωση μαύρου τσαγιού αντιστρέφει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Το εύρημα αυτό εξηγεί εν μέρει την συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης τσαγιού και της μειωμένης εμφάνισης καρδιαγγειακών (Duffy *et al*, 2001). Σύμφωνα με άλλη μελέτη όπου οι εθελοντές κατανάλωσαν ποσότητα μαύρου τσαγιού ισοδύναμη με 6 φλιτζάνια, δε βρέθηκε αύξηση της αντίστασης του πλάσματος όσον αφορά στην οξείδωση των λιπών (Cherubini *et al*, 1999).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε άτομα που καταναλώνουν μέτρια ποσότητα κρασιού καθημερινώς μειώνεται σημαντικά η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα σε σχέση με άτομα που απέχουν από τη κατανάλωση αλκοόλ ή καταναλώνουν υπερβολική ποσότητα. Τα μόρια που υπάρχουν στο σταφύλι και στο κρασί τροποποιούν τον κυτταρικό μεταβολισμό που συνδέεται με μείωση της αρτηριακής πίεσης (German and Walzem, 2000). Οι θετικές επιδράσεις του κρασιού στην υγεία διαφαίνονται και από το λεγόμενο «Γαλλικό Παράδοξο» όπου οι Γάλλοι παρόλο που καταναλώνουν δίαιτα υψηλή σε κορεσμένα έχουν χαμηλή θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, εξαιτίας της συστηματικής κατανάλωσης κόκκινου κρασιού (Dreosti, 2000; Russo *et al*, 2000; Serafini *et al*, 2000).

Η Μεσογειακή δίαιτα έχει επίσης συσχετισθεί με χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Visioli *et al*, 1997). Αυτή η δίαιτα είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και ελαιόλαδο. Το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, εκτός από μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχει και φαινολικά αντιοξειδωτικά τα οποία συμβάλλουν εν μέρει στις καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις της Μεσογειακής δίαιτας (Visioli and Galli, 2001; Wiseman *et al*, 1996). Βέβαια το ελαιόλαδο καταναλώνεται μαζί με λαχανικά. Έχειδειχθεί ότι κατανάλωση τομάτας μαζί με ελαιόλαδο –αλλά όχι με ηλιέλαιο – βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (Lee *et al*, 2000). Επιπλέον, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική επίδραση στην LDL-χοληστερόλη σε σχέση με το ραφινάρισμένο ελαιόλαδο (Fitó *et al*, 2000).

A.3.2.1. Υπέρταση

Η υψηλή πίεση, που ορίζεται ως συστολική πίεση μεγαλύτερη από 140mmHg και διαστολική μεγαλύτερη από 90mmHg, έχει επηρεάσει εκατομμύρια ανθρώπους ανά τον κόσμο (Moline *et al*, 2000). Η παθογένεση της υπέρτασης αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακές επιπλοκές. Η ισορροπία στο ενδοθήλιο μεταξύ αγγειοσυσταλτικών και αγγειοδιασταλτικών ουσιών συντελεί στην αγγειακή αντίσταση και στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο συστολή. Τα αντιοξειδωτικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία της ενδοθηλιακής λειτουργίας. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή, και κυρίως η κερσετίνη, έχουν χαλαρωτική επίδραση στη συστολή των αορτικών αγγείων σε ποντίκια. Σε μια επιδημιολογική μελέτη η κατανάλωση μαύρου τσαγιού σχετίστηκε αντιστρόφως με τη συστολική πίεση. Πάντως, η κατανάλωση μαύρου ή πράσινου τσαγιού σε μέτριες ποσότητες δεν βελτίωσε την πίεση σε ανθρώπους (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.3. Προστατευτικές επιδράσεις του τσαγιού σε άλλες ασθένειες

A.3.3.1 Νεφρικές παθήσεις

Η νεφρική υπέρταση είναι μια μορφή υπέρτασης που σχετίζεται με συστολή της νεφρικής αρτηρίας ή με βλάβες στα νεφρά. Οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού συντελούν στη μείωση της πίεσης βελτιώνοντας έτσι τη νεφρική λειτουργία σε ποντίκια. Επίσης οι κατεχίνες αυξάνουν την έκκριση νατρίου και βελτιώνουν την αιματική κυκλοφορία στα νεφρά. Σε ποντίκια που έχουν υποστεί νεφρεκτομή, οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού εμποδίζουν την πρόοδο της νεφρικής ανεπάρκειας και ανακουφίζουν από τις σπειραματικές σκληρωτικές βλάβες. Επιπροσθέτως, ποντίκια που λάμβαναν πράσινο τσάι πριν υποστούν νεφροπάθεια είχαν χαμηλότερα επίπεδα ουρίας, αζώτου και κρεατίνης ούρων καθώς και χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης και γλυκόζης στα ούρα γεγονός που υποδηλώνει μείωση των αρνητικών επιπτώσεων του νεφρού που υπολειτουργεί (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.3.2. Διαβήτης

Το πράσινο τσάι μπορεί να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης αίματος σε γηρασμένους αρουραίους. Το τσάι εμποδίζει τη δραστηριότητα των μεταφορέων γλυκόζης στο εντερικό επιθήλιο και πιστεύεται ότι ελαττώνει τη διαιτητική πρόσληψη γλυκόζης (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.3.3. Προστασία δέρματος και οφθαλμών

Ο ιστός του δέρματος έχει υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και είναι ευαίσθητος στο οξειδωτικό στρες από εξωγενείς και ενδογενείς πηγές. Οι πολυφαινόλες του μαύρου τσαγιού παρέχουν προστασία έναντι του ερυθήματος και της φλεγμονής του δέρματος που προκαλείται από UVb ακτινοβολία τόσο σε ποντίκια όσο και στον άνθρωπο. Οι EGCG και ECG εμποδίζουν την δράση της 5-α-ρεδουκτάσης η οποία σχετίζεται με εξαρτώμενες από ανδρογόνα δερματολογικές διαταραχές όπως η ακμή.

Το μάτι είναι επίσης ευαίσθητο σε βλάβες από ακτινοβολία, οξυγόνο, χημικά, μολυσματικούς παράγοντες και γήρας. Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού όπως η EGCG προστατεύουν τον οπτικό φακό λαγών από το φωτοοξειδωτικό στρες που προκαλείται από

UVa ακτινοβολία (Dufresne and Farnworth, 2001). Επίσης, η χορήγηση πράσινου ή μαύρου τσαγιού σε ποντίκια είχε καταρρακτοστατική επίδραση (Thiagarajan, 2001).

A.3.3.4. Αντιισταμινικές και αντιαρθριτικές επιδράσεις του τσαγιού

Η έκκριση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα (mast cells) σχετίζεται με φλεγμονή, δερματίτιδα, μαστοκυττάρωση και άσθμα σε περιπτώσεις αλλεργίας από περιβαλλοντικά αντιγόνα. Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του, το τσάι έχει αντιισταμινική επίδραση στα περιτοναϊκά μαστοκύτταρα (Yamada and Tachibana, 2000). Η EGCG μπορεί να μειώσει την έκκριση ισταμίνης έως και 90% σε καλλιέργεια κυττάρων αρουραίων. Αυτό ίσως οφείλεται στο τριφαινολικό τμήμα του μορίου. Η κερσετίνη έχει αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα και προκαλεί δοσοεξαρτώμενη παρεμπόδιση της έκκρισης ισταμίνης. Επίσης η κερσετίνη εμποδίζει την πρωτεϊνική κινάση C, ένα ένζυμο απαραίτητο για την ενεργοποίηση της εκκριτικής διαδικασίας.

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού μειώνουν σημαντικά το ενδεχόμενο εμφάνισης αρθρίτιδας με σημαντική μείωση των μεσολαβητών φλεγμονής στις αρθρώσεις ποντικών (Dufresne and Farnworth, 2001). Ακόμη, υψηλές δόσεις αντιοξειδωτικών έχει αναφερθεί ότι έχουν θετικές επιδράσεις στην οστεοαρθρίτιδα (Darlington and Stone, 2001).

A.3.3.5. Αντιβακτηριακές επιδράσεις του τσαγιού

Το εκχύλισμα μαύρου τσαγιού επηρεάζει την κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα επιταχύνοντας το χρόνο διέλευσης σε ποντίκια. Οι κατεχίνες του τσαγιού επίσης, βελτιώνουν την δραστηριότητα του παχέως εντέρου. Τα εκχυλίσματα τσαγιού εμποδίζουν τη δράση διαφόρων μικροοργανισμών όπως *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Mycoplasma* και *Cryptococcus*. Το τελευταίο είναι υπεύθυνο για τα γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά έλκη. Γενικά, τα κατά Gram-θετικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στα εκχυλίσματα τσαγιού από τα κατά Gram-αρνητικά. Το τσάι μπορεί να επιδράσει και στο μεταβολισμό, τροποποιώντας τα βακτήρια του εντέρου. Έτσι, η κατανάλωση τσαγιού οδηγεί σε μείωση των εντεροβακτηρίων που παράγουν αμμωνία και άλλες βλαβερές αμίνες και σε αύξηση των γαλακτοβάκιλλων και bifido-βακτηρίων τα οποία παράγουν οργανικά οξέα και μειώνουν το εντερικό pH. Το τσάι μπορεί ακόμα να εμποδίσει

την αύξηση του *Staphylococcus aureus* και του *Vibrio parahaemolyticus* που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση χολέρας και διαρροϊκών ασθενειών (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.3.6. Επιδράσεις του τσαγιού σε οδοντικά προβλήματα

Το πράσινο τσάι, ο EGCG και η ECG εμποδίζουν την προσκόλληση και την αύξηση βακτηρίων στην επιφάνεια των δοντιών. Τα αρωματικά συστατικά του τσαγιού παρουσιάζουν συνεργιστική δράση για την εμπόδιση της αύξησης του *Streptococcus mutans*. Ο EGCG επίσης εμποδίζει την ανάπτυξη και προσκόλληση του *Porphyromonas gingivalis*, ενός βακτηρίου που είναι υπεύθυνο για περιοδοντικές ασθένειες (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.3.7. Επιδράσεις του τσαγιού κατά των ιών

Το τσάι έχει ευεργετικές επιδράσεις έναντι των μολύνσεων από ιούς. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του ρετροϊού (rotavirus) σε καλλιέργειες κυττάρων πιθήκων και του ιού της γρίπης Α σε καλλιέργειες κυττάρων ζώων. Έχει αναφερθεί ότι διάφορα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένων των EGCG και ECG, εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του ρετροϊού της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV), εμποδίζοντας τη δράση της ανάστροφης μεταγραφάσης, ενός ενζύμου που επιτρέπει την εγκατάσταση του ιού στα κύτταρα – ξενιστές.

A.3.3.8. Μεταβολικές επιδράσεις του τσαγιού

Η κατανάλωση μαύρου τσαγιού μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα του μυελού από τα κυτταροτοξικά άλατα χρωμίου και αρσενικού σε ποντίκια μειώνοντας τη χρωμοσωμική διαταραχή που προκαλείται από τα άλατα αυτά. Ο EGCG και η ECG έχουν κυτταροπροστατευτική δράση έναντι της ηπατοτοξικότητας από κινόνη που επιτυγχάνεται μέσω μείωσης της διαφυγής της γαλακτικής δεϋδρογενάσης. Τα γλυκοζιτικά φλαβονοειδή του πράσινου τσαγιού εμποδίζουν την αύξηση των επιπέδων αλανίνης και αμινοτρανσφερασών ασπαρτικού που προκαλούνται από την D-γαλακτοζαμίνη κι έτσι εμποδίζουν τις ηπατικές βλάβες σε αρουραίους. Σε αρουραίους που λαμβάνουν πράσινο ή μαύρο τσάι έχει παρατηρηθεί αύξηση του αριθμού των ηπατικών υπεροξειδισωμάτων και αύξηση της υδοξυλίωσης του λαυρικού οξέος στο μικρόσωμα. Η πρόσληψη πράσινου

τσαγιού, EGCG και καφεΐνης πριν από τη λήψη αιθανόλης σε ποντίκια βελτίωσε το μεταβολισμό μειώνοντας τις συγκεντρώσεις της αιθανόλης και της ακεταλδεΐδης στο αίμα και στο ήπαρ. Χορήγηση EGCG με μορφή ένεσης σε αρουραίους οδηγεί σε μείωση της πρόσληψης τροφής, του σωματικού βάρους, των επιπέδων τεστοστερόνης, οιστραδιόλης, λεπτίνης, ινσουλίνης, IGF-I, γλυκόζης, χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων στο αίμα. Το τσάι ίσως επιδρά και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Έχειδειχθεί ότι η κατανάλωση μισού φλιτζανιού τσάι ή περισσότερων ημερησίως διπλασιάζει τις πιθανότητες σύλληψης κατά τη διάρκεια του γυναικείου καταμήνιου κύκλου (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.3.9. Νευρολογικές και φυσιολογικές επιδράσεις τσαγιού

Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι το τσάι μπορεί να βελτιώσει νευρολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες. Ένεση τσαγιού οδηγεί σε ταχεία αύξηση της εγρήγορης και της ικανότητας επεξεργασίας πληροφοριών. Αυτές οι επιδράσεις δεν οφείλονται εξ' ολοκλήρου στην καφεΐνη. Η θεοφυλλίνη δρα ως νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και μειώνει σημαντικά την πίεση σε υπερτασικούς αρουραίους. Η θεοφυλλίνη τροποποιεί τα επίπεδα σεροτονίνης και ντοπαμίνης βελτιώνοντας έτσι την μνήμη, την ικανότητα εκμάθησης και επηρεάζοντας τα συναισθήματα. Έχειδειχθεί πάντως, ότι η προσθήκη καφεΐνης σε ροφήματα βελτιώνει τη διάθεση και μειώνει την ανησυχία 30 με 60min μετά την κατανάλωση (Quinlan *et al*, 1997).

Σύμφωνα με άλλες μελέτες, διάλειμμα για τσάι στη δουλειά σχετίζεται με χαλάρωση στις γυναίκες. Δίαιτες πλούσιες σε αντιοξειδωτικά εμποδίζουν τη μείωση των νευρωνικών λειτουργιών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Επίσης καθυστερούν τις απώλειες σε επίπεδο κεντρικού νευρικού συστήματος που σχετίζονται με την γήρανση (Dufresne and Farnworth, 2001). Ορισμένα αντιοξειδωτικά προστατεύουν τους νευρώνες από το οξειδωτικό στρες το οποίο σχετίζεται με τη νόσο Parkinson και Alzheimer (Ishige *et al*, 2001). Παρόλα αυτά το τσάι δεν έχει αξιολογηθεί όσον αφορά στη θεραπεία αυτών των παθήσεων.

Κατά την διαδικασία της γήρανσης, φαίνεται ότι χάνεται η ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα να αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Τα αντιοξειδωτικά της δίαιτας απαλύνουν τις επιδράσεις του οξειδωτικού στρες και των σχετιζόμενων με την ηλικία ασθενειών (Dufresne and Farnworth, 2001).

A.3.4. Χρήση τσαγιού ως πρόσθετο τροφίμων

Οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό ή σε μαγειρεμένα προϊόντα αντικαθιστώντας τα συνθετικά αντιοξειδωτικά.

Τα εκχυλίσματα πράσινου τσαγιού παρέχουν αποτελεσματική προστασία κατά της οξείδωσης σε διαλύματα ελαίου – νερού με pH 5,5 κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, απουσία ιόντων σιδήρου. Η προσθήκη πολυφαινολών πράσινου τσαγιού σε χυμούς ή άλλα τρόφιμα βελτιώνει την ποιότητά τους. Τα εκχυλίσματα τσαγιού προστίθενται σε τσίχλες και καραμέλες ώστε να μειώνουν τα οδοντικά προβλήματα και να αρωματίζουν την αναπνοή από οσμές σκόρδου, ψαριών (τριμεθυλαμίνη), μεθυλικής μερκαπτάνης, αμμωνίας και καπνού. Η L- θεοφυλλίνη μπορεί να προστεθεί σε ροφήματα, μπισκότα, καραμέλες ή παγωτά για να προκαλέσει χαλάρωση και για να καλύψει την πικρή γεύση σε ορισμένα τρόφιμα (Dufresne and Farnworth, 2001). Σε επίπεδο επάρκειας αντιοξειδωτικών, συμπληρώματα θα πρέπει να δίδονται μόνο όταν η διατροφή δεν μπορεί να καλύψει τις αποκτήσεις του οργανισμού (Giugliano, 2000).

A.3.5. Αντιοξειδωτικά και ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ)

Οι ασθενείς σε μονάδα εντατικής θεραπείας έχουν πληθώρα παθήσεων και υψηλή θνησιμότητα παρά την υποστήριξη οργάνων που τους παρέχεται. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου πιστεύεται ότι κατέχουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση των οργανικών δυσλειτουργιών. Οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών έχουν καλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σχέση με άλλους ασθενείς που έχουν χαμηλότερα επίπεδα. Παρόλα αυτά, μονοθεραπεία με αντιοξειδωτικά σε ασθενείς σε ΜΕΘ μάλλον δε θα είχε αποτέλεσμα αν αναλογιστεί κανείς τις πολύπλοκες παθοφυσιολογικές καταστάσεις που αντιμετωπίζονται στη ΜΕΘ. Τα αντιοξειδωτικά θα πρέπει να αποτελούν μέρος μιας λογικής συνολικής θεραπευτικής αγωγής (Coleman, 2001).

Στην Ανατολική παραδοσιακή ιατρική χρησιμοποιούνται εδώ και εκατοντάδες χρόνια διάφορα φυτά και μπαχαρικά που περιέχουν φλαβονοειδή. Παρόλα αυτά στη Δυτική ιατρική δεν έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί, αν και το ιστορικό ασφάλειάς τους είναι εξαιρετικό (Middleton *et al*, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

A.4. Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το μέρος από τη συνολική προσληφθείσα ποσότητα ενός θρεπτικού συστατικού που χρησιμοποιείται για τις φυσιολογικές σωματικές λειτουργίες (Fairweather – Tait, 1999). Τα στοιχεία που υπάρχουν για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών τσαγιού ή των φρούτων και λαχανικών είναι εξαιρετικά περιορισμένα. Τροχοπέδη αποτελεί η έλλειψη ευαίσθητων οργάνων για τον προσδιορισμό των φλαβονοειδών καθώς και των μεταβολιτών τους στα φυσιολογικά υγρά (Prior and Cao, 1999).

A.4.1. Διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών

Η μέση ημερήσια πρόσληψη το 1970 στην Αμερική είχε υπολογιστεί ότι είναι 1-1,1gr/ημέρα (εκφρασμένο ως γλυκοσίδες), ανάλογα με την εποχή (Wollgast and Anklaam, 2000; Scalbert and Williamson, 2000). Παρόλα αυτά, τα ανωτέρω στοιχεία θεωρούνται αναξιόπιστα λόγω ελλιπούς προσδιορισμού της διαιτητικής πρόσληψης. Πρόσφατα, υπολογίστηκε βάσει 5 φλαβονόλων και φλαβονόνων η πρόσληψη φλαβονοειδών στην Ολλανδική διαίτα, η οποία βρέθηκε ότι είναι 23 mg/ημέρα. Στη Δανία η πρόσληψη φλαβονοειδών υπολογίστηκε ότι είναι 28 mg/ημέρα (βάσει φλαβονόλων, φλαβονόνων και φλαβανόνων). Αξιοσημείωτο είναι ότι αυτές οι εκτιμήσεις δεν περιλαμβάνουν κατεχίνες (φλαβανόλες) και / ή προανθοκυανιδίνες. Η πρόσληψη αυτών των συστατικών ίσως έχει μεγάλη ποσοτική σημασία, αφού βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο τσάι, στο κρασί και στο κακάο τα οποία καταναλώνονται συχνά στις Δυτικές χώρες (Wollgast and Anklaam, 2000).

A.4.2. Πέψη πολυφαινολών

Πολλοί συγγραφείς διαχωρίζουν τις πολυφαινόλες για διατροφικούς σκοπούς σε "εκχυλιζόμενες" (EPP) και "μη-εκχυλιζόμενες" (NEPP). Οι EPP είναι φαινόλες χαμηλού και μέτριου μοριακού βάρους και συμπεριλαμβάνουν και ορισμένες υδρολυόμενες ταννίνες και προανθοκυανιδίνες που μπορούν να εκχυλιστούν με τη χρήση διαφόρων διαλυτών όπως είναι το νερό, η αιθανόλη και η μεθανόλη. Οι NEPP είναι συστατικά ή φαινόλες μεγάλου

μοριακού βάρους που προσδένονται σε διαιτητικές ίνες ή πρωτεΐνες και παραμένουν αδιάλυτες στους συνήθειες διαλύτες. Μελέτες σε ζώα και *in vitro* πειράματα με πεπτικά ένζυμα έχουν δείξει ότι ορισμένες πολυφαινόλες – κυρίως NEPP – δεν είναι βιοδιαθέσιμες. Οι NEPP από το περικάρπιο χαρουπιού έχει βρεθεί ότι κατά 98% αποβάλλονται στα περιττώματα των αρουραίων γεγονός που επιβεβαιώνει την αντίσταση αυτών των συστατικών στην εντερική πέψη και απορρόφηση καθώς επίσης και στην αποδόμηση από τη μικροχλωρίδα του παχέως εντέρου. Οι EPP αντιθέτως απεκκρίθηκαν σε μικρές ποσότητες που σημαίνει ότι υπόκεινται σε εκτενή πέψη, απορρόφηση και βακτηριδιακή αποδόμηση.

A.4.3. Απορρόφηση πολυφαινολών

Εκτός από τη διαιτητική πρόσληψη πολυφαινολών, σημαντικό είναι να γνωρίζουμε και τη βιοδιαθεσιμότητα τους, αφού η διατροφική τους σημασία και οι συστηματικές επιδράσεις τους εξαρτώνται από την συμπεριφορά τους στον πεπτικό σωλήνα. Παρόλα αυτά οι διαθέσιμες πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση των πολυφαινολών στον άνθρωπο είναι ελάχιστες (Wollgast and Anklam, 2000). Η εντερική απορρόφηση και μεταφορά των φλαβονοειδών αποτελεί περιοχή με έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Μέχρι τώρα πιστεύονται ότι μόνο οι αγλυκόνες τυγχάνουν απορρόφησης σε περιορισμένο βαθμό από το παχύ έντερο (Boyle *et al*, 2000). Από μελέτες βασισμένες σε πειραματόζωα είχε εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα φλαβονοειδή της τροφής δεν μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο γιατί σχηματίζουν γλυκοσίδες με σάκχαρα (με εξαίρεση τις κατεχίνες). Μόνο τρία φλαβονοειδή χωρίς μόριο σακχάρου (αγλυκόνες) θεωρούνται ότι μπορούσαν να περάσουν το εντερικό τοίχωμα αφού στο έντερο ή στα εντερικά τοιχώματα δεν εκκρίνονται ένζυμα που διασπούν τους β-γλυκοζιτικούς δεσμούς (Hollman, 1997). Αργότερα, άλλες μελέτες, έδειξαν ότι στο λεπτό έντερο γίνεται απορρόφηση γλυκοζιτών κερσετίνης και ότι το μέσο μεταφοράς είναι ο εντερικός μεταφορέας γλυκόζης. Τα φλαβονοειδή που περιέχουν 3',4'-ορθο-διυδροξύ-B δακτύλιο απορροφώνται κυρίως ως γλυκουρονίδια (88-100%) ενώ η κερσετίνη-3-γλυκοσίδη και η ρουτίνη απορροφώνται χωρίς να μεταβολιστούν (Boyle *et al*, 2000). Η θέση απορρόφησης φαίνεται ότι είναι διαφορετική για την κερσετίνη-3-O-ρουτινοσίδη και για την κερσετίνη-4-O-γλυκοσίδη (Graefe *et al*, 2001). Ο τύπος του σακχάρου και η θέση γλυκοσυλίσωσης επηρεάζουν το ρυθμό απορρόφησης (Gil-Izquierdo and Mellenthin, 2001). Ακόμη, υπάρχουν στοιχεία για εντερική απορρόφηση γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών μετά από κατανάλωση γεύματος πλούσιου σε φλαβονοειδή (Boyle *et al*, 2000). Η απορρόφηση των πολυφαινολών

καθορίζεται κυρίως από τη χημική δομή τους. Η τελευταία εξαρτάται από άλλους παράγοντες όπως ο βαθμός γλυκοσυλίωσης / ακετυλίωσης, η σύζευξη με άλλες φαινόλες, το μοριακό βάρος, ο βαθμός πολυμερισμού και η διαλυτότητα (Wollgast and Anklam, 2000). Οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται από το λεπτό έντερο μεταφέρονται στο παχύ έντερο (Scalbert and Williamson, 2000)

Απορρόφηση φλαβονόλων και φλαβόνων

Έχειδειχθεί ότι η απορρόφηση της από του στόματος χορηγούμενης αγλυκόνης κερσετίνης είναι πολύ μικρή (<2%) στον άνθρωπο. Αντίθετα σε αρουραίους η απορρόφηση είναι 20%. Μελέτη σε ανθρώπους με ειλεοστομία έδειξε ότι η απορρόφηση γλυκοζιτών κερσετίνης οι οποίοι χορηγήθηκαν από το στόμα ήταν 24%. Η απορρόφηση γλυκοζιτών κερσετίνης από κρεμμύδια στην ίδια μελέτη ήταν 52% και 17% για τη ρουτινοσίδη κερσετίνης. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική απορρόφηση κερσετίνης στον άνθρωπο και ότι είναι δυνατή η απορρόφηση γλυκοζιτών από το λεπτό έντερο. Πράγματι λοιπόν από έρευνα σε ανθρώπους βρέθηκε ότι φλαβονόλες και μία φλαβόνη έφθασαν στην κυκλοφορία του αίματος μετά από του στόματος χορήγηση των γλυκοζιτών τους (Hollman, 1997).

Απορρόφηση φλαβανόνων

Δύο ανθρώπινες μελέτες έδειξαν ότι ο μεταβολισμός της ναρινγκίνης και εσπεριδίνης στον άνθρωπο, είναι παρόμοιος με των ζώων. Μετά από πρόσληψη ναρινγκίνης εκκρίνεται ένα φαινολικό οξύ στα ούρα, ενώ η εσπεριδίνη απορροφάται χωρίς να διασπασθεί (Hollman, 1997).

Απορρόφηση κατεχινών

Σύμφωνα με μια έρευνα, οι κατεχίνες απορροφώνται από τον πεπτικό σωλήνα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε αρουραίους. Μάλιστα, μετά από per oz χορήγηση 56mg EGC σε αρουραίους, τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα παρατηρήθηκαν σε 30 min. Αυξήσεις των επιπέδων EGC παρατηρήθηκαν στον άνθρωπο 60 min μετά από του στόματος χορήγηση 97mg EGC υπό τη μορφή συμπληρώματος, μετά από 10ωρη νηστεία (Prior and Cao, 1999). Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης, όπου χορηγήθηκε per oz μια εφάπαξ δόση πράσινου τσαγιού ισοδύναμη με 6 φλιτζάνια τσάι. Τα μέγιστα επίπεδα στο αίμα βρέθηκαν 60 min μετά την κατανάλωση του τσαγιού (Gerard *et al*, 1997). Μετά από του στόματος χορήγηση 0,5, 1 και 2 g κατεχίνης σε ανθρώπους

παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα σε 1-2 ώρες. Σύμφωνα με άλλη μελέτη, η απορρόφηση των κατεχινών του τσαγιού αντιστοιχεί στο 0,2-0,9% της αρχικής δόσης (Wollgast and Anklam, 2000). Πράγματι, η αδέσμευτη (+) – κατεχίνη στο πλάσμα ανθρώπου 3 ώρες μετά την κατανάλωση τσαγιού ήταν ίση με το 0,3% της αρχικής δόσης. Σε παρόμοιο πείραμα, η μεθυλιωμένη (+) – κατεχίνη βρέθηκε ότι αντιστοιχεί στο 3% της αρχικής δόσης 2 ώρες μετά (Hollman, 1997). Πάντως, ανεξάρτητα από τη δόση, το 0,5% των κατεχινών βρίσκεται στο πλάσμα με την αδέσμευτη μορφή, ενώ το ίδιο ποσό ελεύθερων κατεχινών απεκκρίνεται και στα ούρα. Το 25% των κατεχινών ανευρίσκεται στο πλάσμα υπό τη μορφή διάφορων μεταβολιτών (Wollgast and Anklam, 2000). Υπάρχουν στοιχεία τα οποία δείχνουν πρόσδεση των κατεχινών και του ταννικού οξέος με ενδογενείς πρωτεΐνες του εντερικού βλενογόνου γεγονός που ενδεχομένως μειώνει την απορρόφησή τους από τον εντερικό βλενογόνο (Carbonaro *et al*, 2001). Πάντως, αφού απορροφηθούν οι κατεχίνες, τα επίπεδα των μεταβολιτών της EC στο πλάσμα μειώνονται μετά πάροδο 6 ωρών (Prior and Cao, 1999).

Εκτός από την εντερική απορρόφηση, οι κατεχίνες είναι δυνατό να απορροφηθούν κι από τη στοματική κοιλότητα. Μετά από κατανάλωση δόσης πράσινου τσαγιού ισοδύναμης με 2-3 φλιτζάνια τσαγιού, παρατηρήθηκαν μέγιστα επίπεδα EGC, EGCG και EC εντός ολίγων λεπτών. Τα επίπεδα αυτά ήταν πολύ υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα στο πλάσμα. Επιπροσθέτως, η κατακράτηση διαλύματος τσαγιού στη στοματική κοιλότητα για λίγα λεπτά, οδήγησε σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα κατεχινών, ενώ η χορήγηση στερεών τσαγιού υπό τη μορφή κάψουλας δεν έδωσε ανιχνεύσιμα επίπεδα κατεχινών. Η κατακράτηση διαλύματος EGCG στη στοματική κοιλότητα οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων EGCG και EGC στο σάλιο γεγονός που υποδηλώνει ότι ο EGCG μετατρέπεται σε EGC στη στοματική κοιλότητα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας εστεράσης κατεχινών (Yang *et al*, 1999).

Απορρόφηση κατεχινών μετά από προσθήκη γάλατος στο τσάι

Ορισμένες πολυφαινόλες σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες. Έχει προταθεί λοιπόν, ότι η προσθήκη γάλατος σε μαύρο τσάι μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών. Πράγματι, η προσθήκη γάλατος σε μαύρο και πράσινο τσάι, ανέστειλε την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, ενώ δεν επηρεάστηκε η συγκέντρωση των κατεχινών. Εξήχθη λοιπόν το συμπέρασμα ότι η ανασταλτική επίδραση του γάλατος στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος ίσως οφείλεται σε μείωση άλλων αντιοξειδωτικών εκτός από κατεχίνες (Wollgast and Anklam, 2000; Hollman *et al*, 2001).

Απορρόφηση προκυανιδίνης

Στο όξινο γαστρικό περιβάλλον, τα олиγομερή προκυανιδίνης υδρολύονται προς μίγματα μονομερών και διμερών επικατεχίνης κι έτσι αυξάνεται η δυνατότητα απορρόφησής τους από το λεπτό έντερο (Spencer *et al*, 2000). Επίσης έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης προκυανιδίνης και της συγκέντρωσης της στο πλάσμα (Wang *et al*, 2000).

A.4.4. Μεταβολισμός

Μετά την απορρόφηση των πολυφαινολών ακολουθεί ο μεταβολισμός, για τον οποίο, τα περισσότερα στοιχεία προέρχονται από μελέτες σε ζώα.

Σε μία μελέτη, η έγχυση φλαβανόλων στο δωδεκαδάκτυλο είχε ως αποτέλεσμα τη σύζευξη αυτών με γλυκουρονίδια (περίπου 45%), τη μεθυλίωση (περίπου 30%) ή και τα δύο (περίπου 20%) κατά την μεταφορά τους από τα εντεροκύτταρα στον ορογόνο χιτώνα. Το γεγονός αυτό δείχνει τη δραστηριότητα μίας κατεχολικής-Ο-μεθυλ-τρανσφεράσης στο μεταβολισμό των φλαβανόλων και υποδηλώνει ότι οι μεταβολίτες ίσως εισέρχονται στην πυλαία κυκλοφορία. Αντίθετα, με έγχυση στον ειλεό, οι φλαβανόλες εμφανίζονταν στην ορογόνα πλευρά χωρίς να έχουν μεταβολιστεί και το συνολικό ποσοστό των φλαβανόλων που μεταφέρονταν ήταν υψηλότερο σε σχέση με αυτό στο δωδεκαδάκτυλο (Kuhnle *et al*, 2000). Οι φαινολικές ουσίες που απορροφώνται μεταβολίζονται από το ήπαρ (Scalbert and Williamson, 2000). Εκεί οι υδροξυλικές ομάδες των ανένταμων μορίων υφίστανται σύζευξη με γλυκουρονικό ήθειικό οξύ (Wollgast and Anklam, 2000). Το μεγαλύτερο μέρος των μεταβολιτών υφίσταται μεθυλίωση στο ήπαρ (Manach *et al*, 1999). Από το ήπαρ οι φαινολικές ουσίες εκκρίνονται στη χολή και καταλήγουν στο παχύ έντερο (Scalbert and Williamson, 2000). Εκεί, οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο κόλον υδρολύουν τα συζευγμένα μόρια κι έτσι ελευθερώνεται το τμήμα αγλυκόνης το οποίο μπορεί να απορροφηθεί. Επίσης, τα συζευγμένα μόρια μπορεί να επαναπορροφηθούν και να εισέλθουν στην εντεροηπατική κυκλοφορία. Η μικροχλωρίδα του παχέως εντέρου συντελεί και στην διάσπαση του ετεροκυκλικού δακτυλίου των φλαβονοειδών οπότε παράγονται διάφορα φαινολικά οξέα. Στην περίπτωση της κατεχίνης έχουν εντοπισθεί και ενδιάμεσοι μεταβολίτες που είναι οι δ-φαινυλ-βαλερολακτόνες. Τα φαινολικά οξέα απορροφώνται και απεκκρίνονται στα ούρα.

Όσον αφορά στην κατανομή των πολυφαινολών στους ιστούς, λίγα είναι γνωστά. Σημαντικά ποσά EGC και EC έχουν βρεθεί στον οισοφάγο αρουραίου, στο παχύ έντερο, στους νεφρούς, στην χοληδόχο κύστη, στους πνεύμονες και στον προστάτη. Μικρότερα

ποσά βρέθηκαν στο συκώτι, στη σπλήνα, στην καρδιά και στο θυρεοειδή αδέννα. Το ποσό του EGCG ήταν μεγαλύτερο στον οισοφάγο και στο παχύ έντερο λόγω της άμεσης επαφής και χαμηλότερο στα άλλα όργανα λόγω της χαμηλής απορρόφησης του EGCG στη συστηματική κυκλοφορία (Yang *et al*, 1999).

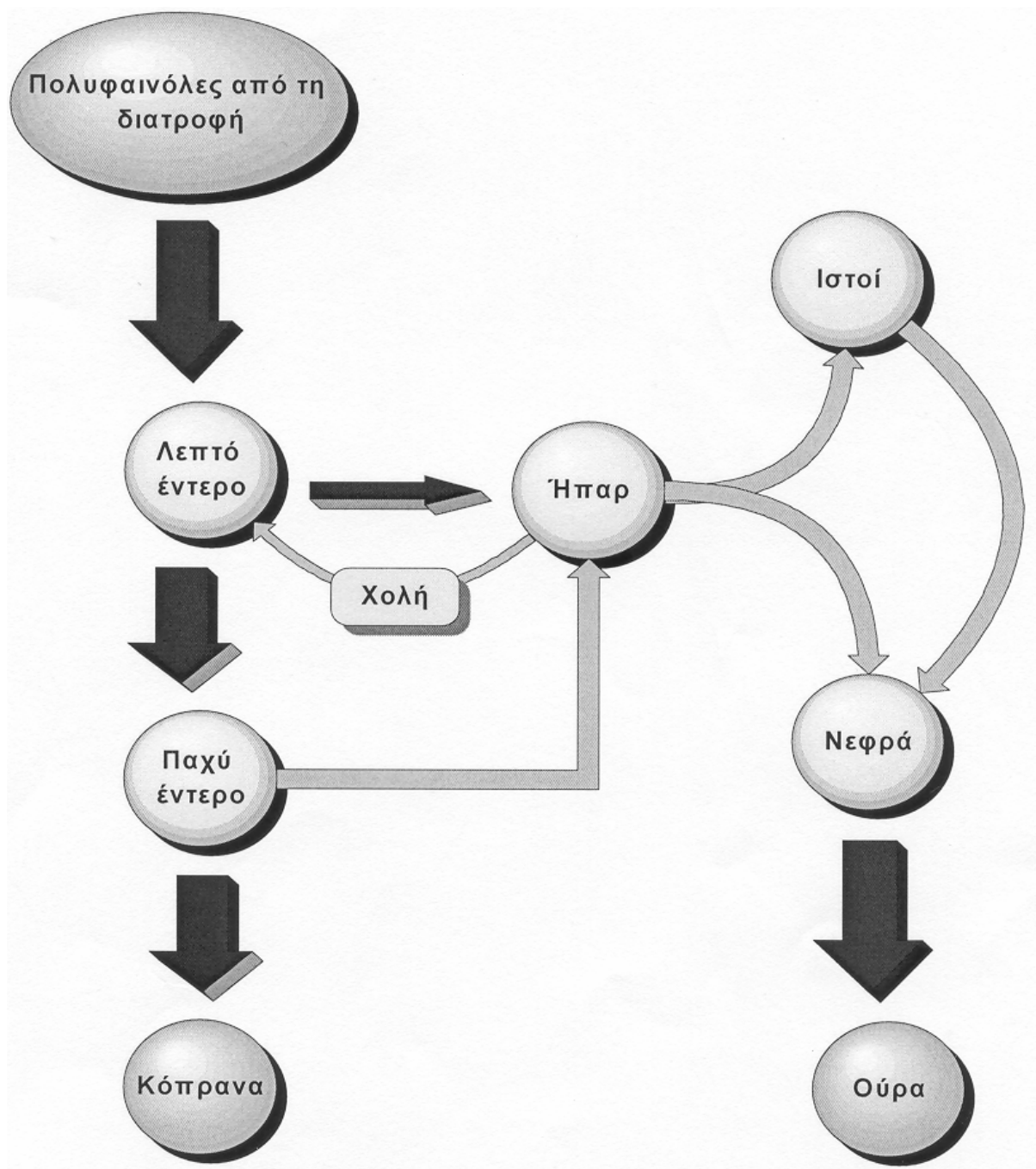
A.4.5. Απέκκριση

Η απέκκριση των προσλαμβανόμενων πολυφαινολών γίνεται μέσω δύο οδών. Για τις φαινολικές ουσίες που δεν απορροφήθηκαν από το λεπτό έντερο, ούτε μεταβολίστηκαν από τη μικροβιακή χλωρίδα του του παχέος εντέρου οπότε και δεν απορροφήθηκαν από αυτό, η απέκκριση γίνεται από το γαστρεντερικό σωλήνα με τα κόπρανα. Οι φαινόλες που έχουν διαπεράσει το γαστρεντερικό σωλήνα και έχουν εισέλθει στον οργανισμό, καταλήγουν στα νεφρά όπου αυτούσιες ή με τη μορφή μεταβολιτών απεκκρίνονται με τα ούρα (Scalbert and Williamson, 2000).

Μετά από χορήγηση πράσινου τσαγιού, βρέθηκαν σε δείγματα ούρων ανθρώπου, ποντικού και αρουραίων μονογλυκουρονίδια και μονοθειϊκοί εστέρες EGC και (-)-επικατεχίνης. Επίσης έχουν βρεθεί O-μεθυλ-EGC-O-γλυκουρονίδια και O-θειϊκή-επικατεχίνη σε δείγμα ανθρώπινων ούρων. Η (-)-5-(3',4',5'-τριυδροξυφαινυλ)-γ-βαλερολακτόνη (M4) και η (-)-5-(3',4'-διυδροξυφαινυλ)-γ-βαλερολακτόνη (M6) που είναι μεταβολίτες της EGC και της (-)-επικατεχίνης βρίσκονται επίσης στα ούρα είτε ως μονογλυκουρονίδια, είτε με τη μονοθειϊκή μορφή (Li *et al*, 2001).

Η κατανάλωση πράσινου τσαγιού οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα κατεχινών στα ούρα σε σχέση με το μαύρο τσάι. Επίσης ο EGCG, εν αντιθέσει με την EC και την EGC, απεκκρίνεται κυρίως μέσω της χολής κι όχι μέσω των ούρων (van het Hof *et al*, 1999). Περισσότερο από το 90% της συνολικής ποσότητας των EGC και EC που ανευρίσκεται στα ούρα, απεκκρίνεται μέσα σε 8 ώρες από την κατανάλωση (Yang *et al*, 1999).

Η απορρόφηση, ο μεταβολισμός και η απέκκριση των πολυφαινολών συνοψίζεται στο σχήμα 7.



Σχήμα 7. Απορρόφηση, μεταβολισμός και απέκκριση πολυφαινολών (Scalbert and Williamson, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

A.5. Ανάλυση των πολυφαινολών των αφεψημάτων

Με βάση τα όσα ειπώθηκαν για τις ευεργετικές δράσεις των πολυφαινολών ο προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου σε βότανα και αφεψήματα καθίσταται ιδιαίτερα σημαντικός. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει τα φύλλα των βοτάνων, αλλά κυρίως τα αφεψήματα αυτών να αναλυθούν πλήρως ως προς το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Άλλωστε, για τη διατύπωση οποιασδήποτε επισήμανσης υγείας απαιτείται η συλλογή στοιχείων για τις πολυφαινολικές ενώσεις των φύλλων των βοτάνων καθώς και για τα αφεψήματα τους. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών.

A.5.1. Μέθοδοι ανάλυσης πολυφαινολών

Μία αρκετά διαδεδομένη μέθοδος προσδιορισμού των πολυφαινολών είναι η αντίδραση Folin – Ciocalteu. Πρόκειται για μία μη ειδική μέθοδο με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες. Αντίθετα η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), συντελεί στο διαχωρισμό και στην ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ανάλυσης με HPLC. Στις περισσότερες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούνται στήλες ανάστροφης φάσης ή διαφορετικές στήλες για σύγκριση των δεδομένων. Υδατικά διαλύματα μεθανόλης ή ακετονιτριλίου συχνά χρησιμοποιούνται ως κινητές φάσεις έκλουσης και μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη στην κινητή φάση μικρής ποσότητας οξικού ή μυρμηκικού οξέος βελτιώνει το διαχωρισμό. Ακόμη, χρησιμοποιούνται διάφοροι ανιχνευτές όπως UV, ηλεκτροχημικοί, φθορισμομετρικοί, χημειοφωταύγειας κτλ. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι για τις κατεχίνες του τσαγιού ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής είναι χίλιες φορές πιο ευαίσθητος από τον UV ανιχνευτή. Πρόσφατα, η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται αρκετά συχνά για την παραλαβή των πολυφαινολών πριν το δείγμα αναλυθεί με HPLC. Για την ποιοτική αξιολόγηση του τσαγιού, έχει προταθεί η μέθοδος τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης. Με αυτή τη μέθοδο μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα οι κατεχίνες, η καφεΐνη και το ασκορβικό οξύ.

Όσον αφορά στους γλυκοζίτες φλαβονολών, λίγα πρότυπα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο για να βασιστεί σε αυτά η ταυτοποίηση. Για το λόγο αυτό, η ταυτοποίηση τους

γίνεται με εναλλακτικές μεθόδους πχ. UV-, ^1H -, ^{13}C -NMR φασματοσκοπία κτλ. Έτσι, η υδρόλυση των γλυκοζιτών σε αγλυκόνες πριν την ανάλυση με HPLC αποτελεί μία πρακτική μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των φλαβονοειδών (Wang *et al*, 2000).

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται οι μέθοδοι ανάλυσης που έχουν εφαρμοστεί σε τσάι και βότανα για τον προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυσή τους.

A.5.2. Συνοπτική παρουσίαση μελετών

Πίνακας 12: Σύνοψη μελετών σε τσάγια και βότανα για την περιεκτικότητά τους σε ολικές PP και το φαινολικό τους προφίλ

A/A	ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ-ΕΤΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΙ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
1.	Hoefler <i>et al</i> , 1976	RP-HPLC ¹	Πράσινο τσάι, μαύρο τσάι	Πράσινο: φλαβονόλες (EGC, EC, +C, EGCG, ECG) και καφεΐνη Μαύρο: θειαφλαβίνες (TFi, TF ₂ A, TF ₂ B, TF ₃ , TF ₄), γαλλικό οξύ και καφεΐνη
2.	Piretti <i>et al</i> , 1990	Ακετυλίωση PP, HPLC με στήλη cyano-silica (TLC)	Πράσινο τσάι	Συγκεντρώσεις (mg/L): +C-7, EC-55, EGC-164, ECG-150, EGCG-528
3.	Yong <i>et al</i> , 1993	Thermospray LC-MS-MS, CID ²	Camelia Sinensis	EC, EGC, ECG, EGCG, εσπεριδίνη, απιγενίνη, κεμπφερόλη, κερκετίνη, ρουτίνη
4.	Goto <i>et al</i> , 1996	Ποσοτική ανάλυση: παραλαβή με μίγμα ακετονιτριλίου-νερού (1:1, v/v) / Ποιοτική ανάλυση: HPLC με στήλη ODC	Πράσινο τσάι (Sencha, Matcha)	Ταυτοποιήθηκαν: EC, EGC, ECG, EGCG, με τον EGCG να επικρατεί σε όλα τα δείγματα (μ.ο. 7.65% του ξηρού βάρους), ενώ το πλουσιότερο σε PP τσάι ήταν μια ποικιλία Sencha (1.1% EC, 4.39% EGC, 1.73% ECG, 9.26% EGCG), το οποίο είχε επίσης και τη λιγότερη καφεΐνη (3.07%)

5	Horie <i>et al</i> , 1996	CZE ³	Πράσινο τσάι (Sencha πρώτου και δεύτερου καθαρισμού, Gyokuro, κονσέρβας)	EC, EGC, ECG, EGCG, +C, καφεΐνη, θεανίνη, ασκορβικό οξύ, με τον EGCG να επικρατεί πάλι σε όλα τα δείγματα (537.1 mg/L στο Sencha), πλουσιότερο σε PP τσάι το Sencha πρώτου καθαρισμού με τα υπόλοιπα να ακολουθούν με τη σειρά που αναφέρονται στα δείγματα, και πλουσιότερο σε ασκορβικό οξύ το κονσερβοποιημένο τσάι, όπου προστίθεται τεχνητά.
6	Amarowicz <i>et al</i> , 1996	Εκχύλιση και ανάλυση με CCC ⁴ , χρωματογραφία στήλης, φασματοφωτομετρία στα 280 και 500 nm, TLC ⁵ , UV-VIS ⁶ φασματοσκοπική νάλυση, HPLC, ¹ H – NMR ⁷	Πράσινο τσάι	Σε 0.5 g ακατέργαστων κατεχινών προσδιορίστηκαν: 27 mg EC, 62 mg EGC, 14 mg ECG, 56 mg EGCG. Rf: 0.39, 0.28, 0.3, 0.19 αντίστοιχα. Οι χρόνοι κατακράτησης στην ημιπαρασκευαστική HPLC ήταν: 9.1, 8.21, 14.85, 9.82 και στην αναλυτική HPLC: 6.05, 4.29, 12.45, 7.08, αντίστοιχα. Η αιθανόλη χαρακτηρίστηκε καλός διαλύτης για το διαχωρισμό των κατεχινών του πράσινου τσαγιού.

7	Zhu <i>et al</i> , 1997	Εκχύλιση και ανάλυση των κατεχινών κατά τη μέθοδο Agarwal <i>et al</i> (1992), HPLC	Πράσινο τσάι (Longjing)	Εξέταση της σταθερότητας των κατεχινών σε: α) δикаρβονικό ρυθμιστικό δ/μα Krebs-Ringer: μέσα σε λίγα μόνο λεπτά το χρώμα τους αλλάζει από ανοιχτό σε σκούρο καφέ, δηλαδή οξειδώνονται (εξαιτίας της επίδρασης ειδικά του αλκαλικού δ/τος 32.5 mM NaHCO ₃ , που περιέχεται στο δ/μα Krebs-Ringer), β) pH: όταν > 8 => αποσυντίθενται μέσα σε λίγα λεπτά, όταν < 4 => σταθερές, ειδικά οι EC και ECG, για > 18h, και γ) σε νερό υπό βρασμό, όπου επίσης έδειξαν μεγάλη σταθερότητα (απώλεια μόνο 15% σε 7h)
8	Miketova <i>et al</i> , 1997	Εκχύλιση των κατεχινών με αιθανόλη και ανάλυση με στήλη silica gel ⁸ , EIMS ⁹ και FABMS ¹⁰ , LC/ ESIMS ¹¹ με ανίχνευση UV στα 220nm, ¹ H- ¹³ C NMR	Πράσινο τσάι-Camelia sinensis	Δεδομένα για ιόντα (A, B, MH ⁺ , MH ⁺ +G) σημαντικά για τη δομή των κατεχινών C, EC, EGC, ECG, EGCG, αλλά και 6 θειογλυκερολών
9	Dalluge <i>et al</i> , 1997a	CLC ¹² /ESIMS	Πράσινο τσάι (Lung Ching)	Ταυτοποιήθηκαν στο τσάι: EC, EGC, ECG, EGCG, GCG, +C (τα δυο τελευταία είχαν τις χαμηλότερες κορυφές) και στο ανθρώπινο πλάσμα:

10	Dalluge <i>et al</i> , 1997b	RP-HPLC, σύγκριση ενός συστήματος διαχωρισμού ευθείας κλίσης με ultrapure silica vs των συμβατικών μονομερών και πολυμερών C-18 στηλών)	Πράσινο τσάι-Camelia sinensis	C (mg/ g φύλλων τσαγιού): 3.76 EC, 15.4 EGC, 3.15 ECG, 21.7 EGCG, 0.6 +C, 0.621 GCG. Πλεονεκτήματα μεθόδου: α) ↑ απόδοσης χρωματογραφίας, β) ολοκληρωμένος διαχωρισμός όλων των αναλυτών και των ισομερών, και γ) δυνατότητα ανάλυσης εκχυλισμάτων πράσινου τσαγιού άμεσα.
11	Conde <i>et al</i> , 1997	Εκχύλιση με μεθανόλη/νερό (80:20) HPLC TLC GC/MS	Eucalyptus camaldulensis E. globulus E. Rudis (Ευκάλυπτος)	Ταυτοποιήθηκαν:-Βανιλίνη -Φαινολικά οξέα (γαλλικό, πρωτοκατεχικό, ελλαγικό) -Γλυκοζίτες φλαβονολών (ρουτίνης, κερκετίνης,καΐμπφερόλης) -1 φλαβανόνη (ναρινγκίνη) -2 φλαβόνες (λουτεολίνη και απιγενίνη)

12	Nelson <i>et al</i> , 1998	ME CLC	Πράσινο <i>τσάι-Camelia sinensis</i> σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες: Lung Ching, κοινό A, κοινό B	Ταχύς διαχωρισμός κατεχινών, (σε 13 min, σε βέλτιστο PH=8 και συγκέντρωση ρυθμιστικού δ/ματος~ 20mmol/L). Η καφεΐνη εκλύεται πρώτη. Ακολουθούν οι απλές κατεχίνες (C, EC, EGC) και τελευταίες οι πιο σύνθετες (ECG, EGCG, GCG). Όμως, ο διαχωρισμός μεταξύ των ισομερών της ίδιας ομάδας είναι ποιοτικά ασθενέστερος. Αυτός βελτιώνεται με την προσθήκη ανιονικών μικυλλίων ή μεθανόλης (υψηλές συγκεντρώσεις, όμως, αυτών αυξάνουν και το <i>χρόνο</i> έκλυσης). Συγκεκριμένα οι EGCG, GCG διαχωρίζουν τέλεια με την προσθήκη της β-κυκλοδεξτρίνης, ως χημικού τροποποιητή (όχι όμως και α-κδ) ακόμα και στη χαμηλή συγκέντρωση του 0.1 mmol/L. Ποσοτικά επικρατέστεροι ήταν: ο EGCG στο Lung Ching (19.6 mg/g), ο EGC στο κοινό A (17,9), όπως και στο κοινό B (20.1)
13	Poon <i>et al</i> , 1998	LC/ESIMS και TMS ¹³	3 ανεξάρτητα εκχυλίσματα τσαγιού	Ταυτοποιήθηκαν: +C, EGCG, EGC, γαλλικό οξύ, ECG, και άλλα 4 συστατικά, πιθανότατα ανάλογα των κατεχινών.

14	Horie <i>et al</i> , 1998	CE ¹⁴ , DAD	Oolong (Κίνα), μαύρο (Ινδία) και πράσινο τσάι (διαφορετικών ημερομηνιών συλλογής, και δείγματα από ποικίλα σημεία του φυτού)	Προσδιορίστηκαν σε όλα τα τσάγια (υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν σε µg/mL, ήταν στο Pompadour): καφεΐνη - 770.8, αδεΐνη - 45.9 (όχι στα Burco, Akfa, Rize), EGC - 85.2 (όχι στα Hornimans, CayCiceg, Filiz, Demcay, Rize), EC - 97.33, +C - 32.06, EGCG - 316.4, ECG -177.4, γαλλικό οξύ - 88.14
15	Arce <i>et al</i> , 1998	CE συζευγμένη με FIA ¹⁵ , ανιχνευτής UV	Εμπορικό πράσινο και μαύρο τσάι: Pompadour, Hornimans, Burco, Akfa, CayCiceg, Filiz, Demcay, Rize)	α) πράσινο τσάι, 7 συστατικά: -θεανίνη, καφεΐνη, EGC, EC, EGCG, ECG, ασκορβικό οξύ- β)oolong: μικρότερο εμβαδό κορυφής για πολυφαινόλες, ενώ της θεανίνης και του AsAc σχεδόν εξαφανισμένες, και γ) του μαύρου: οι EGC, EC ανιχνεύτηκαν σε ίχνη, μη ανιχνευσιμη θεανίνη, AsAc. Ο ανθός περιείχε μεγαλύτερες ποσότητες: θεανίνη, EGCG, ECG και καφεΐνη. Τα πιο ώριμα φύλλα μεγαλύτερες ποσότητες: EGC, EC.
16	Ogawa <i>et al</i> , 1999	LC με ανίχνευση UV και χημειοφωταύγεια ¹⁶ , LC/ESI-MS	Πράσινο τσάι- Thea sinensis L.	Εκλούστηκαν με τη σειρά: +C, EGCG, EC, με την τελευταία να επιδεικνύει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.
17	Nakakuki <i>et al</i> , 1999	HPLC με χρήση προστήλης PVPP	Πράσινο και μαύρο τσάι	Ανάλυση μεθυλιωμένων ξανθινών του τσαγιού που μέχρι στιγμής επικαλύπτονταν από τις PP του. Συγκέντρωση καφεΐνης - 2.21/2.74 (% στο πράσινο / μαύρο τσάι αντίστοιχα) και της θεοβρωμίνης - 0.06/0.15.

18	Degenhardt <i>et al</i> , 2000	HS-CCC ¹⁷ , HPLC, δοκιμασία TEAC ¹⁸	Μαύρο τσάι	Απομόνωση θειαφλαβινών, επιθειαφλαβικών οξέων κι κλάσματος πολυμερών (αποτελούμενο κυρίως από SII θειαρουμπιγίνες και με συγκέντρωση ολικών φαινολών: 34.7 g /100 g ως ισοδύναμα GA), το οποίο επέδειξε αντιοξειδωτική δράση: 3.6 mmol ισοδυνάμου Trolox /g.
19	Wong <i>et al</i> , 2001	Χρωματογραφία στήλης	Πικρό τσάι Κίνας- Ligustrum purpurascens	Ταυτοποίηση: ακτεοσίδη (ισοακτεοσίδη σε ζέων ύδωρ), ligupurpurosides A, cis-ligupurpurosides B, trans-ligupurpurosides B και osmanthusides B. Το κλάσμα γλυκοζιτών (εκτός των τριών τελευταίων) είχε ισχυρή προστατευτική δράση (σε συγκέντρωση 5-40 μM) κατά της οξείδωσης της LDL και της α-τοκοφερόλης, συγκρίσιμη με αυτή του ECG.
20	Khokhar <i>et al</i> , 2002	Εκχύλιση με βραστό νερό για 5 min ή με 80% μεθανόλη ή με 70% αιθανόλη RP-HPLC	Camelia sinensis (Τσάι)	Μαύρο τσάι Πράσινο τσάι (mg/g ξηρού βάρους) -Ολικές pp: 80,5-134,9 87-106,2 -Κατεχίνες: 5,6-47,5 51,5-84,3 -Καφεΐνη: 22-28 11-20 EGCG>ECG>EC>EGC>C

21	Lin <i>et al</i> , 2003	Εκχύλιση με βραστό νερό για 30 min ή με 75% αιθανόλη για 30 min RP-HPLC	10 διαφορετικά είδη <i>Camelia sinensis</i> (Τσάι)	Βρέθηκε ότι τα επίπεδα των συνολικών κατεχινών στο λουλούδι του τσαγιού κυμαίνονται από 10-38 mg/g ενώ της καφεΐνης από 3-8 mg/g vs. 2-126 και 23-49 mg/g αντίστοιχα στα φύλλα τσαγιού
22	Bano <i>et al</i> , 2003	Εκχύλιση με DMSO ²⁰ HPLC ανάλυση	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Δενδρολίβανο)	Βρέθηκαν: -Φαινολικά διπερπένια (καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 12-O-μέθυλοκαρνοσικό οξύ) -Ροσμαρινικό οξύ (↑ C) -Φλαβόνες
23	Pineiro <i>et al</i> , 2004	Εκχύλιση με πεπιεσμένα υγρά (μεθανόλη, αιθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα, νερό) HPLC ανάλυση	Φύλλα τσαγιού	Προσδιορισμός κατεχίνης & επικατεχίνης Η μεθανόλη έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα (μέγιστη θερ/σια εκχύλισης 130 οC, 10 min)

- ¹ RP-HPLC: Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography, Υψηλής Πίεσης Υγρή Χρωματογραφία, Ανάστροφης Φάσης.
- ² CID: Collision-induced dissociation, Διάσπαση Υποκινημένη από Πρόσκρουση
- ³ CZE: Capillary Zone Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς Ζώνης
- ⁴ CCC: Countercurrent Chromatography, Χρωματογραφία Αντίστροφου Ρεύματος
- ⁵ TLC: Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
- ⁶ UV-VIS: UltraViolet- Visible, Υπεριώδες- Ορατό (φάσμα)
- ⁷ ¹H-NMR: Proton Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (μέθοδος φασματομετρίας)
- ⁸ silica gel: οξείδιο του πυριτίου , πυρίτιο (SiO₂)
- ⁹ ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry, Φασματομετρία Μαζών Ηλεκτροψεκασμού, παρέχει τόσο το μοριακό βάρος (MB) όσο και πληροφορίες για τη δομή, συμπεριλαμβανομένου της επιμέρειας, για τα C, EC, EGC, αλλά και κάποιες πληροφορίες για τη δομή των ECG, EGCG.
- ¹⁰ FAB/MS: Fast Atom Bombardment- MS, MS δια Βομβαρδισμού με Ταχεία Άτομα, δίνει το MB και πληροφορίες για τη δομή, μέσω ενός μηχανισμού retro-Diels-Alder, για όλες τις κατεχίνες.
- ¹¹ LC/ESI-MS: Liquid Chromatography / ESI-MS δίνει το MB για όλες τις κατεχίνες και κάποιες πληροφορίες για τη δομή των ECG, EGCG. Είναι μια μέθοδος κατάλληλη για την ανάλυση ακατέργαστων εκχυλισμάτων τσαγιού.
- ¹² CLC: Capillary LC, Τριχοειδής LC
- ¹³ TMS: Tandem Mass Spectrometry, Συζευγμένη MS, αλλιώς και MS/ MS
- ¹⁴ CE: Capillary Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς
- ¹⁵ FIA ή FIS: Flow Injection Analyses ή System, Ανάλυση με Έγχυση Δείγματος σε Ροή Αντιδραστηρίου
- ¹⁶ Χημειοφωταύγεια (chemiluminescence): προέρχεται από φωτεινή ροή και την ανιονική ρίζα υπεροξειδίου του οξυγόνου (O₂⁻), που δημιουργείται από τη ενζυμική αντίδραση της οξειδάσης της ξανθίνης με την υποξανθίνη.
- ¹⁷ HS-CCC: High-Speed CCC, Υψηλής Ταχύτητας CCC
- ¹⁸ TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
- ¹⁹ DMSO: Ethanol, Methanol, Dimethyl Sulfoxide, Διμέθυλοσουλφοξείδιο

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών.

B.1.1. Όργανα / Υλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Ζυγός ακριβείας (Ohaus, Analytical Standard)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μ L και των 100 μ L
- VORTEX (MS1 Minishaker) στις 1800 στροφές

B.1.2. Αντιδραστήρια

Τα πρότυπα πολυφαινολών και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι :

- Κιναμμικό (Fluka, 96340)
- *m*-Υδρόξυ βενζοϊκό οξύ (Sigma, H-5376)
- *m*-Φαινυλοξικό (Sigma, H-4377)
- Πρωτοκατεχικό (Sigma, P-5630)
- *m*-Κουμαρικό (Sigma, C-9008)
- Γαλλικό οξύ (Sigma, G-7384)
- Φερουλικό (Sigma, F-3500)
- Καφεϊκό οξύ (Sigma, C-0625)
- Τυροσόλη (Fluka, 56105)
- Ομοβανιλλικό
- Απιγενίνη (Sigma, A-3145)
- 3,4 Διυδρόξυ – φαινυλοξικό (Fluka, 37860)
- Βανιλλικό οξύ (Serva, 38120)
- Ολεανολικό οξύ (Aldrich Chem Co, 30,170-1)
- Επικατεχίνη (Fluka, 45300)
- Γαλλοκατεχίνη (Sigma, G-6657-1MG)
- Γαλλικός εστέρας κατεχίνης (Sigma, C-0692)

- Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (Sigma, E-4143)
- Βανιλίνη (Sigma, V-2375)
- σ – Αμιρίνη (Extrasynthese, 01080704)
- +/- Κατεχίνη (Sigma, C-1788)
- Ρουτίνη (Sigma, R-5143)
- 3-(4-Υδρόξυ-φαινυλ)προπιονικό οξύ (Aldrich Chem Co, H5,240-6)
- Κερκετίνη (Sigma, Q-0125)
- Ελαγικό οξύ (Sigma, E-2250)
- o – Κουμαρικό οξύ (Fluka, 28170)
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% Trimethylchlorosilan (TMCS)
- Δις-απεσταγμένο νερό EASYPURE-RF

B.1.3. Εκτέλεση

Παρασκευή μητρικού (stock) διαλύματος πολυφαινολών σε μεθανόλη.

- Ζυγίζεται επακριβώς συγκεκριμένη ποσότητα κάθε πολυφαινόλης με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων
- Προστίθεται ακριβής ποσότητα MeOH (με μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μ L)
- Ακολουθεί ανάδευση σε VORTEX
- Αμέσως μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα πολυφαινολών φυλάσσονται στο ψυγείο στους – 20 °C.

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις μητρικών προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών

A/A	Πολυφαινόλη	Βάρος (mg)	Όγκος MeOH που προστέθηκε (mL)	Συγκέντρωση (mg/ mL)
1	Κιναμμικό	28,8	3	9,6
2	π – Υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	30,9	3	10,3
3	π – Υδρόξυ φαινυλοξικό	30,6	3	10,2
4	Πρωτοκατεχικό	30,9	3	10,3
5	π – Κουμαρικό	29,7	3	9,9
6	Γαλλικό οξύ	30,8	3	10,27

7	Φερουλικό	30,7	3	10,23
8	Καφεϊκό οξύ	29,2	3	9,73
9	Τυροσόλη	1,3 και 3	1 και 3	1,3 και 1
10	Ομοβανιλλικό	1,8	2	0,9
11	Απιγενίνη	1,2	2	0,6
12	3,4 Διυδρόξυ – φαινυλοξικό	17,8	2	$8,9 \Rightarrow 0,89$
13	Βανιλλικό οξύ	19,5	2	$9,75 \Rightarrow 0,975$
14	Ολεανολικό οξύ	1,7	2	0,85
15	Επικατεχίνη	2,4	2	1,2
16	Γαλλοκατεχίνη	1	1	1
17	Γαλλικός εστέρας κατεχίνης	1,2	1	1,2
18	Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	4,3	4	1,075
19	Βανιλίνη	11	5	2,2
20	α – Αμιρίνη	1,8	1	1,8
21	+/- Κατεχίνη	12,6	5	2,52
22	Ρουτίνη	13,3	5	2,66
23	3-(4-Υδρόξυ- φαινυλ)προπιονικό οξύ	14,1	5	2,82
24	Κερκετίνη	12,5	5	2,5
25	Ελαγικό οξύ	12,9	5 ³	2,58
26	σ -Κουμαρικό οξύ	3	3	1

Στους δοκιμαστικούς σωλήνες υπ' αριθμόν 12 και 13 έγινε περαιτέρω αραιώση (1:10) με MeOH οπότε προέκυψαν συγκεντρώσεις 0,89 mg/ mL και 0,98 mg/ mL αντίστοιχα.

³ Το ελαγικό οξύ δεν διαλύεται σε μεθανόλη οπότε εξατμίζεται ο διαλύτης και ο δοκιμαστικός σωλήνας φυλάσσεται στο ψυγείο.

B.1.4. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών για την ανάλυση με χρωματογραφία HPLC.

Για την ανάλυση των προτύπων πολυφαινολών με χρωματογραφία HPLC έγιναν κατάλληλες αραιώσεις των αρχικών διαλυμάτων. Στην περίπτωση των δειγμάτων με αύξοντα αριθμό 9 –18 έγινε αραιώση 1:10 με μεθανόλη. Οι νέες συγκεντρώσεις που προκύπτουν παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα.

Πίνακας 14.

A/A	Πολυφαινόλη	Συγκέντρωση (mg/ mL)
9	Τυροσόλη	0,13
10	Ομοβανιλλικό	0,09
11	Απιγενίνη	0,06
12	3,4 Διυδρόξυ – φαινυλοξικό	0,089
13	Βανιλλικό οξύ	0,0975
14	Ολεανολικό οξύ	0,085
15	Επικατεχίνη	0,12
16	Γαλλοκατεχίνη	0,1
17	Γαλλικός εστέρας κατεχίνης	0,12
18	Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	0,1075

Για την ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών με αύξοντα αριθμό 1 – 8 έγινε αραιώση 1:100 (2 διαδοχικές αραιώσεις 1:10)

Οι νέες συγκεντρώσεις που προκύπτουν παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα.

Πίνακας 15.

A/A	Πολυφαινόλη	Συγκέντρωση (mg/ mL)
1	Κιναμμικό	0,1023
2	<i>π</i> – Υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	0,096
3	<i>π</i> – Υδρόξυ φαινυλοξικό	0,103
4	Πρωτοκατεχικό	0,099
5	<i>π</i> – Κουμαρικό	0,0973
6	Γαλλικό οξύ	0,1027
7	Φερουλικό	0,103
8	Καφεϊκό οξύ	0,102

Σε όλα τα δείγματα οι αραιώσεις έγιναν με δις-απεσταγμένο νερό με εξαίρεση το κινναμικό οξύ στο οποίο η αραιώση έγινε με μεθανόλη.

Επιπροσθέτως, παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει μίγμα των 8 ανωτέρω πολυφαινολών. Η τελική συγκέντρωση κάθε πολυφαινόλης στο διάλυμα αυτό είναι αυτή που φαίνεται στον πίνακα 15. το διάλυμα αυτό προέκυψε με ανάμιξη προτύπων διαλυμάτων της κάθε πολυφαινόλης ακολουθούμενη από κατάλληλη αραιώση, ήτοι: 1:10 για τα διαλύματα των ενώσεων με αύξοντα αριθμό 1-18 του πίνακα 13.

Για τα πρότυπα διαλύματα πολυφαινολών με αύξοντα αριθμό 19 – 24 ακολουθείται η εξής διαδικασία: έγινε 1:10 αραιώση και παράλληλα παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε μίγμα των 6 πολυφαινολών με τελική συγκέντρωση αυτή του πίνακα 16.

Πίνακας 16.

A/A	Πολυφαινόλη	Συγκέντρωση (mg/ mL)
19	Βανιλίνη	0,22
20	<i>σ</i> – Αμιρίνη	0,18
21	+/- Κατεχίνη	0,252
22	Ρουτίνη	0,266
23	3-(4-Υδρόξυ-φαινυλ)προπιονικό οξύ	0,282
24	Κερκετίνη	0,25

B.1.5. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων πολυφαινόλων για την ανάλυση με χρωματογραφία GC/ MS.

Από κάθε πρότυπο διάλυμα πολυφαινόλης με αύξοντα αριθμό 1 – 8 και 12, 13 του πίνακα 13 μεταφέρονται από 100 μL σε 1 δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο προστίθενται 4 mL μεθανόλης οπότε ο συνολικός όγκος είναι 5 mL (διάλυμα Α).

Από το διάλυμα Α λαμβάνονται 250 μL , εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και προστίθενται 250 μL BSTFA (XP11).

Επιπλέον από το διάλυμα Α προκύπτει νέο διάλυμα με 1:10 αραιώση. Ακολουθεί εξατμισή μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και προστίθενται με 250 μL BSTFA (XP12).

Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα που περιέχει μίγμα των πολυφαινόλων με αύξοντα αριθμό 9, 15 – 18, 21 και 26 με συγκεντρώσεις που φαίνονται στον πίνακα 17.

Από το διάλυμα που προκύπτει λαμβάνονται 500 μL τα οποία μεταφέρονται σε vial. Ακολουθεί εξατμισή μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και προσθήκη 250 μL BSTFA (XP71).

Επιπλέον στο XP12 διάλυμα γίνεται 1:10 αραιώση και λαμβάνονται 500 μL τα οποία μεταφέρονται σε vial. Ακολουθεί εξατμισή μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και προστίθενται 250 μL BSTFA (XP72).

Πίνακας 17.

A/A	Πολυφαινόλη	Συγκέντρωση (mg/ mL)
9	Τυροσόλη	0,2
15	Επικατεχίνη	0,24
16	Γαλλοκατεχίνη	0,2
17	Γαλλικός εστέρας κατεχίνης	0,24
18	Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	0,22
21	+/- Κατεχίνη	0,252
26	ο - Κουμαρικό	0,2

B.2. Παρασκευή προτύπων μιγμάτων πολυφαινολών για την ανάλυση με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE, Solid Phase Extraction).

B.2.1. Όργανα / Υαλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Ζυγός ακριβείας (Ohaus, Analytical Standard)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μ L και των 100 μ L
- VORTEX (MS1 Minishaker) στις 1800 στροφές

B.2.2. Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

- Κιναμμικό 9,6 mg/ mL
- *m*-OH βενζοϊκό οξύ 10,3 mg/ mL
- *m*-OH φαινυλοξικό 10,2 mg/ mL
- Πρωτοκατεχικό 10,3 mg/ mL
- *m*-κουμαρικό 9,9 mg/ mL
- Γαλλικό οξύ 10,27 mg/ mL
- Φερουλικό 10,23 mg/ mL
- Καφεϊκό οξύ 9,73 mg/ mL
- Τυροσόλη 1,3 mg/ mL
- Ομοβανιλλικό 0,9 mg/ mL
- Απιγενίνη 0,6 mg/ mL
- 3,4 διυδρόξυ – φαινυλοξικό 8,9 και 0,89 mg/ mL
- Βανιλλικό οξύ 9,75 και 0,975 mg/ mL
- Ολεανολικό οξύ 0,85 mg/ mL
- Επικατεχίνη 1,2 mg/ mL
- Γαλλοκατεχίνη 1 mg/ mL
- Γαλλικός εστέρας κατεχίνης 1,2 mg/ mL
- Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης 1,075 mg/ mL
- Βανιλίνη 2,2 mg/ mL
- *o*-Αμιρίνη 1,8 mg/ mL

- +/- Κατεχίνη 2,52 mg/ mL
- Ρουτίνη 2,66 mg/ mL
- 3-(4-Υδρόξυ-φαινυλ)προπιονικό οξύ 2,82 mg/ mL
- Κερκετίνη 2,5 mg/ mL
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Δις-απεσταγμένο νερό EASYPURE - RF

B.2.3. Εκτέλεση

Δημιουργία πολυπροτύπου πολυφαινολών (std pp1)

Περιεχόμενες πολυφαινόλες: κινναμμικό, *π* – υδρόξυ βενζοϊκό οξύ, *π* – υδρόξυ φαινυλοξικό, πρωτοκατεχικό, *π* – κουμαρικό, γαλλικό οξύ, φερουλικό, καφεϊκό οξύ, 3,4 – διυδρόξυ φαινυλοξικό, βανιλλικό οξύ

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 100 μ L (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Συνολικά λοιπόν εισάγεται 1 mL διαλύματος πολυφαινολών
- Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι πολύ μικρού όγκου μεθανόλης (περίπου 500 λ)
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

Δημιουργία πολυπροτύπου κατεχινών (std pp2)

Περιεχόμενες πολυφαινόλες: επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, γαλλικός εστέρας κατεχίνης, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 250 μ L (λ) από κάθε διάλυμα κατεχίνης και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Συνολικά λοιπόν εισάγεται 1 mL διαλύματος κατεχινών
- Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι πολύ μικρού όγκου μεθανόλης (περίπου 500 λ)
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

Δημιουργία πολυπροτύπου πολυφαινολών (std pp3)

Περιεχόμενες πολυφαινόλες: τυροσόλη, ομοβανιλλικό, απιγενίνη, ολεανολικό οξύ

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 250 μ L (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Συνολικά λοιπόν εισάγεται 1 mL διαλύματος πολυφαινολών
- Δεν γίνεται εξάτμιση της MeOH σε ρεύμα αζώτου
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

Στο std pp3 πολυπρότυπο πολυφαινολών παρόλο που δεν έγινε εξάτμιση της MeOH, παρατηρήθηκε η δημιουργία ιζήματος παρασκευάστηκε ένα τέταρτο πολυπρότυπο διάλυμα χωρίς ολεανολικό.

Δημιουργία πολυπρωτύπου πολυφαινολών (std pp4)

Περιεχόμενες πολυφαινόλες: τυροσόλη, ομοβανιλλικό, απιγενίνη

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 250 μL (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Συνολικά λοιπόν εισάγονται 750 μL διαλύματος πολυφαινολών
- Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι πολύ μικρού όγκου μεθανόλης (περίπου 500 λ)
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

Παρατηρείται και πάλι η δημιουργία ιζήματος, οπότε αυτό το πολυπρότυπο δεν θα χρησιμοποιηθεί.

Δημιουργία πολυπρωτύπου πολυφαινολών (std pp5)

Περιεχόμενες πολυφαινόλες: βανιλίνη, σ – αμιρίνη, +/- κατεχίνη, ρουτίνη, 3-(4-υδροξυ-φαινυλ)προπιονικό οξύ, κερκετίνη

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 250 μL (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Συνολικά λοιπόν εισάγεται 1,5 mL διαλύματος πολυφαινολών
- Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι πολύ μικρού όγκου μεθανόλης (περίπου 500 λ)
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

Στο std pp5 πολυπρότυπο πολυφαινολών παρατηρήθηκε η δημιουργία θολώματος. Το θόλωμα εξακολούθησε να υπάρχει ακόμα και μετά την αραίωση με μεθανόλη 5 mL. Παρασκευάστηκε λοιπόν ένα έκτο πολυπρότυπο διάλυμα χωρίς βανιλίνη και σ – αμιρίνη.

Δημιουργία πολυπρωτύπου πολυφαινολών (std pp6)

Περιεχόμενες πολυφαινόλες: +/- κατεχίνη, ρουτίνη, 3-(4-υδροξυ-φαινυλ)προπιονικό οξύ, κερκετίνη

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 250 μL (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Συνολικά λοιπόν εισάγεται 1 mL διαλύματος πολυφαινολών

- Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι πολύ μικρού όγκου μεθανόλης (περίπου 500λ)
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρις όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

B.3. Μελέτη της ανάκτησης πολυφαινολών με εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

B.3.1. Όργανα / Υλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

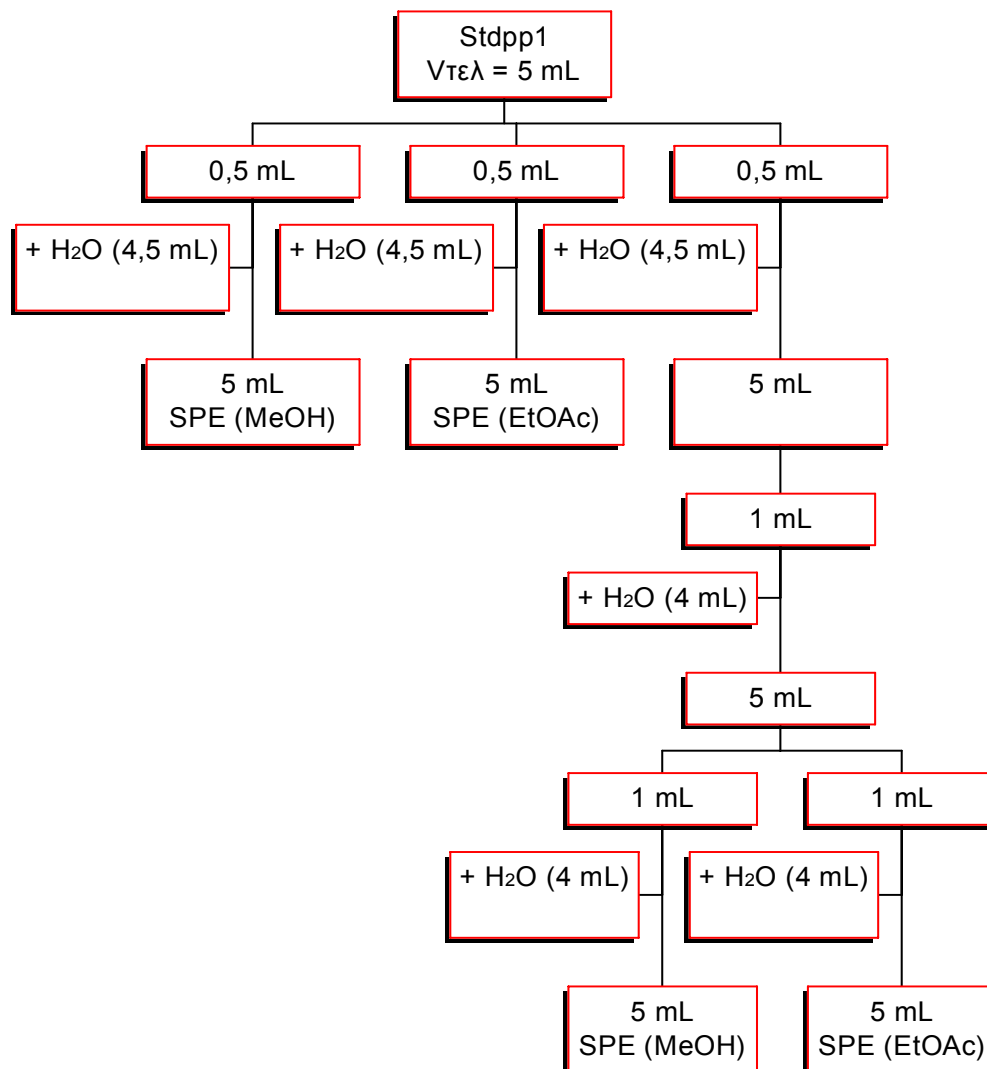
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μ L και των 100 μ L
- VORTEX (MS1 Minishaker) στις 1800 στροφές
- Πιπέτες Pasteur
- Σιφώνιο των 5 mL
- Στηλάκια ISOLUTE SPE COLUMNS C8 (CE) των 500 mg χωρητικότητας 3 mL
- Λεπτά σωληνάκια χωρίς πώμα
- Συσκευή Vac Master πολλαπλών δειγμάτων για εκχύλιση στερεής φάσης
- Συσκευή εφαρμογής κενού MILLIPORE, XX55 22050

B.3.2. Αντιδραστήρια

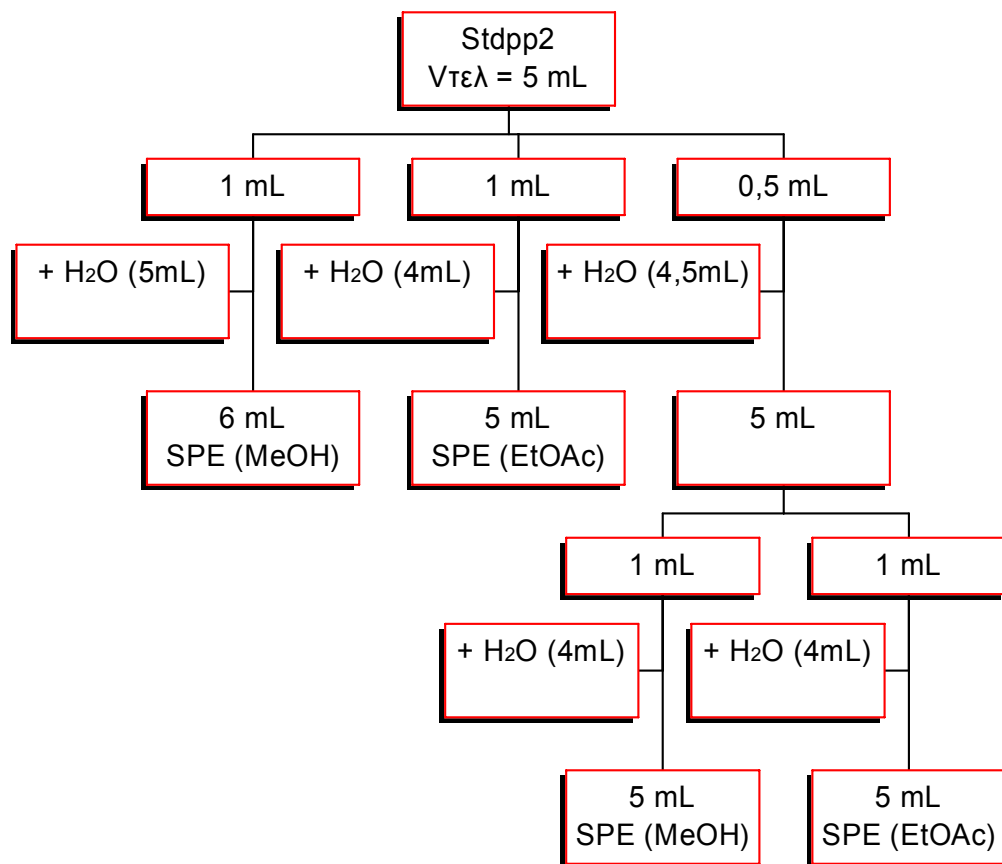
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Οξικός αιθυλεστέρας
- Δις-απεσταγμένο νερό EASYPURE-RF
- 12 δείγματα που προκύπτουν από τα std pp1, std pp2 και std pp3

Β.3.3. Εκτέλεση

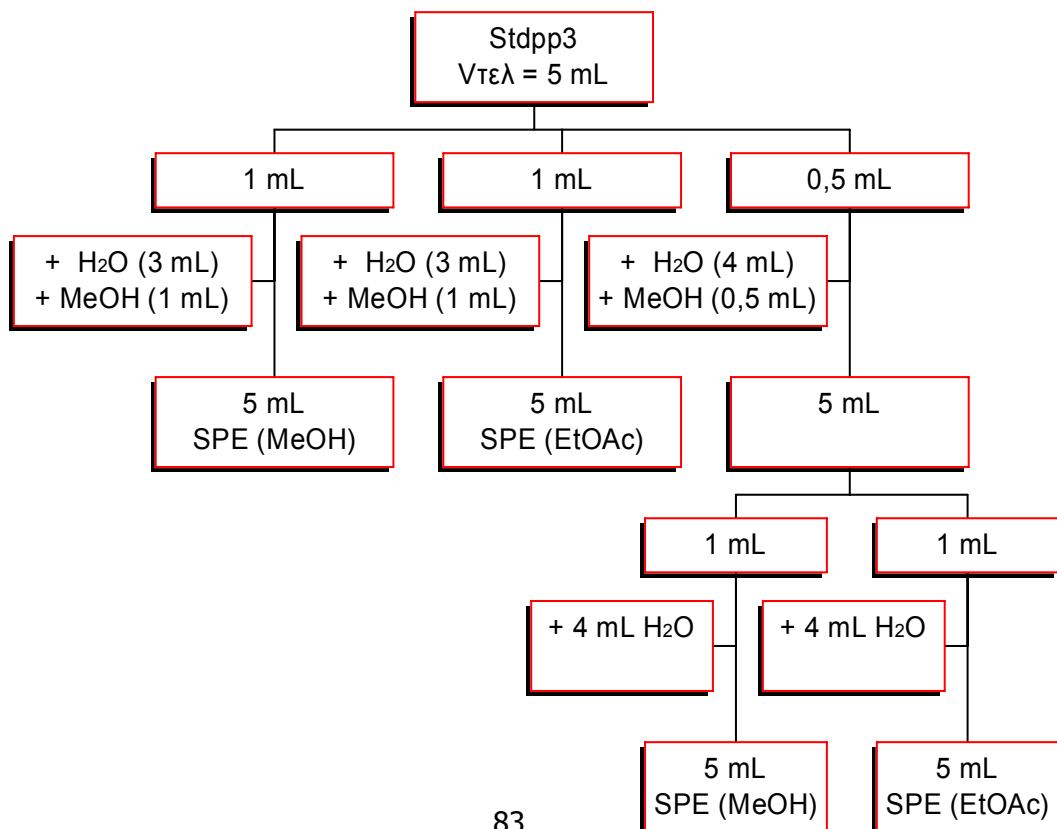
Επεξεργασία του std pp1



Επεξεργασία του std pp2



Επεξεργασία του std pp3



B.4. Πειραματική πορεία για την εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

B.4.1. Όργανα / Υλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μ L και των 100 μ L
- VORTEX (MS1 Minishaker) στις 1800 στροφές
- Πιπέτες Pasteur
- Σιφώνιο των 5 mL
- Στηλάκια ISOLUTE SPE COLUMNS C8 (CE) των 500 mg χωρητικότητας 3 mL
- Λεπτά σωληνάκια χωρίς πώμα
- Συσκευή Vac Master πολλαπλών δειγμάτων για εκχύλιση στερεής φάσης
- Συσκευή εφαρμογής κενού MILLIPORE, XX55 22050
- Σύριγγα
- Φίλτρο διηθήσεως 0,45 mm MILLIPORE

B.4.2. Αντιδραστήρια

- 12 πρότυπα δείγματα
- Άνυδρο θειικό νάτριο, της MERCK 1.06649.1000
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Οξικός αιθυλεστέρας

B.4.3. Εφαρμογή της μεθόδου SPE

- Αρχικά γίνεται έκπλυση των στηλών (conditioning) με:
 - 3 mL οξικού αιθυλεστέρα
 - 3 mL MeOH
 - 5 mL δυσαπεσταγμένου νερού
- Εν συνεχεία γίνεται έκλουση της στήλης με τα 5 mL του δείγματος, τα οποία διέρχονται από τη στήλη με την επίδραση της βαρύτητας

- Μόλις ολοκληρωθεί η διέλευση των δειγμάτων από τα στηλάκια εφαρμόζεται κενό στη συσκευή για 45 περίπου λεπτά
- Μετά την ξήρανση των στηλών γίνεται ανακατανομή των δοκιμαστικών σωλήνων στους οποίους συλλέγονται τα διερχόμενα από τη στήλη υγρά, έτσι ώστε κάτω από τη στήλη υπάρχει καθαρό σωληνάκι και ακολουθεί έκλουση με 3mL οξικό αιθυλεστέρα ή μεθανόλη
- Το συλλεχθέν διάλυμα της οργανικής φάσης (μεθανόλη ή οξικός αιθυλεστέρας) ξηραίνεται με Na_2SO_4 (100 mg)
- Σε κάθε διάλυμα αφήνεται να επιδράσει το ξηραντικό μέσο για 3 λεπτά και ακολούθως διηθείται από φίλτρο διηθήσεως
- Το φίλτρο εκπλένεται με μεθανόλη ή οξικό αιθυλεστέρα αντίστοιχα 2 φορές (1 mL και 0,5 mL διαδοχικά)

B.5. Επαναληπτική διαδικασία ανάκτησης πολυφαινολών από πρότυπα δείγματα.

B.5.1. Όργανα / Υαλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μ L και των 100 μ L
- VORTEX (MS1 Minishaker) στις 1800 στροφές

B.5.2. Αντιδραστήρια

- Τυροσόλη 1 mg/ mL
- Επικατεχίνη 1,2 mg/ mL
- Γαλλοκατεχίνη 1 mg/ mL
- Γαλλικός εστέρας κατεχίνης 1,2 mg/ mL
- Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης 1,075 mg/ mL
- +/- Κατεχίνη 2,52 mg/ mL
- ο- Κουμαρικό 1 mg/ mL
- Stdpp1
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Δις-απεσταγμένο νερό EASYPURE-RF

B.5.3. Εκτέλεση

A] Δημιουργία πολυπροτύπου πολυφαινολών, (std pp7)

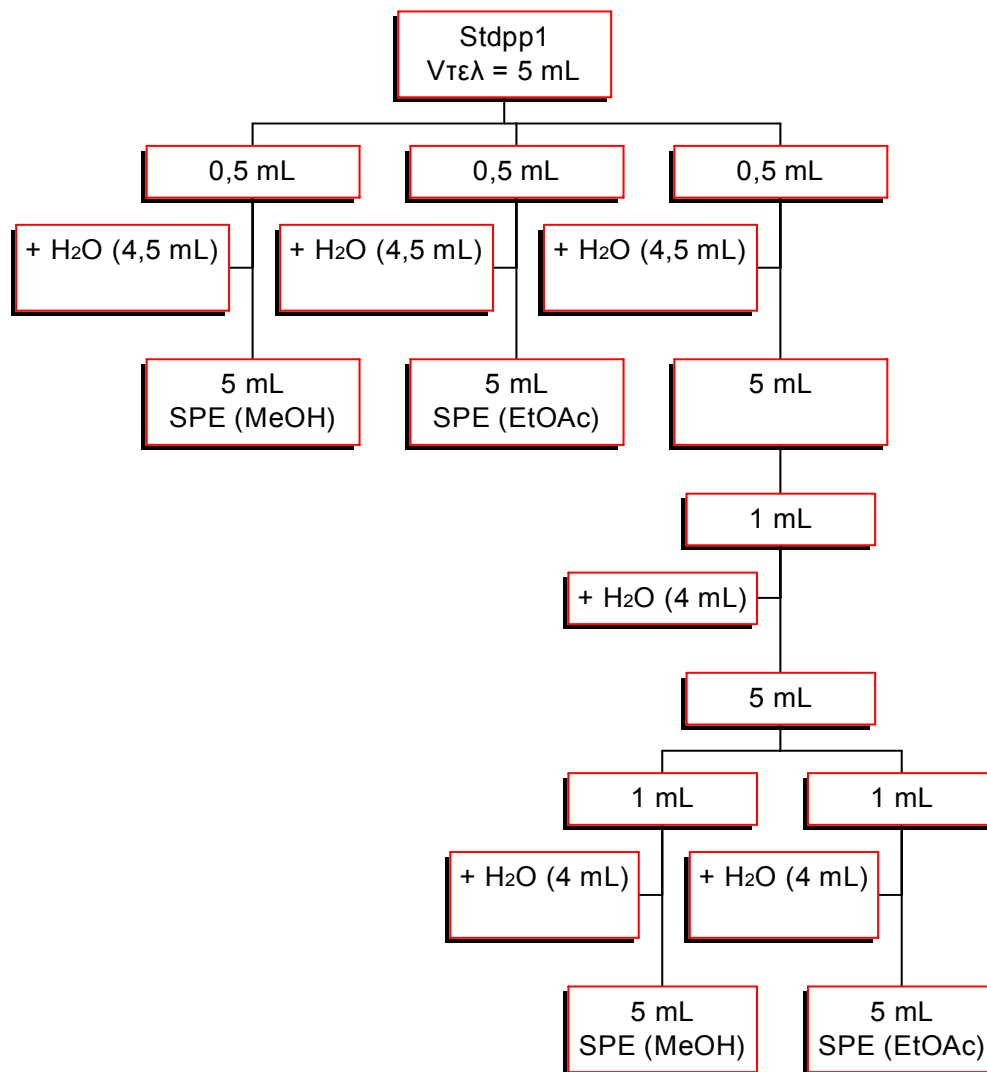
Περιεχόμενες πολυφαινόλες: +/- κατεχίνη, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, γαλλικός εστέρας κατεχίνης, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης, τυροσόλη, ο- κουμαρικό

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 200 μ L (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης (τυροσόλη, ο-κουμαρικό, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, γαλλικός εστέρας κατεχίνης, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης) και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο έχει προσημειωθεί όγκος 5 mL. Στον ίδιο σωλήνα εισάγονται και από 100 μ L από το διάλυμα +/- κατεχίνης. Συνολικά λοιπόν εισάγονται 1,3 mL διαλύματος πολυφαινολών

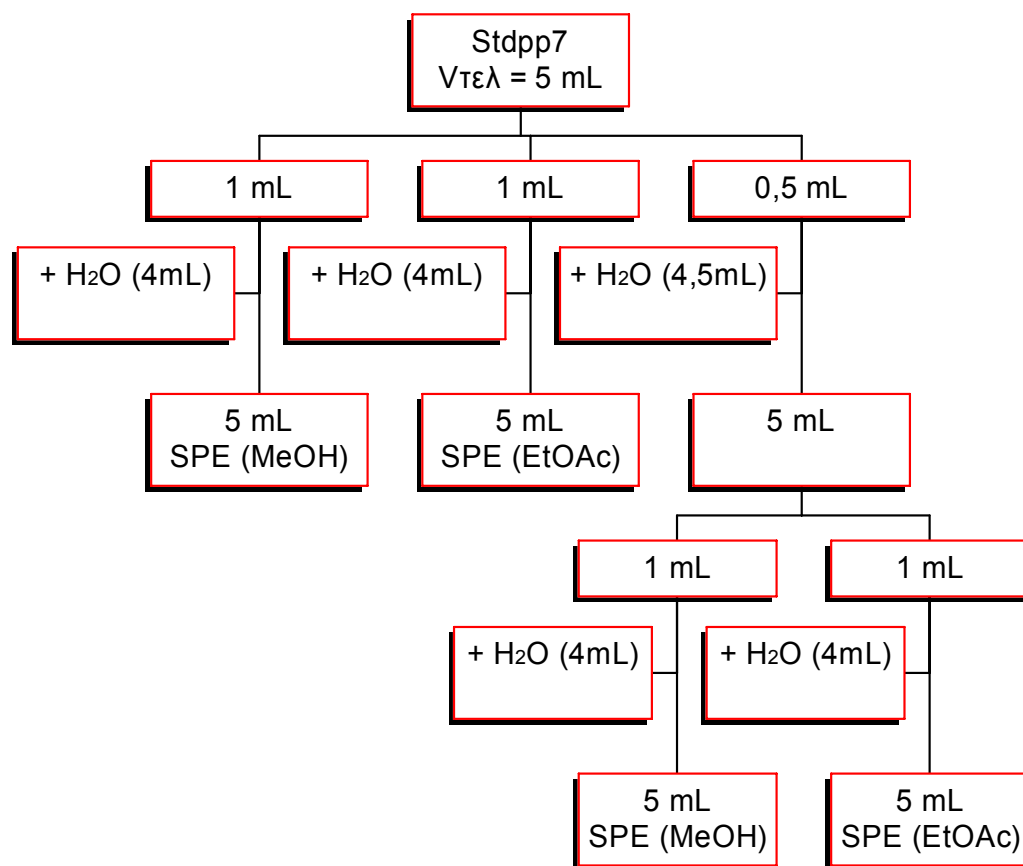
- Ακολουθεί εξάτμιση της μεθανόλης μέχρι μικρού όγκου (περίπου 0,5 mL)
- Προστίθεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρι όγκου 5 mL (προσημειωμένος όγκος)

B] Ανάκτηση πολυφαινολών με εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Επεξεργασία του std pp1



Επεξεργασία του std pp7



Γ] Εφαρμογή της μεθόδου SPE στα πρότυπα δείγματα επανάληψης και ξήρανση

Η διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο Β.4.3

B.6. Προετοιμασία των 8 προτύπων δειγμάτων επανάληψης (μητρικά HPLC)

B.6.1. Όργανα / Υαλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Ποτήρι ζέσεως των 100 mL
- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 µL
- Vials HPLC

B.6.2. Αντιδραστήρια

- 6 πρότυπα δείγματα επανάληψης (ΧΜΠ11, ΧΜΠ12, ΧΜΠ21, ΧΜΠ22, ΧΜΠ31, ΧΜΠ32, ΧΜΠ71, ΧΜΠ72)
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Δις-απεσταγμένο νερό EASYPURE-RF

B.6.3. Εκτέλεση

- Από το πρώτο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ11) λαμβάνονται 250 µL και μεταφέρονται σε vial. Στο ίδιο vial προστίθενται 250 µL δυσαπεσταγμένου νερού
- Από το δεύτερο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ12) λαμβάνονται 500 µL και μεταφέρονται σε vial ως έχουν
- Στο τρίτο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ21) παρατηρήθηκε η δημιουργία θολώματος οπότε προστέθηκε MeOH HPLC μέχρις τελικού όγκου 5 mL. Από το αραιωμένο δείγμα λαμβάνονται 500 µL και μεταφέρονται σε vial
- Από το τέταρτο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ22) λαμβάνονται 500 µL και μεταφέρονται σε vial ως έχουν
- Στο πέμπτο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ31) παρατηρήθηκε η δημιουργία θολώματος οπότε προστέθηκε MeOH HPLC μέχρις τελικού όγκου 5 mL. Από το αραιωμένο δείγμα λαμβάνονται 500 µL και μεταφέρονται σε vial
- Από το έκτο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ32) λαμβάνονται 500 µL και μεταφέρονται σε vial ως έχουν

- Από το έβδομο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ71) λαμβάνονται 500 μ L και μεταφέρονται σε vial ως έχουν
- Από το όγδοο δείγμα επανάληψης (ΧΜΠ72) λαμβάνονται 500 μ L και μεταφέρονται σε vial ως έχουν

Τα οκτώ vials θα αναλυθούν με HPLC

B.7. Προετοιμασία των 2 προτύπων δειγμάτων επανάληψης (μητρικά GC/ MS)

B.7.1. Όργανα / Υαλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 µL
- Vials HPLC

B.7.2. Αντιδραστήρια

- Περιεχόμενες πολυφαινόλες στο stdpp1 (βλ. παρ. B.2.)
- Περιεχόμενες πολυφαινόλες στο stdpp7 (βλ. παρ. B.5.)
- Μεθανόλη
- Μεθανόλη (HPLC grade, SDS)
- Δι - (τριμέθυλοσιλυλο) - τριφθοροακεταμίδιο + 1% τριμέθυλοχλωροσιλάνιο [Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% Trimethylchlorosilan (TMCS)]

B.7.3. Εκτέλεση

Επεξεργασία των περιεχόμενων πολυφαινολών στο stdpp1

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 100 µL (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης που περιέχεται στο stdpp1 και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Συνολικά λοιπόν εισάγεται 1 mL διαλύματος πολυφαινολών
- Συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη μέχρι τα 5 mL
- Από τον δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνονται 250 µL τα οποία μεταφέρονται σε vial και ακολουθεί σιλιλίωση (XP11)
- Από τον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνονται άλλα 500 µL και ακολουθεί αραιώση 1:10 καθώς και δεύτερη αραιώση 1:5
- Από το (δισ)αραιωμένο διάλυμα λαμβάνονται 500 µL τα οποία μεταφέρονται σε vial και ακολουθεί σιλιλίωση (XP12)

Επεξεργασία των περιεχόμενων πολυφαινολών στο stdpp7

- Λαμβάνονται με ακρίβεια 200 μL (λ) από κάθε διάλυμα πολυφαινόλης (τυροσόλη, *o*-κουμαρικό, επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, γαλλικός εστέρας κατεχίνης, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης) που περιέχεται στο stdpp7 και εισάγονται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Στον ίδιο σωλήνα εισάγονται και από 100 μL από το διάλυμα +/- κατεχίνης. Συνολικά λοιπόν εισάγονται 1,3 mL διαλύματος πολυφαινολών
- Συμπληρώνεται ο όγκος με μεθανόλη μέχρι τα 5 mL
- Από τον δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνονται 500 μL τα οποία μεταφέρονται σε vial και ακολουθεί σιλιλίωση (XP71)
- Από τον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνονται άλλα 500 μL και ακολουθεί αραιώση 1:10
- Από το αραιωμένο διάλυμα λαμβάνονται 500 μL τα οποία μεταφέρονται σε vial και ακολουθεί σιλιλίωση (XP72)

Τα τέσσερα vials θα αναλυθούν με GC/ MS.

B.8. Ανάλυση αφεψημάτων βοτάνων με τη μέθοδο SPE

B.8.1. Όργανα / Υαλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το μέρος του πειράματος είναι :

- Ογκομετρικός κύλινδρος των 250 mL
- Μεταλικό σκεύος βρασμού (μπρίκι)
- Εστία βρασμού
- Ποτήρι ζέσεως των 500 mL
- Φίλτρο βοτάνων μεταλικό
- Μεταλικό κουταλάκι
- Ογκομετρική φιάλη των 250 mL
- Σιφώνιο των 10 mL
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL με μπλε βιδωτό πώμα
- Φυγόκεντρος HERMLE, Z320
- Ζυγός ακριβείας (Ohaus, Analytical Standard)
- Διηθητικός ηθμός
- Χωνί διήθησης

B.8.2. Αντιδραστήρια

- 12 βότανα
 - Τσάι κεϋλάνης, 1,5 gr
 - Φασκόμηλο, 1,2 gr
 - Σιδερίτης, 0,8 gr
 - Χαμομήλι, 1 gr
 - Δίκταμο, 1,0003 gr (μη τυποποιημένο δείγμα)
 - Δενδρολίβανο, 1,0034 gr (μη τυποποιημένο δείγμα)
 - Ευκάλυπτος, 1 gr
 - Μαντζουράνα, 0,8 gr
 - Αγριάδα, 1 gr
 - Γλυκάνισος, 1,2 gr
 - Δυόσμος, 1,2 gr
 - Τίλιο, 1,6 gr

- Νερό HBH Λουτρακίου

B.8.3. Προετοιμασία βοτάνων

- Λαμβάνονται 240 mL νερό Λουτρακίου σε ογκομετρικό κύλινδρο 250 mL
- Όλη η ογκομετρηθείσα ποσότητα μεταφέρεται σε μεταλικό σκεύος βρασμού (μπρίκι)
- Το σκεύος τοποθετείται σε προθερμασμένη εστία και αφήνεται εκεί έως ότου βράσει το νερό
- Μετά το βρασμό απομακρύνεται το σκεύος από την εστία και το περιεχόμενο νερό μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως
- Καταβυθίζεται το φακελάκι (ή το φίλτρο για τα μη τυποποιημένα δείγματα) με το δείγμα βοτάνου για 3 λεπτά. Τα δείγματα δίκταμο και δενδρολίβανο δεν είναι τυποποιημένα και γι' αυτό ζυγίζεται με ακρίβεια η ποσότητα που θα εμβαπτιστεί στο βραστό νερό. Οι ποσότητες που ζυγίστηκαν είναι:
 - Δίκταμο: 1,0003 gr
 - Δενδρολίβανο: 1,0034 gr
- Εν συνεχεία με ένα μεταλικό κουταλάκι στραγγίζεται το δείγμα και απομακρύνεται
- Το αφέψημα αφήνεται να κρυώσει και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL όπου και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή. Το αφέψημα ευκάλυπτου χρειάστηκε να διηθηθεί 3 φορές – την 3^η με διπλό διηθητικό ηθμό – πριν μεταφερθεί στην ογκομετρική φιάλη. Επίσης το αφέψημα γλυκάνισου διηθήθηκε μία φορά
- Με σιφώνιο των 10 mL, μεταφέρονται από 8 mL κάθε αφεψήματος σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες. Η υπόλοιπη ποσότητα μεταφέρεται στο αρχικό ποτήρι ζέσεως και φυλάσσεται στο ψυγείο στους -20 °C
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση του αφεψήματος από τσάι κεϋλάνης στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Από τη φυγοκέντρηση δεν παρατηρείται δημιουργία ιζήματος οπότε τα δείγματα θα αναλυθούν ως έχουν.

B.8.4. Εφαρμογή της μεθόδου SPE στα δείγματα από αφεψήματα βοτάνων και ξήρανση

Η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο B.4.3.

Για τα όλα τα δείγματα η παραλαβή των πολυφαινολών γίνεται με μεθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα.

B.8.5. Επανάληψη της μεθόδου SPE και της ξήρανσης σε 12 δείγματα από αφεψήματα βοτάνων

Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση με τη μέθοδο SPE και στα 12 δείγματα από αφεψήματα βοτάνων. Για τα όλα τα δείγματα η παραλαβή των πολυφαινολών γίνεται με μεθανόλη.

Επίσης επαναλαμβάνεται η ξήρανση των δειγμάτων.

B.9. Ανάλυση των προτύπων δειγμάτων και των δειγμάτων από αφεψήματα βοτάνων με HPLC και GC/MS

B.9.1 Όργανα / Υλικά

- Μικροπιπέτα Eppendorf των 1000 μL
- Φιάλη N_2
- VORTEX
- Vials
- Δοκομαστικοί σωλήνες χωρίς πώμα
- HPLC διάταξη (Hewlett Packard, 1050) (HPLC/ W-DAD/FLD/Αυτόματος δειγματολήπτης)
- GC διάταξη (αέριος χρωματογράφος), (Hewlett Packard, 6890), [GC/MSD(TIC)/Αυτόματος δειγματολήπτης]
- Σύστημα EASY pure RF (compact ultrapure water system)
- Υδρόλουτρο (Edelstahl, Rost Frei)

B.9.2. Αντιδραστήρια

- Οξικό αιθυλεστέρα (SDS p.a.)
- MeOH (HPLC grade)
- Νερό από EASY pure RF
- Δι - (τριμέθυλοσιλυλο) - τριφθοροακεταμίδιο + 1% τριμέθυλοχλωροσιλάνιο [Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% Trimethylchlorosilan (TMCS)]

B.9.3. Εκτέλεση

- Στους δοκιμαστικούς σωλήνες με τα δείγματα γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2
- Τα στερεά υπολείμματα επαναδιαλύονται σε 1 mL MeOH
- Ακολουθεί ανάδευση σε VORTEX
- Με μικροπιπέτα Eppendorf λαμβάνονται 500 μL από καθέναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες τα οποία και μεταφέρονται σε αντίστοιχα vials για HPLC
- Τα 500 μL που υπολείπονται τοποθετούνται σε vials και θα αναλυθούν με GC

A] HPLC

- Τα vials που προορίζονται για HPLC πωματίζονται και εισάγονται στον HPLC αναλυτή.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC), Agilent HP-1050. Οι συνθήκες ανάλυσης της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης περιλαμβάνουν τις εξής παραμέτρους :

- Ο ανιχνευτής ήταν υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) σειράς φωτοδιοδίων (DAD) στα 214, 280 και 330 nm
- Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C18, Nucleosil 120 (5 μ m), (120X4mm) σε χρωματογραφία ανάστροφης φάσης
- Για τη βαθμωτή έκλουση χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω σύστημα διαλυτών: Μεθανόλη/ Νερό οξινοσμένο με ορθοφωσφορικό οξύ σε pH = 3

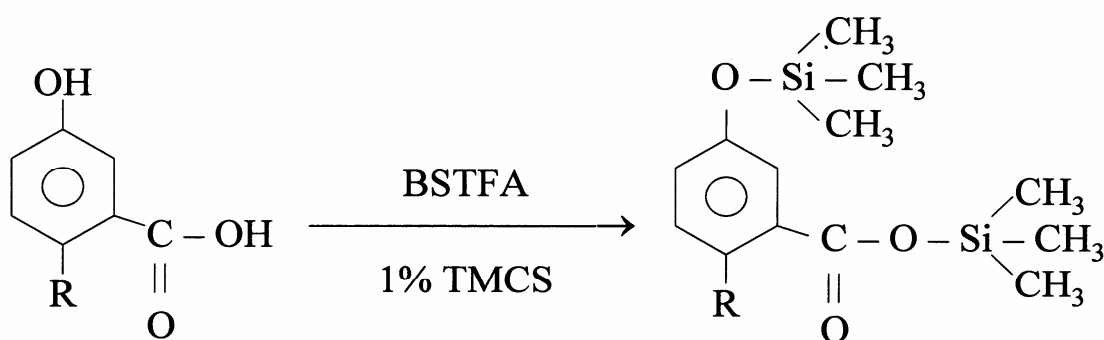
Χρόνος (min)	% Μεθανόλη	% Νερό/ H ₃ PO ₄	Ροή (mL/ min)
0	10	90	1,000
15	28	72	
20	28	72	
22,5	31	69	
37,5	31	69	
40	34	66	
50	34	66	
55	40	60	
57	40	60	
65	70	30	
75	70	30	
85	10	90	

B] GC

- Στα vials που προορίζονται για GC γίνεται εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου
- Εν συνεχεία προστίθενται από 250 µL σιλιλιωτικού μέσου BSTFA που περιέχει 1% TMCS
- Τα vials αναδεύονται σε VORTEX και τοποθετούνται σε υδρόλουτρο στους 70 °C για 20 min (μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς πώμα)
- Τα σιλιλιωμένα πλέον διαλύματα τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη του οργάνου (Ανδρικόπουλος, 1999)

Σιλιλίωση είναι η μετατροπή σε πτητικά παράγωγα, διότι οι πολυφαινόλες είναι πολικές ενώσεις και χαμηλής πτητικότητας οπότε κατακρατώνται από τα υλικά της αέριας χρωματογραφίας.

Η αντίδραση της σιλιλίωσης περιλαμβάνει την μετατροπή των -OH σε αιθέρες και την μετατροπή των -COOH σε εστέρες σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση έγινε με σύστημα αερίου χρωματογράφου – φασματομέτρου μαζών (GC-MSD) της Agilent, HP 6890-MSD 5972. Οι συνθήκες ανάλυσης της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τις εξής παραμέτρους :

- Για την έγχυση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε αυτόματος δειγματολήπτης εφοδιασμένος με σύριγγα μεγέθους 10 μL , ενώ ο όγκος έγχυσης ήταν 3 μL
- Το φασματόμετρο μαζών (MSD) που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής ήταν ηλεκτρονιακού ιονισμού (Electron Impact) στα 70 eV
- Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριχοειδής, DB – 5 MS, με υλικό πλήρωσης 5% φαίνυλο-95% μεθυλοπολυσιλοξάνιο και μήκος 30 m, διάμετρο 250 μm και πάχος φιλμ επικάλυψης 0,25 μm .
- Ως αέριο κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε He της εταιρείας Αεροσκόπιο
- Η ροή του φέροντος αερίου He ήταν 0,6 ml/ min και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου ήταν:

Oven ramp	°C / min	Next °C	Hold min
Initial		70	5.00
Ramp 1	15.00	130	0.00
Ramp 2	4.00	160	15.00
Ramp 3	10.00	300	15
Ramp 4(off)			

- Τα στοιχεία του λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε είναι:
Enhanced Chem Station
G 1701 Ba Version A.01.00
Hewlett Packard 1996, σε υπολογιστή HP Vectra Xn

Η ανάλυση των πολυφαινολών έγινε με την τεχνική 'εκλεκτικής παρακολούθησης ιόντων' (Selective Ion Monitoring). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών (ταυτοποίηση) έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης της κάθε πολυφαινόλης και τα 2 – 3 χαρακτηριστικά ιόντα που παρακολουθούνται για την κάθε μία. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε σε πρότυπα διαλύματα πολυφαινολών.

B.10. Αποτελέσματα

B.10.1. Χρόνοι κατακράτησης και εμβαδό επιφάνειας κορυφής των πολυφαινολών στα πρότυπα διαλύματα με τη μέθοδο HPLC

Πίνακας 18. Χρόνοι κατακράτησης των πολυφαινολών στο σύστημα ανάλυσης HPLC καθώς και μήκος κύματος πολυφαινολών όπου εμφανίζεται το μέγιστο της απορρόφησης

Πολυφαινόλες με μέθοδο HPLC			
A/A	Πολυφαινόλες	Ret. Time (min)	$\lambda_{\max}$
1	Γαλλικό οξύ	3,3	215,271
2	Γαλλοκατεχίνη	5,1 – 5,4	207
3	3,4 Διυδρόξυ – φαινυλοξικό	5,9	281
4	Πρωτοκατεχικό	6,0	205, 259, 293
5	Τυροσώλη	7,7	221, 275
6	<i>n</i> – Υδρόξυ βενζοϊκό οξύ	9.0	255
7	<i>n</i> – Υδρόξυ φαινυλοξικό	9,1	233, 275
8	Κατεχίνη	10,4	203, 279
9	Ομοβανιλλικό	11,3	229, 279
10	Βανιλλικό οξύ	11,6	219, 261, 297
11	Καφεϊκό οξύ	13,6	281
12	Χλωρογενικό οξύ	14,3	219, 327
13	Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	(13,9) 14,6	207, 275
14	Βανιλίνη	14,7	231, 279, 309
15	3-(4-Υδρόξυ- φαινυλ)προπιονικό οξύ	14,6	223, 277
16	Επικατεχίνη	14,5 – 14,8	205, 279
17	<i>n</i> – Κουμαρικό οξύ	17,9	227, 309

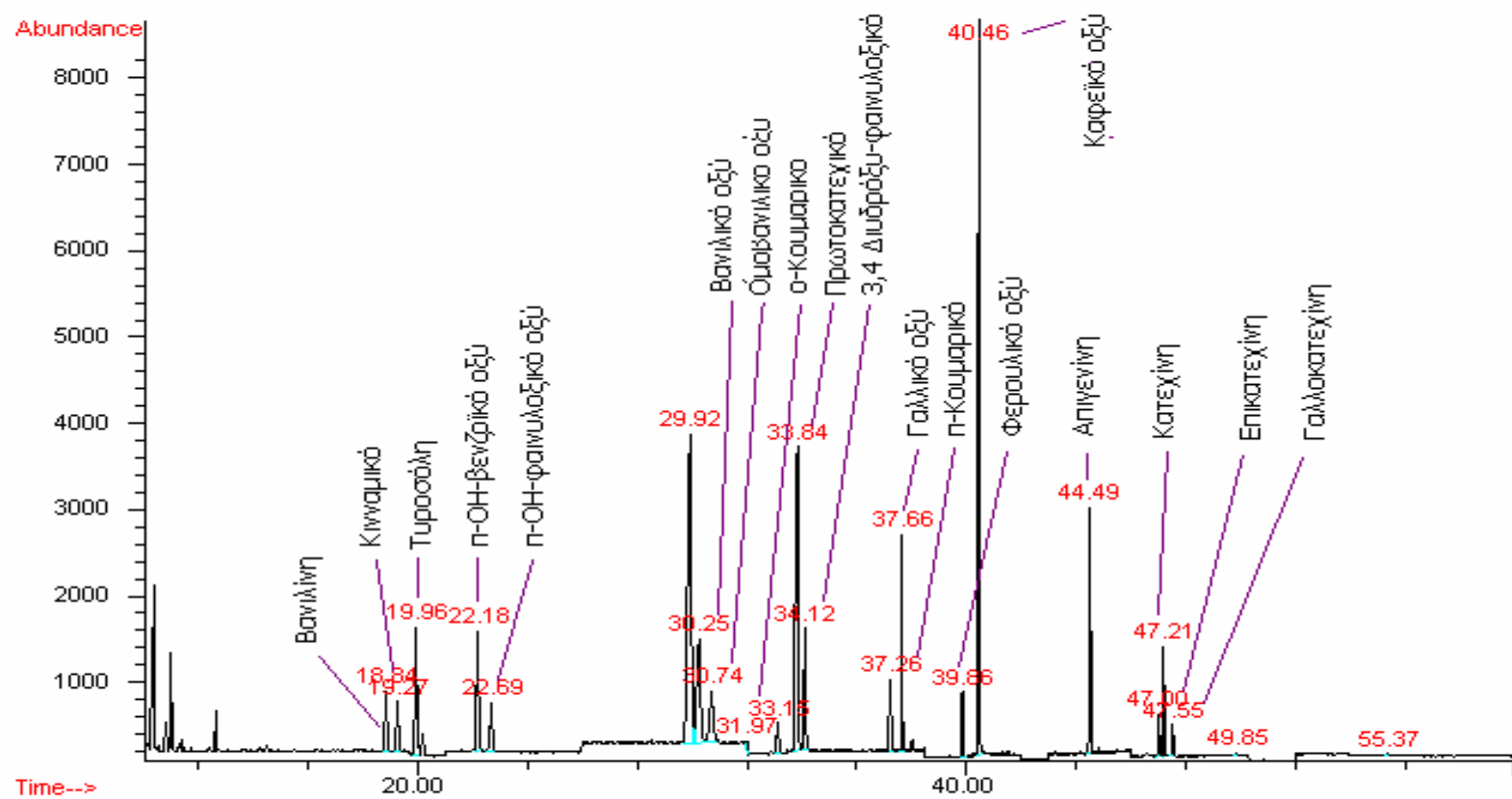
18	Φερουλικό οξύ	20,5	235, 323
19	Γαλλικός εστέρας κατεχίνης	24,2	279
20	<i>o</i> – Κουμαρικό οξύ	26,2	213, 277, 325
21	Κιναμμικό	39,1	217, 279
22	Ρουτίνη	41,0	257, 351
23	Μυρισετίνη	51,4	207, 253, 371
24	Κερκετίνη	62,5	255, 369
25	Απιγενίνη	65,3	267, 339
26	<i>a</i> – Αμιρίνη	68,3	195
27	Ολεανολικό οξύ		

B.10.2. Ανακτήσεις πολυφαινολών από τα πρότυπα διαλύματα

Πίνακας 19. Ανακτήσεις προτύπων πολυφαινολικών ενώσεων μετά από SPE και παραλαβή με μεθανόλη ή οξικό αιθυλεστέρα

Α/Α	Πρότυπα pp	Αρχική ποσότητα (μg)	Δείγμα	SPE			
				MeOH	% Ανάκτηση	AcOEt	% Ανάκτηση
1	Κιναμμικό	1,92	Επανάληπτικό	1,64	85,4	1,21	63,1
2	<i>π</i> -OH-βενζοϊκό	2,06	Αρχικό	0,28	13,7	0,27	13
3	<i>π</i> -OH-φαιτυλοξικό	2,04	Επανάληπτικό	0,34	16,6	0,32	15,6
4	Πρωτοκατεχικό	2,06	Αρχικό	0,13	6,3	0,12	5,7
5	<i>π</i> -Κουμαρικό	1,98	Επανάληπτικό	1,92	96,8	1,43	72,4
6	Γαλλικό	2,05	Αρχικό	1,32	64,39	0,19	9,27
7	Φερουλικό	2,05	Επανάληπτικό	2,06	100,5	1,77	86,3
8	Καφεϊκό	1,95	Αρχικό	1,86	95,2	1,17	60,4
9	3,4-Διυδροξύ-φαιτυλοξικό	1,78	Επανάληπτικό	0,13	7,5	0,11	6,2
10	Βανιλικό	1,95	Αρχικό	1,12	57,5	1,07	54,7
11	Κατεχίνη	2,52	Επανάληπτικό	1,16	46	1,33	53
12	Επικατεχίνη	2,4	Αρχικό	1,92	80,1	2,04	85
13	Γαλλοκατεχίνη	1,99	Επανάληπτικό	0,17	8,4	0,16	8,1
14	<i>o</i> -Κουμαρικό	2,02	Αρχικό	0,68	33,7	0,69	34,2
15	Τυροσόλη	2,01	Επανάληπτικό	1,85	92,1	1,77	88,3
16	Απιγενίνη	0,12	Αρχικό	0,11	93	0,12	96,38

Στις επόμενες σελίδες παρατίθενται 1 χαρακτηριστικό χρωματογράφημα πολυφαινολικών ουσιών στα πρότυπα διαλύματα.



Χρωματογραφική ανάλυση προτύπου διαλύματος πολυφαινολών πριν από SPE

Β.10.3. Προσδιορισθείσες ποσότητες πολυφαινολών στα αφεψήματα βοτάνων με τη μέθοδο SPE

Πίνακας 20. Ποσότητες πολυφαινολών που προσδιορίζονται σε αφεψήματα βοτάνων (2,5 mL) με τη μέθοδο SPE, μετά από παραλαβή με μεθανόλη (M)

PP (ng) \ Βότανο	Τ. Κεϋλάνης (M)	Σιδερίτης (M)	Φασκόμηλο (M)	Ευκάλυπτος (M)	Δίκταμο (M)	Δενδρολίβανο (M)
Βανιλίνη	24,1	45,4	56,2	29,2	0	0
Κιναμικό	143,5	22,7	224,8	9	23,4	2,8
Τυροσόλη	24,3	69,3	71,6	52,8	4,4	18,2
π-ΟΗ-βενζοϊκό	50,7	98,9	152,3	33,1	18	30
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	34,4	9,9	157,7	21,1	0	0
Βανιλικό	251,2	0	591,8	0	0	0
Ομοβανιλικό	0	0	0	0	0	0
ο-Κουμαρικό	238,3	185,4	1215,9	742,9	618,8	0
Πρωτοκατεχικό	35,3	12,7	63,9	43,8	22,1	16,4
3,4-Διυδροξυ-φαινυλοξικό	3,3	0	18,8	0	0	0
π-Κουμαρικό	266,2	113,1	221	70,4	85,3	34,8
Γαλλικό	3041,5	20,5	24,1	52,3	41,4	228,1
Φερουλικό	120,9	0	399,1	0	73,7	0
Καφεϊκό	54,5	15,6	550	16	138,3	12,6
Απιγενίνη	35,5	30,8	31,7	56,6	35	29,7
Επικατεχίνη	9322,2	0	0	43,3	102,6	30,9
Κατεχίνη	4917,8	0	0	28,8	0	15,5
Γαλλοκατεχίνη	45,2	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	18608,9	624,3	3778,9	1199,3	1163	419

(συνέχεια πίνακα)

PP (ng) \ Βότανο	Αγριάδα (M)	Χαμομήλι (M)	Τίλιο (M)	Γλυκάνισος (M)	Μαντζουράνα (M)	Δυόσμος (M)
Βανιλίνη	40	25,5	0	34	51,4	32
Κιναμικό	45,3	6,9	32,1	12,7	39,1	23,3
Τυροσόλη	12	4,7	30,1	90,8	29	107,3
π-ΟΗ-βενζοϊκό	43,4	28,4	23,1	50,3	27,8	18
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	17,4	79,8	0	0	3,8	13,2
Βανιλικό	222,1	407,5	0	0	0	141,5
Ομοβανιλικό	0	0	0	0	0	0
ο-Κουμαρικό	158,2	305,5	183,2	159,9	130,7	729,6
Πρωτοκατεχικό	10,5	27,5	12,3	17,7	10,7	25,8
3,4-Διυδρόξυ-φαινυλοξικό	0	0	0	6,1	0	2,4
π-Κουμαρικό	62,5	42,5	51,6	95,7	43,6	98,8
Γαλλικό	3,3	88,1	26	15,6	5,1	58,4
Φερουλικό	82	0	0	66,2	40,2	39,8
Καφεϊκό	60,7	0	8	58,4	46,5	51,4
Απιγενίνη	42,1	0	67	148,1	45,1	44,9
Επικατεχίνη	0	0	39,7	48,7	0	0
Κατεχίνη	0	0	38,4	0	0	0
Γαλλοκατεχίνη	0	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	756,1	1016,4	511,5	804,2	473	1386,4

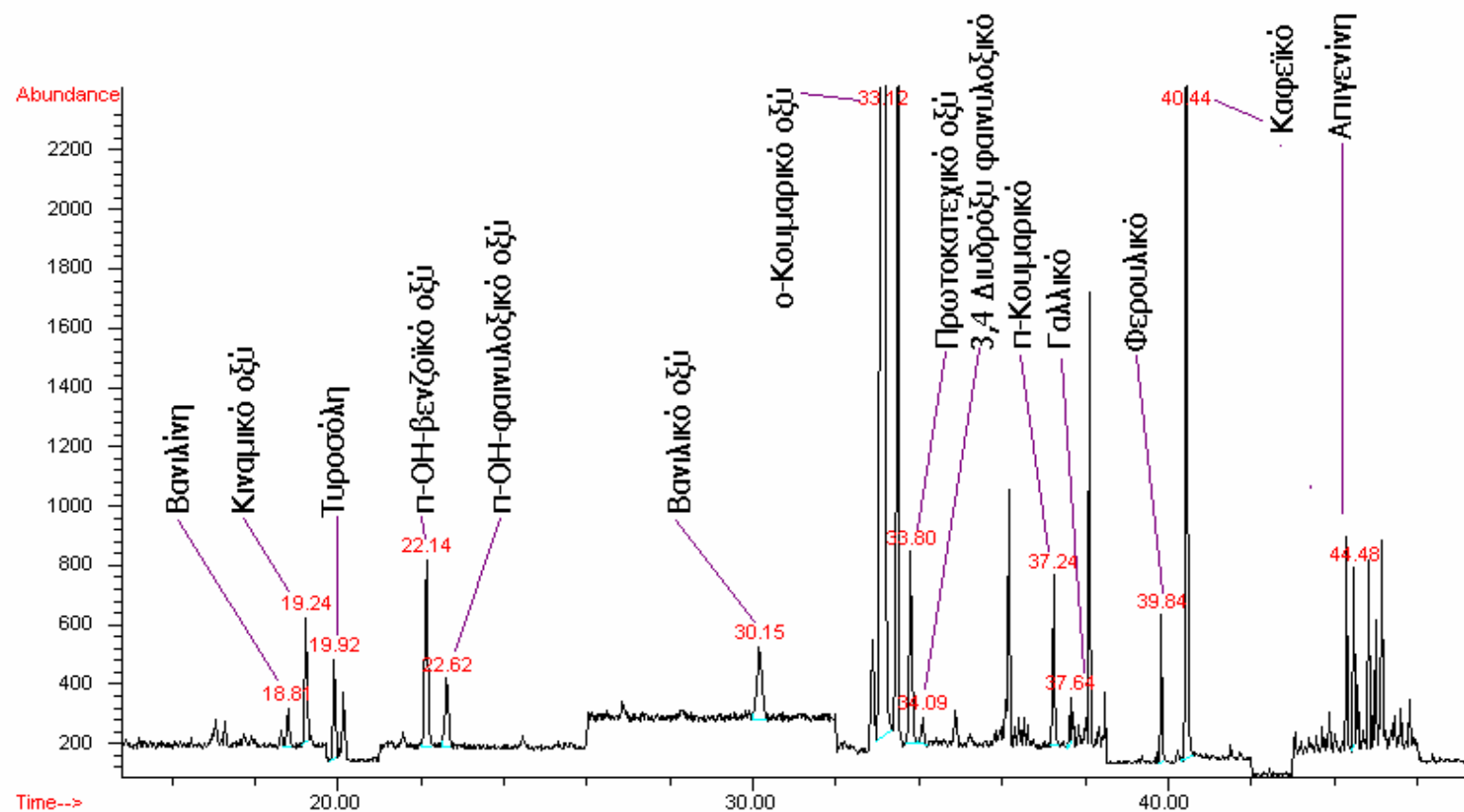
Πίνακας 21. Ποσότητες πολυφαινολών που προσδιορίζονται σε αφεψήματα βοτάνων (2,5 mL) με τη μέθοδο SPE, μετά από παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα (E)

PP (ng) \ Βότανο	Τ. Κεϋλάνης (E)	Σιδερίτης (E)	Φασκόμηλο (E)	Ευκάλυπτος (E)	Δίκταμο (E)	Δενδρολίβανο (E)
Βανιλίνη	65,2	0	174,5	26,3	32,1	17
Κιναμικό	18,9	24,4	25	0	16,7	0
Τυροσόλη	39,9	329,8	103,9	33	14,8	0
π-ΟΗ-βενζοϊκό	28,6	0	38,8	0	0	0
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	0	0	0	0	0	0
Βανιλικό	0	0	0	0	0	0
Ομοβανιλικό	0	0	0	0	0	0
ο-Κουμαρικό	84,1	0	329,3	0	0	0
Πρωτοκατεχικό	23,4	0	16,3	1,4	70,6	1,2
3,4-Διυδροξυ-φαινυλοξικό	0	0	0	30,7	0	0
π-Κουμαρικό	69	109,2	33,2	61,6	50,3	6,5
Γαλλικό	541,8	0	0	2,2	0	0
Φερουλικό	31,1	77,8	58,1	0	25,7	0
Καφεϊκό	14,9	8,3	33,3	0	11,2	0,9
Απιγενίνη	25	20,1	37,6	25	22,3	33,6
Επικατεχίνη	23593,1	0	0	0	0	0
Κατεχίνη	11986	0	0	0	0	0
Γαλλοκατεχίνη	0	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	36521	460,4	850	180,2	243,7	59,2

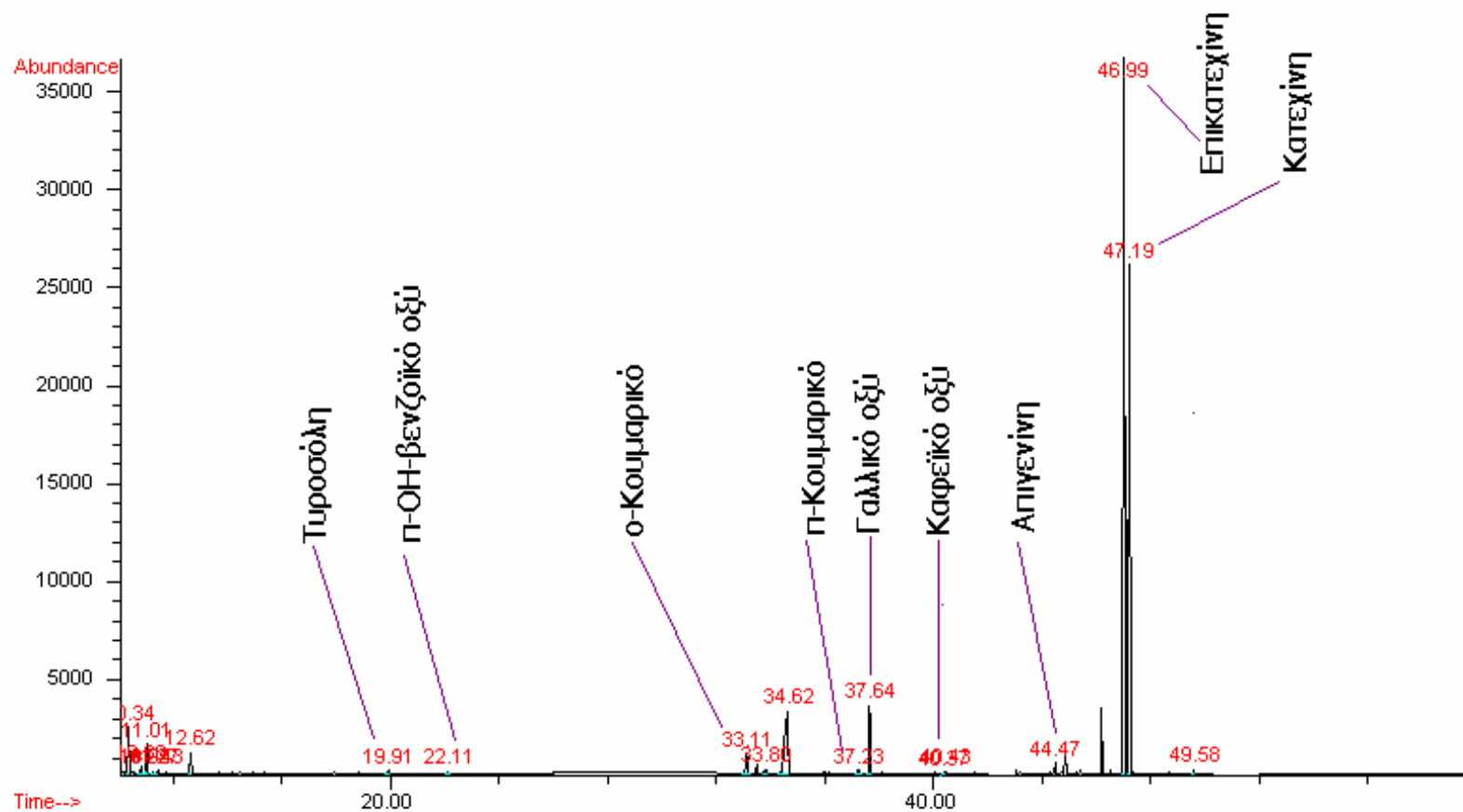
(συνέχεια πίνακα)

PP (ng) \ Βότανο	Αγριάδα (E)	Χαμομήλι (E)	Τίλιο (E)	Γλυκάνισος (E)	Μαντζουράνα (E)	Δυόσμος (E)
Βανιλίνη	24,7	21,7	21,6	0	0	24,4
Κιναμικό	2,7	65,3	13,3	0	0	6,2
Τυροσόλη	0	7,7	37,1	257,1	0	202,2
<i>π</i> -ΟΗ-βενζοϊκό	16,3	26,4	1,3	13,5	0	3,6
<i>π</i> -ΟΗ-φαινυλοξικό	6,4	39,5	0	0	0	1,9
Βανιλικό	12,3	0	0	0	0	0
Ομοβανιλικό	0	0	0	0	0	0
<i>ο</i> -Κουμαρικό	15,6	0	0	0	0	57,1
Πρωτοκατεχικό	0,5	4,2	0	0	0	0
3,4-Διυδροξύ-φαινυλοξικό	0,9	0	0	0	0	2,2
<i>π</i> -Κουμαρικό	3,3	104,6	6,1	36	0	40,6
Γαλλικό	4,7	0	0	0	0	0
Φερουλικό	9,6	72,9	0	0	0	14,7
Καφεϊκό	11,4	30,9	0,9	0	0	1,6
Απιγενίνη	225,3	29,2	38,4	25,4	22	111,1
Επικατεχίνη	0	0	0	0	0	0
Κατεχίνη	0	0	0	0	0	0
Γαλλοκατεχίνη	0	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	333,7	402,4	118,7	332	22	465,6

Στις επόμενες σελίδες παρατίθενται 2 χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα πολυφαινολικών ουσιών σε δύο αφεψήματα βοτάνων.



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος από αφέψημα φασκόμηλου μετά από SPE (παραλαβή με μεθανόλη)



Χρωματογραφική ανάλυση δείγματος από αφέψημα τσαγιού Κεϋλάνης μετά από SPE (παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα)

B.10.4. Ποσότητες πολυφαινολών στα αφεψήματα βοτάνων με τη μέθοδο SPE βάσει της ανάκτησης

Πίνακας 22. Ποσότητες πολυφαινολών που προσδιορίζονται στα αφεψήματα βοτάνων με τη μέθοδο SPE βάσει της ανάκτησης των προτύπων, μετά από παραλαβή με μεθανόλη

PP (μg) (βάσει ανάκτησης) /240 mL αφεψήματος	Τ. Κεϋλάνης (M)	Σιδερίτης (M)	Φασκόμηλο (M)	Ευκάλυπτος (M)	Δίκταμο (M)	Δενδρολίβανο (M)
Βανιλίνη	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Κιναμικό	16,1	2,6	25,3	1,0	2,6	0,3
Τυροσόλη	2,5	7,2	7,5	5,5	0,5	1,9
π-ΟΗ-βενζοϊκό	35,5	69,3	106,7	23,2	12,6	21,0
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	19,9	5,7	91,2	12,2	0	0
Βανιλικό	41,9	0	98,8	0	0	0
Ομοβανιλικό	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ο-Κουμαρικό	67,9	52,9	346,8	211,9	176,5	0
Πρωτοκατεχικό	53,8	19,4	97,4	66,7	33,7	25,0
3,4-Διυδρόξυ-φαινυλοξικό	4,2	0	24,1	0	0	0
π-Κουμαρικό	26,4	11,2	21,9	6,9	8,5	3,5
Γαλλικό	453,5	3,1	3,6	7,8	6,2	34,0
Φερουλικό	11,6	0	38,3	0	7,1	0
Καφεϊκό	5,5	1,6	55,5	1,6	13,9	1,3
Απιγενίνη	3,7	3,2	3,3	5,8	3,6	3,1
Επικατεχίνη	1117,3	0	0	5,2	12,3	3,7
Κατεχίνη	1026,3	0	0	6,0	0	3,2
Γαλλοκατεχίνη	51,7	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	2937,9	176,1	920,2	353,9	277,4	96,9

(συνέχεια πίνακα)

PP (μg) (βάσει ανάκτησης) /240 mL αφεψήματος	Αγρίδα (M)	Χαμομήλι (M)	Τίλιο (M)	Γλυκάνισος (M)	Μαντζουράνα (M)	Δυόσμος (M)
Βανιλίνη	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Κιναμικό	5,1	0,8	3,6	1,4	4,4	2,6
Τυροσόλη	1,3	0,5	3,1	9,5	3,0	11,2
π-ΟΗ-βενζοϊκό	30,4	19,9	16,2	35,2	19,5	12,6
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	10,1	46,1	0	0	2,2	7,6
Βανιλικό	37,1	68,0	0	0	0	23,6
Ομοβανιλικό	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ο-Κουμαρικό	45,1	87,1	52,2	45,6	37,3	208,1
Πρωτοκατεχικό	16	41,9	18,7	26,9	16,3	39,3
3,4-Διυδρόξυ-φαινυλοξικό	0	0	0	7,8	0	3,1
π-Κουμαρικό	6,2	4,2	5,1	9,5	4,3	9,8
Γαλλικό	0,5	13,1	3,9	2,3	0,8	8,7
Φερουλικό	7,9	0	0	6,4	3,9	3,8
Καφεϊκό	6,1	0	0,8	5,9	4,7	5,2
Απιγενίνη	4,3	0	6,9	15,3	4,7	4,6
Επικατεχίνη	0	0	4,8	5,8	0	0
Κατεχίνη	0	0	8,0	0	0	0
Γαλλοκατεχίνη	0	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	170,0	281,7	123,4	171,7	100,9	340,3

Πίνακας 23. Ποσότητες πολυφαινολών που προσδιορίζονται στα αφεψήματα βοτάνων με τη μέθοδο SPE βάσει της ανάκτησης των προτύπων, μετά από παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα.

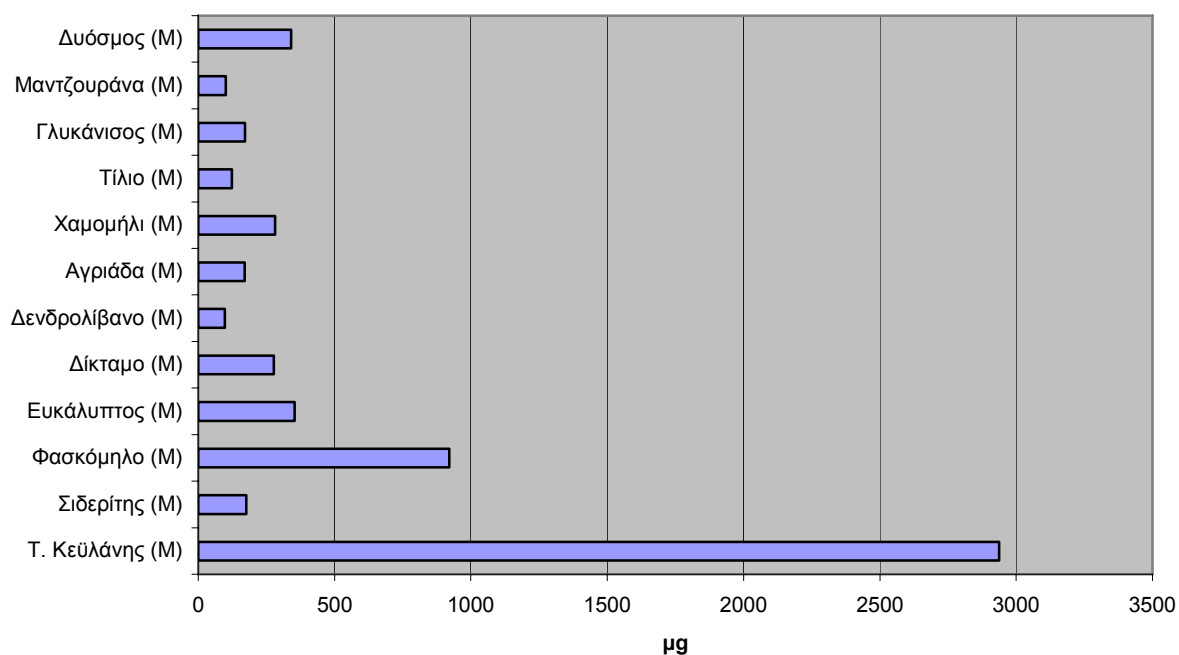
PP (μg) (βάσει ανάκτησης) /240 mL αφεψήματος	Τ. Κεϋλάνης (Ε)	Σιδερίτης (Ε)	Φασκόμηλο (Ε)	Ευκάλυπτος (Ε)	Δίκταμο (Ε)	Δενδρολίβανο (Ε)
Βανιλίνη	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Κιναμικό	2,9	3,7	3,8	0	2,5	0
Τυροσόλη	4,3	35,9	11,3	3,6	1,6	0
π-ΟΗ-βενζοϊκό	21,1	0	28,7	0	0	0
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	0	0	0	0	0	0
Βανιλικό	0	0	0	0	0	0
Ομοβανιλικό	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ο-Κουμαρικό	23,6	0	92,5	0	0	0
Πρωτοκατεχικό	39,4	0	27,5	2,4	118,9	2,0
3,4-Διυδρόξυ-φαινυλοξικό	0	0	0	47,5	0	0
π-Κουμαρικό	9,1	14,5	4,4	8,2	6,7	0,9
Γαλλικό	561,1	0	0	2,3	0	0
Φερουλικό	3,5	8,7	6,5	0	2,9	0
Καφεϊκό	2,4	1,3	5,3	0	1,8	0,1
Απιγενίνη	2,5	2,0	3,7	2,5	2,2	3,3
Επικατεχίνη	2664,6	0	0	0	0	0
Κατεχίνη	2171,0	0	0	0	0	0
Γαλλοκατεχίνη	0	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	5505,6	66,0	183,7	66,4	136,6	6,4

(συνέχεια πίνακα)

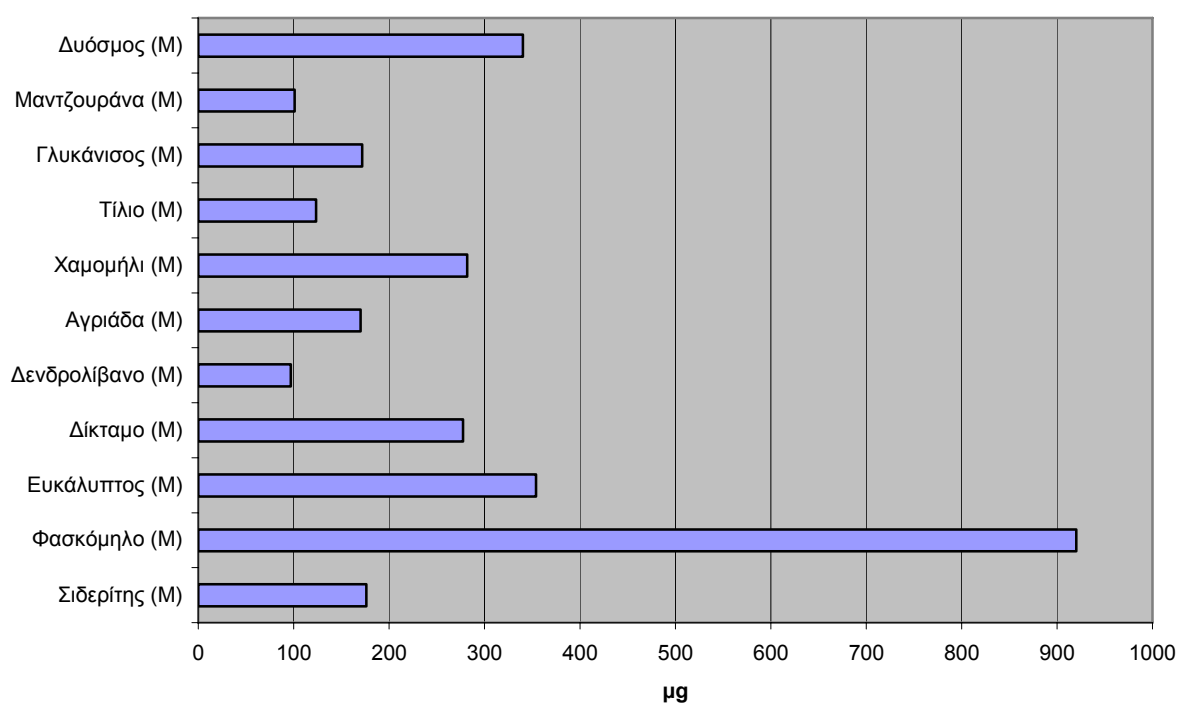
PP (μg) (βάσει ανάκτησης) /240 mL αφεψήματος	Αγριάδα (E)	Χαμομήλι (E)	Τίλιο (E)	Γλυκάνισος (E)	Μαντζουράνα (E)	Δυόσμος (E)
Βανιλίνη	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Κιναμικό	0,4	9,9	2,0	0	0	0,9
Τυροσόλη	0	0,8	4,0	27,9	0	21,9
π-ΟΗ-βενζοϊκό	12,0	19,5	1,0	9,9	0	2,7
π-ΟΗ-φαινυλοξικό	3,9	24,3	0	0	0	1,2
Βανιλικό	2,2	0	0	0	0	0
Ομοβανιλικό	NC	NC	NC	NC	NC	NC
ο-Κουμαρικό	4,4	0	0	0	0	16,0
Πρωτοκατεχικό	0,8	7,1	0	0	0	0
3,4-Διυδρόξυ-φαινυλοξικό	1,4	0	0	0	0	3,4
π-Κουμαρικό	0,4	13,9	0,8	4,8	0	5,4
Γαλλικό	4,9	0	0	0	0	0
Φερουλικό	1,1	8,1	0	0	0	1,6
Καφεϊκό	1,8	4,9	0,1	0	0	0,3
Απιγενίνη	22,4	2,9	3,8	2,5	2,2	11,1
Επικατεχίνη	0	0	0	0	0	0
Κατεχίνη	0	0	0	0	0	0
Γαλλοκατεχίνη	0	0	0	0	0	0
ΣΥΝΟΛΟ	55,8	91,4	11,8	45,2	2,2	64,5

Στις ακόλουθες σελίδες παρατίθενται γραφήματα με τις συνολικές ποσότητες των πολυφαινολών σε κάθε αφέψημα.

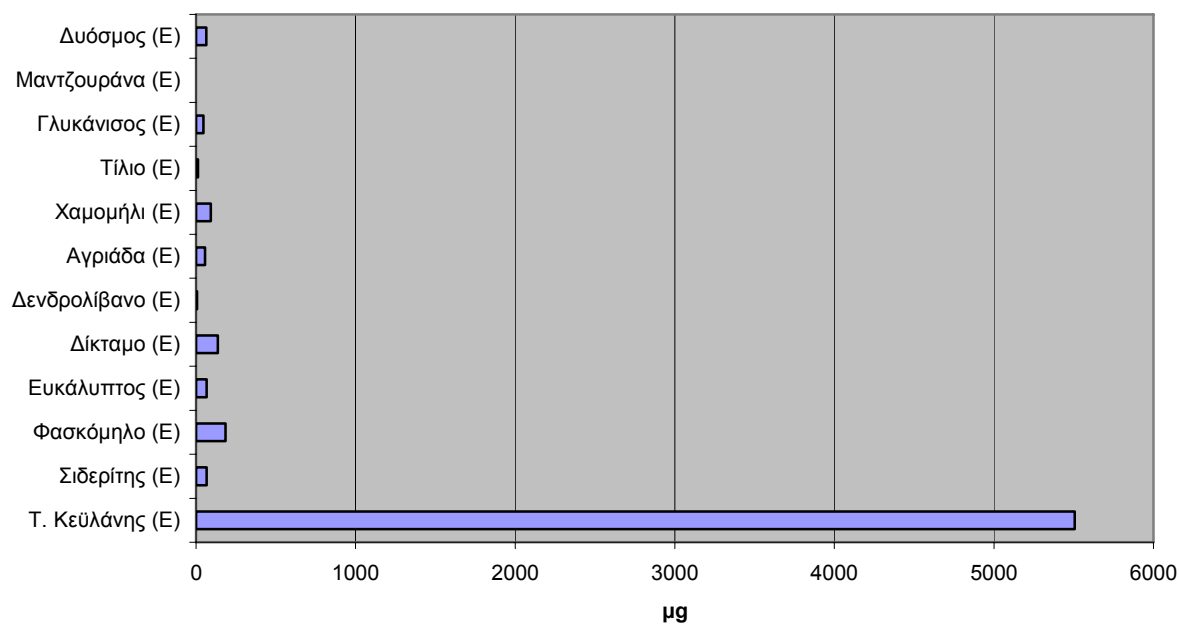
Συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες/ 240 mL αφεψήματος βοτάνων μετά από SPE και παραλαβή με μεθανόλη



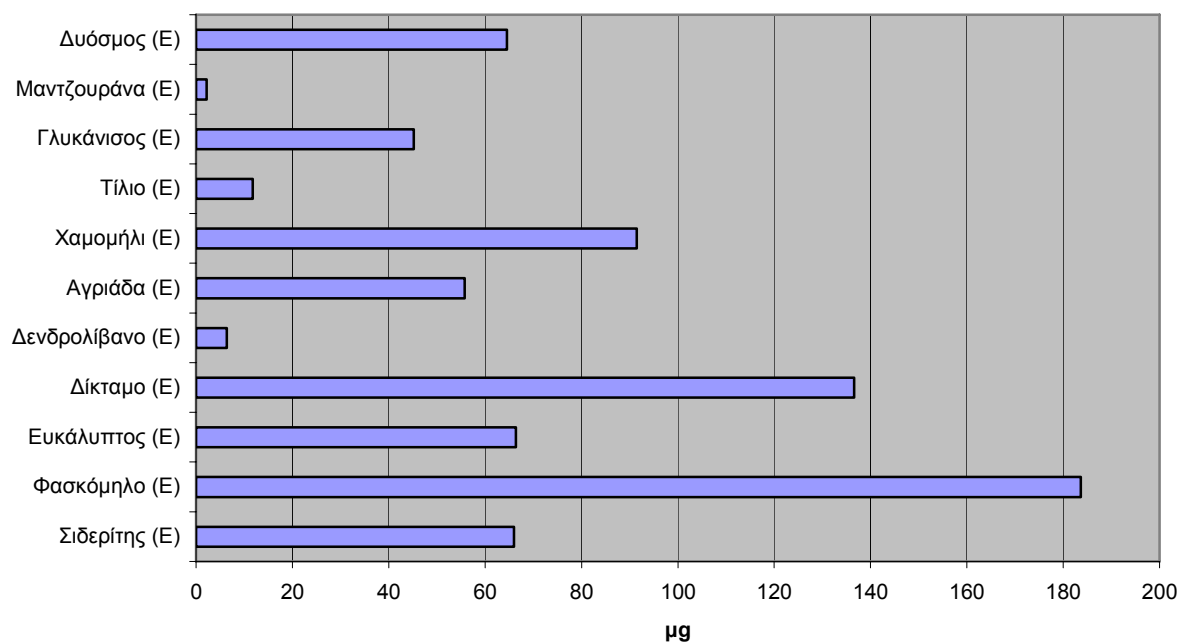
Συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες/ 240 mL αφεψήματος βοτάνων μετά από SPE και παραλαβή με μεθανόλη (χωρίς Τ. Κεϋλάνης)



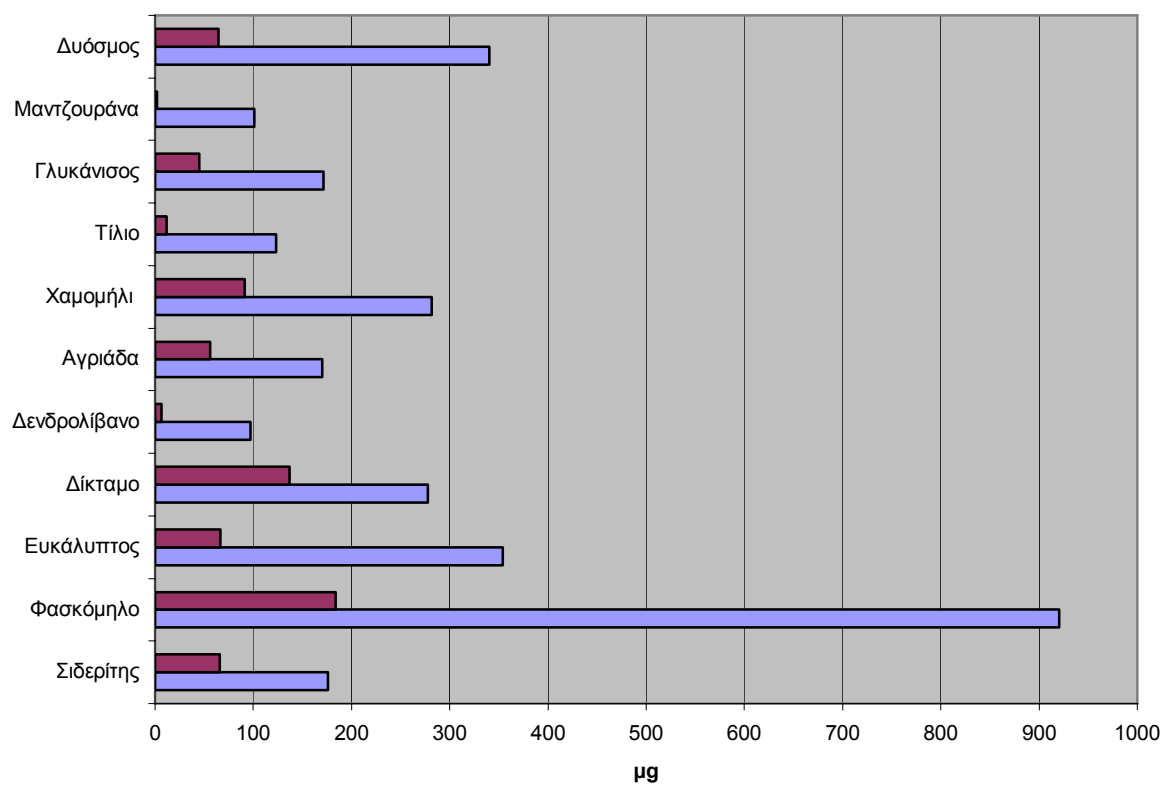
Συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες /240 mL αφεψήματος βοτάνων μετά από SPE και παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα



Συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες/ 240 mL αφεψήματος βοτάνων μετά από SPE και παραλαβή με οξικό αιθυλεστέρα (χωρίς Τ. Κεϋλάνης)



Συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες/ 240 mLαφεψήματος βοτάνων μετά από SPE και παραλαβή με μεθανόλη (ανοιχτόχρωμες ράβδοι) ή οξικό αιθυλαστέρα (σκουρόχρωμες ράβδοι) (χωρίς T. Κεϋλάνης)



Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο προσδιορισμός του είδους και της ποσότητας των πολυφαινολικών ενώσεων στα αφεψήματα βοτάνων της ελληνικής υπαίθρου αποτελεί ένα ανοιχτό πεδίο που συγκεντρώνει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Η πλειοψηφία των ερευνητικών μελετών που πραγματεύονται το συγκεκριμένο θέμα αναφέρονται στο τσάι Κεϋλάνης. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν 12 ελληνικά αφεψήματα βοτάνων στα οποία για πρώτη φορά ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά πολυφαινολικές ενώσεις.

Η μέθοδος που επιλέχθηκε για την παραλαβή των πολυφαινολικών συστατικών των αφεψημάτων ήταν αυτή της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Η μέθοδος SPE έχει εφαρμοστεί για την ανάκτηση πολυφαινολών σε κρασί αλλά και στο πλάσμα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής είναι ότι απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος και είναι σχετικά γρήγορη.

Προκειμένου να καθοριστεί ή να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα χρήσης της μεθόδου για τον ποιοτικό και/ή ποσοτικό προσδιορισμό πολυφαινολικών ενώσεων έγιναν πειράματα ανάκτησης προτύπων διαλυμάτων πολυφαινολών που επιλέχθηκαν ως στόχοι. Η παραλαβή των πολυφαινολών από τη στερεά φάση έγινε με δύο διαλύτες (μεθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα) και ακολούθησε ανάλυση με HPLC ή GC/ MS χρωματογραφίες.

Η μέθοδος SPE φαίνεται πως είναι ικανή να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό πολυφαινολών στα αφεψήματα βοτάνων και ειδικά των απλών πολυφαινολικών ενώσεων. Εντούτοις, πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω και να επιλεγθούν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε να βελτιστοποιηθεί η παραλαβή των πολυφαινολών.

Στα πρότυπα διαλύματα οι ανακτήσεις των πολυφαινολών είναι καλύτερες μετά από παραλαβή με μεθανόλη σε 13 από τις συνολικά 16 πολυφαινόλες – στόχους που μελετήθηκαν. Μάλιστα σε 4 πολυφαινόλες (κιναμικό, *l*-κουμαρικό, γαλλικό, καφεϊκό) η μεθανόλη παρείχε πολύ καλύτερες ανακτήσεις με τη μέθοδο SPE. Για την παραλαβή κατεχίνης, επικατεχίνης και απιγενίνης βρέθηκε ότι ο οξικός αιθυλεστέρας είναι πιο αποδοτικός.

Για πρώτη φορά σε ελληνικά αφεψήματα ανιχνεύτηκαν απλές φαινολικές ενώσεις και κατέστη δυνατή η ποσοτικοποίηση τους. Νέες απλές πολυφαινόλες προσδιορίστηκαν και στο Τσάι Κεϋλάνης. Το αφέψημα τσαγιού Κεϋλάνης παρουσίασε αυξημένη περιεκτικότητα σε κατεχίνες κάτι το οποίο δεν ισχύει για τα υπόλοιπα

αφεψηήματα. Αν στον υπολογισμό της συνολικής περιεκτικότητας των αφεψημάτων σε πολυφαινόλες δεν ληφθούν υπόψιν οι κατεχίνες, τότε το φασκόμηλο υπερτερεί σε απλές φαινολικές ενώσεις σε σχέση με το τσάι Κεϋλανης (920,2 μg vs. 742,6 $\mu\text{g}/\text{c}$) αλλά και σε σχέση με τα υπόλοιπα αφεψηήματα. Η κατάταξη των αφεψημάτων βάσει της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (χωρίς το τσάι Κεϋλάνης) έχει ως εξής : πλούσιο σε πολυφαινόλες είναι το φασκόμηλο, μέτρια περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες έχουν ο ευκάλυπτος, ο δυόσμος, το χαμομήλι, το δίκταμο και ο σιδερίτης, ενώ πιο χαμηλά σε περιεκτικότητα πολυφαινολών είναι ο γλυκάνισος, η αγριάδα, το τίλιο, η μαντζουράνα και το δενδρολίβανο.

Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για την εκπόνηση περαιτέρω μελετών για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών στα ελληνικά βότανα και αφεψηήματα. Από διατροφικής πλευράς, είναι ενδιαφέρον να γνωρίζουμε, όχι μόνο το είδος των περιεχόμενων πολυφαινολών στα διάφορα αφεψηήματα, αλλά και την ποσότητα των καταναλισκόμενων πολυφαινολών, η οποία άλλωστε επηρεάζει τόσο τη διατροφική τους αξία όσο και τις συστηματικές επιδράσεις τους. Από την παρούσα μελέτη δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ποσότητα των αφεψημάτων που πρέπει να καταναλώνονται ημερησίως διότι το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες που υπολογίστηκε αφορά τις πολυφαινόλες – στόχους και όχι όλες τις φαινολικές ουσίες που περιέχονται στα αφεψηήματα. Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα πάντως, φαίνεται ότι για να έχουμε μείωση της συνολικής χοληστερόλης κατά 8 mg/mL , θα πρέπει η κατανάλωση τσαγιού να είναι μεγαλύτερη ή ίση με 9 φλ / ημέρα. Για τους καρκινοπαθείς εφαρμόζεται μια θεραπεία που συνδυάζει την πρόσληψη πράσινου τσαγιού (500 –1500 mg πολυφαινολών) και ενός φαρμάκου (Sulindac), οπότε με τη συνεργιστική δράση αυτών οι επιθυμητές δράσεις αυξάνουν (Fujiki *et al*, 1997; Suganuma *et al*, 1999). Η μέση περιεκτικότητα του πράσινου τσαγιού σε πολυφαινόλες είναι περίπου 100 mg/c , οπότε εύκολα υπολογίζουμε με μια απλή διαίρεση ότι η σύσταση θα έπρεπε να είναι 5 περίπου φλ/ ημέρα. Συνειδητοποιούμε ότι μια τέτοια υψηλή πρόσληψη τσαγιού είναι ανέφικτη. Αν μάλιστα λάβουμε υπόψιν ότι ο ελληνικός πληθυσμός δεν έχει ιδιαίτερη προτίμηση στο πράσινο τσάι καταλαβαίνουμε ότι μία τέτοια σύσταση θα ήταν ανούσιο να συνταχθεί. Θα πρέπει λοιπόν να σκεφτούμε με γνώμονα όχι τις πολυφαινόλες του τσαγιού, αλλά όλα τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στα φυσικά προϊόντα

Η ανεύρεση του είδους και της ποσότητας των πολυφαινολών που περιέχονται στα αφεψηήματα βοτάνων μπορεί να σηματοδοτήσει την απαρχή *in vivo* και *ex vivo*

μελετών για τις επιδράσεις αυτών των αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ένα τέτοιο βήμα θα μπορούσε να έχει προεκτάσεις ως προς την κατεύθυνση βελτίωσης της ποιότητας ζωής του σύγχρονου ανθρώπου μέσω μιας ενδεχόμενης χρήσης των αντιοξειδωτικών ουσιών για φαρμακευτικούς σκοπούς.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdulla, M. and Gruber, P. *Role of Diet Modification in Ccancer Prevention*. BioFactors. 2000: 12 (1–4), pp. 45-51.
- Ahmad, N. and Mukhtar, H. *Cutaneous Photochemoprotection by Green Tea: a brief review*. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology. 2001: 14 (2), pp. 69-76.
- Amarowicz R, Shahidi F. *A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea*. Food Research International.1996: 29(1), pp. 71-76
- Anderson, R.F. *et al. Green Tea Catechins Partially Protect DNA From (.) OH radical-induced Strand Breaks and Base Damage Through Fast Chemical Repair of DNA Radicals*. Carcinogenesis. 2001: 22 (8), pp. 1189-1193.
- Ανδρικόπουλος, Κ. Ν. *Σημειώσεις Οργανικής Χημείας και Δομικής Βιοχημείας (τόμος Ι)*. Αθήνα. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.1998: pp. 174.
- Ανδρικόπουλος, Κ. Ν. *Σημειώσεις Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων (τόμος ΙΙ)*. Αθήνα. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. 1999: pp. 161-220.
- Angerosa, F., d' Alessandro, N., Konstantinou, P. and Di Giacinto. *GC-MC Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil*. J.Agric.Food Chem.1995: 43, pp1802-1807.
- Arogba, S. S. *Mango (Mangifera indica) Kernel: Chromatographic Analysis of the Tannin and Stability Study of the Associated Polyphenol Oxidase Activity*. Journal of Food Composition and Analysis. 2000: 13 (2), pp. 149–156.
- Arce L, Rios A, Valcarcel M. *Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system*. Journal of Chromatography A, 1998:827, pp. 113-120.
- Arts, C.W.I., Hollman, C.H.P. and Kromhout, D. *Chocolate as a Source of Tea Flavonoids*. The Lancet. 1999: 354, pp. 488.
- Bano, M.J. *et al. Phenolic Diterpenes, Flavones and Rosmarinic Acid Distribution During the Development of Leaves, Flowers Stems and Roots of Rosmarinus Officinalis. Antioxidant Activity*. J Agric Food Chem. 2003: 51, pp. 4247-4253.
- Bartolomé, B. *et al. Changes in Phenolic Compounds in Lentils (Lens culinaris) Dduring Germination and Fermentation*. Z Lebensm Unters Forsch A. 1997: 205, pp. 290–294.
- Beecher, R.G., Warden, A.B. and Merken, H. *Analysis of Tea Polyphenols*. Proceedings

- Society for experimental Biology and Medicine. 1999: 220, pp. 267-270.
- Βεκιάρη, Σ.Α. *Οι Πολυφαινόλες του Ελαιολάδου και η Σημασία τους στην Ποιότητά του*. Χημικά χρονικά. 2001: 2, pp. 45-48.
- Boyle, S.P. *et al. Absorption and DNA Protective Effects of Flavonoids Glycosides From an Onion Meal*. European Journal of Nutrition. 2000: 39, pp. 213-223.
- Caldwell, C.R. *Oxygen Radical Absorbance Capacity of the Phenolic Compounds in Plant Extracts Fractionated by High-Performance Liquid Chromatography*. Analytical Biochemistry. 2001: 293 (2), pp. 232-238.
- Caponio, F. *et al. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oils: Influence of the Degree of Olive Ripeness on Organoleptic Characteristics and Shelf-Life*. Eur Food Res Technol. 2001: 212, pp. 329-333.
- Carbonare, M., Grant, G. and Pusztai, A. *Evaluation of Polyphenol Bioavailability in Rat Small Intestine*. European Journal of Nutrition. 2001: 40, pp. 84-90.
- Cheng, T.O. *Tea is Good for the Heart*. Archives of Internal Medicine. 2000: 160 (15), p. 2397.
- Cherubini, A. *et al. Black tea Increases the Resistance of Human Plasma to Lipid Peroxidation in Vitro, but not ex Vivo*. Free Radical Biology & Medicine. 1999: 27 (3/4), pp. 381-387.
- Clifford, M.N. *Chlorogenic Acids and other Cinnamates – Nature, Occurrence and Dietary Burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999: 79, pp. 362-372.
- Coleman, N.A. *Antioxidants in Critical Care Medicine*. Environmental care medicine. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2001: 10, pp. 183-188.
- Colic, M. and Pavelic, K. *Molecular Mechanisms of Anticancer Activity of Natural Dietetic Products*. Journal of Molecular Medicine. 2000: 78 (6), pp. 333-336.
- Conde, E. *et al. Low Molecular Weight Polyphenols in Leaves of Eucalyptus camaldulensis, E. globulus, E. rudis*. Phytochemical Analysis. 1997: 8, pp. 186-193.
- Dalluge J. J, Nelson B. C, Thomas J. B, Sander L. C. *Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography. 1997b: 793(4), pp. 265-274
- Dalluge J. J, Nelson B. C, Thomas J. B, Welch M. J, Sander L. C. *Capillary Liquid Chromatography/ Electrospray Mass Spectrometry for the Separation and*

- Detection of Catechins in Green Tea and Human Plasma. Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 1997a: 11, pp. 1753-1756
- Degenhardt A, Engelhardt U. H, Wendt A-S, Winterhalter P. *Isolation of Black Tea Pigments Using High-Speed Countercurrent Chromatography and Studies on Properties of Black Tea Polymers.* J. Agric. Food. Chem. 2000: 48(11), pp. S200-S205
- De Maat, M.P. *et al. Consumption of Black and Green Tea had no Effect on Inflammation, Homeostasis and Endothelial Markers in Smoking Healthy Individuals.* European Journal of Clinical Nutrition. 2000: 54 (10), pp. 757-763.
- De la Taille, A. *et al. Cancer of the Prostate: Influence of Nutritional Factors. A New Nutritional Approach.* Presse Medicale. 2001: 30 (11), pp. 561-564.
- Depeint, F. *et al. Evidence for Consistent Patterns Between Flavonoid Structures and Cellular Activities.* Proceedings of the Nutrition Society. 2002: 61, pp. 97-103.
- Dreosti, E.I. *Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa and Wine.* Nutrition. 2000: 16, pp. 692-694.
- Duffy, S.J. *et al. Short – and Long – Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease.* Circulation. 2001: 104 (2), pp. 151-156.
- Dufresne, J.C. and Farnworth, R.E. *A Review of Latest Research Findings on the Health Promotion Properties of Tea.* Journal of Nutritional Biochemistry. 2001: 12, pp. 404-421.
- Fairweather – Tait, J.S. *The Importance of Trace Element Speciation in Nutritional Sciences.* Fresenius J. Anal. Chem. 1999: 363, pp. 536-540.
- Fitó, M. *et al. Protective Effect of Olive Oil and its Phenolic Compounds Against Low-Density Lipoprotein Oxidation.* Lipids. 2000: 35 (6), pp. 633-638.
- Frémont, L. *Biological Effects of Resveratrol.* Life Sciences. 2000: 66 (8), pp. 663-673.
- Fujiki, H. *Two Stages of Cancer Prevention With Green Tea.* Mutation Research and Clinical Oncology. 1999: 125, pp. 589-597.
- Fujiki, H. *et al. Cancer Inhibition by Green Tea.* Mutation Research. 1997: 402, pp. 307-310.
- Γαλάρης, Δ. και Δούλιας, Π.Θ. *Βιολογικά Αντιοξειδωτικά. Χημικά Χρονικά.* 2001: 2, pp. 49-50.
- Garry, G.D. *et al. Plant Polyphenols : Are They the New Magic Bullet?* Proceedings of

- the Nutrition Society. 2003: 62, pp. 599-603.
- Gerard, A.A. *et al. Analysis of Catechins from Green and Black Tea in Humans: A specific and Sensitive Colorimetric Assay of Total Catechins in Biological Fluids.* International Journal of Food Science and Nutrition. 1997: 48, pp. 387-392.
- German, J. B. and Walzem, R. L. *The Health Benefits of Wine.* Annual Review of Nutrition. 2000: 20, pp. 561–593.
- Gil-Izquierdo, A. and Mellenthin, A. *Identification and Quantitation of Flavonols in Rowanberry (Sorbus aucuparia L.) juice.* Eur. Food Res. Technol. 2001: 213, pp. 12-17.
- Giovannelli, L. *et al. Effect of Complex Polyphenols and Tannins From Red Wine on DNA Oxidative Damage of Rat Colon Mucosa in Vivo.* European Journal of Nutrition. 2000: 39 (5), pp. 207-212.
- Giugliano, D. *Dietary Antioxidants for Cardiovascular Prevention.* Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases: NMCD. 2000: 10 (1), pp. 38-44.
- Goto T, Yoshida Y, Kiso M, Nagashima H. *Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea.* Journal of Chromatography A. 1996: 749, pp.295-299
- Graefe, E.U. *et al. Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans.* Journal of Clinical Pharmacology. 2001: 41 (5), pp. 492-499.
- Hakim *et al. Reproducibility and Relative Validity of a Questionnaire to Assess Intake of Black Tea Polyphenols in Epidemiological Studies.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001: 10 (6), pp. 667-678.
- HaKim, I.A. *et al. Preparation, Composition and Consumption Patterns of Tea-Based Beverages in Arizona.* Nutrition Research. 2000: 20(12), pp. 1715-1724.
- Hassapidou, N. M. and Bairactari, M. *Dietary Intake of Pre-adolescent Children in Greece.* Nutrition & Food Science. 2001: 31 (3), pp. 136–140.
- Hirvonen, T. *et al. Intake of Flavonols and Flavones and Risk of Coronary Heart Disease in Male Smokers.* Epidemiology. 2001: 12 (1), pp. 62-67.
- Hodgson, J. M. *et al. Acute Effects of Ingestion of Black and Green Tea on Lipoprotein Oxidation.* The American Journal of Clinical Nutrition. 2000: 71 (5), pp. 1103-1107.
- Hoefler, A. C. *et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of tea constituents.* Journal of Chromatography. 1976: 129, pp. 460-463

- Hollman, P.C. *et al.* *Addition of Milk does not Affect the Absorption of Flavonols from Tea in Man.* Free Radical Research. 2001: 34 (3), pp. 297-300.
- Hollman, P.C.H. *Bioavailability of Flavonoids.* European Journal Clinical Nutrition. 1997: S1 (1), pp. S66-S69.
- http://www.agsci.ubc.ca/courses/fnh/410/lipids/5_1.htm, 2001.
- Horie H, Kohata K. *Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation.* Journal of Chromatography A, 1998:802, pp. 219-223
- Horie H, Mukai, T, Kohata K. *Simultaneous determination of qualitative important components in green tea infusions using capillary electrophoresis.* Journal of Chromatography A. 1996: 758, pp. 332-335
- Hu, C. and Kitts, D.D. *Evaluation of Antioxidant Activity of Epigallocatechin, Gallate in Biphasic Model Systems in Vitro.* Molecular and Cellular Biochemistry. 2001: 218, pp. 147-155.
- Ichihashi, M. *et al.* *Preventive Effect of Antioxidant on Ultraviolet-Induced Skin Cancer in Mice.* Journal of Dermatological Science. 2000: 23 (1), pp. S45-S50.
- Ishige, K., Schubert, D. and Sagara, Y. *Flavonoids Protect Neuronal Cells From Oxidative Stress by Three Distinct Mechanisms.* Free Radical Biology and Medicine. 2001: 30 (4), pp. 433-446.
- Καστανάς, Η. *Επιδράσεις Αντιοξειδωτικών στην Αθηρογένεση και την καρκινογένεση.* Πρακτικά Ημερίδας για τα Λειτουργικά Τρόφιμα. Ένωση Ελλήνων Χημικών: 31-5-2002.
- Katiyar, S.K. and Elmets, C.A. *Green Tea Polyphenolic Antioxidants and Skin Photoprotection (Review).* International Journal of Oncology. 2001: 18 (6), pp. 1307-1313.
- Katiyar, S.K. *et al.* *Green Tea Polyphenol (-)- epigallocatechin-3-gallate Treatment of Human Skin Inhibits Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative Stress.* Carcinogenesis. 2001: 22(2), pp. 287-294.
- Khokhar, S. *et al.* *Total Phenol, Catechin and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom.* J Agric Food Chem. 2002: 50, pp. 565-570.
- Krause Mendelson, M. *Food, Nutrition and Diet Therapy*, 10th ed. In: Mahan, L.K., Escott-Stymp, S. (eds). USA: W.B. Saunders Company, 2000.
- Kuhnle, G. *et al.* *Epicatechin and Catechin are O-methylated and Glucuronidated in the Small Intestine.* Biochemical and Biophysical Research. 2000: 277 (2), pp. 507-512.

- Kuntz, S. *et al. Comparative Analysis of the Effects of Flavonoids on Proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines.* European Journal of Nutrition. 1999: 38, pp. 133-142.
- Langley – Evans, S. *Tea as a Protective Agent in Cardiovascular Health.* Nutrition and Food Science. 2001: 31 (2), pp. 75-78.
- Langley – Evans, S.C. *Antioxidant Potential of Green and Black Tea Determined Using the Ferric Reducing Power (FRAP) assay.* International Journal of Food Science and Nutrition. 2000: 51(3), pp. 181-188.
- Lee, A., Thurnham, I. D. and Chopra, M. *Consumption of Tomato Products With Olive Oil But not Sunflower Oil Increases the Antioxidant Activity of Plasma.* Free Radical Biology and Medicine. 2000: 29 (10), pp. 1051–1055.
- Li, C. *et al. Analysis of Urinary Metabolites of Tea Catechins by Liquid Chromatography / Electrospray Ionization Mass Spectrometry.* Chemical Research in Toxicology. 2001: 14 (6), pp. 702-707.
- Liang, Y. and Xu, Y. *Effect of PH on Cream Particle Formation and Solids Extraction Yield of Back Tea.* Food Chemistry. 2001: 77, pp. 155-160.
- Lin, Y-S. *et al. Determination of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Flowers (Camellia sinensis) and Their Hydroxyl Radical Scavenging and Nitric Oxide Suppressing Effects.* J Agric Food Chem. 2003: 51, pp. 975-980.
- Lodovici, M. *et al. Effect of Natural Phenolic Acids on DNA Oxidation in Vitro.* Food and Chemical Toxicology. 2001: 39j, pp. 1205-1210.
- Lu, Y. and Foo, Y.L. *Salvianolic Acid L, a Potent Phenolic Antioxidant From Salvia Officinalis.* Tetrahedron Letters. 2001: 42, pp. 8223-8225.
- Manach, C. *et al. Comparison of the Bioavailability of Quercetin and Catechin in Rats.* Free Radical Biology & Medicine. 1999: 27 (11/12), pp. 1259-1266.
- Marken, H. M. and Beecher, G. R. *Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000: 48 (3), pp. 577–599.
- Maznah, I. *et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Strobilanthes Crispus Leaf Extract.* J. Nutr. Biochem. 2000: 11, pp. 536-542.
- Miao, J.L. *et al. The Scavenging Reactions of Nitrogen Dioxide Radical and Carbonate Radical by Tea Polyphenol Derivatives: a Pulse Radiolysis study.* Radiation Physics and Chemistry. 2001: 60, pp. 163-168.
- Middleton, E.Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T.C. *The Effects of Plant Flavonoids*

- on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer*. Pharmacological Reviews. 2000: 52 (4), pp. 673–751.
- Miketova P, Schram K. H, Whitney J. L, Kerns E. H, Valcic S, Timmermann B. N, Volk K. J. *Mass Spectrometry of Selected Components of Biological Interest in Green Tea Extracts*. J. Nat. Prod. 1998: 61(4), pp. 461-467
- Montanari, L. *et al. Organic and Phenolic Acids in Beer*. [Electronic Text Center, University of Basilicata, University of Perugia and National Institute of Nutrition in Rome]. <http://www.idealibrary.com/links/artid/fstl.1999.0593>
- Moline, J. *et al. Dietary Flavonoids and Hypertension: Is There a Link?* Medical Hypotheses. 2000: 55 (4), pp. 306-309.
- Μπόσκου, Δ. *Χημεία Τροφίμων*. Εκδόσεις Γαρταγάνη: Θεσσαλονίκη, 1997.
- Mulder, P.J.T. *et al. Analysis of Theaflavins in Biological Fluids Using Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry*. Journal of Chromatography. 2001: 760, pp. 271-279.
- Muto, S. *et al. Inhibition by Green Tea Catechins of Metabolic Activation of Procarcinogens by Human Cytochrome P 450*. Mutation Research. 2001: 479, pp. 197-206.
- Nakakuki H, Horie H, Yamauchi Y, Kohata K. *Rapid analysis of methylated xanthines in teas by an improved high-performance liquid chromatographic method using a polyvinylpyrrolidone pre-column*. Journal of Chromatography, 1999:848, pp. 523-527
- Nagano, J. *et al. A Prospective Study of Green Tea Consumption and Cancer Incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan)*. Cancer Causes and Control. 2001: 12, pp. 501-508.
- Nelson B. C, Brown Thomas J, Wise S. A, Dalluge J. J. *The Separation of Green Tea Catechins by Micellar Electrokinetic Chromatography*. J. Microcolumn Separations. 1998: 10(8), pp. 671-679
- Nicoli, M.C. *et al. Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/FST. 1997: 30 (3), pp. 1096-1127.
- Norrish, A. E. *et al. Men Who Consume Vegetable Oils Rich in Monounsaturated Fat: Their Dietary Patterns and Risk of Prostate Cancer (New Zealand)*. Cancer Causes and Control. 2000: 11 (7), pp. 609-615.
- Ogawa A, Arai H, Tanizawa H, Miyahara T, Toyo'oka T. *On-line screening method for*

- antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection.* Analytica Chimica Acta. 1999: 383, pp. 221-230
- Owen, W.R. *et al.* *Olive–Oil Consumption and Health: the Possible Role of Antioxidants.* The Lancet Oncology. 2000: 1, pp. 107-112.
- Pineiro, Z. *et al.* *Determination of Catechins by Means of Extraction with Pressurized Liquids.* Journal of Chromatography A. 2004: 1026, pp. 19-23.
- Piretti M. V. *et al.* *Separation of peracetylated flavanoid and flavonoid polyphenols by normal-phase high-performance liquid chromatography on a cyano-silica column and their determination.* Journal of Chromatography. 1990: 514, pp. 334-342
- Poon G. K. *Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 1998: 794, pp. 63-74
- Prior, R.L. and Cao, G. *Antioxidant Capacity and Polyphenolic Components of Teas: Implications for Altering In vivo Antioxidant Status.* Society for Experimental Biology and Medicine. 1999: 220 (4), pp. 255-261.
- Quinlan, P., Lane, J. and Aspinall, L. *Effects of Hot Tea, Coffee and Water Ingestion on Physiological Responses and Mood: the Role of Caffeine, Water and Beverage Type.* Psychopharmacology. 1997: 134, pp. 164-173.
- Ren, W. *et al.* *Flavonoids: Promising Anticancer Agents.* Medicinal Research Reviews. 2003: 23(4), pp. 519-534.
- Rice-Evans, C. and Miller, J. N. *Antioxidants-the Case for Fruits and Vegetables in the Diet.* British Food Journal. 1995: 97 (9), pp. 35–40.
- Russo, A. *et al.* *Bioflavonoids as Antiradicals, Antioxidants and DNA Cleavage Protectors.* Cell Biology and Toxicology. 2000: 16, pp. 91-98.
- Saya, M.V. *et al.* *Isolation and Characterization of Melanic Pigments Derived From Tea and Tea Polyphenols.* Food Chemistry. 2001: 73, pp. 177-184.
- Sawai, Y. and Moon, J.H. *NMR Analytical Approach to Clarify the Molecular Mechanisms of the Antioxidative and Radical – Scavenging Activities of Antioxidants in Tea Using 11-diphenyl-2-picrylhydrazyl.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000: 48(12), pp. 6247-6253.
- Scalbert, A. and Williamson, G. *Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols.* The Journal of Nutrition. 2000: 130 (8S), pp. 2073S-2085S.
- Serafini, M. *et al.* *Inhibition of Human LDL Lipid Peroxidation by Phenol-rich Beverages*

- and Their Impact on Plasma Total Antioxidant Capacity in Humans*. J. Nutr. Biochem. 2000: 11, pp. 585-590.
- Shahidi, F. *Antioxidants in Food and food antioxidants*. Die Nahrung. 2000: 44(3), pp. 158-163.
- Shankel, D.M. *et al. Role of Antimutagens / Anticarcinogens in Cancer Prevention*. Biofactors. 2000: 12 (1-4), pp. 113-121.
- Shi, X. *et al. Antioxidant Properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its Inhibition of Cr (I)-Induced DNA Damage and Cr (CI) –or TPA- Stimulated NF-KB Activation*. Molecular and Cellular Biochemistry. 2000: 206, pp. 125-132.
- Spencer, P.E.J. *et al. Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000: 272 (1), pp. 236-241.
- Stach, D. and Schmitz, J.O. *Decrease in Concentration of Free Catechins in Tea Over Time Determined by Micellar Electrokinetic Chromatography*. Journal of Chromatography. 2001: 924, pp. 519-522.
- Suganuma, M. *et al. Green Tea and Cancer Chemoprevention*. Mutation Research. 1999: 428, pp. 339-344.
- Thiagarajan, G. *et al. Antioxidant Properties of Green and Black Tea and their Potential Ability to Retard the Progression of Eye Lens Cataract*. Experimental Eye Research. 2001: 73 (3), pp. 393-401.
- Toit, R. *et al. Comparison of the Antioxidant Content of Fruits, Vegetables and Tea Measured as Vitamin C Equivalents*. Toxicology. 2001: 166, pp. 63-69.
- Tomayo, C., Richardson, M.A., Diamond, S. and Skoda, I. *The Chemistry and Biological Activity of Herbs Used in Flor-Essence Herbal Tonic and Essiac*. Polytotherapy Research. 2000: 14(1), pp. 1-14.
- Trevisanato, S. I. and Kim, Y. I. *Tea and Health*. Nutrition Reviews. 2000: 58 (1), pp. 1-10.
- Triantaphyllou, K., Blekas, G. και Boskou, D. *Antioxidative Properties of Water Extracts Obtained From Herbs of the Species Lamiaceae*. International Journal of Food Science and Nutrition. 2001: 52 (4), pp. 313-317.
- Trichopoulou, A. *et al. Nutritional Composition and Flavonoid Content of Edible Wild Greens and Green Pies: a Potential Rich Source of Antioxidant Nutrients in the Mediterranean Diet*. Food Chemistry. 2000:70, pp. 319-323.
- Uesato, S. *et al. Inhibition of Green Tea Catechins Against the Growth of Cancerous*

- Human Colon and Hepatic Epithelial Cells*. Cancer Letters. 2001: 170, pp. 41-44.
- Valcic, S. *et al. Antioxidant Chemistry of Green Tea Catechins. New Oxidation Products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin From their Reactions With Peroxyl Radicals*. Chemical Research in Toxicology. 2000: 13(9), pp. 801-810.
- van het Hof, H.K. *et al. Plasma and Lipoprotein Levels of Tea Catechins Following Repeated Tea Consumption*. Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine. 1999: 220 (4), pp. 203-209.
- Vinson, A. J. *Black and Green Tea and Heart Disease: a Review*. BioFactors. 2000: 13 (1-4), pp. 127-132.
- Vinson, A. J. *Flavonoids in Foods as in Vivo and in Vitro Antioxidants*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 1999: 472, pp. 115-130.
- Visioli, F. and Gall, C. *Antiatherogenic Components of Olive Oil*. Current Atherosclerosis Report. 2001: 3 (1), pp. 64-67.
- Visioli, F. *et al. Cardioprotective Properties of Olive Oil-Derived Polyphenols*. 11th International Symposium on Atherosclerosis: 9-10-1997.
- Wang, F.J. *et al. A Dose-Response Effect From Chocolate Consumption on Plasma Epicatechin and Oxidative Damage*. Journal of Nutrition. 2000: 130, pp. 2115S-2119S.
- Wang, H., Helliwell, K. *Epimerisation of Catechins in Green Tea Infusions*. Food Chemistry. 2000: 70, pp. 337-344.
- Wang, H., Helliwell, K. *Determination of Flavonols in Green and Black Tea Leaves and Green Tea Infusions by High-Performance Liquid Chromatography*. Food Research International. 2001: 34, pp. 223-227.
- Wang, H., Provan, J.G., and Helliwell, K. *Tea Flavonoids: their Functions, Utilization and Analysis*. Trends in Food Science and Technology. 2000:11, pp. 152-160.
- Weisburger, H. J. *Approaches for Chronic Disease Prevention Based on Current Understanding of Underlying Mechanism*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2000: 71 (6), pp. 1710S-1714S.
- Weisburger, H. J. *Eat to Live, not Live to Eat*. Nutrition. 2000: 16, pp. 767-773.
- Weisburger, H.J. *et al. Investigation of Commercial Mitolife as an Antioxidant and Antimutagen*. Nutrition. 2001: 17, pp. 322-325.
- Wiseman, A.S. *et al. Dietary Non-Tocopherol Antioxidants Present in Extra Virgin Olive*

- Oil Increase the Resistance of Low-Density Lipoproteins to Oxidation in Rabbits. Atherosclerosis. 1996: 120, pp. 15-23.*
- Wollgast, J. and Anklam, E. *Polyphenols in Chocolate: is There a Contribution to Human Health?* Food Research International. 2000: 33, pp. 449-459.
- Wong I. Y. F, He Z-D, Huang Y, Chen Z-Y. *Antioxidative Activities of Phenylethanoid Glycosides from Ligustrum purpurascens.* J. Agric. Food Chem. 2001: 49(6), pp. 3113-3119
- Yamada, K. and Tachibana, H. *Recent Topics in Anti-oxidative factors.* BioFactors. 2000: 13 (1-4), pp. 167-172.
- Yang, C. S. *et al. Inhibition of Carcinogenesis by Tea: Bioavailability of Tea Polyphenols and Mechanisms of Actions.* Society for Experimental Biology and Medicine. 1999, pp. 213-217.
- Yang-Sheng, L. *et al. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003: 51, pp.1864-1873
- Yong Y. L, Kwokei J. Ng, Shenjiang Y. *Characterization of flavonoids by liquid chromatography- tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography. 1993: 629, pp. 389-393
- Yoshida, H. *et al. Inhibitory Effect of Tea Flavonoids on the Ability of Cells to Oxidize Low Density Lipoprotein.* Biochemical Pharmacology. 1999: 58, pp. 1695-1703.
- Zhu, N. *et al. Identification of Reaction Products of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate and Pyrogallol With 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical.* Food Chemistry. 2001: 73, pp. 345-349.
- Zhu, N. *et al. Identification of Oxidation Products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin With H₂O₂.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000:48 (4), pp. 979-981.
- Zhu Q. Y, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen Z-Y. *Stability of Green Tea Catechins.* J. Agric. Food Chem.1997: 45,pp. 4624-4628