

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΔΙΑΤΡΟΦΗ, ΤΡΟΦΙΜΑ & ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

Παρασκευή Βασιλακοπούλου

Αθήνα, 2019

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΔΙΑΤΡΟΦΗ, ΤΡΟΦΙΜΑ & ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

Αντωνία Χίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ΧΠ (Επιβλέπουσα)

Βάιος Καραθάνος, Καθηγητής ΧΠ

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια ΧΠ

Η Παρασκευή Βασιλακοπούλου

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι η κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Χίου Αντωνία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέπουσά μου, για την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής και που μου έδωσε τη δυνατότητα να γίνω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Η επιστημονική καθοδήγηση και συμπαράσταση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και σε όλο το διάστημα της συγγραφής ήταν καταλυτικές για την εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας – Βιοχημείας – Φυσικοχημείας Τροφίμων, και ειδικότερα στην κα Χρηστέα Μαργαρίτα η βοήθεια της οποίας ήταν παραπάνω από πολύτιμη καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης του πειράματος. Ακόμα, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Μαρούλα Κόκοτου για τη συμμετοχή της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας για τις γνώσεις, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου προσέφερε.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους, πρώτα απ' όλα στην οικογένειά μου για την ατελείωτη συμπαράσταση και τη συνεχή υποστήριξή τους σε ό,τι κάνω, και φυσικά στους φίλους που με στήριζαν καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Η παρούσα διπλωματική μελέτη αφορά τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα χρησιμοποιώντας ως αναλυτική τεχνική την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Τα τελευταία χρόνια οι πολικές φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στα τρόφιμα έχουν απασχολήσει μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας, καθώς τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών τις έχουν συσχετίσει με ευεργετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Αν και η βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι σχετικά χαμηλή, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για την ευεργετική τους δράση στον οργανισμό ακόμα και όταν η χορήγησή τους γίνεται μακροπρόθεσμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις μέσω της διατροφής. Επιπλέον, οι πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις στα τρόφιμα δεν έχουν απαραίτητα και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ενεργών μεταβολιτών μέσα στο σώμα. Γι' αυτό τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται νέες πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές προκειμένου να επιτυγχάνεται ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους σε ιστούς αλλά και στα διάφορα βιολογικά υγρά.

Το πείραμα που διεξάχθηκε στην παρούσα μελέτη, αφορούσε την εφαρμογή χρωματογραφικής μεθόδου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων σε ιστούς επίμυων και ύστερα η εφαρμογή αυτής της αναλυτικής μεθόδου συγκεκριμένα σε ιστούς εγκεφάλου προερχόμενοι από επίμυες στους οποίους έγινε διατροφική παρέμβαση με κορινθιακή σταφίδα για 10 ή 20 μέρες. Τα αποτελέσματα του πειράματός μας έδειξαν ότι ανιχνεύονται σημαντικές ποσότητες φαινολικών ενώσεων στον εγκέφαλο και μάλιστα τα φλαβονοειδή ήταν και αυτά που απαντώνται στη μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ των διαφορετικών περιοχών του εγκεφάλου που μελετήθηκαν (εγκεφαλικός φλοιός, παρεγκεφαλίδα, ιππόκαμπος, μεσεγκέφαλος και ραβδωτό σώμα).

Λέξεις κλειδιά: πολικές φαινολικές ενώσεις, χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας, βιολογικά δείγματα

The work of this thesis deals with the determination of polar phenolic compounds in biological samples using liquid chromatography coupled with a mass spectrometer (LC-MS).

In recent years, phenolic compounds which are abundantly found in food, have triggered the interest of the scientific community, as results from various epidemiological studies have linked these compounds to many health benefits. Even though the bioavailability of these compounds is relatively low, there have been strong indications of their beneficial effects, even when they are administered in the body at low concentrations via nutrition over an extended period of time. Furthermore, the most abundant phenolic compounds in foods aren't necessarily the ones with the highest levels of active metabolites within the body. For this reason, new and more sensitive analytical techniques have been developed over the past decade in order to achieve the qualitative and quantitative determination of polar phenolic compounds in various tissues and biological fluids.

The experiment which was conducted for the study and the purpose of this thesis, involves the use of a chromatographic method for the determination of polar phenolic compounds in rat tissues. In addition, this method was tested on brain tissues which were extracted from rats, and of to which were orally fed with Korinthian currant for 10 or 20 days. The results showed that significant amounts of phenolic compounds were detected in the brain and particularly the flavonoids were the ones detected with the highest frequency within the different regions of brain which were tested (cortex, cerebellum, mesencephalon, hippocampus and striatum).

Keywords: phenolic compounds, LC-MS, in vivo

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	14
Α' ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	16
1.1 Ορισμός πολικών φαινολικών ενώσεων.....	16
1.2 Κατάταξη και χημικές δομές των πολικών φαινολικών ενώσεων.....	17
1.3 Βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων στα φυτά.	21
1.4 Περιεχόμενο και ρόλος φαινολικών ενώσεων στα φυτά και στα τρόφιμα.....	22
1.5 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών ενώσεων	24
1.5.1 Γενικά	24
1.5.2 Μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων.....	25
1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων.	29
1.5.4 Ανασκόπηση μελετών βιοδιαθεσιμότητας των πολικών φαινολικών ενώσεων.....	32
1.5 Πολικές φαινολικές ενώσεις και υγεία.	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	37
2.1 Εισαγωγή.....	37
2.2 Προκατεργασία Βιολογικών Δειγμάτων	38
2.2.1 Τεχνικές παραλαβής πολικών φαινολικών ενώσεων από το υπόστρωμα των βιολογικών δειγμάτων	39
2.2.1.1 Υπέρηχοι (Ultrasonication).....	39
2.2.1.2 Φυγοκέντρωση (Centrifugation).....	39
2.2.2 Τεχνικές καθαρισμού δείγματος.....	39
2.2.2.1 Καθίζηση πρωτεϊνών (PPT)	39
2.2.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	40
2.3 Τεχνικές Ανάλυσης και Προσδιορισμού των Πολικών Φαινολικών Ενώσεων	43
2.3.1 Γενικά για την υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)	43
2.3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC) για τον προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων.....	46
2.4 Φασματομετρία μάζας – τεχνολογίας Orbitrap.....	50
2.4.1 Φασματομετρία μάζας: Αρχή λειτουργίας και Οργανολογία.....	50
2.4.2 Πηγές Ιόντων	52
2.4.2.1. Πηγή Ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	53

2.4.3 Αναλυτής Μάζας	56
2.4.3.1 Αναλυτής Μάζας τεχνολογίας Orbitrap™	58
2.4.4 Ανιχνευτής Ιόντων	61
2.4.5 Σύστημα Κενού	62
2.4.6 Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων (H/Y)	62
2.5 Σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS)	62
Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	65
3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	65
3.2 Πρότυπες ουσίες, αντιδραστήρια και διαλύτες.	66
3.2.1 Πρότυπες ουσίες	66
3.2.2 Αντιδραστήρια και διαλύτες.	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ 32 ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΟΥ LC-MS	69
4.1 Εισαγωγή	69
4.2 Βελτιστοποίηση παραμέτρων λήψης των φασμάτων μάζας (MS)	69
4.3 Επιλογή παραμέτρων υγρού χρωματογράφου υπερυψηλής πίεσης (UHPLC)	70
4.3.1 Επιλογή θετικού ή αρνητικού ιοντισμού ESI.....	70
4.3.2 Επιλογή παραμέτρων χρωματογραφικής ανάλυσης	71
4.4 Επιλογή μεθόδου προκατεργασίας για τον προσδιορισμό πολικών ΦΕ σε βιολογικά δείγματα.....	72
4.4.1 Πρωτόκολλα προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων.....	72
4.4.1.1 Πρωτόκολλο προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων χωρίς λυοφιλίωση	72
4.4.1.2 Πρωτόκολλο προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων με λυοφιλίωση.	73
4.4.2 Προσδιορισμός της % σχετικής ανάκτησης	74
4.5 Επικύρωση μεθόδου	74
4.5.1 Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης	74
4.5.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) μεθόδου	75
4.5.4 Μελέτη φαινομένου επίδρασης μήτρας (Matrix Effect)	75
4.6 Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
5.1 Μοριακά ιόντα και βελτιστοποίηση των παραμέτρων λήψης των φασμάτων μάζας	77
5.2 Παράμετροι μεθόδου υγρής χρωματογραφίας (UHPLC).....	80
5.2. Χρωματογραφική ανάλυση.....	80
5.3 Επικύρωση μεθόδου	80
5.3.1 Γραμμικότητα	80
5.3.2 Επαναληψιμότητα.....	82
5.3.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	83

5.4 Μέθοδοι προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων.....	84
5.4.1 Υγρασία (%) των ιστών	84
5.4.2 Σχετικές ανακτήσεις (%R)	84
5.4.3 Επίδραση μήτρας	86
5.5 Πολικές φαινόλες σε εγκεφαλικό ιστό επίμυων.....	86
5.5.1 Υγρασία (%) των λυοφιλοποιημένων ιστών	87
5.5.2 Κατανομή πολικών ΦΕ στον εγκεφαλικό φλοιό	87
5.5.3 Κατανομή πολικών ΦΕ στην παρεγκεφαλίδα (cerebellum)	88
5.5.4 Κατανομή πολικών ΦΕ στον ιππόκαμπο (hippocampus)	88
5.5.5 Κατανομή των πολικών ΦΕ στον μεσεγκέφαλο (mesencephalon).....	89
5.5.6 Κατανομή των πολικών ΦΕ στο ραβδωτό σώμα(striatum)	89
5.5.7 Συζήτηση αποτελεσμάτων	90
5.6 Συμπεράσματα	91
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

Εικ.1.1 (α) Φαινόλη, η πιο απλή φαινολική ένωση. (β) Γαλλικό οξύ, μια απλή φαινολική ένωση (γ) Κερκετίνη, μια πολυφαινόλη.....	σ.15
Εικ.1.2 Οιστρόνη, γυναικεία ορμόνη.....	σ.15
Εικ.1.3 Τα σημεία στο φυτικό κύτταρο όπου εντοπίζονται οι φαινολικές ενώσεις (τα υπόλοιπα οργανίδια του κυττάρου δεν εμφανίζονται στην εικόνα.....	σ.19
Εικ.1.4 Παραδείγματα ομοιοπολικών δεσμών που απαντώνται στις μη-διαλυτές φαινολικές ενώσεις: (α) εστερικός δεσμός του 4-υδροξυ βενζοϊκού οξέος, (β) αιθερικός δεσμός κατεχίνης και (γ) δεσμός C-C της ναρινγενίνης με ένα μόριο κυτταρίνης.....	σ.19
Εικ.1.5 Μηχανισμοί απορρόφησης των διαιτητικών πολικών φαινολικών ενώσεων.....	σ.25
Εικ.2.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών σε δείγμα πλάσματος με προσθήκη υδατικού διαλύματος οξέος.....	σ.39
Εικ.2.2 Μετασχηματισμένη πυριτία με επικαλυμμένες τις σιλανολικές ομάδες (silica-based, C18-materials).....	σ.41
Εικ.2.3 Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).....	σ.42
Εικ.2.4 Συνοπτικό σχήμα της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	σ.52
Εικ.2.5 Αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή ιόντων (ESI).....	σ.53
Εικ.2.6 Ο μηχανισμός του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	σ.54
Εικ.2.7 Ο αναλυτής μάζας Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap™ της Thermo Fisher Scientific.....	σ.58
Εικ.2.8 Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του Exactive Plus Orbitrap™.....	σ.59
Εικ.2.9 Απεικόνιση του τροχιακού αναλυτή μαζών Orbitrap.....	σ.60
Εικ.3.1 Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών Orbitrap (LC-MS), (Thermo Scientific™ Exactive Plus with Ultimate 3000 Rapid Separation LC System).....	σ.65
Εικ.5.1 Χρωματογράφημα μείγματος πρότυπων διαλυμάτων 32 πολικών ΦΕ συγκέντρωσης 5 mg/L, σε διαλύτη MeOH-H ₂ O (1:1), στον αρνητικό ιοντισμό, χρησιμοποιώντας ως χρωματογραφική στήλη την Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8μm, 4.6 x 100mm, Agilent).....	σ.79

Πίν.1.1: Κύριες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων.....	σ.16
Πίν.1.2: Κατηγορίες των φλαβονοειδών.....	σ.17
Πίν.1.3: Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών πολικών φαινολικών ενώσεων.....	σ.30
Πίν.2.1: UHPLC μέθοδοι για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα.....	σ.47
Πίν.2.2: Κύριες τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας.....	σ.51
Πίν.2.3: Κύριες κατηγορίες αναλυτών μάζας και τα βασικά τους χαρακτηριστικά.....	σ.56
Πίν.4.1: Μοριακά ιόντα και χρόνοι ανάσχεσης για κάθε πολική ΦΕ στον αρνητικό και θετικό ιοντισμό.....	σ.69
Πίν.4.2: Βαθμωτή έκλουση για τις πολικές ΦΕ που προσδιορίζονται στον αρνητικό ιοντισμό υπό ροή 0.3 mL/min.....	σ.70
Πίν.5.1: Παράμετροι φασματόμετρου μάζας (Full MS) που επιλέχθηκαν μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών λήψης των φασμάτων μάζας.....	σ.76
Πίν.5.2: Μοριακά ιόντα ([M-H] ⁻) των πολικών ΦΕ που αποκρίνονται στον αρνητικό ιοντισμό υπό εφαρμοζόμενη τάση 3.00 kV.....	σ.77
Πίν.5.3: Μοριακά ιόντα ([M+H] ⁺) των πολικών ΦΕ που αποκρίνονται στον θετικό ιοντισμό υπό εφαρμοζόμενη τάση 3.00 kV.....	σ.79
Πίν.5.4: Εξίσωση ευθείας παλινδρόμησης, συντελεστής συσχέτισης και περιοχή γραμμικότητας προτύπων πολικών φαινολών σε διαλύτη MeOH-H ₂ O (1:1).	σ.80
Πίν.5.5: Επαναληψιμότητα πρότυπων διαλυμάτων των πολικών ΦΕ σε διαλύτη MeOH-H ₂ O (1:1).....	σ.81
Πίν.5.6: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των πολικών ΦΕ (mg/L).....	σ.82
Πίν.5.7: % Υγρασία των ιστών μέσω λυοφιλίωσης.....	σ.83
Πίν.5.8: Σχετική ανάκτηση πολικών φαινολικών ενώσεων (%) από ιστούς μετά από λυοφιλίωση.....	σ.83
Πίνακας 5.9: Σχετική ανάκτηση πολικών φαινολικών ενώσεων (%) από νωπούς ιστούς.....	σ.84
Πίν.5.10: Χρόνος ανάσχεσης (RT, min), συντελεστής επίδρασης μήτρας (Matrix Factor, MF%) και επίδραση μήτρας (Matrix Effect, ME %) για κάθε πολική φαινολική ένωση.....	σ.85

Πίν.5.11: Υγρασία (%) των λυοφυλιωμένων ιστών	σ.86
Πίν.5.12: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού. Στον Πίνακα φαίνονται οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον 2 επίμυες.....	σ.86
Πίν.5.13: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα παρεγκεφαλίδας. Στον Πίνακα φαίνονται οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον 2 επίμυες.....	σ.87
Πίν.5.14: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού. Στον Πίνακα φαίνονται οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον 2 επίμυες.....	σ.88
Πίν.5.15: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα μεσεγκεφάλου.....	σ.88
Πίν.5.16: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού.....	σ.89

Σχ.1.1: Επισκόπηση των κύριων βιοσυνθετικών οδών του δευτερογενούς μεταβολισμού που οδηγούν στην σύνθεση φαινολικών ενώσεων	σ.21
Σχ.1.2: Γενικό διάγραμμα της μεταβολικής τύχης των πολικών φαινολικών ενώσεων στο σώμα.....	σ.27
Σχ.1.3: Οι πολικές φαινολικές ενώσεις ως προς διαιτητική και φαρμακολογική προσέγγιση για την πρόληψη ασθενειών.....	σ.35
Σχ.2.1: Τυπική διάταξη της οργανολογίας HPLC.....	σ.44
Σχ.2.2 : Διάγραμμα εξίσωσης van Deemter.....	σ.44
Σχ.2.3 : Σχηματική παρουσίαση ενός φασματομέτρου μάζας.....	σ.50

LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
A.D.M.E.	Absorption, distribution, metabolism, excretion
SPE	Solid phase extraction
GSPE	Grape seed extract
STDEV	Standard deviation
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantitation
PBS	Phosphate-buffered saline
PEP	Φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ

Οι πολικές φαινολικές ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των φυτοχημικών. Μέσα από μεγάλο αριθμό μελετών έχει αποδειχθεί πως οι πολικές φαινόλες, αν και έχουν σχετικά μικρή βιοδιαθεσιμότητα, εμφανίζουν ευεργετικά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Τα οφέλη αυτά, που εμφανίζουν ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, πιθανά οφείλονται στο γεγονός ότι μακροπρόθεσμα κατανέμονται στους διάφορους ιστούς και δρουν συνεργιστικά με άλλα βιομόρια στον οργανισμό. Συνεπώς η ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών που είναι ικανές να προσδιορίζουν ποιοτικά και ποσοτικά τις πολικές φαινολικές ενώσεις και τους μεταβολίτες τους στα βιολογικά υποστρώματα είναι μείζονος σημασίας προκειμένου να προσδιορίσουμε την δράση τους στον οργανισμό.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η συγκριτική αξιολόγηση μεθόδων προκατεργασίας δείγματος για την προσυγκέντρωση πολικών φαινολικών ενώσεων καθώς και η εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου που βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με την φασματομετρία μάζας (LC-MS) για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Ακόμα, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η παρουσία πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα ζωικών προτύπων μετά από κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας.

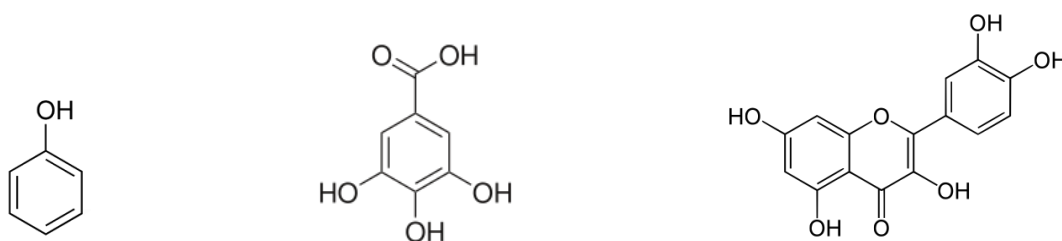
Α' ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

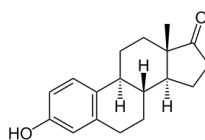
1.1 Ορισμός πολικών φαινολικών ενώσεων.

Ως φαινολικές χαρακτηρίζονται οι οργανικές ενώσεις με δομικό χαρακτηριστικό την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού πυρήνα (C₆), ο οποίος είναι υποκατεστημένος με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου (-OH). Η πιο απλή φαινολική ένωση είναι η φαινόλη (C₆H₅OH). Ανάλογα με το αν διαθέτουν ένα ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια στο μόριό τους, οι πολικές φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε απλές και σύνθετες (ή πολυφαινόλες) αντίστοιχα. Αν και σε αρκετές πηγές οι δύο όροι ταυτίζονται για λόγους απλούστευσης, μιλώντας αυστηρά με χημικούς όρους ο όρος «πολυφαινόλη» όπως ορίστηκε πιο πάνω, θα πρέπει να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για μόρια που φέρουν τουλάχιστον δύο φαινολικές μονάδες, ασχέτως με τον αριθμό των υδροξυλομάδων που η καθεμιά εξ' αυτών φέρει. (1)



Εικόνα 1.1 (α) Φαινόλη, η πιο απλή φαινολική ένωση. (β) Γαλλικό οξύ, μια απλή φαινολική ένωση (γ) Κερκετίνη, μια πολυφαινόλη.

Ωστόσο, σύμφωνα με τον πιο πάνω ορισμό για τις φαινολικές ενώσεις, μπορούν να συμπεριληφθούν στην ίδια κατηγορία και ενώσεις, όπως είναι για παράδειγμα η οιστρόνη, που είναι μια γυναικεία ορμόνη και η χημική της δομή φαίνεται στην εικόνα 1.2. Για το λόγο αυτό, σύμφωνα με τον Harborne (1), όταν θέλουμε να αναφερθούμε συγκεκριμένα στις πολικές φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης, είναι πιο δόκιμο στον ορισμό τους να συμπεριλαμβάνουμε εκτός από τα δομικά τους χαρακτηριστικά και την βιοσυνθετική τους οδό.



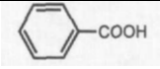
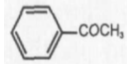
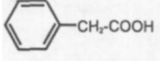
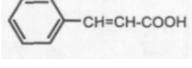
Εικόνα 1.2 Οιστρόνη, γυναικεία ορμόνη.

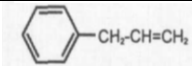
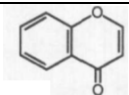
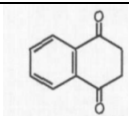
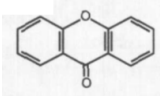
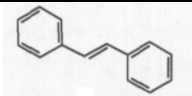
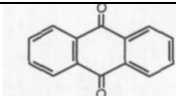
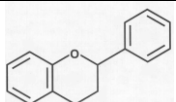
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι Quideau et al.,(2) προτείνουν τον εξής ορισμό για τις πολικές φαινολικές ενώσεις: «Ο όρος πολικές φαινολικές ενώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για να ορίσουμε τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών που προέρχονται αποκλειστικά από την βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος όπου βιοσυντίθενται τα φαινυλοπροπανοειδή ή/και από την βιοσυνθετική οδό του μηλονικού οξέος (ή οδός του πολυκετιδίου), διαθέτουν έναν ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους και δεν διαθέτουν καμία λειτουργική ομάδα που να φέρει άτομο αζώτου στη βασική της δομή».

1.2 Κατάταξη και χημικές δομές των πολικών φαινολικών ενώσεων.

Οι πολικές φαινολικές ενώσεις αποτελούν τη μεγαλύτερη, πιο διαδεδομένη και πιο ποικιλόμορφη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών στο φυτικό βασίλειο. Λόγω της αφθονίας τους στη φύση καθώς και της ποικιλομορφίας τους, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους, βάσει της πηγής προέλευσης, της κατανομής τους στη φύση, της βιολογικής τους δράσης και της χημικής τους δομής.(3) Εξ' αυτών, ο πιο συχνός τρόπος κατανομής των φαινολικών ενώσεων είναι κατά τον Harborne (1, 4) βάσει της χημικής τους δομής και συγκεκριμένα σύμφωνα με τον ανθρακικό τους σκελετό στις εξής 18 κατηγορίες: απλές φαινολικές ενώσεις (π.χ. τυροσόλη, υδροxyτυροσόλη), βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόνες, φαινυλοξικά οξέα, υδροxyκινναμωμικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ), φαινυλοπροπενοειδή, κουμαρίνες και ισοκουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή, λιγνάνες, νεολιγνάνες και λιγνίνες (Πίνακας 1.1).

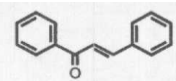
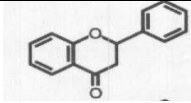
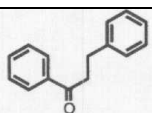
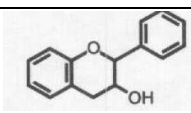
Πίνακας 1.1: Κύριες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων.(4)

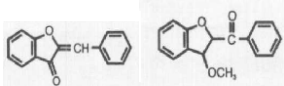
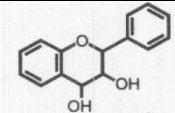
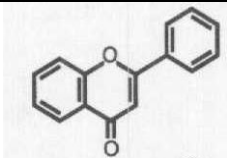
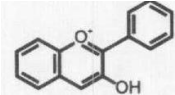
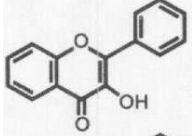
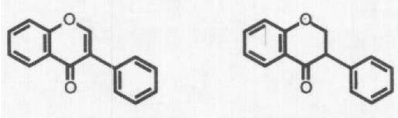
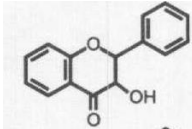
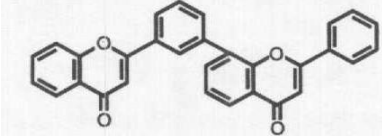
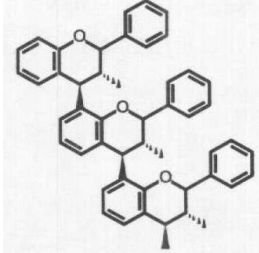
Ονομασία Κατηγορίας	Ανθρακικός σκελετός	Βασική χημική δομή	Παραδείγματα φαινολικών ενώσεων.
Απλές φαινολικές ενώσεις, Βενζοκινόνες	C6		Catechol, hydroquinone
Φαινολικά οξέα	C6-C1		p-hydroxybenzoic acid, gallic acid
Ακετοφαινόνες	C6-C2		3-acetyl-6-methoxybenzaldehyde
Φαινυλοξικά οξέα	C6-C2		p-hydroxyphenylacetic acid
Υδροxyκινναμωμικά οξέα	C6-C3		Caffeic acid, ferulic acid

Φαινυλοπροπενοειδή	C6-C3		eugenol
Κουμαρίνες Ισοκουμαρίνες	C6-C3		Umbeliferone, bergenin
Χρωμόνες	C6-C3		eugenin
Ναφθοκινόνες	C6-C4		plumbagin
Ξανθόνες	C6-C1-C6		mangiferin
Στιλβένια	C6-C2-C6		Lunularic acid
Ανθρακινόνες	C6-C2-C6		emodin
Φλαβονοειδή	C6-C3-C6		Quercetin, cyaniding, genistein
Λιγνάνες Νεολιγνάνες	(C6-C3) ₂		Pinoresinol, eusiderin
Λιγνίνες	(C6-C3) _n		

Τα φλαβονοειδή είναι η μεγαλύτερη κατηγορία πολικών φαινολικών ενώσεων και για τον λόγο αυτό διακρίνονται περαιτέρω σε 13 υποκατηγορίες: χαλκόνες, διϋδροχαλκόνες, χρυσόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες, διϋδροφλαβονόλες, φλαβονόνες, φλαβανόλες, φλαβονοδιόλες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβονοειδή, διφλαβονοειδή και προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2: Κατηγορίες των φλαβονοειδών.(4)

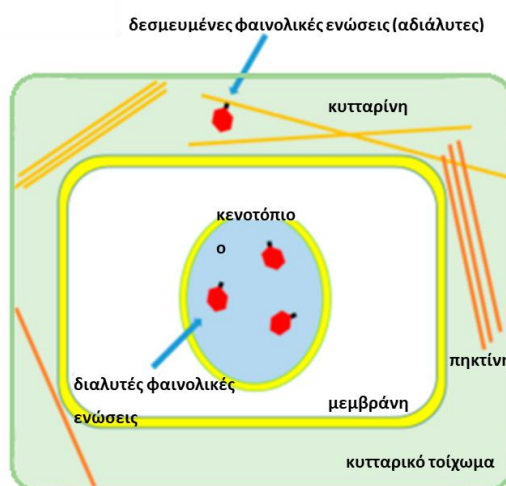
Ονομασία Κατηγορίας	Βασική χημική δομή	Ονομασία Κατηγορίας	Βασική χημική δομή
Χαλκόνες		Φλαβονόνες	
Διϋδροχαλκόνες		Φλαβανόλες	

Χρυσόνες		Φλαβονοδιόλες	
Φλαβόνες		Ανθοκυανιδίνες	
Φλαβονόλες		Ισοφλαβονοειδή	
Διϋδροφλαβονόλες		Διφλαβονοειδή	
Προανθοκυανιδίνες ή Συμπυκνωμένες τανίνες			

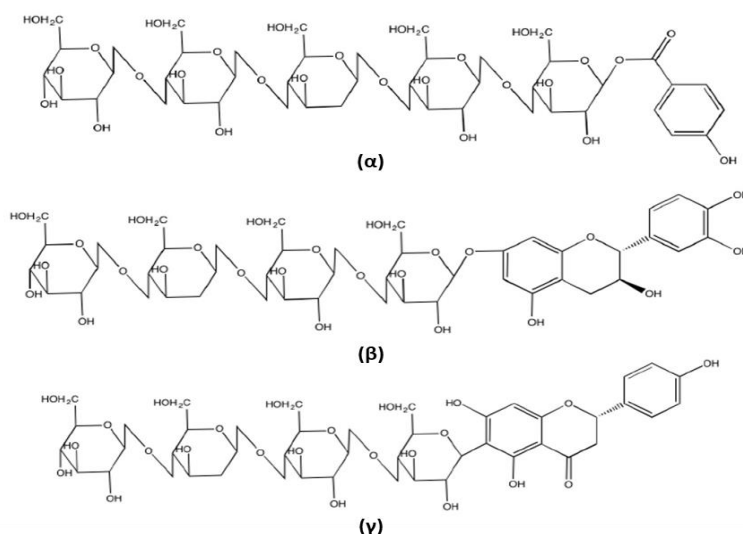
Επειδή η κατανομή των πολικών φαινολικών ενώσεων στα φυτά δεν είναι ομοιόμορφη σε ιστικό και κυτταρικό επίπεδο, πολύ χρήσιμη από διατροφικής σκοπιάς είναι η διάκριση τους με βάση τις δύο μορφές που απαντώνται στα φυτικά κύτταρα: i) διαλυτή μορφή (ελεύθερες και εστεροποιημένες φαινολικές ενώσεις) και ii) αδιάλυτη μορφή (δεσμευμένες φαινολικές ενώσεις με συστατικά του κυττάρου) (Εικόνα 1.3).(3, 5, 6) Οι περισσότερες ελεύθερες διαλυτές φαινολικές ενώσεις εντοπίζονται στα κενοτόπια (χυμοτόπια) των φυτικών κυττάρων όπου υπάρχει χαμηλό pH λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης οργανικών οξέων. Αντιθέτως, οι φαινολικές ενώσεις αδιάλυτης μορφής απαντώνται δεσμευμένες με ομοιοπολικούς δεσμούς, με πρωτεΐνες, κυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη κ.α., που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων (Εικόνα 1.4). Η κατάταξη αυτή είναι πολύ χρήσιμη από διατροφικής σκοπιάς καθώς η μεταβολική τύχη των φαινολικών ενώσεων στο γαστρεντερικό σύστημα αλλά και οι φυσιολογικές τους επιδράσεις, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό, εκτός από τη χημική τους δομή, και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους όπως η διαλυτότητά τους.(5)

Η χημεία των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι αρκετά περίπλοκη καθώς οι περισσότερες από αυτές απαντώνται στα φυτά σε συζευγμένη μορφή, συνήθως με μία ή και

περισσότερες μονάδες σακχάρου που είναι συνδεδεμένες μέσω μίας ή περισσότερων φαινολικών ομάδων ή ακόμα και απευθείας με ένα άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου, δηλαδή ως O- ή C- γλυκοζίτες. Τα σάκχαρα που συνδέονται με τις φαινολικές ενώσεις είναι κυρίως μονοσακχαρίτες όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, μαννόζη, απιόζη, αλλόζη, γλυκουρονικό και γαλακτουρονικό οξύ. Ωστόσο, τα σάκχαρα αυτά μπορεί να υπάρχουν σε μορφή δι-, τρι- ή τετρασακχαριτών, προσδίδοντας επιπλέον πολυπλοκότητα στο έργο του χημικού χαρακτηρισμού των πολικών φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, άλλες συζευγμένες μορφές φαινολικών ενώσεων που απαντώνται στα φυτά είναι με καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια, αλλά και με άλλες φαινολικές ενώσεις. (1, 4)



Εικόνα 1.3 Τα σημεία στο φυτικό κύτταρο όπου εντοπίζονται οι φαινολικές ενώσεις (τα υπόλοιπα οργανίδια του κυττάρου δεν εμφανίζονται στην εικόνα). (5)



Εικόνα 1.4 Παραδείγματα ομοιοπολικών δεσμών που απαντώνται στις μη-διαλυτές φαινολικές ενώσεις: (α) εστερικός δεσμός του 4-υδροξυ βενζοϊκού οξέος, (β) αιθερικός δεσμός κατεχίνης και (γ) δεσμός C-C της ναρινγενίνης με ένα μόριο κυτταρίνης. (5)

1.3 Βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων στα φυτά.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και ειδικότερα, συντίθενται από δύο κύριες βιοσυνθετικές οδούς: (1) του σικιμικού οξέος, όπου παράγονται οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις και (2) του μηλονικού οξέος (Σχήμα 1.1). (1) Πιο συγκεκριμένα οι υδατάνθρακες, που προκύπτουν από το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας διαμέσω της φωτοσύνθεσης (κύκλος του Calvin), αποτελούν τα δομικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται από το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών για να παραχθούν οι φαινολικές ενώσεις. Τα πρόδρομα μόρια των φυτικών φαινολικών ενώσεων, προκύπτουν από δύο καταβολικές πορείες του πρωτογενούς μεταβολισμού των φυτικών κυττάρων: την γλυκόλυση και την οδό των φωσφορικών πεντοζών. Με την καταβολική πορεία της γλυκόλυσης, οι υδατάνθρακες που παράγονται κατά τη φωτοσύνθεση, διασπώνται σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP) το οποίο μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ (pyruvate) με τη βοήθεια του ενζύμου πυροσταφυλική κινάση (pyruvate kinase). Το PEP εισέρχεται στην πορεία του σικιμικού οξέος, ενώ το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA και από εκεί εισέρχεται στη μεταβολική πορεία του μηλονικού οξέος. Αν και ο κύριος σκοπός της μεταβολικής οδού των φωσφορικών πεντοζών είναι η παραγωγή αναγωγικής ισχύος με τη μορφή του NADPH, μέσω αυτής της οδού τα φυτά διασπούν την γλυκόζη παρέχοντας την 4-φωσφοερυθρόζη η οποία εισέρχεται ομοίως στην πορεία του σικιμικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται στα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη που αποτελούν πρόδρομα μόρια ορισμένων τάξεων των φαινολικών ενώσεων (φαινυλοπροπανοειδών) όπως είναι το *p*-κουμαρικό οξύ, το *trans*-κινναμμωμικό οξύ και τα παράγωγά τους, τα παράγωγα των βενζοϊκών οξέων, οι κουμαρίνες, το καφεϊκό οξύ, κ.α. (7, 8) Με το συνδυασμό των μεταβολικών οδών του σικιμικού και του μηλονικού οξέος, συντίθενται τα φλαβονοειδή. Διαμέσω της βιοσυνθετικής οδού των φλαβονοειδών και διαφόρων σταδίων που περιλαμβάνουν αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού, σχηματίζονται οι συμπυκνωμένες (ή μη υδατοδιαλυτές) τανίνες. (3) Οι υδατοδιαλυτές τανίνες είναι παράγωγα του γαλλικού οξέος και προκύπτουν από την βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος. (9)

παρέχοντας προστασία ενάντια των φυτοφάγων ζώων και των διάφορων παθογόνων.(6) Επιπλέον, ορισμένες φαινολικές ενώσεις, όπως είναι συγκεκριμένα οι ανθοκυανίνες, καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (άρωμα, χρώμα, γεύση) των φυτών, άλλες έλκουν τους επικονιαστές και τους διασκορπιστές σπόρων, ενώ άλλες φαινολικές ενώσεις μπορεί να αποτρέπουν την ανάπτυξη κοντινών ανταγωνιστικών φυτών.(4, 7)

Η κατανομή των φαινολικών ενώσεων στους ιστούς, στα κύτταρα αλλά και σε υποκυτταρικό επίπεδο των φυτών, δεν είναι ομοιόμορφη. Μη-διαλυτές φαινολικές ενώσεις βρίσκονται προσκολλημένες στα κυτταρικά τοιχώματα, ενώ οι διαλυτές φαινολικές ενώσεις απαντώνται στα κενοτόπια των φυτικών κυττάρων. Δεν είναι ίδιο το φαινολικό περιεχόμενο όλων των τροφίμων. Συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις όπως είναι η κερκετίνη, βρίσκονται σε όλα τα φυτικά προϊόντα: φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, χυμοί φρούτων, τσάι, κρασί, κ.α., ενώ οι φλαβόνες και ισοφλαβόνες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα τρόφιμα μόνο. Γενικότερα, τα τρόφιμα περιέχουν σύνθετα μίγματα φαινολικών ενώσεων. Τα εξωτερικά στρώματα των φυτών περιέχουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών σε σχέση με αυτά που βρίσκονται στο εσωτερικό τους. Αρκετοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν το περιεχόμενο των φαινολικών στα φυτά. Μεταξύ αυτών είναι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και πεδοκλιματικές συνθήκες (έκθεση στον ήλιο, βροχοπτώσεις, έδαφος), οι καλλιεργητικές τεχνικές που εφαρμόζονται (λίπασμα, βιολογική καλλιέργεια, υδροπονική καλλιέργεια, κ.α.) αλλά και το είδος της ποικιλίας (βιοποικιλότητα). Επιπλέον, ο βαθμός ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση και την αναλογία των φαινολικών ενώσεων στα φυτικά προϊόντα. Γενικώς έχει παρατηρηθεί πως κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων μειώνεται ενώ η συγκέντρωση των ανθοκυανινών αυξάνεται. (6, 11)

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα το φαινολικό περιεχόμενο των τροφίμων, είναι η αποθήκευση και η επεξεργασία των τροφίμων (π.χ. το μαγείρεμα). Κατά την αποθήκευση, λόγω των αντιδράσεων οξειδωσης που διαδραματίζονται στο τρόφιμο, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ποιότητα των τροφίμων καθώς και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Τέτοιες αντιδράσεις μπορεί να είναι ορισμένες φορές επιθυμητές (π.χ. μαύρο τσάι) ενώ άλλες φορές είναι ανεπιθύμητες (π.χ. μαύρισμα των φρούτων). Επιπροσθέτως, το μαγείρεμα έχει μεγάλη επίδραση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Για παράδειγμα, τα κρεμμύδια και οι ντομάτες χάνουν περίπου το 75%-80% του αρχικού τους περιεχομένου σε κερκετίνη ύστερα από 15

λεπτά βρασμού, το 65% ύστερα από μαγείρεμα σε φούρνο μικροκυμάτων και το 30% μετά το τηγάνισμα.(6)

1.5 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φαινολικών ενώσεων

1.5.1 Γενικά

Μπορεί οι πολικές φαινολικές ενώσεις να αποτελούν τα πιο ευρέως διαδεδομένα φυτοχημικά στο φυτικό βασίλειο και κατ' επέκταση το πιο κοινό συστατικό στη διατροφή του ανθρώπου, όμως δεν σημαίνει πως είναι και οι πιο δραστικές ενώσεις μέσα στον οργανισμό. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς να οφείλεται στην χαμηλή εγγενή δραστηριότητά τους, στην μειωμένη απορρόφησή τους από το έντερο, στον αυξημένο μεταβολισμό τους ή στην ταχεία απέκκρισή τους από τον οργανισμό.(12) Επιπροσθέτως, οι μεταβολίτες που προέρχονται από την ηπατική ή πεπτική δραστηριότητα και εντοπίζονται στο αίμα καθώς και στα όργανα-στόχους (π.χ. ήπαρ, νεφρά, καρδιά, εγκέφαλος, κλπ.), μπορεί να έχουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα από τις αρχικές προσληφθείσες φαινολικές ενώσεις.(11) Επομένως, η γνώση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των πολικών φαινολικών ενώσεων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να αξιολογηθούν οι βιολογικές επιδράσεις που μπορεί να εκδηλώνουν *in vivo*. Η βιοδιαθεσιμότητα και η βιοπροσβασιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων, σε συνδυασμό με την ποσότητα της ημερήσιας διαιτητικής πρόσληψης, τη μορφή με την οποία βρίσκονται στη χημική διάταξη του τροφίμου, καθώς και με τον τρόπο που μεταβολίζονται και απορροφώνται από τον οργανισμό καθορίζουν την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης στον οργανισμό.(13)

Με τον όρο *βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability)* εκφράζουμε το ποσοστό του καταναλισκόμενου συστατικού το οποίο, μετά την απορρόφησή του από τον οργανισμό, εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και γίνεται διαθέσιμο προς χρήση ή αποθήκευση.(13) Ως *βιοπροσβασιμότητα (bioaccessibility)* ενός θρεπτικού συστατικού, ορίζεται το ποσό αυτού που απαντάται αποδεδειγμένο από τον βλωμό της τροφής στο έντερο και είναι πιθανό να απορροφηθεί από το εντερικό βλεννογόνο ή να εκδηλώσει οποιαδήποτε ευεργετική δράση. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πολικές φαινολικές ενώσεις στα τρόφιμα, βρίσκονται συνήθως ισχυρά συνδεδεμένες με άλλα θρεπτικά συστατικά, και κυρίως με συστατικά που αποτελούν δομικά συστατικά των κυττάρων. Επομένως, μόνο η ποσότητα των φαινολικών που θα αποσπαστούν κατά την πέψη του τροφίμου από τον βλωμό της τροφής, με τη δράση των πεπτικών ενζύμων (κυρίως στο λεπτό έντερο) και του εντερικού

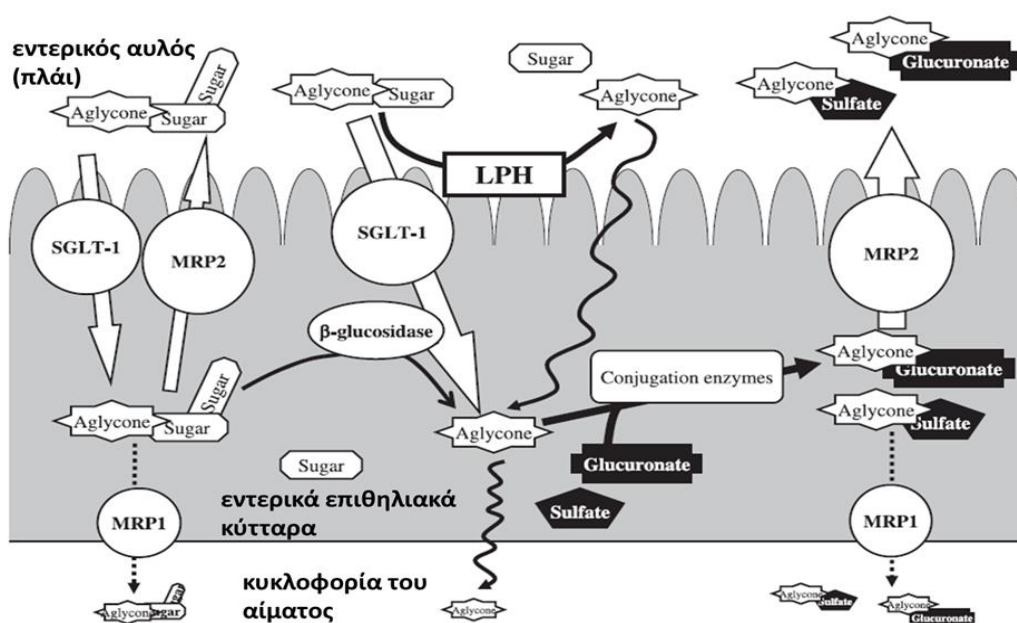
μικροβιόκοσμου (κυρίως στο παχύ έντερο) καθίσταται πιθανώς βιοδιαθέσιμη. Αποτελέσματα ερευνών, δείχνουν πως η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων που προσλαμβάνονται με τη διατροφή, καταλήγει να είναι πολύ χαμηλή στο σώμα, ενώ η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα σπάνια ξεπερνά τα επίπεδα nM.(11, 13)

1.5.2 Μεταβολισμός των φαινολικών ενώσεων

Η διαδικασία της μάσησης που λαμβάνει χώρα στην στοματική κοιλότητα, αποτελεί το πρώτο στάδιο αφομοίωσης των φαινολικών ενώσεων στον οργανισμό. Κατά τη μάσηση επιτυγχάνεται ο τεμαχισμός του τροφίμου, το οποίο αναμειγνύεται με τη βοήθεια της σιέλου. Έτσι ευνοείται η μερική απελευθέρωση των συστατικών του τροφίμου, ενώ αυξάνεται και η επιφάνεια του τροφίμου ευνοώντας έτσι την αποτελεσματικότερη λειτουργία των πεπτικών ενζύμων (α-αμυλάση) που περιέχονται στη σιέλο. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως στην στοματική κοιλότητα ξεκινάει και η διάσπαση των γλυκοζιτών των φαινολικών ενώσεων με τη δράση του βακτηριακού ενζύμου, β-γλυκοσιδάση.(13) Έπειτα, η πολτοποιημένη τροφή που προκύπτει από την ολοκλήρωση της μάσησης στην στοματική κοιλότητα, διέρχεται μέσω του οισοφάγου στο στομάχι. Η αναδευτική δράση και το όξινο περιβάλλον του στομάχου ευνοούν την φυσική και χημική διάσπαση του πολτοποιημένου τροφίμου, καθώς και την απελευθέρωση των φαινολικών ενώσεων από τη διάταξη του τροφίμου. Το όξινο περιβάλλον του στομάχου από την έκκριση του γαστρικού υγρού ευνοεί την όξινη υδρόλυση ορισμένων φαινολικών ενώσεων (π.χ. υδρόλυση των ολιγομερών προανθοκυανιδινών) ή τη διάσπαση της μονάδας σακχάρου σε ορισμένους γλυκοζίτες φαινολικών ενώσεων. Αν και το στομάχι δεν αποτελεί το κυριότερο σημείο απορρόφησης των φαινολικών ενώσεων, τα μικρότερου μεγέθους φαινολικά οξέα που δεν είναι ισχυρά δεσμευμένα με συστατικά του τροφίμου, απελευθερώνονται λόγω του όξινου pH του στομάχου και απορροφώνται σχετικά αμέσως από τα γαστρικά κύτταρα.(12, 13)

Στην συνέχεια, το υδρολυμένο μίγμα της τροφής διέρχεται από το όξινο περιβάλλον του στομάχου στο αλκαλικό περιβάλλον του δωδεκαδάκτυλου. Οι κύριες θέσεις βιομετατροπής και απορρόφησης των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι το τμήμα του δωδεκαδάκτυλου που βρίσκεται στην αρχή, καθώς και η νηστίδα που βρίσκεται στη μέση του λεπτού εντέρου. Αν και οι πολικές φαινολικές ενώσεις δεν υφίστανται εκτενή τροποποίηση, ούτε έχουν σημαντικές απώλειες κατά τη διέλευσή τους από το όξινο περιβάλλον του στομάχου, ανάλογα με τη χημική τους δομή (π.χ. ανθοκυανίνες, φλαβονόλες και φλαβαν-3-όλες), είναι ασταθείς στο αλκαλικό περιβάλλον του λεπτού εντέρου. Αυτή η πιθανή απώλεια

Έπειτα, οι πολικές φαινολικές ενώσεις μετακινούνται από τον εντερικό αυλό στο κυτοσόλιο των εντεροκυττάρων μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Η απορρόφηση των πολικών φαινολικών ενώσεων στο λεπτό έντερο, εξαρτάται σημαντικά από τα χημικά χαρακτηριστικά των μορίων (μέγεθος, βαθμός πολυμερισμού, υδροφοβικότητα), από τη στερεοχημεία της γλυκοζιτικής ομάδας, αλλά και τη φυσιολογία και την ανατομία του καταναλωτή, καθώς και από τη σύσταση του τροφίμου στο οποίο εμπεριέχονται.(13) Οι γλυκοζίτες των φαινολικών ενώσεων είναι πολύ πιο υδρόφιλες σε σχέση με τις αντίστοιχες αγλυκόνες τους, και για το λόγο αυτό, δεν μπορούν να διαπεράσουν την μεμβράνη των εντεροκυττάρων με παθητική διάχυση όπως έχουν τη δυνατότητα να κάνουν οι αντίστοιχες αγλυκόνες τους. Ωστόσο, έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους πραγματοποιείται η απορρόφηση των γλυκοζιτών των φαινολικών ενώσεων και φαίνονται στην εικόνα 1.5. (13-15)



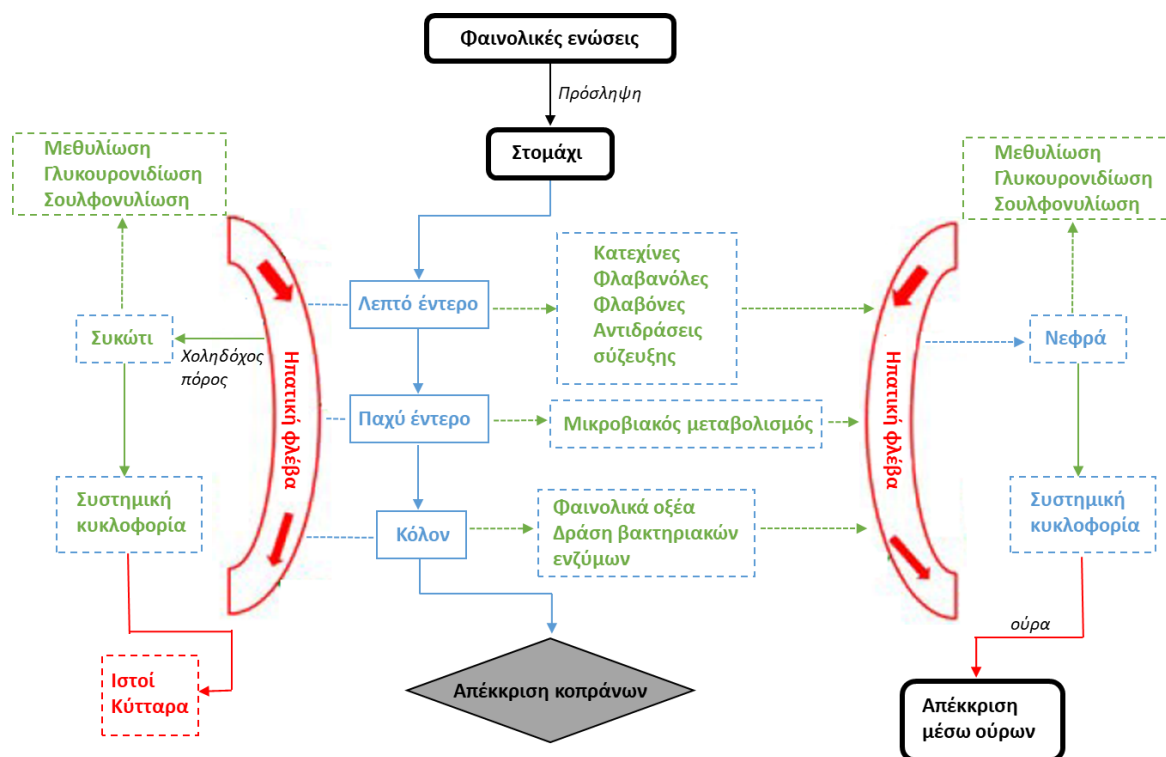
Σύμφωνα με τον πρώτο, οι γλυκοζίτες των φαινολικών ενώσεων υφίστανται β-υδρόλυση εντός του εντερικού αυλού, από την υδρολάση λακτάσης-φλοριζίνης LPH (μια β-ενδογλυκοσιδάση) που βρίσκεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών εντεροκυττάρων. Η LPH

είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος για μια σειρά φλαβονοειδών-Ο-β-D-γλυκοζιτών.(14, 15) Οι αγλυκόνες που προκύπτουν, λόγω της αυξημένης λιποφιλικότητάς τους, διοχετεύεται μέσω παθητικής διάχυσης στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων και περνά έπειτα στην κυκλοφορία του αίματος.(13, 14) Εναλλακτικά, οι γλυκοζίτες των φαινολικών ενώσεων μπορούν να μεταφερθούν απευθείας στο επιθήλιο μέσω επιθηλιακών φορέων όπως είναι ο εξαρτώμενος από το νάτριο μεταφορέας γλυκόζης, SGLT1. Μόλις βρεθούν στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων, οι γλυκοζίτες υδρολύονται από την ενδοκυτταρική β-γλυκοσιδάση (CBG).(14, 15)

Οι αγλυκόνες των φαινολικών ενώσεων που προκύπτουν από τους πιο πάνω μηχανισμούς υδρόλυσης, είτε μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος με παθητική διάχυση είτε υφίστανται μεταβολισμό φάσης II και μετατρέπονται σε αντίστοιχους μεταβολίτες φάσης II από κατάλληλα ένζυμα του κυτοσολίου. Τα ένζυμα που αναλαμβάνουν αυτή τη δράση είναι η UDP-γλυκουρονοτρανσφεράση (UGT), η σουλφοτρανσφεράση (SULT) και η μεθυλοτρανσφεράση των ο-κατεχολών (COMT) που καταλύουν αντίστοιχα αντιδράσεις της υδροξυλομάδας του φαινολικού δακτυλίου της αγλυκόνης με γλυκουρονικό οξύ (γλυκουρονιδίωση), σουλφονική ομάδα (σουλφονυλίωση) ή με μια μεθυλομάδα (μεθυλίωση) αντίστοιχα.(15) Οι μεταβολίτες της φάσης II είτε εκρέονται πίσω στον εντερικό αυλό μέσω των μεταφορέων ABC, MRP και p-γλυκοπρωτεϊνών, είτε μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω αντίστοιχων μεταφορέων φάσης III (MRP, p-γλυκοπρωτεΐνες ή μεταφορείς φαρμάκων/λιπιδίων).(14, 15) Ένα πολύ μικρό ποσοστό των συζευγμένων μεταβολιτών εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, που αντιστοιχεί συνήθως σε επίπεδα κάτω του 1μΜ.(16) Αφού οι αγλυκόνες περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος, μερικές από αυτές φτάνουν στο συκώτι όπου υποβάλλονται σε εκτενέστερο μεταβολισμό φάσης II και λόγω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, μπορεί να επιστρέψουν πίσω στο λεπτό έντερο διαμέσω της έκκρισης της χολής.(13)

Αν και το συκώτι αποτελεί το κύριο ανθρώπινο όργανο υπεύθυνο για την αποτοξίνωση στον οργανισμό, το λεπτό έντερο φαίνεται πως συμβάλλει, μετατρέποντας τα ξενοβιοτικά (στη συγκεκριμένη περίπτωση τις φαινολικές ενώσεις) σε μορφή που αποβάλλεται εύκολα.(13) Το λεπτό έντερο, το συκώτι και η χολή, μεσολαβούν στα πρώτα στάδια του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από δυνητικούς κινδύνους. Παρ' όλο που έχουν αποδειχθεί οι ευεργετικές επιδράσεις των φαινολικών ενώσεων στην υγεία, ο ανθρώπινος οργανισμός τις αναγνωρίζει ως μη-θρεπτικά συστατικά ή ως ξενοβιοτικά, και κατ'

επέκταση επιβάλλει εκτενή μεταβολισμό φάσης II και ποβολή με τα ούρα και τα κόπρανα. Παρ' όλο που οι μεταβολίτες φάσης II που εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία είναι πιο υδρόφιλοι από τις αντίστοιχες αγλυκόνες τους, ο τρόπος με τον οποίο μεταφέρονται στους περιφερειακούς ιστούς (εγκέφαλο, καρδιά, νεφρά, ήπαρ, προστάτης, μήτρα, κλπ.) και εκδηλώνουν βιοδραστικότητα, δεν είναι ξεκάθαρος. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως στους διάφορους ιστούς, οι μεταβολίτες της φάσης II μπορεί να μετατραπούν στις αντίστοιχες αγλυκόνες τους με τη δράση της β-γλυκουρονιδάσης.(13)



Σχήμα 1.2 Γενικό διάγραμμα της μεταβολικής τύχης των πολικών φαινολικών ενώσεων στο σώμα. (12, 17)

Οι γλυκοζίτες των φαινολικών ενώσεων που αντιστέκονται στη δράση των LPH/CBG, δεν απορροφώνται από το λεπτό έντερο και περνούν με τη μορφή που έχουν στο παχύ έντερο. Γενικώς, μόνο το 5 – 10 % των καταναλωθεισών πολικών φαινολικών ενώσεων καταφέρνουν να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο μετά από τη διαδικασία της απογλυκοζυλίωσης ενώ το υπόλοιπο 90 – 95 % καθώς και όσες παραμείνουν στις συζευγμένες τους μορφές, περνούν στο παχύ έντερο όπου μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα προς διάφορους μεταβολίτες οι οποίοι εκδηλώνουν διάφορες φυσιολογικές ιδιότητες.(14, 15) Τα βακτηριακά ένζυμα του παχέος εντέρου καταλύουν την αποσύζευξη, την αποϋδροξυλίωση και τις

αντιδράσεις σχάσης του δακτυλίου, μετατρέποντας τις φαινολικές ενώσεις σε ένα περίπλοκο μίγμα απλών φαινολικών οξέων και αρωματικών μεταβολιτών.(14) Οι φαινολικές ενώσεις που περνούν στο παχύ έντερο, δρουν και ως πρεβιοτικά ρυθμίζοντας την ποικιλότητα της μικροχλωρίδας λόγω της αντιμικροβιακής δράσης που ακούν. Επιπλέον, να επισημανθεί πως αν και η βιομετατροπή των πολικών φαινολικών ενώσεων στο παχύ έντερο είναι δεδομένη, εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια λόγω του διαφορετικού μικροβιακού εντερόκοσμου που διαθέτει ο κάθε οργανισμός, της δομής των πολικών φαινολικών ενώσεων καθώς και της επίδρασης των συνκαταναλισκόμενων τροφίμων, παράγοντες που όπως θα δούμε και στη συνέχεια επιδρούν στη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων.(13)

Οι πολικές φαινολικές ενώσεις καθώς και οι μεταβολίτες τους που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την απορρόφησή τους στο λεπτό ή στο παχύ έντερο, θεωρούνται ως ξενοβιοτικά από τον οργανισμό. Έτσι, μεταφέρονται ταχέως στο ήπαρ όπου υπόκεινται σε περεταίρω μεταβολισμό φάσης II με τη βοήθεια των ενζύμων σύζευξης UGTa, SULT και COMT, που καταλύουν τις αντιδράσεις σύζευξης φάσης II γλυκουρονιδίωση, σουλφονυλίωση και μεθυλίωση αντίστοιχα. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων σε σχέση με τα αρχικά άγλυκα συστατικά από τα οποία προήλθαν, αποδίδεται εν μέρει σε αυτές τις αντιδράσεις σύζευξης φάσης II. Οι μεταβολίτες φάσης II των φαινολικών ενώσεων κυκλοφορούν στο αίμα κυρίως ως συζευγμένα παράγωγα, κυρίως με πρωτεΐνες του αίματος (αλβουμίνη). Με τη μορφή αυτή, είτε εισέρχονται στην εντεροηπατική κυκλοφορία καταλήγοντας πίσω στο λεπτό έντερο μέσω των χοληφόρων οδών, είτε κατανέμονται και διεισδύουν στους ιστούς. Η εντεροηπατική κυκλοφορία δίνει τη δυνατότητα στις πολικές φαινολικές ενώσεις να παραμείνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέσα στο σώμα.(13-15) Οι φαινολικές ενώσεις καθώς και οι μεταβολίτες τους, έχουν ανιχνευθεί σε αρκετούς τύπους ιστών όπως η καρδιά, οι νεφροί, ο εγκέφαλος, το ήπαρ, ο προστάτης, η μήτρα, οι μαστοί, οι ωοθήκες, η ουροδόχος κύστη, τα οστά και το δέρμα τόσο σε ζωικά μοντέλα (τρωκτικά, χοίροι), όσο και σε ανθρώπους.(15) Οι πολικές φαινολικές ενώσεις, οι μεταβολίτες τους, καθώς και τα βακτηριακά παράγωγα του παχέος εντέρου, μπορεί να παραμείνουν στον οργανισμό από λίγα λεπτά μέχρι και μερικές ώρες και στη συνέχεια μεταφέρονται στους νεφρούς για να απεκκριθούν ταχέως με τα ούρα και τα κόπρανα.(13)

1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων.

Η βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών διαφέρει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των πολλών και διαφορετικών κατηγοριών τους, ενώ αυτές που απαντώνται σε μεγαλύτερες

ποσότητες στη διατροφή μας δεν έχουν απαραίτητα και το καλύτερο προφίλ βιοδιαθεσιμότητας.(18) Επομένως, δεν είναι μόνο σημαντικό το να γνωρίζουμε την ποσότητα ενός συστατικού που υπάρχει σε ένα τρόφιμο ή και διατροφικό συμπλήρωμα, αλλά και πόσο από αυτό το συστατικό είναι βιοδιαθέσιμο ώστε να εκδηλώσει βιολογική δράση στον οργανισμό.

Η μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας δεν είναι εύκολη καθώς επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Συγκεκριμένα, η φυσικοχημεία του τροφίμου στο οποίο περιέχονται οι πολικές φαινολικές ενώσεις καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους με τα υπόλοιπα συστατικά του (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, φυτικές ίνες, λιπίδια) επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Σημαντικές είναι και οι αλληλεπιδράσεις με άλλα συγκαταναλωθέντα τρόφιμα, που μπορεί να επηρεάζουν την απορρόφηση των πολικών φαινολικών ενώσεων από τον οργανισμό. Επιπλέον, η επεξεργασία των τροφίμων και συγκεκριμένα κάτω από δραστικές συνθήκες μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό προϊόντων οξείδωσης τα οποία με τη σειρά τους μπορεί να μειώσουν την απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων. Αντίθετα, είδη επεξεργασίας όπως είναι η ομογενοποίηση των λαχανικών, μπορεί να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών μεταβάλλοντας το υπόστρωμα του τροφίμου (food matrix). Αν και γενικώς υποστηρίζεται η ωμή κατανάλωση των λαχανικών, υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που δείχνουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα μερικών φαινολικών ενώσεων αυξάνεται σε μαγειρεμένα τρόφιμα σε σχέση με τα αντίστοιχα ωμά.(18)

Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών, είναι η χημική τους δομή. Στα τρόφιμα, οι περισσότερες φαινολικές απαντώνται είτε ως πολυμερή είτε ως γλυκοζίτες, μορφές που δεν είναι απορροφήσιμες από τον οργανισμό. Συνεπώς πρέπει πρώτα να διασπαστούν από τα ένζυμα του λεπτού εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα προτού απορροφηθούν από τον οργανισμό. Οι ανθοκυανίνες αποτελούν εξαίρεση καθώς οι γλυκοζίτες τους απορροφώνται ως έχουν και εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος. Ο τύπος της χημικής δομής των φαινολικών ενώσεων καθώς και η μονάδα σακχάρου του γλυκοζίτη τους, θα καθορίζει όχι μόνο το ρυθμό αλλά και το ποσοστό της απορρόφησής τους στο γαστρεντερικό σύστημα.

Σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητα έχουν και οι παράγοντες που αφορούν τον ξενιστή-καταναλωτή. Διακρίνονται σε εντερικούς και συστημικούς παράγοντες. Οι πρώτοι, ίσως να είναι και οι πιο σημαντικοί καθώς η εντερική μικροχλωρίδα εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των ατόμων και καθορίζεται τόσο από γενετικούς όσο και από

περιβαλλοντικούς παράγοντες. Όπως είδαμε και πιο πάνω, όσες φαινολικές ενώσεις δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο, περνούν στο παχύ έντερο όπου υφίστανται σημαντικές δομικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, η εντερική μικροχλωρίδα, υδρολύει τους γλυκοζίτες στις αντίστοιχες αγλυκόνες τους, τις οποίες στη συνέχεια τις διασπά σε απλά φαινολικά οξέα. Αυτή η δραστηριότητα είναι ύψιστης σημασίας για τη βιολογική δράση των φαινολικών ενώσεων καθώς με τη διαδικασία αυτή προκύπτουν συγκεκριμένοι βιολογικά ενεργοί μεταβολίτες. Μόλις οι φαινολικές ενώσεις απορροφηθούν και πριν μεταβούν στο αίμα, υφίστανται και άλλες δομικές τροποποιήσεις κυρίως μέσω διαδικασιών σύζευξης, όπως είναι η μεθυλίωση, η σουλφονυλίωση και η γλυκουρονιδίωση. Οι τροποποιήσεις αυτές δύναται να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων και κατά συνέπεια την βιολογική τους δραστηριότητα. Οι μηχανισμοί σύζευξης είναι εξαιρετικά αποτελεσματικοί και τα ελεύθερα άγλυκα συστατικά γενικώς είτε απουσιάζουν είτε είναι παρόντα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα μετά από την κατανάλωση τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά.

Επομένως, είναι σαφές ότι κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, οι πολικές φαινολικές ενώσεις τροποποιούνται εκτεταμένα. Συνεπώς, οι ενώσεις που φτάνουν στα κύτταρα και τους ιστούς συχνά διαφέρουν χημικά, βιολογικά και σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζουν διαφορετική λειτουργία από την αρχική διατροφική μορφή. (18-20)

Πίνακας 1.3: Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών πολικών φαινολικών ενώσεων. (18, 20)

Παράγοντες που αφορούν τις ίδιες τις πολικές ΦΕ	Χημική δομή, συγκέντρωση στα τρόφιμα, χορηγούμενη δόση
Παράγοντες που αφορούν το τρόφιμο	Υπόστρωμα τροφίμου (π.χ. υγρό/στερεό, ζωικής/φυτικής προέλευσης, παρουσία ή απουσία συστατικών που επηρεάζουν θετικά (π.χ. λιπαρά) ή αρνητικά (π.χ. φυτικές ίνες) την απορρόφησή τους.
Παράγοντες που αφορούν την επεξεργασία τροφίμων	Θερμική επεξεργασία, ομογενοποίηση, λυοφιλίωση, αποθήκευση, τεχνικές μαγειρικής
Αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά	Δέσμευση με πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη) ή αλληλεπιδράσεις με άλλες ΦΕ με παρόμοιο μηχανισμό απορρόφησης

Παράγοντες που αφορούν τον ξενιστή	Εντερικοί παράγοντες (ενζυμική δραστηριότητα, χρόνος παρέλευσης στο έντερο, εντερικός μικροβιόκοσμος) Συστημικοί παράγοντες (φύλο, ηλικία, διαταραχές/παθολογικές καταστάσεις, γενετική)
Εξωτερικοί παράγοντες	Έκθεση σε διαφορετικό περιβάλλον, διαθεσιμότητα τροφίμων.

1.5.4 Ανασκόπηση μελετών βιοδιαθεσιμότητας των πολικών φαινολικών ενώσεων.

Τα τελευταία χρόνια, το μεγάλο ενδιαφέρον για τις πολικές φαινολικές ενώσεις έχει προέλθει κυρίως από πολλές επιδημιολογικές μελέτες. Η επιδημιολογία αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο και πολύτιμο εργαλείο, καθώς στόχος της είναι η καθιέρωση στατιστικά έγκυρης συσχέτισης μεταξύ της υγείας ενός πληθυσμού και ενός ή περισσότερων παραγόντων που την επηρεάζουν. Βέβαια, η απόδειξη μιας ισχυρής στατιστικής σχέσης δεν καταδεικνύει την αιτία και το αποτέλεσμα, αλλά μπορεί να υποδηλώνει μόνο αιτιότητα. Έτσι, για να αποδειχθεί η αιτιότητα, είναι σημαντικό να οριστεί μια λογική αλυσίδα γεγονότων βασισμένη στη βιοχημεία, τη χημεία και τη φυσιολογία και να υποστηριχθεί αυτό με μελέτες παρέμβασης. Τέτοιου είδους μελέτες είναι αρκετά δύσκολο να πραγματοποιηθούν και για τον λόγο αυτό, αναπόφευκτα παρέχεται πρόσθετη υποστήριξη από *in vitro* μελέτες και *in vivo* μελέτες χρησιμοποιώντας ζωικά μοντέλα. (20)

Αν και μεγάλος αριθμός *in vitro* μελετών που αξιοποιούν κομμάτια ιστού ή κυτταροκαλλιέργειες παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τις ευεργετικές επιδράσεις των πολικών φαινολικών ενώσεων, απαιτείται μεγάλη προσοχή κατά την ερμηνεία και των δεδομένων που λαμβάνονται. Συγκεκριμένα, στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες, εξετάζονται κυρίως οι αγλυκόνες ή οι γλυκοζίτες των πολικών φαινολικών ενώσεων αντί για τους ενεργούς μεταβολίτες τους, με αποτέλεσμα να εξετάζουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς που εκδηλώνει λάθος ένωση. Ακόμα, σε μελέτες *in vitro*, η χορηγούμενη δόση των υπό εξέταση ενώσεων η οποία κυμαίνεται από μερικά $\mu\text{mol/L}$ έως mmol/L , είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτή που απαντάται στο ανθρώπινο σώμα στην πραγματικότητα η οποία μάλιστα σπάνια ξεπερνά τα nmol/L .

Λόγω της έλλειψης συμφωνίας μεταξύ των εξαιρετικά αποτελεσματικών συγκεντρώσεων *in vitro* και εκείνων *in vivo*, τίθεται το ερώτημα αν η χρήση αυτών των

υψηλών συγκεντρώσεων στις *in vitro* μελέτες καθιστά εν τέλει τα αποτελέσματα άσχετα με την κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών. Αν και επί του παρόντος δεν υπάρχει σαφής απάντηση, μπορεί να υποστηριχθεί πως σε ζώα και ανθρώπους που καταναλώνουν μια συγκεκριμένη πολική φαινολική ένωση συστηματικά, τα κύτταρά τους εκτίθενται σε αυτή σταθερά. Έτσι, η παρατεταμένη έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές επιδράσεις στην υγεία, παρόλο που οι συγκεντρώσεις είναι χαμηλότερες.

Οι μελέτες που χρησιμοποιούν ζωικά μοντέλα, παρέχουν εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες και υπερνικούν και ορισμένες από τις δυσκολίες που απαντώνται στις κλινικές δοκιμές ανθρώπινης παρέμβασης. Για τον λόγο αυτό, δεδομένα που αφορούν την κατανομή των πολικών φαινολικών ενώσεων σε ιστούς όπως το ήπαρ, ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι πνεύμονες, κ.α., προέρχονται κυρίως από *in vivo* μελέτες σε ζωικά μοντέλα. (20)

Στη μελέτη των Margalef et al,(21) χορηγήθηκαν δια του στόματος δόσεις των 125, 250, 375 και 1000 mg/kg, εκχυλίσματος προανθοκυανιδινών από κουκούτσι σταφυλιού (grape seed extract, GSPE) σε αρσενικούς επίμυες Wistar. Οι ιστοί συλλέχθηκαν 2 ώρες μετά τη χορήγηση του GSPE και ύστερα από ανάλυση με HPLC-MS/MS, ποσοτικοποιήθηκαν οι φλαβανόλες και οι μεταβολίτες τους σε διάφορους ιστούς. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειοψηφία των μεταβολιτών GSPE βρίσκεται στο νεφρό (1.17 - 1241 nmol/g), ακολουθούμενη από το ήπαρ (1.38 - 24.2 nmol/g). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις ωστόσο βρέθηκαν στον μεσεντερικό λευκό λιπώδη ιστό (0.08 - 1.02 nmol/g) και στον εγκέφαλο (0.01 - 11 nmol/g). Ακόμα, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι μεταβολίτες της φλαβανόλης ακολουθούν ένα μοτίβο κατανομής ιστοειδικά και επιπλέον, η συγκέντρωσή τους στους ιστούς φαίνεται να εξαρτάται από τη χορηγούμενη δόση.

Στην *in vivo* μελέτη των D'Angelo et al,(22) όπου χορηγήθηκε επισημασμένη ¹⁴C-υδροξυτυροσώλη (χορηγ. δόση 1,5mg/kg ΣΒ) μέσω ενδοφλέβιας ένεσης σε επίμυες, βρέθηκε πως η χορηγούμενη υδροξυτυροσώλη εξαφανίστηκε γρήγορα από το πλάσμα λόγω του άμεσου μεταβολισμού της και της κατανομής της στους διάφορους ιστούς: σκελετικούς μυς, συκώτι, καρδιά, νεφρούς, πνεύμονα αλλά και στον εγκέφαλο, δείχνοντας έτσι πως διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, εξηγώντας έτσι τον νευροπροστατευτικό της ρόλο. Ακόμα, μια άλλη μελέτη (23) έδειξε ότι σε επίμυες που χορηγήθηκε επισημασμένο ¹⁴C-καφεϊκό οξύ παρεντερικά παρατηρήθηκε *in situ* κατανομή της ένωσης, και συγκεκριμένα στον εγκέφαλο ανιχνεύθηκε σε ποσοστό λιγότερο από 0,1%.

Αξίζει να αναφερθεί μια ακόμα μελέτη(24), στην οποία επί 14 βδομάδες χορηγήθηκε σε μία ομάδα ποντικών διατροφή ενισχυμένη με εκχύλισμα σταφυλιού και βατόμουρου (ομάδα PEGB) ενώ η άλλη ομάδα ποντικών ακολούθησε διατροφή μη ενισχυμένη με PEGB (Ομάδα ελέγχου). Ύστερα από ανάλυση σε ιστούς εγκεφάλου, βρέθηκε πως οι φλαβανόλες τόσο στην πρωταρχική τους μορφή (κατεχίνη και επικατεχίνη) όσο και οι συζευγμένοι μεταβολίτες τους (μεθυλιωμένα, γλυκουρονιδιωμένα και σουλφονυλιωμένα παράγωγα) απαντώνται σε συγκεντρώσεις 0.81 – 5.6 pmol/g στον εγκέφαλο επίμυων της ομάδας PEGB, ενώ στην ομάδα ελέγχου δεν ανιχνεύθηκε καμία από τις φλαβανόλες.

Από μια σύντομη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φαίνεται πως η διαιτητική πρόσληψη των πολικών φαινολικών ενώσεων καθιστά τόσο τις πρόδρομες ενώσεις όσο και τους μεταβολίτες τους βιοδιαθέσιμους στο πλάσμα και επακόλουθα στην κατανομή τους σε διάφορους ιστούς, ακόμα και στον εγκέφαλο, ο οποίος περιβάλλεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό που είναι εκλεκτικός ως προς τη διαπερατότητα των θρεπτικών συστατικών.(25) Τελικά φαίνεται πως ορισμένες πολικές φαινολικές ενώσεις και οι μεταβολίτες τους καταφέρνουν να τον διαπεράσουν και να συσσωρευθούν στις περιοχές του εγκεφάλου σε συγκεντρώσεις περίπου 1nmol/g ιστού.(26) Ακόμα, παρά τις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις τους στο αίμα, οι πολικές φαινολικές ενώσεις δρουν ως βιοδραστικά συστατικά, συμβάλλοντας στη βελτίωση της υγείας. Αν και ο προσδιορισμός στους ιστούς θεωρείται πως είναι πιο σημαντικός από εκείνον στο αίμα, οι μελέτες που γίνονται στο συγκεκριμένο πεδίο είναι σε αρχικά στάδια και επί το πλείστον σε ζωικά πρότυπα. (20)

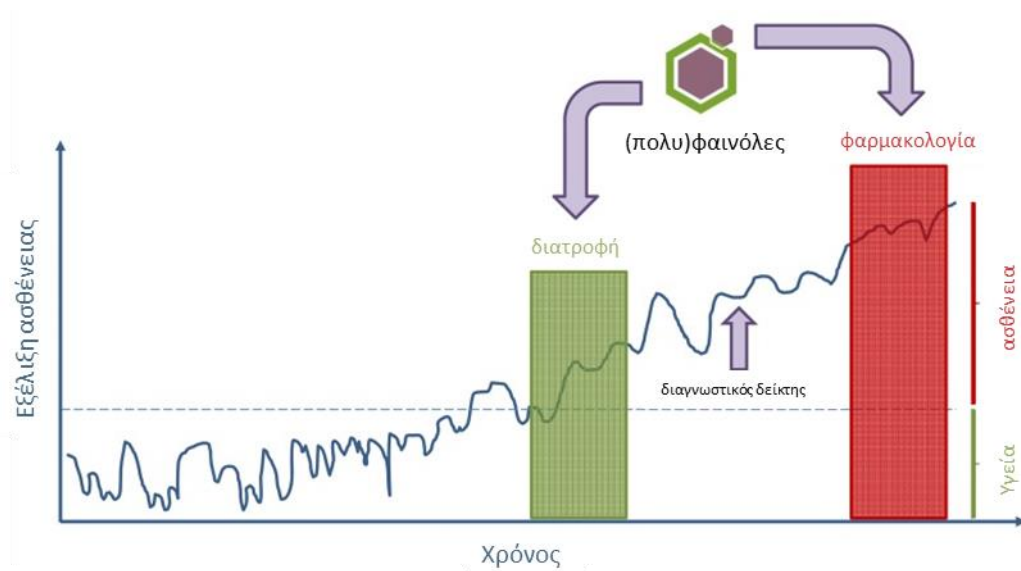
1.5 Πολικές φαινολικές ενώσεις και υγεία.

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει πληθώρα μελετών που πιστοποιεί τη θετική επίδραση των φαινολικών ενώσεων στην υγεία. Αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών που διερευνούν το ρόλο που έχουν τα τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε πολικές φαινολικές ενώσεις, όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, στην ανθρώπινη υγεία δείχνουν πως διατροφικές συνήθειες που βασίζονται στην υψηλή κατανάλωση τέτοιων τροφίμων, συσχετίζονται με μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής και με σημαντική μείωση του επιπολασμού αρκετών χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με τη φλεγμονή όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης τύπου II, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ο καρκίνος. Οι ευεργετικές επιδράσεις των διαιτητικών πολικών φαινολικών ενώσεων καθώς και των μεταβολιτών τους στην ανθρώπινη υγεία φαίνεται πως σχετίζονται με τις πλειοτροπικές τους δράσεις ως αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτικά, αντιμικροβιακά και πρωτίστως ως αντιοξειδωτικά,

καταπολεμώντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (RONS) προερχόμενα από το οξειδωτικό στρες που αποτελεί πρόδρομο αρκετών εκφυλιστικών ασθενειών.(6, 27)

Κάνοντας μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, αντιλαμβάνεται κανείς πως υπάρχουν ωστόσο αντικρουόμενα αποτελέσματα που προκύπτουν κυρίως από τη διαφορά στο σχεδιασμό μεταξύ των *in vivo* μελετών σε ζωικά μοντέλα και τις κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους, και των *in vitro* εργαστηριακών μελετών που γίνονται σε κυτταρικές σειρές. Οι τελευταίες ειδικότερα, συμβάλλουν στον άμεσο εντοπισμό της αιτιολογικής συσχέτισης της δράσης των πολικών φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής τους λειτουργίας, καθώς δείχνουν πως μπορούν να εκδηλώνουν θεαματική αντιοξειδωτική δράση στον οργανισμό. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν φαίνεται να επαληθεύονται στον ίδιο βαθμό από τις *in vivo* μελέτες οι οποίες κατά το σχεδιασμό τους λαμβάνουν υπόψη και άλλες σημαντικές παραμέτρους όπως είναι ο μεταβολισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων από τον οργανισμό. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι ευρισκόμενες συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία του αίματος σε ανθρώπους είναι της τάξεως των nM-μM, δείχνει πως η αντιοξειδωτική δράση των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι πολύ μικρότερη στον οργανισμό.(18, 28) Αυτό όμως δεν αναιρεί την αποδεδειγμένη δράση τους στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών είτε μειώνοντας την παραγωγή τους είτε απενεργοποιώντας τις δραστικές τους ομάδες που προκαλούν οξείδωση. Ακόμα, οι φαινολικές ενώσεις φαίνεται πως εκδηλώνουν συνεργιστική δράση με τον εγγενή αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού και συγκεκριμένα φαίνεται πως βοηθούν στην αναγέννηση των αντιοξειδωτικών βιταμινών.(27, 28)

Λαμβάνοντας υπόψη συλλογικά όλα τα δεδομένα των *in vitro* και *in vivo* μελετών, φαίνεται πως οι πολικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη καινοτόμων τεχνικών φαρμακοθεραπείας, με στόχο την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας τους και ως εκ τούτου να συμβάλλουν σε νέες φαρμακολογικές παρεμβάσεις.(29) Έτσι η έρευνα τα τελευταία χρόνια φαίνεται πως επικεντρώνεται όλο και πιο πολύ στην βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης των φαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία, στη διερεύνηση της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης τους (A.D.M.E.), καθώς και στη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας τους με την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνικών.(30)



Σχήμα 1.3 Οι πολικές φαινολικές ενώσεις ως προς διαιτητική και φαρμακολογική προσέγγιση για την πρόληψη ασθενειών.(29)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

2.1 Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα αποτελεί σημαντικό τμήμα των *in vivo* μελετών, καθώς παρέχει τα απαραίτητα δεδομένα σχετικά με τη συγκέντρωση τους στα βιολογικά υγρά όπως πλάσμα/ορό αίματος και ούρα ή σε διάφορους ιστούς. Στις μελέτες βιοανάλυσης, τα βιολογικά δείγματα που είναι υπό μελέτη μπορεί να είναι ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης. Λόγω του αρκετά πολύπλοκου υποστρώματος των βιολογικών δειγμάτων καθώς και της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ουσιών στα βιολογικά δείγματα, η ανάλυση των συγκεκριμένων δειγμάτων απαιτεί τη χρήση εκλεπτυσμένων αναλυτικών τεχνικών τόσο προκατεργασίας δείγματος όσο και προσδιορισμού. Η πιο συχνή επιλογή για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους, αποτελεί η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS). Ωστόσο και άλλες τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία (GC), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) συζευγμένη με διάφορους ανιχνευτές (UV-Vis, PDA, NMR, κ.λπ.) βρίσκουν ευρεία εφαρμογή για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους, ενώ η διαφορετικότητα στις συνθήκες πραγματοποίησης των διαφόρων μεθόδων προσδιορισμού αποδίδουν διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων στη βιβλιογραφία.(31, 32)

Τα κύρια στάδια των βιοαναλυτικών μελετών είναι: (α) η συλλογή και αποθήκευση των βιολογικών δειγμάτων, (β) η προκατεργασία των βιολογικών δειγμάτων, (γ) η χρωματογραφική ανάλυση και ανίχνευση, (δ) ο ποσοτικός προσδιορισμός και (ε) η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Με την επεξεργασία των δεδομένων αυτών επιτυγχάνεται ο υπολογισμός των φαρμακοκινητικών παραμέτρων των πολικών φαινολικών ενώσεων (χρόνος ημιζωής, A.D.M.E. κ.λπ.), η εκτίμηση της συγκέντρωσής τους που είναι βιοδιαθέσιμη στον οργανισμό, η εκτίμηση της «θεραπευτικής» τους δράσης καθώς και η εκτίμηση του πιθανού μεταβολικού μονοπατιού που ακολουθούν στον οργανισμό.(33)

2.2 Προκατεργασία Βιολογικών Δειγμάτων

Το υπόστρωμα των βιολογικών υγρών και των ιστών είναι πλούσιο σε πεπτίδια, αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες, νευροδιαβιβαστές, βιταμίνες, άλατα κ.α. που δρουν ως παρεμποδιστές κατά τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων. Κατ' επέκταση, η απευθείας έγχυσή τους σε ένα χρωματογραφικό σύστημα που βρίσκεται συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών είναι απαγορευτική. Για τον λόγο αυτό, το στάδιο της προκατεργασίας των δειγμάτων αποτελεί σημαντικό βήμα κατά τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα. Σκοπός του σταδίου αυτού είναι η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών που θα οδηγήσουν στη μεγιστοποίηση των διαφορών μεταξύ του προσδιοριζόμενου συστατικού και των παρεμποδίσεων και έτσι στον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό τους. Στις τεχνικές διαχωρισμού, το επιθυμητό συστατικό και οι ενώσεις που το παρεμποδίζουν μπορούν να διαχωριστούν εάν υπάρχει μία τουλάχιστον σημαντική διαφορά στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι κυριότερες τεχνικές προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων είναι: η καθίζηση (μετουσίωση) πρωτεϊνών (protein precipitation, PPT), η εκχύλιση υγρού-υγρού (liquid-liquid extraction, LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) και η εκχύλιση Soxhlet. Ωστόσο όλο και περισσότερες εφαρμογές εμφανίζονται να χρησιμοποιούν πιο εξεζητημένες μέθόδους προκατεργασίας δείγματος, όπως: εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (sonicated assisted liquid extraction, SAE) ή με τη χρήση μικροκυμάτων (microwave assisted liquid extraction, MAE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase microextraction, μ SPE ή SPME) και η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (supercritical fluid extraction, SFE).(32)

Οι ζωικοί ιστοί (ήπαρ, εγκέφαλος, κ.λπ.) που περιέχουν τις πολικές φαινολικές ενώσεις που μας ενδιαφέρει να προσδιορίσουμε, αρχικά ομογενοποιούνται μαζί με τον διαλύτη εκχύλισης σε μια συσκευή Ultraturrax ή σε κάποια παρεμφερή. Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται συνήθως ως διαλύτης εκχύλισης καθώς δίνει πολύ καλά αποτελέσματα, δεν αναμειγνύεται με το νερό και απομακρύνεται εύκολα. Για τις ανθοκυανίνες ή άλλα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή η χρήση μεθανόλης (MeOH) είναι αρκετά αποτελεσματική. Η MeOH πρέπει να οξινισθεί, κατά προτίμηση χωρίς τη χρήση ανόργανων οξέων καθώς μπορεί να προκαλέσουν υδρόλυση των γλυκοζιτών. Για την οξίνιση χρησιμοποιούνται οργανικά οξέα όπως το μυρμηκικό οξύ, το οξικό οξύ ή το τριφθοροοξικό οξύ, καθώς είναι πιο αποτελεσματικά. Επιπλέον, η κατεργασία με υπερήχους μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. (31)

2.2.1 Τεχνικές παραλαβής πολικών φαινολικών ενώσεων από το υπόστρωμα των βιολογικών δειγμάτων (31, 33, 34)

2.2.1.1 Υπέρηχοι (Ultrasonication)

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με τη χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς.

2.2.1.2 Φυγοκέντρηση (Centrifugation)

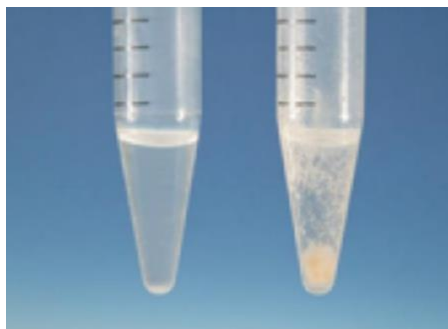
Εάν ο προσδιοριζόμενος αναλύτης και οι προσμίξεις διαφέρουν ως προς τη μάζα ή την πυκνότητα ο διαχωρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με φυγοκέντρηση. Το δείγμα υπό μορφή εναιωρήματος τοποθετείται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρείται σε υψηλό αριθμό στροφών που μετρείται σε στροφές ανά λεπτό (rotations per minute, rpm). Σωματίδια τα οποία δέχονται μεγαλύτερη φυγόκεντρο δύναμη έχουν υψηλότερες ταχύτητες ιζηματοποίησης και απομακρύνονται προς το κάτω μέρος του σωλήνα.

2.2.2 Τεχνικές καθαρισμού δείγματος

2.2.2.1 Καθίζηση πρωτεϊνών (PPT)

Το πρώτο στάδιο προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων συνήθως περιλαμβάνει την απομάκρυνση των πρωτεϊνών ενώ αμέσως μετά ακολουθεί το δεύτερο στάδιο που αφορά στην εκχύλιση των προσδιοριζόμενων πολικών φαινολικών ενώσεων. Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στα βιολογικά δείγματα πρέπει να απομακρυνθούν καθώς επηρεάζουν την απομόνωση και την ανάλυση των πολικών φαινολικών ενώσεων. Ειδικότερα, όταν πρόκειται να γίνει χρωματογραφική ανάλυση με UHPLC, οι πρωτεΐνες καθιζάνουν παρουσία οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση ή δεσμεύονται μη εκλεκτικά και μη αναστρέψιμα ή μετουσιώνονται από τις ελεύθερες σιλανόλες στην επιφάνεια του χρωματογραφικού υποστρώματος. Λόγω του μεγέθους τους, προσροφώνται ή καταβυθίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της πορώδους στατικής φάσης, όπου και μπλοκάρουν την πρόσβαση στους πόρους με αποτέλεσμα να

ελαττώνονται οι θέσεις προσρόφησης και έτσι να προκαλείται μη αναστρέψιμη αύξηση της πίεσης, ελάττωση της χωρητικότητας της στήλης, μείωση της εκλεκτικότητας (καθώς τα αμινοξέα των προσροφημένων πρωτεϊνών μεταβάλλουν την επιφάνεια του υποστρώματος) και τελικά, καταστροφή της χρωματογραφικής στήλης.(33)



Εικόνα 2.1 Καταβύθιση πρωτεϊνών σε δείγμα πλάσματος με προσθήκη υδατικού διαλύματος οξέος.(33)

Οι συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας για την απομάκρυνση πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη μετουσίωσή τους (α) με προσθήκη οργανικού διαλύτη όπως μεθανόλη (MeOH) ή ακετονιτρίλιο (CH_3CN) στο δείγμα, ή (β) με ελάττωση του pH με υπερχλωρικό οξύ (HClO_4) ή τριχλωροξικό οξύ (CCl_3COOH). Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση ή διήθηση για την απομάκρυνσή τους. Αν και με τις προαναφερθείσες τεχνικές η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το υπόστρωμα του δείγματος είναι απλή και αποτελεσματική, έχει ως μειονέκτημα την πιθανή συγκαταβύθιση και μέρους των φαινολικών συστατικών, των οποίων η ανάλυση μας ενδιαφέρει. Ωστόσο, η καταβύθιση των πρωτεϊνών συνδυάζεται συνήθως και με ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού (εκχύλισης) του δείγματος (συνήθως SPE) καθώς τα υπερκείμενα υγρά που συλλέγονται από την φυγοκέντρηση ύστερα από την καταβύθιση των πρωτεϊνών, μπορεί να περιέχουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών που δεν έχουν καθιζήσει, οι οποίες μπορεί να δράσουν ως παρεμποδιστές κατά την ανάλυση με LC-MS.(31)

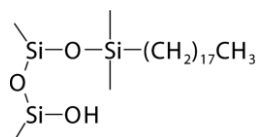
2.2.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) (33, 35)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελεί την πιο δημοφιλή τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων προς ανάλυση, και χρησιμοποιείται για αναλύσεις ρουτίνας σε εργαστήρια βιοαναλύσεων, για απλό καθαρισμό και εμπλουτισμό. Η τεχνική αυτή, σε σχέση με την κλασσική εκχύλιση υγρού-υγρού, έχει υψηλότερη ανάκτηση, επιτυγχάνει πιο αποτελεσματική προσυγκέντρωση του αναλύτη, καταναλώνει λιγότερο οργανικό διαλύτη, απαιτεί λιγότερο χρόνο εκτέλεσης, δεν προκαλεί τη δημιουργία γαλακτωμάτων, είναι εύκολη στη χρήση και μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Επιπλέον, μειώνει σημαντικά το υπόβαθρο θορύβου, κάτι το

οποίο χρειάζεται όταν πρόκειται να ακολουθήσει ανάλυση σε φασματογράφο μάζας, και το σημαντικότερο είναι ότι απομακρύνονται ουσίες που μπορεί να υπερφορτώσουν τη χρωματογραφική στήλη και κατά συνέπεια να μειώσουν την ακρίβεια και την επαναληπτικότητα της μεθόδου ενώ σε μερικές περιπτώσεις μπορεί και να κατακρατηθούν με τρόπο μη αντιστρεπτό στη στήλη, μειώνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής της. Η αποτελεσματικότητα της SPE εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες όπως: ο τύπος του διαλύτη που χρησιμοποιείται, ο όγκος του διαλύματος και το pH, καθώς και η πιθανή ύπαρξη τροποποιητή.

Η αρχή της εκχύλισης στερεάς φάσης βασίζεται στην κατανομή των προσδιοριζόμενων ουσιών μεταξύ μιας στερεάς φάσης (προσροφητικό υλικό) και της υγρής φάσης που αποτελεί το υπόστρωμα του δείγματος και περιέχει όλες τις παρεμποδίσεις. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης προκειμένου να διαχωριστούν, ενώ η παραλαβή των επιθυμητών ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ του αναλύτη, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλουσης των ενώσεων. Τα πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης είναι παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην HPLC αλλά σε διαφορετική κοκκομετρική σύσταση. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία πληρωτικών υλικών διαθέσιμη εμπορικά ως φυσίγγια (cartridges) ή δισκία (discs) καθώς και σε άλλες μορφές, καλύπτοντας μεγάλο εύρος χημικών ιδιοτεροτήτων (υδροφοβικότητα/ υδροφιλικότητα) και μεγάλο εύρος όγκων και διαστάσεων, ανάλογα με την ένωση που πρόκειται να απομονωθεί.

Τα προσροφητικά υλικά κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: σε αυτά που φέρουν ως βάση τους πολυμερή πυριτίου (silica-based) και σε αυτά που φέρουν ως βάση τους ένα πολυμερικό υλικό (polymer sorbent). Η πρώτη περίπτωση αφορά στη χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού, όπως είναι π.χ. το οκτυλο- (C8) και δεκαοκτυλο- (C18) σιλάνιο, για μη πολικές ενώσεις και ονομάζεται SPE ανάστροφης φάσης. Ο διαχωρισμός στην SPE ανάστροφης φάσης βασίζεται σε ελκτικές δυνάμεις Van der Waals ή δυνάμεις διασποράς. Η παραλαβή της επιθυμητής ένωσης στη συνέχεια γίνεται με χρήση κατάλληλου διαλύτη.



Εικόνα 2.2 Μετασχηματισμένο πολυμερές πυριτίου με επικαλυμμένες τις σιλανικές ομάδες (silica-based, C18-materials).

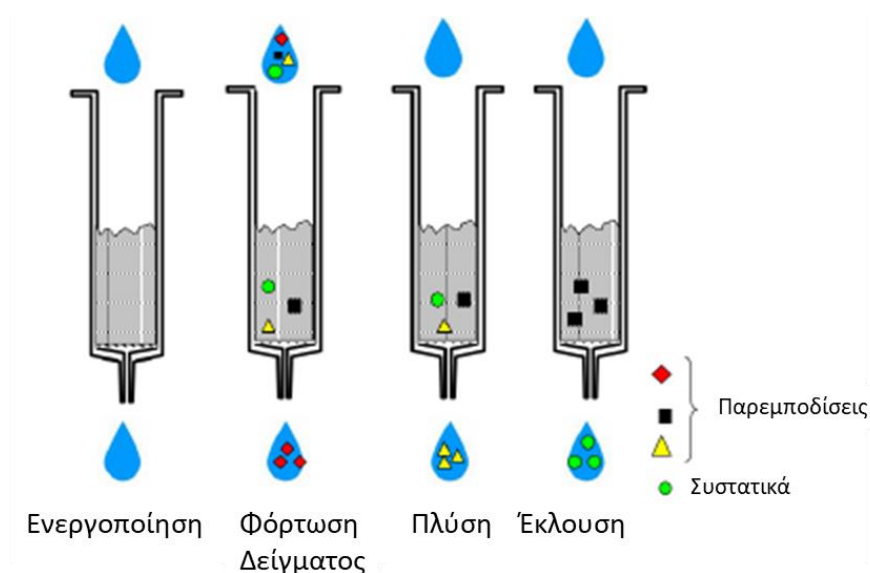
Αντιθέτως, η περίπτωση στην οποία το προσροφητικό υλικό silica gel έχει δεσμευμένες ομάδες όπως CN-, NH₂-, -NH₂CH₂CH₂NH₂-, λέγεται SPE κανονικής φάσης και εφαρμόζεται για πολικές ενώσεις. Ο διαχωρισμός στην SPE κανονικής φάσης στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του πολικού αναλύτη και τις δεσμευμένες ομάδες του πληρωτικού υλικού. Ακόμα, υπάρχει και η περίπτωση της SPE με ιονανταλλαγή, η οποία χρησιμοποιείται για ενώσεις που σε υδατικό διάλυμα βρίσκονται σε ιονισμένη μορφή. Ο μηχανισμός συγκράτησης της ένωσης στην περίπτωση της SPE με ιονανταλλαγή βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις της φορτισμένης δραστικής ομάδας του αναλύτη προς τις φορτισμένες ομάδες που είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα του silica gel. Οι ομάδες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι κυρίως σουλφονυλο-, καρβοξυλο-, διαιθυλαμινο- και τριμεθυλαμινο- ομάδες. Επιπλέον, για τη συγκράτηση του αναλύτη που περιέχεται σε ένα υδατικό διάλυμα από τον ιοντοανταλλάκτη, πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο, ώστε και ο αναλύτης και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στο προσροφητικό να είναι φορτισμένες. Για την αποδέσμευση των συστατικών αρκεί είτε αυτά είτε το υπόστρωμα να βρίσκονται σε μη ιονισμένη μορφή. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος ή διάλυμα, το οποίο περιέχει ιόντα που δρουν ανταγωνιστικά της ένωσης και την αντικαθιστούν.

Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί πως στην SPE, εκτός από τα πυριτικά υλικά, χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο πολυμερικά υλικά, τα οποία πλεονεκτούν έναντι των πυριτικών προσροφητικών υλικών επειδή παραμένουν σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος pH. Επιπλέον, τα υλικά αυτά χαρακτηρίζονται από τις μικτές τους ιδιότητες, καθώς περιέχουν ομάδες με υδρόφιλο και ομάδες με λιπόφιλο χαρακτήρα και επομένως, στα υλικά αυτά η κατακράτηση του αναλύτη βασίζεται στη συνδυασμένη δράση υδροφοβικών και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων. Τέτοια υλικά είναι τα OASIS® HLB της Waters, τα ABSELUT NEXUS της Varian, τα Strata-X της Phenomenex κ.ά. Επομένως, από όλα τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προσυγκέντρωσης εξαρτάται μεταξύ άλλων από το υπόστρωμα του δείγματος και τις ιδιότητες των συστατικών του και άρα η

ύπαρξη διάφορων τύπων SPE στηλών, (C18, C8, C2, SAX, κ.λπ.) μπορεί να συμφωνεί με την εκλεκτικότητα για ένα συγκεκριμένο τύπο φαινολικών ενώσεων.

Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης όπως φαίνεται στην εικόνα 2.3, απαρτίζονται από τα εξής τέσσερα κύρια βήματα:

1. Πρώτα γίνεται ενεργοποίηση και εξισορρόπηση του πληρωτικού υλικού της SPE με διαλύτες όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο, ακολουθούμενο από νερό το οποίο μπορεί να είναι οξιτισμένο συνήθως με κάποιο οργανικό οξύ όπως π.χ. το μυρμηκικό οξύ.
2. Στη συνέχεια φορτώνεται το δείγμα στο υλικό της SPE.
3. Έπειτα, γίνεται έκπλυση της στήλης προκειμένου να απομακρυνθούν οι ουσίες που παρεμποδίζουν την ανίχνευση του προσδιοριζόμενου αναλύτη.
4. Τέλος, με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών γίνεται η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα.



Εικόνα 2.3 Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).(33, 34)

2.3 Τεχνικές Ανάλυσης και Προσδιορισμού των Πολικών Φαινολικών Ενώσεων

2.3.1 Γενικά για την υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)(36-38)

Η υγρή χρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη χρωματογραφική τεχνική της σύγχρονης εποχής για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των ενώσεων ενός δείγματος και περιλαμβάνει συγκεκριμένα όλες τις υγροχρωματογραφικές τεχνικές στις οποίες η κινητή φάση είναι υγρό ενώ η στατική φάση είναι στερεή ή υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Στην τεχνική αυτή ο διαχωρισμός των ουσιών ενός μίγματος, βασίζεται στην

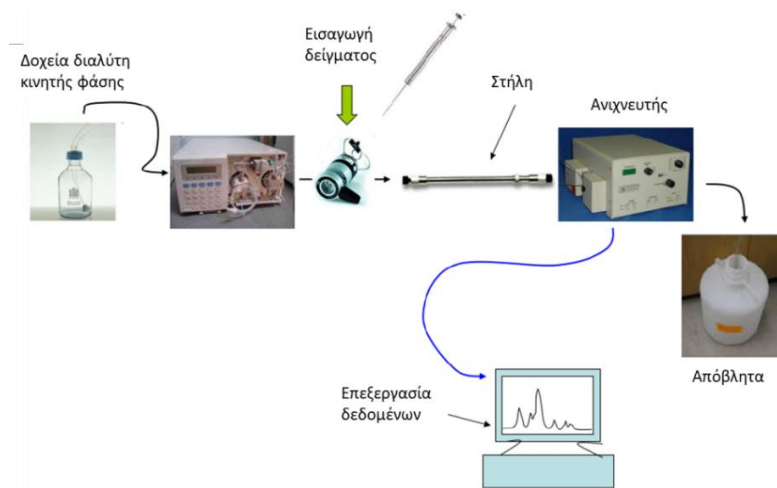
διαφορετική αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να απαιτείται διαφορετικός χρόνος έκλουσης για καθένα από αυτά από τη στήλη. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός αλληλεπίδρασης οφείλεται στον διαφορετικό βαθμό προσρόφησης του κάθε συστατικού στην κινητή φάση. Η αλληλεπίδραση αυτή σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων που περιέχονται στο υπό ανάλυση διάλυμα και κατ' επέκταση υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με αυτές τις αλληλεπιδράσεις (π.χ. χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, χρωματογραφία ιονανταλλαγής κ.α.).

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης: Η Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase NP-HPLC), όπου η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο κ.ά. και η Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης (Reversed Phase (RP-HPLC), όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική της κινητής που αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.

Στην υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης χρησιμοποιούνται πολικοί διαλύτες. Ειδικότερα, η κινητή φάση συνήθως αποτελείται από μείγματα νερού ή ρυθμιστικά υδατικά διαλύματα με διάφορους οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με το νερό, όπως η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το τετραϋδροφουράνιο, κ.α. Η σύσταση της κινητής φάσης καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης μπορεί να διατηρείται σταθερή, οπότε ονομάζεται ισοκρατική έκλυση, ή να μεταβάλλεται με το χρόνο, οπότε ονομάζεται βαθμωτή.

Τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μια διάταξη της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης είναι τα εξής (σχήμα 2.1) :

- α) φιάλη(ες) αποθήκευσης διαλυτών,
- β) μονάδα εισαγωγής δείγματος,
- γ) αντλία υψηλής πίεσης,
- δ) χρωματογραφική στήλη,
- ε) ανιχνευτή,
- στ) σύστημα συλλογής, καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων.



Σχήμα 2.1 Τυπική διάταξη της οργανολογίας HPLC.(37)

Για την περιγραφή της αποδοτικότητας ενός χρωματογραφικού συστήματος, τα σημαντικότερα μεγέθη που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

1. Ο αριθμός θεωρητικών πλακών (N) και το ύψος της θεωρητικής πλάκας (H), για τις οποίες ισχύουν οι σχέσεις :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2.1) \quad \text{και} \quad N = \frac{L}{H} \quad (2.2)$$

όπου: t_R = ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης

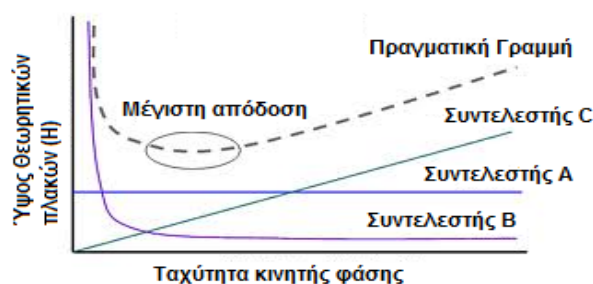
w = το εύρος της κορυφής της ένωσης

L = το μήκος του πληρωμένου τμήματος της στήλης

Τα μεγέθη N και H, σχετίζονται με την αναλυτική στήλη μέσω της εξίσωσης van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) \times u \quad (2.3)$$

όπου A, B, και C, είναι οι συντελεστές που σχετίζονται αντίστοιχα με τα φαινόμενα πολλαπλότητας διαδρομών ροής, διαμήκους διάχυσης και μεταφοράς μάζας μεταξύ των φάσεων.



Σχήμα 2.2. Διάγραμμα εξίσωσης van Deemter.(39)

2. Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης, R_s , η οποία αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητας της για τον διαχωρισμό δύο προσδιοριζόμενων ουσιών.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{w_A + w_B} \quad (2.4)$$

όπου: $(t_R)_A, (t_R)_B$ = οι χρόνοι κατακράτησης των δύο ενώσεων

w_A, w_B = τα εύρη των κορυφών των δύο ενώσεων

3. Η ασυμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών.

$$S_{10} = \frac{a}{b} \quad (2.5)$$

όπου: a, b = τα εύρη της κορυφής εκατέρωθεν του κεντρικού άξονα στο 1/10 του ύψους της κορυφής και $0.8 \leq S_{10} \leq 1.2$

Οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες για ταχείες αναλύσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων, σε συνδυασμό με την εξέλιξη της τεχνολογίας των υλικών πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών, οδήγησαν στην νέα μορφή της HPLC, την UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). Τα διάφορα συστήματα που διατίθενται στο εμπόριο μπορούν να λειτουργήσουν σε πιέσεις μέχρι και 1200 – 1300 bar (18000 – 19500 psi). Η βασική αρχή της UHPLC είναι ότι η χρήση μικρότερων σωματιδίων αδρανούς υλικού ως στατική φάση, μπορεί να βελτιώσει τα όρια της ανάλυσης. Τα μη πορώδη σωματίδια που έχουν μέγεθος κάτω από 2 μm και έως 1.3 μm και χαρακτηρίζονται από μικρή επιφάνεια, έχουν μικρή ικανότητα συγκράτησης. Για τον λόγο αυτό προτιμάται η χρήση πορωδών σωματιδίων πυριτίου με μέγεθος μικρότερο από 2 μm , με καλή ομοιομορφία στην κατανομή τους εντός της στήλης, τα οποία αντέχουν σε υψηλές πιέσεις. (37)

2.3.2 Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC) για τον προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων

Αφού ολοκληρωθεί η προκατεργασία του βιολογικού δείγματος, σειρά έχει η ανάλυσή του. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων των βιολογικών δειγμάτων, περιλαμβάνει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του κάθε προσδιοριζόμενου αναλύτη. Ο προσδιορισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα πραγματοποιείται επί το πλείστον με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), ωστόσο τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά η UHPLC, με την οποία επιτυγχάνεται πολύ καλός διαχωρισμός μεγάλου αριθμού πολικών φαινολικών ενώσεων σε σχετικά μικρό χρόνο. Ύστερα από μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, στον πίνακα 2.1 συνοψίζονται ορισμένες UHPLC μέθοδοι που έχουν

χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα.

Η ανάλυση των πολικών φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιώντας χρωματογραφία UHPLC ανάστροφης φάσης (reversed phase). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στατική φάση είναι silica gel τροποποιημένη με ομάδες δεκαοκτυλο-(C18) σιλάνιου, η οποία είναι και η πιο δημοφιλής στήλη ανάστροφης φάσης στην HPLC. Επιπλέον, ο διαχωρισμός των πολικών φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιώντας μη πολικά προσροφητικά υλικά βασίζεται στην υδρόφοβη αλληλεπίδραση κάθε φαινολικής ένωσης με την στατική φάση. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι αγλυκόνες, οι γλυκοζίτες και τα παράγωγά τους προσδιορίζονται ταυτόχρονα σε ένα χρωματογραφικό σύστημα με τους γλυκοζίτες να εκλύονται πρώτοι ακολουθούμενοι από τις αντίστοιχες αγλυκόνες τους.(32)

Στην περίπτωση που απαιτείται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός ενός μεγάλου αριθμού πολικών φαινολικών ενώσεων ως μίγμα η βαθμωτή έκλυση, δηλαδή η μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης με το χρόνο, αποτελεί μια πολύ καλή εφαρμογή, ώστε να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των αναλυτών σε σχετικά μικρές χρονικές περιόδους. Κινητές φάσεις που περιέχουν ακετονιτρίλιο και νερό χρησιμοποιούνται πιο συχνά από μεθανόλη και νερό. Σε μερικές περιπτώσεις, οξικό οξύ ή μυρμηκικό οξύ ή οξικό αμμώνιο προστίθενται στην κινητή φάση προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος χρωματογραφικός διαχωρισμός και υψηλότερη ευαισθησία του φασματομέτρου μάζας). Επιπλέον, αυτή η προσθήκη οξέος στο έκλουσμα προσδίδει εξαιρετική αύξηση στην εκλεκτικότητα του διαχωρισμού των ενώσεων και ευνοεί την βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών.

Ειδικότερα για την κινητή φάση φαίνεται πως η χρήση της μεθανόλης καθυστερεί την έκλυση των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονών από την χρωματογραφική στήλη και οι αντίστοιχες χρωματογραφικές τους κορυφές δεν είναι συμμετρικές. Η χρήση πιο υδρόφοβων οργανικών διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, φαίνεται πως έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δύναμης της έκλυσης επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την συγκράτηση των αναλυτών σε χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Οι καλύτερες (optimum) συνθήκες διαχωρισμού, όσον αφορά στους χρόνους κατακράτησης των πολικών φαινολικών ενώσεων, καθώς και συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών, βρέθηκαν χρησιμοποιώντας ακετονιτρίλιο ως οργανικό διαλύτη στην κινητή φάση.(32, 40) Για τον λόγο αυτό, το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται ευρέως από αρκετούς ερευνητές ως κινητή φάση για τον διαχωρισμό των μιγμάτων των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους.(32)

Πίνακας 2.1: UHPLC μέθοδοι για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα.

Προσδ. Ένωση	Στήλη	Κινητή φάση	Ανιχνευτής	Τύπος δείγματος/ Προκατεργασία δείγματος	Γραμμική δυναμική περιοχή	LOD/LOQ	Ανάκτηση, % R	Βιβλ. αναφορά
Isorhamnetin kaempferol quercetin baicalein	Acquity UPLC BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)	Βαθμωτή έκλουση A: MeOH B: 0.1% HCOOH σε νερό flow rate: 0.4 mL/min	ESI-MS	πλάσμα/ όξινη υδρόλυση	0.009-1.04 μg/mL	0.78-3.38 ng/mL 3.63-5.88 ng/mL	57.1-101.8 %	(41)
Hydroxytyrosol, secoiridoids, oleuropein	Acquity UPLC HSS T3 (100 × 2.1 mm, 1.8 μm)	Βαθμωτή έκλουση A: 0.2% CH ₃ COOH B: MeOH flow rate: 0.3 mL/min	PDA ESI-TQD/MS	ιστός εγκεφάλου/ λυοφιλίωση, μSPE	-	-	-	(42)
(-)epicatechin, (+)catechin, methyl catechin glucuronide, catechin glucuronide	Agilent Plus C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)	Βαθμωτή έκλουση A: 0.2% CH ₃ COOH B: ACN flow rate: 0.4 mL/min	ESI-MS/MS	ιστός εγκεφάλου/ όξινη υδρόλυση (4% H ₃ PO ₄), SPE στηλάκια OASIS HLB 2mg 30μm micro-elution plates	-	0.3 pmol/g (LOD) / 1 pmol/g (LOQ)	-	(24)
procyanidin metabolites	VP-ODS C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)	Βαθμωτή έκλουση A: 0.4% CH ₃ COOH B: ACN flow rate: 1.0 mL/min	DAD ESI Q-TRAP MS	ιστοί εγκεφάλου & ήπατος/ όξινη υδρόλυση, εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)	-	-	-	(43)

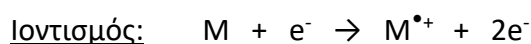
3,5,6,7,8,30,40-heptamethoxy-flavone (HMF), nobiletin (NBT), tangeretin (TGT), natsudaaidain (NDD)	L-column ODS (5 m, 150 mm, 2.1 mm i.d.; Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan)	Βαθμωτή έκλουση A: 5% CH ₃ COOH B: ACN flow rate: 0.3 mL/min	HPLC-UV	ιστός εγκεφάλου/ εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)	0.1-1 µg/mL	LOQ: ▪ 0.1µg/mL (HMF) ▪ 0.039µg/mL (NBT) ▪ 0.074µg/mL (TGT) ▪ 0.037µg/mL (NDD)	-	(44)
5,7-dimethoxyflavone	Agilent XDB C18 column (4.6 mm × 50 mm, 1.8 µm particle size, Agilent, California, US) coupled with Agilent XDB C18 guard column (2.1 mm × 5 mm, 1.8 µm particle size, Agilent, California, US)	Ισοκρατική έκλουση A: 20mM NH ₄ HCO ₂ σε νερό (50/50 (v/v)) B: ACN flow rate: 0.4 mL/min	HPLC-ESI-MS/MS	ιστός εγκεφάλου/ εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)	-	LLOQ: 2ng/mL	-	(45)
Naringenin, hesperetin, nobiletin, naringin, hesperidin, geniposide	Agilent Rapid Resolution High Definition (RRHD) Zorbax Eclipse Plus C18(Agilent Technologies, USA), 2.1 mm × 100 mm, 1.8 m particle size.	Βαθμωτή έκλουση A: 0.1% HCOOH B: ACN με 0.1% HCOOH flow rate: 0.4 mL/min	UPLC-ESI-MS/MS	πλάσμα, ιστός εγκεφάλου& δείγματα ούρων/ SPE στηλάκια Hydrophilic–Lipophilic-Balanced (HLB) Oasis	-	1-10 ng/mL (LLOQ)	85.1 - 110.5% (στο πλάσμα) 83.2 - 107.5% (στον εγκέφαλο) 83.4 - 94.5 % (στα ούρα)	(46)

2.4 Φασματομετρία μάζας – τεχνολογίας Orbitrap

2.4.1 Φασματομετρία μάζας: Αρχή λειτουργίας και Οργανολογία(47, 48)

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές που τα τελευταία χρόνια έχουν σημειώσει εντυπωσιακή ανάπτυξη και ίσως είναι και αυτή με την μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών (χημεία τροφίμων και περιβαλλοντική χημεία, βιοεπιστήμες, μεταβολομική κ.α.). Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται από υψηλή εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται και από υψηλή ευαισθησία που φτάνει έως τα 10^{-8} mol, καθώς και από υψηλή ταχύτητα ανάλυσης. Έτσι, επιτυγχάνεται η ανίχνευση ενώσεων σε πολύ χαμηλά επίπεδα (trace levels) με μεγάλη ακρίβεια, ακόμα και σε δείγματα με περίπλοκα υποστρώματα, όπως είναι τα βιολογικά δείγματα. Παράλληλα, παρέχει πολύ χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του υπό ανάλυση δείγματος, την αναλογία ισότοπων ατόμων στο δείγμα, τις δομές των μορίων (ανόργανων, οργανικών, βιομόρια κλπ) και γενικότερα την ακριβή στοιχειακή σύσταση του δείγματος.

Η φασματομετρία μάζας, βασίζεται στην παραγωγή και στη μέτρηση του σήματος των ιόντων/θραυσμάτων στην αέρια φάση κατά την ανάλυση ενός δείγματος, που σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της ακριβούς μοριακής μάζας τους, οδηγεί στην ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση των ουσιών που περιέχονται στο δείγμα. Η αρχή λειτουργίας ενός φασματομέτρου μαζών συνίσταται στον ιοντισμό του αναλύτη και τη μεταφορά των ιόντων/θραυσμάτων σε χώρο υψηλού κενού, όπου με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων εστιάζονται τα ιόντα σε μία δέσμη και προσδιορίζεται ο λόγος μάζας-προς-φορτίο του κάθε ιόντος (mass-to-charge ratio, m/z), παράγοντας έτσι τα φάσματα μαζών. Η τεχνική MS ακολουθεί την παρακάτω πορεία:

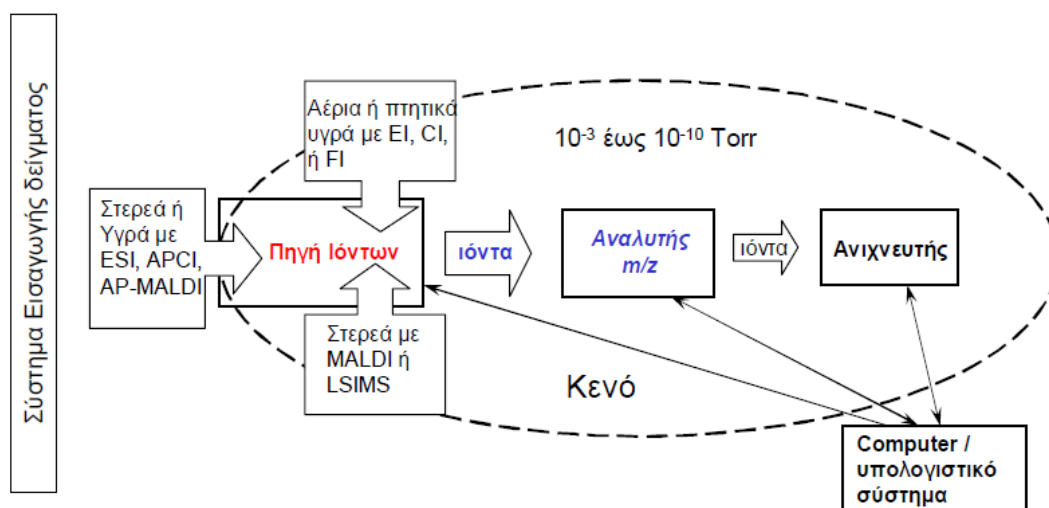


Όπου: $M^{\bullet+}$: μοριακό ιόν, EE^+ : ιόν με άρτιο αριθμό e, OE^+ : ιόν με περιττό αριθμό e,

N : μόριο, και $R^\bullet$: ρίζα.

Ένα τυπικό φασματομέτρο μαζών αποτελείται όπως φαίνεται στο σχήμα 2.3 από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1. Το **σύστημα εισαγωγής του δείγματος**. Τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται είτε σε αέρια είτε σε υγρή μορφή.
2. Την **πηγή ιόντων**, όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα.
3. Τον **αναλυτή μαζών**, όπου εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το m/z τους.
4. Το **σύστημα ανίχνευσης των ιόντων** που συλλέγει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
5. Το **σύστημα κενού**, για τη διατήρηση της πίεσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλα τα τμήματά του.
6. Το **σύστημα συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων**, που είναι ουσιαστικά ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής ο οποίος διαθέτει το κατάλληλο λογισμικό.



Σχήμα 2.3 Σχηματική παρουσίαση ενός φασματόμετρου μάζας.(49)

Λόγω της δυνατότητας των φασματόμετρων μάζας να διακρίνουν τις ισοτοπικές μάζες, τα ατομικά βάρη στη βιβλιογραφία της φασματομετρίας μαζών διαφέρουν από αυτά που χρησιμοποιούνται στις άλλες τεχνικές της αναλυτικής χημείας. Ως μονάδα μάζας χρησιμοποιείται η μονάδα ατομικής μάζας amu (atomic mass unit) ή u ή Dalton (Da). Η μονάδα ατομικής μάζας ορίζεται ως το 1/12 της μάζας του ατόμου του άνθρακα ($^{12}_6\text{C}$), δηλαδή ισχύει ότι $m(^{12}_6\text{C})=12,000 \text{ Da}$. Έτσι, η μάζα των υπολοίπων στοιχείων και των ισοτόπων τους υπολογίζεται με αναγωγή στο άτομο του $^{12}_6\text{C}$ και λέγεται ακριβής μάζα. Κατ' επέκταση, η

ακριβής μάζα μιας ένωσης, υπολογίζεται από το άθροισμα των ακριβών μαζών των στοιχείων από τα οποία αποτελείται. Επιπλέον, η ακριβής μάζα διαφέρει από το μοριακό βάρος καθώς για τον υπολογισμό του δεύτερου λαμβάνονται υπόψη οι μάζες όλων των ισοτόπων του κάθε στοιχείου, κανονικοποιημένες με βάση την αφθονία του κάθε ισότοπου. Επομένως, η ακριβής μάζα είναι η μάζα που μετρείται από τα φασματομέτρα μαζών.

2.4.2 Πηγές Ιόντων

Σε μια μέτρηση με φασματομετρία μάζας, το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το σχηματισμό των ιόντων του αέριου αναλύτη και αποτελεί καθοριστικό στάδιο για την μέτρηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μορφή του φάσματος μάζας μιας ένωσης, εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη τεχνική παραγωγής ιόντων, καθώς για την ίδια ένωση το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι τελείως διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιοντισμού. Γενικώς, οι τεχνικές ιοντισμού διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Στις **πηγές αέριας φάσης**, όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται. (Πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI), Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization, CI))
- Στις **πηγές εκρόφησης**, όπου το δείγμα σε υγρή ή στερεά κατάσταση, μετατρέπεται σε αέρια ιόντα. (Βομβαρδισμός με ταχέως κινούμενα άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB), Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Desorption Ionization, MALDI), Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI), Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI))

Στον Πίνακα 2.2 παρατίθενται οι κύριες τεχνικές ιοντισμού που εφαρμόζονται καθώς και οι διατάξεις με τις οποίες συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται σε κάθε τεχνική και οι κατηγορίες των αναλυόμενων ενώσεων που ενδείκνυνται.

Πίνακας 2.2: Κύριες τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας.(47)

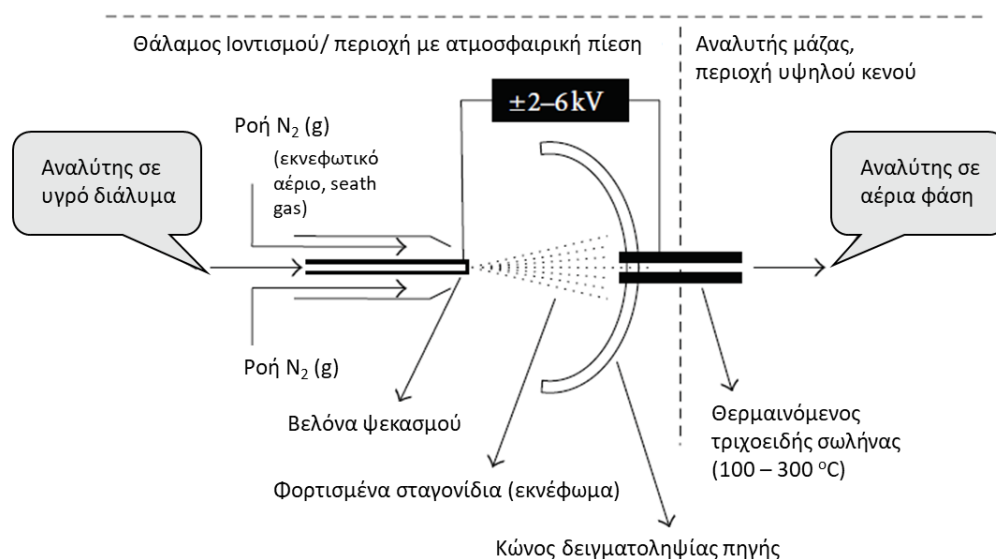
Τεχνική Ιοντισμού	Κύρια Ιόντα	Αναλυτής Μαζών	Τάξεις Ενώσεων
Ιοντισμός ηλεκτρονίων	$M+\bullet$, θυγατρικά ιόντα	Q, TOF, IT, B	Μη πολικές, κάποιες πολικές <500 Dalton Πολικές, κάποιες μη πολικές,
MALDI	$[M+H]^+$ $[M+H]^-$	TOF, Orbitrap	βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή Έως 106 Dalton
ESI	$[M+H]^+$ $[M+H]^-$	Q, TOF, IT, FTICR, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές,

APCI	Ιόντα προσθήκης π.χ.	Q, TOF, IT	πρωτεΐνες <200.000
	$[M+NH_4]^+$		Dalton
	$[M+H]^+$		Μη πολικές, κάποιες
	$[M+H]^-$		πολικές <1000 Dalton

2.4.2.1. Πηγή Ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI)(50)

Η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού (ESI) χρησιμοποιείται ευρέως στη σύγχρονη φασματομετρία μαζών, για τον προσδιορισμό μεγάλου εύρους μορίων, τόσο μετρίως πολικών όσο και πολικών αλλά και θερμικά ασταθών μορίων. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες.

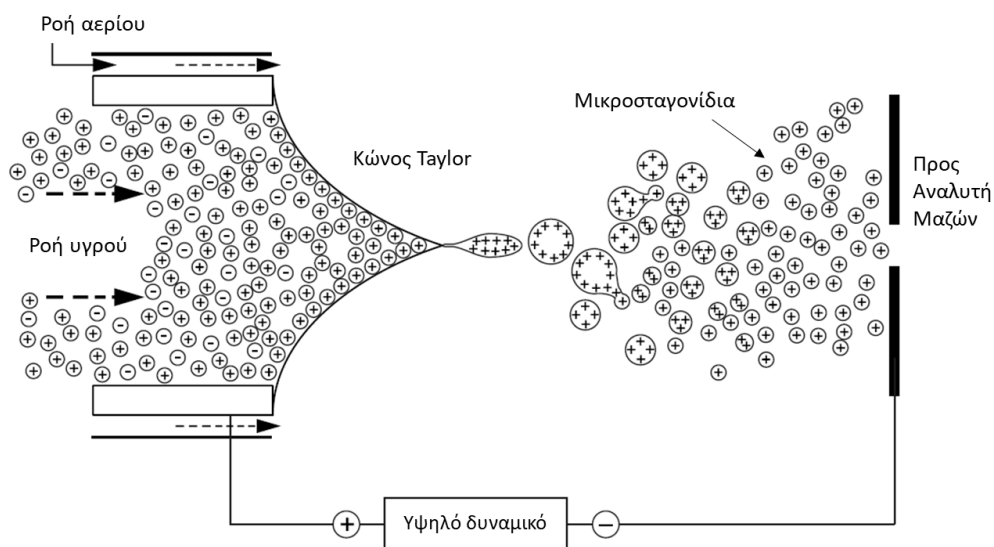
Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής ιοντισμού είναι ότι δεν περιλαμβάνει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών, καθιστώντας έτσι δυνατή την ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό ανήκει στις «ήπιες» τεχνικές ιοντισμού, δηλαδή σε αυτές που επιτυγχάνουν τον ιοντισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους χωρίς περιορισμό στη μάζα, έχει πολύ καλή απόδοση με υψηλή ευαισθησία, εύκολη ποσοτικοποίηση και χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης της υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών.



Εικόνα 2.4 Συνοπτικό σχήμα της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).(51)

Κατά τον κλασσικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, αρχικά το σχετικά αραιό διάλυμα του δείγματος (με συγκέντρωση λιγότερη από mM σε πολικό πτητικό διαλύτη), διέρχεται από

έναν μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα με ταχύτητα ροής της τάξεως των 1 – 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, ενώ ομοαξονικά με τον τριχοειδή σωλήνα ρέει αέριο άζωτο υπό πίεση (εκνεφωτικό αέριο, seath gas). Μεταξύ της άκρης του μεταλλικού τριχοειδούς σωλήνα και του κώνου δειγματοληψίας της πηγής ή του θερμαινόμενου τριχοειδούς (heated capillary) που συνήθως βρίσκεται σε απόσταση 1 – 3 cm από την άκρη της βελόνας ψεκασμού, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού της τάξεως των 2 – 6 kV, που οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου. Το πεδίο αυτό δημιουργεί μια συσσώρευση φορτίου μέσω ηλεκτραπωθητικών δυνάμεων στην επιφάνεια του υγρού που βρίσκεται στην άκρη του τριχοειδούς, από όπου θα σχηματιστούν τα φορτισμένα σταγονίδια, τα οποία ανάλογα με την πολικότητα που εφαρμόζεται, έχουν είτε θετικό είτε αρνητικό φορτίο. Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ο «κώνος του Taylor», όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.8, ο οποίος αποτελείται από φορτισμένα σωματίδια τα οποία κατά την εκνέφωση συρρικνώνονται και έχουν διάμετρο περίπου 1 μm .

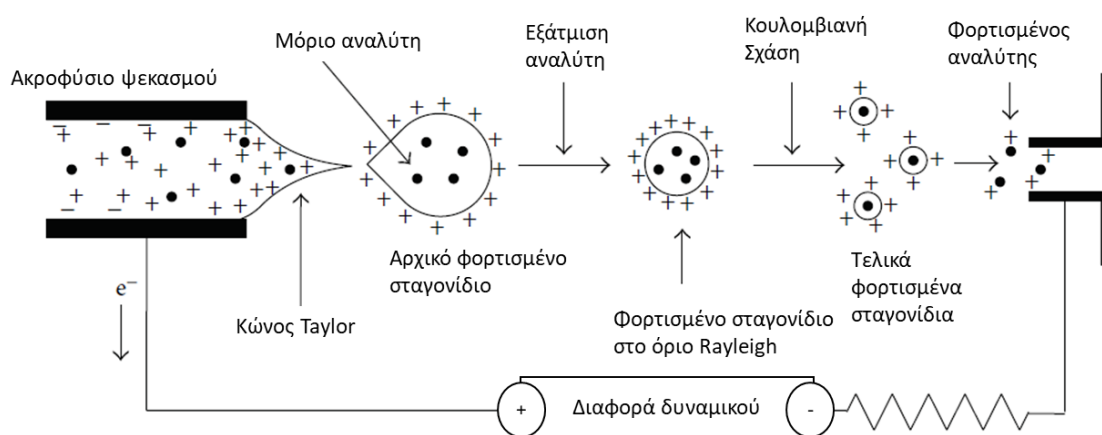


Εικόνα 2.5 Αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή ιόντων (ESI).(52)

Λόγω αυτής της ελάττωσης του μεγέθους των σταγονιδίων τα φορτισμένα σωματίδια αναγκάζονται να συνυπάρξουν σε όλο και μικρότερο χώρο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλιμακούμενων απωστικών δυνάμεων μεταξύ τους. Οι δυνάμεις που καθορίζουν την σταθερότητα των παραγόμενων σταγονιδίων κατά τον ηλεκτροψεκασμό είναι οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ομοίως φορτισμένων ιόντων που τείνουν να «σπάσουν» το σταγονίδιο και η επιφανειακή τάση του σταγονιδίου που τείνει να το κρατήσει σταθερό. Με τη μείωση της διαμέτρου του σταγονιδίου, η επιφανειακή του τάση δεν αλλάζει

δραματικά, όμως οι απωστικές δυνάμεις αυξάνονται μέχρι να εξισωθούν με την επιφανειακή τάση. Το σημείο αυτό ονομάζεται όριο Rayleigh, και τη στιγμή που ξεπεραστεί αυτό το όριο, δηλαδή όταν οι απωστικές δυνάμεις γίνονται μεγαλύτερες από την επιφανειακή τάση του σταγονιδίου, το σταγονίδιο υφίσταται τη λεγόμενη «κουλομβιανή σχάση» (Coulomb fission) και δημιουργεί πολλαπλά δευτερεύοντα φορτισμένα σωματίδια.

Ακόμα, το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται σε συνδυασμό με την ομοαξονική ροή του αέριου αζώτου που απελευθερώνεται υπό πίεση (εκνεφωτικό αέριο, seath gas), καθώς και με το αέριο άζωτο που υπάρχει γύρω από το τριχοειδές (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas), βοηθούν στην εξάτμιση του διαλύτη και οδηγούν στη δημιουργία ενός εκνεφώματος αποτελούμενο από μικρού μεγέθους φορτισμένα σωματίδια, που κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών, ο οποίος βρίσκεται στο τμήμα του οργάνου που διαθέτει υψηλό κενό. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί πως στην περίπτωση της θερμαινόμενης πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (HESI II), η διάταξη της πηγής είναι η ίδια με αυτή στις ESI, με τη μόνη διαφορά ότι στην πρώτη, υπάρχει και μια ακόμα συσκευή στο σώμα του ανιχνευτή, που είναι υπεύθυνη για τη θέρμανση του εκνεφωτικού αέριου αζώτου (seath gas) σε θερμοκρασίες μεταξύ 200 και 600 °C. Όταν λοιπόν, η ομοαξονική ροή του θερμαινόμενου εκνεφωτικού αέριου αζώτου διασταυρώνεται με τα φορτισμένα σταγονίδια που εκρέονται από το μεταλλικό τριχοειδές, τα σταγονίδια αυτά εξατμίζονται ταχύτερα από την περίπτωση του κλασσικού ESI όπου το εκνεφωτικό αέριο άζωτο είναι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Εικόνα 2.6 Ο μηχανισμός του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI).(51)

Η αποτελεσματικότητα και η σταθερότητα της εκνέφωσης είναι ανάλογη του μεγέθους της διαφοράς δυναμικού στο σύστημα. Όσο αυξάνεται η διαφορά δυναμικού, το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται και η κίνησή τους γίνεται οριζόντια. Επιπροσθέτως, η διαδικασία του

ηλεκτροψεκασμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις πειραματικές συνθήκες και την επίδραση του υποστρώματος (matrix effect). Ενίσχυση και καταστολή του σήματος στο ESI προκαλείται επίσης και από άλλους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το ποσοστό ιοντισμού των αναλυτών όπως αστάθεια ροής, θόρυβος υποστρώματος, η σύσταση της κινητής φάσης και συστατικών του δείγματος.

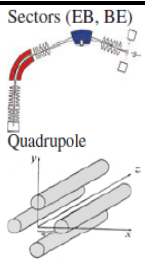
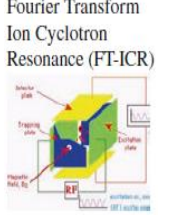
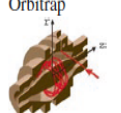
2.4.3 Αναλυτής Μάζας (47, 48, 53)

Μόλις σχηματιστούν τα ιόντα στην πηγή ιόντων, επιταχύνονται προς τον αναλυτή μάζας ο οποίος αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα ενός φασματομέτρου μάζας, καθώς διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Για την εκπλήρωση του σκοπού τους, οι αναλυτές μάζας χρησιμοποιούν δυνάμεις που επηρεάζουν την κίνηση των ιόντων και ειδικότερα (i) ένα μαγνητικό πεδίο, (ii) ένα ηλεκτρικό πεδίο και (iii) μια ραδιοσυχνότητα. Ένας αναλυτής μάζας μπορεί να χρησιμοποιήσει μόνο μία ή συνδυασμό των δύο ή και των τριών δυνάμεων. Επιπλέον, υπάρχουν διάφορα είδη αναλυτών μάζας, ανάλογα με την περιοχή μαζών στην οποία μπορούν να εκτελέσουν σάρωση, την ταχύτητα σάρωσης, τη διακριτική ικανότητα, την ακρίβεια μάζας, τη δυνατότητα θραυσματοποίησης του αναλύτη, τις εφαρμογές και φυσικά το κόστος. Ο ιδανικός αναλυτής μάζας θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές m/z , να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιοντισμού.

Γενικώς οι αναλυτές μάζας μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες ομάδες: σε εκείνους που βασίζονται στο διαχωρισμό ιόντων στο διάστημα (ion separation in space) που αλλιώς αναφέρονται και ως αναλυτές τύπου δέσμης (beam-type analyzers), καθώς και σε εκείνους που διαχωρίζουν τα ιόντα στο χρόνο (ion separation in time) όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.3. Οι αναλυτές μάζας που διαθέτουν μαγνητικό και ηλεκτρικό πεδίο (double sector instruments), ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole) καθώς και ο αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF) ανήκουν στην πρώτη ομάδα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, τα ιόντα ταξιδεύουν για μερικά εκατοστά (περίπου 30-100 cm στο τετραπολικό αναλυτή μάζας) ή μέτρα (περίπου 2-5 m σε τομείς ή 2-17 μέτρα στο TOF) και κατά το μήκος αυτής της διαδρομής που διανύουν, υποβάλλονται σε μία ή δύο από τις δυνάμεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Αντιθέτως, οι αναλυτές μάζας που διαχωρίζουν τα ιόντα στο χρόνο, λειτουργούν ως συσκευές παγίδευσης και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναλυτές

μαζών γραμμικής ή τρισδιάστατης παγίδας ιόντων (linear or tridimensional Ion Trap), όπως ο αναλυτής μαζών Orbitrap καθώς και ο αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με σχηματισμό Fourier (FT-ICR). Στην κατηγορία αυτή, η διαδρομή των ιόντων μπορεί να κυμαίνεται από μερικά εκατοστά (cm) έως και μέτρα (m) ανάλογα με τον χρόνο παγίδευσης.

Πίνακας 2.3: Κύριες κατηγορίες αναλυτών μάζας και τα βασικά τους χαρακτηριστικά. (53)

Διαχωρισμός ιόντων με βάση το διάστημα (separation in space)					
Αναλυτής Μάζας	Δύναμη	Διαχωρισμός με βάση	Εύρος m/z	Διαχωριστική Ικανότητα, R	Ακρίβεια μάζας, ppm
	Μαγνητικά & Ηλεκτροστατικά πεδία	Ιοντική ορμή & κινητική ενέργεια	10,000	10,000	<1 ppm
	Ηλεκτρικό πεδίο & ραδιοσυχνότητα	Σταθερότητα/ Αστάθεια των τροχιών	2000 - 4000	Unit (0.2 u FWHM)	No (>20ppm)
		Ταχύτητα	>100,000	>20,000	2-5 ppm
Διαχωρισμός ιόντων με βάση το χρόνο (separation in time)					
Αναλυτής Μάζας	Δύναμη	Διαχωρισμός με βάση	Εύρος m/z	Διαχωριστική Ικανότητα, R	Ακρίβεια μάζας, ppm
	Ηλεκτρικό πεδίο & ραδιοσυχνότητα	Συχνότητα των τροχιών	<6000	<500	no
	Ηλεκτρικό πεδίο, μαγνητικό πεδίο, ραδιοσυχνότητα	Συχνότητα των τροχιών	>10,000	>500,000	<1 ppm
	Ηλεκτρικό πεδίο	Συχνότητα αρμονικών ταλαντώσεων	<6000	>100,000	2-5ppm

Από τον τύπο του αναλυτή μαζών εξαρτάται η διακριτική ή διαχωριστική ικανότητα (Resolving Power – R) του οργάνου, η οποία αποτελεί το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό ποιότητας ενός φασματομέτρου μαζών. Η διαχωριστική ικανότητα (R) εκφράζει τη δυνατότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διακρίνει δύο μόλις διαχωριζόμενες κορυφές στο φάσμα μαζών που αντιστοιχούν σε μάζες m_1 και m_2 , και ορίζεται ως ο λόγος της διαφοράς μάζας (Δm) των δύο ουσιών προς τη μέση μάζα (m) των δύο ουσιών.

$$R = \frac{\Delta m}{m} \quad (2.1)$$

Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι πετυχαίνεται όταν δύο περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους των κορυφών τους ($h_1/h_2 < 10$, όπου h_1 το ύψος της κορυφής και h_2 το ύψος της «κοιλιάδας» μεταξύ των κορυφών).

2.4.3.1 Αναλυτής Μάζας τεχνολογίας Orbitrap™

Ο αναλυτής μάζας Orbitrap™, είναι τεχνολογίας τροχιακής παγίδευσης ιόντων και πρόκειται για έναν καινοτόμο αναλυτή μαζών που κατασκεύασε η εταιρεία Thermo Fisher Scientific το 2005. Ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών προσφέρει υψηλή ευαισθησία και ισχύ διαχωρισμού, δυναμικό εύρος και υψηλή σταθερότητα και ακρίβεια μέτρησης μάζας σε επίπεδο που ανταγωνίζεται σε κάποιο βαθμό τον αναλυτή μαζών FT-ICR. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του Orbitrap είναι ότι λειτουργεί χωρίς μαγνητικό πεδίο και ως εκ τούτου είναι διαθέσιμο σε χαμηλότερη τιμή και απαιτεί λιγότερο χώρο εγκατάστασης σε σχέση με τους αντίστοιχους FT-ICR αναλυτές μαζών. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί πως ο Orbitrap διαθέτει ένα κοινό χαρακτηριστικό με το FT-ICR: ο Orbitrap χρησιμοποιεί επίσης την αρχή της ανίχνευσης εικόνας ρεύματος (image current detection) των ταλαντώσεων των ιόντων, καθώς και τον μετασχηματισμό Fourier για τη μετατροπή της ψηφιοποιημένης εικόνας ρεύματος στο πεδίο του χρόνου σε περιοχή συχνοτήτων με τον ίδιο τρόπο όπως γίνεται και στον FT-ICR και στη συνέχεια μετατρέπεται σε φάσμα μάζας.(54, 55)

Κατά τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο «Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap™», της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.10. Ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών, που είναι συζευγμένος με σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC), έχει σχεδιαστεί για υψηλές επιδόσεις και αποδόσεις, για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενώσεων καθώς και για ποσοτική ανάλυση. Χάρη στην τεχνολογία Orbitrap που διαθέτει, το σύστημα Exactive Plus™, προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια μάζας (HR/AM) με την τεχνική πλήρους σάρωσης (full scan MS) για γρήγορα, αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα και τεράστια αναλυτική εμπιστοσύνη, τόσο για εφαρμογές διαλογής (screening), για την ταυτοποίηση μιας ένωσης σε αναλύσεις ρουτίνας, όσο και για την ανίχνευση ενώσεων που βρίσκονται σε ίχνη σε σύνθετα μίγματα.(55)



Εικόνα 2.7 Ο αναλυτής μάζας Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap™ της Thermo Fisher Scientific.(56)

Πιο συγκεκριμένα, η προηγμένη επεξεργασία σήματος επιτρέπει τη γρήγορη ταχύτητα σάρωσης που φτάνει μέχρι και τα 12 Hz για απαιτητικά δείγματα με πολύπλοκα υποστρώματα. Η ακρίβεια μάζας (mass accuracy) είναι <1 ppm με εσωτερική βαθμονόμηση του οργάνου και <3 ppm με εξωτερική βαθμονόμηση. Επιπλέον, η διακριτική του ικανότητα (Resolving Power, R) φτάνει μέχρι τα 140,000 (FWHM) σε m/z 200 για τη διαλογή και ποσοτική ανάλυση με ταχείες τεχνικές υγρής χρωματογραφίας UHPLC. Η δυναμική περιοχή είναι μεγαλύτερη από 5000 σε μία σάρωση διατηρώντας την επιλεχθείσα ακρίβεια μάζας. Το εκτεταμένο εύρος της περιοχής μαζών φτάνει από 50 μέχρι 6000 m/z , ενώ η ευαισθησία φτάνει σε επίπεδα fg (10^{-15} g). Επιπροσθέτως, η γρήγορη εναλλαγή πολικότητας μεταξύ θετικού και αρνητικού τρόπου σάρωσης, εξοικονομεί χρόνο επιτρέποντας την πραγματοποίηση ολοκληρωμένων αναλύσεων ελέγχου ακόμα και σε μία μόνο ανάλυση. Ακόμα, η υψηλή διακριτική ικανότητα (mass resolution) που διαθέτει, εξασφαλίζει την αποφυγή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, μειώνοντας έτσι την ανάγκη επανελέγχου των δειγμάτων.

Το προαιρετικό κελί συγκρούσεων (HCD) που διαθέτει, αποδίδει μια πρόσθετη λειτουργικότητα στο σύστημα παρέχοντας την δυνατότητα θραυσματοποίησης όλων των ιόντων (All Ion Fragmentation, AIF), επιτρέποντας έτσι την επιβεβαίωση της σύνθεσης της ένωσης και διατηρώντας ταυτόχρονα υψηλή διακριτική ικανότητα και υψηλή ευαισθησία. Επιπλέον, μαζί με το εκτεταμένο εύρος της περιοχής μαζών που φτάνει από 50 μέχρι 6000 m/z και με την προηγμένη επεξεργασία σήματος που διαθέτει, επιτρέπει στον αναλυτή μάζας Orbitrap να έχει μεγαλύτερη απόκριση στην ανίχνευση ιόντων, καθιστώντας την συνολική

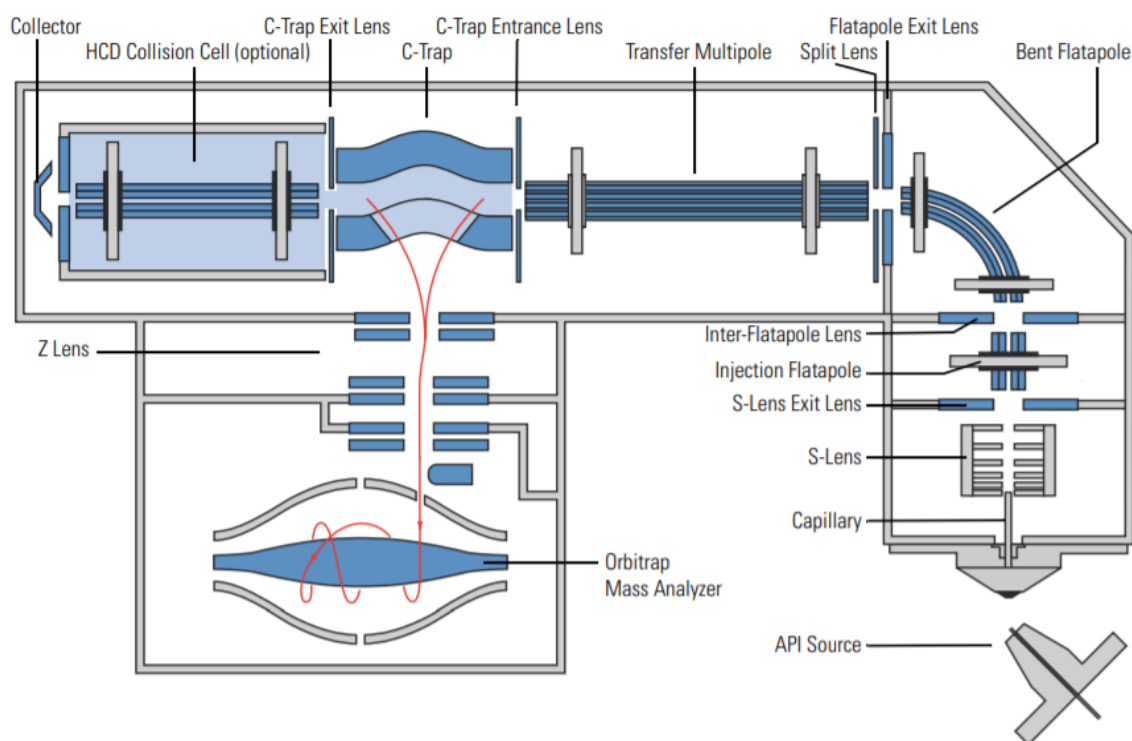
διάταξη ως ένα ιδανικό φασματοόμετρο μάζας για τη βιοφαρμακευτική αγορά, την ασφάλεια τροφίμων, τις περιβαλλοντικές αναλύσεις, την εγκληματική τοξικολογία, τις κλινικές έρευνες καθώς και για τις μελέτες μεταβολισμού φαρμάκων.(55)

Στην εικόνα 2.11, δίνεται η απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του Exactive Plus Orbitrap™, η οποία εν συντομία είναι η εξής:

Τα ιόντα που παράγονται από την πηγή API, συσσωρεύονται και οδηγούνται προς την C-παγίδα ιόντων (C-trap) όπου παγιδεύονται, καθώς ψύχονται και χάνουν την κινητική τους ενέργεια λόγω συγκρούσεων με το αέριο άζωτο που υπάρχει εκεί. Στη συνέχεια τα ιόντα συμπίεζονται σε ένα μικρό νέφος και εισέρχονται στον αναλυτή μάζας Orbitrap. Τα συμμετρικά αξονικά ηλεκτρόδια του Orbitrap δημιουργούν ένα ηλεκτροστατικό δυναμικό :

$$U(r,z) = \frac{k}{2} \times \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} \times (R_m)^2 \times \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C \quad (2.2)$$

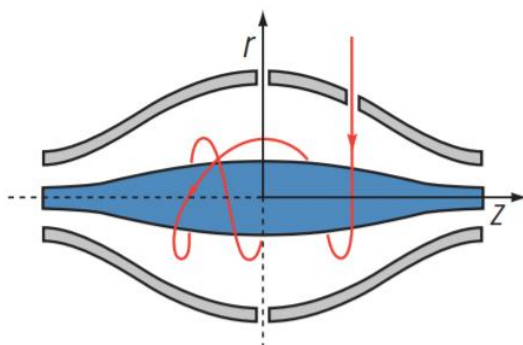
Όπου r και z είναι οι κυλινδρικές συντεταγμένες, k είναι η σταθερά που σχετίζεται με την καμπυλότητα του πεδίου και R_m είναι η χαρακτηριστική ακτίνα καμπυλότητας.



Εικόνα 2.8 Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του Exactive Plus Orbitrap™.(57)

Τα ιόντα πραγματοποιούν περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο (r, ϕ όπου ϕ η γωνιακή συντεταγμένη) ταυτόχρονα με ταλάντωση στην κατεύθυνση του άξονα z ,

όπως φαίνεται στην εικόνα 2.12. Η ταλάντωση θεωρείται αρμονική και είναι ανεξάρτητη από τις παραμέτρους r, ϕ της κίνησης των ιόντων.



Εικόνα 2.9 Απεικόνιση του τροχιακού αναλυτή μαζών Orbitrap.(58)

Τα ταλαντευόμενα ιόντα προκαλούν ένα ρεύμα το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί με έναν διαφοροποιημένο ενισχυτή. Τα ιόντα συγκεκριμένης μάζας, παράγουν ένα κυματικό σήμα, ενώ πολλά ιόντα διαφορετικής μάζας παράγουν ένα σύνθετο σήμα των οποίων οι συχνότητες προσδιορίζονται με μετασχηματισμούς Fourier. Ο λόγος m/z του κάθε ιόντος σχετίζεται άμεσα με την συχνότητα ταλάντωσης (ω) του ιόντος. Ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z διαφέρουν στην περιστροφή και την αξονική ταλάντωση με αποτέλεσμα να παράγουν σχετικά διαφοροποιημένα σήματα στον ενισχυτή. Η συχνότητα ταλάντωσης σχετίζεται με τον λόγο m/z με βάση την εξίσωση 2.3:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \quad (2.3)$$

όπου ω είναι η συχνότητα της ταλάντωσης, k η σταθερά του συστήματος και m/z ο λόγος μάζας προς φορτίο. Από τον υπολογισμό της συχνότητας ταλάντωσης (ω), προκύπτει ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας.

2.4.4 Ανιχνευτής Ιόντων

Ο ανιχνευτής συλλέγει τα διαχωριζόμενα ιόντα και παράγει ηλεκτρικό σήμα το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους που δέχεται στην χρονική μονάδα. Στη φασματομετρία μάζας κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα είδη ανιχνευτών όπως είναι τα φαρανταϊκά κύπελλα (faraday cup), οι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές (electron multipliers) και οι ανιχνευτές σπινθηρισμού. Στη σύγχρονη φασματομετρία μάζας οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές ιόντων είναι οι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές. Το συγκεκριμένο σύστημα ανίχνευσης ιόντων αποτελείται από γυάλινο ή μεταλλικό σωλήνα με μεταλλική

επίστρωση (π.χ. κράμα Cu/Be) που παρουσιάζει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Μόλις τα ιόντα του αναλύτη προσπέσουν σε μια τέτοια επιφάνεια προκαλούν εκπομπή ηλεκτρονίων τα οποία με τη σειρά τους χτυπούν την επόμενη επιφάνεια εκπέμποντας νέα ηλεκτρόνια, δημιουργώντας κατά αυτόν τον τρόπο μια αλυσιδωτή διαδικασία και επιτυγχάνεται ενίσχυση σήματος έως και 10^7 . Το σήμα αυτό στη συνέχεια απεικονίζεται ως φάσμα μάζας στην οθόνη του υπολογιστή που ελέγχει το όργανο.(59)

2.4.5 Σύστημα Κενού

Για τη διασφάλιση της ορθής λειτουργίας του φασματόμετρου μάζας, απαιτούμενη προϋπόθεση είναι το σύστημα να είναι συνεχώς υπό υψηλό κενό στην περιοχή 10^{-5} - 10^{-8} Torr (ή 1.3×10^{-5} - 1.3×10^{-8} mbar) ώστε να δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Στα περισσότερα φασματόμετρα μάζας το κενό δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού. Οποιαδήποτε διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα στο φασματόμετρο μάζας (π.χ. στην πηγή ιόντων), οδηγεί στη μείωση της παραγωγής των ιόντων του αναλύτη και στην εμφάνιση σημάτων που αντιστοιχούν στον ιοντισμό των συστατικών της ατμόσφαιρας.(48)

2.4.6 Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων (H/Y)

Ο H/Y χρησιμοποιείται για την βαθμονόμηση του φασματόμετρου μάζας, για την ταυτοποίηση των ιοντικών θραυσμάτων από την ακριβή τιμή m/z ή από τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών και με το κατάλληλο λογισμικό ο H/Y μπορεί από τα φασματικά δεδομένα να δώσει ενδείξεις στο χρήστη για την ταυτότητα της εξεταζόμενης ένωσης. Τέλος, ο H/Y μπορεί να διαθέτει βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας και μετά από σύγκριση των φασμάτων μάζας να αποφανθεί ως προς το αν το εξεταζόμενο φάσμα μπορεί να αποδοθεί σε μια ένωση ή σε ένα μίγμα ενώσεων καθώς και να τις προσδιορίσει ποιοτικά και ποσοτικά.(48)

2.5 Σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Τις τελευταίες δεκαετίες, στο χώρο της εργαστηριακής χημείας, για την προέκταση των ερευνών, τη βελτιστοποίηση στη μελέτη και την ανάλυση δειγμάτων, άρχισαν να χρησιμοποιούνται συζευγμένες τεχνικές, έτσι ώστε να συνδυάζονται οι δυνατότητες και τα πλεονεκτήματα τους με σκοπό τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη συζευγμένη τεχνική είναι η HPLC-MS, δηλαδή η σύζευξη χρωματογραφίας

υψηλής απόδοσης με τη φασματομετρία μαζών. Η τεχνική αυτή δίνει την δυνατότητα προσδιορισμού μη-πτητικών ενώσεων, θερμοευαίσθητων ενώσεων καθώς και την καθαρότητα χρωματογραφικής κορυφής με ταυτόχρονη ταυτοποίηση δομής αγνώστων ενώσεων. Συνεπώς, ο συνδυασμός των δύο παραπάνω τεχνικών επιτρέπει την εισαγωγή διαχωρισμένων ουσιών μίγματος στο φασματόμετρο μαζών, προσφέροντας αξιόπιστη ταυτοποίηση, ακόμα και εάν ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρης, διότι ουσίες με παρόμοιους χρόνους ανάσχεσης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών. Είναι λοιπόν προφανές, ότι ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας με την φασματομετρία μαζών επιτρέπει αρχικά τον διαχωρισμό των ουσιών μεταξύ τους βάσει του χρόνου ανάσχεσης και έπειτα την ταυτοποίησή τους, καθώς αυτές εισέρχονται διαχωρισμένες στο MS.

Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .

3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνονται: αναλυτικός ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, καταψύκτης (-40°C), υπερκατάψυξη (-80°C), αναδευτήρας Vortex (Velp Scientific), συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (IST VacMaster), συσκευή παραγωγής δις απεσταγμένου νερού ειδικής αντίστασης 17.8 MΩ/cm (Barnstead, EASYpure RF), ομογενοποιητής (Ultra-Turrax, IKA-Labortechnik), ομογενοποιητής υπερήχων (Sonopuls, HD 2070), λουτρό υπερήχων (Elma, S60 Elmasonic), συσκευή λυοφιλίωσης (Heto LyoLab 3000), φυγόκεντρος (Hermle Z 320), φυγόκεντρος (Centurion, Scientific Ltd) και ψυχόμενη φυγόκεντρος (Centurion Scientific K3 Series ή Eppendorf Centrifuge 5417C). Για την εξάτμιση και συμπύκνωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε οβίδα αερίου αζώτου και συμπυκνωτής κενού speed vacuum (Labconco).

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 2, 5, 100, 500 και 1000 mL, γυάλινος ογκομετρικός κύλινδρος των 5 και 100 mL, γυάλινο ογκομετρικό σιφώνιο των 5 mL, γυάλινες πιπέτες Pasteur, γυάλινες κωνικές φιάλες των 100, 250 και 500 mL, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 10 mL με μπλε βιδωτό πώμα, πλαστικά Eppendorf χωρητικότητας 1.5 mL, αυτόματα πιπέττα μεταβλητού όγκου 100-1000 µL (Eppendorf, Reference), tips, καθώς και γυάλινες σύριγγες των 10, 50, 250 και 1000 µL. Τα δείγματα για την ανάλυση στο LC-MS, τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (vials) των 1.5 mL (Thermo Scientific), και χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι υποδοχείς (inserts) των 150 και 250 µL. Επίσης για την διήθηση της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε χωνί Buchner και φίλτρα διήθησης (Membrane Filters, PVDF 0.45 µm, Teknokroma).

Κατά τη διεξαγωγή της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) χρησιμοποιήθηκαν στηλάκια Bond Elut Plexa, 60 mg/ 3 mL (Agilent).

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε σε υδροχρωματογραφικό σύστημα της σειράς DIONEX (UltiMate™ 3000 Rapid Separation UHPLC+), αποτελούμενο από μια αντλία δύο διαλυτών με ενσωματωμένο σύστημα απαέρωσης, θερμοστάτη στηλών, αυτόματο δειγματολήπτη. Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών (Thermo Scientific™) με αναλυτή μάζας

τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap) (Exactive Plus: Benchtop Full-Scan Orbitrap™ Mass Spectrometer). Το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι το XCalibur 4.1, Thermo Scientific.



Εικόνα 3.1. Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών Orbitrap (LC-MS), (Thermo Scientific™ Exactive Plus with Ultimate 3000 Rapid Separation LC System).

3.2 Πρότυπες ουσίες, αντιδραστήρια και διαλύτες.

3.2.1 Πρότυπες ουσίες

Για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού των πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικούς ιστούς, οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: (-) Επικατεχίνη, ($\pm$) Κατεχίνη, Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης, Γαλλικό Οξύ, Συριγγικό Οξύ, Νεοχλωρογενικό Οξύ, Χλωρογενικό Οξύ, 3,4 – Διϋδροξυβενζοϊκό Οξύ (ή πρωτοκατεχικό οξύ), 3,4 – Διϋδροξυφαιτυλοξικό Οξύ, Ομοβανιλική αλκόολη, Βανιλικό Οξύ, Ομοβανιλικό Οξύ, Καφεϊκό Οξύ, *p* – Υδροξυβενζοϊκό Οξύ, 2 – (4 – υδροξυφαιτυλο) Αιθανόλη (τυροσόλη), 3 – (4 – υδροξυφαιτυλο) Προπιονικό Οξύ, Ρουτίνη, *p* – Υδροξυφαιτυλοξικό Οξύ, Βανιλίνη, 3 – (4 – υδροξυφαιτυλο) – 1 – προπανόλη, Φερουλικό Οξύ, *o* – Κουμαρικό Οξύ, *p* – Κουμαρικό Οξύ, Σιναπικό Οξύ, Ελευρωπαΐνη, Λουτεολίνη, Καμπφερόλη, Κερκετίνη, *trans* – Κιναμμωμικό Οξύ, 4,5,7 – τριυδροξυϊσοφλαβανόνη (Ναρινγκενίνη), 4,5,7 – τριυδροξυϊσοφλαβόνη (Απιγενίνη), και 5,7 – διϋδροξυφλαβόνη (Χρυσίνη).

Για κάθε ένωση ζυγίστηκαν επακριβώς 5mg και διαλύθηκαν σε 5mL μεθανόλης χρωματογραφικής καθαρότητας (LC-MS grade) ώστε να παρασκευαστούν πρότυπα διαλύματα

συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας μείγματος των ενώσεων σε μεθανόλη, συγκεντρώσεων 20 mg/L, 10 mg/L και 1 mg/L.

3.2.2 Αντιδραστήρια και διαλύτες.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις χρωματογραφικές αναλύσεις ήταν ιδιαίτερα υψηλής καθαρότητας (LC-MS grade) και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής:

- Μεθανόλη (MeOH), καθαρότητας LC-MS, Fisher Chemical
- Νερό (H₂O), καθαρότητας LC-MS, Fisher Chemical
- Ακετονιτρίλιο (ACN), καθαρότητας LC-MS, Fisher Chemical

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Μυρμηκικό Οξύ (HCOOH), καθαρότητας 99+%, Chem-Lab NV
- Φωσφορικό Οξύ (H₃PO₄), καθαρότητας 85%, Chem-Lab NV

Επίσης, παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0.1%, διάλυμα ασκορβικού οξέος 1%, διάλυμα φωσφορικού οξέος 4% και διάλυμα H₂O/MeOH/H₃PO₄ (94:4.5:1.5 v/v/v).

Στη συνέχεια αναφέρεται ο τρόπος παρασκευής διαλυμάτων κατά την πορεία της εργασίας:

- Διαλύματα μυρμηκικού οξέος 1% και 0.1% (v/v). Παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα μυρμηκικού οξέος 1% (v/v). Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό διηθήθηκε υπό κενό με χρήση φίλτρου (Membrane Filters, PVDF 0.45 μm, Teknokroma) και φυλάχθηκε στους 4°C. Το μυρμηκικού οξέος 0.1% (v/v) προέκυψε από το εν λόγω διάλυμα με αραιώση.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Μία ταμπλέτα PBS (Gibco, Life Technologies™) διαλύθηκε σε 500mL δις απεσταγμένου νερού και φυλάχθηκε στο ψυγείο (4°C).
- Διάλυμα Ασκορβικού Οξέος 1% (w/v). Ζυγίστηκαν 0.1g ασκορβικού οξέος, τα οποία διαλύθηκαν σε 10mL δις απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα φωσφορικού οξέος 4% (v/v). Παραλήφθηκαν 4.7 mL πυκνού φωσφορικού οξέος και αραιώθηκαν με δις απεσταγμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL.

- Διάλυμα $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (94:4.5:1.5 v/v/v). Παρασκευάστηκαν 100 mL του συγκεκριμένου διαλύματος με ανάμειξη 94 mL H_2O (LC-MS grade), 4.5 mL MeOH (LC-MS grade) και 1.5 mL δ/τος H_3PO_4 4% (v/v).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ 32 ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΟΥ LC-MS

4.1 Εισαγωγή

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μεθόδου υγροχρωματογραφίας, με φασματομετρία μάζας (LC-MS) τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap), για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 32 πολικών φαινολικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα από επίμυες. Έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της μεθόδου προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα προκατεργασίας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε λήψη των φασμάτων μάζας για κάθε αναλύτη, βελτιστοποίηση των παραμέτρων ιοντισμού, βελτιστοποίηση της κινητής φάσης καθώς και της μεθόδου προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων.

Η μέθοδος στη συνέχεια, επικυρώθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας (σε συνθήκες επαναληψιμότητας) καθώς προσδιορίστηκαν και τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).

Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων σε δείγματα εγκεφάλου που προέρχονται από επίμυες οι οποίοι είχαν κατανωλώσει Κορινθιακή σταφίδα.

4.2 Βελτιστοποίηση παραμέτρων λήψης των φασμάτων μάζας (MS)

Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία λήψης των φασμάτων μάζας παίζει η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού για την παραγωγή ιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για την ανάλυση των πολικών φαινολικών ενώσεων επιλέχθηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) καθώς αυτή ήταν η μόνη διαθέσιμη στο συγκεκριμένο όργανο.

Για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων λήψης του φάσματος μάζας κάθε πολικής φαινολικής ένωσης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεως 10 και 1mg/L, με τα οποία έγινε απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο (infusion), έτσι ώστε να ληφθούν τα φάσματα μαζών για κάθε ένωση αλλά και να βρεθούν οι παράμετροι που αποδίδουν τη μέγιστη κατά το δυνατό απόκριση του οργάνου.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

- Η πολικότητα (positive/ negative ionization)
- Η θέση του ακροσωλήνιου ιοντισμού (probe)
- Η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού (spray voltage)
- Οι παροχές του αερίου εκνέφωσης N₂ (seath gas)
- Η θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τον κώνο εισόδου στο εσωτερικό του φασματομέτρου (capillary temperature)
- Η ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy)

Τα πειράματα διεξήχθησαν και στις δύο πολικότητες με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές για όλες τις παραπάνω παραμέτρους καθώς και τα αντίστοιχα μοριακά ιόντα για κάθε πολική φαινολική ένωση.

4.3 Επιλογή παραμέτρων υγρού χρωματογράφου υπερυψηλής πίεσης (UHPLC)

4.3.1 Επιλογή θετικού ή αρνητικού ιοντισμού ESI

Με την βελτιστοποίηση των παραμέτρων του φασματομέτρου μάζας, είναι απαραίτητος και ο προσδιορισμός του κατάλληλου χρωματογραφικού συστήματος, της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης και των παραμέτρων του χρωματογράφου (UHPLC), όπως η ροή της κινητής φάσης, το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης και ο όγκος έγχυσης δείγματος. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση με βάση το πρωτόκολλο των Qiu et al(60), στον αρνητικό και στο θετικό ιοντισμό. Στον πίνακα 4.1, φαίνονται τα μοριακά ιόντα καθώς και οι χρόνοι κατακράτησης για κάθε πολική φαινολική ένωση που βρέθηκαν ύστερα από χρωματογραφική ανάλυση στον αρνητικό και θετικό ιοντισμό. Όπως φαίνεται, η χρωματογραφική ανάλυση στον αρνητικό ιοντισμό έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και επιλέχθηκε για τη μελέτη.

Πίνακας 4.1: Μοριακά ιόντα και χρόνοι κατακράτησης για κάθε πολική ΦΕ στον αρνητικό και θετικό ιοντισμό.

ΕΝΩΣΗ	Μοριακός Τύπος	Αρνητικός Ιοντισμός		Θετικός Ιοντισμός	
		[M-H] ⁻	Retention Time	[M+H] ⁺	Retention Time
Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0407	30.21	287.0547	30.24
Καμπφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0405	32.06	287.0547	32.08
Ναρινγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0606	31.92	273.0752	31.91
Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0464	31.92	271.0598	31.94

Χρυσίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0506	34.57	255.0648	34.58
Σιναπικό οξύ	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0609	23.87	225.0760	23.84
Φερουλικό οξύ	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0500	24.18	-	
Ρουτίνη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ ·xH ₂ O	609.1475	22.2	611.1609	22.22
(±) Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0722	14.5	291.0864	14.11
(-) Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	289.0722	18.62	291.0864	18.44
Νεοχλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0884	11.07	355.1026	10.53
trans-Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0884	13.37	355.1026	12.96
Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	179.0340	18.21	181.0478	18.12
ο-Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163.0390	23.07	165.0681	23.01
ρ-Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163.0390	27.19	165.0681	26.16
Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	153.0181	11.5	n.d.	n.d.
Ελευρωπαΐνη	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1788	26.15	541.5402	26.84
Γαλλικό Οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169.0132	8.21	n.d.	n.d.
Φλωρετικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0548	21.96	n.d.	n.d.
ρ – υδροξυ-Φαιτυλοξικό Οξύ	C ₈ H ₈ O ₃	151.0390	17.01	n.d.	n.d.
Βανιλίνη	C ₈ H ₈ O ₃	151.0390	18.3	n.d.	n.d.
3-(4-υδροξυφαιτυλο)-1-Προπανόλη	C ₉ H ₁₂ O ₂	151.0389	22.9	n.d.	n.d.
Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0358	30.49	303.0500	30.49
Συριγγικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0449	18.37	n.d.	n.d.
3,4 – Διυδροξυφαιτυλοξικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	167.0341	12.29	n.d.	n.d.
Ομοβανιλλική αλκοόλη	C ₉ H ₁₂ O ₃	167.0341	17.92	n.d.	n.d.
Βανιλλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	167.0341	23.34	n.d.	n.d.
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0497	19.06	n.d.	n.d.
ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ/ Τυροσόλη	C ₇ H ₆ O ₃ / C ₈ H ₁₀ O ₂	137.0231	15.81	139.0390	n.d.
Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	457.0790	19.51	457.1074	26.15
trans-Κιναμμωμικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₂	147.0439	31.36	149.0400	n.d.

4.3.2 Επιλογή παραμέτρων χρωματογραφικής ανάλυσης

Η χρωματογραφική ανάλυση έλαβε χώρα με βάση το πρωτόκολλο των Qiu et al (60), με τροποποιήσεις. Η ανάλυση έγινε σε στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8μm, 4.6 x 100mm, Agilent), υπό βαθμωτή έκλουση όπως φαίνεται στον πίνακα 4.2 χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα υδατικού διαλύματος HCOOH (0.1% v/v) και ACN με ροή 0.3 mL/min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10μL.

Πίνακας 4.2: Πρόγραμμα Βαθμωτής έκλουσης για τις πολικές ΦΕ.

Χρόνος (min)	% HCOOH (0.1%v/v)	% ACN
0	95	5
6	75	15
12	75	15

25	62	38
30	30	70
35	10	90
40	95	5

4.4 Επιλογή μεθόδου προκατεργασίας για τον προσδιορισμό πολικών ΦΕ σε βιολογικά δείγματα

Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προκατεργασίας του δείγματος κατ' αρχήν πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων. Παρατηρήθηκε ότι η συνηθέστερη μέθοδος ήταν η λυοφιλοποίηση των βιολογικών δειγμάτων και πιο συγκεκριμένα των ιστών όπως εγκέφαλος, ήπαρ, κ.α, χρησιμοποιώντας εκχύλιση στερεάς φάσης για τον καθαρισμό και την ταυτόχρονη προσυγκέντρωση του δείγματος. Ωστόσο, επειδή υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές όπου στις μεθόδους προκατεργασίας χρησιμοποιήθηκε νωπός παγωμένος ιστός, πραγματοποιήθηκαν πρώτα δοκιμές με νωπό ιστό και στη συνέχεια με λυοφιλοποιημένους ιστούς και επομένως, στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων.

4.4.1 Πρωτόκολλα προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων

4.4.1.1 Πρωτόκολλο προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων χωρίς λυοφιλίωση

Βασιζόμενοι στην μέθοδο προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων που εφάρμοσαν οι Li T-x et al (61), και αφού έγιναν τροποποιήσεις, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εγκεφάλου και ήπατος από επίμυες, ακολουθώντας την εξής πειραματική πορεία:

1. Ζυγίστηκαν ~500 mg παγωμένου νωπού ιστού σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα.
2. Προστέθηκε PBS (250 mg ιστού/ mL)
3. Έγινε ομογενοποίηση στο Ultra-Turrax και ακολούθως με υπερήχους στο Sonopulser.
4. Φυγοκέντρωση (3000 rpm, 10 min) και παραλαβή του υπερκλειμένου το οποίο υποδιαιρέθηκε σε μικρότερες ποσότητες (aliquots) των 400μL σε σωληνες erpendorf. Έπειτα, όλα τα δείγματα εμβολιάστηκαν (spiked) με πρότυπο διάλυμα μείγματος των αναλυτών, έτσι ώστε να έχουν συγκέντρωση 10ppm.
5. Ακολούθησε εξάτμιση σε άζωτο και ανάδευση με Vortex.

6. Έγινε φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (12000 rpm, 5min, 4°C) και αμέσως μετά το υπερκείμενο υπέστη εκχύλιση στερεάς φάσεως (στηλάκια Agilent, Bond Elut Plexa, 60mg, 3mL). Η πορεία που ακολουθήθηκε για το SPE ήταν η εξής:
- Ενεργοποίηση των στηλών, πρώτα προσθέτοντας 1.5mL MeOH (LC-MS) και ύστερα 1.5mL 0.1% HCOOH.
 - Εναπόθεση του προς ανάλυση δείγματος στη στήλη.
 - Έκπλυση με HCOOH (0.1% v/v, 2mL).
 - Παραλαβή των φαινολικών με MeOH (2mL, LC-MS).
7. Τέλος, έγινε συμπύκνωση στο speedvac (42min, 42°C) σχεδόν επί ξηρού και έπειτα έγινε αναδιάλυση με 400 µL MeOH (LC-MS).

4.4.1.2 Πρωτόκολλο προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων με λυοφιλίωση.

Βασιζόμενοι στην μέθοδο προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων που εφάρμοσαν οι Serra et al (62), και αφού έγιναν τροποποιήσεις, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εγκεφάλου, καρδιάς και ήπατος από επίμυες, ακολουθώντας την εξής πειραματική πορεία:

- Οι ιστοί υπέστησαν λυοφιλίωση για 72 hrs.
- Ζυγίστηκαν ~60 mg λυοφυλιωμένου ιστού σε eppendorf.
- Σε κάθε eppendorf, προστέθηκαν:
 - 50 µL ασκορβικού οξέος 1%
 - 100µL H₃PO₄ 4%
 - 400µL H₂O/MeOH/H₃PO₄ (94:4.5:1.5 v/v/v)
- Ακολούθησε ανάδευση στο Vortex για 30sec, και τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων για 10min.
- Αμέσως μετά έγινε φυγοκέντρωση (12000 , 10min) και παραλήφθηκε το υπερκείμενο.
- Τα βήματα 3.iii) έως και 5 έγιναν συνολικά 4 φορές (δλδ 4 εκχυλίσεις). Τα εκχυλίσματα συνδυάστηκαν μαζί και εμβολιάστηκαν (spiked) με πρότυπο διάλυμα μείγματος των αναλυτών, έτσι ώστε να έχουν συγκέντρωση 5 και 0.1 ppm. Παράλληλα αναλύθηκε τυφλό (Blank) δείγμα (χωρίς εμβολιασμό).
- Στη συνέχεια το συνολικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε στο speedvac (42°C, 70 min) για να εξατμιστεί η MeOH και ακολούθησε SPE (στηλάκια Agilent, Bond Elut Plexa, 60mg, 3mL) σύμφωνα με την πορεία που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.4.1.1.

8. Τα εκλούσματα που παραλήφθηκαν συμπυκνώθηκαν και έγινε αναδιάλυση σε 400 ή 200 μL MeOH-H₂O (1:1).

Επιπλέον, για τους ιστούς που υπέστησαν λυοφιλίωση, όπως φαίνεται και στον πίνακα __, προσδιορίστηκε και η % υγρασία που περιείχαν, με βάση την εξίσωση:

$$\% \text{ υγρασία} = \frac{m_{\text{νυπού ιστού}}}{m_{\text{λυοφιλοποιημένου ιστού}}} \times 100 \quad (\text{Σχέση 4.1})$$

4.4.2 Προσδιορισμός της % σχετικής ανάκτησης

Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της % σχετικής ανάκτησης (% Recovery, %R) των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι:

$$\%R = \frac{\text{Εμβαδό κορυφής εμβολιασμένου δείγματος (spike)}}{\text{Εμβαδό κορυφής προτύπου}} \times 100 \quad (\text{Σχέση 4.2})$$

4.5 Επικύρωση μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου αναφέρεται στην επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι η μέθοδος ικανοποιεί τις ιδιαίτερες απαιτήσεις για τη συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση. Προσδιορίστηκαν η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης, η επαναληψιμότητα της μεθόδου, καθώς και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD).

4.5.1 Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης

Στην παρούσα εργασία κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπα μείγματα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε διαλύτη MeOH-H₂O (1:1) για το εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 0.001 mg/L. Η δυναμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης επιλέχθηκε ξεχωριστά για κάθε ένωση. Σε κάθε περίπτωση προσδιορίστηκε η ευθεία παλινδρόμησης ($y = ax + b$) με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων

4.5.2 Πιστότητα και επαναληψιμότητα μεθόδου

Η πιστότητα συχνά ορίζεται ως η τυπική απόκλιση (STDEV) ή ως η εκατοστιαία σχετική απόκλιση (%RSD) μιας σειράς μετρήσεων. Συγκεκριμένα, για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας της μεθόδου, παρασκευάστηκε μείγμα των πρότυπων διαλυμάτων των πολικών φαινολικών ενώσεων σε διαλύτη MeOH-H₂O (1:1) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις για

κάθε ένωση και έγινε υπολογισμός της τυπικής απόκλισης (STDEV), της εκατοστιαίας τυπικής απόκλισης (%RSD) και του μέσου όρου (average) των τιμών εμβαδού κορυφής (peak areas).

4.5.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) μεθόδου

Ο υπολογισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης στην παρούσα εργασία έγινε χρησιμοποιώντας τους παρακάτω τύπους :

$$LOD=3.3*STDEV \quad (\text{Σχέση 4.3}) \quad \text{και} \quad LOQ=10*STDEV \quad (\text{Σχέση 4.4})$$

όπου STDEV : τυπική απόκλιση

Ο υπολογισμός της τυπικής απόκλισης (STDEV) έγινε από τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας που περιγράφεται στο τμήμα 4.5.2.

4.5.4 Μελέτη φαινομένου επίδρασης μήτρας (Matrix Effect)

Ο παράγοντας μήτρας (matrix factor, MF) είναι μια τιμή που μας επιτρέπει να κάνουμε μια εκτίμηση για το φαινόμενο επίδρασης μήτρας, δηλαδή πόσο επηρεάζει η μήτρα την καταστολή του σήματος (ion suppression) ή τον εμπλουτισμό του (ion enhancement). Όταν ο παράγοντας μήτρας είναι μεγαλύτερος της μονάδας υποδηλώνει ενίσχυση σήματος, ενώ όταν είναι μικρότερος της μονάδας υποδηλώνει καταστολή σήματος.

Η τιμή του παράγοντα επίδρασης μήτρας (MF) δίνεται από τη σχέση :

$$\text{Παράγοντας υποστρώματος (MF)} = \frac{\text{Απόκριση παρουσία μήτρας}}{\text{Απόκριση απουσία μήτρας}} \quad (\text{Σχέση 4.5})$$

Αντίστοιχα η σχέση που μας δίνει τον υπολογισμό της επίδρασης του υποστρώματος (ME) προκύπτει από τη σχέση:

$$\% \text{ Επίδραση Υποστρώματος (ME)} = [(MF-1)] * 100 \quad (\text{Σχέση 4.6})$$

4.6 Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίμυες που είχαν λάβει συνήθη δίαιτα ή δίαιτα εμπλουτισμένη με Κορινθιακή σταφίδα. Η ανάλυση έλαβε χώρα σε εγκεφάλους επίμυων. Όλα τα δείγματα εγκεφάλου που αναλύθηκαν ήταν χωρισμένα στα επιμέρους τμήματα: εγκεφαλικός φλοιός (cortex), παρεγκεφαλίδα (cerebellum), υπόκαμπος (hippocampus),

μεσεγκέφαλος (mesencephalon) και ραβδωτό σώμα (striatum). Επί συνόλου αναλύθηκαν 5 δείγματα εγκεφάλου επίμυων (Rat 1 -5).

Για το Rat 1 ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο προκατεργασίας χωρίς λυοφιλίωση ενώ για τα Rat 2, 3, 4 και 5, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο προκατεργασίας με λυοφιλίωση, όπως περιγράφονται στα τμήματα 4.4.1.1 και 4.4.1.2 αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Μοριακά ιόντα και βελτιστοποίηση των παραμέτρων λήψης των φασμάτων μάζας

Τα πειράματα διεξήχθησαν στον αρνητικό και θετικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων λήψης του φάσματος μάζας έγινε απευθείας έγχυση στο φασματόμετρο (infusion) και οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για το σύνολο των πολικών φαινολών της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 5.1. Επιπλέον, εγχύθηκαν μείγματα των πρότυπων διαλυμάτων συγκεντρώσεως 10 και 1 mg/L και λήφθηκαν τα αντίστοιχα φάσματα.

Πίνακας 5.1: Παράμετροι φασματόμετρου μάζας (Full MS) που επιλέχθηκαν μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών λήψης των φασμάτων μάζας.

Παράμετροι	Επιλεγμένες τιμές	Επιλεγμένες τιμές
Πολικότητα (polarity)	Αρνητικός Ιοντισμός	Θετικός Ιοντισμός
Διαχωριστική ικανότητα (Resolution)	70.000	70.000
Εύρος σάρωσης (Scan range, m/z)	100 – 1500	150 – 2000
Θέση ακροσωλήνιου ιοντισμού (probe)	B	A
Δυναμικό (spray voltage, kV)	3.00	3.0
Αέριο εκνέφωσης N ₂ (seath gas)	12.00	12.00
Αέριο ξήρανσης N ₂ (auxiliary gas)	0.00	0.00
S-lens RF level	70.00	70.00
Θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τον κώνο εισόδου στο εσωτερικό του φασματόμετρου (ion transfer capillary temperature, °C)	280	280

Η αντίστοιχη διαδικασία έλαβε χώρα στο θετικό ιοντισμό. Από σύγκριση των φασμάτων παρατηρήθηκε ισχυρότερο σήμα των μοριακών ιόντων της κάθε πολικής φαινολικής ένωσης στον αρνητικό ιοντισμό, ο οποίος και επιλέχθηκε για τη μελέτη. Στη συνέχεια για κάθε ένωση προσδιορίστηκε το μοριακό ιόν στον αρνητικό ιοντισμό.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 5.2 όπου φαίνονται τα μοριακά ιόντα των ενώσεων που αποκρίνονται στον αρνητικό ιοντισμό που μελετήθηκαν σε θεωρητικό επίπεδο κάνοντας αναζήτηση σε διαδικτυακή βάση δεδομένων (63) και υπό τις συνθήκες της μελέτης. Αντίστοιχα στον πίνακα 5.3 φαίνονται τα μοριακά ιόντα των ενώσεων που αποκρίνονται στον θετικό ιοντισμό.

Πίνακας 5.2: Μοριακά ιόντα ([M-H]⁻) των πολικών ΦΕ που αποκρίνονται στον αρνητικό ιοντισμό υπό εφαρμοζόμενη τάση 3.00 kV.

ΕΝΩΣΗ	Μοριακός Τύπος	Θεωρητικό [M-H] ⁻	Πειραματικό [M-H] ⁻
Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0405	285.0407
Καμπφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0405	285.0405
Ναρινγκενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0612	271.0606
Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455	269.0464
Χρυσίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0506	253.0506
Σιναπικό οξύ	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0612	223.0609
Φερουλικό οξύ	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0506	193.0500
Ρουτίνη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ ·xH ₂ O	609.1461	609.1475
(±) Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0863	289.0722
(-) Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	289.0717	289.0722
Νεοχλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	353.0884
trans-Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.0878	353.0884
Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	179.0349	179.0340
p -Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163.0401	163.0390
ο -Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163.0401	163.0390
Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	153.0193	153.0181
Ελευρωπαΐνη	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.518	539.1788
Γαλλικό Οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169.0143	169.0132
Φλωρετικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0557	165.0548
p – υδροξυφαινοξικό Οξύ	C ₈ H ₈ O ₃	151.0401	151.0390
Βανιλίνη	C ₈ H ₈ O ₃	151.0401	151.0390
3 – (4 – υδροξυφαινοξικό) – 1 – προπανόλη	C ₉ H ₁₂ O ₂	151.084	151.0389
Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0354	301.0358
Συριγγικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0456	197.0449
3,4 – Διϋδροξυφαινοξικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	167.0350	167.0341
Ομοβανιλική αλκοόλη	C ₉ H ₁₂ O ₃	167.192	167.0341
Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	167.0350	167.0341
Ομοβανιλικό οξύ (HVA)	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0506	181.0497
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	137.0244	137.0231
Τυροσόλη	C ₈ H ₁₀ O ₂	137.0681	137.0231
(-) Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	457.0776	457.0790
trans-Κιναμμωμικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₂	147.0452	147.0439

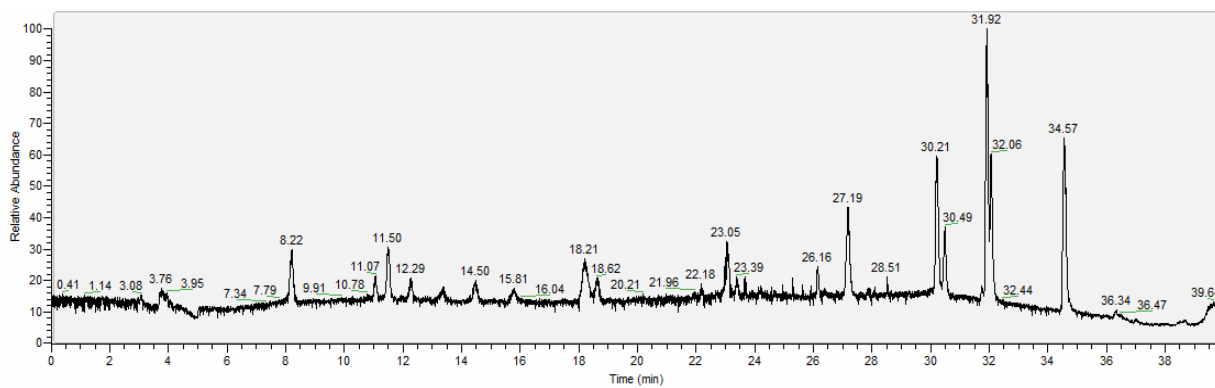
Πίνακας 5.3: Μοριακά ιόντα ($[M+H]^+$) των πολικών ΦΕ που αποκρίνονται στον θετικό ιοντισμό υπό εφαρμοζόμενη τάση 3.00 kV.

ΕΝΩΣΗ	Μοριακός Τύπος	Θεωρητικό $[M+H]^+$	Πειραματικό $[M+H]^+$
Λουτεολίνη	$C_{15}H_{10}O_6$	287.0550	287.0547
Καμπφερόλη	$C_{15}H_{10}O_6$	287.0550	287.0547
Ναρινγκενίνη	$C_{15}H_{12}O_5$	273.0757	273.0752
Απιγενίνη	$C_{15}H_{10}O_5$	271.0601	271.0598
Χρυσίνη	$C_{15}H_{10}O_4$	255.0651	255.0648
Σιναπικό οξύ	$C_{11}H_{12}O_5$	225.0757	225.0760
Ρουτίνη	$C_{27}H_{30}O_{16} \cdot xH_2O$	611.1606	611.1609
(±) Κατεχίνη	$C_{15}H_{14}O_6$	291.0863	291.0864
(-) Επικατεχίνη	$C_{15}H_{10}O_6$	291.0863	291.0864
Νεοχλωρογενικό οξύ	$C_{16}H_{18}O_9$	355.1024	355.1026
trans-Χλωρογενικό οξύ	$C_{16}H_{18}O_9$	355.1024	355.1026
Καφεϊκό οξύ	$C_9H_8O_4$	181.0495	181.0478
p -Κουμαρικό οξύ	$C_9H_8O_3$	165.0546	165.0681
o -Κουμαρικό οξύ	$C_9H_8O_3$	165.0546	165.0681
Ελευρωπαΐνη	$C_{25}H_{32}O_{13}$	541.5401	541.5402
Κερκετίνη	$C_{15}H_{10}O_7$	303.0499	303.0500
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	$C_7H_6O_3$	139.0389	139.0390
Τυροσόλη	$C_8H_{10}O_2$	139.0389	139.0390

5.2 Παράμετροι μεθόδου υγρής χρωματογραφίας (UHPLC)

5.2. Χρωματογραφική ανάλυση

Με βάση τη μεθοδολογία και τις παραμέτρους που περιεγράφηκαν στο τμήμα 4.3.3 πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφική ανάλυση. Ενδεικτικό χρωματογράφημα από την ανάλυση μείγματος πρότυπων διαλυμάτων των 32 πολικών ΦΕ συγκέντρωσης 5 mg/L, που βασίζεται σε αυτές τις παραμέτρους, παρατίθεται στην εικόνα 5.1. Επιπλέον, στον πίνακα 5.4, παρατίθενται οι χρόνοι κατακράτησης κάθε πολικής φαινολικής ένωσης.



Εικόνα 5.1 Χρωματογράφημα μείγματος πρότυπων διαλυμάτων 32 πολικών ΦΕ συγκέντρωσης 5 mg/L, σε διαλύτη MeOH-H₂O (1:1), στον αρνητικό ιοντισμό, χρησιμοποιώντας ως χρωματογραφική στήλη την Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8μm, 4.6 x 100mm, Agilent). Οι ενώσεις που αντιστοιχούν στους χρόνους κατακράτησης του χρωματογραφήματος φαίνονται στον πίνακα 5.4.

5.3 Επικύρωση μεθόδου

5.3.1 Γραμμικότητα

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των πολλαπλών εξωτερικών προτύπων (multiple external standards), κατασκευάστηκε για κάθε πρότυπη ένωση ξεχωριστά καμπύλη αναφοράς και προσδιορίστηκε η ευθεία παλινδρόμησης καθώς και ο συντελεστής R². Κάθε εξίσωση προέκυψε από την ανάλυση των δειγμάτων σε 5 - 7 επίπεδα συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4: Εξίσωση ευθείας παλινδρόμησης, συντελεστής συσχέτισης και περιοχή γραμμικότητας προτύπων πολικών φαινολών σε διαλύτη MeOH-H₂O (1:1).

Ένωση	RT (min)	Καμπύλη αναφοράς	R ²	Περιοχή γραμμικότητας (mg/L)
Γαλλικό Οξύ	8.21	$y = 345509772x - 32295412$	0.9972	0.02 - 5
Νεοχλωρογενικό οξύ	11.07	$y = 102981238x - 9396627$	0.9953	0.01 - 5
trans-Χλωρογενικό οξύ	13.37	$y = 80462835x + 194622$	0.9972	0.01 - 5
(±) Κατεχίνη	14.58	$y = 119945765x - 545805$	0.9999	0.05 - 5
(-) Επικατεχίνη	18.62	$y = 110836468x - 2172806$	0.9992	0.05 - 5
Καφεϊκό οξύ	18.21	$y = 419838353x - 7666971$	0.9989	0.01 - 5
Συριγγικό οξύ	18.37	$y = 5736807x + 3348576$	0.9975	0.1 - 5
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	19.06	$y = 2196168x + 4754767$	0.9982	1 - 5
Γαλλικό εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	19.51	$y = 5980679x - 11316712$	0.997	2 - 5
Σιναπικό οξύ	23.87	$y = 13272369x - 165736$	0.9969	0.05 - 5
Φερουλικό οξύ	24.18	$y = 27744284x - 1536966$	0.9916	0.05 - 5
Ένυδρη ρουτίνη	22.2	$y = 28802485x + 702791$	0.9935	0.01 - 5
p -Κουμαρικό οξύ	23.07	$y = 245922001x - 398481$	0.9992	0.001 - 5
o -Κουμαρικό οξύ	27.19	$y = 370033075x - 4782427$	0.9996	0.01 - 5
Λουτεολίνη	30.21	$y = 667040127x$	0.9737	0.001 - 5
Καμπφερόλη	32.06	$y = 726020221x$	0.9984	0.001 - 5
Ναρινγκενίνη	31.92	$y = 629391334x$	0.9958	0.001 - 5
Απιγενίνη	31.92	$y = 519266039x$	0.992	0.001 - 5
Χρυσίνη	34.57	$y = 958432762x$	0.9929	0.001 - 5
Πρωτοκατεχικό οξύ	11.5	$y = 258509753x$	0.9981	0.01 - 5
Ελευρωπαΐνη	26.15	$y = 96680629x - 1982975$	0.9965	0.01 - 5
Φλωρετικό οξύ	21.96	$y = 6307393x + 403417$	0.999	0.2 - 5
3 – (4 – υδροξυφαινυλο) – 1 – προπανόλη	22.91	$y = 22981450x - 1295279$	0.9994	0.1 - 5

Κερκετίνη	30.49	$y = 241472366x + 4715166$	0.9997	0.02 - 5
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ/ Τυροσόλη	15.81	$y = 157341187x + 5970629$	0.9999	0.01 - 5
3,4 – Διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ	12.28	$y = 13963761x + 1785863.4542$	0.943	0.02 - 5
Ομοβανιλλική αλκοόλη	17.93	$y = 7954382x - 1901227$	0.999	0.02 - 5
Βανιλλικό οξύ	23.33	$y = 11982791x + 1136327$	0.9998	0.02 - 5
trans-Κινναμωμικό οξύ	31.36	$y = 5013877x + 238280$	0.9914	1 - 5

5.3.2 Επαναληψιμότητα

Για την επαναληψιμότητα της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν μείγματα των πρότυπων διαλυμάτων των πολικών φαινολών σε διαλύτη MeOH-H₂O (1:1). Η συγκέντρωση για κάθε ένωση στο μείγμα ήταν διαφορετική και αντιστοιχεί στη δυναμική περιοχή της καμπύλης βαθμονόμησης που επιλέχθηκε ξεχωριστά για κάθε ένωση. Η εκατοστιαία τυπική απόκλιση (%RSD) που υπολογίστηκε για κάθε ένωση φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.5: Επαναληψιμότητα πρότυπων διαλυμάτων πολικών ΦΕ σε διαλύτη MeOH-H₂O (1:1).

Ένωση	C (mg/L)	%RSD
Λουτεολίνη	0.0025	1.55
Καμπφερόλη	0.0025	0.83
Ναρινγκενίνη	0.0025	0.69
Απιγενίνη	0.0025	2.31
Χρυσίνη	0.0025	1.18
Σιναπικό οξύ	0.05	4.11
Φερουλικό οξύ	0.05	0.39
Ένυδρη ρουτίνη	0.05	2.47
Κατεχίνη	0.05	1.98
Επικατεχίνη	0.05	11.65
Νεοχλωρογενικό οξύ	0.05	1.53
trans-Χλωρογενικό οξύ	0.05	2.43
Καφεϊκό οξύ	0.05	2.20
p- Κουμαρικό οξύ	0.01	1.50
o -Κουμαρικό οξύ	0.01	0.60
Πρωτοκατεχικό Οξύ	0.01	0.75
Ελευρωπαΐνη	0.01	9.82
Γαλλικό οξύ	0.1	1.30
Φλωρετικό οξύ	0.2	2.61
3 – (4 – υδροξυφαινυλο) – 1 – προπανόλη	0.2	21.18

Κερκετίνη	0.1	4.73
Συριγγικό οξύ	1	0.74
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	1	21.38
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ/Τυροσόλη	1	4.03
Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	2	25.68

5.3.3 Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που υπολογίστηκαν φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.6: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των πολικών ΦΕ (mg/L).

Ένωση	LOD	LOQ
Λουτεολίνη	0.0002	0.0007
Καμπφερόλη	0.0001	0.0003
Ναρινγκενίνη	0.0001	0.0003
Απιγενίνη	0.0004	0.0011
Χρυσίνη	0.0002	0.0006
Σιναπικό οξύ	0.0067	0.0204
Φερουλικό οξύ	0.0004	0.0013
Ένυδρη ρουτίνη	0.0038	0.0116
Κατεχίνη	0.0028	0.0085
Επικατεχίνη	0.0105	0.0319
Νεοχλωρογενικό οξύ	0.0005	0.0014
trans-Χλωρογενικό οξύ	0.0018	0.0056
Καφεϊκό οξύ	0.0022	0.0066
p- Κουμαρικό οξύ	0.0005	0.0015
o-Κουμαρικό οξύ	0.0002	0.0005
Πρωτοκατεχικό Οξύ	0.0003	0.0008
Ελευρωπαΐνη	0.0027	0.0083
Γαλλικό οξύ	0.0024	0.0073
Φλωρετικό οξύ	0.0205	0.0622
3 – (4 – υδροξυφαινυλο) – 1 – προπανόλη	0.0908	0.2752
Κερκετίνη	0.0133	0.0402
Συριγγικό οξύ	0.0377	0.1144
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	2.6818	8.1266
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ/Τυροσόλη	0.1736	0.5260
Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	0.0732	0.2218

5.4 Μέθοδοι προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων.

5.4.1 Υγρασία (%) των ιστών

Υπολογίστηκε η % υγρασία των ιστών που υπέστησαν λυοφιλίωση όπως περιεγράφηκε στο τμήμα 4.4.1.

Πίνακας 5.7: % Υγρασία των ιστών μέσω λυοφιλίωσης

Είδος ιστού	Brain 1R	Brain 2R	Liver 1	Heart 1
% υγρασία	76.8%	77.3%	67.3%	60.6%

5.4.2 Σχετικές ανακτήσεις (%R)

Ακολουθώντας τα δύο διαφορετικά πρωτόκολλα προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που δείχνουν τις % σχετικές ανακτήσεις για κάθε μια πολική φαινολική ένωση (πίνακας 5.8 και 5.9 αντίστοιχα).

Πίνακας 5.8: Σχετική ανάκτηση πολικών φαινολικών ενώσεων (%) από ιστούς μετά από λυοφιλίωση.

Είδος ιστού	Προκατεργασία με λυοφιλίωση			
	Εγκέφαλος	Εγκέφαλος	Ήπαρ	Καρδιά
Συγκέντρωση ΦΕ	5 mg/L	0.1 mg/L	5 mg/L	0.1 mg/L
Ένωση	% R (Ανάκτηση)	% R (Ανάκτηση)	% R (Ανάκτηση)	% R (Ανάκτηση)
Λουτεολίνη	30	10	10	1
Καμπφερόλη	26	5	1	0.5
Ναρινγκενίνη	51	27	25	21
Απιγενίνη	59	25	37	30
Χρυσίνη	24	27	20	26
Συναπικό οξύ	19	15	1	nd
Φερουλικό οξύ	28	20	9	nd
Ρουτίνη	60	13	11	nd
Κατεχίνη	28	8	3	nd
Επικατεχίνη	21	nd	nd	nd
Νεοχλωρογενικό οξύ	25	13	3	nd
trans-Χλωρογενικό οξύ	53	11	2	nd
Καφεϊκό οξύ	77	12	7	10
p- Κουμαρικό οξύ	36	12	10	4
o-Κουμαρικό οξύ	64	22	22	22
Πρωτοκατεχικό Οξύ	106	24	39	nd
Ελευρωπαΐνη	53	28	4	nd
Γαλλικό οξύ	nd	42	nd	nd
Φλωρετικό οξύ	nd	nd	14	nd
p – υδροξυφαιτυλοξικό Οξύ	nd	nd	nd	nd
Βανιλίνη	nd	nd	nd	nd
3 – (4 – υδροξυφαιτυλο) – 1 – προπανόλη	32	nd	21	nd

Κερκετίνη	19	nd	2	nd
Συριγγικό οξύ	nd	55	nd	nd
3,4 – Διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ	nd	nd	1	nd
Ομοβανιλλική αλκοόλη	nd	nd	3	nd
Βανιλλικό οξύ	nd	7	2	nd
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	nd	nd	nd	nd
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ/ Τυροσόλη	46	22	46	0
Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	nd	nd	nd	nd
trans-Κιναμμωμικό οξύ	nd	nd	nd	nd

Πίνακας 5.9: Σχετική ανάκτηση πολικών φαινολικών ενώσεων (%) από νωπούς ιστούς

Προκατεργασία χωρίς λυοφιλίωση		
Είδος ιστού	Ήπαρ	Εγκέφαλος
Συγκέντρωση ΦΕ	10 mg/L	10 mg/L
Ένωση	% R (Ανάκτηση)	% R (Ανάκτηση)
Λουτεολίνη	18	61
Καμπφερόλη	14	57
Ναρινγενίνη	16	43
Απιγενίνη	17	71
Χρυσίνη	14	47
Σιναπικό οξύ	22	18
Φερουλικό οξύ	25	15
Ένυδρη ρουτίνη	39	85
Κατεχίνη	11	16
Επικατεχίνη	11	16
Νεοχλωρογενικό οξύ	18	5
trans-Χλωρογενικό οξύ	32	13
Καφεϊκό οξύ	25	11
p- Κουμαρικό οξύ	52	19
o-Κουμαρικό οξύ	54	28
Πρωτοκατεχικό Οξύ	3	7
Ελευρωπαΐνη	33	62
Γαλλικό οξύ	1	1
Φλωρετικό οξύ	27	nd
p – υδροξυφαινυλοξικό Οξύ	1	nd
Βανιλίνη	1	nd
3 – (4 – υδροξυφαινυλο) – 1 – προπανόλη	1	47
Κερκετίνη	18	79
Συριγγικό οξύ	22	nd
3,4 – Διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ	3	7
Ομοβανιλλική αλκοόλη	13	7
Βανιλλικό οξύ	1	8
Ομοβανιλλικό οξύ (HVA)	nd	nd
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ/Τυροσόλη	15	7
Γαλλικός εστέρας Επιγαλλοκατεχίνης	nd	nd
trans-Κιναμμωμικό οξύ	30	nd

5.4.3 Επίδραση μήτρας

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τους χρόνους κατακράτησης (RT, min), την επίδραση μήτρας (Matrix Effect, ME%) καθώς και τον συντελεστή επίδρασης μήτρας (Matrix Factor, MF%) για κάθε ένωση σε δείγμα εγκεφάλου από επίμου.

Πίνακας 5.10: Χρόνος ανάσχεσης (RT, min), συντελεστής επίδρασης μήτρας (Matrix Factor, MF%) και επίδραση μήτρας (Matrix Effect, ME %) για κάθε πολική φαινολική ένωση.

Ένωση	Χρόνος ανάσχεσης (RT, min)	Συντελεστής επίδρασης μήτρας (Matrix Factor, MF%)	Επίδραση μήτρας (Matrix Effect, ME %)
Λουτεολίνη	30.21	0.6	-37.3
Καμπφερόλη	32.06	0.9	-4
Ναρινγκενίνη	31.88	0.8	-21.8
Απιγενίνη	31.92	0.9	-3.4
Χρυσίνη	34.55	0.3	-66.8
Σιναπικό οξύ	23.85	0.7	-33
Φερουλικό οξύ	24.15	0.2	-84
Ρουτίνη	22.2	0.9	-11
Κατεχίνη	14.53	0.7	-28
Επικατεχίνη	18.67	0.8	-22
Νεοχλωρογενικό οξύ	11.07	0.7	-28
trans-Χλωρογενικό οξύ	13.40	0.7	-26
Καφεϊκό οξύ	18.22	1.7	68
p-Κουμαρικό οξύ	23.03	0.8	-16
o-Κουμαρικό οξύ	27.15	0.6	-42
Πρωτοκατεχικό Οξύ	11.51	1.1	12
Ελευρωπαΐνη	26.11	1.2	22
Γαλλικό οξύ	8.23	1.2	18
Φλωρετικό οξύ	21.94	1.4	44
Κερκετίνη	30.47	9	>100
Συριγγικό οξύ	18.45	1.9	>100

5.5 Πολικές φαινόλες σε εγκεφαλικό ιστό επίμωων

Οι αναλύσεις του εγκεφάλου έγιναν για κάθε ένα από τα επιμέρους τμήματα εγκεφάλου (εγκεφαλικός φλοιός, παρεγκεφαλίδα, ιππόκαμπος, μεσεγκέφαλος, ραβδωτό σώμα). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ng/g ιστού.

5.5.1 Υγρασία (%) των λυοφιλοποιημένων ιστών

Η % υγρασία των ιστών όπως αυτή προσδιορίστηκε από τη λυοφιλίωση φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5.11: Υγρασία (%) των λυοφυλιωμένων ιστών

Τμήμα εγκεφάλου	CORTEX	CEREBELLUM	HIPPOCAMPUS	MESENCEPHALON	STRIATUM
RAT 2 (τυπική διαίτα)					
% υγρασία	79.8	77.8	81.9	77.4	81.3
RAT 3 (παρέμβασης)					
% υγρασία	80.5	79.8	79.0	80.6	80.4
RAT 4 (παρέμβασης)					
% υγρασία	82.7	77.8	82.2	74.4	79.4
RAT 5 (παρέμβασης)					
% υγρασία	81.3	81.1	86.0	79.5	81.2

5.5.2 Κατανομή πολικών ΦΕ στον εγκεφαλικό φλοιό

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.12 η απιγενίνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα εγκεφαλικού φλοιού. Παρατηρήθηκε επίσης πως το δείγμα του Rat 3 εμφάνιζε το μεγαλύτερο αριθμό ανιχνευθέντων πολικών φαινολικών ενώσεων και μάλιστα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επιπλέον, η λουτεολίνη και η απιγενίνη είναι τα μόνα φλαβονοειδή που ανιχνεύθηκαν και στο δείγμα ελέγχου (Rat 2) ωστόσο σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα δείγματα παρέμβασης.

Πίνακας 5.12: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού. Στον Πίνακα φαίνονται οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον 2 επίμυες.

CORTEX					
Συγκεντρώσεις ng/g ιστού					
Ένωση	Rat 2 (T.δίαιτα)	Rat 1 (παρέμβαση)	Rat 3 (παρέμβαση)	Rat 4 (παρέμβαση)	Rat 5 (παρέμβαση)
Λουτεολίνη	4	357	233	16	n.d.
Καμπφερόλη	n.d.	210	165	n.d.	n.d.
Ναρινγκενίνη	n.d.	6	29	n.d.	n.d.
Απιγενίνη	7	5	100	26	14
Χρυσίνη	n.d.	23	153	1	1

Παράλληλα σε έναν από τους τέσσερις ιστούς επίμυων παρέμβασης που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε ένα από τα φερουλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, o-κουμαρικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, κατεχίνη, γαλλικό οξύ. Επίσης, το νεοχλωρογενικό οξύ ανιχνεύθηκε στον ιστό επίμυ που ελάμβανε τυπική δίαιτα και σε έναν ιστό επίμυ παρέμβασης.

5.5.3 Κατανομή πολικών ΦΕ στην παρεγκεφαλίδα (cerebellum)

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.13 το δείγμα του Rat 3 εμφάνιζε και πάλι το μεγαλύτερο αριθμό ανιχνευθέντων πολικών φαινολικών ενώσεων και μάλιστα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης η απιγενίνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα παρεγκεφαλίδας.

Πίνακας 5.13: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα παρεγκεφαλίδας. Στον Πίνακα φαίνονται οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον 2 επίμυες.

CEREBELLUM					
Συγκεντρώσεις ng/g ιστού					
Ένωση	Rat 2 (Τ.δίαιτα)	Rat 1 (παρέμβαση)	Rat 3 (παρέμβαση)	Rat 4 (παρέμβαση)	Rat 5 (παρέμβαση)
Λουτεολίνη	5	50	54	n.d.	n.d.
Ναρινγενίνη	3	10	49	n.d.	n.d.
Απιγενίνη	27	8	99	9	7
Χρυσίνη	n.d.	56	244	3	2

Παράλληλα σε έναν από τους τέσσερις ιστούς επίμυων παρέμβασης που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε ένα από τα καμπφερόλη p-κουμαρικό οξύ, o-κουμαρικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ. Επίσης, στον ιστό επίμυ που ελάμβανε τυπική δίαιτα ανιχνεύθηκε γαλλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.

5.5.4 Κατανομή πολικών ΦΕ στον ιππόκαμπο (hippocampus)

Τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 5.14 δείχνουν πως η απιγενίνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα ιππόκαμπου και μάλιστα τα υψηλότερα επίπεδα απιγενίνης βρέθηκαν στο δείγμα Rat 1. Γενικώς τα επίπεδα συγκεντρώσεων των ανιχνευθέντων ΦΕ ήταν υψηλότερα στο δείγμα Rat 1.

Πίνακας 5.14: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού. Στον Πίνακα φαίνονται οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε τουλάχιστον 2 επίμυες.

HIPPOCAMPUS					
Συγκεντρώσεις ng/g ιστού					
Ένωση	Rat 2 (Τ.δίαιτα)	Rat 1 (παρέμβαση)	Rat 3 (παρέμβαση)	Rat 4 (παρέμβαση)	Rat 5 (παρέμβαση)
Λουτεολίνη	7	197	63	10	
Απιγενίνη	17	867	63	70	19
Χρυσίνη	5	140	15	9	n.d.

Επίσης, στον ιστό επίμυ που ελάμβανε τυπική δίαιτα ανιχνεύθηκε γαλλικό οξύ και νεοχλωρογενικό οξύ.

5.5.5 Κατανομή των πολικών ΦΕ στον μεσεγκέφαλο (mesencephalon)

Τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 5.15 δείχνουν πως η απιγενίνη είναι παρούσα σε όλα τα δείγματα μεσεγκεφάλου. Το δείγμα του Rat 3 εμφανίζει και πάλι το μεγαλύτερο αριθμό ανιχνευθέντων πολικών φαινολικών ενώσεων και μάλιστα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας 5.15: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα μεσεγκεφάλου.

MESENCEPHALON					
Συγκεντρώσεις ng/g ιστού					
Ένωση	Rat 2 (Τ.δίαιτα)	Rat 1 (παρέμβαση)	Rat 3 (παρέμβαση)	Rat 4 (παρέμβαση)	Rat 5 (παρέμβαση)
Λουτεολίνη	2	n.d.	19	3	2
Απιγενίνη	10	n.d.	65	7	11
Χρυσίνη	13	30	360	3	2

Παράλληλα σε έναν από τους τέσσερις ιστούς επίμυων παρέμβασης που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε ένα από τα καμπφερόλη, ναρινγκενίνη, p-κουμαρικό οξύ, ο-κουμαρικό οξύ.

5.5.6 Κατανομή των πολικών ΦΕ στο ραβδωτό σώμα(striatum)

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.16 η απιγενίνη και η χρυσίνη ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα ραβδωτού σώματος. Το δείγμα του Rat 3 εμφανίζει και πάλι το μεγαλύτερο αριθμό ανιχνευθέντων πολικών φαινολικών ενώσεων και μάλιστα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας 5.16: Συγκεντρώσεις των ανιχνευθέντων ΦΕ σε δείγματα εγκεφαλικού φλοιού.

STRIATUM					
Συγκεντρώσεις ng/g ιστού					
Ένωση	Rat 2 (Τ.δίαιτα)	Rat 1 (παρέμβαση)	Rat 3 (παρέμβαση)	Rat 4 (παρέμβαση)	Rat 5 (παρέμβαση)
Λουτεολίνη	7	61	725		8
Απιγενίνη	23	53	209		43
Χρυσίνη	6	78	50		2

Παράλληλα σε έναν από τους τέσσερις ιστούς επίμυων παρέμβασης που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε ένα από τα καμπφερόλη και ναρινγκενίνη και γαλλικό οξύ. Επίσης, στον ιστό επίμου που ελάμβανε τυπική δίαιτα ανιχνεύθηκε νεοχλωρογενικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ.

5.5.7 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με την μελέτη των Chiou et al(64), μεταξύ των πολικών φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν στην κορινθιακή σταφίδα ανήκουν το φερουλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, η κατεχίνη, καμπφερόλη καθώς και χρυσίνη (65). Παράλληλα, το γεγονός ότι η τροφή των επίμυων είναι φυτικής προέλευσης, δικαιολογεί την παρουσία των φλαβονοειδών λουτεολίνη, απιγενίνη και ναρινγκενίνη στον εγκέφαλο όλων των επίμυων που αναλύθηκαν, είτε ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης με κορινθιακή σταφίδα, είτε στην ομάδα που χορηγήθηκε τυπική δίαιτα.

Ακόμα, τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με μελέτες *in vitro*(66),(67), και *in vivo*(67),(68) που δείχνουν ότι οι πολικές φαινολικές ενώσεις καταφέρνουν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και συσσωρευθούν στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου σε συγκεντρώσεις περίπου 1nmol/g ιστού.(26) Επιπλέον, να σημειωθεί πως λόγω της εκλεκτικότητας που φαίνεται πως παρουσιάζουν τα φλαβονοειδή ως προς την κατανομή τους σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (εγκεφαλικός φλοιός, παρεγκεφαλίδα, υπόκαμπος και μεσεγκέφαλος)(68), στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν για ανάλυση οι συγκεκριμένες περιοχές. Ακόμα, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων παρέμβασης παρατηρήθηκε πως τα φλαβονοειδή (λουτεολίνη, απιγενίνη, ναρινγκενίνη και χρυσίνη) ήταν από τις φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε όλα σχεδόν τα διαφορετικά τμήματα εγκεφάλου και σε όλα τα δείγματα.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτεύχθηκε η ανίχνευση της ναρινγκενίνης σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μία τάξη

μεγέθους πιο χαμηλή από αυτήν που βρέθηκε στην μελέτη των Peng et al, (0.4μg/g εγκεφαλικού ιστού) (69) Επιπλέον, παρόλο που με την παρούσα μέθοδο δεν ανιχνεύθηκε κερκετίνη στον εγκέφαλο, όπως παρατηρήθηκε και στην μελέτη των Bieger et al(70), οι ερευνητές μιας άλλης μελέτης(71), αναφέρουν πως παρατηρείται συσσώρευση της κερκετίνης στον εγκέφαλο, αλλά σε συγκεντρώσεις της τάξεως pmol/g, που είναι αρκετά χαμηλότερο από τα όρια ανίχνευσης της παρούσας μελέτης.

5.6 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, συνολικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε έδωσε καλά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα η λήψη των φασμάτων μάζας των πολικών φαινολών φαίνεται πως είναι ευνοϊκή στον αρνητικό ιοντισμό. Ακόμα, η εφαρμογή της συγκεκριμένης χρωματογραφικής μεθόδου επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων που μελετήσαμε με υψηλή ευαισθησία. Ωστόσο, μπορεί να βελτιστοποιηθεί ως προς τον χρόνο έκλουσης και το διαχωρισμό ορισμένων συστατικών αλλάζοντας τις συνθήκες ανάλυσης όπως για παράδειγμα τη στατική φάση ή/και την κινητή φάση.

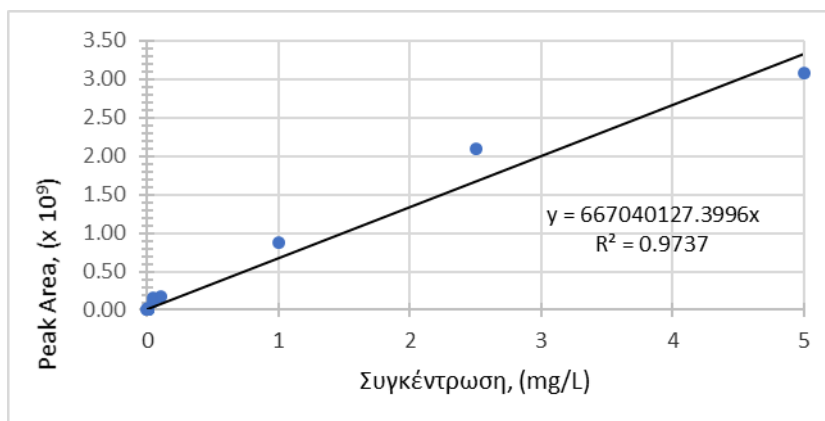
Επίσης φαίνεται πως η επίδραση της μήτρας είναι αρκετά μεγάλη, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο όταν το υπόστρωμα που αναλύεται είναι βιολογικό δείγμα. Για να αντιμετωπιστεί επομένως το συγκεκριμένο πρόβλημα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρότυπο προσαρμοσμένο στη μήτρα του δείγματος για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων στα δείγματα ιστού. Ακόμα, επειδή το στάδιο της προκατεργασίας των δειγμάτων αποτελεί σημαντικό βήμα για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων, η ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων από το βιολογικό υπόστρωμα χρήζει περαιτέρω μελέτης καθώς παρατηρήθηκε πως δεν έχουμε ανάκτηση όλων των ενώσεων.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως με την μέθοδο που ακολουθήθηκε κατέστη δυνατή η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών φαινολικών ενώσεων ιστοειδικά μετά από διατροφική παρέμβαση με Κορινθιακή σταφίδα. Ωστόσο, απαιτείται η ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την καταλληλότερη μέθοδο προκατεργασίας του δείγματος και φυσικά για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την ποσοτική κατανομή πολικών φαινολών στον εγκεφαλικό ιστό μετά την κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας.

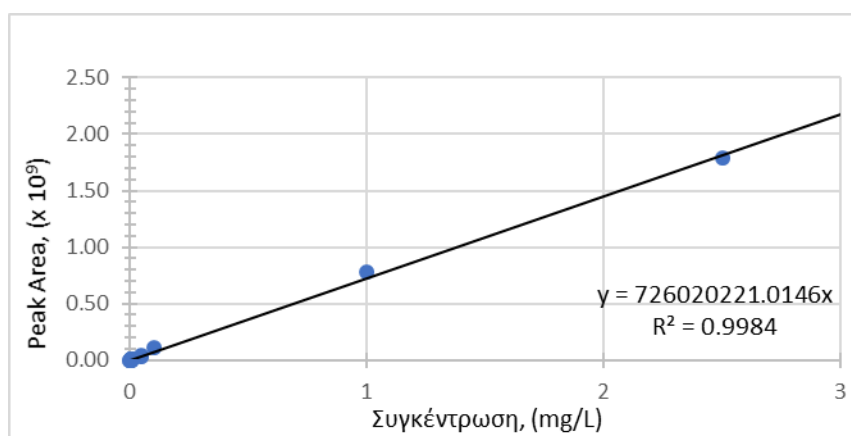
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'

Καμπύλες αναφοράς πρότυπων ουσιών

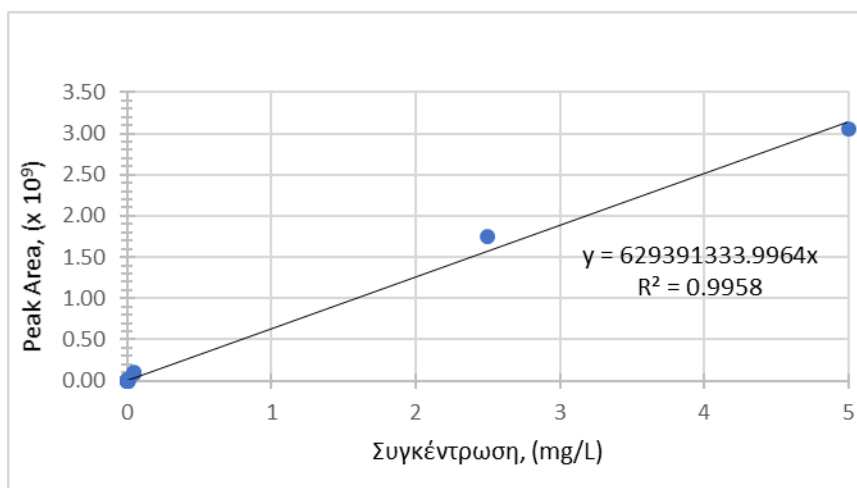
1. Καμπύλη αναφοράς λουτεολίνης



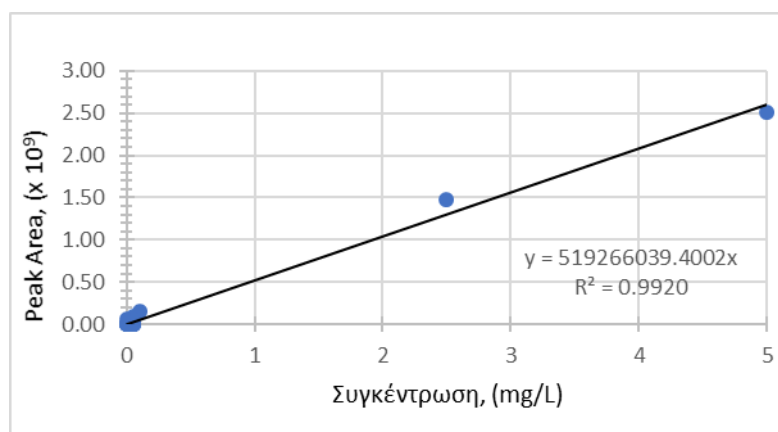
2. Καμπύλη αναφοράς καμπφερόλης



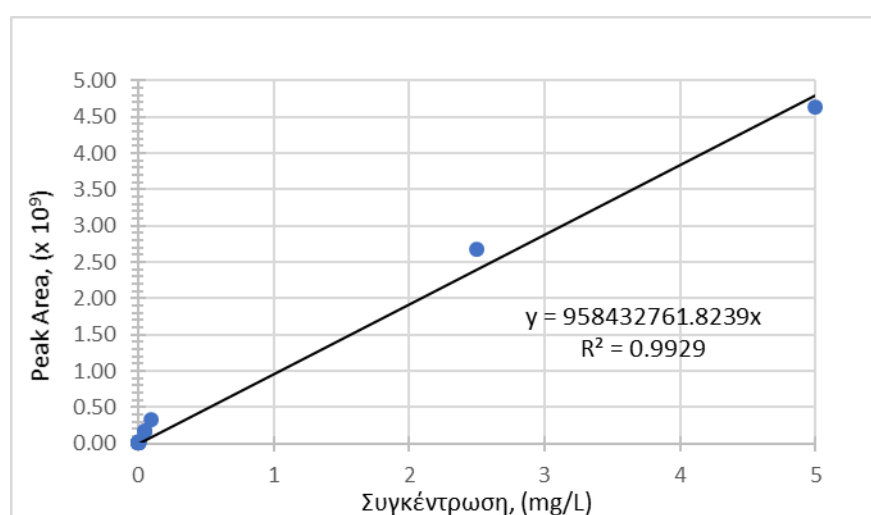
3. Καμπύλη αναφοράς ναρινγκενίνης



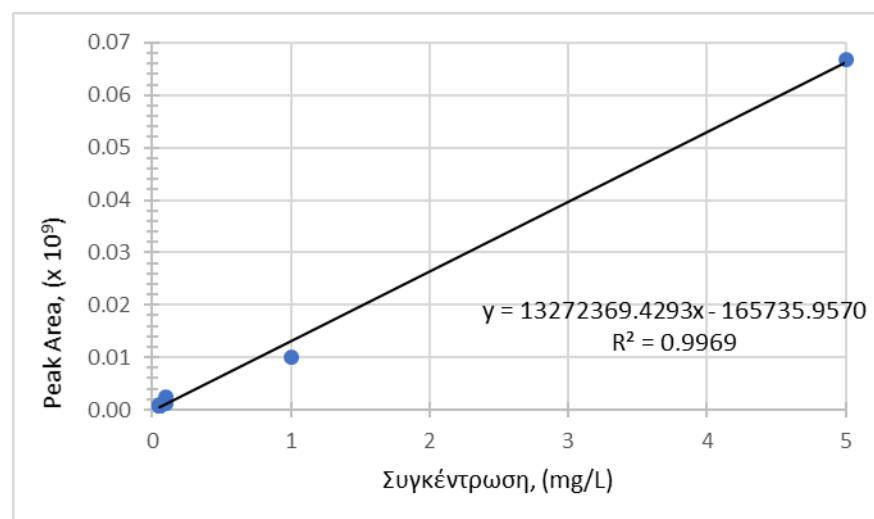
4. Καμπύλη αναφοράς απιγενίνης



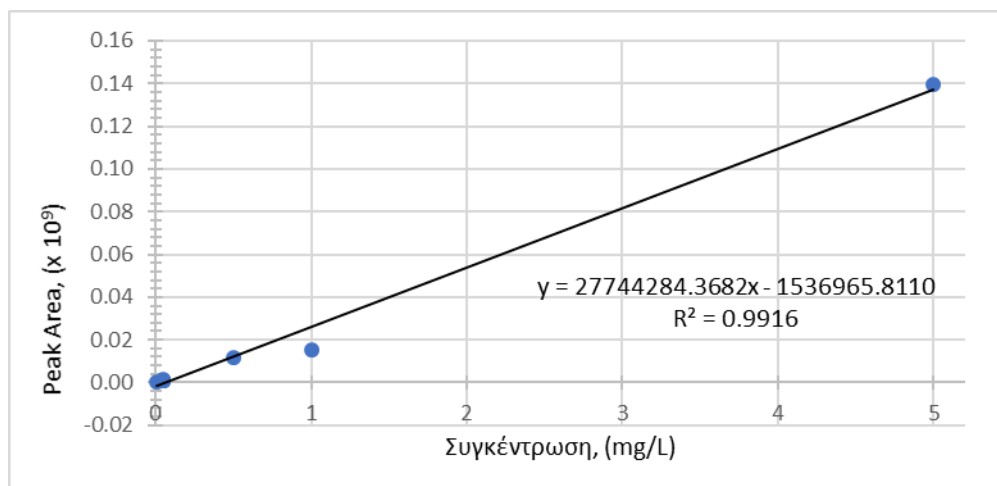
5. Καμπύλη αναφοράς χρυσίνης



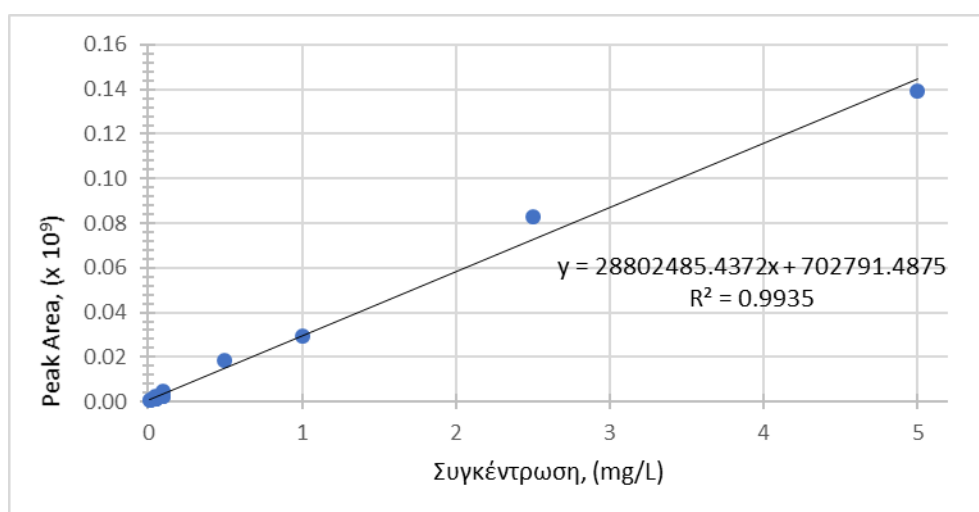
6. Καμπύλη αναφοράς σιναπικού οξέος



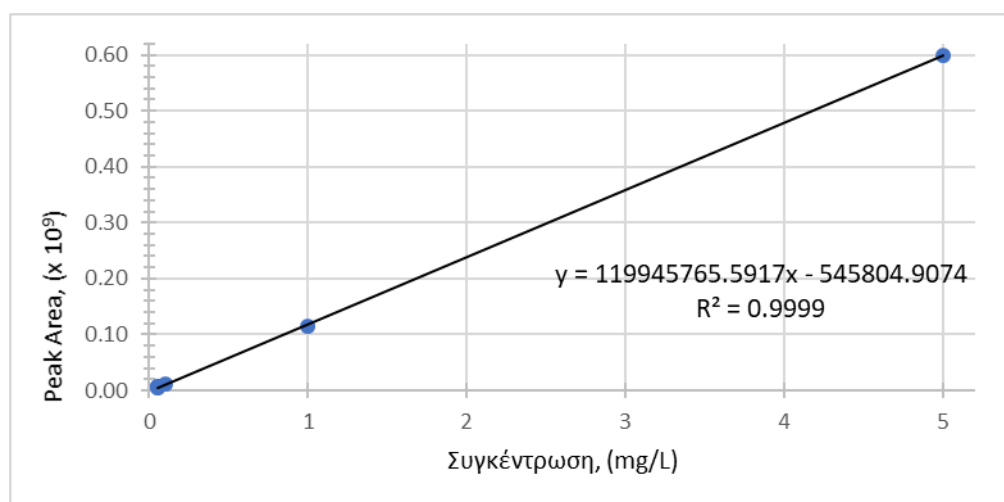
7. Καμπύλη αναφοράς φερουλικού οξέος



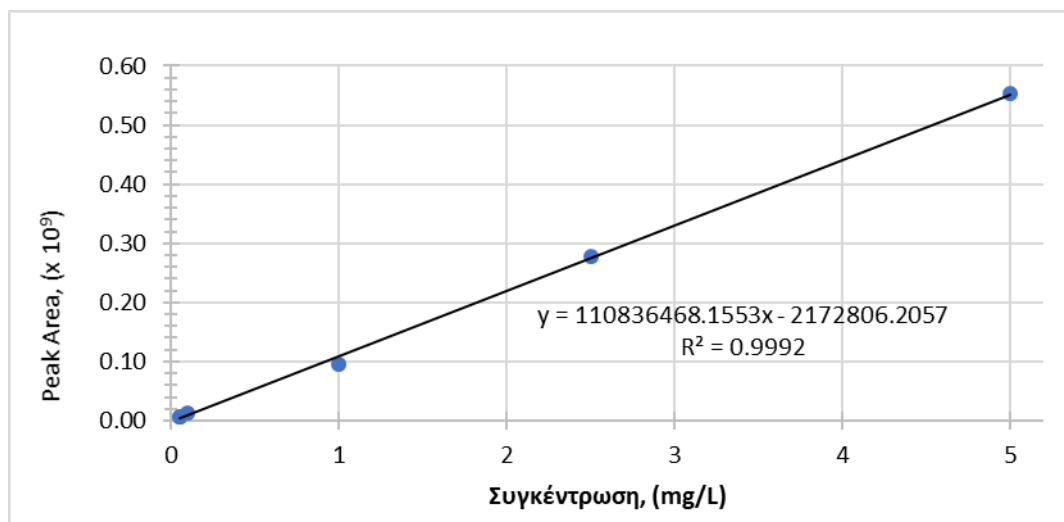
8. Καμπύλη αναφοράς ένυδρης ρουτίνης



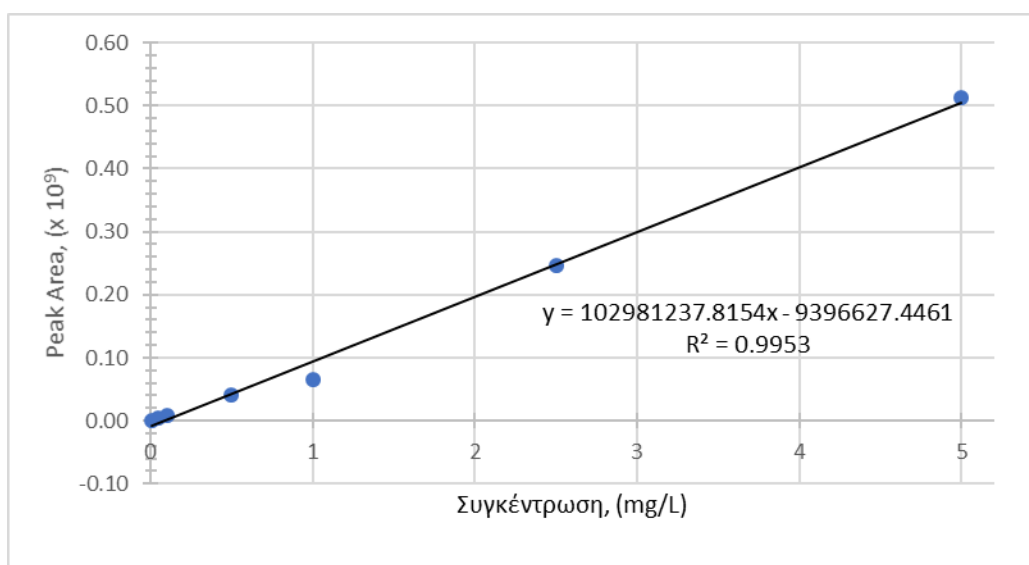
9. Καμπύλη αναφοράς $\pm$ κατεχίνης



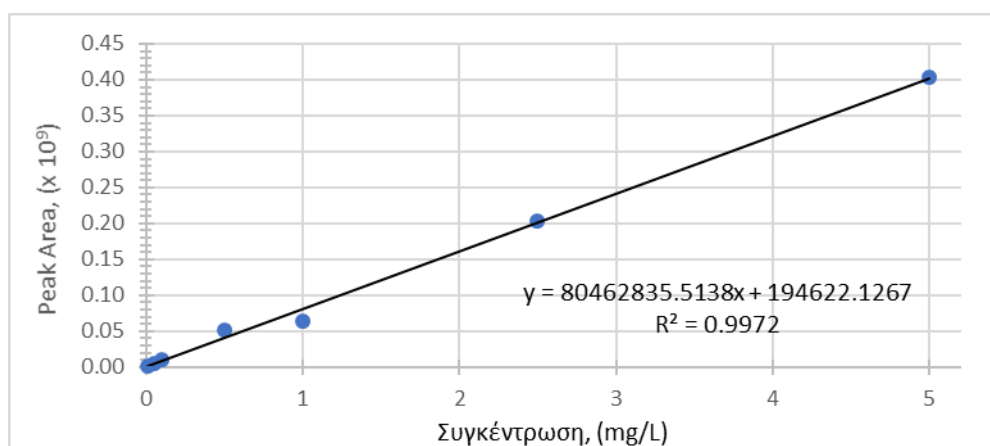
10. Καμπύλη αναφοράς (-) επικατεχίνης



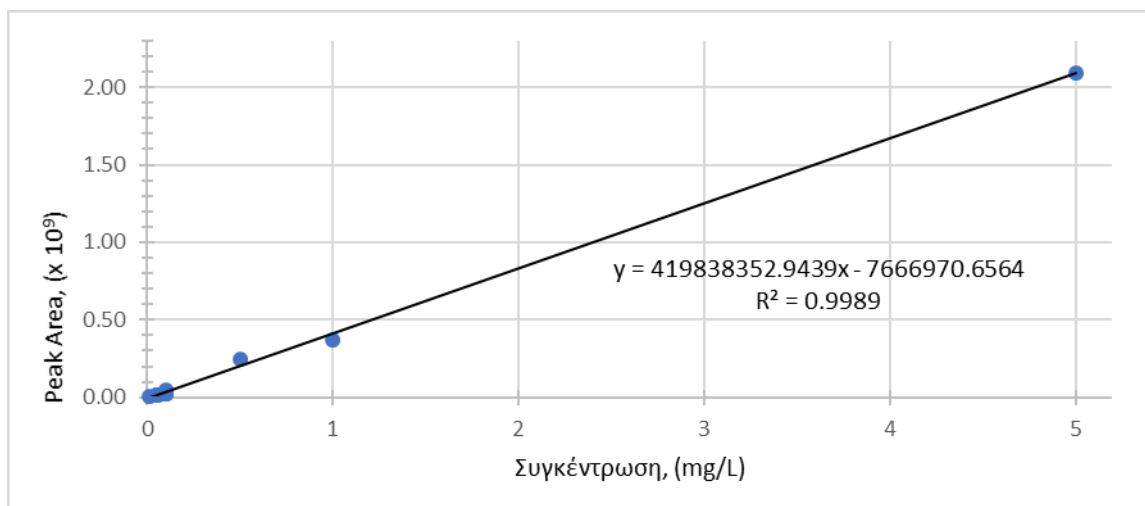
11. Καμπύλη αναφοράς νεοχλωρογενικού οξέος



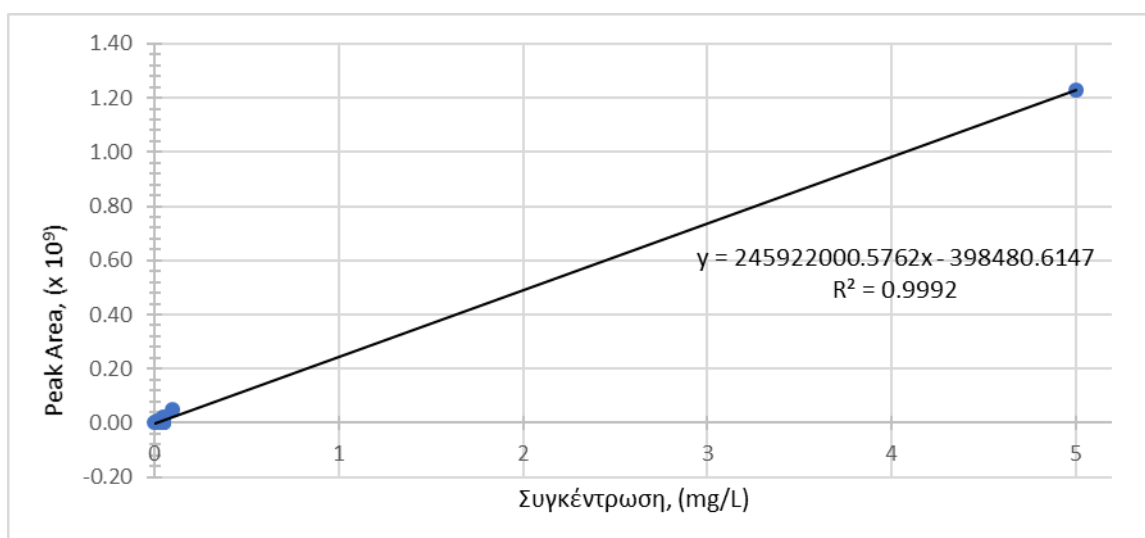
12. Καμπύλη αναφοράς trans-χλωρογενικού οξέος



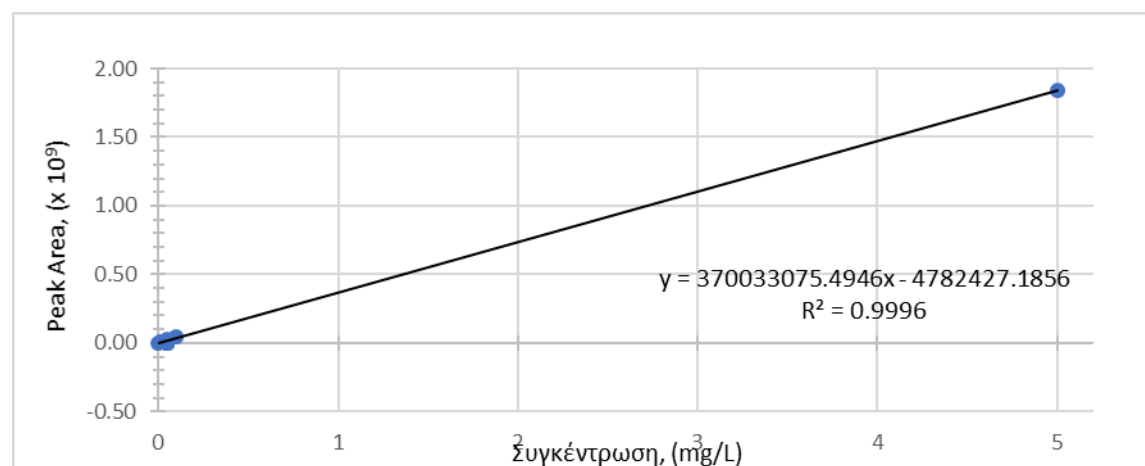
13. Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού οξέος



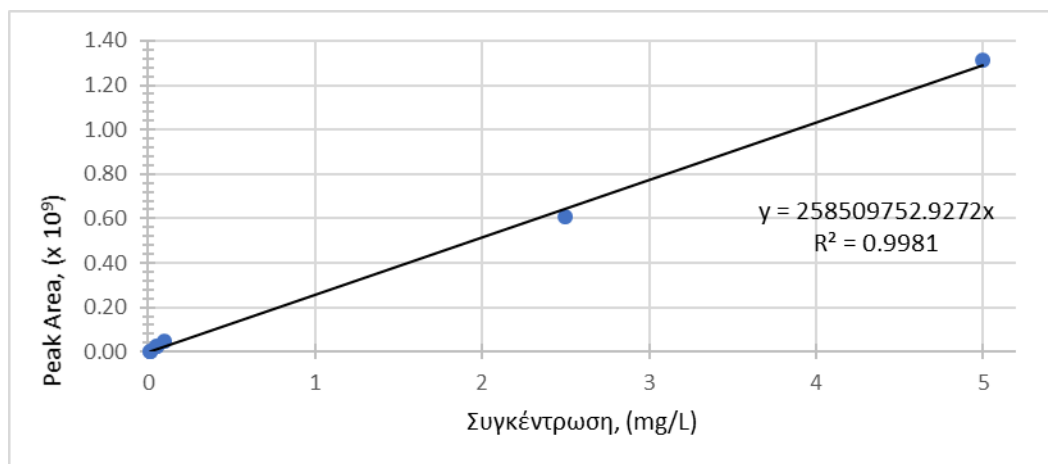
14. Καμπύλη αναφοράς p-κουμαρικού οξέος



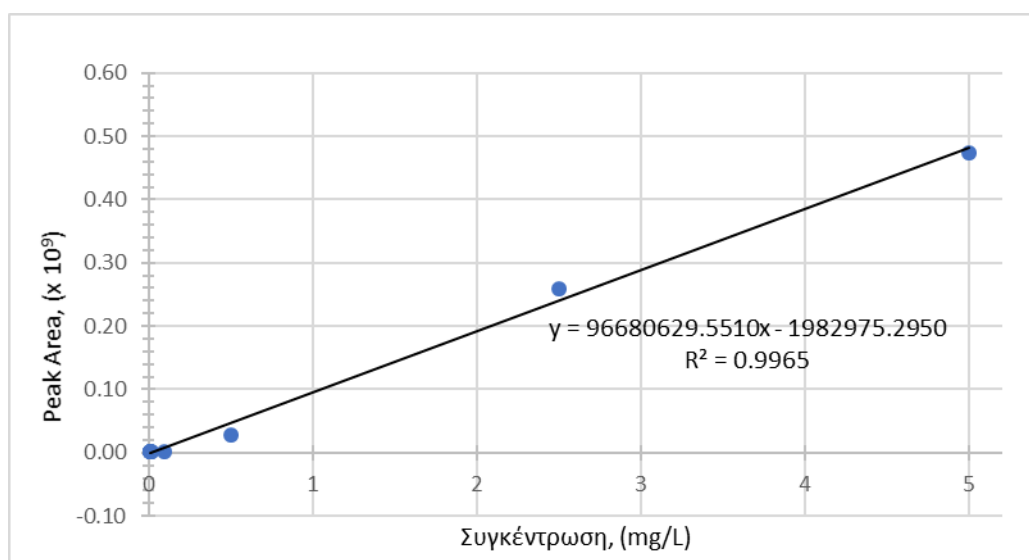
15. Καμπύλη αναφοράς o-κουμαρικού οξέος



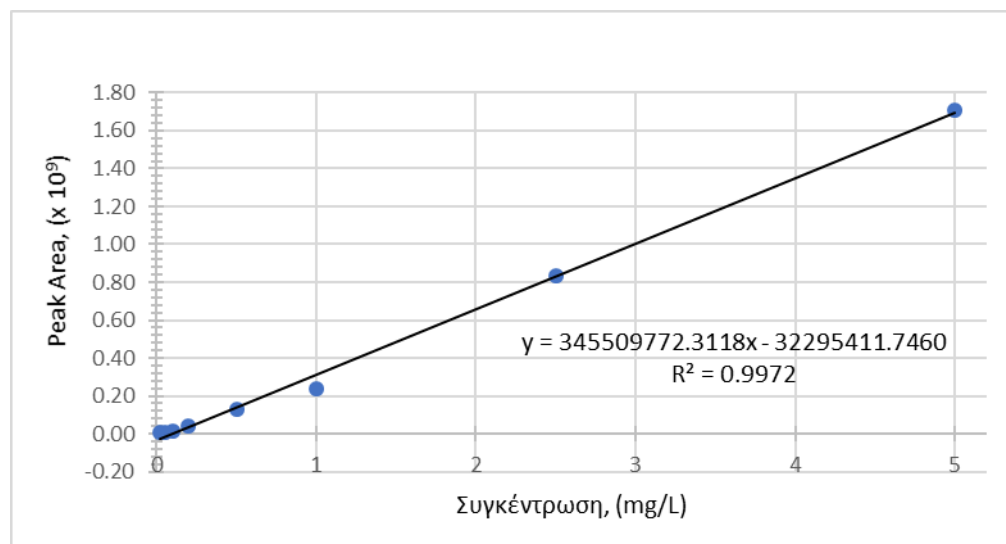
16. Καμπύλη αναφοράς πρωτοκατεχικού οξέος



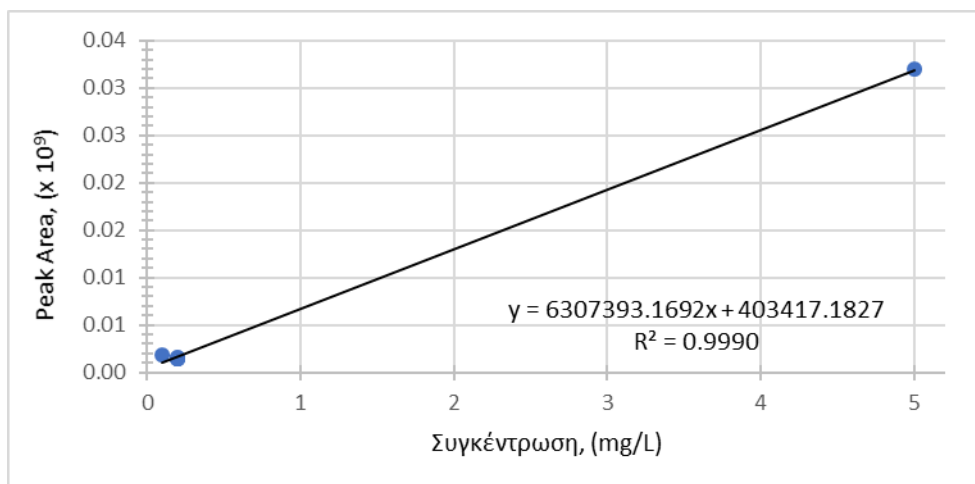
17. Καμπύλη αναφοράς ελευρωπαΐνης



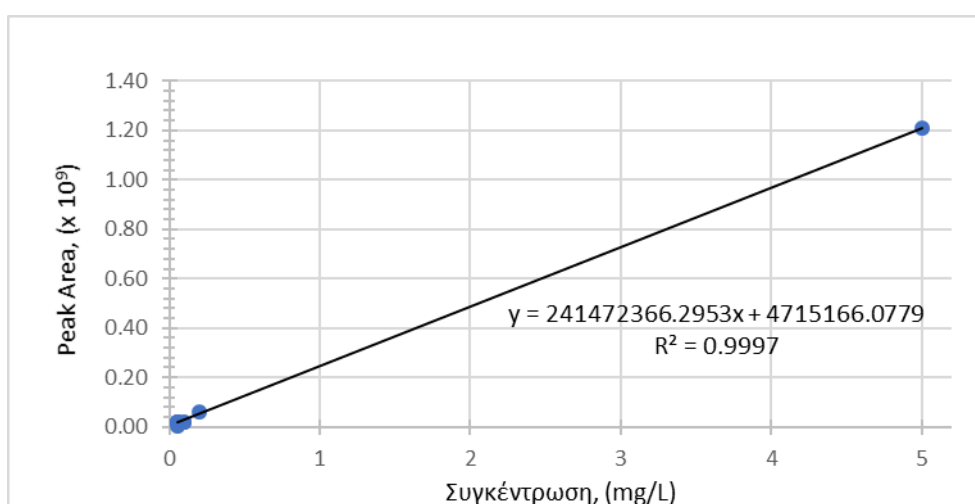
18. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος



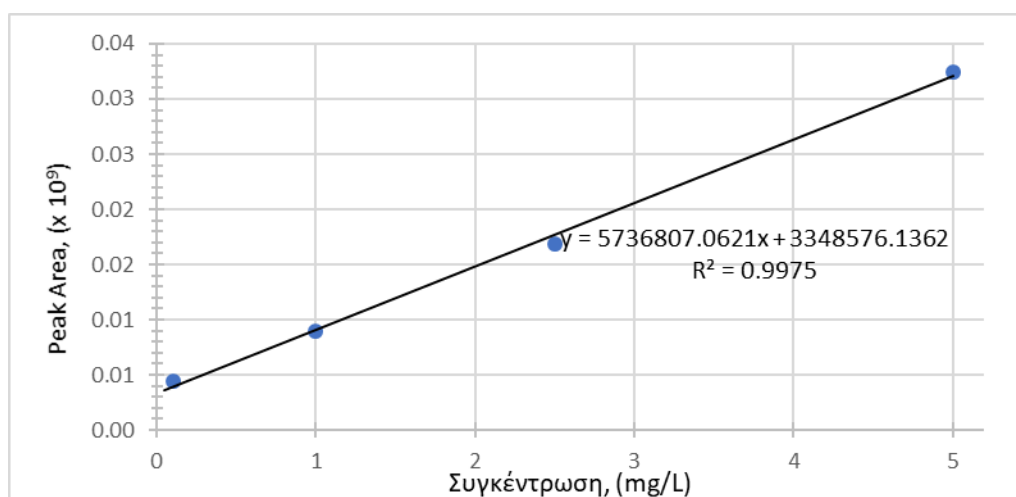
19. Καμπύλη αναφοράς 3-(4-υδροξυφαινυλο)προπιονικού οξέος



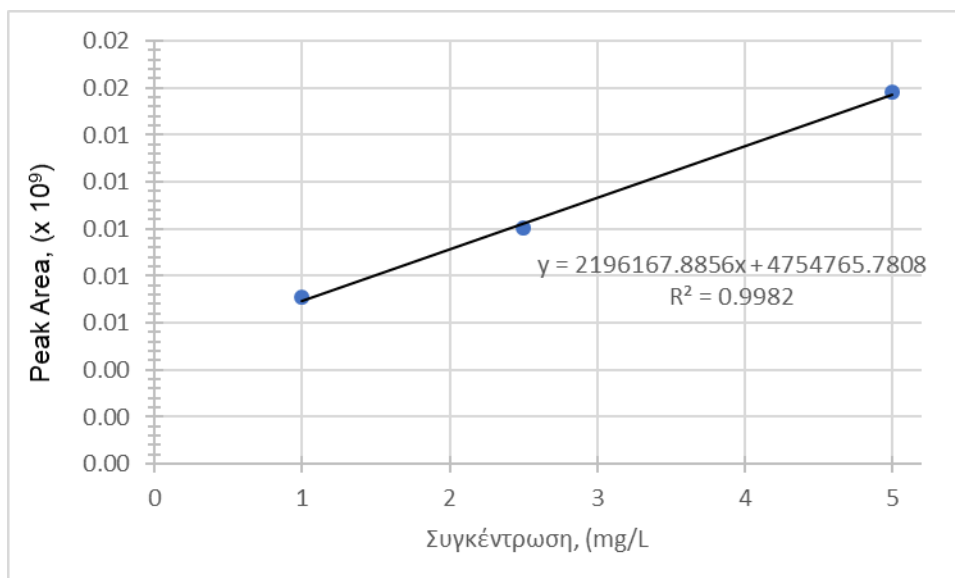
20. Καμπύλη αναφοράς κερκετίνης



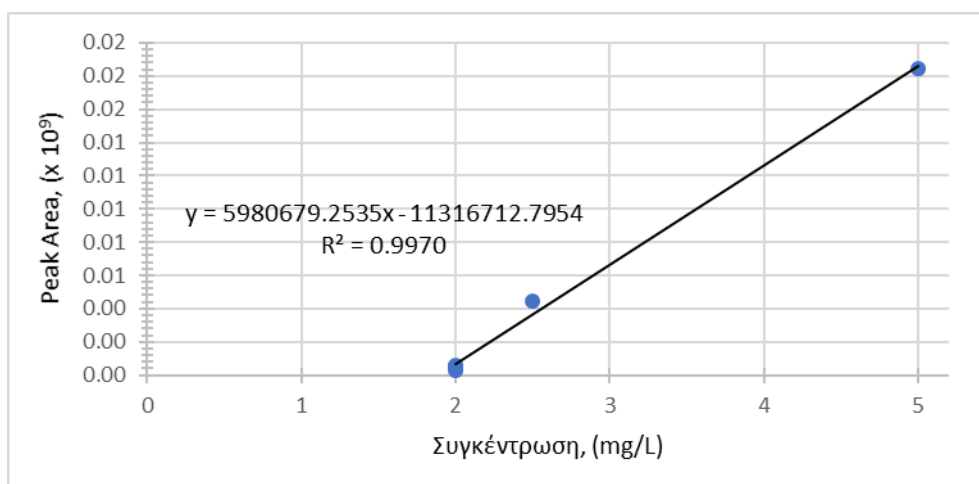
21. Καμπύλη αναφοράς συριγγικού οξέος



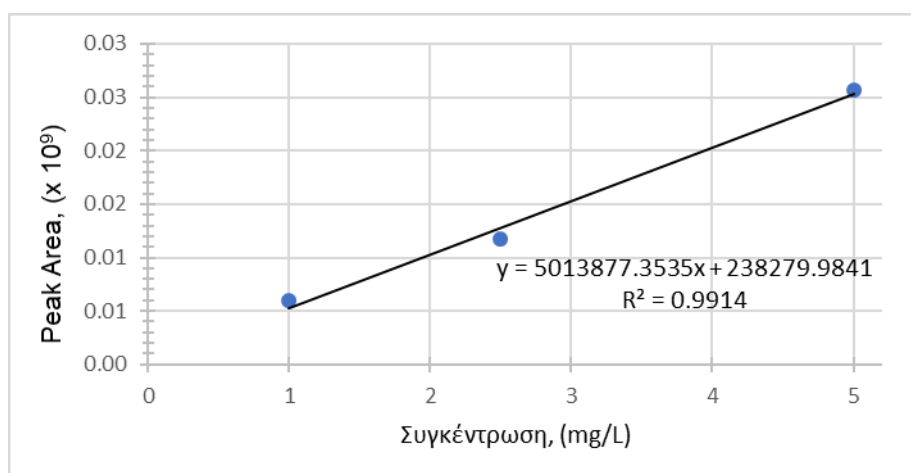
22. Καμπύλη αναφοράς ομοβανιλικού οξέος (HVA)



23. Καμπύλη αναφοράς γαλλικού εστέρα επιγαλλοκατεχίνης



24. Καμπύλη αναφοράς trans-κινναμωμικού οξέος



1. Harborne JB. Plant Phenolics. In: P.M. Dey JBH, ed. *Methods in plant biochemistry* Academic Press Limited, 1989:11-6.
2. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegur L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50(3):586-621. doi: 10.1002/anie.201000044.
3. A. Belščak-Cvitanović KD, A. Huđek, V. Bačun-Družina, D. Komes. Overview of polyphenols and their properties. In: Galanakis CM, ed. *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications: Woodhead Publishing-Elsevier*, 2018:3-44.
4. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-33.
5. Shahidi F, Yeo JD. Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules* 2016;21(9). doi: 10.3390/molecules21091216.
6. Pandey KB, Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2009;2(5):270-8.
7. Saltveit ME. Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. In: M.Yahia E, ed. *Fruit and Vegetable Phytochemicals, Chemistry and Human Health*. 2nd ed: John Wiley & Sons Ltd., 2018:115-23.
8. W.Vermerris RN. Biosynthesis of Phenolic Compounds. Edition ed. *Phenolic Compound Biochemistry: Springer*, 2007:74-145.
9. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* 2010;2(12):1231-46. doi: 10.3390/nu2121231.
10. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 2013;72:1-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.
11. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727.
12. L. Chen HC, J.Xiao. Polyphenols: absorption, bioavailability and metabolomics. In: Galanakis CM, ed. *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications: Woodhead Publishing-Elsevier*, 2018:49-56.

13. Velderrain-Rodriguez GR, Palafox-Carlos H, Wall-Medrano A, Ayala-Zavala JF, Chen CY, Robles-Sanchez M, Astiazaran-Garcia H, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct* 2014;5(2):189-97. doi: 10.1039/c3fo60361j.
14. Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-Suarez JM. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food Chem Toxicol* 2018;113:49-65. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.022.
15. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(14):1818-92. doi: 10.1089/ars.2012.4581.
16. Kanazawa K. Bioavailability of non-nutrients for preventing lifestyle-related diseases. *Trends in Food Science & Technology* 2011;22(12):655-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.06.005>.
17. Teng H, Chen L. Polyphenols and Bioavailability: an update. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018;0. doi: 10.1080/10408398.2018.1437023.
18. Visioli F, De La Lastra CA, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A, D'Archivio M, Faria A, Fave G, Fogliano V, et al. Polyphenols and human health: a prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011;51(6):524-46. doi: 10.1080/10408391003698677.
19. van Duynhoven J, Vaughan EE, Jacobs DM, Kemperman RA, van Velzen EJ, Gross G, Roger LC, Possemiers S, Smilde AK, Dore J, et al. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108 Suppl 1:4531-8. doi: 10.1073/pnas.1000098107.
20. D'Archivio M, Filesì C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences* 2010;11(4):1321-42. doi: 10.3390/ijms11041321.
21. Margalef M, Pons Z, Bravo FI, Muguerza B, Arola-Arnal A. Tissue distribution of rat flavanol metabolites at different doses. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2015;26(10):987-95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.04.006>.
22. D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant

- from olive oil. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2001;29(11):1492-8.
23. Omar MH, Mullen W, Stalmach A, Auger C, Rouanet JM, Teissedre PL, Caldwell ST, Hartley RC, Crozier A. Absorption, disposition, metabolism, and excretion of [3-(14)C]caffeic acid in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 2012;60(20):5205-14. doi: 10.1021/jf3001185.
24. Julien Bensalem SD, David Gaudout, Laure Servant, Frédéric Calon, Yves Desjardins, Sophie Layé, Pauline Lafenetre, Véronique Pallet Polyphenol-rich extract from grape and blueberry attenuates cognitive decline and improves neuronal function in aged mice. *Journal of Nutritional Science* 2018;7. doi: 10.1017/jns.2018.10.
25. Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S. Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *International journal of molecular sciences* 2017;18(11):2230. doi: 10.3390/ijms18112230.
26. Pandareesh MD, Mythri RB, Srinivas Bharath MM. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochem Int* 2015;89:198-208.
27. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine* 2010;31(6):435-45. doi: 10.1016/j.mam.2010.09.006.
28. Natália Martins LB, Isabel C.F.R. Ferreira. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology* 2016;48:1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008>.
29. Figueira I, Menezes R, Macedo D, Costa I, Dos Santos CN. Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. *Current neuropharmacology* 2017;15(4):562-94. doi: 10.2174/1570159x14666161026151545.
30. Hussain T, Tan B. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? 2016;2016:7432797.
31. Miniati E. Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43(4):362-8.
32. Magiera S, Baranowska, I. UHPLC in the Analyses of Isoflavones and FLavonoids. In: Xu QA, ed. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its applications*: Wiley, 2013:207-16.

33. Θεοδωρίδης Γ, Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, Β. Τεχνικές κατεργασίας βιολογικών δειγμάτων. Βιοαναλυτική χημεία. Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
34. Αρχοντάκη Ε. "Προκατεργασία δείγματος για αναλύσεις με HPLC". ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα.
35. Μπακέας Ε, Ευσταθίου,Κ.,. "Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς" - Ενόργανη Χημική Ανάλυση Ι. ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, 2008.
36. D.A. Skoog FJH, T.A. Nieman,. Εισαγωγή στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς. "Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης". Μτφ: Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης,Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα,2005:785-813.
37. Θεοδωρίδης Γ, Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, Β. Χρωματογραφικές τεχνικές στη βιοανάλυση. Βιοαναλυτική χημεία. Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
38. D.A. Skoog FJH, T.A. Nieman,. Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). "Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης". Μτφ: Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης,Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα,2005:844-7.
39. https://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016. (accessed 9/1/ 2019).
40. Zhang W, Xu M, Yu C, Zhang G, Tang X. Simultaneous determination of vitexin-4"-O-glucoside, vitexin-2"-O-rhamnoside, rutin and vitexin from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by UPLC-ESI-MS/MS. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 2010;878(21):1837-44. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.05.023.
41. Li G, Zeng X, Xie Y, Cai Z, Moore JC, Yuan X, Cheng Z, Ji G. Pharmacokinetic properties of isorhamnetin, kaempferol and quercetin after oral gavage of total flavones of Hippophae rhamnoides L. in rats using a UPLC-MS method. Fitoterapia 2012;83(1):182-91. doi: 10.1016/j.fitote.2011.10.012.
42. María-Carmen López de las Hazas JG-P, Alba Macià, A. Filipa Almeida, M. Rita Ventura, Maria-José Motilva, Cláudia N. Santos,. Brain uptake of hydroxytyrosol and its main circulating metabolites: Protective potential in neuronal cells. Journal of Functional Foods 2018;46:110-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.028>.

43. Wu QL, Shuyi & Xiao, Juan & Sui, Yong & Xie, Bijun & Sun, Zhida. Analysis of distribution and pharmacokinetics of litchi pericarp procyanidins in rat plasma and organs by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 2017;243:167–76. doi: 10.1007/s00217-016-2733-x. .
44. Okuyama S, Miyazaki K, Yamada R, Amakura Y, Yoshimura M, Sawamoto A, Nakajima M, Furukawa Y. Permeation of Polymethoxyflavones into the Mouse Brain and Their Effect on MK-801-Induced Locomotive Hyperactivity. *International journal of molecular sciences* 2017;18(3). doi: 10.3390/ijms18030489.
45. Bei D, An G. Pharmacokinetics and tissue distribution of 5,7-dimethoxyflavone in mice following single dose oral administration. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2016;119:65-70. doi: 10.1016/j.jpba.2015.11.025.
46. Li TX, Hu L, Zhang MM, Sun J, Qiu Y, Rui JQ, Yang XH. A sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of eleven bioactive components of Tong-Xie-Yao-Fang decoction in rat biological matrices. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2014;944:90-100. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.11.015.
47. Θεοδωρίδης Γ, Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, Β. Φασματομετρία μάζας. Βιοαναλυτική χημεία. Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
48. D.A. Skoog FJH, T.A. Nieman,. Φασματομετρία Μοριακών Μαζών. “Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης”. Μτφ: Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2005:578-614.
49. Θωμαΐδης Ν. "Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές". ΕΚΠΑ, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, 2008.
50. Gross J, H.,. Electrospray Ionization. *Mass Spectrometry, A Textbook*, Third Edition. Springer, 2017:721-69.
51. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* 2012;2012:40. doi: 10.1155/2012/282574.
52. Westman-Brinkmalm A, Brinkmalm, G. Electrospray Ionization. In: Ekman R, Silberring J, Westman-Brinkmalm A, Kraj A, eds. *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation and Applications*. Wiley, 2009:43.

53. Giorgi G. Mass Spectrometry and High Resolution Mass Spectrometry : An Overview. Molecular Technologies for Detection of Chemical and Biological Agents. Springer, 2016:89-100.
54. Gross J, H.,. Orbitrap-Principle of Operation. Mass Spectrometry, A Textbook, Third Edition. Springer, 2017:247-54.
55. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-Exactive-Plus-Benchtop-Full-Scan-Orbitrap-Mass-Spectrometer.pdf>. (accessed 9/2/ 2019).
56. Exactive Plus™ Operating Manual(P/N 1323060, Revision A). Thermo Fisher Scientific Inc, 2012.
57. Ion Optics. Exactive Plus™ Operating Manual(P/N 1323060, Revision A). Thermo Fisher Scientific Inc, 2012:31.
58. Orbitrap Analyzer. Exactive Plus™ Operating Manual(P/N 1323060, Revision A). Thermo Fisher Scientific Inc, 2012:34.
59. Douglas A. Skoog FJH, Stanley R. Crouch. Transducers for Mass Spectrometry. Principles of Instrumental Analysis sixth edition. (2006, Brooks Cole):282-5.
60. Qiu X, Zhang J, Huang Z, Zhu D, Xu W. Profiling of phenolic constituents in Polygonum multiflorum Thunb. by combination of ultra-high-pressure liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. Journal of chromatography A 2013;1292:121-31. doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.051.
61. Li T-x, Hu L, Zhang M-m, Sun J, Qiu Y, Rui J-q, Yang X-h. A sensitive UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of eleven bioactive components of Tong-Xie-Yao-Fang decoction in rat biological matrices. Journal of Chromatography B 2014;944:90-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.015>.
62. Serra A, Rubio L, Borrás X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. Molecular nutrition & food research 2012;56(3):486-96. doi: 10.1002/mnfr.201100436.
63. <https://www.mzcloud.org/>. (accessed 2/10/ 2018).
64. Chiou A, Karathanos VT, Mylona A, Salta FN, Preventi F, Andrikopoulos NK. Currants (Vitis vinifera L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry 2007;102(2):516-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.009>.

65. Kanellos PT, Kaliora AC, Gioxari A, Christopoulou GO, Kalogeropoulos N, Karathanos VT. Absorption and bioavailability of antioxidant phytochemicals and increase of serum oxidation resistance in healthy subjects following supplementation with raisins. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 2013;68(4):411-5. doi: 10.1007/s11130-013-0389-2.
66. Faria A, Pestana D, Teixeira D, Azevedo J, De Freitas V, Mateus N, Calhau C. Flavonoid transport across RBE4 cells: A blood-brain barrier model. *Cellular & molecular biology letters* 2010;15(2):234-41. doi: 10.2478/s11658-010-0006-4.
67. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free radical biology & medicine* 2004;36(5):592-604. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023.
68. Rangel-Ordóñez L, Noldner M, Schubert-Zsilavecz M, Wurglics M. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba extract EGb 761(R). *Planta medica* 2010;76(15):1683-90. doi: 10.1055/s-0030-1249962.
69. Peng HW, Cheng FC, Huang YT, Chen CF, Tsai TH. Determination of naringenin and its glucuronide conjugate in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1998;714(2):369-74. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00204-7).
70. Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolffram S. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *The Journal of nutrition* 2008;138(8):1417-20. doi: 10.1093/jn/138.8.1417.
71. Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto K, Tsuji A, Kawai Y, et al. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free radical biology & medicine* 2011;51(7):1329-36. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.017.