



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ**

ΓΟΥΣΓΟΥΝΗ ΑΙΜΙΛΙΑ ΤΑΤΙΑΝΑ

Αθήνα, 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCE & EDUCATION

DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS

MAIN TITLE:

EVALUATION AND OPTIMIZATION OF METHODOLOGIES FOR PHYTOCHEMICALS

DETERMINATION IN BLOOD

GOUSGOUNI AIMILIA TATIANA

Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αντωνία Χίου (Επιβλέπουσα), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Καραθάνος Βάϊος, Καθηγητής

ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΑ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΑ

Η Γουσγούνη Αιμιλία-Τατιάνα

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 εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα μου, κ. Χίου Αντωνία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση της πτυχιακής εργασίας αυτής, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Βασιλακοπούλου Παρασκευή, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος, για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράσταση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής πορείας, καθώς και της συγγραφής. Ευχαριστώ επίσης και την κ. Χρηστέα Μαργαρίτα για την συμμετοχή και βοήθεια της κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω και τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένειά και τους φίλους μου, για την υποστήριξη και ατελείωτη κατανόηση καθ' όλη την διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορά τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων σε δείγματα ορού και πλάσματος χρησιμοποιώντας ως αναλυτική τεχνική την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματοόμετρο μάζας (LC-MS). Τις τελευταίες δεκαετίες, τα φυτοχημικά και κυρίως οι πολικές φαινολικές ενώσεις των βρώσιμων φυτών έχουν κινήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των πιθανών ευεργετικών δράσεων τους στην ανθρώπινη υγεία. Επιδημιολογικές μελέτες τις έχουν συσχετίσει με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων παθήσεων όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος και διαβήτης II. Παρότι η βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι χαμηλή, ενδείκνυται να ωφελούν τον οργανισμό ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις μετά από μακροχρόνια χορήγησή τους μέσω της διατροφής. Επίσης, οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις απαντώνται σε δεσμευμένη μορφή στα φυτικά κύτταρα, αλλά και μετά τον μεταβολισμό τους εντός του οργανισμού, με αποτέλεσμα η επιτυχημένη ανάλυσή τους να προαπαιτεί προκατεργασία των δειγμάτων. Τα τελευταία χρόνια η ερευνητική κοινότητα ασχολείται με την ανάπτυξη νέων ευαίσθητων τεχνικών με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους σε βιολογικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη έγινε σύγκριση μεθόδων προκατεργασίας δειγμάτων ορού και πλάσματος πριν την εφαρμογή χρωματογραφικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων. Σκοπός ήταν η εύρεση την βέλτιστης μεθόδου προκατεργασίας, δηλαδή εκείνης που θα επέφερε τις καλύτερες ανακτήσεις για την πλειοψηφία των υπό μελέτη ενώσεων. Τέλος, εφαρμόστηκε η επικυρωμένη μέθοδος σε δείγματα ορού εθελοντών μετά από οξεία χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολικών φαινολικών ενώσεων στα δείγματα αυτά με την εφαρμογή της επιλεγμένης πειραματικής μεθόδου σε συνδυασμό με ενζυμική υδρόλυση.

Λέξεις κλειδιά: Πολικές φαινολικές ενώσεις, πρωτεϊνική καθίζηση, εκχύλιση, χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας, πλάσμα, ορός

The objective of this thesis is the determination of polar phenolic compounds in plasma and serum samples using liquid chromatography coupled with a mass spectrometer (LC-MS). In the past few decades, phytochemicals, more specifically polar phenolic compounds of plant foods, have triggered the interest of the scientific community due to their probable health benefits. Many epidemiological studies have linked them to the prevention of chronic diseases like cardiovascular diseases, cancer and type II diabetes. Even though polar phenolic compounds show a low bioavailability, it is suggested that they have beneficial effects, even when they are administered in the body at low concentrations through diet for an extended period of time. Furthermore, most phenolic compounds are found in bound form in plant cells and in the body, so the treatment of the samples is necessary for their successful analysis. Over the past few years, new and more sensitive analytical techniques have been developed for their qualitative and quantitative determination in various biological samples.

In the present study, methods of pretreatment of serum and plasma samples were compared before the application of a chromatographic method for the quantitative determination of polar phenolic compounds. The aim was to find the optimal pretreatment method, which is the one that would bring the best recoveries for the majority of the compounds under study. Finally, the validated method was applied to serum samples of volunteers after an acute administration of Corinthian raisins. The results of the experiment showed that it is possible to detect and quantify polar phenolic compounds in these samples by applying the selected experimental method in combination with enzymatic hydrolysis.

Keywords: Polar phenolic compounds, protein precipitation, extraction, chromatography, mass spectrometry, plasma, serum

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	15
1.1 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ.....	15
1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	16
1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	17
1.4 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	18
1.4.1 Γενικά	18
1.4.2 Φαινολικά οξέα	19
1.4.3 Φλαβονοειδή	20
1.4.4 Στυλβένια	22
1.4.5 Λιγνάνες και Λιγνίνες	23
1.4.6 Φαινυλαιθανοϊδή και φαινυλαλδεΐδες	23
1.4.7 Διαλυτή και αδιάλυτη μορφή των πολικών φαινολικών ενώσεων.....	24
1.5 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ.....	25
1.6 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ	27
1.7 ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	29
1.8 ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	32
1.8.1 Αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες	32
1.8.2 Καρδιαγγειακά νοσήματα	33
1.8.3 Διαβήτης τύπου II.....	33
1.8.4 Καρκίνος	34
1.8.5 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες	34
1.9 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ...	35
1.9.1 Γενικά	35
1.9.2 Μεταβολική πορεία από το στόμα στο έντερο	35

1.9.3 Βιοδιαθεσιμότητα και βιοπροσβασιμότητα	37
1.9.4 Μετά την απορρόφηση	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ	39
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	39
2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ	39
2.2.1 Ορός αίματος	40
2.2.2 Πλάσμα αίματος.....	40
2.2.3 Ολικό αίμα.....	41
2.3 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	41
2.3.1 Καθίζηση πρωτεϊνών (PPT)	43
2.3.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	43
2.3.3 Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE).....	45
2.3.4 Ενζυμική υδρόλυση.....	45
2.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (LC-MS).....	46
2.4.1 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography LC)	46
2.4.2 φασματομετρία μάζας	48
2.5 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΛΕΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ.....	51
ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΑΣΤΗΡΙΑ	59
3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	59
3.2 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ	61
3.2.1 Πρότυπες ουσίες.....	61
3.2.2 Διαλύτες και αντιδραστήρια.....	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΟΡΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΟΡΓΑΝΟΥ LC-MS	64
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	64

4.2 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	64
4.2.1 Πορείες 1-4a.....	65
4.2.2 Πορείες 1-4b.....	66
4.2.3 Πορείες 1-2c	66
4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LIQUID CHROMATOGRAPHY – MAS SPECTROMETRY, LC – MS).....	68
4.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΚΤΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	72
4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΩΝ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ..	74
5.2 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ.....	80
5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LIQUID CHROMATOGRAPHY – MAS SPECTROMETRY, LC – MS) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΟΥ.	81
5.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

Εικόνα 1.1: Τα φυτοχημικά και οι κύριες ομάδες τους.	16
Εικόνα 1.2: Απεικόνιση απλής φαινολικής ομάδας με έναν αρωματικό δακτύλιο και μία ομάδα υδροξυλίου (C ₆ H ₅ OH).	17
Εικόνα 1.3: Απεικόνιση του σκελετού των φλαβονοϊδών και των υποκατηγοριών τους (Del Rio et al., 2013).....	22
Εικόνα 1.4: Απεικόνιση του σκελετού των στιλβένιων και της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης (Fraga et al., 2010).....	22
Εικόνα 1.5: Απεικόνιση του σκελετού των λιγνανών (αριστερά) και λιγνινών (δεξιά) (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).	23
Εικόνα 1.6: Απεικόνιση χημικής δομής Βανιλίνης (Bezerra-Filho et al., 2019).	24
Εικόνα 1.7: Τρόποι με τους οποίους μπορεί να βρίσκονται οι φαινολικές ενώσεις στα βρώσιμα φυτά. Οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να είναι χημικά δεσμευμένες με άλλες ενώσεις και μέρη του κυττάρου, αλλά και παγιδευμένες μέσα στα κύτταρα, ή σε δομές φυτικών ινών (Wang et al., 2020).....	25
Εικόνα 2.1: Διαφορές μεταξύ του ολικού αίματος, του πλάσματος και του ορού.....	41
Εικόνα 2.2: Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης (Stalikas, 2007).	44
Εικόνα 3.1: Υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης HUPLC, συζευγμένο με αναλυτή μάζας Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap της Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2012).	60
Εικόνα 4.1: ΧIC Χρωματογράφημα μείγματος πρότυπου διαλύματος των πολικών φαινολικών ενώσεων, συγκέντρωσης 1 μg/mL στον αρνητικό ιοντισμό, με χρήση Accucore C18 ως χρωματογραφικής στήλης. Οι ενώσεις που αντιστοιχούν στους χρόνους κατακράτησης του χρωματογραφήματος φαίνονται στον πίνακα 4.4.	72

Εικόνα 5.1: Πολικές φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στον ορό εθελοντών πριν και μετά την χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας, με και χωρίς ενζυμική προκατεργασία (0 ώρες, 0 ώρες + ενζυμική υδρόλυση, 2 ώρες, 2 ώρες + ενζυμική υδρόλυση).....84

Πίνακας 1.1: Δομή βενζοϊκού οξέος και των παραγώγων του (Stalikas, 2007).	19
Πίνακας 1.2: Δομή κινναμωμικού οξέος και των παραγώγων του (Stalikas, 2007).	20
Πίνακας 1.3: Διαιτητική πρόσληψη φαινολικών ενώσεων ανά 1000 kcal διατροφής ημερησίως σε ενήλικες των Η.Π.Α ηλικίας 20 ετών και άνω, 2007-2016 (Huang et al., 2020).	31
Πίνακας 2.1: Παραδείγματα από εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό πολικών φαινολών σε πλάσμα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης.	55
Πίνακας 3.1: Πρότυπες ουσίες πολικών φαινολικών ενώσεων.	61
Πίνακας 4.1: Οι πειραματικές πορείες που εξετάστηκαν. a = πρωτεϊνική καθίζηση (PPT), b = πρωτεϊνική καθίζηση + εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και c = Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). ...	65
Πίνακας 4.2: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης για τις πολικές φαινολικές ενώσεις.	69
Πίνακας 4.3: Παράμετροι φασματομέτρου μάζας πλήρους σάρωσης (Full Scan MS).	69
Πίνακας 4.4: Μοριακά Ιόντα, ακρίβεια μάζας (mass error, ppm) και χρόνοι κατακράτησης των πολικών φαινολικών ενώσεων στον αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (-ESI).	70

Σχήμα 1.1: Απεικόνιση των βιοσυνθετικών οδών του δευτερογενούς μεταβολισμού προς τον σχηματισμό των φαινολικών ενώσεων (Saltveit, 2017).....	27
Σχήμα 2.1: Τυπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης(Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015b).	48
Σχήμα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες κάποιων τεχνικών κάθε σταδίου (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015c).....	49
Σχήμα 4.1: Απεικόνιση μεθόδου με υγρή-υγρή εκχύλιση.....	67
Σχήμα 4.2: Πρωτόκολλο οξείας παρέμβασης με Κορινθιακή σταφίδα σε εθελοντές.	73
Διάγραμμα 5.1: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με ακετονιτρίλιο (1a).	76
Διάγραμμα 5.2: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο (2a).....	76
Διάγραμμα 5.3: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με οξινομένο ακετονιτρίλιο (3a).....	77
Διάγραμμα 5.4: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με οξινομένο διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο (4a).	77
Διάγραμμα 5.5: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με ακετονιτρίλιο καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (1b).....	78

Διάγραμμα 5.6: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (2b)..... 78

Διάγραμμα 5.7: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα οξινισμένο ακετονιτρίλιο καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (3b)..... 78

Διάγραμμα 5.8: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα οξινισμένο διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο και εκχύλιση στερεάς φάσης (3b). 79

Διάγραμμα 5.9: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς οξίνιση (1c)..... 79

Διάγραμμα 5.10: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού με οξίνιση (2c)..... 79

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

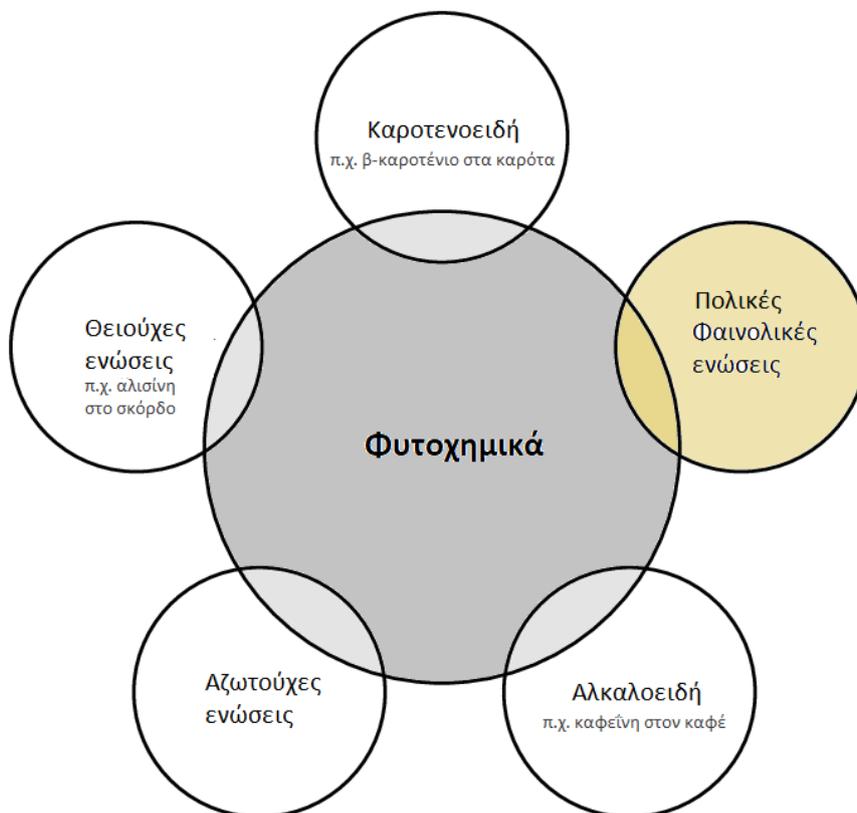
1.1 ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΑ

Πληθώρα κλινικών μελετών έχουν δημοσιεύσει δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η χορτοφαγική διατροφή μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων (π.χ. καρδιαγγειακά νοσήματα, υπέρταση, διαβήτης, καρκίνος). Η ευεργετικότητα των φυτικών προϊόντων οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε απαραίτητα για τον οργανισμό συστατικά, όπως ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, φυτικές ίνες και νερό, αλλά και στην παρουσία φυτοχημικών (Dixit, 2015).

Τα φυτοχημικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών με πολλαπλές λειτουργίες. Προστατεύουν το φυτό από τα βακτήρια, τους ιούς και τους μύκητες. Επιπλέον, τα φυτοχημικά προσδίδουν στα φυτά χρώμα (π.χ. καροτενοειδή), άρωμα (βανιλίνη) και γεύση (καφεΐνη) (Barbieri et al., 2017). Κάποια από αυτά επιδεικνύουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και ορμονική δράση. Δεν είναι θρεπτικές ουσίες δηλαδή δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση του ανθρώπου. Μάλιστα, αντιμετωπίζονται από τον οργανισμό ως ξενοβιοτικά και υπόκεινται σε μεταβολισμό με σκοπό την αποτελεσματική αποβολή τους. Όμως, η κατανάλωση φυτοχημικών μπορεί να έχει ευεργετικές δράσεις για την ανθρώπινη υγεία καθώς μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να καταστέλλουν την φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και την μόλυνση από μικροοργανισμούς. Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποια από αυτά συμβάλλουν στην ρύθμιση της γλυκόζης και της χοληστερόλης στο αίμα και κάποια έχουν ορμονική δράση (Singh, 2016).

Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί πάνω από 100000 φυτοχημικές ουσίες. Οι κύριες ομάδες φυτοχημικών είναι τα αλκαλοειδή, οι θειούχες οργανικές ενώσεις, τα καροτενοειδή, οι αζωτούχες ενώσεις και οι φαινολικές ενώσεις και ταξινομούνται σύμφωνα με τις δομικές και λειτουργικές ομοιότητές τους (Barbieri et al., 2017).

Μια σημαντική ομάδα, αυτή που θα αναλυθεί στη παρούσα μελέτη, είναι οι πολυφαινόλες και ευρύτερα, οι πολικές φαινολικές ενώσεις.



Εικόνα 1.1: Τα φυτοχημικά και οι κύριες ομάδες τους.

1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

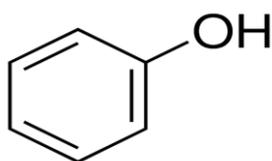
Πριν ονομαστούν «πολυφαινόλες», αυτές οι φυτικής προέλευσης φυσικές ουσίες αποκαλούνταν «φυτικές τανίνες». Διάφορα φυτικά εκχυλίσματα που τις περιέχουν χρησιμοποιήθηκαν από την αρχαιότητα στην βυρσοδεψία (Quideau et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι για πρώτη φορά στην αρχαία Ελλάδα και την Αίγυπτο, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα φλοιών δένδρων και καρπών για να φτιαχτεί ένα διάλυμα που περιείχε φυτικές τανίνες. Εμβαπτιζόμενα τα δέρματα για αρκετό χρονικό διάστημα, αποκτούσαν σημαντικές και επιθυμητές ιδιότητες όπως η ασηψία και η ευκαμψία. Η ιδέα αυτή με το πέρασμα του χρόνου εξελίχθηκε. Σημαντικές βιοτεχνίες και αργότερα βιομηχανίες, αναπτύχθηκαν, ικανοποιώντας βασικές ανάγκες του ανθρώπου, παρέχοντας το δέρμα, ένα υλικό με εξαιρετικές ιδιότητες ποιότητας και αντοχής (Bravo, 2009).

Η χρησιμότητα των τανινών, ενέπνευσε τους επιστήμονες του δεύτερου μισού του 20^{ου} αιώνα, στο να τις μελετήσουν και να ανακαλύψουν την σημαντικότητά τους και σε άλλους τομείς πέρα από την βυρσοδεψία. Σήμερα, η επιστημονική κοινότητα, αλλά και το ευρύτερο κοινό, εστιάζουν όλο και περισσότερο στις πολικές φαινολικές ενώσεις, καθώς η υψηλή

συγκέντρωσή τους στα φρούτα, στα λαχανικά και στα υπόλοιπα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, υποδεικνύει την πιθανή συνεισφορά τους στην υγεία.

1.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι πολικές φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις πιο πολυάριθμες και ευρύτερα καταναμημένες ομάδες ουσιών στο φυτικό βασίλειο, με περισσότερες από 8000 διαφορετικές δομές. Η πληθώρα αυτών των χημικών ενώσεων και οι διαφορετικές χημικές ιδιότητές τους, έχει δυσχεράνει την κατηγοριοποίησή τους από τους επιστήμονες. Με βάση τη δομή τους, οι πολικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν σε απλές και σύνθετες, τις λεγόμενες πολυφαινόλες, ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών ομάδων στην δομή τους. Μια φαινολική ομάδα αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με τουλάχιστον ένα υδροξύλιο.



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση απλής φαινολικής ομάδας με έναν αρωματικό δακτύλιο και μία ομάδα υδροξυλίου (C₆H₅OH).

Επιστρέφοντας στην ονομασία «τανίνες», φαίνεται πως αυτές είναι υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος και αρκετά μεγάλο αριθμό φαινολικών ομάδων, που τους επιτρέπει να αλληλοεπιδρούν μέσω δεσμών υδρογόνου με το κολλαγόνο του δέρματος (Bravo, 2009). Όμως, δεν έχουν όλες οι πολυφαινόλες την δυνατότητα επίδρασης στο ζωικό δέρμα. Επομένως, όλες οι τανίνες ανήκουν στην ομάδα των πολυφαινολών μεν, αλλά, δεν είναι όλες οι πολυφαινόλες τανίνες.

Σύμφωνα με τον Harborne, είναι απαραίτητο για τον ορισμό των πολυφαινολών να συμπεριληφθεί η βιοχημική οδός από την οποία προκύπτουν, καθώς και τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Έτσι, οι Quideau et al., προτείνουν τον εξής ορισμό: «Ο όρος πολικές φαινολικές ενώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, οι οποίοι προέρχονται αποκλειστικά από την βιοσυνθετική οδό του σικιμικού οξέος,

όπου βιοσυντίθενται τα φαινυλοπροπανοειδή, καθώς και από τους μεταβολίτες που προέρχονται από την βιοσυνθετική οδό του μηλονικού οξέος. Διαθέτουν έναν, ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους και δεν διαθέτουν καμία λειτουργική ομάδα που να φέρει άτομο αζώτου στη βασική δομή της.» Κατά αυτόν τον τρόπο, οι πολικές φαινολικές ενώσεις, μπορούν να είναι από απλά μόρια, όπως τα φαινολικά οξέα, έως και πολύπλοκες ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι τανίνες (Quideau et al., 2011).

1.4 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

1.4.1 Γενικά

Λόγω της ποικιλομορφίας και της ευρείας διάδοσής τους στην φύση, πολλοί τρόποι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση των πολικών φαινολικών ενώσεων (Barbieri et al., 2017). Η κατηγοριοποίηση θα μπορούσε να αφορά την δομή τους, την βιολογική τους δράση, την πηγή προέλευσης και την κατανομή τους στην φύση. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος είναι η κατά Harborne κατάταξη των φαινολικών ενώσεων σε τουλάχιστον 10 κατηγορίες με βάση την χημική τους δομή και πιο συγκεκριμένα, του ανθρακικού σκελετού τους (Bravo, 2009).

Μεταξύ των πιο κοινών και σημαντικών πολικών φαινολικών ενώσεων, είναι τα απλά φαινολικά παράγωγα και τα φλαβονοειδή.

Στα φαινολικά παράγωγα ταξινομούνται ανάλογα με τις ομοιότητες του ανθρακικού σκελετού τους, οι απλές φαινολικές ενώσεις και οι βενζοκινόνες (C_6), τα φαινολικά οξέα (C_6-C_1), τα στυλβένια ($C_6-C_2-C_6$), οι λιγνάνες, οι νεολιγνάνες (C_6-C_3)₂, οι λιγνίνες (C_6-C_3)_n, τα φαινυλαιθανοειδή, οι φαινυλαλδεΐδες (C_6-C_2), κ.α.

Τα φλαβονοειδή ($C_6-C_3-C_6$) αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα πολικών φαινολικών ενώσεων, η οποία υποδιαιρείται σε 13 κατηγορίες ανάλογα με την βασική χημική δομή τους. Αυτές είναι: οι χαλκόνες, οι διυδροχαλκόνες, οι χρυσόνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες, οι διυδροφλαβονόλες, οι φλαβανόνες, φλαβονοδιόλες, οι ανθοκυανιδίνες, τα ισοφλαβονοειδή, τα διφλαβονοειδή και οι προανθοκυανιδίνες, ή αλλιώς συμπυκνωμένες τανίνες (Bravo, 2009).

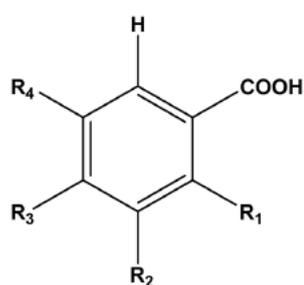
Από τα παραπάνω, θα αναλύσουμε περαιτέρω τα φαινολικά οξέα, κάποια φλαβονοειδή, τα στυλβένια, τις λιγνάνες, τις λιγνίνες, τα φαινυλαιθανοειδή και τις φαινυλαλδεΐδες.

1.4.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα βρίσκονται σε αφθονία στη φύση. Χωρίζονται σε υποομάδες όπως: α) τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (ανθρακικός σκελετός C₆-C₁) β) τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος (ανθρακικός σκελετός C₆-C₃), η χημική δομή των οποίων φαίνεται στους πίνακες 1.1 και 1.2. Μια άλλη κατηγορία φαινολικών οξέων είναι αυτή των φαινυλοξικών οξέων, δηλαδή υποκατεστημένων με φαινολικό πυρήνα οξικών οξέων. Ενώ τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν πολλά ελεύθερα φαινολικά οξέα, στα δημητριακά και στους σπόρους τα φαινολικά οξέα είναι συχνά σε δεσμευμένη μορφή. Τα παραπάνω, μπορούν να αποδεσμευτούν με όξινη ή αλκαλική υδρόλυση ή με την δράση ενζύμων (Tsaο, 2010).

Παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέος απαντώνται σε ορισμένα κόκκινα φρούτα, στο μαύρο ραπανάκι, και στα κρεμμύδια. Κάποια από αυτά, όπως το γαλλικό οξύ, απαντώνται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Αναφορικά με τα παράγωγα υδροξυκινναμωμικού οξέος οι κύριοι εκπρόσωποί τους είναι το p-κουμαρικό, το καφεϊκό, το φερουλικό και το σιναπικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ είναι το πιο διαδεδομένο φαινολικό οξύ στα περισσότερα φρούτα και εντοπίζεται κυρίως στο εξωτερικό τμήμα των ώριμων φρούτων. Το φερουλικό οξύ περιέχεται σε μεγάλες ποσότητες στο περικάρπιο και την σιβάδα αλευρόνης του σιταριού (0,8-2 g / kg) με αποτέλεσμα ο βαθμός άλεσης να επηρεάζει άμεσα την περιεκτικότητα του στα διάφορα άλευρα (Manach et al., 2004).

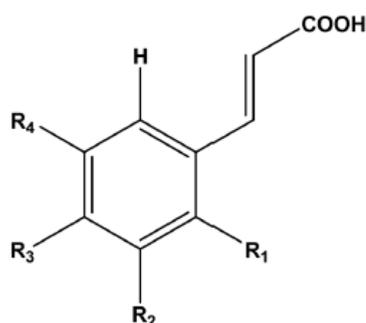
Πίνακας 1.1: Δομή βενζοϊκού οξέος και των παραγώγων του (Stalikas, 2007).



Hydroxybenzoic Acids

Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Benzoic acid	H	H	H	H
p-Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H
Vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H
Gallic acid	H	OH	OH	OH
Protocatechuic acid	H	OH	OH	H
Syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gentisic acid	OH	H	H	OH
Veratric acid	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Salicylic acid	OH	H	H	H

Πίνακας 1.2: Δομή κινναμωμικού οξέος και των παραγώγων του (Stalikas, 2007).



Hydroxycinnamic Acids

Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cinnamic acid	H	H	H	H
<i>o</i> -Coumaric acid	OH	H	H	H
<i>m</i> -Coumaric acid	H	OH	H	H
<i>p</i> -Coumaric acid	H	H	OH	H
Ferulic acid	H	OCH ₃	OH	H
Sinapic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Caffeic acid	H	OH	OH	H

1.4.3 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο πολυποίκιλη και διαδεδομένη κατηγορία των πολικών φαινολικών ενώσεων. Η κοινή τους χημική δομή είναι αυτή του διφαινυλοπορπανίου (C₆-C₃-C₆) και αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (C₆), συνδεδεμένους μέσω τριών ανθρακοατόμων που συνήθως σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (Branco, 2009). Τα φλαβονοειδή μπορούν να υποδιαιρεθούν σε 13 ομάδες εκ των οποίων θα αναφερθούμε στις 6 βασικότερες: τις φλαβονόλες, τις φλαβόνες, τις φλαβανόνες, τις ισοφλαβόνες, τις φλαβανόλες και τις ανθοκυανίνες.

Οι φλαβονόλες είναι τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή στα τρόφιμα, και οι κύριοι εκπρόσωποί τους είναι η κερκετίνη, η μυρισετίνη και η καμπφερόλη. Εντοπίζονται γενικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα περισσότερα φυτά (1-30 mg/kg φρέσκου τροφίμου) και σχεδόν πάντα σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (συνδεδεμένα με γλυκόζη, ραμινόζη κ.α.). Γλυκοζίτες φλαβονολών είναι για παράδειγμα η αστραγαλίνη, η ισοκερκετίνη και η ρουτίνη. Οι πιο πλούσιες πηγές είναι τα κρεμμύδια, οι λαχανίδες, το πράσο, το μπρόκολο και το τσάι. Το κόκκινο κρασί και το τσάι περιέχουν επίσης έως και 45 mg φλαβονολών ανά λίτρο. Οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στο εξωτερικό μέρος των ιστών γιατί η βιοσύνθεσή τους διεγείρεται από την ηλιακή ακτινοβολία (Manach et al., 2004).

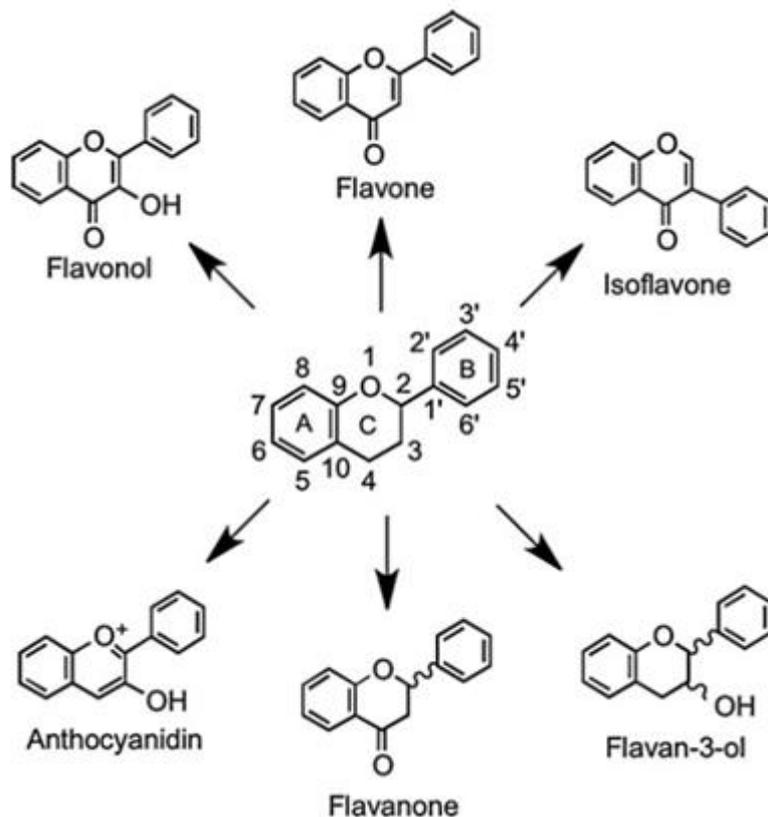
Οι φλαβόνες απαντώνται κυρίως ως εστέρες λουτεολίνης και απιγενίνης. Οι μόνες σημαντικές εδώδιμες πηγές φλαβονών είναι ο μαϊντανός, το σέλινο και το κεχρί.

Οι φλαβανόνες είναι γενικά γλκοζυλιωμένες, που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο λευκό σπογγώδες των εσπεριδοειδών. Κύριες φλαβανόνες είναι η ναρινγκενίνη στο γκρέιπφρουτ, η εσπερετίνη στα πορτοκάλια και η εριοδικτυόλη στα λεμόνια.

Οι ισοφλαβόνες έχουν δομικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και κατατάσσονται στα φυτο-οιστρογόνα. Έχει προταθεί ότι οι ψευδο-ορμονικές ιδιότητές τους, σε συνδυασμό με την αντιοξειδωτική τους δράση, βοηθούν στην πρόληψη της καρκινογένεσης. Οι ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη και η δαΐσδεΐνη βρίσκονται κυρίως στη σόγια και στα προϊόντα της (Tsao, 2010).

Οι φλαβανόλες, ή αλλιώς φλαβανο-3-όλες, βρίσκονται τόσο σε μονομερή (κατεχίνες) όσο και σε πολυμερή μορφή (προανθοκυανιδίνες). Βρίσκονται σε αφθονία στις μπανάνες, στα μήλα, στα βατόμουρα, στα ροδάκινα και στα αχλάδια. Οι μονομερείς φλαβανόλες (κατεχίνη και επικατεχίνη) και τα παράγωγά τους (π.χ., οι γαλλοκατεχίνες) είναι τα κύρια φλαβονοειδή στα φύλλα τσαγιού και στους κόκκους κακάο. Η κατεχίνη και η επικατεχίνη μπορούν να σχηματίσουν πολυμερή, τα οποία συχνά αναφέρονται ως προανθοκυανιδίνες. Αυτές είναι εν μέρη υπεύθυνες για τη στυφή γεύση πολλών τροφίμων όπως της μπύρας, των σταφυλιών, του κρασιού και του τσαγιού όπως και της πικρής γεύσης της σοκολάτας.

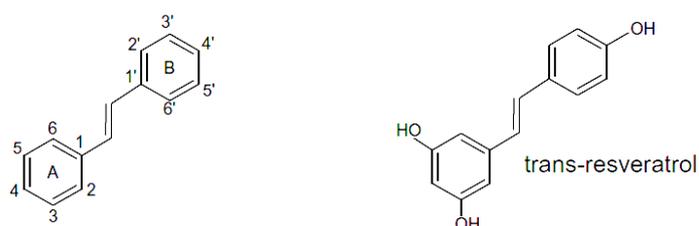
Οι ανθοκυανιδίνες είναι χρωστικές που προσδίδουν το ροζ, το κόκκινο, το μπλε, ή και το μωβ χρώμα στα φυτά, τα λουλούδια και τα φρούτα. Η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η μαλβιδίνη, η πελαργονιδίνη και η πεονιδίνη είναι οι πιο μελετημένες ανθοκυανίνες. Εμφανίζονται σε διάφορα φρούτα όπως στα φρούτα του δάσους, ποικιλίες κόκκινων σταφυλιών και σε άλλα τρόφιμα όπως η μελιτζάνα, τα φασόλια, τις γλυκοπατάτες καθώς και το κόκκινο κρασί (Panche et al., 2016).



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση του σκελετού των φλαβονοειδών και των υποκατηγοριών τους (Del Rio et al., 2013).

1.4.4 Στιλβένια

Τα στιλβένια ($C_6-C_2-C_6$) συντίθενται από το κινναμωμικό οξύ. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε φαρμακευτικά φυτά και έχει μελετηθεί για την αντικαρκινική της δράση. Περιέχεται επίσης και στο κόκκινο κρασί (Scalbert & Williamson, 2018).

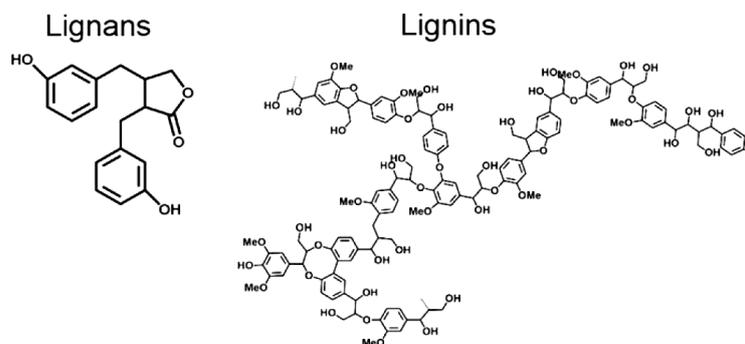


Εικόνα 1.4: Απεικόνιση του σκελετού των στιλβένιων και της *trans*-ρεσβερατρόλης (Fraga et al., 2010).

1.4.5 Λιγνάνες και Λιγνίνες

Οι λιγνάνες (C_6-C_3)₂, συντίθενται από δύο μόρια φαινυλπροπανόλης και κατατάσσονται στα φυτο-οιστρογόνα όπως και οι ισοφλαβόνες. Πολλές φαινολικές ενώσεις που εντάσσονται στην ομάδα των λιγνάνων εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στον λιναρόσπορο (έως 3,7 g/kg ξηρού βάρους). Άλλα δημητριακά, σιτηρά, φρούτα (κυρίως δαμάσκηνα, αχλάδια) και ορισμένα λαχανικά (σκόρο, καρότο, σπαράγγια) περιέχουν επίσης λιγνάνες (Tsao, 2010).

Οι λιγνίνες (C_6-C_2)_n είναι σύνθετα φαινολικά πολυμερή που σχηματίζονται από τρεις κύριους τύπους μονολιγνολών (σιναφυλ-αλκοόλη, κωνφερυλική αλκοόλη και π-κουμαρυλική αλκοόλη). Ενισχύουν την ακαμψία και τις υδρόφοβες ιδιότητες των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων εμποδίζοντας έτσι την είσοδο παθογόνων και παρασίτων στα φυτά (Liu et al., 2021).



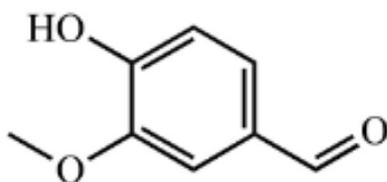
Εικόνα 1.5: Απεικόνιση του σκελετού των λιγνάνων (αριστερά) και λιγνινών (δεξιά) (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

1.4.6 Φαινυλαιθανοΐδη και φαινυλαλδεΐδες

Στα φαινυλαιθανοΐδη (C_6-C_2) ανήκουν οι φαινολικές ενώσεις τυροσόλη, 3-υδροξυ-τυροσόλη και ελευρωπαΐνη. Οι παραπάνω πολικές φαινολικές ανευρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο και σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, κ.α. ευεργετικές ιδιότητες του (Καρκονίε et al., 2019).

Η πιο μελετημένη φαινυλαλδεΐδη (C_6-C_2) είναι η βανιλίνη, η οποία απαντάται στην βανίλια. Η βανιλίνη χρησιμοποιείται ευρέως ως αρωματικός παράγοντας στην βιομηχανία τροφίμων, αλλά και σε φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά. Η ένωση αυτή, καθώς και οι

βασικοί τις μεταβολίτες (βανιλλικό οξύ και βανιλλική αλκοόλη) έχουν μελετηθεί για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους (Bezerra-Filho et al., 2019).



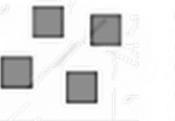
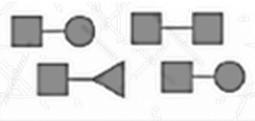
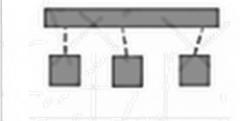
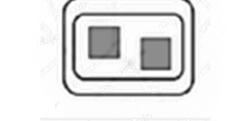
Εικόνα 1.6: Απεικόνιση χημικής δομής Βανιλίνης (Bezerra-Filho et al., 2019).

1.4.7 Διαλυτή και αδιάλυτη μορφή των πολικών φαινολικών ενώσεων

Γενικά, στα φυτά οι πολικές φαινολικές ενώσεις εμφανίζονται σε ελεύθερη (διαλυτή), ή συνδεδεμένη (αδιάλυτη) μορφή. Οι ελεύθερες φαινολικές ενώσεις δεν αλληλοεπιδρούν με άλλα μόρια και μπορούν να διαλυθούν σε πολικούς οργανικούς διαλύτες. Εντοπίζονται στα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων, όπου υπάρχει χαμηλό pH λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης οργανικών οξέων (Bravo, 2009).

Στα φυτικά κύτταρα οι φαινολικές ενώσεις κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους απαντώνται σε αδιάλυτη μορφή. Είναι δεσμευμένες δηλαδή από ένα, ή περισσότερα παράγωγα απλών σακχάρων, τα οποία συνδέονται με τις υδροξυλομάδες, ή με ένα άτομο άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Τα συνδεδεμένα σάκχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, με πιο κοινή τη γλυκόζη, δισακχαρίτες, ακόμα και ολιγοσακχαρίτες. Συχνά ανευρίσκονται και σε σύνδεση με ενώσεις όπως καρβοξυλικά και οργανικά οξέα, αμίνες, πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλες φαινόλες. Οι πολικές φαινολικές ενώσεις αδιάλυτης μορφής εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων και τους δομικούς και τους προστατευτικούς ιστούς του φυτού, όπως το περικάρπιο και το εξωτερικό τοίχωμα του σπόρου.

Ο διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων σε διαλυτές και αδιάλυτες είναι πολύ χρήσιμος για την μελέτη τους σε διατροφικό επίπεδο, καθόσον αυτές έχουν διαφορετική μεταβολική πορεία στο γαστρεντερικό σύστημα και διαφορετική επίδραση στη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού (Wang et al., 2020).

Ελεύθερες (Διαλυτές)	Συνδεδεμένες (Αδιάλυτες)			
	Χημικά δεσμευμένες		«Παγιδευμένες»	
	με μακρομόρια μέσω ομοιοπολικών δεσμών	στο υπόστρωμα μέσω ιοντικών δεσμών	σε φυσικές δομές π.χ. φυτικών ινών	μέσα στο αέριο φυτικό κύτταρο
				

Εικόνα 1.7: Τρόποι με τους οποίους μπορεί να βρίσκονται οι φαινολικές ενώσεις στα βρώσιμα φυτά. Οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να είναι χημικά δεσμευμένες με άλλες ενώσεις και μέρη του κυττάρου, αλλά και παγιδευμένες μέσα στα κύτταρα, ή σε δομές φυτικών ινών (Wang et al., 2020).

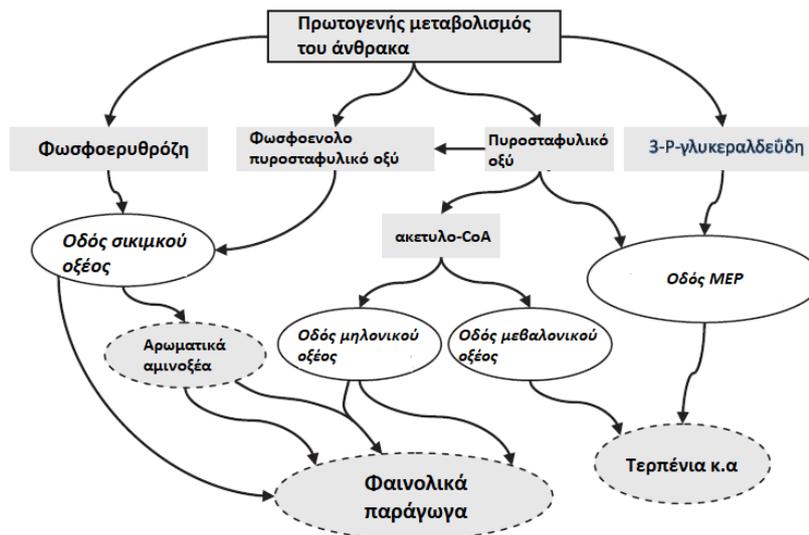
1.5 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε στον ορισμό κατά Harborne οι πολικές φαινολικές ενώσεις είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και συντίθενται από την μεταβολική πορεία του σικιμικού οξέος και του μηλονικού οξέος. Μέσω της φωτοσύνθεσης και του κύκλου του Calvin, τα φυτά μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας σε υδατάνθρακες. Κατά τον πρωτογενή μεταβολισμό των φυτών, οι υδατάνθρακες αυτοί συμμετέχουν στην γλυκόλυση και στην οδό των φωσφοπεντοζών, δύο καταβολικές πορείες των φυτικών κυττάρων από τις οποίες προκύπτουν τα πρόδρομα μόρια των φαινολικών ενώσεων. Από την καταβολική πορεία της γλυκόλυσης προκύπτει το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ και έπειτα το πυροσταφυλικό οξύ. Το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ εισέρχεται στη πορεία του σικιμικού οξέος, ενώ το πυροσταφυλικό οξύ εισέρχεται στη πορεία του μηλονικού οξέος, αφού πρώτα μετατραπεί σε ακέτυλο-CoA. Από την πορεία των φωσφοπεντοζών και την διάσπαση της γλυκόζης σε αυτή, προκύπτει η 4-φωσφοερυθρόζη, η οποία και αυτή εισέρχεται στην πορεία του σικιμικού οξέος.

Στη πορεία του σικιμικού οξέος οι παραπάνω ενώσεις μετατρέπονται στα αρωματικά αμινοξέα φαινυλαλαίνη και τυροσίνη, που αποτελούν πρόδρομα μόρια ορισμένων πολυφαινολικών ενώσεων, όπως του p-κουμαρικού οξέος, των κουμαρινών, του καφεϊκού οξέος και των παραγώγων του βενζοϊκού οξέος. Τα флаβονοειδή συντίθεται με τον συνδυασμό των μεταβολικών πορειών του σικιμικού και το μηλονικού οξέος (Harborne, 1989).

Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 1.1**, στην σύνθεση των φυτικών φαινολικών ενώσεων μπορεί να συμμετέχουν πολλά διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια και ως εκ τούτου να προκύπτουν χημικές ενώσεις με πληθώρα χημικών δομών. Η ποικιλία των χημικών τους δομών σχετίζεται με τις ποικίλες λειτουργίες τους στα φυτά. Ορισμένες πολυφαινόλες προσφέρουν μηχανική στήριξη και συμμετέχουν στην αρχιτεκτονική των φυτών, ενώ άλλες προστατεύουν τα φυτά από την υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία. Μερικές πολυφαινόλες προσελκύουν έντομα επικονιαστές, που θα διασκορπίσουν τους σπόρους του φυτού, ενώ άλλες καταστέλλουν την ανάπτυξη κοντινών ανταγωνιστικών φυτών. Οι φαινολικές ενώσεις συμμετέχουν στον αμυντικό μηχανισμό των φυτών, δρουν ενάντια στο βιοτικό και το αβιοτικό stress, συνεισφέρουν στην επούλωση τραυματισμών, εκδηλώνουν αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες και παρέχουν προστασία ενάντια στα φυτοφάγα ζώα και στους διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (Harborne, 1989). Τέλος, οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για πολλές οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των φυτών. Η στυφάδα και η πικρία πολλών τροφίμων και ποτών εξαρτώνται από την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις (Bravo, 2009).

Τα επαγόμενα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στη φύση. Οι φαινολικές ενώσεις αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής ύλης μετά την κυτταρίνη και αποτελούν περίπου το 40% του οργανικού άνθρακα της βιόσφαιρας. Τα αγγειόσπερμα θα ήταν αδύνατον να εξελιχθούν έτσι ώστε να κυριαρχήσουν στην γη χωρίς τις φαινολικές ενώσεις, που τα προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία και που παράγουν επιδερμικούς φραγμούς μετά από τραυματισμό, ελαχιστοποιώντας έτσι την απώλεια νερού (Harborne, 1989).



Σχήμα 1.1: Απεικόνιση των βιοσυνθετικών οδών του δευτερογενούς μεταβολισμού προς τον σχηματισμό των φαινολικών ενώσεων (Saltveit, 2017).

1.6 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ

Οι φαινολικές ενώσεις υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στα φυτικά τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τα λαχανικά, τα όσπρια, τα φρούτα, τους ξηρούς καρπούς και στα επεξεργασμένα τρόφιμα όπως τον χυμό μούρων, το τσάι και το κρασί (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

Οι φαινολικές ενώσεις δεν κατανέμονται ομοιόμορφα στους ιστούς των φυτών. Οι αδιάλυτες φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων, ενώ οι διαλυτές φαινολικές ενώσεις βρίσκονται κυρίως στα κενοτόπια. Επιπλέον, δεν απαντώνται οι ίδιες φαινολικές ενώσεις σε όλα τα φυτά και διαφέρουν και ως προς την συγκέντρωσή τους. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα των παραγώγων του βενζοϊκού οξέος είναι χαμηλή στα περισσότερα βρώσιμα φυτά με εξαίρεση ορισμένα κόκκινα φρούτα, το ραπανάκι και τα κρεμμύδια. Αντίθετα, τα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ, το φερούλικό οξύ και το p-κουμαρικό οξύ, είναι πιο κοινά, εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φρούτων και η συγκέντρωσή τους είναι ιδιαίτερα υψηλή στο εξωτερικό μέρος των ώριμων φρούτων (Manach et al., 2004). Μια άλλη σημαντική παράμετρος είναι η κατανομή των φαινολικών ενώσεων στα διάφορα μέρη του ίδιου φυτού. Οι ενώσεις που βρίσκονται στα φύλλα μπορεί να είναι διαφορετικές από αυτές που υπάρχουν στα λουλούδια, στα στελέχη,

στις ρίζες, ή και στους καρπούς. Ακόμη και όταν είναι κατανεμημένες σε όλο το φυτό οι ίδιες φαινολικές ενώσεις, η συγκέντρωσή τους σε διάφορα μέρη μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Στο φυτό κичώριο, η υδροξυκουμαρίνη βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα άνθη (1,65% του ξηρού βάρους) σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα (0,05%) και απουσιάζει εντελώς από τις ρίζες (Saltveit, 2017). Στα εσπεριδοειδή δε, μόνο το 1/5 της περιεκτικότητας των φλαβανονών βρίσκεται στον χυμό του φρούτου, γεγονός που δείχνει ότι η κατανάλωση ολόκληρου του φρούτου είναι πιο ωφέλιμη.

Υπάρχουν φαινολικές ενώσεις, όπως η κερκετίνη, που απαντώνται σε μεγάλη ποικιλία φυτικών προϊόντων, π.χ. φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, χυμοί φρούτων, τσάι, κρασί, αφεψήματα, ενώ άλλες ανευρίσκονται μόνο σε αφθονία σε συγκεκριμένα τρόφιμα, όπως οι φλαβανόνες στα εσπεριδοειδή και οι ισοφλαβόνες στη σόγια. Στα περισσότερα τρόφιμα περιέχονται σύνθετα μείγματα φαινολικών ενώσεων, τα οποία δεν έχουν αναγνωριστεί ή μελετηθεί εκτενώς (Manach et al., 2004).

Όπως προαναφέρθηκε, η περιεκτικότητα των φυτικών τροφίμων σε πολικές φαινολικές ενώσεις διαφέρει από είδος σε είδος. Στα όσπρια και στα δημητριακά οι κύριες φαινολικές ενώσεις είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι τανίνες. Η συγκέντρωση τους στα δημητριακά είναι συνήθως μικρότερη από 1% της ξηρής βάσης, εκτός από μερικές ποικιλίες σόργου, οι οποίες μπορούν να έχουν έως και 10%. Στα όσπρια, οι σκουρόχρωμες ποικιλίες, όπως τα κόκκινα και τα μαύρα φασόλια, έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Τα λαχανικά αποτελούν κυρίως πηγή γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών (Bravo, 2009).

Εκτός από το είδος των φυτών, η περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων φαίνεται ότι επηρεάζεται από πολλούς άλλους παράγοντες, όπως η επεξεργασία του βρώσιμου φυτού πριν την κατανάλωση, το επίπεδο ωρίμανσης του την στιγμή της συγκομιδής και η μεταγενέστερη αποθήκευση του. Για παράδειγμα, το απλό ξεφλούδισμα των φρούτων και λαχανικών μπορεί να εξαλείψει ένα σημαντικό μέρος των πολικών φαινολών, καθώς αυτές οι ουσίες υπάρχουν συχνά σε υψηλότερη συγκέντρωση στα εξωτερικά μέρη του φυτού, απ' ό,τι στα εσωτερικά (Manach et al., 2004). Επίσης, η συγκέντρωση των φαινολικών οξέων μειώνεται όσο ωριμάζει το τρόφιμο, ενώ αντίθετα αυξάνεται η συγκέντρωση των ανθοκυανινών.

Κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία των τροφίμων πραγματοποιούνται οξειδωτικές αντιδράσεις οι οποίες επηρεάζουν την ποιότητά τους, καθώς και κάποια οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Οι αντιδράσεις αυτές μπορεί να φέρουν επιθυμητά, ή ανεπιθύμητα αποτελέσματα στα τρόφιμα. Για παράδειγμα, οι οξειδωτικές αλλαγές, όπως το μαύρισμα του κακάο κατά την επεξεργασία του, ή ο οξειδωτικός πολυμερισμός των

πολυφαινολών του τσαγιού κατά την διάρκεια της παρασκευής του μαύρου τσαγιού, έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία ωφέλιμων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Αντίθετα, οι ενζυματικές και οι μη ενζυματικές αντιδράσεις αμαύρωσης που επάγονται από την δράση της φαινολοξειδάσης είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ανεπιθύμητου χρώματος και κακής γεύσης στα λαχανικά (Bravo, 2009). Το μαγείρεμα επίσης επιδρά αρνητικά στο περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις. Το ποσοστό απώλειάς τους από τα τρόφιμα λόγω του μαγειρέματος υπολογίζεται ότι είναι 41% μετά από βρασμό, 33% μετά από μαγείρεμα στον ατμό και 50% μετά από τηγάνισμα (Huang et al., 2020).

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επιδρούν σημαντικά στην περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων στα φυτά. Μελέτες έχουν δείξει ότι βιολογικά λαχανικά που έχουν καλλιεργηθεί σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος, έχουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα φαινολικών ενώσεων σε σχέση με λαχανικά που έχουν αναπτυχθεί σε συμβατές, προστατευμένες, μη στρεσογόνες συνθήκες θερμοκηπίου (Manach et al., 2004). Βέβαια υπάρχουν πολλές ακόμα μελέτες στις οποίες η βιολογική καλλιέργεια δεν έχει συσχετιστεί με αυξημένο περιεχόμενο σε πολικές φαινόλες.

Αν και οι φαινολικές ενώσεις είναι τόσο σημαντικές για την ανάπτυξη των φρούτων και των λαχανικών μια υπερπαραγωγή και υπερβολική συσσώρευσή τους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος χαμηλής ποιότητας. Το υψηλό επίπεδο φαινολικών ενώσεων ορισμένων φρούτων και λαχανικών (π.χ. μήλα και πατάτες) προκαλεί τον αποχρωματισμό τους, όταν υποβάλλονται σε υψηλό στρες, που οδηγεί σε κυτταρική αποδιαμερισματοποίηση (Harborne, 1989).

1.7 ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Εκτός από την τον ρόλο τους στην φυσιολογία των φυτών, οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν σημαντικό τμήμα της ανθρώπινης διατροφής παρόλο που εντάσσονται στα μη θρεπτικά συστατικά των τροφών. Εφόσον είναι διαδεδομένες στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, καταναλώνονται καθημερινά από τον πληθυσμό. Υπολογίζεται ότι το εύρος πρόσληψης των φαινολικών ενώσεων κυμαίνεται από 25 mg έως 1 g ημερησίως (Stalikas, 2007).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής μεταξύ του 2007 και του 2016 από τους Qiushi Huang et. al., καταγράφηκε η 24ωρη διαιτητική πρόσληψη

ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος πληθυσμού με σκοπό τον υπολογισμό της ημερήσιας πρόσληψης φαινολικών ενώσεων. Τα αποτελέσματα δείχναν ότι η συνήθης πρόσληψη ήταν κατά μέσο όρο 884 mg ανά 1000 kcal τροφής με κύριες πηγές τα φαινολικά οξέα (1006 mg/ημέρα) και τα флаβονοειδή (379 mg/ημέρα). Το 40% της φαινολικής πρόσληψης προέρχονταν από την κατανάλωση καφέ, το 10% από όσπρια και το 8% από το τσάι. Τα παραπάνω ευρήματα συμβαδίζουν με την αμερικάνικη δίαιτα η οποία είναι φτωχή σε φρούτα, λαχανικά και σιτηρά ολικής άλεσης. Στον **Πίνακα 1.3** αναγράφεται η μέση πρόσληψη φαινολικών ενώσεων ανά ομάδα πληθυσμού που ερευνήθηκε (Huang et al., 2020).

Σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον ελληνικό πληθυσμό, η συνολική ημερήσια πρόσληψη φαινολικών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένου και των λιποδιαλυτών φαινολικών της διατροφής) υπολογίστηκε ότι ήταν 1306 mg με κύριες πηγές τα φρούτα, τα λαχανικά και τα μπαχαρικά (Dilis & Trichoroulou, 2010).

Λίγες μόνο πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις ποσότητες των φαινολικών ενώσεων που καταναλώνονται ανά ομάδα. Οι Manach, et al. (Manach et al., 2004) έδωσαν δεδομένα σχετικά με τη κατανάλωση διαφόρων κατηγοριών φαινολικών ενώσεων στον κόσμο, κάποια από τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

Οι флаβονόλες είναι οι πιο μελετημένες και η κατανάλωσή τους υπολογίζεται στα 20–25 mg/ημέρα στις Ηνωμένες Πολιτείες, τη Δανία και την Ολλανδία. Στην Ιταλία, η μέση κατανάλωσή τους είναι 35 mg/ημέρα. Η πρόσληψη флаβονονών είναι παρόμοια ή πιθανώς υψηλότερη από αυτή των флаβονολών. Για παράδειγμα, η μέση κατανάλωση εσπερετίνης στη Φινλανδία είναι 28 mg /ημέρα. Οι флаβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, στην μέντα, αλλά κυρίως στα εσπεριδοειδή. Η πρόσληψη των флаβανονών είναι πιθανώς μεγαλύτερη σε περιοχές που παράγονται εσπεριδοειδή και τομάτες, όπως η νότια Ευρώπη.

Η κατανάλωση ανθοκυανινών μελετήθηκε στη Φινλανδία, όπου καταναλώνονται υψηλές ποσότητες μούρων και παρατηρήθηκαν τιμές κατά μέσο όρο 82 mg/ημέρα, αν και ορισμένες περιπτώσεις ξεπέρασαν τα 200 mg/ημέρα. Στην Ισπανία η συνολική κατανάλωση κατεχινών, καθώς και διμερών και τριμερών προανθοκυανιδίνης έχει υπολογίζεται σε 18–31 mg/ημέρα. Κύριες πηγές είναι τα μήλα, τα αχλάδια, τα σταφύλια και το κόκκινο κρασί.

Η κατανάλωση σόγιας στις ασιατικές χώρες είναι 10–35 g/ημέρα, που ισοδυναμεί με μέση πρόσληψη 25–40 mg ισοφλαβονών/ημέρα, με μέγιστη πρόσληψη 100 mg/ημέρα. Οι Αμερικανοί και οι Ευρωπαίοι που καταναλώνουν λίγη σόγια, προσλαμβάνουν μικρή ποσότητα ισοφλαβονών. Είναι γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια εντάσσονται όλο και περισσότερα

προϊόντα σόγιας στην αγορά και η χρήση της στην βιομηχανία τροφίμων αυξάνεται, πράγμα που ενδέχεται να αλλάξει τα παραπάνω δεδομένα.

Η πρόσληψη υδροξυκιναμωμικών οξέων ποικίλλει πολύ, ανάλογα με την κατανάλωση καφέ. Μερικά άτομα που πίνουν πολλά φλιτζάνια την ημέρα μπορεί να προσλαμβάνουν έως και 500–800 mg υδροξυκιναμικό οξύ/ημέρα, ενώ άτομα που δεν πίνουν καφέ και δεν καταναλώνουν εναλλακτικές πηγές όπως φρούτα και λαχανικά, προσλαμβάνουν έως και μόνον 25 mg/ημέρα.

Λόγω του μεγάλου αριθμού των φαινολικών ενώσεων και των πολλών παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν την συγκέντρωσή τους στα τρόφιμα, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα όσον αφορά την περιεκτικότητά τους στα διάφορα τρόφιμα, όπως υπάρχουν για παράδειγμα για τις βιταμίνες. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός της ημερήσιας πρόσληψής τους. Κατόπιν, η ημερήσια πρόσληψη των φαινολικών ενώσεων θα μπορούσε να συσχετιστεί με την συχνότητα εμφάνισης ορισμένων ασθενειών και να διερευνηθεί ο προστατευτικός ρόλος τους (Manach et al., 2004).

Πίνακας 1.3: Διαιτητική πρόσληψη φαινολικών ενώσεων ανά 1000 kcal διατροφής ημερησίως σε ενήλικες των Η.Π.Α ηλικίας 20 ετών και άνω, 2007-2016 (Huang et al., 2020).

Variable	2007-2008	2009-2010	2011-2012	2013-2014	2015-2016	P for trend
	<i>mg per 1,000 kcal/d, mean (standard error)</i>					
Overall	903.8 (54.0)	905.9 (24.3)	876.8 (38.3)	873.1 (30.7)	887.2 (29.4)	0.79
Age						
20-39 y	581.1 (23.8)	626.5 (25.1)	562.6 (33.5)	587.4 (33.6)	650.2 (32.4)	0.38
40-59 y	1,069.2 (103.8)	1,042.3 (30.0)	980.6 (67.5)	981.5 (36.2)	988.4 (48.0)	0.38
60+ y	1,129.2 (66.8)	1,096.9 (35.2)	1152.3 (40.6)	1093.5 (43.8)	1047.3 (43.6)	0.51
Sex						
Male	835.7 (43.6)	837.9 (32.1)	853.8 (59.0)	793.0 (31.6)	843.1 (28.5)	0.80
Female	966.5 (70.0)	971.0 (30.8)	899.4 (32.9)	951.7 (37.8)	929.4 (40.8)	0.70
Race/Hispanic origin						
Non-Hispanic White	1,001.8 (66.6)	1,007.6 (30.2)	977.7 (41.3)	973.7 (38.4)	989.0 (34.2)	0.51
Non-Hispanic Black	498.0 (21.5)	555.9 (42.4)	514.5 (35.9)	543.5 (26.6)	518.0 (28.0)	0.32
Hispanic origin	710.4 (31.1)	714.8 (29.4)	686.1 (31.0)	684.6 (35.1)	679.3 (25.6)	0.81
Other	933.7 (80.8)	833.8 (52.9)	888.9 (58.7)	861.7 (47.7)	941.8 (78.0)	0.62
Education						
Less than high school	1,074.7 (170.5)	860.9 (35.7)	767.1 (37.1)	891.9 (108.4)	731.6 (50.5)	0.11
High school or equivalent	833.4 (45.7)	874.2 (32.3)	850.4 (84.5)	792.2 (51.8)	857.0 (73.3)	0.64
Some college	844.0 (53.4)	849.2 (46.3)	862.8 (62.1)	848.2 (46.0)	888.4 (27.5)	0.53
College or above	910.7 (52.0)	1026.3 (39.1)	966.4 (49.3)	952.0 (54.2)	972.8 (51.0)	0.75
Body mass index						
<25	983.5 (90.0)	909.6 (38.3)	835.7 (38.1)	869.9 (35.5)	852.5 (35.5)	0.92
25-29.9	908.4 (60.0)	951.1 (31.8)	926.9 (53.3)	897.9 (43.0)	949.2 (35.7)	0.76
≥30	825.5 (53.2)	862.2 (32.8)	866.0 (51.8)	854.2 (58.3)	859.3 (40.9)	0.61

1.8 ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

1.8.1 Αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Υπάρχουν αξιολογα επιδημιολογικά στοιχεία που δείχνουν ότι μια διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά συμβάλει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης πολλών χρόνιων ασθενειών. Τα ευεργετικά αποτελέσματα αποδίδονται συχνά στις φαινολικές ενώσεις που περιέχουν τα τρόφιμα αυτά και την αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιθρομβωτική και κυρίως αντιφλεγμονώδη δράση τους (Del Rio et al., 2013). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής πρόσληψης πολυφαινολών και της μείωσης του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, διαβήτη τύπου II, καρκίνου και νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές στη διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στις ομάδες υδροξυλίου και τις αρωματικές δομές, οι οποίες δρουν ως αναγωγικές ουσίες και είναι σε θέση να αδρανοποιήσουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την ανεπάρκεια της ενδογενούς αντιοξειδωτικής απάντησης του οργανισμού και οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών, μπορεί να προκαλέσει βλάβη σημαντικών κυτταρικών στοιχείων, όπως των λιπιδίων, του DNA και των πρωτεϊνών. Υπάρχει μια ισχυρή σχέση μεταξύ του αυξημένου οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής (Fraga et al., 2010).

Η φλεγμονή είναι μια περίπλοκη διαδικασία ανοσοαπόκρισης που χαρακτηρίζεται από την διαδοχική απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η αναστολή της παραγωγής κυτοκινών, όπως της ιντερλευκίνης 1b (IL-1b), της ιντερλευκίνης IL-6 και του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-a), καθώς και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως του μονοξειδίου του αζώτου (NO), μπορεί να αποτρέψει, ή να καταστείλει ασθένειες που προκαλούνται από την χρόνια συστηματική φλεγμονή. Οι πολικές φαινολικές ενώσεις φαίνεται να παρεμβαίνουν στις φλεγμονώδεις διαδικασίες του οργανισμού. Οι Lau et al. (2007) διερεύνησαν την προληπτική δράση των πολυφαινολών των βατόμουρων ενάντια στην οξεία φλεγμονώδη απάντηση των μικρογλοιακών κυττάρων. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η χορήγηση εκχυλίσματος βατόμουρου ανέστειλε την παραγωγή NO, IL-1b και TNF-a στα παραπάνω κύτταρα (Zhu et al., 2018).

Πολλές χρόνιες παθήσεις συσχετίζονται με τις συστηματικές προφλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού που κινητοποιούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Οι κυριότερες είναι

τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης II, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Santhakumar et al., 2018).

1.8.2 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι ένας γενικός όρος που αφορά διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας και των αιμοφόρων αγγείων. Χαρακτηρίζονται από την αθηροσκλήρωση δηλαδή την εναπόθεση λιπιδίων στα τοιχώματα των αρτηριών και την δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Η δημιουργία των αθηρωματικών πλακών περιλαμβάνει μια σειρά από γεγονότα τα οποία αρχίζουν με την εμφάνιση τοπικής βλάβης στο ενδοθήλιο και την οξείδωση της LDL μετά την καταστροφή των ενδογενών αντιοξειδωτικών της. Η οξείδωση των φωσφολιπιδικών συστατικών της LDL επάγει τον σχηματισμό παραγόντων φλεγμονής και επομένως την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Οι πολικές φαινολικές ενώσεις, μέσω πολλαπλών συνεργιστικών μηχανισμών φαίνεται ότι βοηθούν στην ρύθμιση των ενδοθηλιακών αγγειακών λειτουργιών. Προλαμβάνουν την δημιουργία αθηρομάτωσης με τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, δηλαδή αυξάνοντας την HDL και μειώνοντας την LDL, καθώς και την ολική χοληστερόλη. Πολυφαινολικές ενώσεις, όπως η ρεσβερατρόλη φαίνεται ότι αναστέλλουν το σύμπλοκο NADPH-οξειδάση και την έκκριση NO. Επίσης, τα φαινολικά οξέα που περιέχονται στο ελαιόλαδο έχει φανεί ότι μειώνουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων στον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) του διεγερμένου ενδοθηλίου (Santhakumar et al., 2018).

1.8.3 Διαβήτης τύπου II

Ο διαβήτης αποτελεί μία νοσογόνο κατάσταση, όπου ο οργανισμός δεν παράγει, ή δεν χρησιμοποιεί επαρκώς την ινσουλίνη (ινσουλινοαντίσταση). Το οξειδωτικό στρες αποτελεί βασικό αίτιο καταστροφής των περιοχών του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη μειώνοντας έτσι την συλλογική παραγωγή της. Επιπλέον, η υπεργλυκαιμία και η ινσουλινοαντίσταση αποτελούν καταστάσεις όπου διαπιστώνεται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και αδρανοποίηση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η ύπαρξη αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες στον σακχαρώδη διαβήτη είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη και ενοχοποιείται για την εμφάνιση πολλών επιπλοκών, όπως εγκεφαλικών επεισοδίων, νεφρικής ανεπάρκειας, νευροπάθειας, καταρράκτη, κ.α.

Οι Murugan και Pari (2007) έδειξαν ότι η από του στόματος χορήγηση διαλύματος κουρκουμίνης και τετραυδροκουρκουμίνης σε αρουραίους με διαβήτη τύπου II, είχε αντιοξειδωτική και αντιδιαβητική δράση. Η θεραπεία οδήγησε σε μια σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, καθώς και σε μια σημαντική αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης. Οδήγησε επίσης στην αύξηση της δραστηριότητας των ενδογενών αντιοξειδωτικών των ερυθροκυττάρων (δισμουτάση υπεροξειδίων, καταλάση, GPX, GST, γλουταθειόνη) (Fraga et al., 2010).

1.8.4 Καρκίνος

Σε μια σειρά επιδημιολογικών μελετών έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φρούτων και λαχανικών και της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου. Επομένως, εικάζεται ότι οι φαινολικές ενώσεις μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά την καρκινογένεση και την ανάπτυξη όγκου. Για παράδειγμα, έχει υποστηριχθεί ότι οι ισοφλαβόνες της σόγιας έχουν προστατευτική δράση απέναντι στον καρκίνο του μαστού. Επίσης, πολλές κλινικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην δράση των φαινολικών ενώσεων κατά της οξειδωσης του DNA, η οποία σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Για παράδειγμα, μια διατροφή πλούσια σε πολυφαινόλες έχει βρεθεί ότι προστατεύει το DNA των λεμφοκυττάρων από βλάβες λόγω του οξειδωτικού στρες. Άλλες μελέτες ανέφεραν ότι μετά από τακτική κατανάλωση πράσινου τσαγιού παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνης στα ούρα (βιοδείκτης οξειδωτικής βλάβης του DNA) (Del Rio et al., 2013).

1.8.5 Νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Έχει προταθεί ότι φαινολικές ενώσεις είναι ικανές να προλαμβάνουν νευροεκφυλιστικές βλάβες και να επιβραδύνουν την νευρική και νοητική δυσλειτουργία λόγω γήρατος. Η ευεργετική δράση τους στην νευρολογική υγεία οφείλεται στην ικανότητά τους να αλληλοεπιδρούν με την ενδοκυτταρική νευρωνική και νευρογλοιακή σηματοδότηση και στην δυνατότητά τους να επηρεάζουν την περιφερική και εγκεφαλοαγγειακή ροή του αίματος, καθώς και να μειώνουν τη νευρωνική βλάβη και τις απώλειες που προκαλούνται από τις νευροτοξίνες και την φλεγμονή (Santhakumar et al., 2018).

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους, κάποιες φαινολικές ενώσεις (ισοφλαβόνες, μερικές λιγνάνες και στυλβένια) έχουν παρόμοια επίδραση

στο ορμονικό σύστημα των θηλαστικών με τα οιστρογόνα. Χαρακτηρίζονται ως φυτοοιστρογόνα και χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά στην θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης κατά την εμμηνόπαυση (Vacek et al., 2010).

Την τελευταία δεκαετία, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων που προσλαμβάνονται με την διατροφή. Οι συγκεντρώσεις τους στο αίμα δεν ξεπερνούν το 1 μΜ, ποσότητα που δεν μπορεί να συμβάλει σε αξιόλογο βαθμό στη συνολική αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Συγκριτικά, άλλα αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνες C και E εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τόσο στα τρόφιμα, όσο και στον ανθρώπινο οργανισμό μετά την απορρόφησή τους. Συμπερασματικά, η κατανόηση της βιοπροσβασιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των διάφορων φαινολικών ενώσεων των φυτικών τροφίμων, είναι ζωτικής σημασίας για την αξιολόγηση της ευεργετικής τους δράσης (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

1.9 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

1.9.1 Γενικά

Η ημερήσια πρόσληψη των φαινολικών ενώσεων διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο, ανάλογα με τις διατροφικές επιλογές και προτιμήσεις τους, αλλά και με τον τόπο κατοικίας του (Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, παρόλο που εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα στην ανθρώπινη διατροφή, λόγω της αφθονίας τους στα φυτά, οι φαινολικές ενώσεις δεν είναι ιδιαίτερα δραστικές εντός του οργανισμού, πιθανότατα λόγω της χαμηλής εγγενούς δραστηριότητας, της μειωμένης απορρόφησης στο έντερο, του υψηλού επιπέδου μεταβολισμού, αλλά και της γρήγορης απέκκρισής τους. Επιπλέον, οι μεταβολίτες που βρίσκονται στο αίμα και στα όργανα-στόχους προκύπτουν από την πεπτική, ή ηπατική δραστηριότητα και μπορεί να διαφέρουν από τις αρχικές ενώσεις όσον αφορά τη βιολογική τους δραστηριότητα (Manach et al., 2004).

1.9.2 Μεταβολική πορεία από το στόμα στο έντερο

Η μάσηση είναι το πρώτο στάδιο στον μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων. Αυτή η λειτουργία συνίσταται στον τεμαχισμό των τροφών, καθώς και την ανάμειξή τους με τη σίελο. Η αποδιάταξη της δομής του τροφίμου κατά τη μάσηση επιτρέπει τη μερική απελευθέρωση

των συστατικών τους και αυξάνει το εμβαδόν τους και συνεπώς την επιφάνεια δράσης της α-αμυλάσης, του πεπτικού ενζύμου που βρίσκεται στη σίελο.

Ο βλωμός τροφής που σχηματίζεται στο στόμα μεταφέρεται μέσω του οισοφάγου στον στομάχο με περισταλτικές κινήσεις. Κατά τη διάρκεια της παραμονής της τροφής στον στομάχο, η αναδευτική κίνηση και το όξινο περιβάλλον προκαλούν τη φυσική και χημική διάσπαση των τροφών (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

Η απορρόφηση των πολυφαινολών πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήσιδα. Ο χυμός μεταφέρεται από τον στομάχο στο δωδεκαδάκτυλο το pH αλλάζει από όξινο σε αλκαλικό, στο οποίο οι φαινολικές ενώσεις είναι ασταθείς. Οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν αυτούσιες από το λεπτό έντερο. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις όμως βρίσκονται στα τρόφιμα με τη μορφή εστέρων, γλυκοζιτών, ή πολυμερών, που δεν μπορούν να απορροφηθούν αυτοτελώς. Αυτές οι ουσίες πρέπει να υποστούν υδρόλυση από τα εντερικά ένζυμα (Manach et al., 2004). Φαίνεται ότι οι φαινολικές ενώσεις μετακινούνται προς τον αυλό του λεπτού εντέρου στο κυτταρόπλασμα των εντεροκυττάρων μέσω των δύο παρακάτω βασικών τρόπων απορρόφησης. Κατά τον πρώτο τρόπο το σάκχαρο των γλυκοζιτών διασπάται στην επιφάνεια των εντεροκυττάρων από την υδρολάση λακτάσης-φλωριζίνης (LPH), η οποία έχει εξειδίκευση σε μια σειρά γλυκοζιτών φλαβονοειδών. Οι αγλυκόνες, χάρις στην λιπόφιλη φύση τους διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των εντεροκυττάρων με παθητική διάχυση. Κατά τον δεύτερο τρόπο απορρόφησης, οι γλυκοζίτες των φαινολικών ενώσεων μεταφέρονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης των εντεροκυττάρων με την βοήθεια του συμμεταφορέα νατρίου-γλυκόζης (SGLT1) (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

Ωστόσο, μόνο ένα χαμηλό ποσοστό των προσλαμβανόμενων φαινολικών ενώσεων (5-10% της συνολικής πρόσληψης) απορροφάται στο λεπτό έντερο. Οι υπόλοιπες πολυφαινόλες (90-95%) διασχίζουν την εντερική οδό και καταλήγουν στο παχύ έντερο, όπου υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία από τη μικροχλωρίδα του. Ως αποτέλεσμα παράγεται ποικιλία μεταβολιτών, με διάφορες χημικές ιδιότητες. Η μικροχλωρίδα διασπά τις πολύπλοκες δομές των φαινολικών ενώσεων σε διάφορα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, όπως απλές φαινολικές ενώσεις και αρωματικοί μεταβολίτες, τα οποία απορροφώνται ευκολότερα. Ο μετασχηματισμός των πολυφαινολών από τη μικροχλωρίδα του εντέρου γίνεται κυρίως με διάσπαση των γλυκοζιδικών δεσμών και σχάση του δακτυλίου (Santhakumar et al., 2018).

1.9.3 Βιοδιαθεσιμότητα και βιοπροσβασιμότητα

Με τον όρο βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το ποσοστό της καταναλισκόμενης ουσίας που απορροφάται στο έντερο και καταλήγει στην κυκλοφορία. Με τον όρο βιοπροσβασιμότητα ορίζεται το ποσοστό της καταναλισκόμενης ουσίας που έχει αποδεσμευτεί από το υπόστρωμα του τροφίμου και είναι διαθέσιμο προς απορρόφηση στο έντερο. Δεδομένου ότι οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε δεσμευμένη μορφή, η εξερεύνηση των παραπάνω όρων είναι σημαντική. Έτσι, βιοπροσβάσιμες θα είναι μόνο οι φαινολικές ενώσεις που θα αποσπαστούν από τον βλωμό της τροφής χάρις στην περισταλτικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα, την δράση των πεπτικών ενζύμων του λεπτού εντέρου και την μικροχλωρίδα του παχέους εντέρου. Το γεγονός αυτό εξηγεί την χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στον οργανισμό μετά την κατανάλωσή τους (Manach et al., 2004).

Η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων στον οργανισμό επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Όπως προαναφέρθηκε, ο βασικότερος παράγοντας που επηρεάζει την βιοδιαθεσιμότητά τους είναι η χημική τους δομή. Η δέσμευσή τους με κάποια άλλη ένωση (π.χ. γλυκόζη), το είδος της ένωσης αυτής, το εάν βρίσκονται σε μονομερή ή πολυμερή μορφή θα καθορίσουν τον ρυθμό και το ποσοστό απορρόφησής τους από το γαστρεντερικό σύστημα. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις των πολικών φαινολικών ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του τροφίμου και η φυσικοχημεία αυτού, επιδρούν σημαντικά στην βιοδιαθεσιμότητά τους. Επιπρόσθετα, η επεξεργασία των τροφίμων μπορεί να επηρεάσει θετικά, ή αρνητικά την απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων. Προϊόντα οξείδωσης που σχηματίζονται υπό ακραίες συνθήκες επεξεργασίας, πιθανόν να μειώνουν την απορρόφηση, ενώ η μεταβολή του υποστρώματος κάποιων λαχανικών με ομογενοποίηση έχει δείξει να την αυξάνει. Η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται ιδιαίτερα και από τον ξενιστή-καταναλωτή. Η μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου του κάθε ανθρώπου είναι διαφορετική, καθώς καθορίζεται από γενετικούς, ιδιοσυστασικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επομένως, η υδρόλυση και η απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων στο παχύ έντερο που περιεγράφηκε παραπάνω, εμφανίζει διακυμάνσεις. Τέλος, μετά την απορρόφησή τους, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να υποστούν μέσα στα εντεροκύτταρα περαιτέρω τροποποιήσεις (κυρίως μεθυλίωση, σουλφονυλίωση, γλυκουρονιδίωση). Αυτές μπορεί να οδηγήσουν στην απέκκριση των μεταβολιτών τους στον εντερικό αυλό και όχι στην ευκολότερη μεταφορά τους στην κυκλοφορία, μειώνοντας έτσι την βιοδιαθεσιμότητά τους (Scalbert & Williamson, 2018).

1.9.4 Μετά την απορρόφηση

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι η απορρόφηση των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι περιορισμένη και πως αυτές υπόκεινται σε εκτεταμένες τροποποιήσεις κατά την διέλευση τους από τον οργανισμό. Οι ενώσεις που φτάνουν εν τέλει στα κύτταρα και στους ιστούς ενδέχεται να διαφέρουν από την αρχική τους μορφή ως προς την χημική δομή και τις λειτουργίες τους (Scalbert & Williamson, 2018).

Οι αγγλικόνες και οι μεταβολίτες των υπόλοιπων φαινολικών ενώσεων που καταλήγουν τελικά στην κυκλοφορία αντιμετωπίζονται από τον οργανισμό ως ξενοβιοτικές ουσίες. Έτσι, μπορεί να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία στο ήπαρ με την βοήθεια ενζύμων σύζευξης UGTa, SULT και COMT του μεταβολισμού φάσης II. Έπειτα, οι μεταβολίτες που προκύπτουν κυκλοφορούν στο αίμα κυρίως σε συζευγμένη μορφή με πρωτεΐνες του αίματος (αλβουμίνη) και, είτε καταλήγουν στο λεπτό έντερο μέσω της απέκκρισης δια της χολής, είτε κατανέμονται στους ιστούς (Santhakumar et al., 2018). Οι φαινολικές ενώσεις, οι μεταβολίτες τους καθώς και τα παράγωγα της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου, έχουν εντοπιστεί σε αρκετούς ιστούς οργάνων επιμύων, αλλά και του ανθρώπου, όπως η καρδιά, το ήπαρ, οι νεφροί, η ουροδόχος κύστη, οι μαστοί, η μήτρα, οι ωοθήκες, ο προστάτης, κ.α. Η παραμονή τους στον οργανισμό μπορεί να διαρκέσει από λίγα λεπτά έως και μερικές ώρες μέχρι να απεκκριθούν τελικά μέσω του ουροποιητικού, ή του γαστρεντερικού συστήματος (Velderrain-Rodríguez et al., 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα και στον ορό αίματος, είναι σημαντικά στοιχεία που αντλούνται από τις *in vivo* μελέτες και παρέχουν πληροφορίες για την παρουσία τους στους ζωντανούς οργανισμούς. Στις βιοαναλυτικές μελέτες, οι τεχνικές προσδιορισμού των φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους καθορίζονται αφενός από την πολυπλοκότητα των βιολογικών υποστρωμάτων και αφετέρου από το γεγονός ότι απαντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επομένως, η εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών προκατεργασίας και προσδιορισμού είναι απαραίτητη, καθώς λόγω των παραπάνω, η απευθείας ανάλυση του δείγματος χωρίς προκατεργασία καθίσταται πρακτικά αδύνατη.

Οι κυριότερες μέθοδοι προκατεργασίας του πλάσματος και ορού αίματος είναι η αποπρωτεΐνωση (PPT), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) και η ενζυμική υδρόλυση. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (HPLC-MS) είναι η πιο συχνή επιλογή για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα και στον ορό αίματος. Βέβαια, εφαρμόζονται κι άλλες αναλυτικές τεχνικές, όπως είναι η αέρια χρωματογραφία (GC) και η υγρή χρωματογραφία (LC), συζευγμένες με άλλους τύπους ανιχνευτών όπως UV-Vis, DAD, NMR, κ.α.

Συνεπώς, στις βιοαναλυτικές μελέτες αρχικά συλλέγονται και αποθηκεύονται τα βιολογικά δείγματα, έπειτα σειρά έχει η προκατεργασία τους, η ανίχνευση των υπό μελέτη συστατικών με την κατάλληλη αναλυτική τεχνική, ο προσδιορισμός των απαντώμενων συγκεντρώσεών τους και τέλος, η στατιστική επεξεργασία και ερμηνεία των ευρημάτων της ανάλυσης (Miniati, 2007)

2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ

Το αίμα χαρακτηρίζεται ως ρευστός ζωντανός ιστός στον οποίο εμπεριέχεται ποικιλία συστατικών και χημικών ουσιών. Σε αυτά περιλαμβάνονται υδατάνθρακες, πρωτεΐνες,

ορμόνες, αλλά και αέρια, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα και άζωτο. Το αίμα αποτελεί μέσο μεταφοράς χρήσιμων και απαραίτητων συστατικών για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Σε αυτό εμπεριέχονται ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, και αιμοπετάλια τα οποία χαρακτηρίζονται ως τα έμμορφα συστατικά του. Το πλάσμα και ο ορός του αίματος παράγονται όταν, με φυγοκέντρηση, διαχωρίζονται τα προαναφερθέντα έμμορφα συστατικά του αίματος (Imaging & Technology, 2002).

2.2.1 Ορός αίματος

Ο ορός είναι το υδατώδες τμήμα του αίματος που λαμβάνεται μετά την πλήρη πήξη του, χωρίς την προσθήκη αντιπηκτικού παράγοντα. Ως εκ τούτου, δεν περιέχει τα έμμορφα στοιχεία του, δηλαδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, καθώς και τους παράγοντες πήξης του αίματος όπως το ινωδογόνο. Στον ορό περιέχονται οι πρωτεΐνες του αίματος που δεν συμμετέχουν στην διαδικασία της πήξης του, όπως η αλβουμίνη και η σφαιρίνη καθώς και αντισώματα, ηλεκτρολύτες, ορμόνες, αντιγόνα, φάρμακα και μικροοργανισμοί (McPherson et al., 2022)

Για την παραγωγή ορού συλλέγεται το αίμα σε σωληνάριο, χωρίς αντιπηκτικό, και αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ύστερα, φυγοκεντρείται (1000 × g) για 15 min. Κατά την περιστροφή στη φυγόκεντρο, ο θρόμβος (πήγμα) που περιέχει τα κύτταρα του αίματος, μετακινείται στον πυθμένα του σωληναρίου, αφήνοντας τον ορό στο υπερκείμενο μέρος. Για μελλοντική ανάλυση μπορεί να φυλαχθεί στους -80°C (Miniati, 2007).

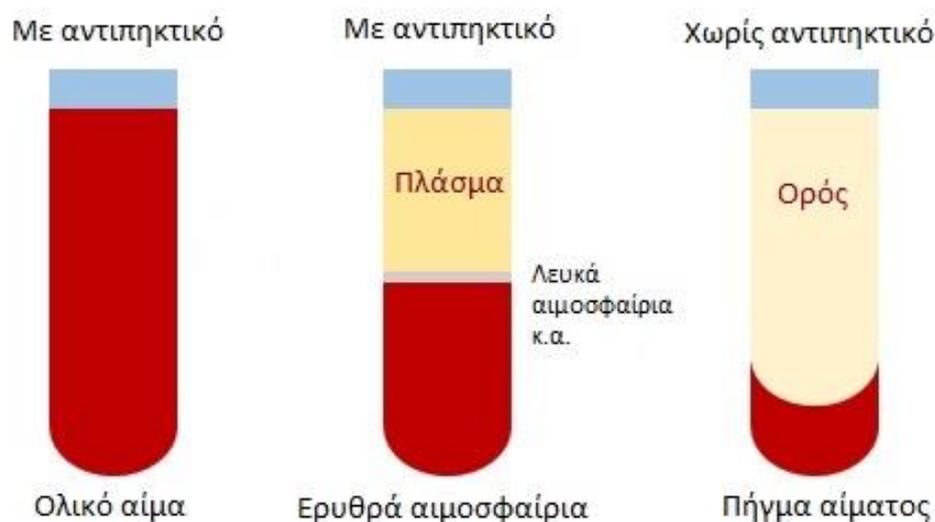
2.2.2 Πλάσμα αίματος

Το πλάσμα είναι το εξωκυττάριο υγρό του αίματος και καταλαμβάνει το 55% της συνολικής ποσότητάς του. Σε αντίθεση με τον ορό, παραλαμβάνεται χωρίς να προηγηθεί η πήξη του αίματος. Έτσι, το πλάσμα, περιλαμβάνει επίσης τους διάφορους παράγοντες πήξης, όπως το ινωδογόνο (McPherson et al., 2022).

Για την παραγωγή πλάσματος συλλέγεται το αίμα σε ειδικά σωληνάκια με αντιπηκτική ουσία. Το EDTA είναι το πιο κοινό αντιπηκτικό στην αιματολογία. Το δείγμα αίματος με αντιπηκτική ουσία φυγοκεντρείται (2000-3000 × g) για 10 min. Το πλάσμα αφαιρείται και φυλάσσεται στους -80°C. Η παραγωγή πλάσματος είναι πιο γρήγορη και πιο εύκολη από αυτήν του ορού (Miniati, 2007).

2.2.3 Ολικό αίμα

Το ολικό αίμα παραλαμβάνεται από φλέβα, αρτηρία ή τριχοειδές και συλλέγεται σε ειδικά σωληνάκια με αντιπηκτική ουσία. Οι συγκεντρώσεις και οι ιδιότητες των κυττάρων και υπόλοιπων συστατικών του αίματος παραμένουν σχετικά αναλλοίωτες (Imaging & Technology, 2002)



Εικόνα 2.1: Διαφορές μεταξύ του ολικού αίματος, του πλάσματος και του ορού.

2.3 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ως βιολογικά δείγματα το ολικό αίμα, ο ορός και το πλάσμα, θα υποστούν περαιτέρω προκατεργασία, ανάλογα με τον σκοπό της εκάστοτε βιοανάλυσης. Ο σκοπός της προκατεργασίας είναι τριπλός. Συγκεκριμένα, αφορά σε:

1. απομάκρυνση των ενώσεων που μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά και να δημιουργούν προβλήματα στην ανάλυση των δειγμάτων,
2. απομόνωση των υπό μελέτη ενώσεων χωρίς την αλλοίωσή τους και
3. εμπλουτισμό/προσυγκέντρωση των υπό μελέτη συστατικών, ειδικά όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα.

Η προκατεργασία είναι ιδιαίτερα σημαντική και επιβάλλει προσεκτικό και μελετημένο προγραμματισμό, διότι η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των εκάστοτε αναλυτικών μεθόδων εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από αυτήν. Ειδικότερα, ο προσδιορισμός των πολικών

φαινολικών ενώσεων στα βιολογικά υγρά παρεμποδίζεται από την περιεκτικότητα του δείγματος σε πεπτίδια, αμινοξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες κ.α. Επομένως, η έγχυση τους σε ένα όργανο ανίχνευσης όπως ένα χρωματογραφικό σύστημα, δεν γίνεται χωρίς να έχει προηγηθεί αποτελεσματική προκατεργασία του δείγματος. Για να είναι αποτελεσματική μια μέθοδος προκατεργασίας πρέπει να:

1. Εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς:
 - Τις χημικές ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων (π.χ. σταθερότητα, πολικότητα, θερμοευαισθησία κ.α.)
 - Την χημική σύσταση και την φυσικοχημεία του δείγματος/υποστρώματος
 - Τις χημικές ιδιότητες των παρεμποδιζουσών ενώσεων
2. Να μην αλλοιώνει την ακεραιότητα του δείγματος κατά την διάρκεια της διαδικασίας
3. Να παρέχει υψηλές και ικανοποιητικές ανακτήσεις

Δευτερευόντως, για την βελτιστοποίηση της μεθόδου προκατεργασίας θα πρέπει:

1. η διαδικασία να είναι απλή, επαναλήψιμη και ακριβής,
2. να είναι οικονομική και να μην ξεπερνά τις δυνατότητες του εκάστοτε εργαστηρίου σε αναλώσιμα υλικά και εξοπλισμό,
3. να είναι γρήγορη και να μπορεί να αυτοματοποιηθεί αν είναι δυνατό και
4. οι ανακτήσεις να είναι επαναλήψιμες.

Είναι σχεδόν αδύνατο μια μέθοδος προκατεργασίας να πληροί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις. Επομένως, σε κάθε περίπτωση πρέπει να συγκρίνονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων που αρμόζουν στην μελέτη και να επιλέγεται η καταλληλότερη με βάση τον διαθέσιμο χρόνο, τους διαθέσιμους πόρους, την αναλυτική τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί και την επιθυμητή ακρίβεια του προσδιορισμού (Moein et al., 2017).

Στην βελτιστοποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων συνεισφέρει ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός της υπό ανάλυση ουσίας από τυχόν παρεμποδιστικούς παράγοντες. Ο σκοπός αυτός μπορεί να υλοποιηθεί με διάφορες τεχνικές προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων, όπως η καθίζηση των πρωτεϊνών (PPT), η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), και η ενζυμική υδρόλυση. Οι παραπάνω τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με σκοπό την μέγιστη ανάκτηση του αναλύτη.

2.3.1 Καθίζηση πρωτεϊνών (PPT)

Συνηθίζεται, στην πρώτη φάση της προκατεργασίας, πριν δηλαδή την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων, να απομακρύνονται οι πρωτεΐνες από το βιολογικό δείγμα, έτσι ώστε να μην επηρεάσουν την ανάλυση και απομόνωσή τους. Ειδικά πριν την χρωματογραφική ανάλυση με HPLC, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των πρωτεϊνών, καθώς αυτές μπορεί να δεσμευτούν και να μετουσιωθούν από τις σιλανόλες στην επιφάνεια του χρωματογραφικού υποστρώματος, ή και να καθιζάνουν λόγω της παρουσίας οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση. Επίσης, οι πρωτεΐνες προσροφώνται από την πορώδη στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης, μπλοκάροντας τους πόρους λόγω του μεγέθους τους και ελαττώνοντας έτσι τις θέσεις προσρόφησης. Το γεγονός αυτό, προκαλεί μη αναστρέψιμη αύξηση της πίεσης στη στήλη, ελαττώνει την χωρητικότητα και την εκλεκτικότητα της καθώς τα αμινοξέα των προσροφημένων πρωτεϊνών μεταβάλλουν την επιφάνεια του υποστρώματος.

Η πιο διαδεδομένη τεχνική καθίζησης των πρωτεϊνών των βιολογικών δειγμάτων είναι η μετουσίωσή τους με προσθήκη οργανικού διαλύτη, όπως η μεθανόλη (CH_3OH) και το ακετονιτρίλιο (CH_3CN), ή/και με ελάττωση του pH, συνήθως με την προσθήκη ανόργανου, ή οργανικού οξέος, όπως είναι το φωσφορικό (H_3PO_4) και το μυρμηγκικό (HCOOH) οξύ αντίστοιχα. Έπειτα, οι καθιζάνουσες πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση, ή διήθηση. Παρόλο που οι παραπάνω τεχνικές είναι εύκολες και αποτελεσματικές, έχουν το μειονέκτημα ότι κατά την καθίζηση μπορεί οι φαινολικές ενώσεις να συγκαταβυθιστούν, ή να εγκλειστούν στο ίζημα. Για την απομάκρυνση τυχόν πρωτεϊνών που έχουν παραμείνει στο υπερκείμενο υγρό μετά την φυγοκέντρηση, συχνά ακολουθεί και επιπλέον στάδιο καθαρισμού του δείγματος, όπως είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) που αναφέρεται στη συνέχεια (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015a)

2.3.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

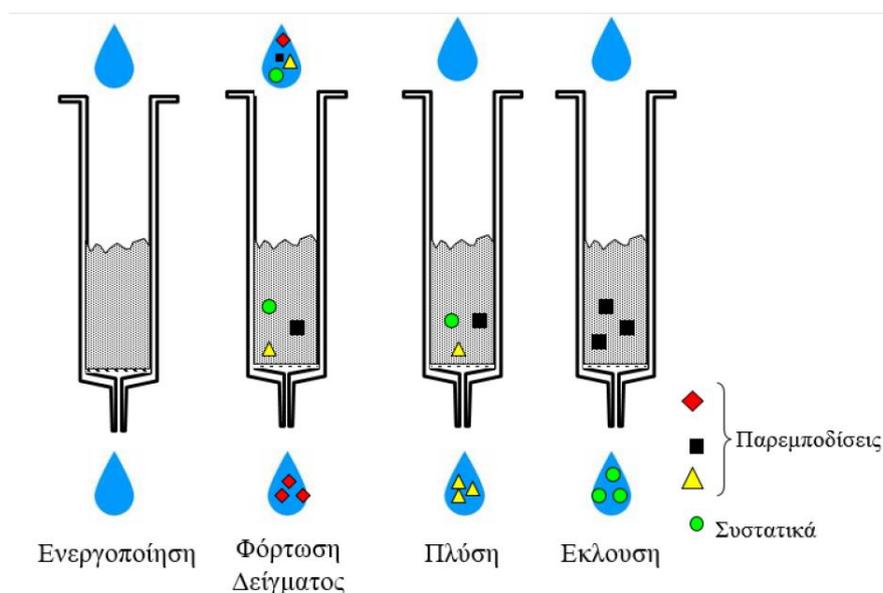
Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι η δημοφιλέστερη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση σε HPLC (Αρχοντάκη Ε, n.d.). Αφορά στην κατανομή των εκχυλιζόμενων ουσιών μεταξύ της στερεάς φάσης που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και της υγρής που αποτελεί το υπόστρωμα. Οι ενώσεις που προσδιορίζονται οφείλουν να έχουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τις ομάδες της στερεάς φάσης, προκειμένου να διαχωριστούν. Η παραλαβή του αναλύτη από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διάφοροι μηχανισμοί συγκράτησης και

έκλυσης των ενώσεων προκύπτουν από τις διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των συστατικών υπό ανάλυση, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος, ή του διαλύτη (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015a). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από το υπόστρωμα του δείγματος και τις ιδιότητες των συστατικών του.

Η τεχνική SPE έχει υψηλή ανάκτηση, καταναλώνει λίγο οργανικό διαλύτη, μπορεί να αυτοματοποιηθεί και κυρίως, απομακρύνει αποτελεσματικά τις ανεπιθύμητες ουσίες που μπορεί να επιδράσουν αρνητικά στην μετέπειτα ανάλυση.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης πραγματοποιείται σε τέσσερα βασικά στάδια :

1. Αρχικά, γίνεται ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού με μικρές ποσότητες διαλύτη, όπως μεθανόλη (MeOH), ή ακετονιτρίλιο (ACN), με σκοπό την απομάκρυνση οποιασδήποτε μόλυνσης που πιθανόν υπήρχε στο φυσιγγίο, καθώς και την επιδιαλύτωση του προσροφητικού υλικού.
2. Έπειτα, προστίθεται το δείγμα στο φυσιγγίο της SPE.
3. Στην συνέχεια, γίνεται έκπλυση του φυσιγγίου με έναν διαλύτη μέσης ισχύος (συνήθως χρησιμοποιείται νερό, ή ρυθμιστικό διάλυμα με μικρή προσθήκη οργανικού διαλύτη), που αποσκοπεί στην απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ουσιών.
4. Τέλος, γίνεται η έκλυση του αναλύτη με την χρήση κατάλληλων διαλυτών



Εικόνα 2.2: Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης (Stalikas, 2007).

2.3.3 Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)

Στην εκχύλιση υγρού-υγρού οι επιθυμητές ενώσεις κατανέμονται μεταξύ δύο υγρών φάσεων, μιας υδατικής φάσης και ενός οργανικού διαλύτη, που δεν αναμιγνύονται. Εάν το δείγμα δεν βρίσκεται ήδη μέσα σε υδατική φάση (π.χ. πλάσμα, όρος), τότε διαλυτοποιείται με κάποιον κατάλληλο διαλύτη. Η προσθήκη οργανικού διαλύτη (π.χ. οξικός αιθυλεστέρας), η καλή ανάμειξη του δείγματος με τη χρήση vortex και η συχνά η εφαρμογή φυγοκέντρησης, οδηγεί στον διαχωρισμό των φάσεων. Έτσι, η φάση που περιέχει την ουσία υπό ανάλυση με τον διαλύτη διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα στοιχεία του δείγματος σχηματίζοντας δύο διαφορετικές στιβάδες. Η επιτυχία ή όχι μίας εκχύλισης σχετίζεται με τον συντελεστή κατανομής του αναλύτη ανάμεσα στις δύο φάσεις. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί μερικές φορές, δηλαδή να προστεθεί εκ νέου οργανικός διαλύτης, με σκοπό την βελτίωση της ανάκτησης του αναλύτη και την απομάκρυνση των παρεμποδιστών της (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015a).

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι από τις πιο χρησιμοποιημένες τεχνικές, καθώς έχει πολλά θετικά στοιχεία. Είναι απλή, γρήγορη, φθηνή και έχει ικανοποιητική εκλεκτικότητα. Επιπλέον, η επιφάνεια επαφής των δύο φάσεων είναι πολύ μικρή με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η μη αντιστρεπτή πρόσδεση του αναλύτη, γεγονός που συντείνει στην βελτιστοποίηση της ανάκτησης (Αρχοντάκη Ε, n.d.).

2.3.4 Ενζυμική υδρόλυση

Οι φαινολικές ενώσεις, μετά την απορρόφησή τους, υπάρχουν στην κυκλοφορία κυρίως ως γλυκουρονιδωμένοι και σουλφωνυλιωμένοι μεταβολίτες λόγω του μεταβολισμού τους στο ήπαρ. Οι ενώσεις αυτές δύσκολα συντίθεται στο εργαστήριο συνεπώς η απόκτηση τους σε πρότυπη μορφή δεν είναι εφικτή σε μεγάλο βαθμό. Εν απουσία πρότυπων ενώσεων για τους μεταβολίτες των φαινολικών ενώσεων, εφαρμόζονται τεχνικές όπως είναι η ενζυμική υδρόλυση, με σκοπό την αποδέσμευση της αγλυκόνης και κατ' επέκταση την έμμεση ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους (Miniati, 2007). Τα κύρια ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην αναλυτική χημεία για το σκοπό αυτό είναι η β-γλυκουρονιδάση και η σουλφατάση.

Οι διαδικασίες ενζυμικής υδρόλυσης ποικίλλουν ως προς τη συγκέντρωση του ενζύμου, το pH, τη θερμοκρασία κ.α., ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε μελέτης. Συνήθως οι τιμές του pH είναι μεταξύ 4.5 και 5.5 και η συνηθέστερη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται είναι 37°C. Για την ρύθμιση του pH χρησιμοποιείται κάποιο οξύ ή άλας όπως υδροχλωρικό οξύ,

οξικό νάτριο, ασκορβικό οξύ κ.α. Ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 45 λεπτά έως και 20 ώρες.

Η ενζυματική αντίδραση διακόπτεται με εμβάπτιση σε ένα λουτρό πάγου ή και με προσθήκη οξέος. Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης στη συνέχεια υποβάλλεται σε περαιτέρω τεχνικές καθαρισμού, όπως SPE ή LLE για την ανάκτηση των αγλυκονών (Quifer-Rada et al., 2017).

2.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (LC-MS)

Κατά την εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (LC-MS) τα συστατικά που έχουν διαχωριστεί στην χρωματογραφική στήλη εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας, όπου αναλύονται με έναν ανιχνευτή που προσφέρει αξιόπιστη ταυτοποίηση. Ακόμα και αν ο πρωταρχικός διαχωρισμός δεν είναι απόλυτα επιτυχής και κάποιες ενώσεις συνεκλούνται από την στήλη, το διαφορετικό φάσμα μαζών τους μπορεί να επιτρέψει την αποτελεσματική ταυτοποίηση και ποσοτικοποίησή τους.

2.4.1 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography LC)

Η πιο δημοφιλής χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι η υγρή χρωματογραφία. Σε αυτήν περιλαμβάνονται όλες οι υγροχρωματογραφικές τεχνικές, όπου η κινητή φάση είναι υγρή και η στατική φάση είναι στερεή, ή υγρή, προσκολλημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Στην υγρή χρωματογραφία οι ενώσεις του δείγματος αλληλεπιδρούν διαφορετικά με την κινητή και την στατική φάση, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ανάλυσή τους. Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός αλληλεπίδρασης είναι η προσρόφηση. Συγκεκριμένα, ο βαθμός προσρόφησης της κάθε ένωσης στην στατική φάση σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα του φορτίου της, με αποτέλεσμα η κάθε μια να έχει διαφορετικό χρόνο έκλουσης από την χρωματογραφική στήλη.

Διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης, ανάλογα με την σχέση πολικότητας της στατικής και της κινητής φάσης: η Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης, στην οποία η στατική φάση είναι πολική και η κινητή φάση αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες (εξάνιο, χλωροφόρμιο κ.α.) και η Χρωματογραφία Ανάστροφης Φάσης, στην οποία η στατική

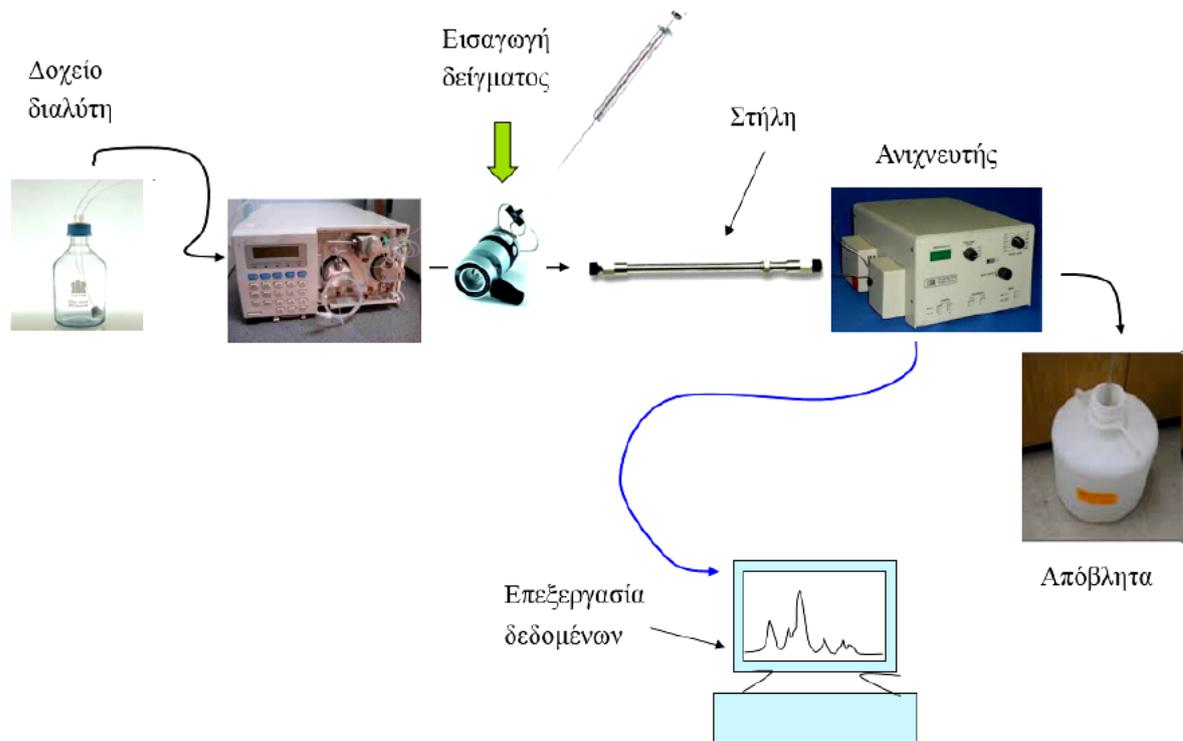
φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή, η οποία κινητή αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο τετραϋδροφουράνιο κ.α.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, ή νερό. Επίσης, όταν η σύσταση της κινητής φάσης διατηρείται σταθερή κατά την διάρκεια όλης της ανάλυσης, η έκλυση ονομάζεται ισοκρατική, ενώ όταν μεταβάλλεται ονομάζεται βαθμωτή.

Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας, όπως η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, η χρωματογραφία συγγένειας και η χρωματογραφία ιονανταλλαγής που αναφέρονται στον τρόπο που αλληλοεπιδρούν τα συστατικά του υπό ανάλυση δείγματος με την στατική φάση.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure/Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια πολύ καλή διαχωριστική μέθοδος που εφαρμόζεται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια λόγω της ακρίβειας και επαναληψιμότητας που προσφέρει σε ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων χημικών ενώσεων (π.χ. ορμόνες, αντιβιοτικά βιταμίνες, φάρμακα, τοξίνες ναρκωτικές ουσίες κ.α.) (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015b).

Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) απαρτίζεται από τα κάτωθι:

- Φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών της κινητής φάσης
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος
- Αντλία υψηλής πίεσης
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής (φασματοόμετρα μαζών, ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους, φθορισμομετρικοί, ηλεκτροχημικοί κ.α.)
- Σύστημα συλλογής, καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων (ηλεκτρονικός υπολογιστής)



Σχήμα 2.1: Τυπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης(Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015b).

2.4.2 Φασματομετρία μάζας

A) Αρχή λειτουργίας και Οργανολογία

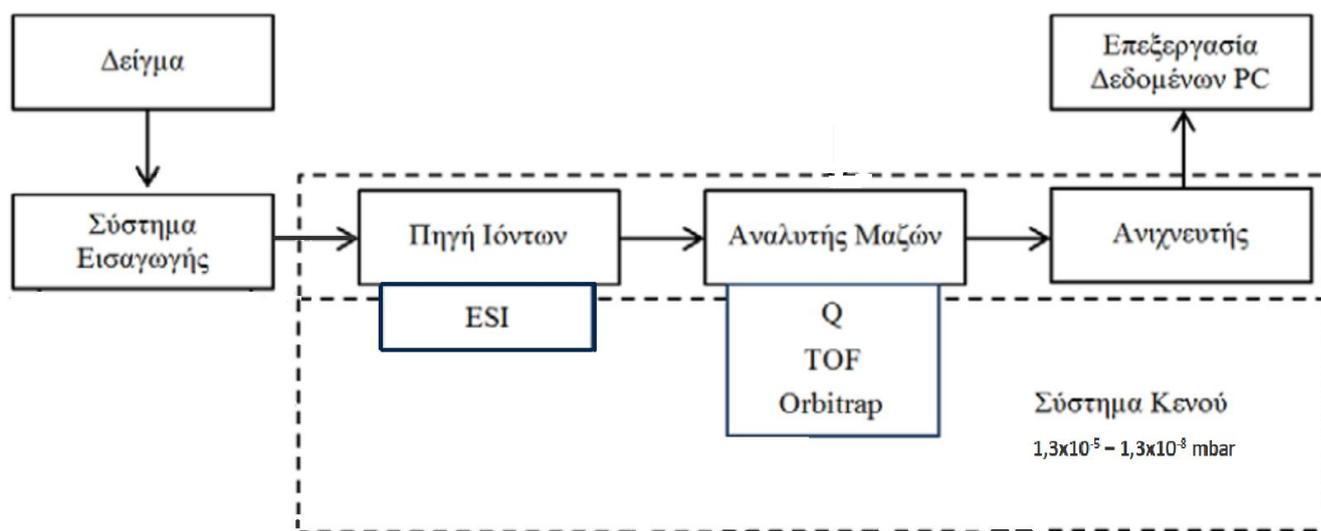
Η φασματομετρία μάζας είναι μια πολύ σημαντική τεχνική ανάλυσης, η οποία αναπτύσσεται εντυπωσιακά τα τελευταία χρόνια. Έχει ποικιλία εφαρμογών σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους όπως η χημεία τροφίμων, η περιβαλλοντική χημεία και οι βιοεπιστήμες. Στην φασματομετρία μάζας γίνεται ακριβής ταυτοποίηση ενώσεων χάρις στην ακριβή μέτρηση των μοριακών τους μαζών, ακόμη και αν αυτές βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα. Είναι μια εκλεκτική και γρήγορη αναλυτική μέθοδος με υψηλή ευαισθησία. Επιπλέον, ανιχνεύει με ακρίβεια ίχνη ενώσεων σε περίπλοκα υποστρώματα, όπως είναι αυτά των βιολογικών δειγμάτων. Τέλος, χάρις στη φασματομετρία μαζών δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης οποιασδήποτε ένωσης, καθώς και η διαλεύκανση της δομής αγνώστων ενώσεων που προσδιορίζονται στα δείγματα.

Στην φασματομετρία μάζας, κατά την ανάλυση ενός δείγματος παράγεται και μετριέται το ηλεκτρικό σήμα των μοριακών ιόντων μιας ένωσης στην αέρια φάση και έτσι προσδιορίζεται

με ακρίβεια το μοριακό βάρος της. Με αυτόν τον τρόπο, ανιχνεύονται ποσοτικά και ποιοτικά τα συστατικά του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή βασίζεται στον ιοντισμό της ουσίας υπό μελέτη, την μεταφορά των ιόντων σε χώρο υψηλού κενού και τον προσδιορισμό του λόγου μάζας/φορτίου κάθε ιόντος (mass to charge ratio, m/z) με τον εστιασμό των ιόντων σε μια δέσμη με την βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων. Τα παραγόμενα φάσματα μαζών ανιχνεύονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο μεταφέρεται στο σύστημα συλλογής και επεξεργασίας των δεδομένων, δηλαδή στον ηλεκτρονικό υπολογιστή που διαθέτει το κατάλληλο λογισμικό (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015c).

Τα επιμέρους τμήματα ενός τυπικού φασματομέτρου μαζών είναι τα εξής:

- το σύστημα εισαγωγής του δείγματος σε αέρια ή υγρή μορφή,
- η πηγή ιόντων που προκαλεί τον ιοντισμό των συστατικών του δείγματος,
- ο αναλυτής μαζών όπου διαχωρίζονται οι ιονισμένες ενώσεις με βάση το m/z τους,
- το σύστημα ανίχνευσης των ιόντων που είναι υπεύθυνο για την συλλογή των διαχωρισμένων ιόντων και την μετατροπή τους σε ηλεκτρικό σήμα,
- το σύστημα κενού που διατηρεί την πίεση του οργάνου σε χαμηλά επίπεδα,
- ο ηλεκτρονικός υπολογιστής που συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα.



Σχήμα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες κάποιων τεχνικών κάθε σταδίου (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015c).

B) Πηγές ιόντων

Στο πρώτο στάδιο της φασματομετρίας μάζας σχηματίζονται τα ιόντα του αέριου αναλύτη. Η μέτρηση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθορίζονται από αυτό το στάδιο. Ανάλογα με την τεχνική παραγωγής ιόντων που εφαρμόζεται, το φάσμα μάζας μιας ένωσης που λαμβάνεται διαφέρει ως προς την μορφή. Μεταξύ των διάφορων τεχνικών ιοντισμού που υπάρχουν, στην σύγχρονη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται εκτενώς η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού (ESI), μια μέθοδος με καλή απόδοση, εύκολη ποσοτικοποίηση και υψηλή ευαισθησία για ένα μεγάλο εύρος ενώσεων. Στην μέθοδο αυτή το υγρό ψεκάζεται μέσα από ένα τριχοειδή σωλήνα, σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο όπου διασπείρεται σχηματίζοντας ένα νέφος από φορτισμένα σταγονίδια. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι μια ήπια τεχνική ιοντισμού καθώς δεν απαιτούνται ακραίες συνθήκες, όπως υψηλή θερμοκρασία, για την πραγματοποίηση του. Έτσι προκύπτει μικρή, ή και μηδαμινή θραύση και είναι δυνατή η ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών. Επίσης, στον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, προσδιορίζεται το μοριακό βάρος χωρίς περιορισμό της αναλυόμενης μάζας. Η παραπάνω τεχνική χρησιμοποιείται συχνά για την σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με την φασματομετρία μαζών (Banerjee & Mazumdar, 2012).

Γ) Αναλυτής Μάζας

Μετά τον σχηματισμό των ιόντων στο προηγούμενο στάδιο της φασματομετρίας, ακολουθεί ο διαχωρισμός τους με βάση τον λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) που γίνεται από τον αναλυτή μάζας. Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιείται με την βοήθεια ενός μαγνητικού πεδίου, ενός ηλεκτρικού πεδίου, ή και μιας ραδιοσυχνότητας, τα οποία προκαλούν δυνάμεις που επηρεάζουν την κίνηση των ιόντων. Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται στους αναλυτές τύπου δέσμης που διαχωρίζουν τα ιόντα στον χώρο (ion separation in space, beam-type analyzers) και σε αυτούς που διαχωρίζουν τα ιόντα στον χρόνο (ion separation in time). Στους αναλυτές δέσμης (π.χ. Quadrupole, TOF κ.α.) τα ιόντα ταξιδεύουν μερικά εκατοστά ή μέτρα ανάλογα τον αναλυτή και δέχονται διαδοχικά δυνάμεις με έναν ή δύο από τους τρόπους που προαναφέρθηκαν. Στους αναλυτές μάζας που διαχωρίζουν τα ιόντα στον χρόνο (π.χ. αναλυτές γραμμικής ή τρισδιάστατης παγίδας ιόντων, αναλυτές μαζών Orbitrap, FT-ICR κ.α.), το κάθε ιόν «παγιδεύεται» από την συσκευή κάποια στιγμή μέσα στην διαδρομή του.

Δ) Ανιχνευτής Ιόντων

Ο ανιχνευτής ιόντων είναι υπεύθυνος για την συλλογή των διαχωρισμένων ιόντων και την παραγωγή ηλεκτρικού σήματος το οποίο εξαρτάται από τον αριθμό των ιόντων που δέχεται ανά χρονική μονάδα και από το φορτίο τους. Στην σύγχρονη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιούνται ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές ως ανιχνευτές ιόντων. Το σύστημα αυτό αποτελείται από ένα μεταλλικό, ή γυάλινο σωλήνα με μεταλλική επίστρωση που εμφανίζει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Όταν τα ιόντα της προσδιοριζόμενης ουσίας προσπέσουν στην επιφάνεια αυτή, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία ανακλώνται και χτυπούν ξανά στις επιφάνειες του σωλήνα εκπέμποντας νέα ηλεκτρόνια και δημιουργώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση που ενισχύει το σήμα έως και 10^7 φορές. Ύστερα έχουμε την απεικόνιση του ηλεκτρικού σήματος στον υπολογιστή με τη μορφή φάσματος μάζας .

Ε) Σύστημα Κενού

Για να λειτουργεί σωστά ένα φασματομέτρο πρέπει το σύστημα να βρίσκεται συνεχώς υπό κενό της τάξεως των $1,3 \times 10^{-5} - 1,3 \times 10^{-8}$ mbar. Η εισροή ατμοσφαιρικού αέρα στο σύστημα επηρεάζει αρνητικά τα αποτελέσματα, καθώς ο ιοντισμός των συστατικών του δείγματος επιβαρύνεται από τον μη επιθυμητό ιοντισμό συστατικών του ατμοσφαιρικού αέρα. Το κενό επιτυγχάνεται μέσω εσωτερικών και εξωτερικών αντλιών κενού.

ΣΤ) Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων

Όπως προαναφέρθηκε, στον υπολογιστή απεικονίζεται το σήμα των ιοντικών θραυσμάτων ως φάσμα μάζας και γίνεται η ταυτοποίησή τους μέσω της τιμής m/z ή τις των τιμών των ισοτοπικών κορυφών τους. Για τον προσδιορισμό και την μελέτη των ενώσεων ενός δείγματος που αναλύεται, γίνεται σύγκριση των φασμάτων μάζας τους με αυτά γνωστών ενώσεων και μιγμάτων που διατίθενται σε προϋπάρχουσες βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας. Τα αποτελέσματα που εμφανίζονται στον Η/Υ προσδιορίζουν ποιοτικά και ποσοτικά τις ενώσεις του δείγματος. Τέλος, αναλόγως του σχεδιασμού της μελέτης εφαρμόζονται και οι κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι (Θεοδωρίδης Γ. et al., 2015c).

2.5 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΜΕΛΕΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

Τα τελευταία χρόνια, πληθώρα επιδημιολογικών μελετών συσχετίζουν την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε φυτοχημικά, όπως είναι οι πολικές φαινολικές ενώσεις, με ευεργετικές

επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Pinto & Santos, 2017). Ως εκ τούτου, ολοένα και αυξάνονται οι μελέτες στην παγκόσμια βιβλιογραφία που διερευνούν την βιοδιαθεσιμότητα των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους. Οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές εξετάζουν την φαρμακοκινητική των πολικών φαινολών και τον μεταβολισμό τους. Οι πληροφορίες που αντλούνται από τέτοιες μελέτες είναι πολύ χρήσιμες, καθώς αφενός συνεισφέρουν στην διερεύνηση της φαρμακολογικής δράσης των πολικών φαινολικών ενώσεων προωθώντας έτσι την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων και αφετέρου, από διατροφική σκοπιά, δίνουν πληροφορίες για τον μεταβολισμό τους όταν καταναλώνονται ως αναπόσπαστο στοιχείο ενός τροφίμου.

Στον οργανισμό οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις της τάξης των ng/mL. Επομένως, ο προσδιορισμός τους στον ορό και στο πλάσμα αίματος απαιτεί την χρήση εκλεκτικών και ευαίσθητων αναλυτικών μεθοδολογιών που χαρακτηρίζονται από ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για την διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητας των πολικών φαινολικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους είναι η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) (Kanellos et al., 2013; Soleas et al., 2001) και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (LC-UV/Vis) (Bolarinwa & Linseisen, 2005). Ωστόσο, η τεχνική που συναντάται πιο συχνά στη βιβλιογραφία είναι η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Blount et al., 2015; Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Επιπλέον, οι τεχνικές προκατεργασίας που ακολουθούνται γενικά είναι αντίστοιχες με αυτές που εφαρμόζονται σε βιοαναλυτικές μεθόδους, όπως έχουν περιγραφεί στις παραγράφους 2.3.1 ως 2.3.4 και προηγούνται της ανάλυσης με LC-MS.

Στις μελέτες Blount et al. και Serra et al. χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης ως τεχνική προκατεργασίας του πλάσματος επίμυων (Blount et al., 2015) και ανθρώπων (Serra et al., 2009), με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου καθαρισμού των δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση σε LC-MS. Οι ανακτήσεις των διάφορων φαινολικών ενώσεων της κάθε μελέτης ήταν κατά μέσο όρο 96% (Blount et al., 2015) και 87% (Serra et al., 2009) αντίστοιχα. Στις μελέτες Rodriguez Lanzi et al. και Xu et al. χρησιμοποιήθηκε η πρωτεϊνική καθίζηση με εκχύλιση στερεάς φάσης για την προκατεργασία του πλάσματος επίμυων. Οι ανακτήσεις των διάφορων φαινολικών ενώσεων της κάθε μελέτης κυμαίνονταν μεταξύ 102% - 105% (Rodriguez Lanzi et al., 2018) και 81% - 99% (Xu et al., 2018), αντίστοιχα. Οι Xin et al. και Zhang et al. εφάρμοσαν τεχνικές πρωτεϊνικής καθίζησης σε δείγματα πλάσματος επίμυων για την επικύρωση και την μελλοντική χρήση της μεθόδου τους σε μελέτες φαρμακοκινητικής. Οι

ανακτήσεις για τις υπό ανάλυση φαινολικές ενώσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 103%–105% (Xin, 2019) και 72% - 95% (Zhang et al., 2010) αντίστοιχα. Για τους ίδιους λόγους, οι Tao et al. και Ren et al. εφάρμοσαν μεθόδους εκχύλισης υγρού-υγρού σε δείγματα πλάσματος επίμυων και είχαν ανακτήσεις της τάξης του 89% - 106% (Tao et al., 2019) και 59%-91% (Ren et al., 2016) αντίστοιχα. Στις μελέτες των de Oliveira et al. και Bolarinwa & Linseisen χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική υδρόλυση σε δείγματα πλάσματος επίμυων (de Oliveira et al., 2013) και ανθρώπων, με σκοπό την αποδέσμευση των αγλυκονών από τους μεταβολίτες των φαινολικών ενώσεων πριν την εφαρμογή SPE και πριν την ανάλυση σε LC-MS. Οι ανακτήσεις των φαινολικών ενώσεων είχαν μέσο όρο 102,5% (de Oliveira et al., 2013) και 99,7% (Bolarinwa & Linseisen, 2005) αντίστοιχα. Τέλος, οι Huo et al. και Cremin et al. χρησιμοποίησαν ενζυμική υδρόλυση πριν από την εφαρμογή LLE σε δείγματα πλάσματος επίμυων (Huo et al., 2016) και ανθρώπων (Cremin et al., 2001) για τους ίδιους λόγους και είχαν ανακτήσεις της τάξεως του 72%-100% (Huo et al., 2016) και 98% (Cremin et al., 2001) αντίστοιχα.

Στον **Πίνακα 2.1** παρουσιάζονται η τεχνική προκατεργασίας, η αναλυτική τεχνική, οι χρωματογραφικοί παράμετροι και τα βασικά στοιχεία επικύρωσης που εφαρμόστηκαν σε ορισμένες από τις προαναφερθείσες μελέτες, των οποίων η ανάλυση έγινε με υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (LC-MS).

Πίνακας 2.1: Παραδείγματα από εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό πολικών φαινολών σε πλάσμα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης.

Προσδιοριζόμενες ΠΦΕ	Δείγμα	Προκατεργασία Δείγματος	Αναλυτική Τεχνική	Χρωματογραφικές παράμετροι	Ανάκτηση %R, LLOQ και γραμμική περιοχή μεθόδου	Βιβλιογραφική αναφορά
cinnamic acid (CA) vanillic acid (VA) protocatechuic acid (PA)	Πλάσμα επίμυων	Εκχύλιση Υγρού-Υγρού	UHPLC-QTrap MS/MS MRM (-)ESI	Στήλη: Acquity BEH C18 column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm particle size) Κινητή φάση: (A) 0.1% HCOOH, H ₂ O (B) 0.1% HCOOH, ACN Ροή κινητής φάσης: 0.30 mL/min Έκλουση: Βαθμωτή Όγκος έγχυσης: 2 μL	%R: 88.7 - 105.7% LLOQ: (CA) 160 ng/mL (VA) 10.3 ng/mL και (PA) 10.0 ng/mL Γραμμική περιοχή: 10-16000 ng/mL	(Tao et al., 2019) DOI: 10.1002/bmc.4534
catechin (C) epicatechin (EC) gallocatechin (GC) epigallocatechin (EGC) epicatechin-3-gallate (ECG) gallocatechin-3-gallate (GCG) epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	Πλάσμα επίμυων	Ενζυμική προκατεργασία (glucuronidase-sulfatase), Εκχύλιση Υγρού-Υγρού	UFLC-4000 QTRAP® tandem MS/MS turbo ion spray (TIS) MRM ESI	Στήλη: Venusil C18 column (100 × 2.1 mm, 2.2 μm) Κινητή φάση: (A) 0.1% acetic acid, H ₂ O (B) HCOOH, ACN (50:50 v/v) Ροή κινητής φάσης: 0,40 mL/min Έκλουση: Βαθμωτή Όγκος έγχυσης: 5 μL	%R: 72,4-99,7% LLOQ: (C) 8 ng/mL (EC) 8 ng/MI (GC) 3 ng/MI (EGC) 30 ng/MI (ECG) 10 ng/mL (GCG) 5 ng/MI (EGCG) 15 ng/mL Γραμμική περιοχή: 3-30000 ng/mL	(Huo et al., 2016) http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.048

catechin (C) epicatechin (EC) dimer B2 trimer	Ανθρώπινο Πλάσμα	SPE	UPLC MS/MS SRM ESI	Στήλη: Acquity HSS T3 column (100mm×2.1mm) Κινητή φάση: (A) acetic acid (99.8:0.2, v/v) (B) acetonitrile Ροή κινητής φάσης: 0.4ml/min Έκλυση: Βαθμωτή Όγκος έγχυσης: -	%R: 65-102% LOQ: (C) 0,013 μM (EC) 0,015 μM (Dimer B2) 0,010 μM (Trimer) 0,98 μM Γραμμική περιοχή: 0,008-5,8 μM	(Serra et al., 2009) https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.005
catechin (C) epicatechin (EC) metabolites	Πλάσμα επίμυων	SPE	HPLC-TOF MS/MS NMR	Στήλη: Varian Metasil 5 Basic C18 (250 x 4.6 mm) column Κινητή φάση: (A) 1% phosphoric acid in MilliQ water (B) HPLC grade acetonitrile Ροή κινητής φάσης: 1 mL/min Έκλυση: Βαθμωτή Όγκος έγχυσης: -	%R: 96.0 ± 3.1%. LOQ: (C) 138,9 pmol (EC) 10,4 pmol (Metabolites) 2,05-10,6 pmol Γραμμική περιοχή: (C) 5nM – 50 μM (EC) 5nM – 50 μM (Metabolites) 250pM-20 μM	(Blount et al., 2015) DOI: 10.1021/jf505922b

isochlorogenic acid B	Πλάσμα επίμυων	PPT with MEOH, 0.1% HCOOH	HPLC-MS/MS (-)ESI SRM	<p>Στήλη: Zorbax SB-C18 column (3.5 μm, 2.1 mm×100 mm)</p> <p>Κινητή φάση: (A) 0.1% formic acid in methanol (B) 1% formic acid in water</p> <p>Ροή κινητής φάσης: 0,2 mL/min</p> <p>Έκλυση: Βαθμωτή</p> <p>Όγκος έγχυσης: 10 μL</p>	<p>%R: 102.65%–105.02%</p> <p>LLOQ: 5 ng/MI</p> <p>Γραμμική περιοχή: 5–2500 ng/mL</p>	<p>(Xin, 2019)</p> <p>http://www.icps.ac.cn/EN/10.5246/jcps.2019.03.016</p>
epicatechin, epicatechin methyl-glucuronide, epicatechin methyl-sulphate, catechin, catechin-glucuronide, quercetin methyl-glucuronide, resveratrol-3-glucuronide, resveratrol-4-glucuronide and resveratrol-3-sulphate	Πλάσμα επίμυων	PPT with ultrapure water and 20μL H3PO4 85% (v/v), SPE OASIS HLB, 60 mg	UHPLC-TQD MS/MS SRM (-) Z-spray electrospray	<p>Στήλη: reversed-phase Kinetex C18 column (3.0mm×100 mm, 2.6 μm)</p> <p>Κινητή φάση: (A) ultrapure water with 0.1% (v/v) formic acid (B) ultrapure water with 0.1% (v/v) acetonitrile</p> <p>Ροή κινητής φάσης: 0,4 mL/min</p> <p>Έκλυση: Βαθμωτή</p> <p>Όγκος έγχυσης: 5 μL</p>	<p>%R: 81-107%</p> <p>Γραμμική περιοχή: 0.05 and 25 μg/ml were obtained for all analytes, except for procyanidin B1 and B2 which presented a linear range between 1 and 25 μg/ml.</p>	<p>(Rodriguez Lanzi et al., 2018)</p> <p>https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.05.021</p> <p>DOI: 10.1016/j.abb.2018.05.021</p>

<p>5-CQA, caffeic, ferulic, isoferulic, hippuric, p-coumaric, m-coumaric, vanillic, 3-hydroxybenzoic, dihydrocaffeic, 2-hydroxyphenylpropionic acids</p>	<p>Πλάσμα επίμωων</p>	<p>Ενζυμική υδρόλυση (β-glucuronidase and sulfatase) SPE</p>	<p>LC-MS single-quadrupole mass spectrometer ESI</p>	<p>Στήλη: C18 column (50 × 2.1 mm, 1.8 μm) Κινητή φάση: (A) acwater (B) acACN Ροή κινητής φάσης: 330 μL/min Έκλυση: Βαθμωτή Όγκος έγχυσης: 5 μL</p>	<p>%R: 88%-110%</p> <p>(LOD, ng/mL): 5-CQAa: 16 Caffeic: 12 Ferulic: 16 Isoferulic: 20 m-coumaric: 10 p-coumaric: 30 dihydrocaffeic: 24 hippuric: 64 3-hydroxybenzoic: 16 2-hydroxyphenylpropionic: 14 Vanillic: 436</p> <p>(LOQ, ng/mL): 5-CQAa: 52 Caffeic: 38 Ferulic: 52 Isoferulic: 60 m-coumaric: 30 p-coumaric: 94 dihydrocaffeic: 72 hippuric: 200 3-hydroxybenzoic: 46 2-hydroxyphenylpropionic:40 Vanillic: 1320</p>	<p>(de Oliveira et al., 2013) DOI: 10.1021/jf401534d</p>
--	-----------------------	---	--	--	---	---

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΑΣΤΗΡΙΑ

3.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνονται: αναδευτήρας Vortex (Velp Scientific), φυγόκεντρος (Centurion Scientific Ltd), συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (IST VacMaster), συσκευή παραγωγής δις απεσταγμένου νερού ειδικής αντίστασης 17,8 ΜΩ/cm (Barnstead, EASYpure RF), υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας, συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου, συσκευή περιστροφικού συμπυκνωτή υπό κενό (speed vacuum, Labconco), καταψύκτης (-40°C) και υπερκαταψύκτης (-80°C). Ακόμη, στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνονται: γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 2, 5, 10, 250 και 1000 mL, γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 100 mL, γυάλινο ογκομετρικό σιφώνιο των 2,5 mL, γυάλινες πιπέτες Pasteur, σωλήνες φυγοκέντρησης (Eppendorf tubes) χωρητικότητας 1.5 mL, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 10 mL, αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-100 µL και 100-1000 µL (Eppendorf, Reference), καθώς και κατάλληλα ρύγχη (tips) για τις αυτόματες πιπέτες και γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (vials) των 2 mL, με κατάλληλους υποδοχείς δειγμάτων (inserts) των 150 µL. Τα στηλάκια που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ήταν τα OASIS HLB 60mg/3mL (Waters).

Για τις αναλύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών και αναλυτή μάζας τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap). Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (Ultra-High Pressure/Performance Liquid Chromatography, UHPLC) της σειράς DIONEX (UltiMate 3000™ Rapid Separation UHPLC+), αποτελούμενο από τα εξής μέρη:

- Αντλία διαλυτών με ενσωματωμένο σύστημα απαέρωσης
- Θερμοστάτη στηλών
- Αυτόματο δειγματολήπτη

- Φασματόμετρο μαζών Orbitrap (Exactive Plus: Benchtop Full-Scan Orbitrap™, Thermo Scientific)



Εικόνα 3.1: Υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης HUPLC, συζευγμένο με αναλυτή μάζας Thermo Exactive Plus Benchtop Full-Scan Orbitrap της Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2012).

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε στην εξής αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης :

- Στήλη Accucore™ C18 (Thermo Fisher Scientific), διαμέτρου 2,1 mm, μήκους 150 mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 2,6 μm

Για τη ρύθμιση και τον έλεγχο των παραμέτρων του φασματόμετρου μαζών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Exactive Plus Tune (Version 2.8 SP1, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Για την διεκπεραίωση και καταγραφή των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό XCalibur 4.1 Thermo Scientific, ενώ για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TraceFinder™ software (Version 4.1, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA).

3.2 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

3.2.1 Πρότυπες ουσίες

Για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες ουσίες που αναφέρονται στον **Πίνακα 3.1**. Για κάθε ένωση παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα (standard stock solution) συγκέντρωσης 1 mg/mL σε μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας (LC-MS grade). Κατόπιν, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο μείγμα διαλύματος εργασίας (working solution) όλων των ενώσεων με συγκέντρωση 10 µg/mL σε τελικό όγκο 10 mL (WS1). Από αυτό λήφθηκαν 200 µL τα οποία αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 2 mL, ώστε να προκύψει το δεύτερο διάλυμα εργασίας (WS2) με συγκέντρωση 1 µg/mL. Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάχθηκαν στους -20°C.

Πίνακας 3.1: Πρότυπες ουσίες πολικών φαινολικών ενώσεων.

α/α	Πρότυπη Ένωση	Εταιρεία
1	(-)-Epicatechin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
2	(-)-Epigallocatechin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
3	(-)-Epigallocatechin gallate	Extrasynthèse (Genay-Sedex, France)
4	(+)-Catechin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
5	(+)-E-Viniferin	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
6	(±)-Hesperetin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
7	(±)-Naringenin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
8	3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
9	3-Hydroxytyrosol (DOPET)	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
10	3-O-Methylquercetin (Isorhamnetin)	Extrasynthèse (Genay-Sedex, France)
11	Apigenin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
12	Kaempferol-3-O-glucoside (Astragalin)	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
13	Caffeic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
14	Caftaric acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
15	Chlorogenic acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
16	Chrysin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
17	Daidzein	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
18	Epicatechin gallate	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
19	Ferulic acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
20	Formononetin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
21	Gallic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
22	Genistein	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
23	HVA	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
24	Quercetin-3-O-glucoside (Isoquercetin)	Extrasynthèse (Genay-Sedex, France)
25	Kaempferol	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
26	Luteolin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
27	Myricetin	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
28	Neochlorogenic acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
29	o-coumaric acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
30	Oleuropein	Extrasynthèse (Genay-Sedex, France)
31	p-coumaric acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
32	Phloretic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)

33	p-Hydroxybenzoic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
34	p-hydroxyphenylacetic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
35	Piceid (Polydatin)	Fluorochem (Hadfield, UK)
36	Procyanidin B2	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
37	Protocatechuic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
38	Quercetin	Extrasynthèse (Genay-Sedex, France)
39	Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)	Extrasynthèse (Genay-Sedex, France)
40	Sinapic acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
41	Syringic acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
42	trans-cinnamic acid	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
43	trans-coutaric acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
44	trans-Resveratrol	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
45	Tyrosol	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
46	Vanillic acid	Sigma-Aldrich (Seelze, Germany/St. Louis, MO, USA)
47	Vanillin	Supelco (Bellefonte, PA, USA)
48	Quercetin-d3 (IS)	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)

3.2.2 Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προκατεργασία των δειγμάτων και την μετέπειτα χρωματογραφική ανάλυση ήταν:

- Ακετονιτρίλιο (ACN) υψηλής καθαρότητας για MS, LC/MS grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).
- Μεθανόλη (MeOH) υψηλής καθαρότητας για MS, LC/MS grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).
- Νερό (H₂O) υψηλής καθαρότητας για MS, LC/MS grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).
- Οξικός αιθυλεστέρας, (Ethyl acetate) υψηλής καθαρότητας, HPLC grade solvents (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Μυρμηγκικό οξύ (HCOOH) υψηλής καθαρότητας, Optima™ LC/MS grade formic acid 99,0%+ (Fisher Chemical)
- Φωσφορικό Οξύ (H₃PO₄), καθαρότητας 85%, Chem-Lab NV
- Οξικό οξύ
- Οξικό νάτριο
- Σουλφατάση (Helix Pomatia, Type H-2), ≥2000 units/mL και β-Γλυκουρονιδάση ≥ 100000 units/mL (S9751, Sigma-Aldrich)

Κατά την πορεία της εργασίας τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με τους εξής τρόπους:

- Για τα διαλύματα μυρμηγκικού οξέος (HCOOH) 1% και 0,1% (v/v), αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα μυρμηγκικού οξέος 1% (v/v). Έπειτα το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκε για να προκύψει το εν λόγω διάλυμα μυρμηγκικού οξέος 0,1% (v/v).
- Για το 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.
- Για το διάλυμα 10% MeOH σε ACN, παρασκευάστηκαν 10 mL του συγκεκριμένου διαλύματος με ανάμειξη 1 mL MeOH (LC-MS grade) και 9 mL ACN.
- Για το διάλυμα φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) 1% (v/v) σε ακετονιτρίλιο (ACN), αναμείχθηκε 1 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (H_3PO_4) με 99 mL ακετονιτρίλιο (ACN).
- Για το διάλυμα H_3PO_4 / MeOH/ ACN (1:10:89 v/v/v), παρασκευάστηκαν 100 mL του συγκεκριμένου διαλύματος με ανάμειξη 1 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (H_3PO_4), 10 mL μεθανόλης (MeOH) και 89 mL ακετονιτριλίου (ACN).
- Για το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M οξικού νατρίου (CH_3COONa) με τελικό όγκο 250 mL, αρχικά ζυγίστηκαν 3,402 g άλατος (CH_3COONa) και διαλύθηκαν σε νερό. Στη συνέχεια, έγινε ρύθμιση του pH με προσθήκη λίγων σταγόνων οξικού οξέος (CH_3COOH). Μόλις το pH έφθασε στην επιθυμητή τιμή, συμπληρώθηκε νερό έως τον τελικό όγκο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΟΡΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ LC-MS

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της βέλτιστης μεθόδου προκατεργασίας δειγμάτων πλάσματος και ορού, για τον προσδιορισμό πολικών φαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, έγινε συγκριτική μελέτη των βασικότερων τρόπων προκατεργασίας πλάσματος και ορού που εφαρμόζονται στη βιβλιογραφία, οι οποίοι είναι η πρωτεϊνική καθίζηση, η εκχύλιση υγρού-υγρού, η εκχύλιση στερεάς φάσης, καθώς και συνδυασμοί αυτών. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μελετήθηκαν η πρωτεϊνική καθίζηση (PPT), ο συνδυασμός πρωτεϊνικής καθίζησης και εκχύλισης στερεάς φάσης (PPT & SPE), καθώς και η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). Σε κάθε περίπτωση μελετήθηκαν οι ανακτήσεις των υπό μελέτη πολικών φαινολικών ενώσεων. Τέλος, η πορεία προκατεργασίας με τις πιο ικανοποιητικές ανακτήσεις εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων σε δείγματα ορού ή/και πλάσματος τριών εθελοντών πριν και μετά την κατανάλωση Κορινθιακής σταφίδας.

4.2 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου προκατεργασίας των δειγμάτων, αρχικά έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση με σκοπό την μελέτη και την σύγκριση των σύγχρονων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων. Παρατηρήθηκε ότι η συνηθέστερη μέθοδος ήταν η εφαρμογή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) σε δείγματα πλάσματος, με ή χωρίς να έχει προηγηθεί πρωτεϊνική καθίζηση (PPT) (Blount et al., 2015; Rodriguez Lanzi et al., 2018; Xu et al., 2018). Πολλά υποσχόμενη φάνηκε να είναι και η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) (Ren et al., 2016; Tao et al., 2019). Δεδομένου ότι οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε δεσμευμένη μορφή, ερευνήθηκε και η χρήση οξέος καθώς και ενζύμων με σκοπό την αποδέσμευση και μεγαλύτερη ανάκτησή τους (de Oliveira et al., 2013; Kanellos et al., 2013; Soleas et al., 2001). Τέλος, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές χρήσης τόσο πλάσματος όσο και ορού (Kahle et al., 2011) για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων στο αίμα και έτσι επιλέχθηκε η χρήση και των δύο. Στο πλαίσιο της

παρούσας εργασίας, μελετήθηκαν δέκα διαφορετικές πορείες προκατεργασίας όπως φαίνονται στον **πίνακα 4.1**.

Πίνακας 4.1: Οι πειραματικές πορείες που εξετάστηκαν. a = πρωτεϊνική καθίζηση (PPT), b = πρωτεϊνική καθίζηση + εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και c = Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE).

	Πορεία		Εφαρμοζόμενες τεχνικές προκατεργασίας
1 ^η	1	a	PPT με Ακετονιτρίλιο (ACN)
2 ^η	2		PPT με 10% Μεθανόλη σε ακετονιτρίλιο (MeOH, ACN)
3 ^η	3		PPT με Οξιμισμένο Ακετονιτρίλιο (ac. ACN)
4 ^η	4		PPT με Οξιμισμένη 10% Μεθανόλη σε Ακετονιτρίλιο (ac. MeOH, ACN)
5 ^η	1	b	PPT με Ακετονιτρίλιο (ACN) + SPE
6 ^η	2		PPT με 10% Μεθανόλη σε ακετονιτρίλιο (MeOH, ACN) + SPE
7 ^η	3		PPT με Οξιμισμένο Ακετονιτρίλιο (ac. ACN) + SPE
8 ^η	4		PPT με Οξιμισμένη 10% Μεθανόλη σε Ακετονιτρίλιο (ac. MeOH, ACN) + SPE
9 ^η	1	c	LLE με οξικό αιθυλεστέρα
10 ^η	2		LLE με οξίνιση + οξικό αιθυλεστέρα

4.2.1 Πορείες 1-4a

Για τις πειραματικές πορείες 1-4a, όπου η προκατεργασία δειγμάτων ορού και πλάσματος έγινε μόνο με πρωτεϊνική καθίζηση (PPT), ερευνήθηκε η δράση των παρακάτω τεσσάρων διαλυτών:

1a: Αποπρωτεΐνωση με Ακετονιτρίλιο (ACN)

2a: Αποπρωτεΐνωση με 10% Μεθανόλη σε ακετονιτρίλιο (MeOH,ACN)

3a: Αποπρωτεΐνωση με Οξιμισμένο Ακετονιτρίλιο (ac.ACN)

4a: Αποπρωτεΐνωση με Οξιμισμένη 10% Μεθανόλη σε Ακετονιτρίλιο (ac.MeOH,ACN)

Η πειραματική πορεία είχε ως εξής:

1. Σε 100 μL δείγματος (πλάσματος, ή ορού) προστέθηκαν 400μL διαλύματος (1a ή 2a ή 3a ή 4a)
2. Ανάδευση με Vortex
3. Φυγοκέντρηση (7000 g) για 15 min
4. Αφού σχηματίστηκε ίζημα, έγινε παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος
5. Συμπύκνωση επί ξηρού στο SpeedVac (38°C)
6. Αναδιάλυση με 100 μL MeOH-H₂O (1:1, v/v)

7. Επιπλέον διήθηση, ή φυγοκέντρηση
8. Μεταφορά σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη (LC-MS vials)

4.2.2 Πορείες 1-4b

Στο πρωτόκολλο προκατεργασίας με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) πραγματοποιείται αρχικά πρωτεϊνική καθίζηση όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Επομένως, έως το βήμα 6, οι πειραματικές πορείες είναι ίδιες, με την διαφορά ότι η αναδιάλυση έγινε σε 400μL 0,1% (v/v) HCOOH, H₂O για την περαιτέρω προκατεργασία των δειγμάτων.

1b: Αποπρωτεΐνωση με Ακετονιτρίλιο (ACN) + εκχύλιση στερεάς φάσης

2b: Αποπρωτεΐνωση με 10% Μεθανόλη σε ακετονιτρίλιο (MeOH,ACN) + εκχύλιση στερεάς φάσης

3b: Αποπρωτεΐνωση με Οξιτισμένο Ακετονιτρίλιο (ac.ACN) + εκχύλιση στερεάς φάσης

4b: Αποπρωτεΐνωση με Οξιτισμένη 10% Μεθανόλη σε Ακετονιτρίλιο (ac.MeOH,ACN) + εκχύλιση στερεάς φάσης

Από την αναδιάλυση και μετά (βήμα 6), η πειραματική πορεία είχε ως εξής:

7. Βήματα εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) :

- I. Ενεργοποίηση της στήλης με προσθήκη 1,5 mL MeOH
 - II. Εξισορρόπηση της στήλης με προσθήκη 1,5 mL 0,1% HCOOH, H₂O
 - III. Εναπόθεση του δείγματος στην στήλη
 - IV. Έκπλυση της στήλης με 1 mL 0,1% HCOOH (ac.H₂O)
 - V. Προσθήκη 4 mL MeOH για την έκλυση των φαινολικών ενώσεων
8. Συμπύκνωση επί ξηρού στο SpeedVac (38 °C)
 9. Αναδιάλυση με 100 μL MeOH-H₂O (1:1, v/v)
 10. Επιπλέον διήθηση, ή φυγοκέντρηση
 11. Μεταφορά σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη (LC-MS vials)

4.2.3 Πορείες 1-2c

Στις πειραματικές πορείες 1c και 2c πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) των δειγμάτων πλάσματος και ορού. Στην πορεία 2c προηγήθηκε η προσθήκη 10 μL

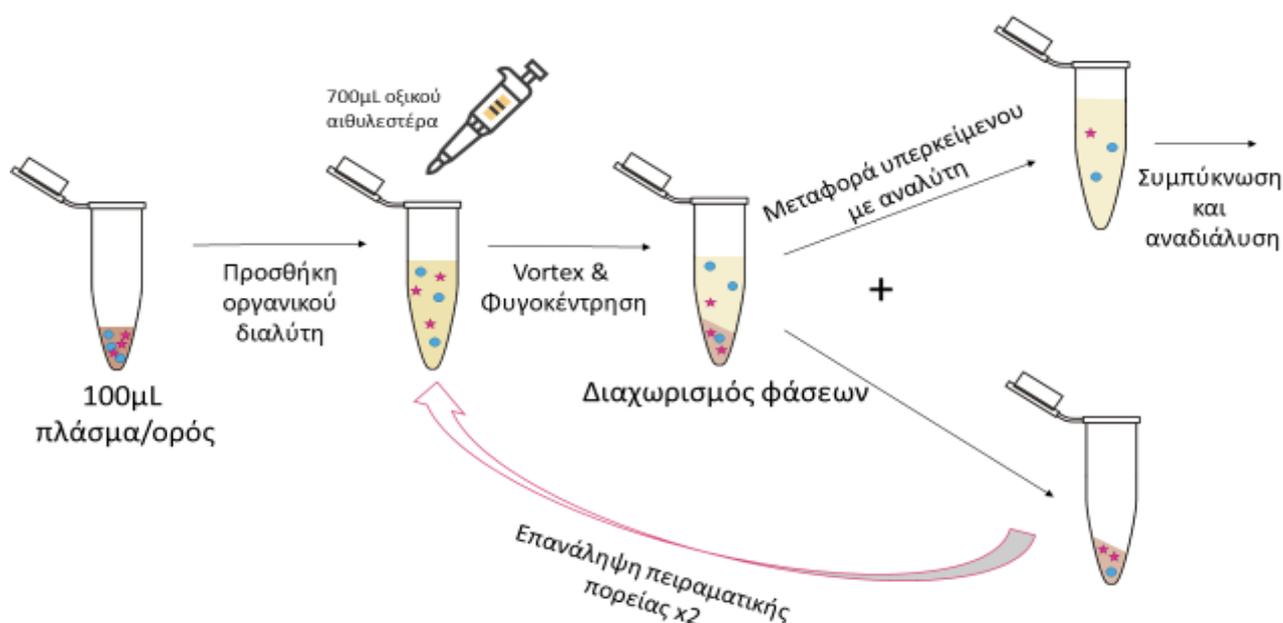
μυρμηκικού οξέος (HCOOH), με σκοπό την περαιτέρω αποδέσμευση των δεσμευμένων φαινολικών ενώσεων και μεταβολιτών.

1c: εκχύλιση υγρού-υγρού

2c: εκχύλιση υγρού-υγρού με οξίνιση

Η πειραματική πορεία είχε ως εξής:

1. Σε 100 μL δείγματος (πλάσματος, ή ορού) προστέθηκαν 700 μL οξικού αιθυλεστέρα
2. Ανάδευση με Vortex
3. Φυγοκέντρηση (5000 g) για 5 min
4. Αφού σχηματίστηκε διαχωριστική στιβάδα μεταξύ των υγρών φάσεων του δείγματος, έγινε παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος
5. Στο εναπομείναν δείγμα, επαναλήφθηκε η πειραματική πορεία από την προσθήκη του οξικού αιθυλεστέρα μέχρι το βήμα 4 άλλες δύο φορές, με συλλογή κάθε φορά των υπερκείμενων διαλυμάτων
9. Τα υπερκείμενα διαλύματα υπέστησαν συμπύκνωση επί ξηρού στο SpeedVac (38°C)
6. Αναδιάλυση με 100 μL MeOH-H₂O (1:1, v/v)
7. Επιπλέον διήθηση, ή φυγοκέντρηση
8. Μεταφορά σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη (LC-MS vials)



Σχήμα 4.1: Απεικόνιση μεθόδου με υγρή-υγρή εκχύλιση.

Στο τέλος των παραπάνω πειραματικών δοκιμών επιλέχθηκε να διερευνηθεί και η επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης στον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων. Έτσι, επαναλήφθηκε η πειραματική πορεία 1c αφότου είχε γίνει η παρακάτω πειραματική πορεία ενζυμικής υδρόλυσης:

1. Σε 100 mL ορού/πλάσματος προστέθηκαν 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M οξικού νατρίου (CH_3COONa), $\text{pH}=5$
2. Έπειτα, προστέθηκαν 20 mL διαλύματος ενζύμων (2000 U β -γλυκουρονιδάσης, 40 U σουλφατάσης)
3. Ανάδευση με Vortex
4. Τοποθέτηση σε επωαστήρα (υδρόλουτρο) για 45 min (37°C)
5. Διακοπή της αντίδρασης με φωσφορικό οξύ 4% (100 μL)

Ακολούθησε εκχύλιση υγρού-υγρού, δηλαδή η πορεία 1c, όπως περιγράφεται παραπάνω από το στάδιο της προσθήκης διαλύτη και μετά.

4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LIQUID CHROMATOGRAPHY – MS SPECTROMETRY, LC – MS)

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών. Με την υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των διάφορων συστατικών βάσει των δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης που αναπτύσσονται μεταξύ τους, του υλικού πλήρωσης της χρωματογραφικής στήλης και της υγρής κινητής φάσης. Για την χρωματογραφική ανάλυση των πολικών φαινολικών ενώσεων σε δείγματα ορού και πλάσματος, επιλέχθηκε η χρήση της στήλης Accucore™ C18 (Thermo Fisher Scientific), υπό βαθμωτή έκλυση, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2. Οι διαλύτες έκλυσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: (A) υδατικό διάλυμα μυρμηγκικού οξέος (HCOOH) (0,1% v/v) και (B) διάλυμα ακετονιτριλίου οξιμισμένο με HCOOH (0,1% v/v). Εφαρμόστηκαν υπό ροή 0,12 mL/min και με θερμοκρασία στήλης 25°C . Ο όγκος έγχυσης ήταν 5 μL .

Πίνακας 4.2: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλυσης για τις πολικές φαινολικές ενώσεις.

Χρόνος, min	% HCOOH (0.1%v/v) (A)	% ACN (0.1%v/v) (B)
0	95	5
1.1	95	5
2.2	75	25
3.3	75	25
3.9	60	40
6.5	60	40
9.5	5	95
12	5	95
12.4	95	5
18	95	5

Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών Orbitrap Exactive Plus™. Στο φασματόμετρο αυτό αρχικά πραγματοποιείται ο ιοντισμός των ενώσεων με θερμαινόμενο ηλεκτροψεκασμό (H-ESI). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η κινητή φάση καθώς και ο διαλύτης της εγχυμένης ποσότητας του δείγματος περνά στην αέρια φάση, τα περιεχόμενα μόρια ιοντίζονται και στη συνέχεια με τη βοήθεια του διερχόμενου αέριου αζώτου σε συνδυασμό με τα ηλεκτροστατικά πεδία που αναπτύσσονται καθοδόν εντός του φασματόμετρου μαζών, αυτά φτάνουν στον αναλυτή μάζας όπου διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης επιλέχθηκε ο αρνητικός ιοντισμός ((-)ESI), με πλήρη σάρωση (Full Scan MS) και ανιχνεύθηκαν τα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$ της κάθε πολικής φαινόλης. Οι παράμετροι λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών αναγράφονται στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3: Παράμετροι φασματόμετρου μάζας πλήρους σάρωσης (Full Scan MS).

Παράμετροι	Επιλεγμένες τιμές
Θέση ακροσωλήνιου ιοντισμού (<i>probe</i>)	C
Απόσταση μικρομέτρου (<i>Micrometer, in.</i>)	1,5
Πολικότητα (<i>polarity</i>)	Αρνητικός Ιοντισμός
Διαχωριστική ικανότητα (<i>Resolution</i>)	70000
Εύρος σάρωσης (<i>Scan range, m/z</i>)	100 – 1200
Δυναμικό (<i>spray voltage, kV </i>)	3,80
Αέριο εκνέφωσης N_2 (<i>seath gas</i>), AU	40

Αέριο ξήρανσης N ₂ (auxiliary gas), AU	11
Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης (°C)	200
Sweep gas, AU	2
S-lens RF level, AU	50
Θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τον κώνο εισόδου στο εσωτερικό του φασματομέτρου (ion transfer capillary temperature, °C)	320

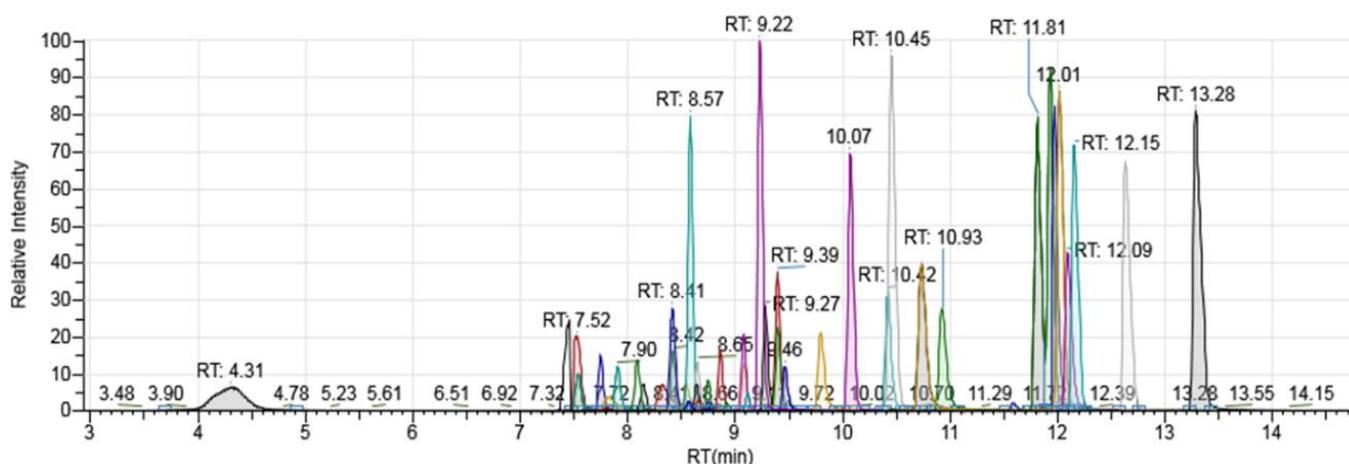
Στον **Πίνακα 4.4**, φαίνονται τα μοριακά ιόντα ([M-H]⁻), η ακρίβεια μάζας (mass error, ppm), καθώς και οι χρόνοι κατακράτησης (RT, min) για κάθε πολική φαινολική ένωση της. Ακόμα, στην **εικόνα 4.1** παρουσιάζεται το αντίστοιχο XIC (Extracted Ion Chromatogram) χρωματογράφημα. Σύμφωνα με τις συνθήκες του υγροχρωματογραφικού συστήματος που προαναφέρθηκαν, όλες οι προσδιοριζόμενες πολικές φαινολικές ενώσεις εκλύονται εντός 13 λεπτών. Παρόλο που οι περισσότερες ενώσεις συνεκλούνται, η χρήση ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας καθιστά τον διαχωρισμό τους εφικτό, ακόμα και στην περίπτωση των ισομερών ενώσεων, χάρις στην ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων που παρέχει ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών.

Πίνακας 4.4: Μοριακά Ιόντα, ακρίβεια μάζας (mass error, ppm) και χρόνοι κατακράτησης των πολικών φαινολικών ενώσεων στον αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (-ESI).

Πολική Φαινόλη	Μοριακός τύπος	[M-H] ⁻ Μοριακό Ιόν (Θεωρητική τιμή)	[M-H] ⁻ Μοριακό Ιόν (Πειραματική τιμή)	Ακρίβεια μάζας (mass error, ppm)	Χρόνος Κατακράτησης (RT,min)
Φλαβαν-3-ολες					
(-) Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,072	-0,69	8,41
(-) Επιγαλοκατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0667	305,0668	-0,33	7,72
(-) Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457,0776	457,0783	-1,53	8,52
(+)(-) Κατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0718	289,072	-0,69	8,07
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441,0827	441,0831	-0,91	9,06
Φλαβόνες					
4,5,7 - τριϋδροξυϊσοφλαβόνη (Απιγενίνη)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0455	269,0457	-0,74	11,82
5,7-διϋδροξυφλαβόνη (Χρυσίνη)	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253,0506	253,0507	-0,4	13,29
Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0406	-0,35	10,76

Φλαβονόλες					
3-Ο-Μεθυλοκερκετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315,051	315,0514	-1,27	12,09
Καμπφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	285,0406	-0,35	12,01
Μυρικετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317,0303	317,0305	-0,63	9,81
Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0354	301,0355	-0,33	10,94
Φλαβανόνες					
(+)(-) Εσπερετίνη	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	301,0718	301,072	-0,66	12,15
(+)(-) 4,5,7 - τριυδροξυϊσοφλαβόνη (Ναρινγκενίνη)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0612	271,0616	-1,48	11,97
Ισοφλαβόνες					
Δαϊσδεΐνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253,0506	253,0507	-0,4	10,48
Φορμονονετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267,0663	267,0667	-1,5	12,63
Γενιστεΐνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0455	269,0459	-1,49	11,93
Στιλβένια					
trans-Ρεσβερατρόλη	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,0714	227,0711	1,32	10,44
(+)-Ε-Βινιφερίνη	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	453,1344	453,1351	-1,54	11,58
Γλυκοζίτες					
Αστραγαλίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	447,0938	-1,12	9,07
Πισεΐδη (Πολυδατίνη)	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389,1242	389,1251	-2,31	8,86
Ισοκερκετίνη	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	463,0891	-1,94	8,92
Ρουτίνη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1461	609,1469	-1,31	8,64
Προανθοκυανιδίνες					
Προκυανιδίνη	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577,1351	577,136	-1,56	8,13
Φαινυλαιθανοειδή					
3-υδροξυ τυροσόλη	C ₉ H ₁₂ O ₃	153,0546	153,0544	1,31	7,47
Ελευρωπαΐνη	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539,1759	539,1779	3,71	9,41
2-(4-υροξυφαινυλο) αιθανόλη (Τυροσόλη)	C ₈ H ₁₀ O ₂	137,0597	137,0594	2,19	8,74
Φαινολικά Οξέα					
Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	179,0339	179,0341	-1,12	8,58
Καφταρικό οξύ	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	311,0409	311,0412	-0,96	7,72
Χλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0882	-1,13	7,89
Φερουλικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₄	193,0495	193,0499	-2,07	9,4
Γαλλικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₄	169,0131	169,0132	-0,59	4,43
Νεοχλωρογενικό οξύ	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	353,0883	-1,42	7,49
p-Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163,039	163,039	0	10,09
o-Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163,039	163,039	0	9,24

3-(4-υδροξυφαινυλο) προπιονικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₃	165,0546	165,0546	0	9,11
p-υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	137,0233	137,023	2,19	8,41
p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₃	151,039	151,0387	1,99	8,57
Σιναπικό οξύ	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223,0612	223,0608	1,79	9,28
Συριγγικό Οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0444	197,0447	-1,52	8,64
trans-κινναμωμικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₂	147,0441	147,0438	2,04	11,88
trans-κουταρικό οξύ	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	295,0459	295,0461	-0,68	8,26
Βανιλλικό Οξύ	C ₈ H ₈ O ₃	167,0339	167,0339	0	8,66
Φαινολικές Αλδεΐδες					
Βανιλίνη	C ₈ H ₈ O ₄	151,039	151,0388	1,32	9,47
Εσωτερικό πρότυπο (IS)					
Κερκετίνη-d3	C ₁₅ H ₇ D ₃ O ₇	304,0531	304,0543	3,95	10,9



Εικόνα 4.1: ΧIC Χρωματογράφημα μείγματος πρότυπου διαλύματος των πολικών φαινολικών ενώσεων, συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στον αρνητικό ιοντισμό, με χρήση Accucore C18 ως χρωματογραφική στήλη. Οι ενώσεις που αντιστοιχούν στους χρόνους κατακράτησης του χρωματογραφήματος φαίνονται στον πίνακα 4.4.

4.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΚΤΗΣΕΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Σε κάθε εξεταζόμενη πορεία προκατεργασίας δειγμάτων πλάσματος και ορού, προσδιορίστηκαν οι ανακτήσεις για κάθε πολική φαινολική ένωση κατά περίπτωση. Με τον όρο επι τοις εκατό ανάκτηση (Recovery, %R) εννοούμε το ποσοστό του προσδιοριζόμενου αναλύτη που απομονώνεται από το υπό εξέταση δείγμα εφαρμόζοντας συγκεκριμένα βήματα

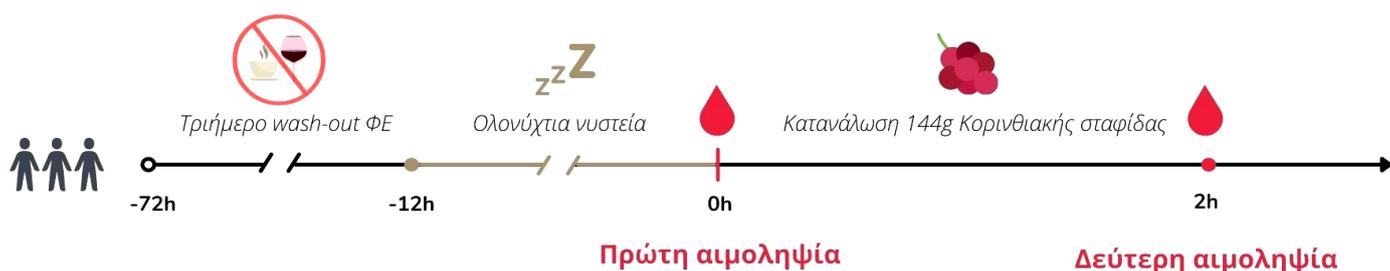
προκατεργασίας σε σχέση με την πραγματική του περιεκτικότητα σε αυτό. Στην παρούσα μελέτη, η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της επι τοις εκατό ανάκτησης (% Recovery, %R) των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι:

$$R (\%) = [\text{εμβαδόν κορυφής εμβολιασμένου δείγματος (spiked) / Εμβαδόν κορυφής δείγματος προσαρμοσμένου στο υπόστρωμα (matrix-matched)}] * 100$$

(Σχέση 4.1)

4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μετά την αξιολόγηση των διαφορετικών τρόπων προκατεργασίας πλάσματος και ορού, η προκατεργασία που οδήγησε στα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, εφαρμόστηκε σε δείγματα ληφθέντα από εθελοντές, με στόχο τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων μετά από εφάπαξ χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας. Ζητήθηκε από τρεις εθελοντές να περιορίσουν την πρόσληψή τους σε φαινολικές ενώσεις τρεις μέρες πριν την παρέμβαση (wash-out). Μετά από ολονύχτια νηστεία υποβλήθηκαν σε αιμοληψία. Έπειτα, κατανάλωσαν 144 g Κορινθιακής σταφίδας, ποσότητα η οποία αντιστοιχεί σε 8 μικρομερίδες, και επαναλήφθηκε αιμοληψία 2 ώρες αργότερα. Το παραπάνω πρωτόκολλο βασίστηκε στην μελέτη των Kanellos P.T. et. al. (Kanellos et al., 2013).



Σχήμα 4.2: Πρωτόκολλο οξείας παρέμβασης με Κορινθιακή σταφίδα σε εθελοντές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΩΝ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Οι δέκα υπό μελέτη πορείες προκατεργασίας δειγμάτων εφαρμόστηκαν τόσο σε πλάσμα όσο και ορό. Ως δείκτη ποιότητας της κάθε μεθόδου προκατεργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι ποσοστιαίες ανακτήσεις τους (%Recovery, %R). Για τον υπολογισμό των ανακτήσεων, έγινε εμβολιασμός με 10 μL προτύπου διαλύματος μίγματος πολικών φαινολικών ενώσεων (1000 ng/mL), με αποτέλεσμα τα δείγματα να έχουν τελική συγκέντρωση 100 ng/mL. Σε κάποια δείγματα, ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε στην αρχή της προκατεργασίας (spiked samples) και σε άλλα, μετά το πέρας της (matrix-matched samples). Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν ως ο ποσοστιαίος λόγος της απόκρισης σήματος των φαινολικών ενώσεων στο εμβολιασμένο δείγμα από την αρχή της προκατεργασίας, προς την απόκριση σήματός τους στο δείγμα το οποίο είναι προσαρμοσμένο στο υπόστρωμα (matrix-matched) (σχέση 4.1).

Για τη σύγκριση των %R που απέδωσε η κάθε πορεία προκατεργασίας σε κάθε δείγμα ξεχωριστά, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση διακύμανσης με έναν παράγοντα (one-way ANOVA), με τη χρήση του λογισμικού SPSS, λαμβάνοντας ως ανεξάρτητη μεταβλητή τους δέκα διαφορετικούς τρόπους προκατεργασίας των δειγμάτων (πίνακας 4.1).

Στα **διαγράμματα 5.1. – 5.10** συνοψίζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν αναφορικά με τις ανακτήσεις των πολικών φαινολών ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο. Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων τα δεδομένα ανακτήσεων των πολικών φαινολών έχουν ομαδοποιηθεί σε εύρη ανακτήσεων και η συζήτηση αφορά σε αριθμό των ενώσεων ανεξαρτήτως είδους.

Με βάση τα ευρήματα της στατιστικής ανάλυσης προέκυψαν διάφορα συμπεράσματα, όσον αφορά στην αποτελεσματικότητα των δέκα διαφορετικών μεθόδων. Εκ πρώτης όψεως, παρατηρήθηκαν ικανοποιητικές ανακτήσεις στις πειραματικές πορείες όπου συνδυάστηκε η πρωτεϊνική καθίζηση με την εκχύλιση στερεάς φάσης (πορείες 1-4b), καθώς και στην εκχύλιση υγρού-υγρού (πορείες 1-2c). Αντιθέτως, σε όλες τις μεθόδους στις οποίες εφαρμόστηκε μονάχα πρωτεϊνική καθίζηση (πορείες 1a-4a) δεν υπήρξαν ικανοποιητικές ανακτήσεις. Πιο συγκεκριμένα, τόσο στο πλάσμα όσο και στον ορό, οι περισσότερες ενώσεις είχαν ανακτήσεις κάτω του 40%, με πολλές από αυτές να είναι μηδενικές (π.χ. φλαβαν-3-όλες). Εξαιρέση

αποτελούν οι φλαβανόνες και οι ισοφλαβόνες στα δείγματα πλάσματος, οι οποίες εμφάνισαν μέτριες ανακτήσεις (44%-54%) στις πορείες 1a και 2a. Όμως, οι ανακτήσεις των παραπάνω ενώσεων ήταν καλύτερες σε άλλες πειραματικές πορείες (83% και 90% αντίστοιχα, στην 1c: εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς οξίνιση). Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι οι μέθοδοι πρωτεϊνικής καθίζησης με μη οξινισμένους διαλύτες (1a: ACN, 2a: 10% MeOH) είχαν πιο ευνοϊκές ανακτήσεις από ό,τι οι μέθοδοι με οξινισμένους διαλύτες, ειδικά στα δείγματα πλάσματος. Το παραπάνω συμπέρασμα απαιτεί περισσότερη διερεύνηση, καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικά στοιχεία.

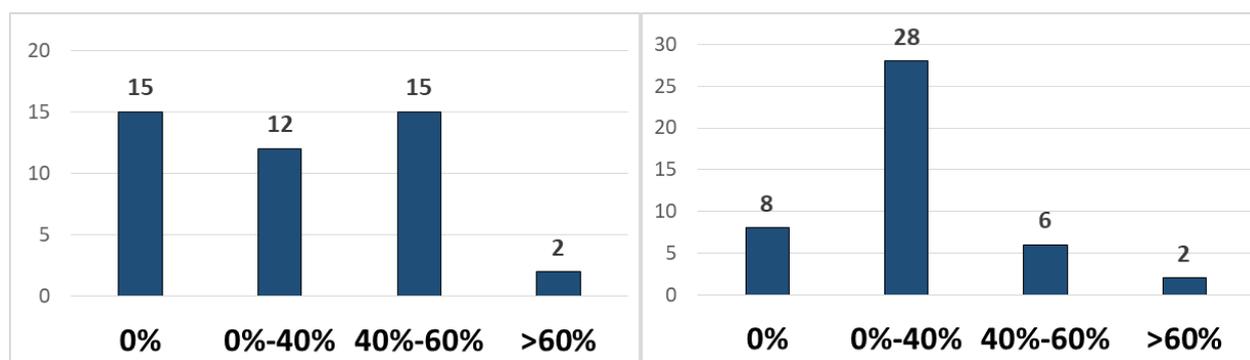
Η προσθήκη της εκχύλισης στερεάς φάσης, ως επιπλέον βήμα κατά την προκατεργασία των δειγμάτων μετά την πρωτεϊνική καθίζηση, βελτίωσε σημαντικά τις ανακτήσεις των φαινολικών ενώσεων. Χαρακτηριστικά, η επικατεχίνη που είχε 0% ανάκτηση στις πορείες 1a-4a, μετά την προκατεργασία με SPE, είχε 60% (μέσος όρος ανακτήσεων στις πορείες 1b-4b). Στις μεθόδους με SPE, οι ανακτήσεις των περισσότερων φαινολικών ενώσεων ήταν μεγαλύτερες από 40% και μικρότερες από 80%. Σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους προκατεργασίας της παρούσας πειραματικής εργασίας, οι μέθοδοι με SPE είχαν τις πιο υψηλές ανακτήσεις για τις φλαβόνες (1b και 4b στο πλάσμα), τις φλαβανόνες (2b πλάσμα), τις ισοφλαβόνες (2b και 3b στο πλάσμα), καθώς και αρκετά φαινολικά οξέα. Συγκρίνοντας τις ανακτήσεις των πρωτοκόλλων προκατεργασίας 1b με 4b μεταξύ τους δεν οδηγηθήκαμε σε κάποιο ξεκάθαρο συμπέρασμα. Δεν είναι εμφανές εάν κάποιος από τους τέσσερις διαλύτες ήταν αποτελεσματικότερος για την ανάκτηση των φαινολικών ενώσεων, καθώς τα τέσσερα πρωτόκολλα συνήθως δεν εμφάνιζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Υπάρχει μια ένδειξη ότι οι ανακτήσεις των φαινολικών ενώσεων στις πορείες 1b και 2b ήταν καλύτερες στα δείγματα ορού, ενώ στις πορείες 3b και 4b ήταν καλύτερες στα δείγματα πλάσματος. Σε κάθε περίπτωση, είναι εμφανές ότι η εκχύλιση στερεάς φάσης βελτίωσε σε μεγάλο βαθμό τις ανακτήσεις των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα πλάσματος και ορού που είχαν προηγουμένως υποστεί πρωτεϊνική καθίζηση.

Στο πείραμα αυτό, η προκατεργασία με την καλύτερη απόδοση στα βιολογικά δείγματα πλάσματος και ορού, ήταν η εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς οξίνιση (πορεία 1c). Σχεδόν όλες οι φαινολικές ενώσεις είχαν ανακτήσεις πάνω από 60%, οι περισσότερες δε κυμαίνονταν μεταξύ 80% και 105%. Για παράδειγμα, οι γλυκοζίτες στα δείγματα πλάσματος εμφάνισαν ανακτήσεις από 98% έως 105%. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κάποιες φαινολικές ενώσεις εμφάνισαν τις υψηλότερες ανακτήσεις τους στα δείγματα που υποβλήθηκαν σε SPE. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, οι ανακτήσεις αυτές συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες στα

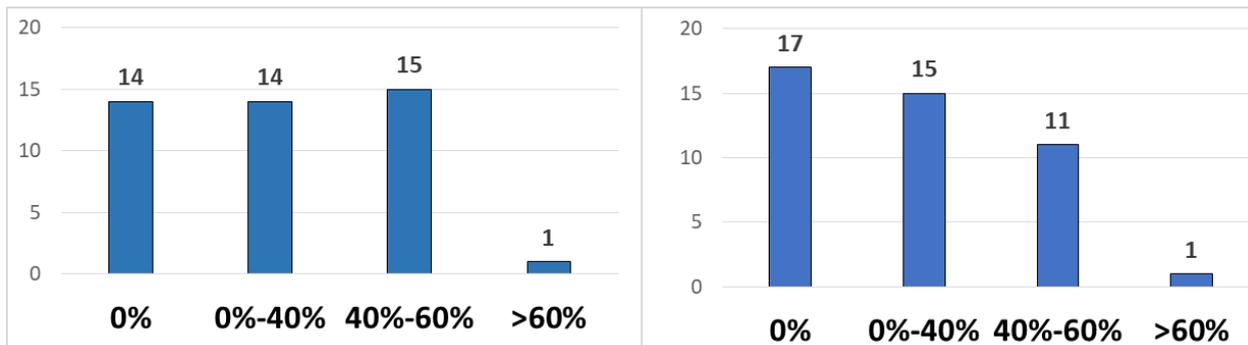
δείγματα που υποβλήθηκαν σε LLE χωρίς οξίνιση, δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, καθιστώντας έτσι την πορεία 1c το ίδιο αξιόπιστη. Το παραπάνω φαινόμενο εμφανίστηκε πολύ έντονα στα δείγματα ορού, όσον αφορά τις ανακτήσεις των φλαβονολών, των φλαβονών, των ισοφλαβονών, καθώς και αρκετών φαινολικών οξέων. Τέλος, φαίνεται πως η προσθήκη μυρμηγκικού οξέος πριν την εκχύλιση των δειγμάτων πλάσματος και ορού, δεν βελτίωσε τις ανακτήσεις των φαινολικών ενώσεων. Αντιθέτως, σχεδόν όλες οι ενώσεις εμφάνισαν ανακτήσεις χαμηλότερες από 60%.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού, εκτός από το ότι επέφερε ικανοποιητικές ανακτήσεις, ήταν ταχύτερη, οικονομικότερη και απλούστερη μέθοδος από ό,τι η εκχύλιση στερεάς φάσης. Το εργαστήριο διέθετε μη αυτοματοποιημένη συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (IST VacMaster), με αποτέλεσμα να απαιτείται πολύς χρόνος για την εκχύλιση των εκατοντάδων δειγμάτων. Επίσης, για την μέθοδο SPE γινόταν μεγάλη κατανάλωση αναλώσιμων (στηλάκια) και διαλυτών σε αντίθεση με την LLE. Επιλέχθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς οξίνιση ως η βέλτιστη μέθοδος προκατεργασίας ορού και πλάσματος για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων στο μηχάνημα LC-MS.

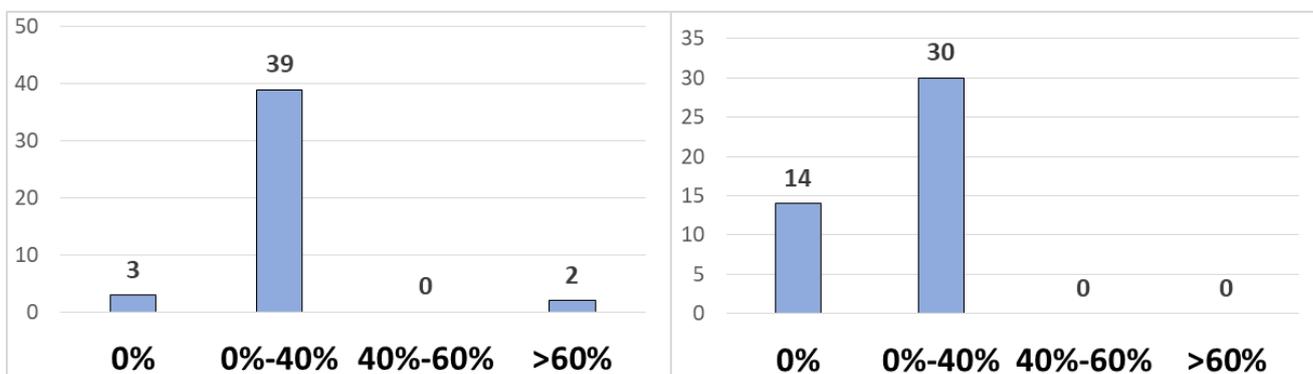
Διάγραμμα 5.1: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με ακετονιτρίλιο (1a).



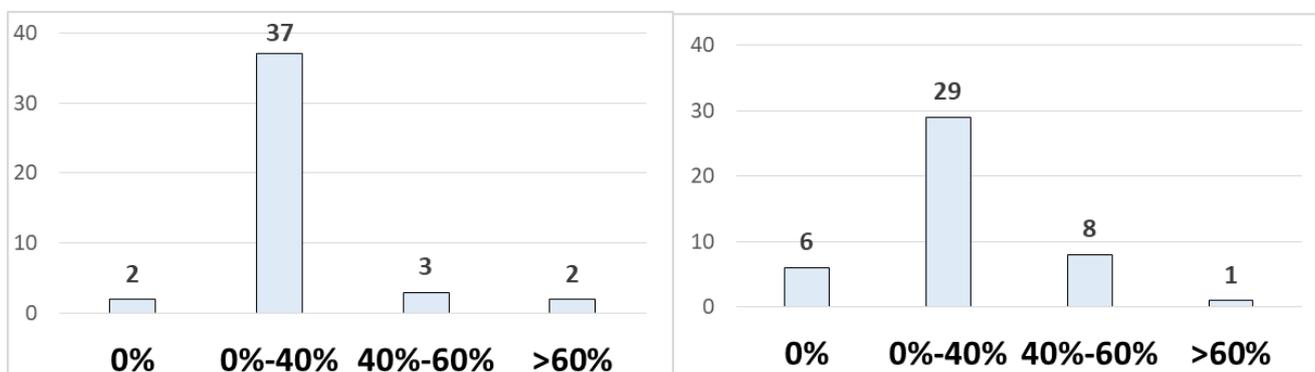
Διάγραμμα 5.2: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο (2a).



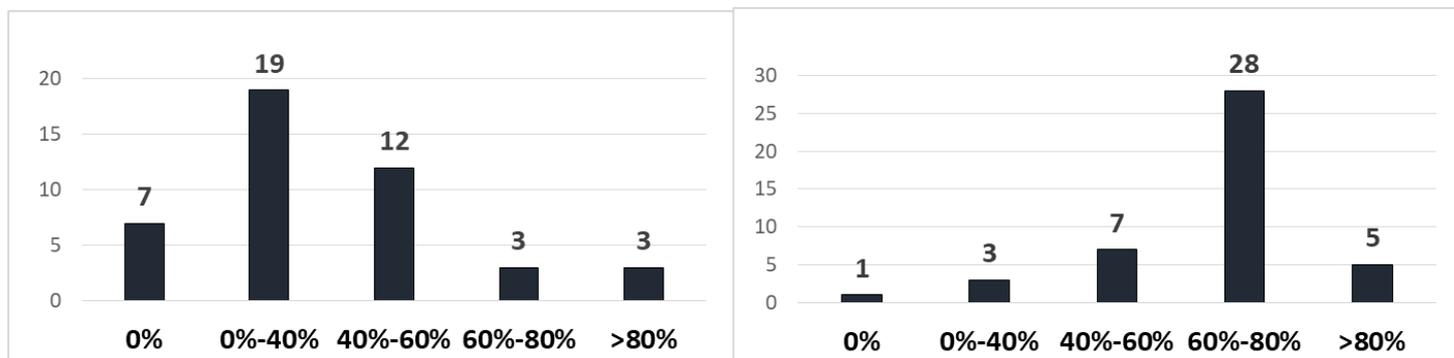
Διάγραμμα 5.3: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με οξινομένο ακετονιτρίλιο (3a).



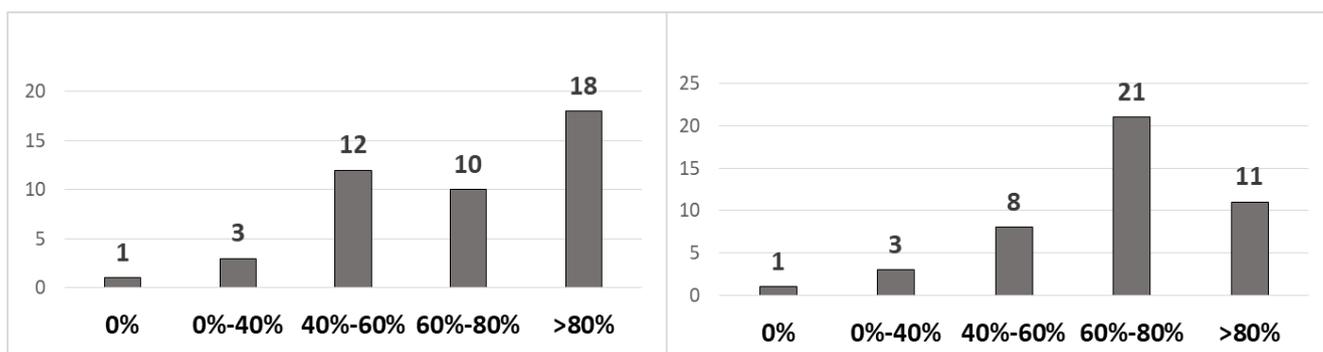
Διάγραμμα 5.4: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με οξινομένο διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο (4a).



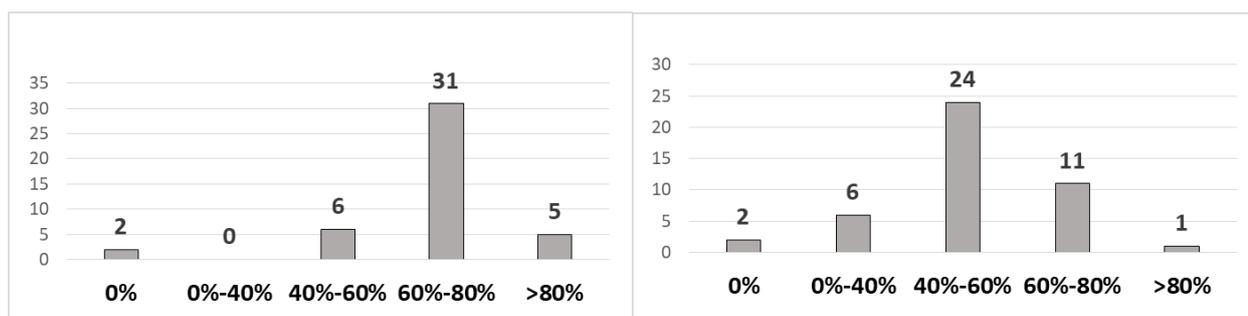
Διάγραμμα 5.5: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με ακετονιτρίλιο καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (1b).



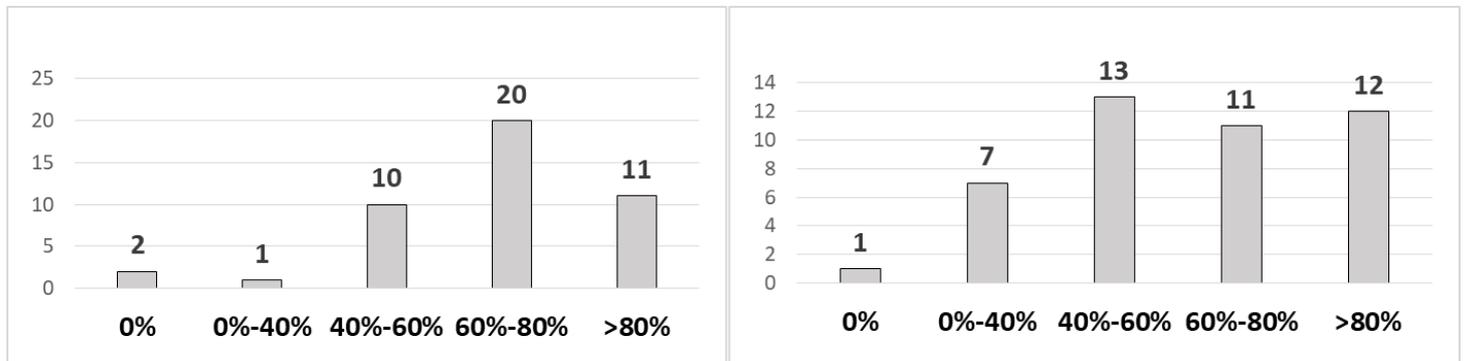
Διάγραμμα 5.6: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (2b).



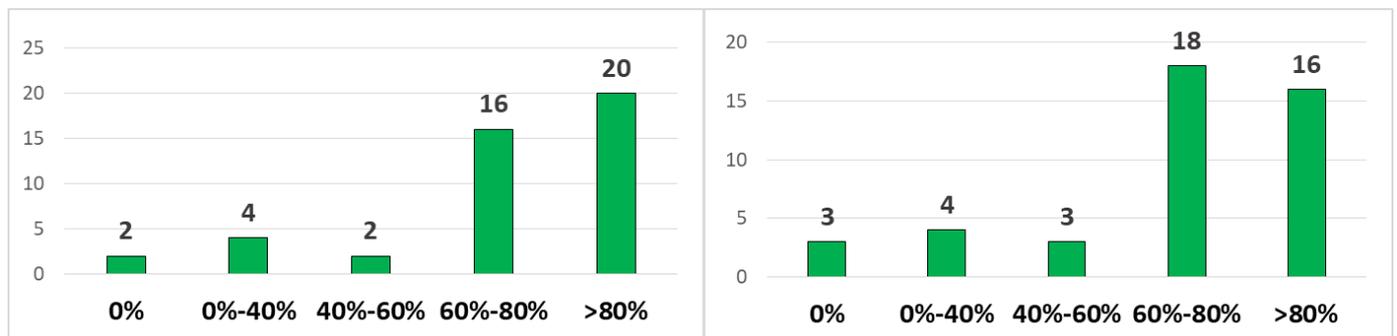
Διάγραμμα 5.7: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα οξινισμένο ακετονιτρίλιο καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (3b).



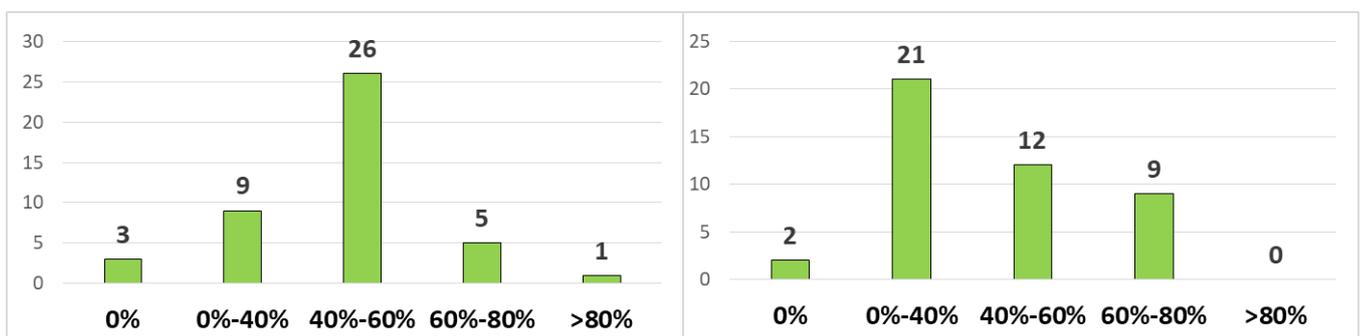
Διάγραμμα 5.8: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική καθίζηση με διάλυμα οξινομένο διάλυμα 10% μεθανόλης σε ακετονιτρίλιο και εκχύλιση στερεάς φάσης (3b).



Διάγραμμα 5.9: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς οξίνιση (1c).



Διάγραμμα 5.10: Κατανομή των 44 πρότυπων ενώσεων ανά εύρος ανακτήσεων σε δείγματα πλάσματος (αριστερά) και ορού (δεξιά) όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού με οξίνιση (2c).



5.2 ENZYΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Μετά την σύγκριση των μεθόδων και την επιλογή της πειραματικής πορείας 1c, αξιολογήθηκε και η προσθήκη του βήματος ενζυμικής υδρόλυσης. Όπως αναλύθηκε στην ενότητα 1.9, οι πολικές φαινολικές ενώσεις μετά την απορρόφηση τους μεταβολίζονται κατά μείζονα λόγο στο ήπαρ. Πιο συγκεκριμένα, από τον μεταβολισμό φάσης II προκύπτουν συζευγμένα παράγωγα αυτών, οι γλυκουρονιδιωμένοι και σουλφονυλιωμένοι μεταβολίτες τους. Επομένως, στα δείγματα πλάσματος και ορού, δύο ώρες μετά από παρέμβαση με τρόφιμο, είναι πολύ πιθανό μεγάλο ποσοστό των πολικών φαινολικών ενώσεων να βρίσκεται σε μορφή τέτοιων μεταβολιτών. Η προσθήκη ενζύμων που διασπούν γλυκουρονικούς και σουλφιδικούς δεσμούς (γλυκουρονιδάση και σουλφατάση, αντίστοιχα), θεωρητικά προκαλεί την αποδέσμευση των πολικών φαινολικών ενώσεων και επιτρέπει την ανίχνευσή τους. Με βάση τα παραπάνω, αποφασίστηκε να συμπεριληφθεί η ενζυμική υδρόλυση ως επιπλέον βήμα της πειραματικής πορείας. Σύμφωνα όμως με τους Quifer-Rada et al., να μην η ενζυμική υδρόλυση είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών παραγώγων του μεταβολισμού φάσης II, αλλά ενδέχεται η πειραματική διαδικασία να επηρεάζει αρνητικά την σταθερότητα των ελεύθερων φαινολικών ενώσεων (Quifer-Rada et al., 2017). Για την διερεύνηση του παραπάνω ευρήματος, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν δείγματα ελέγχου CONTROL 1a και CONTROL 1b. Η σειρά δειγμάτων CTRL 1a εμβολιάστηκε με 10μL από 1600ng/mL πρότυπου μείγματος ελεύθερων πολικών φαινολικών ενώσεων από την αρχή της προκατεργασίας και προστέθηκαν ένζυμα. Η σειρά δειγμάτων CTRL 1b εμβολιάστηκε με 10μL από 1600ng/mL πρότυπου μείγματος ελεύθερων πολικών φαινολικών ενώσεων από την αρχή της προκατεργασίας και σε αυτήν δεν προστέθηκαν ένζυμα. Έπειτα, τοποθετήθηκαν και οι δύο σειρές σε υδατόλουτρο στους 37°C για 45 λεπτά. Τέλος, υποβλήθηκαν σε εκχύλιση υγρού-υγρού και ανάλυση στο LC-MS. Προκειμένου να αξιολογηθεί η πιθανή επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης στην ανάκτηση των ελεύθερων πολικών φαινολικών ενώσεων στον ορό και στο πλάσμα, υπολογίστηκε ο λόγος των σημάτων (CTRL 1a/ CTRL 1b * 100) για κάθε ένωση.

Στα δείγματα πλάσματος, οι ανακτήσεις των ελεύθερων πολικών φαινολών, ήταν χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες ανακτήσεις τους στα δείγματα ορού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η επιγαλλοκατεχίνη η οποία είχε 71% ανάκτηση στα δείγματα ορού και πλάσματος μετά από εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς την προσθήκη ενζύμου. Στην μέθοδο όπου προστέθηκε ένζυμο η ίδια ένωση είχε κατά μέσο όρο 18% ανάκτηση στα δείγματα πλάσματος

και 99% στα δείγματα ορού. Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στην περιεκτικότητα του πλάσματος σε πρωτεΐνες που ενδέχεται να επηρεάζουν την ευαισθησία της ανάλυσης. Στην μελέτη των Quifer-Rada et al. που διεκπεραίωσαν παρόμοιο πείραμα σε δείγματα ούρων, η ενζυμική υδρόλυση μείωσε σημαντικά τις ανακτήσεις των ελεύθερων πολικών φαινολικών ενώσεων. Οι ερευνητές πρότειναν πως το εργαλείο αυτό πιθανώς να μην είναι ιδανικό για τον προσδιορισμό των γλυκουρονιδιωμένων και σουλφονυλιωμένων παραγώγων. Ωστόσο, στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν πρότυπα διαλύματα για τους μεταβολίτες των πολικών φαινολικών ενώσεων, η χρήση ενζυμικής υδρόλυσης, ίσως μπορεί να δώσει ποσοτική εικόνα για τις ενώσεις αυτές και να φέρει αξιόλογα αποτελέσματα.

5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LIQUID CHROMATOGRAPHY – MS SPECTROMETRY, LC – MS) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΟΡΟΥ

Στην παρούσα μελέτη αρχικά εξετάστηκαν διάφορες τεχνικές καθώς και συνδυασμοί αυτών, οι οποίες επί το πλείστον εφαρμόζονται για την προκατεργασία του πλάσματος και του ορού αίματος, με σκοπό την απομόνωση των πολικών φαινολικών ενώσεων από αυτά. Από τις δέκα πειραματικές πορείες που εξετάστηκαν, επιλέχθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού χωρίς οξίνιση ως η βέλτιστη μέθοδος προκατεργασίας ορού και πλάσματος για την ανάλυση των πολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο LC-MS. Ακόμη, διερευνήθηκε η καταλληλότητα του συνδυασμού της εκχύλισης υγρού-υγρού και της ενζυμικής υδρόλυσης με ένζυμο β-γλυκουρονιδάση και σουλφατάση για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη ενώσεων στον ορό και στο πλάσμα. Ο ορός φάνηκε να έχει τις πιο ικανοποιητικές ανακτήσεις (%R) των υπό μελέτη ενώσεων και για αυτό επιλέχθηκε για την μετέπειτα πορεία της μελέτης. Ακόμη το γεγονός ότι στη βιβλιογραφία η πλειοψηφία των μελετών βιοδιαθεσιμότητας χρησιμοποιεί κατά βάση το πλάσμα για τον προσδιορισμό των πολικών φαινολικών συστατικών και όχι τον ορό παρόλο που ως υποστρώματα μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους, αποτέλεσε άλλο ένα κίνητρο για τη διερεύνηση του ορού στα μετέπειτα βήματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης (Renai et al., 2022).

Ακολούθως, εξετάστηκε η εφαρμογή του επιλεγμένου τρόπου προκατεργασίας δειγμάτων ορού για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας των πολικών φαινολικών συστατικών της Κορινθιακής σταφίδας σε τρεις υγιείς εθελοντές, οι

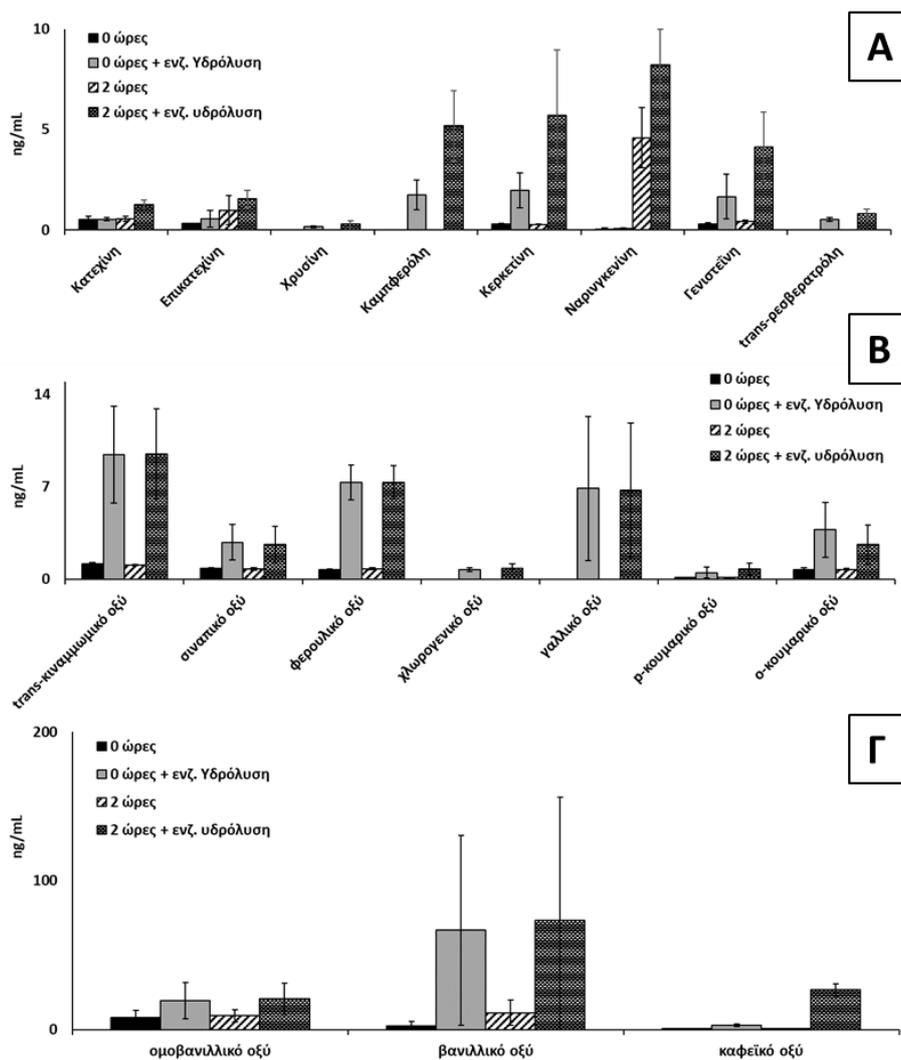
οποίοι κατανάλωσαν 144 g Κορινθιακής σταφίδας, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 8 ισοδύναμα φρούτου (ή 8 μικρομερίδες). Υποβλήθηκαν σε μία αρχική αιμοληψία όντας υπό κατάσταση ολονύχτιας νηστείας και σε μία δεύτερη αιμοληψία 2 h από την κατανάλωση της Κορινθιακής σταφίδας. Για την μελέτη αυτή επιλέχθηκε η χορήγηση της Κορινθιακής σταφίδας καθώς από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι έχει πλούσιο περιεχόμενο σε πολικά φαινολικά συστατικά τα οποία καθίστανται βιοδιαθέσιμα (Chiou et al., 2007). Η επιλογή μίας και μοναδικής αιμοληψίας στις 2 ώρες από την κατανάλωση της Κορινθιακής σταφίδας αποτελεί ένα εύλογο μέσο χρονικό διάστημα που χρειάζεται να περάσει προκειμένου οι περισσότερες πολικές φαινολικές να φτάσουν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα όπως βρέθηκε στη βιβλιογραφία (Kanellos et al., 2013).

Ο προσδιορισμός των επιμέρους πολικών φαινολικών συστατικών στον ορό των εθελοντών έγινε με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (LC – MS). Με την παρούσα μελέτη, επιτεύχθηκε η ανίχνευση σημαντικών ποσοτήτων πολικών φαινολικών ενώσεων στα δείγματα ορού δύο ώρες μετά από την παρέμβαση με τρόφιμο πλούσιο σε αυτά τα φυτοχημικά συστατικά. Ακόμη, παρατηρήθηκε πως ύστερα από την εφαρμογή της ενζυμικής υδρόλυσης στα δείγματα ορού, αυξήθηκαν σημαντικά οι συγκεντρώσεις για την πλειονότητα των ελεύθερων πολικών φαινολικών συστατικών, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την παρουσία των αντίστοιχων γλυκουρονιδιωμένων και σουλφονυλιωμένων παραγώγων τους (μεταβολίτες φάσης II) δύο ώρες μετά την χορήγηση του τροφίμου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ύστερα από τον μεταβολισμό των διαιτητικών πολικών φαινολικών ενώσεων, δεν απαντώνται οι αντίστοιχοι γλυκοζίτες τους στο αίμα και στα ούρα στην μορφή με την οποία υπάρχουν στο τρόφιμο, ενώ παράλληλα, ένα πολύ μικρό ποσοστό των πολικών φαινολικών ενώσεων είναι παρόντα στα βιολογικά αυτά υποστρώματα ως αγλυκόνες, δηλαδή σε ελεύθερη μορφή. Αντιθέτως, οι πολικές φαινολικές ενώσεις απαντώνται στο αίμα και στα ούρα επί το πλείστον σε γλυκουρονιδιωμένη και σουλφονυλιωμένη μορφή (Kroon et al., 2004).

Αρκετές από τις πολικές φαινολικές ενώσεις που έχουν βρεθεί στη σταφίδα, μεταξύ των οποίων ανήκουν η ρεσβερατρόλη, η χρυσίνη, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η ναρινγκενίνη, η γενιστεΐνη, η καμπφερόλη και η κερκετίνη, ανιχνεύθηκαν στον ορό των εθελοντών. Αξίζει να σημειωθεί πως τα δείγματα ορού που υποβλήθηκαν και στο επιπλέον βήμα της ενζυμικής υδρόλυσης, οι συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων πολικών φαινολικών ενώσεων ήταν συγκριτικά υψηλότερες από ότι στα δείγματα όπου δεν πραγματοποιήθηκε ενζυμική υδρόλυση. Ακόμη, στον ορό των εθελοντών ανιχνεύθηκαν και φαινολικά οξέα που επίσης

απαντώνται στη σταφίδα, και συγκεκριμένα είναι το *trans*-κίναμωμικό οξύ, σιναπικό οξύ, φερουλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, γαλλικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ και *o*-κουμαρικό οξύ, φλωρετικό οξύ, ομοβανιλλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, *p*-υδροξυ βενζοϊκό οξύ και *p*-υδροξυ φαινυλοξικό οξύ για τα οποία ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις τους ύστερα από την ενζυμική προκατεργασία των δειγμάτων ορού πριν και μετά τη λήψη της Κορινθιακής σταφίδας. Ορισμένα από αυτά τα μικρού μοριακού βάρους φαινολικά οξέα που υπάρχουν αυτούσια στην Κορινθιακή σταφίδα, αποτελούν είτε παράγωγα καταβολισμού άλλων πολικών φαινολικών ενώσεων όπως είναι η κερκετίνη, που προκύπτουν από την δράση της εντερικής μικροχλωρίδας είτε είναι προϊόντα του ενδογενούς μεταβολισμού της ντοπαμίνης (Murphy et al., 2018). Ακόμη, η εντεροηπατική κυκλοφορία δίνει τη δυνατότητα στις πολικές φαινολικές ενώσεις να παραμείνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέσα στο σώμα (Del Rio et al., 2013; Santhakumar et al., 2018; Velderrain-Rodríguez et al., 2014). Συνεπώς η ύπαρξή τους στα δείγματα ορού που ελήφθησαν πριν και μετά τη χορήγηση του τροφίμου, εφόσον δεν διαφέρει σημαντικά, πιθανότατα να σχετίζεται με όλα ή κάποια από τα παραπάνω.

Μεταξύ των φλαβονοειδών που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη, η ναρινγκενίνη ήταν το πολικό φαινολικό συστατικό που ανιχνεύθηκε στα υψηλότερα επίπεδα. Συγκεκριμένα στα δείγματα ορού πριν την παρέμβαση με και χωρίς ενζυμική προκατεργασία, ανιχνεύτηκαν 0,05 και 0,07 ng/mL ναρινγκενίνης αντίστοιχα. Δύο ώρες μετά την παρέμβαση, οι συγκεντρώσεις ναρινγκενίνης που προσδιορίστηκαν ήταν 5 και 8 ng/mL αντίστοιχα. Η θεαματική αυτή αύξηση της ναρινγκενίνης, υποδηλώνει πως ήταν απόρροια της κατανάλωσης Κορινθιακής Σταφίδας. Παρόμοιες διακυμάνσεις στις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις τους παρατηρήθηκαν και για τα υπόλοιπα φλαβονοειδή (χρυσίνη, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, η γενιστεΐνη, η καμπφερόλη και η κερκετίνη) όπως φαίνεται και στην **εικόνα 5.1**.



Εικόνα 5.1: Πολικές φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στον ορό εθελοντών πριν και μετά την χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας, με και χωρίς ενζυμική προκατεργασία (0 ώρες, 0 ώρες + ενζυμική υδρόλυση, 2 ώρες, 2 ώρες + ενζυμική υδρόλυση).

5.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, η εφαρμογή της εκχύλισης υγρού-υγρού σε συνδυασμό με την ενζυμική υδρόλυση φαίνεται να αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των πολικών φαινολικών ενώσεων και των αντίστοιχων γλυκουρονιδωμένων και σουλφονυλιωμένων παραγώγων τους σε δείγματα ορού αίματος τα οποία αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.

Με την προκατεργασία που ακολουθήθηκε, κατέστη δυνατή η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών φαινολικών συστατικών σε ορό αίματος που συλλέχθηκε δύο ώρες από τη δια στόματος χορήγηση Κορινθιακής σταφίδας.

Αν και η παρούσα μεθοδολογία εξετάστηκε μελετώντας μικρό αριθμό δειγμάτων, φαίνεται πως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και σε μεγαλύτερης κλίμακα μελέτη για την ανάλυση ορού αίματος με στόχο τον προσδιορισμό πολικών φαινολικών συστατικών σε αυτό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2017). Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological Research*, 196, 44–68. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.003>
- Bezerra-Filho, C. S. M., Barboza, J. N., Souza, M. T. S., Sabry, P., Ismail, N. S. M., & de Sousa, D. P. (2019). Therapeutic Potential of Vanillin and its Main Metabolites to Regulate the Inflammatory Response and Oxidative Stress. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(20), 1681–1693. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190312164355>
- Blount, J. W., Redan, B. W., Ferruzzi, M. G., Reuhs, B. L., Cooper, B. R., Harwood, J. S., Shulaev, V., Pasinetti, G., & Dixon, R. A. (2015). Synthesis and Quantitative Analysis of Plasma-Targeted Metabolites of Catechin and Epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(8), 2233–2240. <https://doi.org/10.1021/jf505922b>
- Bolarinwa, A., & Linseisen, J. (2005). Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 823(2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.024>
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Chiou, A., Karathanos, V., Mylona, A., Salta, F., Preventi, F., & Andrikopoulos, N. (2007). Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry - FOOD CHEM*, 102, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.009>
- Cremin, P., Kasim-Karakas, S., & Waterhouse, A. L. (2001). LC/ES-MS Detection of Hydroxycinnamates in Human Plasma and Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1747–1750. <https://doi.org/10.1021/jf000764y>
- de Oliveira, D. M., Pinto, C. B., Sampaio, G. R., Yonekura, L., Catharino, R. R., & Bastos, D. H. M. (2013). Development and Validation of Methods for the Extraction of Phenolic Acids from Plasma, Urine, and Liver and Analysis by UPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(25), 6113–6121. <https://doi.org/10.1021/jf401534d>

- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Dilis, V., & Trichopoulou, A. (2010). Antioxidant Intakes and Food Sources in Greek Adults. *The Journal of Nutrition*, *140*(7), 1274–1279. <https://doi.org/10.3945/jn.110.121848>
- Dixit, M. (2015). Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/504253>
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(6), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>
- Harborne, J. B. (1989). *Plant phenolics*. Academic Press.
- Huang, Q., Braffett, B. H., Simmens, S. J., Young, H. A., & Ogden, C. L. (2020). Dietary Polyphenol Intake in US Adults and 10-Year Trends: 2007-2016. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *120*(11), 1821–1833. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2020.06.016>
- Huo, Y., Zhang, Q., Li, Q., Geng, B., & Bi, K. (2016). Development of a UFLC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven tea catechins in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study after administration of green tea extract. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *125*, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.048>
- Imaging, W. H. O. D., & Technology, L. (2002). *Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations* (p. This is the 2nd revision of document WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.1). World Health Organization.
- Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., Hecker, D., Huemmer, W., Ackermann, M., & Richling, E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *European Journal of Nutrition*, *50*(7), 507–522. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0157-0>
- Kanellos, P. T., Kaliora, A. C., Gioxari, A., Christopoulou, G. O., Kalogeropoulos, N., & Karathanos, V. T. (2013). Absorption and Bioavailability of Antioxidant Phytochemicals and Increase of Serum Oxidation Resistance in Healthy Subjects Following Supplementation with Raisins. *Plant Foods for Human Nutrition*, *68*(4), 411–415. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0389-2>
- Karković Marković, A., Torić, J., Barbarić, M., & Jakobušić Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24102001>

- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.15>
- Liu, X.-Y., Zhang, Y.-B., Yang, X.-W., Xu, W., Liu, L., Zhang, P., Gong, Y., Liu, N.-F., & Peng, K.-F. (2021). Simultaneous determination of twenty-five compounds with anti-inflammatory activity in *Spatholobi Caulis* by using an optimized UFLC-MS/MS method: An application to pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *204*, 114267. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114267>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- McPherson, Richard A, & Mathew R. (2022). *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. (24th ed.). Elsevier Inc.
- Miniati, E. (2007). Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanità*, *43*, 362–368.
- Moein, M. M., El Beqqali, A., & Abdel-Rehim, M. (2017). Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B*, *1043*, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.028>
- Murphy, N., Achaintre, D., Zamora-Ros, R., Jenab, M., Boutron-Ruault, M., Carbonnel, F., Savoye, I., Kaaks, R., Kühn, T., Boeing, H., Aleksandrova, K., Tjønneland, A., Kyrø, C., Overvad, K., Quirós, J. R., Sánchez, M., Altzibar, J. M., María Huerta, J., Barricarte, A., ... Scalbert, A. (2018). A prospective evaluation of plasma polyphenol levels and colon cancer risk. *International Journal of Cancer*, *143*(7), 1620–1631. <https://doi.org/10.1002/ijc.31563>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, *50*(3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Quifer-Rada, P., Martínez-Huélamo, M., & Lamuela-Raventos, R. M. (2017). Is enzymatic hydrolysis a reliable analytical strategy to quantify glucuronidated and sulfated polyphenol metabolites in human fluids? *Food Funct.*, *8*(7), 2419–2424. <https://doi.org/10.1039/C7FO00558J>
- Ren, H., Qian, D., Su, S., Guan, H., Zhang, W., Shang, E., & Duan, J. (2016). Simultaneous determination of tanshinones and polyphenolics in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic interaction between them: Simultaneous determination

- tanshinones and polyphenolics pharmacokinetic interaction. *Drug Testing and Analysis*, 8(7), 744–754. <https://doi.org/10.1002/dta.1840>
- Renai, L., Ancillotti, C., Ulaszewska, M., Garcia-Aloy, M., Mattivi, F., Bartoletti, R., & Del Bubba, M. (2022). Comparison of chemometric strategies for potential exposure marker discovery and false-positive reduction in untargeted metabolomics: Application to the serum analysis by LC-HRMS after intake of Vaccinium fruit supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(5), 1841–1855. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03815-5>
- Rodriguez Lanzi, C., Perdicaro, D. J., Antonioli, A., Piccoli, P., Vazquez Prieto, M. A., & Fontana, A. (2018). Phenolic metabolites in plasma and tissues of rats fed with a grape pomace extract as assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 651, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.05.021>
- Saltveit, M. E. (2017). Synthesis and Metabolism of Phenolic Compounds. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals* (pp. 115–124). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch5>
- Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 113, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022>
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2018). *Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine*. 13.
- Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Salvadó, M.-J., Bustos, M., Fernández-Larrea, J., & Motilva, M.-J. (2009). Determination of procyanidins and their metabolites in plasma samples by improved liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(11–12), 1169–1176. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.005>
- Singh, S. (2016). Enhancing phytochemical levels, enzymatic and antioxidant activity of spinach leaves by chitosan treatment and an insight into the metabolic pathway using DART-MS technique. *Food Chemistry*, 199, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.127>
- Soleas, G. J., Yan, J., & Goldberg, D. M. (2001). Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757(1), 161–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00142-6)
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Tao, Y., Xu, X., Yan, J., & Cai, B. (2019). A sensitive UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of polyphenols in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of

dispensing granules and standard decoction of *CINNAMOMUM CASSIA* twigs. *Biomedical Chromatography*, 33(7), e4534. <https://doi.org/10.1002/bmc.4534>

Thermo Fisher Scientific. (2012). *Exactive Plus Operating Manual (P/N 1323060, Revision A) (A0793 ed.)*.

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>

Vacek, J., Ulrichová, J., Klejdus, B., & Šimánek, V. (2010). Analytical methods and strategies in the study of plant polyphenolics in clinical samples. *Analytical Methods*, 2(6), 604. <https://doi.org/10.1039/c0ay00042f>

Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C.-Y. O., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food Funct.*, 5(2), 189–197. <https://doi.org/10.1039/C3FO60361J>

Wang, Z., Li, S., Ge, S., & Lin, S. (2020). Review of Distribution, Extraction Methods, and Health Benefits of Bound Phenolics in Food Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3330–3343. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06574>

Xin, L. (2019). Rapid and sensitive HPLC-MS/MS method for quantitative determination of isochlorogenic acid B in rat plasma and its application in pharmacokinetic study. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 28(3), 167–173. <https://doi.org/10.5246/jcps.2019.03.016>

Xu, Z.-L., Xu, M.-Y., Wang, H.-T., Xu, Q.-X., Liu, M.-Y., Jia, C.-P., Geng, F., & Zhang, N. (2018). Pharmacokinetics of Eight Flavonoids in Rats Assayed by UPLC-MS/MS after Oral Administration of *Drynariae rhizoma* Extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/4789196>

Zhang, W., Xu, M., Yu, C., Zhang, G., & Tang, X. (2010). 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*, 878(21), 1837–1844. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.05.023>

Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2018). Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1260–1270. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>

Αρχοντάκη Ε. (n.d.). *Προκατεργασία δείγματος για αναλύσεις HPLC*.

Θεοδωρίδης Γ., Σαμανίδου Β., Γηρούση Σ., Ζώτου Α., & Ζαχαριάδης Γ. (2015α). Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων. In *Βιοαναλυτική Χημεία*.

Θεοδωρίδης Γ., Σαμανίδου Β., Γηρούση Σ., Ζώτου Α., & Ζαχαριάδης Γ. (2015β). Κεφάλαιο 11: Χρωματογραφικές Τεχνικές στη Βιοανάλυση. In *Βιοαναλυτική Χημεία*.

Θεοδωρίδης Γ., Σαμανίδου Β., Γηρούση Σ., Ζώτου Α., & Ζαχαριάδης Γ. (2015c). Κεφάλαιο 12: Φασματομετρία Μάζας. In *Βιοαναλυτική Χημεία*.