



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

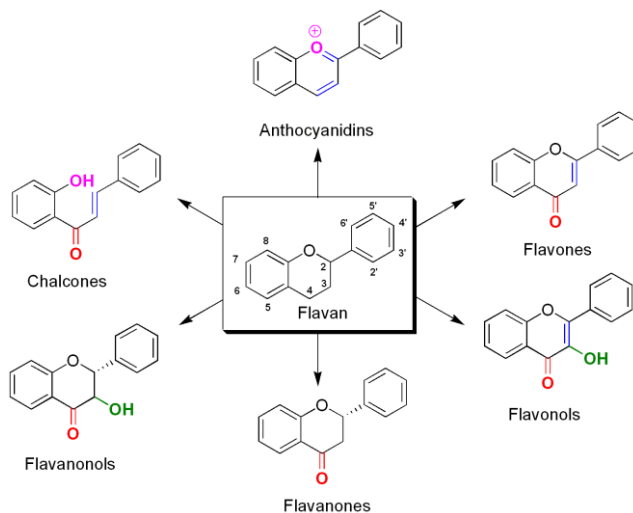
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ"**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ ΦΑΣΕΩΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ
"DISCOVERY RP AMIDE C16".**

ΝΙΚΟΛΙΑ Κ. ΚΟΥΤΡΟΠΟΥΛΟΥ

A.M: 160703



Επιβλέπων καθηγητής:

Γιαγκίνης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Γιαγκίνης Κωνσταντίνος (Επιβλέπων καθηγητής)

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου

Παντερή Ειρήνη

Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Γκίκας Ευάγγελος

Επίκουρος Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Περίληψη

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην χημική τάξη των πολυφαινολών, εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά και παρουσιάζουν ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες. Ειδικότερα, πολλά φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντιαθηρωματική, ηπατοπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς και αντικαρκινικές ιδιότητες. Η απορρόφηση των φλαβονοειδών διαμέσου του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου θεωρείται ότι αποτελεί την πλέον κρίσιμη παράμετρο για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης. Η λιποφιλία καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την απορρόφηση των ξενοβιοτικών ουσιών διαμέσου του εντερικού επιθηλίου.

Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν οι χρωματογραφικοί δείκτες λιποφιλίας $\log k_w$ 33 φλαβονοειδών με την χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Discovery RP Amide C16. Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε ως υδατική συνιστώσα κορεσμένο σε οκτανόλη ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 7,4 και ως οργανικός τροποποιητής μεθανόλη. Προσδιορίστηκε μεγάλος αριθμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φλαβονοειδών με την χρήση λογισμικών προγραμμάτων. Τα δεδομένα εντερικής διαπερατότητας των υπό μελέτη φλαβονοειδών συλλέχθηκαν από την βιβλιογραφία.

Διαπιστώθηκε παρόμοιος μηχανισμός έκλουσης για το σύνολο των φλαβονοειδών, εξαιρουμένων των γλυκοζιτών τους, με βάση την ισχυρή γραμμική σχέση μεταξύ $\log k_w/S$. Καταγράφηκε ικανοποιητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας για 20 φλαβονοειδή για τα οποία υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα. Η συσχέτιση που καταγράφηκε ήταν καλύτερη από τις αντίστοιχες γραμμικές συσχετίσεις με την χρήση στηλών ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών για την ομάδα εργασίας των 20 φλαβονοειδών. Με την εισαγωγή των όρων S και V βελτιώθηκε σημαντικά η συσχέτιση μεταξύ των δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας. Η τελική εξίσωση που προέκυψε θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας φλαβονοειδών για τα οποία δεν υπάρχουν διαθέσιμες πειραματικές τιμές στην βιβλιογραφία.

Λέξεις-Κλειδιά: Φλαβονοειδή, Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσης (RP-HPLC), Λιποφιλία, Εντερική διαπερατότητα, κύτταρα Caco-2, Discovery RP Amide C16.

Abstract

Flavonoids belong to the chemical class of polyphenols, being found in large quantities in plants and exhibiting a variety of medicinal properties. In particular, many flavonoids have antioxidant, anti-atherosclerotic, hepato-protective and anti-inflammatory effects, as well as anti-tumor properties. The absorption of flavonoids through small intestine mucosa is considered to be a critical parameter for the manifestation of their biological activity. Lipophilicity significantly affects the absorption of xenobiotic substances through the intestinal epithelium.

In the present study, the chromatographic $\log k_w$ indices of 33 flavonoids were determined by the use of reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Discovery RP Amide C16 reverse phase column was used as static phase. For the preparation of mobile phase, octanol-saturated MOPS buffer with pH 7.4 was used aqueous component and methanol as organic modifier. A large number of physicochemical properties of flavonoids were determined using software programs. The intestinal permeability data of the flavonoids studied were collected from the literature.

A similar elution mechanism was found for all flavonoids, excluding their glycosides, based on the strong linear $\log k_w / S$ relationship. A satisfactory linear correlation was observed between $\log k_w$ indices and intestinal permeability coefficient for 20 flavonoids for which bibliographic data was available. The correlation recorded was better than the corresponding linear correlations derived by the used of immobilized artificial membrane columns for the under study data set. The introduction of S and V terms significantly improved the correlation between $\log k_w$ indices and intestinal permeability coefficient. The resulting final equation could be used to estimate the intestinal permeability of flavonoids for which no experimental values are available in the literature.

Keywords: Flavonoids, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), Lipophilicity, Intestinal Absorption, Caco-2 cells, Discovery RP Amide C16.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή, κύριο Κωνσταντίνο Γιαγκίνη, που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα. Τον ευχαριστώ βαθύτατα για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και τη συνεχή καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Η διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κύριο Τσόπελα Φώτη, την κυρία Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα από το Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, καθώς και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Στεργιόπουλο Χρύσανθο για τη θερμή τους υποδοχή, τη στήριξη τους και την φιλική τους στάση όλο αυτό το διάστημα.

Προς τους Καθηγητές του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας και ιδιαίτερα τους Ε. Παντερή, Ι. Ντότσικα, Ε. Γκίκα και Ε. Μικρό εκφράζω τις ευχαριστίες μου για το ενδιαφέρον τους και το επίπεδο των σπουδών που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και το φιλικό μου περιβάλλον, ιδιαιτέρως την στενή μου φίλη Π. Μπίνου, που όπως πάντα ήταν δίπλα μου και με στήριζαν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών

Κουτροπούλου Νικολία,

Αθήνα 2018

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Θεωρητικό μέρος	7
1. Φλαβονοειδή.....	7
1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....	7
1.2 Χημική Δομή	8
1.3 Ταξινόμηση και Πηγές Προέλευσης.....	10
1.4 Απορρόφηση και Μεταβολισμός Φλαβονοειδών	15
1.5 Εντερική διαπερατότητα	18
1.6 Πιθανές Ευεργετικές Ιδιότητες Φλαβονοειδών	22
2. Λιποφιλία	34
3. Χρωματογραφία	37
3.1 Υγροχρωματογραφία.....	38
3.2 Στατικές φάσεις στην RP-HPLC.....	42
3.3 Κινητές φάσεις στην RP-HPLC	45
3.4 RP-HPLC και δείκτες λιποφιλίας.....	47
Πειραματικό μέρος.....	50
4. Προσδιορισμός λιποφιλίας φλαβονοειδών μέσω προσδιορισμού των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$	50
4.1 Εξεταζόμενα Φλαβονοειδή	50
4.2 Μεθοδολογία	56
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	61
5.1 Γραφήματα $\log k/\phi$ και εξαγωγή τιμών $\log k_w$	61
5.2 Συσχέτιση με την Caco-2 εντερική διαπερατότητα.....	66
6. Συμπεράσματα	75
Βιβλιογραφία	76

Θεωρητικό μέρος

1. Φλαβονοειδή

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Η ιστορία των φλαβονοειδών ξεκινά περί το 1930, όταν μια νέα ουσία απομονώνεται από τα πορτοκάλια. Οι επιστήμονες θεώρησαν αρχικά, ότι είναι μέλος μιας νέας οικογένειας βιταμινών και για τον λόγο αυτό την ονόμασαν *βιταμίνη Ρ*. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για φλαβονοειδές, τη ρουτίνη (rutin), ενώ μέχρι και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 4000 διαφορετικά φλαβονοειδή [1].

Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών προϊόντων, καθώς αποτελούν μια κλάση δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίζονται στα φυτά, είναι δε ευρέως διαδεδομένα σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Στη φύση, είναι προϊόντα που βρίσκονται σε διάφορα μέρη του φυτού και χρησιμοποιούνται από αυτά για την ανάπτυξη και την άμυνά τους [2]. Πρόκειται για φαινολικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και πολλά από αυτά αναγνωρίζονται εύκολα ως χρωστικές των ανθών στις περισσότερες οικογένειες αγγειόσπερμων. Ωστόσο, η εμφάνισή τους δεν περιορίζεται στα άνθη, αλλά εντοπίζονται σε όλα τα μέρη του φυτού [3]. Πολλά φλαβονοειδή βρίσκονται επίσης σε αφθονία στα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι, το κακάο και το κρασί και ως εκ τούτου, ονομάζονται διαιτητικά φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, διαχωρίζονται σε υποομάδες, που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες πηγές. Για παράδειγμα, τα κρεμμύδια και το τσάι είναι σημαντικές διαιτητικές πηγές φλαβονολών και φλαβονών.

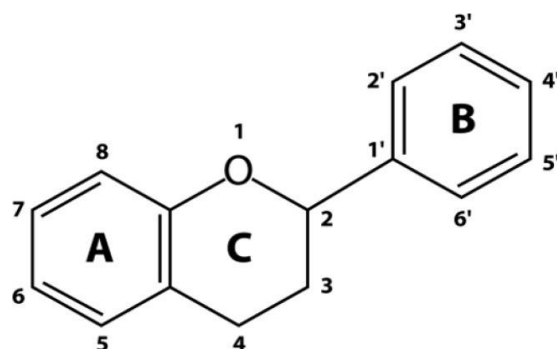
Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες στα φυτά, τα ζώα και τα βακτηρίδια. Συντίθενται σε συγκεκριμένα σημεία του φυτού και είναι υπεύθυνα για το χρώμα και το άρωμα των ανθών, αλλά και στον καρπό προκειμένου να προσελκύσουν επικονιαστές και κατά συνέπεια να βοηθήσουν τη βλάστηση των σπορίων [4]. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα φυτά, δρουν ως φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας [5] και λειτουργούν προστατευτικά στον παγετό και την ξηρασία [6].

Τα φλαβονοειδή συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα θετικών επιδράσεων για την υγεία και είναι αναπόσπαστο στοιχείο εφαρμογών στη φαρμακευτική, την ιατρική και την κοσμητολογία. Αυτό αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-μεταλλαξεογόνες και αντι-καρκινικές ιδιότητές τους σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επιδρούν στη λειτουργία των κυτταρικών ενζύμων. Οι επιθυμητές βιοχημικές και αντιοξειδωτικές αυτές επιδράσεις έχει διαπιστωθεί ότι σχετίζονται με διάφορες χρόνιες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η νόσος Alzheimer (AD), η αθηροσκλήρωση, κ.λπ. [7, 8].

Τα φλαβονοειδή έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και μελετώνται λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία του ανθρώπου. Οι Dixon & Pansinetti [9] έκαναν μια λεπτομερή ανασκόπηση σχετικά με τα φυτικά φλαβονοειδή και τα ισοφλαβονοειδή και αξιολόγησαν τις εφαρμογές τους στη γεωργία και τις νευροεπιστήμες στους ανθρώπους. Οι Kumar & Pandey [10] εξέτασαν την προστατευτική δράση των φλαβονοειδών κατά των χρόνιων νοσημάτων του ανθρώπου, καθώς και τη δράση τους στα φυτά. Πρόσφατα οι Panche et al. [11], έκαναν ανασκόπηση για τη νόσο AD και τις τρέχουσες θεραπευτικές μεθόδους, και συζήτησαν λεπτομερώς τις χρήσεις των φλαβονοειδών ως δευτερογενών μεταβολιτών φυτών για τη θεραπεία της νόσου AD και των μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή.

1.2 Χημική Δομή

Η βασική χημική δομή των φλαβονοειδών είναι ένας σκελετός 15 ατόμων άνθρακα, τα οποία είναι διατεταγμένα σε δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) που ενώνονται μεταξύ τους με μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα και από αυτή προκύπτει ένας ετεροκυκλικός πυρολικός δακτύλιος (C) (Εικόνα 1) [1].



Εικόνα 1 : Βασική δομή φλαβονοειδών

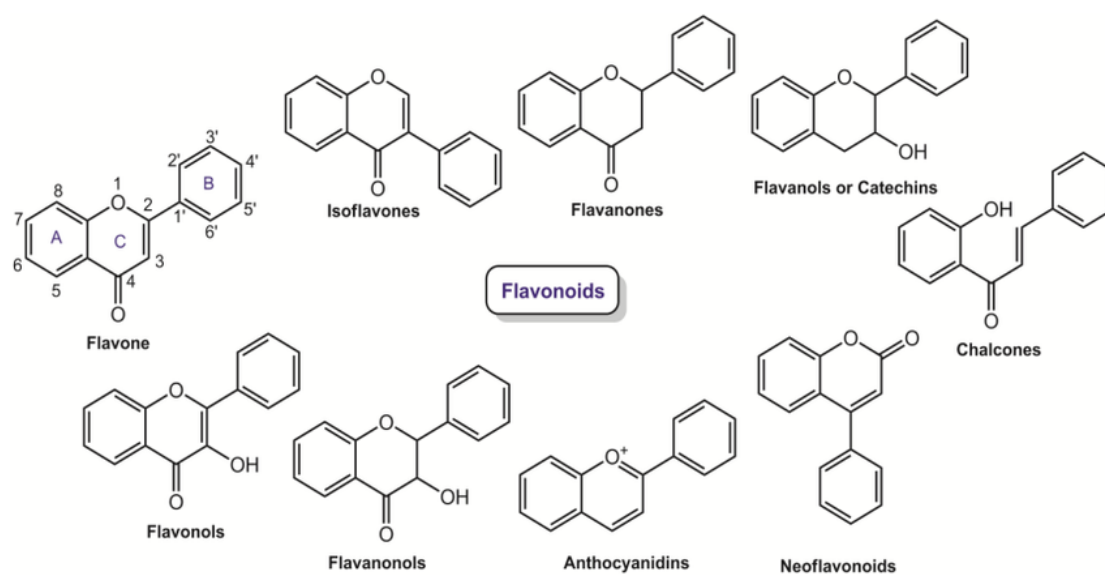
Η βιολογική δράση του κάθε φλαβονοειδούς σχετίζεται άμεσα με την χημική του δομή. Έτσι, ένας διπλός δεσμός μεταξύ των ανθράκων C2 και C3 επηρεάζει τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του μορίου. Η σύνδεση καρβονυλομάδας στον C4 άνθρακα βοηθά στην εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου, ενώ μία υδροξυλομάδα στον C3 άνθρακα συμβάλλει στην αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Ο αριθμός των υδροξυλομάδων που εντοπίζονται στον δακτύλιο B είναι ανάλογος με την ικανότητα του μορίου να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, ειδικά εάν οι υδροξυλομάδες βρίσκονται στις θέσεις 3' και 4'. Τέλος, οι υδροξυλομάδες που βρίσκονται στις θέσεις αυτές, καθώς και στις θέσεις 3, 5 και 7 ενισχύουν την αναστολή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων [12-16].

Τα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν με μορφή αγλυκονών, γλυκοζιτών ή μεθυλιωμένων παραγώγων. Η βασική τους δομή είναι η αγλυκόνη. Επίσης, εντοπίζονται στην φύση και με την μορφή μεθυλο-αιθέρων και ακετυλο-εστέρων. Όταν σχηματίζονται οι γλυκοζίτες, ο γλυκοζιτικός δεσμός συνήθως βρίσκεται στην θέση 3 ή 7 του υδατανθρακικού τμήματος και συνήθως αποτελείται από L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, γλυκοραμνόζη, γαλακτόζη ή αραβινόζη [17].

1.3 Ταξινόμηση και Πηγές Προέλευσης

Τα флаβονοειδή μπορούν να υποδιαιρεθούν σε διαφορετικές υποομάδες ανάλογα με τον άνθρακα του δακτυλίου C στον οποίο είναι συνδεδεμένος ο δακτύλιος B, καθώς και τον βαθμό ακορεστότητας, τον βαθμό οξείδωσης και το είδος των υποκαταστατών του δακτυλίου C. Για флаβονοειδή της ίδιας τάξης οι διαφορές εντοπίζονται στους υποκαταστάτες των δακτυλίων A και B.

Τα флаβονοειδή στα οποία συνδέεται ο δακτύλιος B στη θέση 3 του δακτυλίου C ονομάζονται ισοφλαβόνες. Εκείνα στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 4 ονομάζονται νεοφλαβονοειδή, ενώ εκείνα στα οποία ο δακτύλιος B συνδέεται στη θέση 2 μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε διάφορες υποομάδες με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου C. Αυτές οι υποομάδες είναι: флаβόνες, флаβονόλες, флаβανόνες, флаβανονόλες, флаβανόλες ή κατεχίνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Ταξινόμηση флаβονοειδών

Ισοφλαβόνες

Στις ισοφλαβόνες η σύνδεση του δακτυλίου B με τον C γίνεται στη θέση 3 αντί για τη θέση 2. Η παρουσία τους στο φυτικό βασίλειο είναι περιορισμένη και βρίσκονται κυρίως στη σόγια και σε άλλα οσπριοειδή φυτά, ενώ ορισμένες έχουν εντοπιστεί σε μικροοργανισμούς. Παρουσιάζουν δε δυνατότητες για την καταπολέμηση ενός σημαντικού αριθμού ασθενειών. Ισοφλαβόνες όπως η γενιστεΐνη (genistein) και η δαΐδζεΐνη (daidzein) θεωρούνται συνήθως φυτο-οιστρογόνα εξαιτίας της οιστρογονικής δράσης τους σε ορισμένα ζωικά μοντέλα [18].

Νεοφλαβονοειδή

Στα νεοφλαβονοειδή ο δακτύλιος B συνδέεται με τον C στη θέση 4, ενώ στη θέση 2 συναντάται μια καρβονυλική ομάδα. Η πρώτη απομονωμένη νεοφλαβονή από φυσικές πηγές ήταν η καλοφιλολίδη (calophyllolide). Η απομόνωση έγινε το 1951 από σπόρους *Calophyllum inophyllum* [19].

Φλαβόνες

Οι φλαβόνες δομικά στερούνται μια υδροξυλομάδα στη θέση 3 του δακτυλίου C. Έχουν διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων 2 και 3 και της α κετόνης στη θέση 4 του δακτυλίου C. Οι περισσότερες φλαβόνες των λαχανικών και των φρούτων έχουν μια ομάδα υδροξυλίου στη θέση 5 του A δακτυλίου, ενώ η υδροξυλίωση σε άλλες θέσεις, ως επί το πλείστον στις θέσεις 7 του A δακτυλίου ή 3' και 4' του B δακτυλίου, μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την ταξινόμηση του συγκεκριμένου λαχανικού ή φρούτου. Εμφανίζονται ευρέως σε φύλλα, άνθη και φρούτα ως γλυκοζίτες. Το σέλινο, ο μαϊντανός, οι κόκκινες πιπεριές, το χαμομήλι, η μέντα και το ginkgo biloba είναι από τις σημαντικότερες πηγές φλαβονών. Η λουτεολίνη (luteolin), η απιγενίνη (apigenin) και η τανγκεριτίνη (tangeritin) ανήκουν σε αυτήν την υποκατηγορία φλαβονοειδών [20].

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι φλαβονοειδή με μια υδροξυλομάδα στη θέση 3 και μια καρβονυλομάδα στη θέση 4 του δακτυλίου C. Εμφανίζονται σε αφθονία σε μια ποικιλία φρούτων και λαχανικών. Οι πιο μελετημένες φλαβονόλες είναι η καμπφερόλη (kaempferol), η κερκετίνη (quercetin), η μυρικετίνη (myricetin) και η φισετίνη (fisetin). Τα κρεμμύδια, το λάχανο, το μαρούλι, οι ντομάτες, τα μήλα, τα σταφύλια, τα μούρα, το τσάι και το κόκκινο κρασί είναι πλούσιες πηγές φλαβονολών. Η πρόσληψη φλαβονολών συσχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία που περιλαμβάνει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων [20, 21].

Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες, που ονομάζονται επίσης και διυδροφλαβόνες, έχουν το δακτύλιο C κορεσμένο, και ως εκ τούτου, σε αντίθεση με τις φλαβόνες, ο δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 είναι κορεσμένος και αυτή είναι η μόνη δομική διαφορά μεταξύ των δύο υποομάδων των φλαβονοειδών. Οι φλαβανόνες είναι παρούσες σε όλα τα εσπεριδοειδή, όπως τα πορτοκάλια, τα λεμόνια και τα σταφύλια. Η εσπεριτίνη (hesperitin), η ναρινγενίνη (naringenin) και η εριοδικτυόλη (eriodictyol) είναι μέλη αυτής της κατηγορίας φλαβονοειδών. Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για την πικρή γεύση του χυμού και της φλούδας των εσπεριδοειδών. Τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών παρουσιάζουν ενδιαφέροντες φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ μειώνουν τα λιπίδια και τη χοληστερόλη στο αίμα. Κατά τα τελευταία 15 χρόνια, ο αριθμός των φλαβανονών έχει αυξηθεί σημαντικά [21].

Φλαβανονόλες

Το χαρακτηριστικό των φλαβανονολών είναι μία υδροξυλομάδα στη θέση 3 και μια καρβονυλομάδα στη θέση 4 του δακτυλίου C. Παραδείγματα αυτής της υποομάδας είναι η ταξιφολίνη (taxifolin), που εντοπίζεται σε κωνοφόρα, σε εκχυλίσματα από γάλα γαϊδουράγκαθου, στο ξύδι που έχει παλαιωθεί σε ξύλο κερασιάς και παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς και η αρωμαδεδρίνη (aromadedin) [22].

Φλαβανόλες ή κατεχίνες

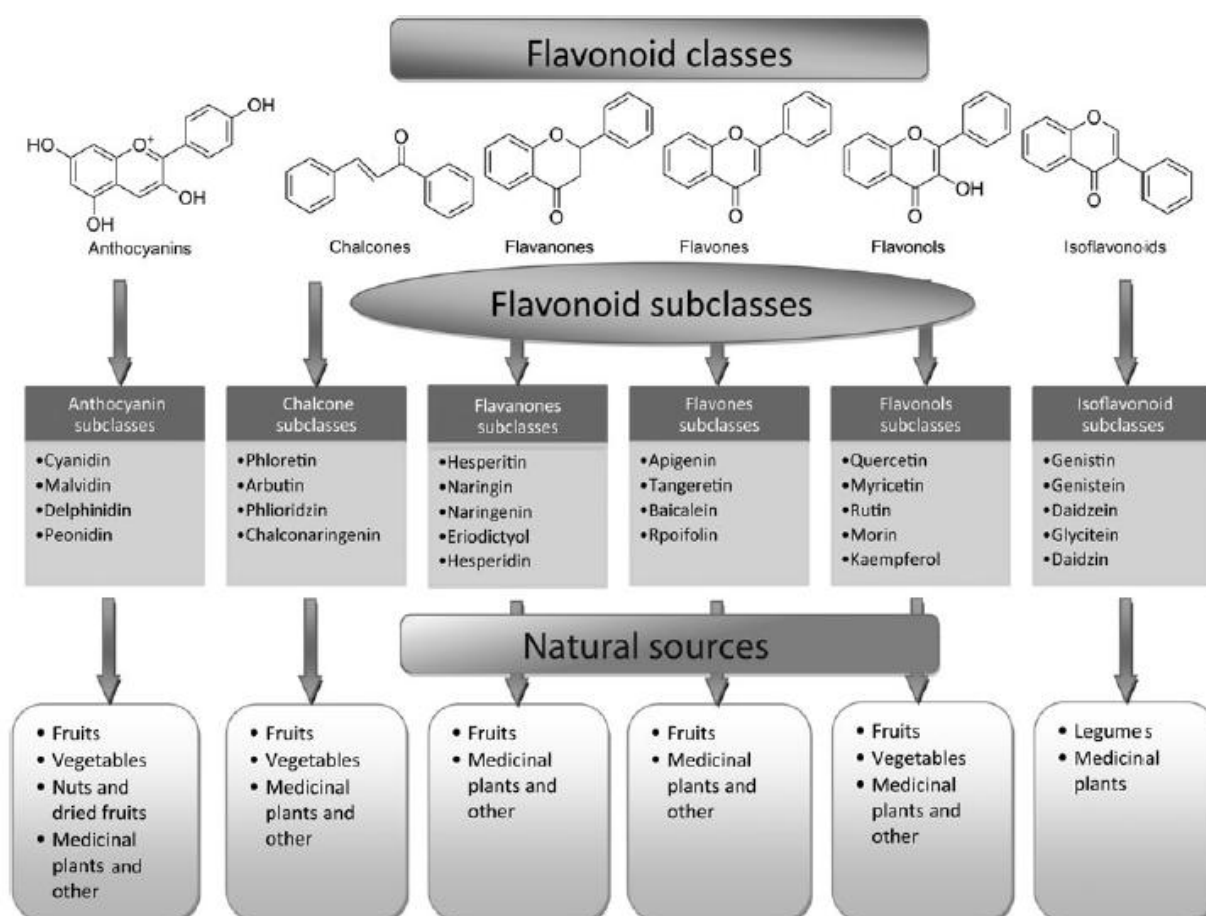
Οι φλαβανόλες, που ονομάζονται επίσης διυδροφλαβονόλες ή κατεχίνες, είναι 3-υδροξυ παράγωγα των φλαβανονών. Είναι μια πολύ διαφοροποιημένη και πολυ-υποκατεστημένη υποομάδα. Οι φλαβανόλες αναφέρονται επίσης και ως φλαβανο-3-όλες, καθώς η ομάδα υδροξυλίου είναι πάντα δεσμευμένη στη θέση 3 του δακτυλίου C. Σε αντίθεση με πολλά φλαβονοειδή, δεν υπάρχει διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3. Οι φλαβανόλες εντοπίζονται σε αφθονία σε μπανάνες, μήλα, βατόμουρα, ροδάκινα και αχλάδια [20].

Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ουσίες που ευθύνονται για τα χρώματα στα φυτά και τα φρούτα. Η κυανιδίνη (Cyanidin), η δελφινιδίνη (delphinidin), η μαλβιδίνη (malvidin), η πελαργονιδίνη (pelargonidin) και η πεονιδίνη (peonidin) είναι οι πιο συχνά μελετημένες ανθοκυανίνες. Εμφανίζονται κυρίως στα εξωτερικά στρώματα των κυττάρων διάφορων φρούτων όπως τα κράνμπερι, η μαύρη σταφίδα, τα κόκκινα σταφύλια, τα σταφύλια merlot, τα ράσμπερι, τις φράουλες, τα βατόμουρα και τα μπλάκμπερι. Η σταθερότητα σε συνδυασμό με τα οφέλη για την υγεία αυτών των ενώσεων τους αποτελούν δύο βασικούς λόγους για την ένταξή τους στη βιομηχανία των τροφίμων σε μια ποικιλία εφαρμογών [23]. Το χρώμα της ανθοκυανίνης εξαρτάται από το pH, καθώς και από τη μεθυλίωση ή την ακυλίωση στις ομάδες υδροξυλίου στους δακτυλίους A και B [21].

Χαλκόνες

Χαρακτηρίζονται από την απουσία του δακτυλίου C της βασικής σκελετικής δομής των φλαβονοειδών που φαίνεται στην Εικόνα 1. Για το λόγο αυτό αναφέρονται και ως φλαβονοειδή ανοιχτής αλυσίδας. Σημαντικά παραδείγματα χαλκονών αποτελούν η φλοριντζίνη (phloridzin), η αρβουτίνη (arbutin), η φλορετίνη (phloretin) και η χαλκονανρινγενίνη (chalconaringenin). Οι χαλκόνες εντοπίζονται σε σημαντικές ποσότητες σε ντομάτες, αχλάδια, φράουλες και ορισμένα προϊόντα σιταριού. Οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών επειδή παρουσιάζουν πολλά θρεπτικά και βιολογικά οφέλη [20].



Εικόνα 3: Κατάταξη και πηγές φλαβονοειδών

1.4 Απορρόφηση και Μεταβολισμός Φλαβονοειδών

1.4.1 Απορρόφηση

Απορρόφηση είναι η διαδικασία με την οποία ένα δραστικό συστατικό περνά από τη θέση χορήγησης στον οργανισμό, πρακτικά όμως στο αίμα και τα λεμφαγγεία. Η βιοδιαθεσιμότητα είναι μια φαρμακοκινητική παράμετρος που δηλώνει το ολικό ποσό και τον αληθή ρυθμό με τον οποίον φτάνει το χορηγούμενο δραστικό συστατικό στη συστηματική κυκλοφορία για να δράσει στα όργανα στόχους. Εκφράζεται ως ποσοστό του χορηγούμενου δραστικού συστατικού που κατορθώνει να εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία και τελικά να φτάσει στο σημείο δράσης. Για παράδειγμα, αν χορηγηθούν από το στόμα (per os) 100mg ενός φαρμάκου και από αυτά τα 80mg απορροφηθούν χωρίς να υποστούν καμία χημική μεταβολή, τότε ότι η βιοδιαθεσιμότητα του είναι 80%. Για να υπολογιστεί με άμεσο τρόπο η βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμάκου που χορηγείται από του στόματος, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στην κυκλοφορία σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η καμπύλη που προκύπτει καλύπτει ένα εμβαδόν επιφάνειας το οποίο ονομάζεται εμβαδόν περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve - AUC) και είναι ανάλογο της ποσότητας του φαρμάκου στην κυκλοφορία. Όσο μεγαλύτερο το εμβαδόν της AUC, τόσο περισσότερο φάρμακο διατίθεται στην κυκλοφορία για να δράσει. Η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται τόσο από την απορρόφηση, η οποία είναι συνάρτηση της οδού χορήγησης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του δραστικού συστατικού και διάφορων φυσικών και βιολογικών παραμέτρων, όσο και από το φαινόμενο πρώτης διόδου [24].

Το φαινόμενο πρώτης διόδου (first pass effect) είναι το φαινόμενο της εξουδετέρωσης ενός σημαντικού ποσοστού από την κανονική δόση ενός φαρμάκου που χορηγείται από το στόμα, λόγω καταστροφής του από τα ένζυμα του γαστρεντερικού συστήματος, τα βακτηρίδια του εντέρου, τα ένζυμα των κυττάρων του τοιχώματος του εντέρου και τα ηπατικά κύτταρα. Ένα φάρμακο, όταν χορηγείται από το στόμα, θα φτάσει στον αυλό του εντέρου και από εκεί θα περάσει στο εσωτερικό των αγγείων του κυκλοφορικού συστήματος και ιδιαίτερα στο φλεβικό σύστημα. Όλες οι φλέβες του εντέρου καταλήγουν στην πυλαία φλέβα, η οποία καταλήγει στο ήπαρ. Έτσι, ένα ποσοστό του φαρμάκου θα καταλήξει στα

κύτταρα του ήπατος όπου υπάρχει η πιθανότητα να μεταβολιστεί και να εξουδετερωθεί. Επομένως, αν θέλουμε να έχουμε φαρμακολογικό αποτέλεσμα θα πρέπει να συνυπολογίσουμε στη δοσολογία μας και το ποσόν του φαρμάκου που θα υποστεί το φαινόμενο πρώτης διόδου. Για να παρακαμφθεί το φαινόμενο πρώτης διόδου το φάρμακο πρέπει να δοθεί παρεντερικά [25].

Η ποικιλία των δομών των φλαβονοειδών συμβάλλει αναμφισβήτητα στις διαφοροποιήσεις που αυτά εμφανίζουν ως προς τη βιολογική δραστηρότητά τους. Ακόμα και μικρές διαφοροποιήσεις ως προς την χημική τους δομή μπορεί να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστηριότητα τους. Είναι σαφές ότι η βιοδιαθεσιμότητα των διαιτητικών φλαβονοειδών είναι ιδιαίτερα μεταβλητή μεταξύ των ατόμων. Μετά από την λήψη τους, τα φλαβονοειδή απορροφούνται κυρίως στο λεπτό έντερο και υποβάλλονται σε εκτεταμένο μεταβολισμό με ένα σημαντικό ποσοστό να φθάνει στο κόλον. Το μικροβίωμα του παχέος εντέρου λειτουργεί ως μεταβολικός αντιδραστήρας, παίζοντας ρόλο κλειδί στον καταβολισμό των μη απορροφούμενων φλαβονοειδών σε μικρότερα μόρια, όπως φαινολικά και αρωματικά οξέα, τα οποία μπορεί να γίνουν βιοδιαθέσιμα [26].

Στον αυλό του λεπτού εντέρου, η υδρολάση λακτάσης – φλοριζίνης (LPH, λακτάση) υδρολύει τους γλυκοζίτες των φλαβονοειδών στις αντίστοιχες τους αγλυκόνες [27]. Η LPH είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος για μια σειρά φλαβονοειδών-Ο-β-D-γλυκοζιτών. Οι αγλυκόνες μπορεί να εισέλθουν στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιποφιλίας τους. Εναλλακτικά, οι γλυκοζίτες μπορούν να μεταφερθούν απευθείας στο επιθήλιο μέσω επιθηλιακών μεταφορέων, όπως είναι ο εξαρτώμενος από το νάτριο μεταφορέας γλυκόζης [27, 28], με τους γλυκοζίτες να υδρολύονται στη συνέχεια από ενδοκυτταρικές β-γλυκοζιδάσες, όπως κυτοσολικές β-γλυκοζιδάσες [27, 29]. Ως εκ τούτου, οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών διασπώνται κατά κανόνα είτε στον εντερικό αυλό είτε στο επιθήλιο πριν την απορρόφηση. Ωστόσο, οι ανθοκυανίνες αποτελούν μια εξαίρεση και βρίσκονται στο πλάσμα και στα ούρα ως γλυκοζίτες [30]. Η επίδραση της έλλειψης λακτάσης (που έχει επιπολασμό 60-100% σε πολλές χώρες της Λατινικής Αμερικής, της Αφρικής και της Ασίας) σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών είναι προς το παρόν άγνωστη.

1.4.2 Μεταβολισμός

Τα φλαβονοειδή γενικά καταναλώνονται ως γλυκοζίτες, με ένα ποσοστό της αγλυκόνης να απελευθερώνεται είτε στο επιθήλιο είτε στον αυλό του λεπτού εντέρου. Σε αντίθεση με τα διαιτητικά μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά, ένα μέρος των φλαβονοειδών που καταναλώνονται δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο και φτάνουν στο παχύ έντερο όπου εκτίθενται σε υδρόλυση και ζύμωση με τη μεσολάβηση μικροοργανισμών. Εντός του επιθηλίου, τα φλαβονοειδή υποβάλλονται σε μεταβολισμό φάσης I με τους μεταβολίτες που προκύπτουν να μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Στο ήπαρ, υποβάλλονται σε περαιτέρω μεταβολισμό φάσης I και φάσης II που οδηγούν σε περισσότερες πολικές ενώσεις και οι οποίες λειτουργούν ως μεσολαβητές σε μια σειρά βιολογικών επιδράσεων στους ιστούς-στόχους.

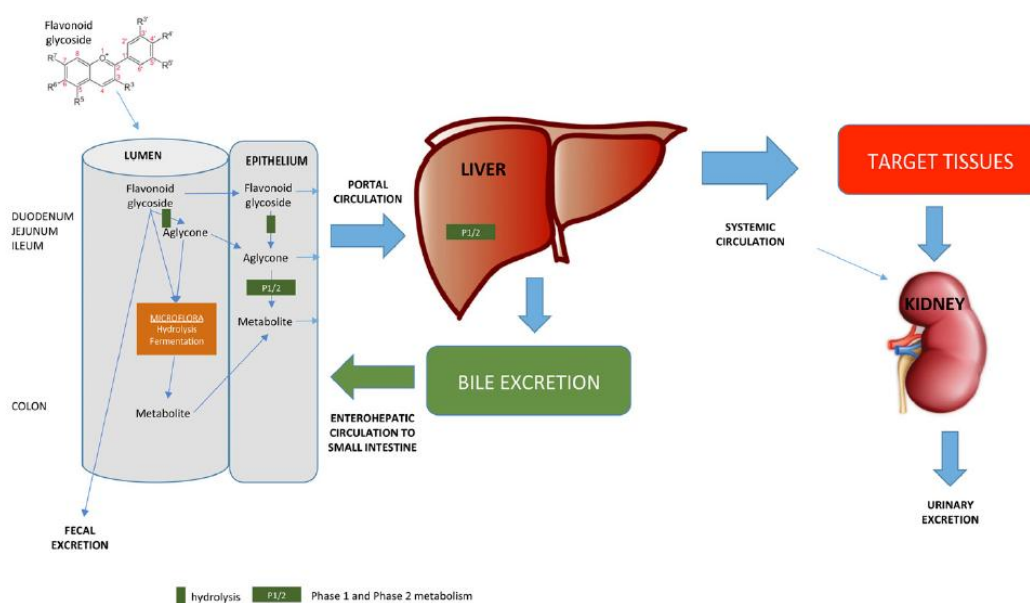
Η αποβολή των φλαβονοειδών από το σώμα πραγματοποιείται μέσω του νεφρού, από το εντερικό επιθήλιο και μέσω της απέκκρισης της χολής. Τα φλαβονοειδή που εκκρίνονται μέσω της χοληφόρου οδού στο δωδεκαδάκτυλο υποβάλλονται στη δράση των μικροβιακών ενζύμων και μπορεί να επαναπορροφηθούν και να υποβληθούν σε εντεροηπατική ανακύκλωση [31].

➤ Μετα-απορροφητικός Μεταβολισμός

Μετά την απορρόφηση, τα φλαβονοειδή μπορούν να υποβληθούν σε μεταβολισμό φάσης I στο ήπαρ από το κυτοχρωμικές P450 μονοοξυγενάσες. Στους ανθρώπους, υπάρχουν 57 γονίδια του κυτοχρώματος που χωρίζονται σε 18 οικογένειες με ισομορφές όπως το κυτόχρωμα 1A1, κυτόχρωμα 1A2, κυτόχρωμα 1B1, κυτόχρωμα 3A4 (το κυρίαρχο ανθρώπινο εντερικό και ηπατικό κυτόχρωμα 450s), και το κυτόχρωμα 2C9 που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φλαβονοειδών [32, 33].

Ωστόσο, τα προϊόντα οξείδωσης που προέρχονται από το μεταβολισμό φάσης I τείνουν να είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες των περισσότερων φλαβονοειδών, γεγονός που συμβαίνει πιθανώς λόγω της ταχείας γλυκουρονιδίωσης, θείωσης ή μεθυλίωσης των πιθανών υποστρωμάτων φάσης I στο έντερο και στο ήπαρ [34] από ένζυμα σύζευξης της φάσης II, συμπεριλαμβανομένων των ουριδινο-5'

διφωσφορικών γλυκουρονοσυλ-τρανσφερασών (UGT), σουλφοτρανσφερασών και κατεχολο-O-μεθυλοτρανσφερασών (COMTs). Τα προϊόντα σύζευξης γλυκουρονίδης με θείο- και μεθυλ- ομάδα είναι περισσότερο πολικοί μεταβολίτες και μπορεί να εκκρίνονται μέσω των νεφρών στα ούρα ή μέσω της χολής ή να μεταφέρονται πίσω στον εντερικό αυλό [35].



Εικόνα 4: Μεταβολισμός Φλαβονοειδών

1.5 Εντερική διαπερατότητα

Τα κύτταρα Caco-2 είναι μία κυτταρική σειρά καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του ανθρώπινου κόλου, που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την εντερική απορρόφηση φαρμάκων και άλλων ενώσεων. Όταν καλλιεργούνται ως μονοστιβάδα, τα κύτταρα Caco-2 διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν συνδέσεις μεταξύ τους που θα χρησιμεύσουν ως μοντέλο παρακυτταρικής μεταφοράς κατά μήκος της μονοστιβάδας. Επιπλέον, τα κύτταρα Caco-2 εκφράζουν πρωτεΐνες μεταφοράς, πρωτεΐνες εκροής, και ένζυμα συζεύξεως φάσης II για τον σχηματισμό μιας ποικιλίας διακυτταρικών οδών, καθώς και για το μεταβολικό μετασχηματισμό των

υπό μελέτη ενώσεων. Από πολλές απόψεις, η μονοστιβάδα κυττάρων Caco-2 προσομοιάζει το ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο. Μια από τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων και των κυττάρων Caco-2 είναι η έλλειψη έκφρασης του ισοενζύμου του κυτοχρώματος P450 και ειδικότερα του CYP3A4, το οποίο είναι συνήθως σε υψηλά επίπεδα στο έντερο.

Ανθρώπινες επιθηλιακές Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά για να αποτυπώσουν την ανθρώπινη εντερική απορρόφηση στα τέλη της δεκαετίας του 1980 [36]. Από τότε, το μοντέλο αυτό έχει γίνει ένα τυπικό εργαλείο για την πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης φαρμάκων σε ανθρώπους και για μελέτες σχετικές με μηχανισμούς μεταφοράς φαρμάκων [37]. Η δοκιμασία διαπερατότητας με χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων είναι αξιόπιστη, εύκολη στη διεξαγωγή και απαιτεί μόνο μικρές ποσότητες ενώσεων. Αρχικά, απομονωμένα από αδενοκαρκίνωμα ανθρώπινου παχέος εντέρου (κόλον), κύτταρα Caco-2 υποβάλλονται σε αυθόρμητη εντεροκυτταρική διαφοροποίηση στην καλλιέργεια ώστε να προσομοιάζουν τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου [38]. Οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας που προσδιορίζονται για ενώσεις αναφοράς σε μονοστιβάδες κυττάρων Caco-2 έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν καλή συσχέτιση με την απορρόφηση *in vivo* [39]. Έτσι, η Caco-2 κυτταρική μονοστιβάδα έχει γίνει ένα πρότυπο *in vitro* μοντέλο για την αξιολόγηση της εντερικής διαπερατότητας και της μεταφοράς υποψήφιων φαρμάκων.

Αν και οι ραδιοεπισημασμένες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν στις αρχικές δοκιμασίες μονοστιβάδας κυττάρων Caco-2, τελικά έχουν αντικατασταθεί στα περισσότερα εργαστήρια με τη χρήση της υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS) και LC-δίδυμης φασματομετρίας μάζας (LC-MS-MS). Η φασματομετρία μάζας όχι μόνο εξαλείφει την ανάγκη των ραδιοεπισημασμένων ενώσεων, αλλά επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών ενώσεων. Η μέτρηση των πολλαπλών ενώσεων ανά δοκιμασία μειώνει τον αριθμό των επώσεων που πρέπει να πραγματοποιηθούν, αυξάνοντας έτσι την απόδοση των πειραμάτων. Επιπλέον, η χρήση των LC-MS και LC-MS-MS προσθέτει μια άλλη διάσταση στις αναλύσεις Caco-2, διευκολύνοντας τη διερεύνηση του μεταβολισμού των ενώσεων από κύτταρα Caco-2 [40].

Οι μονοστιβάδες κυττάρων Caco-2 καλλιεργούνται συνήθως σε ημιδιαπερατά πλαστικά «πιάτα» πολλών οπών, που μπορούν να προσαρμοστούν στα φρεάτια των πλακών καλλιέργειας. Οι ενώσεις που πρόκειται να εξεταστούν (test compounds) στη συνέχεια προστίθενται είτε στις κορυφαίες είτε στις πλαγιοβασικές πλευρές της μονοστιβάδας. Μετά από επώαση για διάφορα χρονικά διαστήματα (δηλ. 10, 20, 30 και 40 λεπτά), τα δείγματα του ρυθμιστικού διαλύματος από αντίθετους θαλάμους αφαιρούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ενώσεων και τον υπολογισμό του ρυθμού διαπερατότητας κάθε ένωσης, που αποκαλείται φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας (P_{app}) και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$P_{app} = Vr \times (dC) / (dt) \times 1 / A C_0$$

Όπου:

Vr είναι ο όγκος του διαμερίσματος παραλήπτη

dC / dt είναι η κλίση της αθροιστικής συγκέντρωσης της ένωσης στον θάλαμο αποδέκτη με την πάροδο του χρόνου

A είναι η επιφάνεια της μεμβρανικής περιοχής

C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση στο θάλαμο δότη [39]

Το P_{app} δεν είναι σταθερό, αλλά ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες της δοκιμασίας και τα χαρακτηριστικά από παρτίδα σε παρτίδα των κυτταρικών μονοστιβάδων Caco-2. Για να γίνει σύγκριση των τιμών P_{app} για προσδιορισμούς ενώσεων σε διαφορετικές ημέρες ή ακόμα και σε διαφορετικά εργαστήρια (ενδιάμεση πιστότητα) είναι απαραίτητο να μετρούνται μερικές ενώσεις αναφοράς σε κάθε δοκιμασία. Ιδανικά, ενώσεις αναφοράς που αντιπροσωπεύουν υψηλή (π.χ. προπρανολόλη) και χαμηλή κυτταρική διαπερατότητα (π.χ. μαννιτόλη) θα πρέπει να μετρούνται μαζί με τις ενώσεις που εξετάζονται [41].

Αν οι τιμές P_{app} στην κορυφαία προς πλαγιοβασική κατεύθυνση δεν είναι ίσες με εκείνες της πλαγιοβασικής προς την κορυφαία κατεύθυνση, ή εάν οι τιμές P_{app} μειώνονται με την αύξηση της συγκέντρωσης της ένωσης που εξετάζεται, αυτό υποδηλώνει τη συμμετοχή οδών μεταφοράς. Στη συνέχεια, μπορούν να

πραγματοποιηθούν επιπλέον επιώσεις ώστε να ανιχνευθεί η ανάμιξη συγκεκριμένων συστημάτων μεταφοράς ή εκροής [40].

Η χρήση κυττάρων Caco-2 για την προσομοίωση της ανθρώπινης εντερικής απορρόφησης αυξήθηκε, καθώς όλο και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η μεταφορά του φαρμάκου σε ανθρώπους συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τις τιμές φαινόμενης διαπερατότητας που μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας Caco-2 κύτταρα για ορισμένα φάρμακα, όπως η υδροχλωρική ρανιτιδίνη, τρυγική μετοπρολόλη, πιροξικάμη, μινοξιδίλη, ναπροξένη, αντιπυρίνη και μετοπρολόλη. Αυτά τα φάρμακα είναι γνωστό ότι διαχέονται παθητικά τόσο σε κύτταρα Caco-2 όσο και στον ανθρώπινο εντερικό ιστό, υποδηλώνοντας έτσι πως τα δεδομένα διαπερατότητας Caco-2 συσχετίζονται μάλλον με την παθητική διάχυση και όχι με την ενεργό μεταφορά. Η διαπερατότητα κυττάρων Caco-2 ωστόσο ήταν 79 και 27 φορές χαμηλότερη για τα υδρόφιλα αργώς – παθητικά μεταφερόμενα φάρμακα τερβουταλίνη και ατενολόλη, αντίστοιχα. Τα ποσοστά μεταφοράς των L-dopa, L-λευκίνη και D-γλυκόζης ήταν πολύ πιο αργά σε κύτταρα Caco-2 από ότι στην ανθρώπινη νήστιδα. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα Caco-2 κύτταρα είναι χρήσιμα για την πρόβλεψη της παθητικής εντερικής μεταφοράς μορίων στο ανθρώπινο έντερο, αλλά δεν είναι ένα καλό μοντέλο για τη μεταφορά υδρόφιλων και ενεργώς μεταφερόμενων μορίων, όπως οι γλυκοζίτες φλαβονοειδών. Αυτό αποδίδεται στην έλλειψη έκφρασης μεταφορέων και ενζύμων στις κυτταρικές σειρές Caco-2 σε σύγκριση με το αληθινό ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο. Για παράδειγμα, η LPH εκφράζεται στα κύτταρα Caco-2, αλλά η έκφρασή της είναι πολύ χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των *ex vivo* εντερικών δειγμάτων. Εξαιτίας αυτού, ο μεταβολισμός των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών *in vitro* συνήθως υποτιμάται.

Γλυκουρονίδια και σουλφίδια φλαβονοειδών δεν ανιχνεύτηκαν μετά από ανάλυση μεταφοράς του Xi-aochaichu-tang (μια Κινέζικη φυτική θεραπεία) χρησιμοποιώντας κύτταρα Caco-2. Αντιστρόφως, ενώ τώρα έχει αποδειχθεί ότι οι γλυκοζίτες κερκετίνης δεν υπάρχουν στο αίμα, σε πείραμα μεταφοράς κυττάρων Caco-2 γλυκοζιτών κερκετίνης παρουσιάστηκε πλαγιοβασική μεταφορά αυτών των γλυκοζιτών, γεγονός που θα μπορούσε να παρερμηνευθεί πως υπάρχει

βιοδιαθεσιμότητα. Οι μεταβολίτες κερκετίνης (ειδικά τα γλυκουρονίδια) δεν ανιχνεύτηκαν κατά την χορήγηση κερκέτινο-3-γλυκοσίδης σε Caco-2 κυττάρα σε αντίθεση με την χορήγηση αγλυκονών κερκετίνης. Επομένως, φαίνεται ότι η προ-απογλυκοζυλίωση κατά την *in vitro* χώνευση του εντέρου μπορεί να ενισχύσει την εντερική και μεταβολική μετατροπή των γλυκοσιδών της διαιτητικής κερκετίνης [42].

1.6 Πιθανές Ευεργετικές Ιδιότητες Φλαβονοειδών

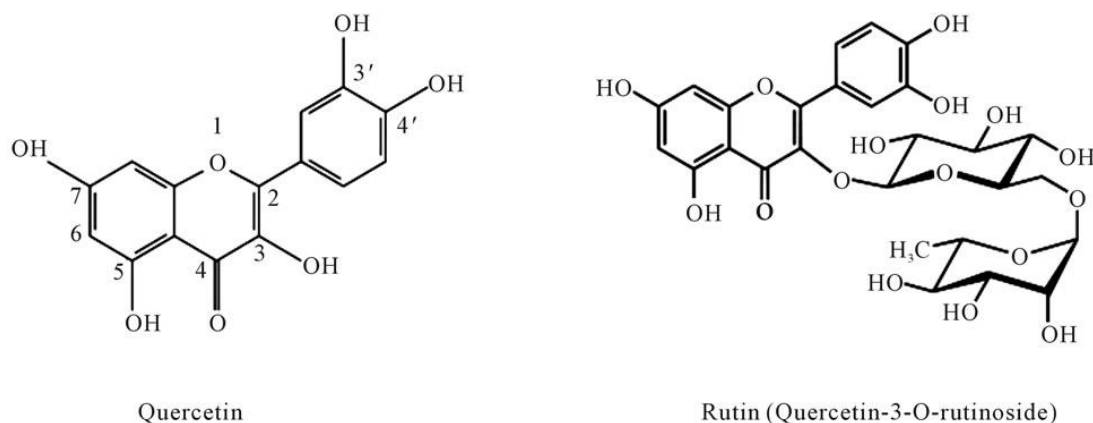
Σε *in vivo*, *in vitro* μελέτες, καθώς και σε επιδημιολογικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου και ότι η μακροχρόνια χορήγηση τους μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης ορισμένων χρόνιων ασθενειών. Οι βιολογικές ιδιότητες των φλαβονοειδών βέβαια εξαρτώνται σημαντικά από τη χημική δομή και το σχετικό προσανατολισμό διαφόρων ομάδων στο μόριό τους. Οι ευεργετικές τους επιδράσεις, όπως αναλγητικές, αντιμυκητιασικές, αντικαταθλιπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές παρουσιάζονται στη συνέχεια.

1.6.1 Αναλγητικές ιδιότητες

Πολλές μελέτες δείχνουν πως οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών είναι πανταχού παρόντα φυσικά προϊόντα με ευρεία ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως για παράδειγμα αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές δράσεις με λιγότερες παρενέργειες. Πολλά φαρμακευτικά φυτά που περιέχουν φλαβονοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη παραδοσιακή ιατρική ως αναλγητικά.

Η κερκετίνη παρουσιάζει αναλγητική δράση και μπορεί να μειώσει το κατώτατο όριο πόνου στη δοκιμασία θερμής πλάκας (με τη χρήση θερμικής διέγερσης ποντικών για την παραγωγή πόνου) σε δόσεις των 3,5 mg/ kg που χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά [43]. Έχει αναφερθεί ότι η κερκετίνη εμφανίζει δοσο-εξαρτώμενη αναλγητική δράση σε δόσεις 25-200 mg/ kg (ενέσιμη ενδοπεριτοναϊκά) σε δοκιμασία πόνου (με χρήση χημικής ουσίας για να δημιουργηθεί πόνος με

φλεγμονή σε ποντίκια) και επίσης παρουσιάζει αναλγητική δράση στη δόση των 4 mg/ kg (ενδοπεριτοναϊκή ένεση) σε δοκιμασία θερμής πλάκας [44]. Οι αποτελεσματικές δόσεις της κερκετίνης (60-200 mg/ kg) σε διαφορετικά ζωικά μοντέλα έχουν αναλγητικό αποτέλεσμα ισοδύναμο με αυτό της ασπιρίνης (100 mg/ kg) ή της μορφίνης (2 mg/ kg) [45].



Εικόνα 5: Δομές των φλαβονοειδών κερκετίνη και ρουτίνη.

Η ρουτίνη και η κερκετίνη έχουν παρόμοια χημική δομή και παρουσιάζουν και οι δύο αναλγητική δράση για την ανακούφιση του πόνου [43]. Η ρουτίνη μπορεί να αναστείλει την απόκριση πόνου σε ποντίκια που προκαλείται από αντιμόνιο τρυγικό κάλιο και η αναλγητική της ισχύς είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από την ασπιρίνη.

Η υπερίνη είναι ένας γλυκοζίτης φλαβονόλης που ασκεί αναλγητική δράση. Η αναλγητική ισχύς της υπερίνης στην δόση των 0,25 mg/ kg (ενδοεγκεφαλοκοιλιακή χορήγηση) ήταν περίπου 20 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της μορφίνης και 100 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με χορήγηση ενδοπεριτοναϊκά [46].

Η λουτεολίνη (1 mg/ kg,) φαίνεται να μπορεί να αυξήσει το κατώτατο όριο του πόνου στο μοντέλο θερμής πλάκας. Παρουσιάζει αποτελεσματικές αναλγητικές δράσεις για οξεία και χρόνια διαχείριση πόνου και ο μηχανισμός μπορεί να

σχετίζεται με την αναστολή της ευαισθησίας της διέγερσης περιφερικών νεύρων και την αντιφλεγμονώδη δράση [47].

Η καμπφερόλη έχει παρουσιάσει αναλγητική δράση σε πρόκληση με οξικό οξύ (writhing) σε ποντικούς στη δόση των 100 mg/ kg και το ποσοστό αναστολής ήταν 51,6% [48]. Πρόσφατα, ένα νέο δι-φλαβονοειδές, που απομονώθηκε από τους απολιπανθέντες φλοιούς του *Camellia oleifera* και αναγνωρίστηκε ως δομή διμοριακής καμπφερόλης, θα μπορούσε να ανακουφίσει τον πόνο, καθώς παρουσιάζει κεντρικές και περιφερειακές αναλγητικές επιδράσεις. Ο μηχανισμός της αναλγητικής δραστηριότητας φαίνεται να σχετίζεται με την αναστολή της σύνθεσης ή της δράσης των προσταγλανδινών.

Η εσπεριδίνη έχει αναφερθεί ότι διαθέτει περιφερειακή αλλά όχι κεντρική αναλγητική δράση *in vivo* από το 1994. Η εσπεριδίνη (100 mg/ kg, υποδόρια χορήγηση) μειώνει την επαγόμενη από το οξικό οξύ κοιλιακή συστολή σε ποντίκια κατά 50%. Οι μελέτες του Loscalzo έδειξαν ότι το σημαντικό αναλγητικό αποτέλεσμα της εσπεριδίνης (0,7 και 1 mg/ kg) παρεμποδίστηκε μερικώς από το ανταγωνιστικό οπιοειδές ναλτρεξόνη, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή των υποδοχέων των οπιοειδών στον μηχανισμό δράσης της [49, 50].

Σε μοντέλο πρόκλησης με οξικό οξύ (writhing), η απιγενίνη έδειξε εξέχουσα αναλγητική δράση τόσο στις χαμηλές (700 mg/ kg) όσο και στις υψηλές δόσεις (1400 mg/ kg) με αναστολή 37,62% και 50,33%, αντίστοιχα, και η υψηλή δόση φάνηκε να έχει ίση αποτελεσματικότητα με την ασπιρίνη (65 mg/ kg) [51]. Στην δοκιμή με χρήση βραστού νερού για να διεγείρει την αίσθηση πόνου σε ποντικούς, η απιγενίνη (δόσεις των 2, 5 και 10 mg/ kg) παρουσίασε εξαιρετική δόσοεξαρτώμενη αναλγητική δράση [52, 53].

1.6.2 Αντιμυκητιασικές ιδιότητες

Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η αντιμυκητιασική δράση των φλαβονοειδών κατά του στελέχους *Candida albicans in vitro* και μεταξύ των δραστικών ενώσεων ήταν η κερκετίνη και η μυρικετίνη (φλαβονόλες), η βαϊκαλεΐνη (φλαβόνες), κατεχίνες (φλαβανόλες) και η καρβακρόλη (χαλκόνες).

Η αντιμυκητιασική δράση των φλαβονολών κερκετίνη, μυρικετίνη και καμπφερόλη κατά του στέλεχους *Candida albicans* έχει αναφερθεί από τους Herrera et al. Η απομονωμένη από την πρόπολη κερκετίνη ανέστειλε την ανάπτυξη του *Candida albicans* και παρουσίασε αντιμυκητιασική δράση κατά της υποτροπικής στοματίτιδας με εύρος τιμών MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) 197-441 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με τη χρήση μεθόδου μικροκαταλύσεως με άγαρ. Παρομοίως, απομονώθηκαν η μυρικετίνη και η καμπφερόλη από την ίδια πηγή πρόπολης, και διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη ειδών *Candida* σε τιμές MIC που κυμαίνονταν μεταξύ 197 και 441 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [54].

Στην υποκατηγορία των φλαβονών, απομονώθηκε βαϊκαλεΐνη από την *Scutellaria bicalensis* και αναφέρθηκε ότι επάγει την απόπτωση στο *C. albicans* με τιμή MIC 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε μια *in vitro* μελέτη αντιμυκητιασικής δραστηριότητας (58). Η αστερλίνη A που απομονώθηκε από την *asterella angusta* ανέστειλε την ανάπτυξη των *C. albicans* και την ανάπτυξη αποικίας σε εύρος MIC 16-512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (59). Μια άλλη φλαβόνη, η απιγενεΐνη, απομονωμένη από την πρόπολη, έδειξε αντιμυκητιασική δράση κατά του *C. albicans* με εύρος τιμών MIC 197-441 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε ένα σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού μικροανάλυσης [54].

Σε μια *in vitro* μελέτη από τους Sitheequ et al. [55], διαπιστώθηκε ότι οι κατεχίνες που βρίσκονται στο μαύρο τσάι μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη μυκήτων με τιμή MIC 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Άλλες φλαβανόλες, όπως η γαλοταννίνη που απομονώθηκε από το *Syzygium cordatum*, παρουσίασε αντιμυκητιασική δράση έναντι του *C. albicans* με αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων σε τιμή MIC 0,195 mg/mL σε μελέτη ανάλυσης μικροδιέγερσης [56]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν συνεργατικές επιδράσεις των κατεχινών και των αντιμυκητιασικών, όπως η γαλακτική επιγαλλοκατεχίνη (EGCG), μια γνωστή αντιμικροβιακή πολυφαινόλη που βρίσκεται στο τσάι, η οποία βρέθηκε να αναστέλλει την ανάπτυξη του *C. albicans* και να ενισχύει την αντιμυκητιασική δραστηριότητα [57].

Ορισμένες ισοφλαβόνες είναι επίσης γνωστές για την αντιμυκητιασική δράση τους, όπως η γλαμπριδίνη, που απομονώθηκε από την *Glycyrrhiza glabra* και βρέθηκε να έχει αντιμυκητιασική δράση ευρέος φάσματος έναντι πολλών ειδών *Candida* [58]. Σε μια μελέτη από τους Belofsky et al., μια ισοφλαβόνη, η σεδονάνη A, ανέστειλε

τον *C. albicans* και τον *C. glabrata* σε τιμές MIC 15 και 7,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα [59]. Άλλη ισοφλαβόνη που είναι γνωστή ως δορσμανίνη και που απομονώθηκε από τον *dorstenia mannii* έχει βρεθεί ότι έχει αντιμυκητιασική δράση κατά του *C. albicans* με MIC 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [60].

Ορισμένες από τις χαλκόνες έχουν εμπλακεί στην αναστολή των εξωενζύμων που είναι υπεύθυνα για μηχανισμούς εισβολής μυκήτων. Παράδειγμα αποτελεί η 2',4'-διυδροξυ-3'-μεθοξυχαικόννη, η οποία με τη σειρά της παρουσίασε αντιμυκητιασική δραστηριότητα κατά του *C. albicans* με MIC 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [61]. Μια άλλη χαλκόννη, γνωστή ως καρβακρόλη, έχει βρεθεί ότι διαταράσσει την κυττοπλασματική μεμβράνη και προκαλεί απόπτωση σε αρκετά είδη *candida in vitro* [62, 63].

1.6.3 Αντικαταθλιπτικές ιδιότητες

Ένα κλάσμα φλαβονοειδών που λαμβάνεται από ένα ακατέργαστο εκχύλισμα του *Hypericum perforatum* (βαλσαμόχορτο) παρουσίασε δράση παρόμοια με αντικαταθλιπτική δράση σε ποντίκια. Το κλάσμα διαχωρίστηκε περαιτέρω και αποτελούνταν κυρίως από υπεροσίδη, ισοκερκιτρίνη, μικελιανίνη, κερκετίνη και τις αγλυκόνες κερσιτρίνη και αστιλβίνη [69,70]. Οι Butterweck et al. ανέφεραν ότι τα κύρια φλαβονοειδή (υπεροσίδη και ισοκερκιτρίνη) που εξάγονται από τα φύλλα του *Arocynum venetum* L. (αποκυνοειδή) μειώνουν σημαντικά τον χρόνο ακινησίας αρσενικών αρουραίων σε δόσεις των 30, 60 και 125 mg/kg , αντιστοίχως, σε δοκιμασία αναγκαστικής κολύμβησης (forced swimming test – FST), γεγονός που υποδηλώνει πιθανή δράση παρόμοιας της αντικαταθλιπτικής. Τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με εκείνα του τρικυκλικού αντικαταθλιπτικού ιμιπραμίνη (20 mg/kg). Ούτε το εκχύλισμα *Arocynum* ούτε η ιμιπραμίνη προκάλεσαν οποιεσδήποτε εμφανείς αλλαγές συμπεριφοράς ή κινητικής δυσλειτουργίας στη δοκιμασία ανοικτού πεδίου [64]. Το *Hypericum perforatum* θεωρείται αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών αντικαταθλιπτικών για τη θεραπεία της ήπιας έως μέτριας κατάθλιψης. Οι Messaoudi et al. [65] ανέφεραν την παρόμοια με αντικαταθλιπτική δράση πολυφαινολικού εκχυλίσματος κακάο, ενός πολύπλοκου μίγματος που παρασκευάζεται από μη καβουρδισμένους κόκκους κακάο, υψηλής

περιεκτικότητας σε φλαβονοειδή, με τη χρήση του FST σε αρουραίους. Οι μελέτες τους έδειξαν ότι το πολυφαινολικό εκχύλισμα κακάο μείωσε σημαντικά τη διάρκεια της ακινησίας σε δόσεις των 24 και 48 mg/ kg για 14 ημέρες.

Οι Zheng et al. [66] διερεύνησαν την πιθανή αντικαταθλιπτική δράση των φλαβονοειδών που εξαγονται από τα φύλλα *Aprocymum venetum* (AV). Η χορήγηση εκχυλίσματος AV στις ενδοπεριτοναϊκές δόσεις των 25, 50 και 100 μg/ mL μείωσε σημαντικά τον χρόνο ακινησίας και εμφάνισε δράση παρόμοια με αντικαταθλιπτική σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε FST.

Οι Ishisaka et al. [67] ανέφεραν ότι η χρόνια από του στόματος χορήγηση της λουτεολίνης εμφάνισε αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα σε δόση 50mg/kg/ημέρα σε ορισμένες δοκιμές συμπεριφοράς. Η λουτεολίνη επίσης εξασθένησε την έκφραση των ενδοπλασματικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με το άγχος σε ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε κορτικοστερόνη. Οι Ishisaka et al. επίσης διερεύνησαν τις επιδράσεις της λουτεολίνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι καταστέλει σημαντικά τον προκαλούμενο από τανικαμυκίνη κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος σε δόσεις 1 και 10 μg/ mL. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η λουτεολίνη έχει παρόμοια με αντικαταθλιπτική δράση που μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στην καταστολή του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο [68].

1.6.4 Σχετιζόμενες με τις γνωστικές λειτουργίες ιδιότητες

Μέχρι στιγμής, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες για την αξιολόγηση της οξείας και χρόνιας επίδρασης της κατανάλωσης φλαβονοειδών στη βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας σε υγιείς εθελοντές ανθρώπους. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Mix et al. χορηγήθηκαν 60 mg EGB761 που περιείχαν περίπου 24% γλυκοζίτες φλαβονών του *Gingko Biloba*, τρεις φορές την ημέρα για διάρκεια 60 εβδομάδων, σε 63 εθελοντές ηλικίας μεταξύ 40 και 65 ετών. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική βελτίωση της ταχύτητας της επεξεργασίας και της αυτοαναφερόμενης απόδοσης μνήμης στην ομάδα που δόθηκε η θεραπεία [69]. Τα ευρήματα μιας άλλης μελέτης, που πραγματοποιήθηκε από την ίδια ερευνητική

ομάδα, σε 262 συμμετέχοντες ηλικίας άνω των 60 ετών που ακολούθησαν την ίδια δίαιτα, ήταν σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματα [70]. Σε άλλη μελέτη, όπου έγινε χορήγηση 60 mg μίγματος ισοφλαβονών σε 36 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εθελόντριες ηλικίας μεταξύ 50 και 65 ετών για 12 εβδομάδες βρέθηκε σημαντική βελτίωση στη μνήμη και τη χρονική διάρκεια της προσοχής τους [71]. Χορήγηση της ίδιας δόσης μίγματος φλαβονοειδών για έξι μήνες σε 78 γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, επίσης έδειξε βελτιωμένη γνωστική λειτουργία ύστερα από ενεργή θεραπεία [72]. Κατανάλωση 25 mg πρωτεΐνων σόγιας για 2,5 χρόνια σε 313 υγιείς μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας από 42 έως 92 ετών έδειξε σημαντικά καλύτερη οπτική μνήμη μετά την αγωγή για την ομάδα που λάμβανε ισοφλαβόνες [73]. Σε μελέτη που αξιολόγησε τα αποτελέσματα των φλαβονοειδών σε 30 εθελοντές ηλικίας μεταξύ 18 και 35 ετών, οι Scholey et al. κατέγραψαν βραχυπρόθεσμη βελτίωση σε γνωστικές επιδόσεις, συγκεκριμένα 90 λεπτά μετά την κατανάλωση ροφήματος κακάο [74]. Μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Feild et al. σε 30 υγιείς εθελοντές ηλικίας μεταξύ 18 και 25 ετών, που κατανάλωναν 35 g μαύρης σοκολάτας, και η οποία περιείχε 773 mg φλαβονοειδών, έδειξε βελτιωμένη μνήμη και χρόνο απόκρισης, 120 λεπτά μετά την κατανάλωση [75].

Επιδημιολογικές μελέτες που αξιολόγησαν τη συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου άνοιας και της κατανάλωσης φλαβονοειδών είχαν εξαιρετικά αποτελέσματα. Οι Birks et al. βρήκαν πως η ημερήσια κατανάλωση 80-720 mg εκχυλίσματος *gingko biloba* είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά βελτιωμένη γνωστική συμπεριφορά σε σύγκριση με την ομάδα λήψης placebo [76]. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν επίσης με ημερήσια κατανάλωση 25,6 g πρωτεΐνης σόγιας που περιείχε γενιστεΐνη, δαϊσδεΐνη και γλυσιτεΐνη [77]. Οι Kang et al. μελετώντας 15080 γυναίκες άνω των 70 ετών κατέγραψαν ότι η άνω των 10 ετών κατανάλωση φρούτων και λαχανικών σχετιζόταν με καθυστέρηση της έκπτωσης των γνωστικών λειτουργιών [78]. Σε άλλη μελέτη των Morris et al. σε 3718 ανθρώπους άνω των 65 ετών παρατηρήθηκαν επίσης τα ίδια αποτελέσματα [79]. Το σημαντικό σημείο αυτών των δύο μελετών ήταν πως η κατανάλωση λαχανικών ήταν περισσότερο αποτελεσματική στη μείωση του ποσοστού έκπτωσης της γνωστικής λειτουργίας σε

σχέση με τα φρούτα. Αξιολόγηση 2031 ανθρώπων ηλικίας μεταξύ 70 και 74 ετών που καταναλώναν κρασί, τσάι και σοκολάτα, έδειξε ότι εμφανίζουν έναν σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο κακής γνωστικής επίδοσης σε σχέση με άτομα που δεν καταναλώνουν αυτές τις τροφές [80]. Τέλος, με βάση τις μελέτες που εκπόνησαν οι Sofi et al. σε 2574 εθελοντές για πάνω από 13 χρόνια έδειξαν πως η κατανάλωση κατεχινών και φλαβονολών είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική βελτίωση της μνήμης [81].

1.6.5 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Τα φλαβονοειδή μπορούν να μπλοκάρουν πολλές προ-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες και θεωρούνται φυσικοί αναστολείς της φλεγμονής, ενώ περιορίζουν την ένταση της φλεγμονής. Έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί παράγοντες φυτικής προέλευσης για την αποφυγή βλαβών που προκαλούνται από τα ουδετερόφιλα, ως τα κεντρικά κύτταρα στις οξείες φλεγμονώδεις διεργασίες. Κατά τις φλεγμονώδεις διεργασίες, παρατηρείται αύξηση του αριθμού, της κινητικότητας, της διάρκειας ζωής, της δυνατότητας εισροής σε ιστούς και της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των ουδετερόφιλων. Η από του στόματος χορήγηση χρυσίνης βρέθηκε να μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα της μυελοϋπεροξειδάσης, ενός ενεργού βιοχημικού δείκτη διήθησης ουδετερόφιλων, σε πειραματικό μοντέλο φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σε ποντίκια [82]. Επίσης, μια μελέτη των Hsu et al. έδειξε ότι η χρυσίνη αναστέλλοντας την παραγωγή του ανιόντος υπεροξειδίου και την απελευθέρωση ελασάσης θα μπορούσε να έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις έναντι των ουδετερόφιλων στον άνθρωπο [83]. Επιπλέον, η μελέτη αυτή ανέφερε ότι η κερκετίνη λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας της λειτουργίας των λευκοκυττάρων. Έχει αποδειχθεί, [84] ότι μια διατροφή που περιέχει ισοφλαβόνη με νταϊντζίνη, γενιστεΐνη και τους γλυκοζίτες τους μπορεί να περιορίσει την φλεγμονώδη αντίδραση στο ήπαρ και το έντερο ποντικών μετά από LPS ένεση. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή είναι σε θέση να αναστείλουν την έκφραση επαγόμενων ισόμορφων της συνθάσης του νιτρικού μονοξειδίου, της κυκλοοξυγενάσης και της λιπooξυγενάσης, που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας νιτρικού μονοοξειδίου, προστανοειδών και λευκοτριενίων,

αντίστοιχα, καθώς και άλλων διαμεσολαβητών της φλεγμονώδους διαδικασίας, όπως οι κυτταροκίνες, οι χυμοκίνες, ή μόρια προσκόλλησης [85, 86].

1.6.6 Αντιδιαβητικές ιδιότητες

Συνδεόμενες με τις βιολογικές ιδιότητές τους, οι πολυφαινόλες μπορεί να είναι χρήσιμα διατροφικά «φάρμακα» και να αποτελέσουν συμπληρωματικές θεραπείες για διάφορες πτυχές του σακχαρώδους διαβήτη. Ο αντιδιαβητικός μηχανισμός των флаβονοειδών οφείλεται κυρίως στις επιδράσεις τους στα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της γλυκόζης. Είναι σημαντικό ότι τα флаβονοειδή ασκούν αντιδιαβητική δράση μέσω της βελτίωσης της δράσης της ινσουλίνης στα κύτταρα του σκελετικού μυός και του ήπατος για να μειώσουν τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα, την ηπατική γλυκονεογένεση και την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης [87]. Στο έντερο, τα флаβονοειδή αναστέλλουν την πέψη του αμύλου, επιβραδύνουν τη γαστρική κένωση και μειώνουν την απορρόφηση της γλυκόζης [88].

Με βάση διάφορα *in vitro* πειράματα σε ζωικά μοντέλα, αλλά και μελέτες σε ανθρώπους, οι πολυφαινόλες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διεργασίες. Μπορούν να ρυθμίσουν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των λιπιδίων, να συμβάλουν στην αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας, της δυσλιπιδαιμίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη, στη βελτίωση του μεταβολισμού του λιπώδους ιστού και στην ανακούφιση του οξειδωτικού στρες [89-91].

Μια πρόσφατη μελέτη διερεύνησε την επίδραση των συμπληρωμάτων κερκετίνης στους μυεντερικούς νευρώνες και τα γλοία στο παχύ έντερο έντερο (τυφλό) διαβητικών αρουραίων και κατέγραψε την πιθανή νευροπροστατευτική δράση της [92]. Η κερκετίνη έχει επίσης αποδειχθεί σε *in vitro* μελέτη σε αρουραίους ότι προστατεύει τους νευρώνες στα νωτιαία νεύρα γαγγλίου έναντι βλάβης προκαλούμενης από υψηλή τιμή γλυκόζης, εύρημα που μπορεί να αποδειχθεί ευεργετικό για τη θεραπεία της διαβητικής νευροπάθειας [93]. Μία τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διπλά-τυφλή μελέτη σε άνδρες

και γυναίκες με διαβήτη τύπου 1 ή 2 και διαβητική νευροπάθεια που έλαβαν το QR-333, μια ένωση που περιέχει κερκετίνη ή εικονικό φάρμακο, τρεις φορές ημερησίως για 4 εβδομάδες, σε κάθε πόδι όπου εμφανίστηκαν συμπτώματα, κατέδειξε ότι το QR-333 μείωσε σημαντικά τα συμπτώματα της διαβητικής νευροπάθειας, βελτίωσε την ποιότητα ζωής και ήταν ασφαλές και καλά ανεκτό [94].

1.6.7 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Τα φλαβονοειδή είναι χρήσιμα ως χημειοπροστατευτικοί/ χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Είναι ευρέως γνωστό ότι η υψηλή πρόσληψη φρέσκων φρούτων και λαχανικών, πλούσιων σε βιταμίνες A, C, E, β-καροτένιο, φλαβονοειδή και άλλα συστατικά, προσφέρουν προστασία από πολλούς καρκίνους όπως των πνευμόνων, του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου [95, 96].

Οι Woo et al. [97] διαπίστωσαν ότι η πρόσληψη διατροφικών φλαβονοειδών έχει προστατευτική δράση ως προς τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου που σχετίζεται με το κάπνισμα. Οι Menezes et al. [98] αναφέρουν επίσης ότι τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες που παρεμβαίνουν σε αρκετούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς του καρκίνου, όπως η αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της απόπτωσης και η αναστολή της διαφοροποίησης ή έναν συνδυασμό αυτών των μηχανισμών [99].

Η αυξημένη κατανάλωση φλαβονοειδών έχει φανεί ότι συνδέεται σημαντικά με μείωση του καρκίνου του παχέος εντέρου κατά 6% [100], μείωση του καρκίνου των ωοθηκών κατά 18% [101] και μείωση του καρκίνου του πνεύμονα (σχετιζόμενου με το κάπνισμα) κατά 16% [97]. Παράλληλα, τα αποτελέσματα από τη μελέτη του Tang [102] δείχνουν ότι η αύξηση της πρόσληψης διαιτητικών φλαβονοειδών κατά 20 mg/d συσχετίζεται με 10% μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα.

Στοιχεία τόσο από επιδημιολογικές όσο και από εργαστηριακές μελέτες δείχνουν ότι η διατροφική πρόσληψη φλαβονοειδών μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων τύπων καρκίνου. Αρκετοί τύποι φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων της σιλυμαρίνης, της γενιστεΐνης, της κερκετίνης, της δαϊδεζίνης, της λουτεολίνης,

της καμπεφρόλης, της απιγενίνης και της 3-γαλακτικής επιγαλλοκατεχίνης, έχουν αναγνωριστεί ότι αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλές μορφές καρκίνου. Αυτές οι προαναφερθείσες ενώσεις έχει αναφερθεί ότι έχουν αντικαρκινική και προστατευτική δράση κατά του καρκίνου του προστάτη, του παχέος εντέρου, του μαστού, του θυρεοειδούς, του πνεύμονα, των ωοθηκών, καθώς και σε άλλες μορφές καρκίνου. Η χημειοπροστατευτική αποτελεσματικότητά τους αποδίδεται στην ανασταλτική δράση τους έναντι της ανάπτυξης νέων καρκινικών κυττάρων, στην παρεμπόδιση των καρκινογόνων ουσιών να φτάσουν στις θέσεις ενεργοποίησης τους, και στη μείωση της τοξικότητας ορισμένων ενώσεων με αναστολή του μεταβολισμού τους [103].

Οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων τα флаβονοειδή εμφανίζουν τα αντικαρκινικά τους αποτελέσματα περιλαμβάνουν:

- A) επαγωγή της απόπτωσης,
- B) διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G_1 ή G_2/M φάση με την αναστολή των βασικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDKs),
- Γ) αναστολή των μεταβολικών ενζύμων (κυρίως των κυτοχρωμάτων P450 [CYPs]), που σχετίζονται με την ενεργοποίηση πολλών καρκινογόνων ενώσεων,
- Δ) αναστολή του σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης των μεταβολικών ενζύμων της φάσης II, και
- Ε) αναστολή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF).

Επιπλέον, ορισμένα флаβονοειδή έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν σημαντικά την ανοχή σε πολλαπλά φάρμακα, που είναι υπεύθυνα για την υποτροπή του καρκίνου και την αποτυχία της χημειοθεραπείας. Ωστόσο, κάποια флаβονοειδή έχουν συγκεκριμένους μηχανισμούς δράσης που δεν είναι χαρακτηριστικοί της οικογένειας των флаβονοειδών. Για παράδειγμα, οι ισοφλαβόνες γενιστεΐνη και δαϊδζεΐνη έχει αποδειχθεί πως αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [104]. Εξαιτίας της δομικής ομοιότητάς τους με τα οιστρογόνα, η γενιστεΐνη και η δαϊδζεΐνη έχουν αναφερθεί ότι ασκούν σημαντική προληπτική δράση κατά του καρκίνου του μαστού. Άλλο ένα ενδιαφέρον флаβονοειδές είναι η σιλυβίνη, η οποία έχει αντιοξειδωτική και

ηπατοπροστατευτική δράση [105]. Κατά συνέπεια, αρκετές μελέτες για τα флаβονοειδή υποστηρίζουν τον πιθανό ρόλο των флаβονοειδών στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου.

2. Λιποφιλία

Η λιποφιλία ή λιποφιλικότητα, αποτελεί την βασικότερη φυσικοχημική ιδιότητα των μορίων που επηρεάζει τη μεταφορά ενός φαρμάκου και είναι μέτρο συγγένειας ενός μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Είναι λοιπόν η ιδιότητα που καθορίζει την κατανομή της κάθε ουσίας ανάμεσα σε μια υδατική και μία οργανική φάση.

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί πως λιποφιλία και υδροφοβία δεν είναι ταυτόσημες έννοιες. Η λιποφιλία είναι μία σύνθετη ιδιότητα και η υδροφοβία μαζί με την πολικότητα αποτελούν συνιστώσες αυτής. Συγκεκριμένα:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα}$$

Η ποσοτική έκφραση της λιποφιλίας περιγράφεται από τον συντελεστή μερισμού ή κατανομής P (Partition Coefficient) σε ένα διφασικό σύστημα διαλυτών. Ο συντελεστής μερισμού εκφράζεται από το λόγο της συγκέντρωσης της αδιάστατης μονομερούς μορφής της ουσίας στην οργανική φάση ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση αυτής στο νερό:

$$P = C_{\text{org}} / C_{\text{υδατ}}$$

Ο συνηθέστερος οργανικός διαλύτης για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας είναι η 1-οκτανόλη, που αποτελείται από μία πολική κεφαλή συνδεδεμένη με μία υδρόφοβη αλυσίδα, προσομοιάζοντας τη δομή των φωσφολιπιδίων των βιολογικών μεμβρανών. Το σύστημα οκτανόλης/ νερού επιτρέπει τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου και προσομοιάζει τόσο την πρωτεϊνική σύνδεση όσο και τις βιολογικές μεμβράνες. Ωστόσο, για κάποιους τύπους μεμβρανών και βιολογικών φραγμών άλλα συστήματα διαλυτών θεωρούνται καταλληλότερα. Για παράδειγμα, μεμβράνες που δεν περιέχουν δότες και δέκτες πρωτονίων προσομοιώνονται καλύτερα από το σύστημα αλκανίου (κυκλοεξανίου)-νερού.

Λόγω της δομής τους, πολλά φάρμακα διαθέτουν ένα ή/και περισσότερα κέντρα ιονισμού, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται στα διάφορα βιολογικά υγρά όχι μόνο με την αδιάστατη αλλά και με την ιονισμένη τους μορφή. Ο βαθμός ιονισμού τους εξαρτάται από το pH και από την σταθερά ιονισμού pK_a του εκάστοτε μορίου. Σε

αυτές τις περιπτώσεις για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας δεν χρησιμοποιείται ο συντελεστής μερισμού αλλά ο συντελεστής κατανομής (D). Ο συντελεστής αυτός αναφέρεται στον λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων των ιονισμένων μορφών και της αδιάστατης μορφής στην οργανική και υδατική φάση.

$$D = \Sigma c_{\text{org}} / \Sigma c_{\text{υδατ}}$$

Έτσι, ο συντελεστής κατανομής (logD) αναφέρεται στη λιποφιλία του μίγματος όλων των υφιστάμενων ιοντικών μορφών της ένωσης σε συγκεκριμένο pH. Ο συντελεστής κατανομής logD είναι πάντοτε μικρότερος από τον συντελεστή μερισμού logP. Θεωρώντας ότι πρακτικά στην οκτανόλη κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή, ισχύει η σχέση:

$$\log P = \log D + Q$$

όπου Q είναι η διόρθωση η οποία εξαρτάται από το pK_a της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος

Για μονοπρωτικά οξέα : $Q = \log (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a})$

Για μονοπρωτικές βάσεις : $Q = \log (1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}})$

Για διπρωτικές βάσεις και οξέα και αμφολύτες οι διορθώσεις Q γίνονται περισσότερο πολύπλοκες.

Τεχνικές προσδιορισμού του συντελεστή μερισμού

Ο άμεσος τρόπος προσδιορισμού του συντελεστή μερισμού περιλαμβάνει τις τεχνικές της ανακινούμενης φιάλης, της φυγόκεντρου χρωματογραφίας κατανομής και της ποτενσιομετρικής μεθόδου.

Η παραδοσιακή τεχνική για την μέτρηση του συντελεστή μερισμού είναι η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης. Ελέγχοντας το pH της υδατικής φάσης μπορεί να μετρηθεί το logP ουδέτερων και ιοντικών διαλυμάτων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει έναν αριθμό πρακτικών περιορισμών, όπως η ακρίβεια του όγκου των φάσεων, η σταθερότητα και η πτητικότητα της διαλυμένης ουσίας, οι προσμίξεις της, καθώς και ο σχηματισμός μικρογαλακτωμάτων και η κατανάλωση χρόνου. Επιπλέον οι τιμές logP που μετρούνται για ιονισμένες διαλυμένες ουσίες είναι

φαινομενικές τιμές και ισχυρά εξαρτώμενες από πειραματικές συνθήκες όπως ο όγκος των φάσεων, η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος και η ιοντική ισχύς. Αυτό κάνει τη χρήση τους σε μελέτες σχέσεων δομής – ιδιότητας και δομής - δραστηριότητας λιγότερο αξιόπιστη [106].

Η ποτενσιομετρική τεχνική επιτρέπει την μέτρηση των σταθερών ιονισμού και των τιμών $\log P$. Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση του ότι όταν μια ιονιζόμενη ένωση σε υδατικό διάλυμα τιτλοδοτείται παρουσία οργανικής φάσης, η καμπύλη τιτλοδότησης μετακινείται προς τα δεξιά για τα οξέα και προς τα αριστερά για τις βάσεις. Αυτή η μετατόπιση σχετίζεται με το pK_a και τη λιποφιλικότητα τόσο των ουδέτερων όσο και των ιονισμένων μορφών της διαλυμένης ουσίας, καθώς και με τον όγκο των δύο φάσεων [106].

Η φυγόκεντρη χρωματογραφία κατανομής είναι μία μοναδική μορφή χρωματογραφίας κατανομής υγρού – υγρού που δεν περιέχει στερεή υποστήριξη. Έτσι, αποφεύγεται το πρόβλημα της απορρόφησης και η συγκράτηση της διαλυμένης ουσίας εξαρτάται αποκλειστικά από τον συντελεστή κατανομής της. Δύο μη αναμίξιμα υγρά χρησιμοποιούνται ως κινητές και στατικές φάσεις στη χρωματογραφία. Φυγόκεντρες δυνάμεις διατηρούν τη στατική φάση καθώς η κινητή φάση αντλείται από το σύστημα [107].

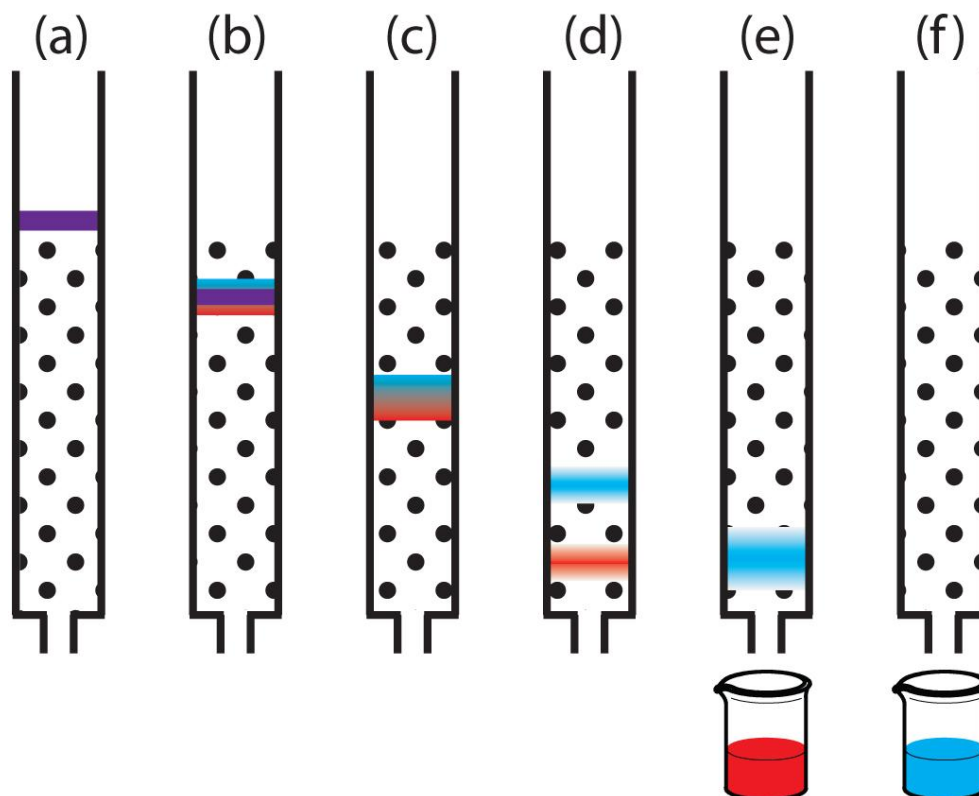
Ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί έμμεσα με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών, και συγκεκριμένα της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Αντίστροφης Φάσης (RP-TLC) και της Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης (RP-HPLC), μέσω καμπυλών αναφοράς. Οι τεχνικές αυτές προσομοιώνουν την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης/νερού και πλεονεκτούν έναντι άλλων (π.χ. μέθοδος ανακινούμενης φιάλης), λόγω της ταχύτητας, της ακρίβειας, της επαναληψιμότητας και της μεγάλης δυναμικής περιοχής μετρήσεων χωρίς να απαιτούν μεγάλες ποσότητες των υπό ανάλυση ενώσεων [108].

3. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett το 1903, στην προσπάθεια του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μίας στατικής και μίας κινητής, και βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μίγματος, όπως είναι η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων κ.ά. Οι διαφορές αυτές διαμορφώνουν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις του χρωματογραφικού συστήματος. Έτσι, η κινητή φάση, διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτήν των συστατικών του μίγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και εξέρχονται από τη στήλη σε συνήθως διαφορετικές χρονικές στιγμές.

Βασική αρχή χρωματογραφίας

Καθορισμένη ποσότητα δείγματος προστίθεται στην κινητή φάση ή στην αρχή της στήλης. Το δείγμα μετακινείται στη στήλη και τα συστατικά του κατανέμονται, με κάποιον μηχανισμό, μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Το κλάσμα κάθε συστατικού ευρισκόμενο στην κινητή φάση, κατά τη μετακίνηση του μέσα στη στήλη έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης, οπότε συμβαίνει νέα κατανομή. Αυτό επαναλαμβάνεται πολλές φορές καθώς διαβιβάζεται συνεχώς νέα κινητή φάση στη στήλη. Τα συστατικά μετακινούνται μόνο όταν βρίσκονται στην κινητή φάση και η ταχύτητα μετακίνησης τους εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής τους σε αυτή, που είναι συνάρτηση του συντελεστή κατανομής τους στις δύο φάσεις. Έτσι, συστατικά με διαφορετικούς συντελεστές κατανομής θα μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από τη στήλη [109].



Εικόνα 6: Χρωματογραφικός Διαχωρισμός

3.1 Υγροχρωματογραφία

Στην υγροχρωματογραφία (LC), η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, ενώ η κινητή φάση είναι υγρή. Η διαβίβαση της κινητής μέσα από τη στατική φάση πετυχαίνεται λόγω βαρύτητας ή με χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια μεγάλης διαμέτρου (κλασσική χρωματογραφία), είτε με τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου υψηλής διαχωριστικής απόδοσης (υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, HPLC).

Η αντιστρόφου φάσεως υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) έχει αποδειχθεί ότι προσομοιώνει το σύστημα οκτανόλης-νερού και θεωρείται ως μια δημοφιλής εναλλακτική λύση για την αξιολόγηση της λιποφιλίας. Εδώ ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια

(ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα μη πολικό χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Προσφέρει αρκετά πρακτικά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της ταχύτητας, της αναπαραγωγιμότητας, της ευαισθησίας στις προσμείξεις ή στα προϊόντα αποικοδόμησης, ευρύτερο δυναμικό εύρος, ανίχνευση on line και μειωμένο χειρισμό και μέγεθος του δείγματος. Αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον και η βιβλιογραφία είναι πλούσια σε ερευνητικά άρθρα, τα οποία διερευνούν τη σχέση της χρωματογραφικής κατακράτησης με τον διαχωρισμό στο σύστημα οκτανόλης-νερού και τους κοινούς παράγοντες που βρίσκονται πίσω από αυτές τις δύο διαδικασίες [110]. Παρουσιάζει όμως περιορισμούς που αφορούν στις δυνατότητες ανίχνευσης και το pH (2.5-7.8).

Ως δείκτης λιποφιλίας χρησιμοποιείται ο λογάριθμος του παράγοντα χωρητικότητας ($\log k$), που δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\log k = \log [(t_r - t_o) / t_o]$$

όπου:

- t_r : ο χρόνος κατακράτησης της υπό ανάλυσης ουσίας
- t_o : ο νεκρός χρόνος (χρόνος κατακράτησης ουσίας που δεν συγκρατείται από τη στήλη)

Ο λογάριθμος του παράγοντα χωρητικότητας σχετίζεται γραμμικά με το συντελεστή μερισμού σύμφωνα με την σχέση:

$$\log k = a \log P + b$$

Οι σταθερές a και b της εξίσωσης προκύπτουν με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης, ενώ η ποιότητα των στατιστικών στοιχείων που συνοδεύουν την εξίσωση εξαρτάται από τις χρωματογραφικές συνθήκες και την φύση των υπό μελέτη ουσιών [111].

3.1.1 Οργανολογία

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγροχρωματογραφίας περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη:

- 1) Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.

Απαερωτής: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.

- 2) Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): Περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.

- 3) Θάλαμος ανάμιξης: Πραγματοποιείται ανάμιξη της κινητής φάσης με τις προς ανάλυση ενώσεις.

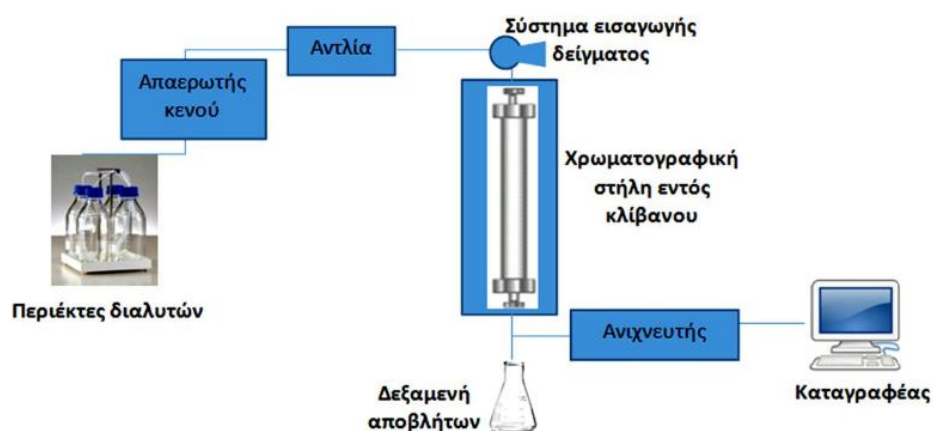
- 4) Χρωματογραφική στήλη (column): Στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).

- 5) Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του φωτός.

- 6) Καταγραφέας: Πρόκειται για τον ηλεκτρονικό υπολογιστή που μετατρέπει το σήμα του ανιχνευτή σε φάσμα.



Εικόνα 7: Τυπική εργαστηριακή διάταξη χρωματογραφίας HPLC



Εικόνα 8: Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγροχρωματογραφίας HPLC

3.2 Στατικές φάσεις στην RP-HPLC

Τα πλέον προτιμώμενα υλικά πλήρωσης για στήλες αντίστροφης φάσης στην χρωματογραφική ανάλυση είναι το οκταδεκυλιωμένο πήγμα οξειδίου του πυριτίου και το οκτυλιωμένο πήγμα διοξειδίου του πυριτίου (C-18, C-8). Η στατική φάση με τα δεκαοκτώ άτομα άνθρακα (ODS) θεωρείται ότι προσομοιάζει καλύτερα το μερισμό στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Σε μία χρωματογραφική ανάλυση τα μόρια του αναλύτη που υπάρχουν στην κινητή φάση βυθίζονται ανάμεσα στις ανθρακικές αλυσίδες της στατικής φάσης και αποβυθίζονται με τη βοήθεια της κινητής φάσης.

Ωστόσο, η παρεμβολή σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στο μηχανισμό κατανομής της RP-HPLC έχει αναγνωριστεί ως σοβαρό μειονέκτημα, ιδίως στην περίπτωση των βασικών φαρμάκων [112]. Ως σιλανόφιλες καλούνται οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των υπό προσδιορισμό ουσιών και των ελεύθερων υδροξυλίων του πήγματος διοξειδίου του πυριτίου που δεν αντέδρασαν κατά την παρασκευή της στατικής φάσης με τις αλκυλικές αλυσίδες λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Οι σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις αποδίδονται στις ελεύθερες θέσεις σιλανόλης και περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου καθώς και ηλεκτροστατικές δυνάμεις, ειδικά στην περίπτωση θετικά φορτισμένων βασικών ενώσεων, προκαλώντας σημαντικές αυξήσεις στην κατακράτηση. Εξαρτώνται επίσης από τον βαθμό ιονισμού των ομάδων σιλανόλης, που είναι λιγότερο έντονος σε χαμηλά επίπεδα pH. Ένα ακόμα μειονέκτημα των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων είναι ότι προκαλούν «ουρά» (tailing) στις κορυφές των χρωματογραφημάτων και γενικότερα ασυμμετρία στις χρωματογραφικές κορυφές, γεγονότα που περιορίζονται αυξάνοντας τον αριθμό των ατόμων του άνθρακα στην αλκυλική αλυσίδα [113, 114].

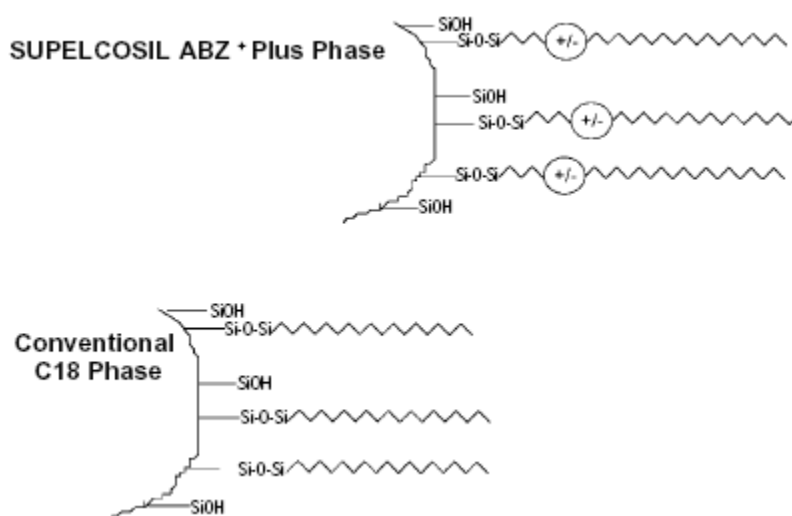
Το πρόβλημα των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων αντιμετωπίζεται εν μέρει από την ανάπτυξη των στηλών με μειωμένες ελεύθερες ή προσιτές θέσεις σιλανόλης. Συγκεκριμένα έχουν επικρατήσει οι εξής λύσεις:

- Η πρώτη στηρίζεται στην προσθήκη διάφορων παραγόντων επικάλυψης των ελεύθερων υδροξυλίων του πήγματος του οξειδίου του πυριτίου στην κινητή φάση. Συνήθως χρησιμοποιούνται υδρόφοβες αμίνες, όπως η n-δεκυλαμίνη,

οι οποίες στην πρωτονιωμένη τους μορφή αλληλεπιδρούν με ελεύθερα υδροξύλια [115].

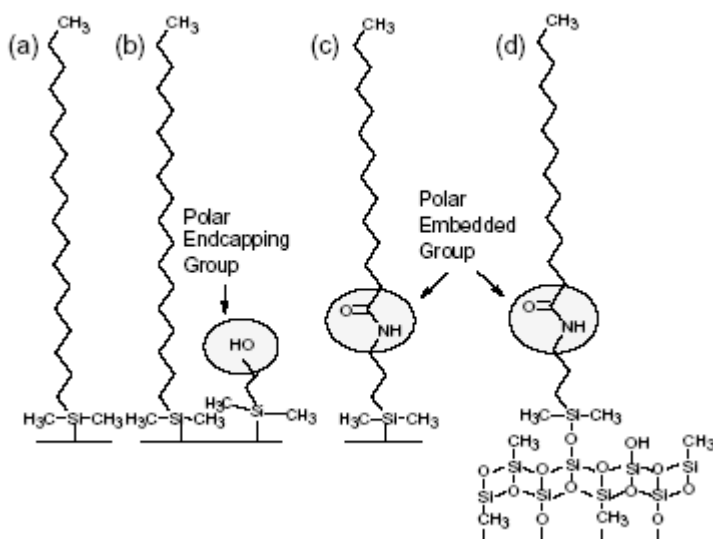
- Η δεύτερη στοχεύει στην παραγωγή στατικών φάσεων με τέτοιον τρόπο ώστε να διαθέτουν πολύ περιορισμένο αριθμό προσβάσιμων ελεύθερων υδροξυλίων. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με δέσμευση των υδροξυλίων που δεν αντιδρούν με αλκύλια μικρού μήκους ώστε να δημιουργούνται end-capped BDS στήλες, είτε με τη χρήση στηλών που είναι διαμορφωμένες έτσι ώστε τα ελεύθερα υδροξύλια να είναι εγκλωβισμένα στο εσωτερικό της στατικής φάσης και όχι εκτεθειμένα στην επιφάνεια της («polar-embedded» στήλες). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η στήλη ABZ [116].

Οι στήλες ABZ διαθέτουν ένα πολικό τμήμα (συνήθως αμίδιο ή καρβαμίδιο) που εντοπίζεται στη βάση της υδρογονανθρακικής τους αλυσίδας. Το τμήμα αυτό δρα προστατευτικά για τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης, ιδιαίτερα ως προς αναλύτες υψηλής πολικότητας. Οι αμιδικές ομάδες αναπτύσσουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου, προσδίδοντας στις υδρογονανθρακικές αλυσίδες πιο εκτεταμένη διαμόρφωση ακόμα και κατά τη χρήση κινητών φάσεων με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε νερό.



Εικόνα 9: Δομική σύγκριση της στήλης ABZ με μία στήλη ODS.

Παρόμοια χαρακτηριστικά με εκείνα της ABZ παρουσιάζουν οι στήλες που ανήκουν στις κατηγορίες «polar-endcapped» και «hydrid-based particle bonded with the polar embedded ligand». Κατά την σύνθεση των «polar-endcapped» στηλών μικρές αλκυλικές αλυσίδες, αποτελούμενες συνήθως από 3-4 άτομα άνθρακα και ένα πολικό τμήμα, αντιδρούν με τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης. Τα πολικά τμήματα προσδίδουν εκτεταμένη διαμόρφωση στις αλυσίδες ενώ αυξάνουν την πολικότητα κοντά στην βάση της στατικής φάσης, διευκολύνοντας έτσι την διείσδυση στο εσωτερικό των υδρογονανθρακικών αλυσίδων για μόρια από κινητές φάσεις που έχουν υψηλή περιεκτικότητα νερού. Όσον αφορά τις «polar-endcapped» και «hydrid-based particle bonded with the polar embedded ligand» στήλες, είναι εκείνες που έχουν παρασκευαστεί από μίγματα οργανοσιλανίων, δημιουργώντας τμήματα σιλοξάνης και μεθυλοσιλοξάνης, περιορίζοντας έτσι την ανομοιογένεια στην επιφάνειά τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι η στήλη Discovery-RP-Amide-C16.



Εικόνα 10: (a) Συμβατική ODS στατική φάση. (b) Polar endcapped ODS. (c) Polar embedded ODS. (d) Hybrid-based particle bonded with the polar embedded ligand - Discovery-RP-Amide-C16.

Συγκεκριμένα η Discovery-RP-Amide-C16 παρουσιάζει μοναδική επιλεκτικότητα, εξαιρετική συγκράτηση και ανάλυση για πολικές ενώσεις και χαμηλότερη υδροφοβικότητα σε σύγκριση με την ODS, ενώ είναι συμβατή με 100% υδατικές κινητές φάσεις.

3.3 Κινητές φάσεις στην RP-HPLC

Οι περισσότερες χρησιμοποιούμενες κινητές φάσεις σε RP-HPLC είναι μίγματα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με οργανικό τροποποιητή, συνήθως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή THF. Ωστόσο, το ακετονιτρίλιο βρέθηκε ότι παράγει τις πιο ασύμμετρες κορυφές στην ανάλυση των οργανικών βάσεων. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην αδυναμία του ακετονιτρίλιου να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τις υπολειμματικές σιλανόλες, σε αντίθεση με τη μεθανόλη και το THF. Όσον αφορά την εκτίμηση της λιποφιλίας, φαίνεται ότι η μεθανόλη είναι ο καταλληλότερος οργανικός τροποποιητής για RP-HPLC, καθώς δεν διαταράσσει το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου του νερού. Επιπλέον, κατά την εξισορρόπηση, τα μόρια μεθανόλης συνδέονται με τη στατική φάση σχηματίζοντας μια μονοστιβάδα, το οποίο παρέχει τη ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου σε καλύτερη συμφωνία με την η-οκτανόλη.

Η σύνθεση του ρυθμιστικού υδατικού συστατικού στην κινητή φάση παίζει επίσης ενεργό ρόλο στη συγκράτηση πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων, που μπορεί να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων με αντίθετα ιόντα. Το μορφολινο-προπανο-σουλφονικό οξύ (MOPS), θεωρείται ως ο ρυθμιστικός παράγοντας που επιλέγουμε για την εκτίμηση της λιποφιλίας με HPLC. Παρουσιάζει μεγάλη ρυθμιστική ικανότητα σε συνδυασμό με την ικανότητα σχηματισμού ζευγών ιόντων λόγω της αμφολυτικής του φύσης και, κατά συνέπεια, δεν παρεμβαίνει ούτε στις διαλυμένες ουσίες ούτε στη στατική φάση. Από την άλλη, τα πειράματα κατανομής για τον προσδιορισμό $\log D$ συνήθως εκτελούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ή σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS), που περιέχει NaCl και KCl σε συνολική συγκέντρωση περίπου 0,16 M, η οποία είναι παρόμοια με τις ισοτονικές φυσιολογικές συνθήκες. Ως εκ τούτου, αυτή η επιλογή χρησιμοποιείται συχνά και

στην HPLC. Ωστόσο, τα φωσφορικά άλατα και κυρίως τα χλωριούχα ανιόντα είναι ικανά να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων με πρωτονιωμένα μόρια με σταθερές εκχύλισης που μπορεί να διαφέρουν από εκείνες του συστήματος οκτανόλης-νερού [114].

Στην περίπτωση των βασικών φαρμάκων, η προσθήκη μικρών ποσοτήτων (0,15-0,20% v/ v) αμινών στην κινητή φάση είναι μια κρίσιμη προϋπόθεση για την καταστολή των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, ακόμη και αν χρησιμοποιούνται πολικά ενσωματωμένες ή καλυμμένες με πολική ομάδα στα άκρα στατικές φάσεις. Οι υδρόφοβες αμίνες, όπως η η-δεκυλαμίνη και η N, N-διμεθυλοκυτταμίνη, θεωρούνται οι πλέον κατάλληλοι παράγοντες επικάλυψης σε συνδυασμό με μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή. Η επίδραση των υδρόφοβων αμινών κατά την κατακράτηση είναι λιγότερο εμφανής με το ακετονιτρίλιο ως οργανικό τροποποιητή. Το ακετονιτρίλιο, ως ασθενής διαλύτης δεσμεύσεως υδρογόνου, δεν είναι ικανό να διαλυθεί στη στατική φάση με αρκετό νερό, προλαμβάνοντας πιθανώς τη θετικά φορτισμένη αμίνη να σύρεται στη στήλη και να ασκεί τον ρόλο του παράγοντα κάλυψης [23].

Για την καλύτερη προσομοίωση του χρωματογραφικού συστήματος με το σύστημα οκτανόλης/νερού προτείνεται επίσης η προσθήκη οκτανόλης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα κορεσμένα σε 1-οκτανόλη ως κινητές φάσεις, λαμβάνεται γρήγορα σταθερή γραμμή βάσης και οι λογάριθμοι των σχετικών χρόνων κατακράτησης συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με κλίση με τιμή μονάδας ως προς τους συντελεστές κατανομής που λαμβάνονται από την κλασική διαδικασία της ανακινούμενης φιάλης [117]. Η συμπερίληψη της 1-οκτανόλης στο έκλουσμα, και συγκεκριμένα στο οργανικό τμήμα της κινητής φάσης, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ελαχιστοποίηση της επίδρασης διαφορικού δεσμού υδρογόνου που παρατηρείται στις περισσότερες μεθόδους RP-LC. Η οκτανόλη είναι σημαντικά πιο λιπόφιλη από τη μεθανόλη και θα εμπλουτιστεί στη στατική φάση σε σχέση με τον όγκο του εκλούσματος, δημιουργώντας μία φάση που θα προσομοιάζει εκείνη της οκτανόλης και ελαχιστοποιώντας τη διάκριση των δεσμών υδρογόνου [118]. Γενικά, η προσθήκη n-οκτανόλης στην κινητή φάση διαπιστώθηκε ότι παράγει ελαφρώς χαμηλότερους χρόνους κατακράτησης χωρίς να επηρεάζεται το σχήμα της κορυφής. Επίσης ευρέθη ότι παράγει χαμηλότερες τιμές $\log k_{\text{ow}}$ και

ευνοεί την ομοιομορφία του μηχανισμού κατακράτησης στην περίπτωση των βασικών φαρμάκων. Ωστόσο, πρέπει να υπάρξει προσοχή στη σωστή επιλογή της κλίμακας κλάσματος μεθανόλης για τη διαδικασία της παρέκτασης, καθώς η παρουσία της η-οκτανόλης σε πλούσιες σε νερό κινητές φάσεις μπορεί να επηρεάσει τη γραμμικότητα που οδηγεί σε υποεκτίμηση της λιποφιλικότητας [112].

3.4 RP-HPLC και δείκτες λιποφιλίας

Εάν ληφθεί υπόψη ολόκληρη η περιοχή των % ποσοστών του οργανικού τροποποιητή, η σχέση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης και του κλάσματος του οργανικού τροποποιητή ϕ ακολουθεί το μοντέλο παραμέτρων διαλυτότητας του Schoenmaker σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Log}k = A\phi + B\phi^2 + E\phi^{1/2} + \text{log}k_w$$

Τα A, B και E είναι συντελεστές προσαρμογής και το $\text{log}k_w$ είναι η τιμή που αντιστοιχεί σε 100% υδατική κινητή φάση. Ο όρος $B\phi^2$ αντιστοιχεί στην καμπυλότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οργανικών τροποποιητών που αποδίδεται εν μέρει σε σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις, ενώ το $E\phi^{1/2}$ αντιπροσωπεύει την καμπυλότητα που παρατηρείται σε πλούσιες σε νερό κινητές φάσεις λόγω προβλημάτων διάλυσης της στατικής φάσης. Το σφάλμα στις τιμές $\text{log}k_w$, που παράγεται ως αποτέλεσμα της καμπυλότητας στα χαμηλότερα κλάσματα του οργανικού τροποποιητή, διερευνήθηκε από τον Tate et al. [119]. Η σωστή εκτίμηση της παρεκτάσεως των δεικτών χρωματογραφίας εξαρτάται επίσης από τη στατική φάση. Πράγματι, μια πολικά ενσωματωμένη στήλη με βάση το υδρίδιο παρήγαγε ελαφρώς μικρότερο σφάλμα στην διαδικασία παρέκτασης από μια στήλη με πολικά άκρα και μια συμβατική στήλη με μη πολικά άκρα, ως αποτέλεσμα τόσο της μικρότερης επιφάνειας όσο και των λιγότερων επιφανειακών σιλανολών.

Παρόλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις N-N μεμονωμένων ζευγών μεταξύ των ενσωματωμένων αμιδικών ομάδων και των διαλυμένων ουσιών που περιέχουν άτομα αζώτου, όπως οι βασικές ενώσεις, φαίνονται να επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά συγκράτησης και επομένως την ακρίβεια της παρεμβολής [119].

Η τετραγωνική παρέκταση χρησιμοποιώντας την υψηλότερη συγκέντρωση οργανικού τροποποιητή μπορεί επίσης να οδηγήσει σε εσφαλμένες τιμές σε σχέση με τη λιποφιλία.

Εντούτοις, όταν η μεθανόλη χρησιμοποιείται ως οργανικός τροποποιητής σε κλάσματα >0.2 μαζί με έναν παράγοντα κάλυψης, το γραμμικό τμήμα της προηγούμενης εξίσωσης είναι επαρκώς ευρύ. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή ανηγμένων τιμών $\log k_w$ σύμφωνα με το μοντέλο της γραμμικής αντοχής διαλυτή Snyder μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Log}k = -S\varphi + \log k_w$$

Η γραμμική σχέση γενικά προτιμάται για την επίτευξη αντιπροσωπευτικών τιμών $\log k_w$ της λιποφιλίας. Θεωρείται ότι η γραμμικότητα είναι καλύτερη για συγκεντρώσεις τροποποιητή που παράγουν $0 < \log k < 1$.

Οι τιμές $\log k_w$ πλεονεκτούν έναντι των τιμών $\log k'$, δεδομένου ότι είναι ανεξάρτητες των χρωματογραφικών συνθηκών, ενώ αποφεύγονται σφάλματα ως προς την εκτίμηση της λιποφιλίας λόγω αναστροφής της λιποφιλίας σε διαφορετικά ποσοστά οργανικού τροποποιητή. Επιπλέον, ο υπολογισμός της παραμέτρου $\log k_w$ μέσω γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης οδηγεί σε άρση των αναπόφευκτων σφαλμάτων στις μετρήσεις της παραμέτρου $\log k'$ σε μικρά ποσοστά νερού. Τέλος, ο προσδιορισμός της λιποφιλίας μέσω της παραμέτρου $\log k_w$ καλύπτει μεγάλο εύρος λιποφιλίας [119].

Οι τιμές $\log k_w$ βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους με τις τιμές $\log P$ και συσχετίζονται με τις τιμές $\log P$ μέσω της σχέσης :

$$\log P = a \log k_w + b$$

Σε ορισμένες περιπτώσεις και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, η κλίση a και ο σταθερός όρος b προσεγγίζουν την μονάδα και το μηδέν αντίστοιχα, οδηγώντας σε 1 προς 1 συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων $\log k_w$ και $\log P$.

Θεωρητικά οι τιμές $\log k_w$ δεν επηρεάζονται από το είδος του οργανικού τροποποιητή. Ωστόσο, πολλές φορές παρατηρούνται αποκλίσεις και οι τιμές $\log k_w$ διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του οργανικού τροποποιητή. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του φαινομένου των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, ενώ η υδροφοβία και η διπολική ροπή του διαλύτη φαίνεται επίσης να παίζει ενεργό ρόλο, ιδίως όσον αφορά τις σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις και την δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.

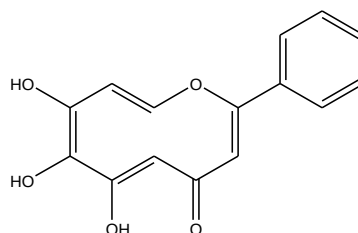
Πειραματικό μέρος

4. Προσδιορισμός λιποφιλίας флаβονοειδών μέσω προσδιορισμού των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$.

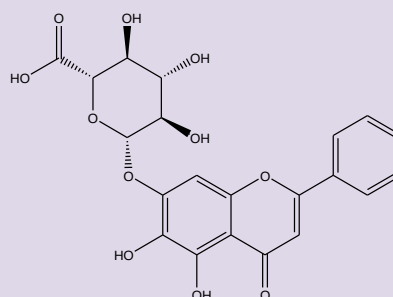
4.1 Εξεταζόμενα Φλαβονοειδή

Παρακάτω παρατίθενται οι χημικές δομές των 33 флаβονοειδών που εξετάστηκαν:

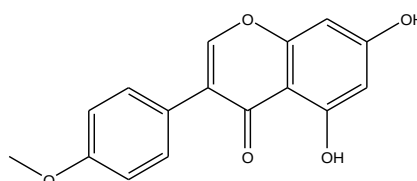
1. Baicalein



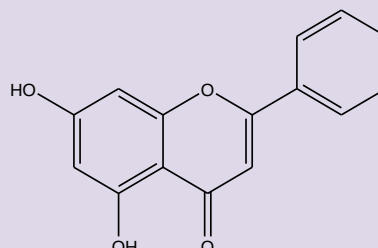
2. Baicalin



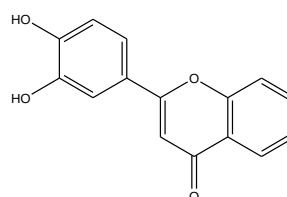
3. Biochanin-A



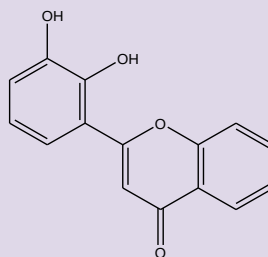
4. Chrysin



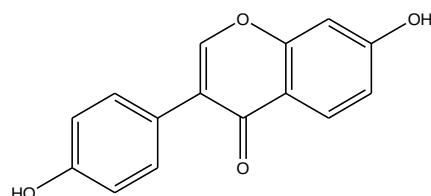
5. 3',4'-dihydroxyflavone



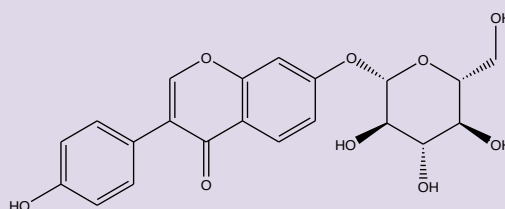
6. 2',3'-dihydroxyflavone



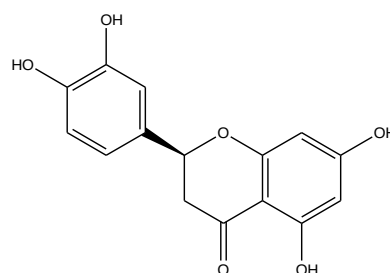
7. Daidzein



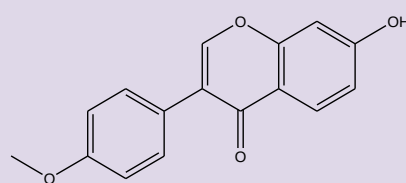
8. Daidzin



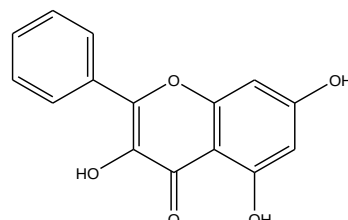
9. Eriodictyol



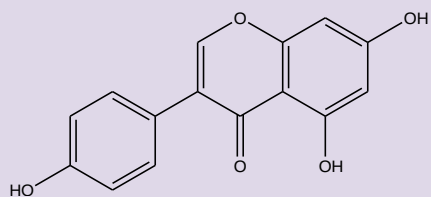
10. Formonentin



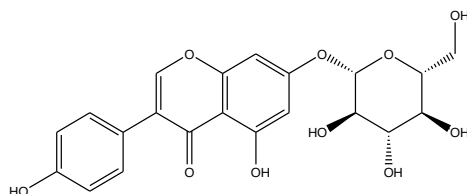
11. Galangin



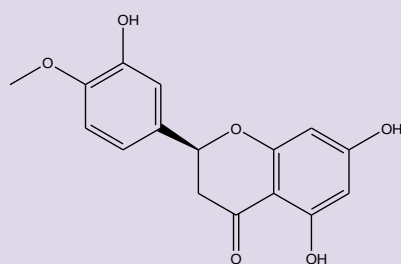
12. Genistein



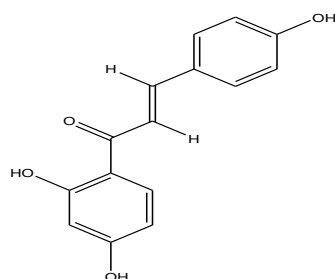
13. Genistin



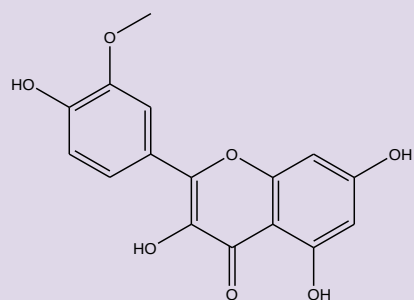
14. Hesperetin

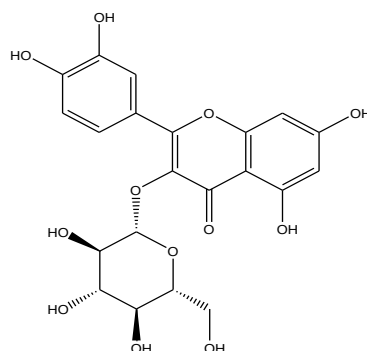
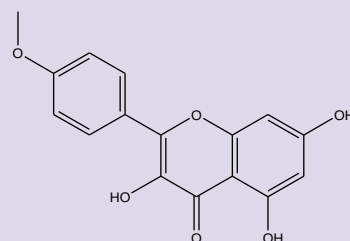
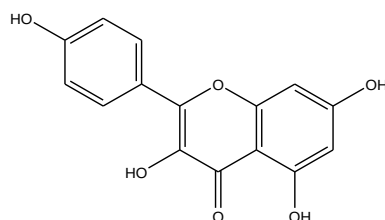
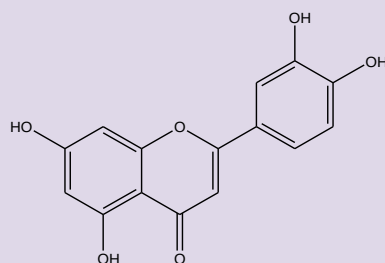
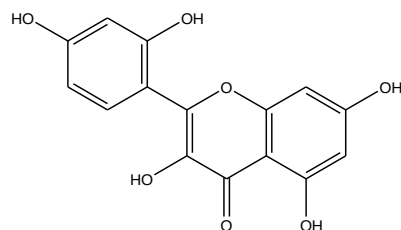


15. Isoliquiritigenin

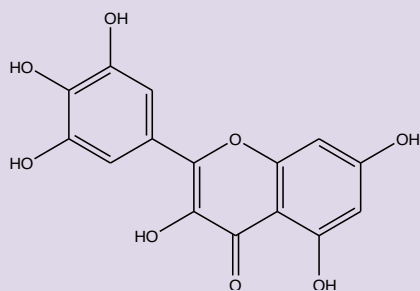


16. Isorhamnetin

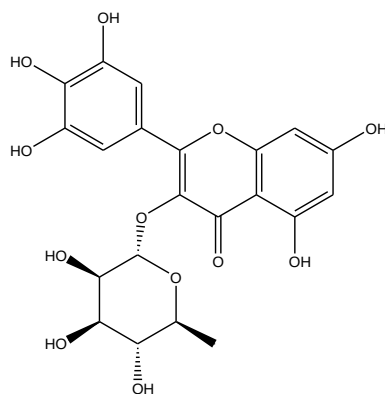


17. Isoquercitrin**18. Kaempferide****19. Kaempferol****20. Luteolin****21. Morin**

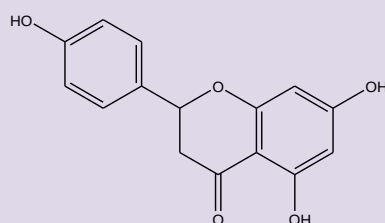
22. Myricetin



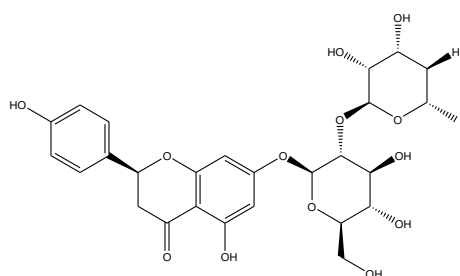
23. Myricitrin



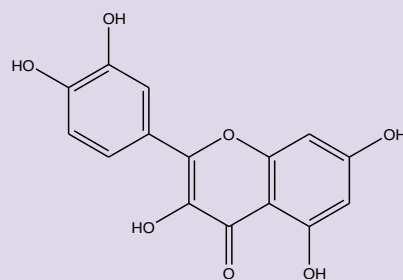
24. Naringenin

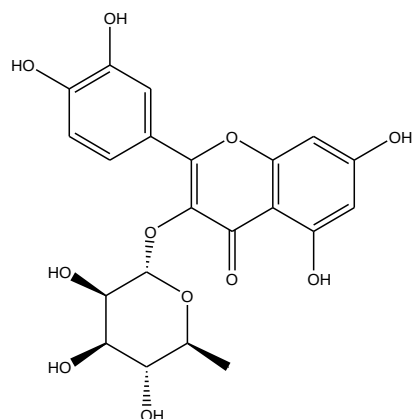
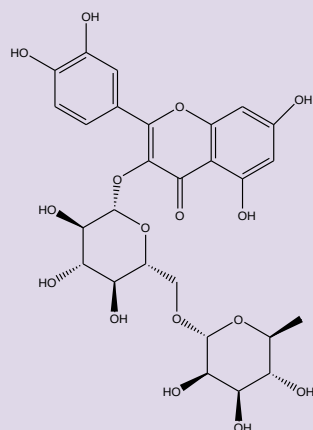
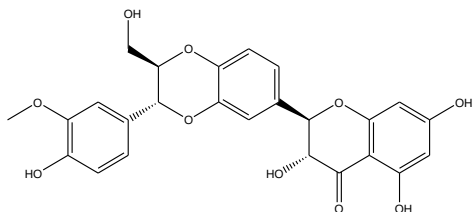
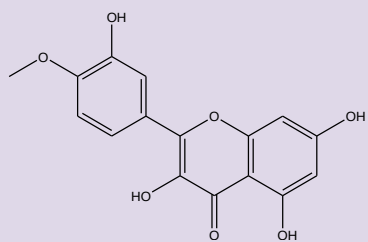
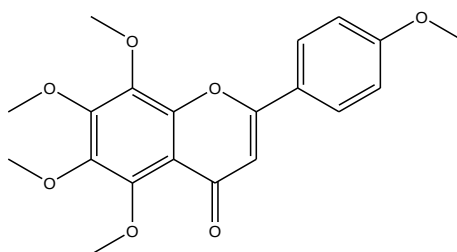


25. Naringin

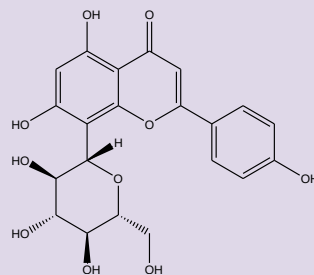


26. Quercetin

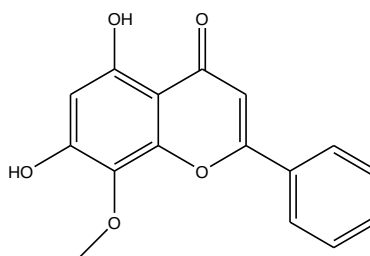


27. Quercitrin**28. Rutin****29. Sylibin****30. Tamarixetin****31. Tangeretin**

32. Vitexin



33. Wogonin



Όλα τα флаβονοειδή που μελετήθηκαν, με εξαίρεση την baicalin, είναι ουδέτερες ενώσεις ή ασθενή οξέα με βαθμό ιονισμού μικρότερο ή ισοδύναμο του 31% σε pH 7,4.

Για τη μελέτη του χρόνου ανάσχεσης κάθε флаβονοειδούς παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αυτών. Συγκεκριμένα, οι υψηλής καθαρότητας ουσίες αραιώθηκαν σε καθαρή μεθανόλη. Τα μεθανολικά διαλύματα αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια τύπου Errendorf και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη για την περαιτέρω χρήση τους. Επίσης, τα флаβονοειδή παρουσιάζουν τη μέγιστη απορρόφηση στα 254nm, οπότε αυτό ήταν και το επιλεγμένο μήκος κύματος στον ανιχνευτή.

4.2 Μεθοδολογία

4.2.1 Αντιδραστήρια

Τα флаβονοειδή προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Alfa Aesar- Thermo Fisher Scientific (Germany), Extrasynthese (France) and Cayman Chemical Company (Michigan, USA) και ήταν καθαρότητας τουλάχιστον 95%. Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC gradient, Macron). Για την προετοιμασία των κινητών φάσεων

χρησιμοποιήθηκε μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ (MOPS $\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich), οκτανόλη ($\geq 99\%$ Alfa Aesar), και υδατικά διαλύματα υδροχλωρικού οξέος (30% Merck) και καυστικού νατρίου (Sodium hydroxide solution, Fluka). Το νερό ήταν καθαρότητας HPLC μέσω του συστήματος παραγωγής νερού EASYpure II (Barnstead International, USA). Για τη λήψη του νεκρού χρόνου χρησιμοποιήθηκε μεθανολικό διάλυμα κιτρικού νατρίου (Sodium citrate, Mallinckrodt).

4.2.2 Οργανολογία

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων πέρα από το σύστημα Υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε σύζευξη με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (Knauer K-1001 HPLC αντλία, K-1500 degasser and solvent organizer και Knauer K-2501 ανιχνευτή UV-Vis) χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικός ζυγός, μαγνητικός αναδευτήρας και pHμετρική συσκευή.

4.2.3 Προγράμματα και Βάσεις Δεδομένων

Για τη διαχείριση της χρωματογραφικής διαδικασίας και την εμφάνιση των χρωματογραφικών δεδομένων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Eurochrom 2000 Version 2.05.

Για τις προβλεπόμενες τιμές του $\log P$ (συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης – νερού) των εξεταζόμενων φλαβονοειδών όσο και για το μοριακό τους βάρος (MW), την πολική τους επιφάνεια επαφής (TPSA), τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου τους ως δότη (HBD) και ως δέκτη (HBA) αλλά και για τις τιμές Abraham (οξύτητα (A) και βασικότητα (B) των δεσμών υδρογόνου) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ADME Boxes v. 3.0 (Pharma Algorithms).

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Statistica – Axa 7.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA) και του Microsoft Excel 2007.

4.2.4 Πειραματικό Πρωτόκολλο

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα μεθανόλης και ρυθμιστικού διαλύματος MOPS σε pH 7,4 κορεσμένο σε οκτανόλη σε διάφορες αναλογίες (ποσοστό μεθανόλης 35-65% με βήμα 5%). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη Discovery RP Amide C16 10 cm x 3 mm, 5 μ m.

➤ Παρασκευή νερού κορεσμένου σε οκτανόλη

Ποσότητα υπερκάθαρου νερού προστίθεται σε μια διαχωριστική χοάνη, προσθέτουμε επίσης μικρή ποσότητα οκτανόλης, έως ότου δημιουργηθούν σταγονίδια στην επιφάνεια του νερού (κορεσμός διαλύματος) και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται να ηρεμήσει για μία ημέρα, ώστε να είναι ξεκάθαρος ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (νερού κορεσμένου σε οκτανόλη και οκτανόλης). Η οκτανόλη λόγω της μη υδατοδιαλυτής της φύσης επικάθεται στην επιφάνεια του νερού. Παρόλα αυτά μέρος της οκτανόλης εισέρχεται στα μόρια του νερού. Όταν τα μόρια της οκτανόλης έχουν δεσμεύσει κάθε μόριο του νερού επέρχεται ο κορεσμός του νερού από την οκτανόλη. Στο σημείο αυτό δημιουργούνται σταγονίδια οκτανόλης, τα οποία λόγω της πυκνότητάς τους επικάθονται στην επιφάνεια του διαλύματος. Γίνεται απομόνωση της υδατικής φάσης ώστε να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία του ρυθμιστικού διαλύματος.

➤ Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

Ζυγίζεται τόση ποσότητα MOPS έτσι ώστε η συγκέντρωση του στον όγκο της τελικής κινητής φάσης να είναι 0,02 M ($m = C \times V \times Mr$). Η ζυγισμένη αυτή ποσότητα προστίθεται σε κατάλληλο όγκο νερού κορεσμένου σε οκτανόλη που έχει τοποθετηθεί σε ποτήρι ζέσεως. Η ανάμιξη των ουσιών γίνεται με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος προστίθενται σταγόνες καυστικού νατρίου (NaOH), έτσι ώστε να γίνεται ελεγχόμενη αύξηση του pH, μέχρι η τιμή του να φτάσει στο 7,4. Η παρακολούθηση του pH γίνεται με πεχάμετρο.

➤ Παρασκευή κινητής φάσης

Ανάλογα με την επιθυμητή αναλογία της κινητής φάσης, αναμιγνύονται κάθε φορά κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος και μεθανόλης. Για παράδειγμα, η κινητή φάση αναλογίας 50:50 και τελικού όγκου 500 mL, θα περιέχει 250 mL μεθανόλης και 250 mL ρυθμιστικού διαλύματος.

Προτού ξεκινήσει η χρωματογραφική διαδικασία, γίνονται οι κατάλληλες ρυθμίσεις (μέσω του προγράμματος Eurochrom) έτσι ώστε η ροή της κινητής φάσης να είναι ίση με 1 mL/ min και το μήκος κύματος του ανιχνευτή να είναι στα 254 nm.

Για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης αφήνεται το χρωματογραφικό σύστημα να λειτουργήσει για τουλάχιστον 30 min με την προεπιλεγμένη ροή κινητής φάσης. Στη συνέχεια ενίεται χωριστά το διάλυμα της κάθε ουσίας σε μεθανόλη και μετράται ο χρόνος ανάσχεσης αυτής (t_r), που αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή. Κατά την έναρξη, την διάρκεια και την λήξη των μετρήσεων των φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκαν κάθε φορά μετρήσεις του νεκρού χρόνου για το σύστημα. Για τον προσδιορισμό του νεκρού χρόνου t_0 χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος συγκράτησης του κιτρικού νάτριου. Κάθε πείραμα, τόσο για τα φλαβονοειδή όσο και για τον νεκρό χρόνο, επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις διπλούν. Λήφθηκε ο μέσος όρος των χρόνων και υπολογίστηκε ο παράγοντας χωρητικότητας (k') σύμφωνα με τη σχέση του θεωρητικού μέρους:

$$\log k' = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad 4.1$$

Ακολουθώς, όταν αλλάζει η σύσταση της κινητής φάσης ή όταν τίθεται εκ νέου σε λειτουργία το χρωματογραφικό σύστημα επαναλαμβάνεται η διαδικασία της εξισορρόπησης της στήλης πριν την ένεση των δειγμάτων. Τα δείγματα, όπως έχει προαναφερθεί, φυλάσσονται στην κατάψυξη.

4.2.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών $\log k_w$

Για την εξαγωγή των δεικτών λιποφιλίας οι δείκτες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι οι ισοκρατικές τιμές $\log k$ και οι ανηγμένες τιμές $\log k_w$. Οι τελευταίες αντιστοιχούν σε κινητή φάση χωρίς οργανικό τροποποιητή και εξάγονται χρησιμοποιώντας το γραμμικό τμήμα της παρακάτω εξίσωσης με χρήση γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης με βάση τη σχέση:

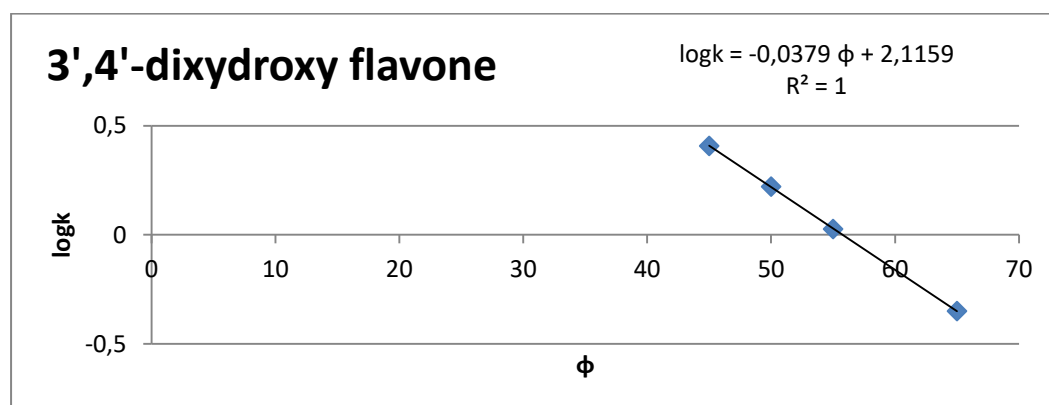
$$\log k' = -S\varphi + \log k_w \quad 4.2$$

όπου $\log k_w$ η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας που αντιστοιχεί σε κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα και S η κλίση της ευθείας.

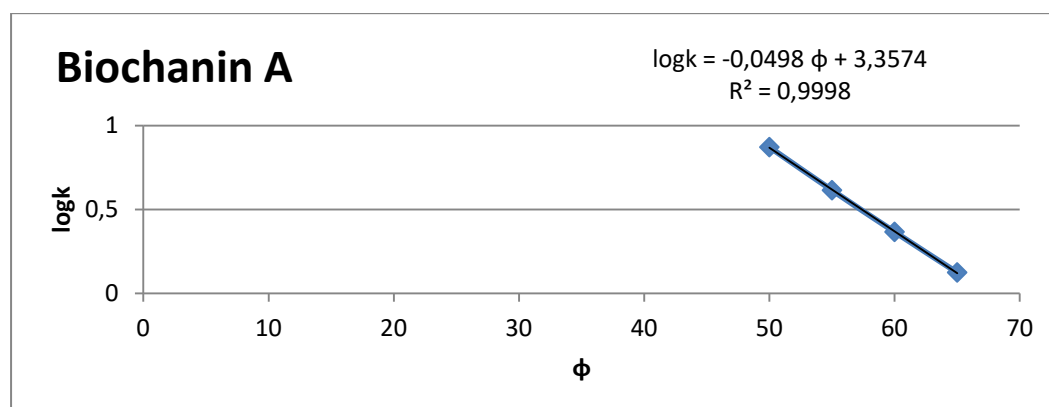
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

5.1 Γραφήματα $\log k/\phi$ και εξαγωγή τιμών $\log k_w$

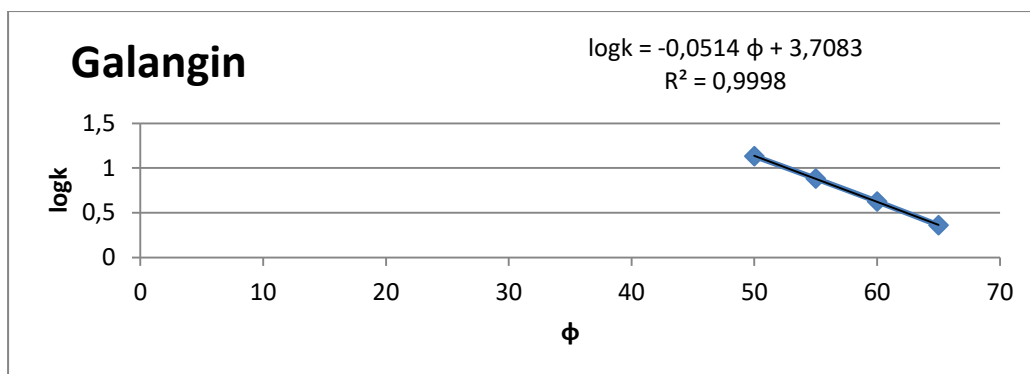
Τουλάχιστον τρία διαφορετικά ποσοστά μεθανόλης χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του γραμμικού τμήματος της σχέσης $\log k/\phi$. Όλοι οι δείκτες $\log k_w$ συνοδεύτηκαν από υψηλούς συντελεστές συσχέτισης. Ακολουθούν κάποια ενδεικτικά γραφήματα ($\log k/\phi$) των ουσιών που αναλύθηκαν :



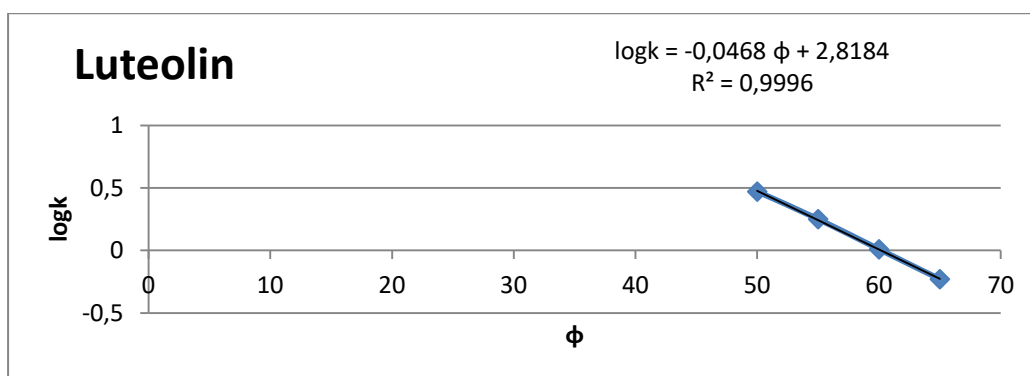
Σχήμα 5.1: Διάγραμμα $\log k/\phi$, όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης και ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για την ουσία 3',4'-dihydroxy flavone.



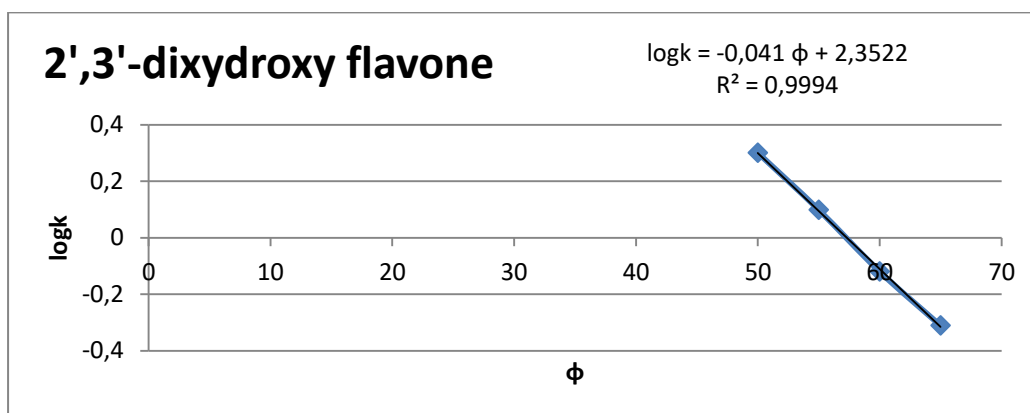
Σχήμα 5.2: Διάγραμμα $\log k/\phi$, όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης και ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για την ουσία biochanin A.



Σχήμα 5.3: Διάγραμμα $\log k/\phi$, όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης και ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για την ουσία galangin.



Σχήμα 5.4: Διάγραμμα $\log k/\phi$, όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης και ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για την ουσία luteolin.



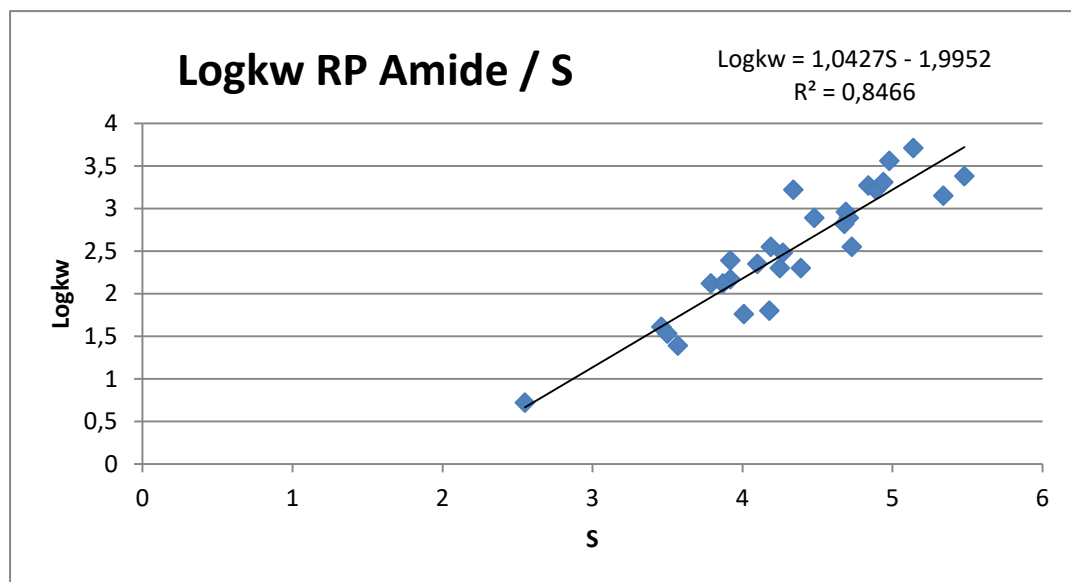
Σχήμα 5.5: Διάγραμμα $\log k/\phi$, όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης και ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή για την ουσία 2',3'-dihydroxy flavone.

Οι ανηγμένες τιμές $\log k_w$ σε pH 7,4, προσδιορίστηκαν μέσω κινητών φάσεων με διαφορετικά ποσοστά μεθανόλης η κάθε μία, χρησιμοποιώντας το γραμμικό τμήμα της σχέσης $\log k/\phi$ και παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα μαζί με τις αντίστοιχες κλίσεις S και τις τυπικές αποκλίσεις τους.

Φλαβονοειδή	$\log k_w$	Slope x (-100)
Baicalein	2,48 ($\pm 0,11$)	4,27 ($\pm 0,19$)
Baicalin	1,23 ($\pm 0,02$)	3,92 ($\pm 0,05$)
Biochanin	3,36 ($\pm 0,03$)	4,98 ($\pm 0,05$)
Chrysin	3,27 ($\pm 0,08$)	4,84 ($\pm 0,14$)
3',4'-dixydroxy flavone	2,12 ($\pm 0,01$)	3,79 ($\pm 0,02$)
2',3'-dixydroxy flavone	2,35 ($\pm 0,04$)	4,10 ($\pm 0,07$)
Daidzein	2,17 ($\pm 0,11$)	3,92 ($\pm 0,22$)
Daidzin	1,33 ($\pm 0,09$)	4,43 ($\pm 0,17$)
Eriodictyol	1,61 ($\pm 0,14$)	3,46 ($\pm 0,25$)
Formonentin	2,55 ($\pm 0,04$)	4,19 ($\pm 0,07$)
Galangin	3,71 ($\pm 0,03$)	5,14 ($\pm 0,05$)
Genistein	2,89 ($\pm 0,11$)	4,71 ($\pm 0,19$)
Genistin	1,60 ($\pm 0,17$)	4,16 ($\pm 0,41$)
Hesperetin	2,30 ($\pm 0,16$)	4,39 ($\pm 0,29$)
Isoliquiritigenin	3,22 ($\pm 0,04$)	4,89 ($\pm 0,06$)
Isorhamnetin	2,89 ($\pm 0,12$)	4,48 ($\pm 0,20$)
Isoquercitrin	1,76 ($\pm 0,18$)	4,01 ($\pm 0,29$)
Kaempferide	3,22 ($\pm 0,22$)	4,34 ($\pm 0,37$)
Kaempferol	3,31 ($\pm 0,06$)	4,94 ($\pm 0,11$)
Luteolin	2,82 ($\pm 0,04$)	4,68 ($\pm 0,07$)
Morin	1,39 ($\pm 0,10$)	3,57 ($\pm 0,26$)
Myricetin	2,30 ($\pm 0,06$)	4,25 (0,11)

Myricitrin	1,53 ($\pm 0,01$)	3,50 ($\pm 0,03$)
Narignenin	2,12 ($\pm 0,12$)	3,87 ($\pm 0,21$)
Naringin	1,80 ($\pm 0,19$)	4,88 ($\pm 0,47$)
Quercetin	3,15 ($\pm 0,26$)	5,34 ($\pm 0,47$)
Quercitrin	2,24 ($\pm 0,05$)	4,81 ($\pm 0,08$)
Rutin	1,80 ($\pm 0,14$)	4,18 ($\pm 0,34$)
Sylibin	2,55 ($\pm 0,12$)	4,73 ($\pm 0,29$)
Tamarixetin	2,96 ($\pm 0,11$)	4,69 ($\pm 0,18$)
Tangeretin	3,38 ($\pm 0,13$)	5,48 ($\pm 0,23$)
Vitexin	0,72 ($\pm 0,08$)	2,55 ($\pm 0,19$)
Wogonin	2,39 ($\pm 0,04$)	3,92 ($\pm 0,08$)

Πίνακας 5.1: Ανηγγμένες τιμές $\log k_w$ για pH 7,4 μαζί με τις αντίστοιχες κλίσεις S και τις τυπικές αποκλίσεις τους.



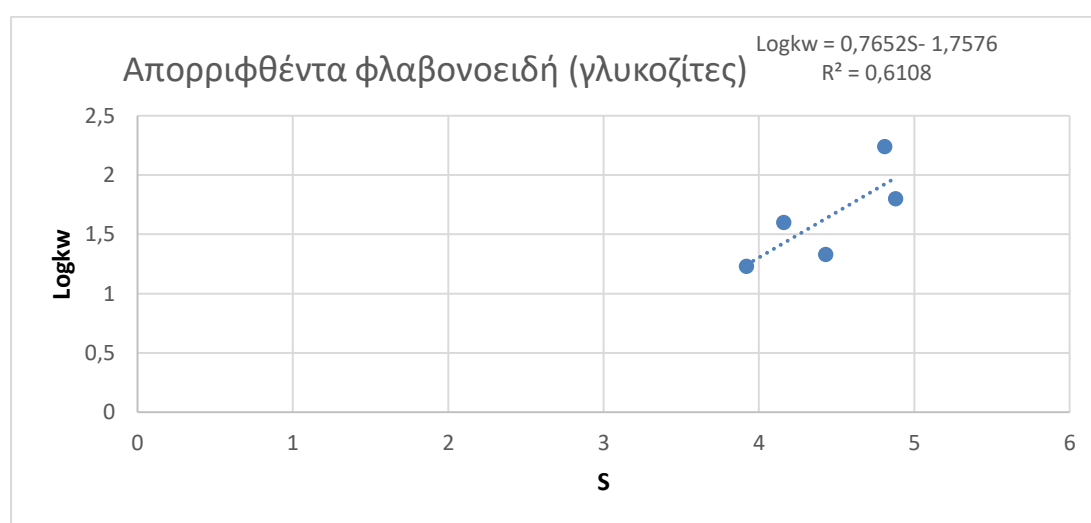
Σχήμα 5.6: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών $\log k_w$ με τις αντίστοιχες τιμές της κλίσης S για τα φλαβονοειδή που αναλύθηκαν.

Είναι ευρέως γνωστό ότι στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως οι κλίσεις, που χρησιμοποιούνται στη μορφή $S = 100 \times \text{Slope}$, συσχετίζονται με τις τιμές $\log k_w$, υπό την προϋπόθεση ότι ο μηχανισμός έκλουσης είναι κοινός για όλους τους αναλύτες. Στην παρούσα μελέτη συσχετίζοντας τις τιμές $\log k_w$ ως συνάρτηση της κλίσης S των εξεταζόμενων φλαβονοειδών, λήφθηκε ισχυρή γραμμική συσχέτιση. Έγινε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ των τιμών $\log k_w$ κι της κλίσης S και προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση :

$$\text{Log}k_w = 1,04(\pm 0,09)S - 2,00(\pm 0,38) \quad 5.1$$

$$(n = 28, R = 0,9205, R^2 = 0,8472, SE = 0,29)$$

Από την παραπάνω γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης εξαιρέθηκαν τα φλαβονοειδή baicalin, daidzin, genistin, naringin και quercitrin, διότι παρουσίαζαν μεγάλη απόκλιση. Η μόνη εμφανής ομοιότητα μεταξύ τους ήταν ότι πρόκειται για γλυκοζίτες, όμως το στοιχείο αυτό δεν επαρκεί καθώς στην παραπάνω εξίσωση παλινδρόμησης συμπεριελήφθησαν δύο γλυκοζίτες, όπως η rutin και η vitexin, που δεν παρουσιάζουν απόκλιση. Από τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης που έγινε για τα συγκεκριμένα φλαβονοειδή, δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια συσχέτιση. Ωστόσο, δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο συμπέρασμα καθώς είναι λίγοι σε αριθμό και έχουν μικρό εύρος τιμών $\log k_w$.



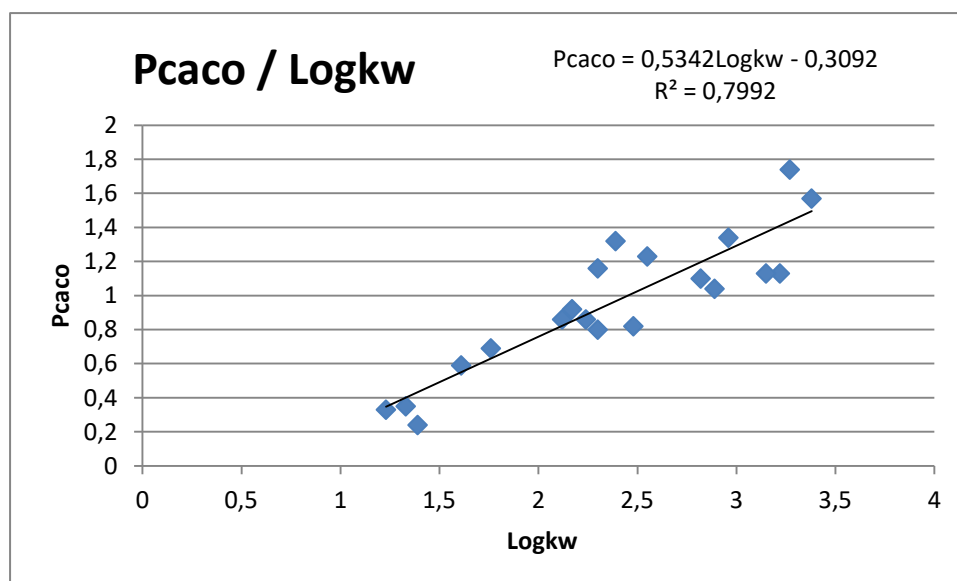
Σχήμα 5.7 : Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών $\text{Log}k_w$ και S για τα φλαβονοειδή που απορρίφθηκαν από την γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

5.2 Συσχέτιση με την Caco-2 εντερική διαπερατότητα

Για τη συσχέτιση που ακολουθεί, τα δεδομένα εντερικής διαπερατότητας για τα 20 φλαβονοειδή που συμμετέχουν σε αυτή συλλέχθηκαν από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ένα ερευνητικό εργαστήριο [120]. Για μερικά φλαβονοειδή υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα από άλλα διαφορετικά ερευνητικά εργαστήρια. Τα δεδομένα αυτά δεν κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν, γιατί το πειραματικό πρωτόκολλο προσδιορισμού του συντελεστή διαπερατότητας παρουσιάζει σχετικά χαμηλή διεργαστηριακή επαναληψιμότητα. Πραγματοποιήθηκε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας (P_{caco}) για τα κύτταρα Caco-2 και του $\log k_w$. Η εξίσωση που προέκυψε είναι η εξής :

$$P_{\text{caco}} = 0,53(\pm 0,06)\text{Log}k_w - 0,31(\pm 0,016) \quad 5.2$$

$$(n = 20, R = 0,8940, R^2 = 0,7992, SE = 0,18)$$



Σχήμα 5.8 : Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας P_{caco} και του $\text{Log}k_w$.

Ως σχετικές ιδιότητες, ο αριθμός δεσμών υδρογόνου ως δότη (HBD) και ως δέκτη (HBA), η συνολική πολική επιφάνεια επαφής (TPSA), ο συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού ($\log P$), το μοριακό βάρος (MW), καθώς επίσης η παράμετρος βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου και οι

παράγοντες S (διπολικότητα / πολικότητα), E (πλεονάζουσα μοριακή διαθλασιμότητα, εκφράζει στερικές ιδιότητες και αποτελεί μέτρο των δυνάμεων συνοχής Van der Waals) και V (χαρακτηριστικός όγκος McGowan, μοριακός όγκος) από την γενική εξίσωση Abraham, εξετάστηκαν ως προς τη συσχέτιση τους με την παραπάνω εξίσωση. Για τον υπολογισμό φυσικοχημικών ιδιοτήτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **ADME Boxes v.3.0** (Advanced Pharma Algorithms, Inc., Toronto, Canada). Η εισαγωγή των δομών πραγματοποιήθηκε είτε σχεδιαστικά, είτε με την κωδικοποίηση SMILES. Οι τιμές των ιδιοτήτων αυτών για κάθε ένα από τα φλαβονοειδή που εξετάστηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 5.3.

Ύστερα από Πολλαπλή Ανάλυση Παλινδρόμησης, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στην εξίσωση μεταξύ $P_{caco} - \log k_w$, βρέθηκε πως υπάρχει σημαντική βελτίωση της προσαρμογής των δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο εάν ληφθούν υπόψιν και οι παράγοντες S και V. Συγκεκριμένα, η εξίσωση διαμορφώθηκε ως εξής :

$$P_{caco} = 0,50(\pm 0,06)\log k_w + 0,77(\pm 0,25)V - 0,67(\pm 0,20)S - 0,16(\pm 0,28) \quad 5.3\alpha$$

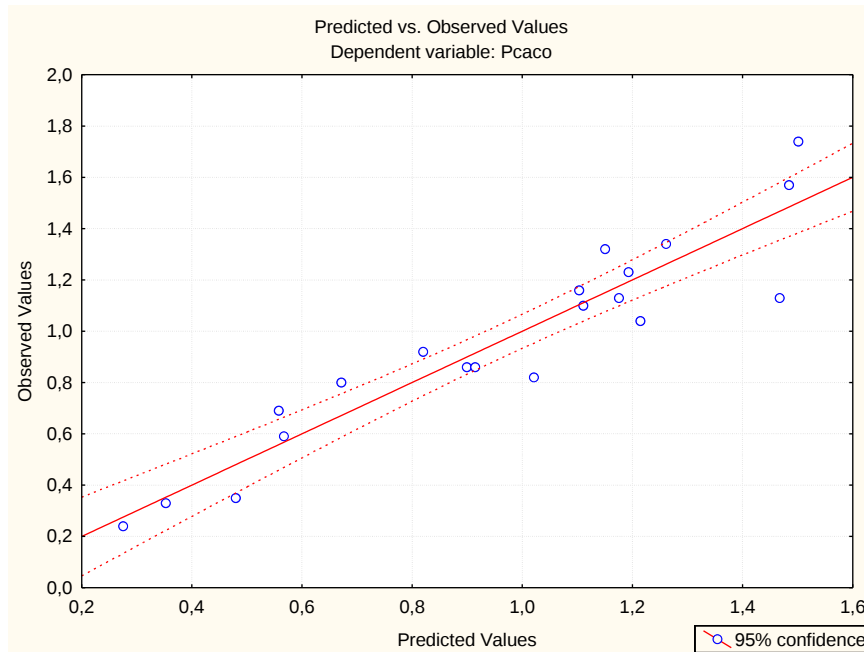
$$(n = 20, R = 0,9387, R^2 = 0,8812, SE = 0,15)$$

Επίσης, βρέθηκε όπως υπάρχει σημαντική βελτίωση της προσαρμογής των δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο εάν ληφθεί υπόψιν ο παράγοντας A. Η βελτίωση, ωστόσο, αυτή ήταν μικρότερη από αυτήν που προέκυψε με την εισαγωγή των όρων S και V. Συγκεκριμένα, η εξίσωση διαμορφώθηκε ως εξής :

$$P_{caco} = 0,46(\pm 0,06)\log k_w - 0,16(\pm 0,07)A + 0,10(\pm 0,22) \quad 5.3\beta$$

$$(n = 20, R = 0,9230, R^2 = 0,8520, SE = 0,16)$$

Η εξίσωση 5.3α θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του συντελεστή διαπερατότητας φλαβονοειδών για τα οποία δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα. Μια πρώτη εκτίμηση μέσω της εξίσωσης 5.3α θεωρείται αξιόπιστη κάτι που αποτυπώνεται και στο γράφημα μεταξύ των πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας.



Σχήμα 5.9 : Συσχέτιση πειραματικών και αντίστοιχων προβλεπόμενων τιμών του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας.

Στον Πίνακα 5.2 Αναφέρονται οι πειραματικές τιμές του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας, καθώς και οι αντίστοιχες προβλεπόμενες τιμές έτσι όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση 5.3α. Η διαφορά μεταξύ πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών Pcaco (residuals) κυμαίνεται κατά απόλυτη τιμή από 0,01 έως 0,33, η οποία είναι ικανοποιητική.

Observed Pcaco	Predicted Pcaco	Residuals
0,820000	1,021172	-0,201172
0,330000	0,352772	-0,022772
1,740000	1,500997	0,239003
0,920000	0,819951	0,100049
0,350000	0,479558	-0,129557
0,590000	0,567381	0,022619
1,230000	1,192890	0,037110
1,040000	1,214413	-0,174413
1,160000	1,103193	0,056807
0,690000	0,557691	0,132309
1,130000	1,467046	-0,337046
1,100000	1,110721	-0,010721
0,240000	0,275053	-0,035053
0,800000	0,671829	0,128171
0,860000	0,899449	-0,039449
1,130000	1,175213	-0,045213
0,860000	0,914681	-0,054681
1,340000	1,260945	0,079055
1,570000	1,484430	0,085570
1,320000	1,150618	0,169382
0,240000	0,275053	-0,337046
1,740000	1,500997	0,239003
0,961000	0,961000	0,000000
0,980000	1,062182	0,005949

Πίνακας 5.2 : Πειραματικές και προβλεπόμενες τιμές του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας και οι διαφορές αυτών.

Σύγκριση της στήλης RP Amide με τις στήλες IAM.PC.MG και IAM.PC.DD

Στον Πίνακα 5.4 συνοψίζονται οι τιμές του $\text{Log}k_w$ της στήλης RP Amide σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε, και των στηλών IAM.PC.MG και IAM.PC.DD όπως βρέθηκαν από τους Tsopelas et al. [121].

Πραγματοποιήθηκε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τις τιμές από τις στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών μεταξύ P_{caco} – $\text{Log}k_w$ με τα εξής αποτελέσματα:

- $P_{\text{caco}} = 0,52(\pm 0,15)\log k_{\text{wIAM.PC.DD}} - 0,38(\pm 0,39)$ 5.4

(n = 20, R = 0,6334, $R^2 = 0,4012$, SE = 0,32)

- $P_{\text{caco}} = 0,53(\pm 0,14)\log k_{\text{wIAM.PC.MG}} - 0,19(\pm 0,31)$ 5.5

(n = 20, R = 0,6645, $R^2 = 0,4415$, SE = 0,31)

Συγκρίνοντας τις εξισώσεις 5.4 και 5.5 με την 5.2 παρατηρούμε πως τα αποτελέσματα από την χρήση της στήλης RP Amide προσαρμόζονται καλύτερα στο γραμμικό μοντέλο ($R^2 = 0,7992$) σε σχέση με τα αντίστοιχα των ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών ($R^2 = 0,4012$ για την IAM.PC.DD και $R^2 = 0,4415$ για την IAM.PC.MG), όσον αφορά στα 20 φλαβονοειδή των οποίων οι τιμές P_{caco} ήταν βιβλιογραφικά διαθέσιμες.

Ακολούθησε πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ $P_{\text{caco}} - \log k_{\text{w}}$ και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του Πίνακα 5.3 για τις στήλες IAM.PC.DD και IAM.PC.MG. Ωστόσο, δεν βρέθηκε κάποια εξίσωση, για καμία από τις δυο στήλες, στην οποία κάποια από τις φυσικοχημικές ιδιότητες να είναι στατιστικά σημαντικές και ταυτόχρονα να βελτιώνουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της για την ομάδα εργασίας (n=20) των φλαβονοειδών που μελετήσαμε.

Flavonoid	MW ^a	TPSA ^a	HBD ^a	HBA ^a	HBT ^b	A ^a	B ^a	AB ^c	nOH	AlOH	PhOH	S	E	V	logP
Baicalein	270,24	86,99	3	5	8	1,02	0,99	2,01	3	0	3	2,23	2,24	1,8458	3,04 ^a
Baicalin	446,36	183,21	6	11	17	1,65	2,52	4,17	5	3	2	3,49	3,17	2,8918	0,62 ^a
Biochanin A	284,26	75,99	2	5	7	0,80	1,14	1,94	2	0	2	2,13	2,20	1,9867	3,07 ^a
Chrysin	254,24	66,76	2	4	6	0,80	0,92	1,72	2	0	2	2,04	2,13	1,7871	3,52 ^b
3,4- Dihydroxyflavone	254,24	66,76	2	4	6	0,77	1,20	1,97	2	0	2	2,21	2,15	1,7871	2,64 ^a
2,3- Dihydroxyflavone	254,24	66,76	2	4	6	0,77	1,20	1,97	2	1	1	2,21	2,15	1,7871	2,87 ^a
Daidzein	254,24	66,76	2	4	6	1,16	1,27	2,43	2	0	2	2,23	2,21	1,7871	2,91 ^b
Daidzin	416,38	145,91	5	9	14	1,49	2,80	4,29	4	3	1	3,29	3,19	2,8174	0,44 ^a
Eriodictyol	288,25	107,22	4	6	10	1,57	1,29	2,86	4	0	4	2,37	2,38	1,9475	2,02 ^b
Formononetin	268,26	55,76	1	4	5	0,66	1,21	1,87	1	0	1	2,12	2,04	1,9280	2,58 ^b
Galangin	270,24	86,99	3	5	8	1,11	1,21	2,32	3	1	2	2,25	2,31	1,8458	2,85 ^a
Genistein	270,24	86,99	3	5	8	1,30	1,20	2,50	3	0	3	2,25	2,36	1,8458	2,57 ^a

Genistin	432,38	166,14	6	10	16	1,63	2,73	4,36	5	3	2	3,31	3,34	2,8761	0,45 ^a
Hesperetin	302,28	96,22	3	6	9	1,07	1,23	2,30	3	0	3	2,25	2,22	2,0884	2,60 ^b
Isoliquiritigenin	256,25	77,76	3	4	7	1,30	1,02	2,32	3	0	3	2,13	2,11	1,8957	2,96 ^a
Isorhamnetin	316,26	116,45	4	7	11	1,38	1,57	2,95	4	1	3	2,53	2,52	2,1041	2,16 ^a
Isoquercitrin	464,38	206,60	8	12	20	2,57	3,16	5,73	7	3	4	3,70	3,67	2,9935	-0,46 ^a
Kaempferide	300,26	96,22	3	6	9	1,11	1,43	2,54	3	1	2	2,35	2,38	2,0454	2,82 ^a
Kaempferol	286,24	107,22	4	6	10	1,61	1,49	3,10	4	1	3	2,46	2,54	1,9045	2,45 ^a
Luteolin	286,24	107,22	4	6	10	1,57	1,34	2,91	4	0	4	2,42	2,50	1,9045	2,53 ^b
Morin	302,24	127,45	5	7	12	2,11	1,71	3,82	5	1	4	2,66	2,75	1,9632	1,54 ^b
Myricetin	318,23	147,68	6	8	14	2,27	1,78	4,05	6	1	5	2,82	2,85	2,0219	1,63 ^a
Myricitrin	464,38	206,60	8	12	20	2,68	2,99	5,67	8	3	5	3,64	3,61	2,9935	0,12 ^a
Naringenin	272,25	86,99	3	5	8	1,30	1,14	2,44	3	0	3	2,19	2,23	1,8888	2,52 ^b
Naringin	580,53	225,06	8	14	22	2,10	3,86	5,96	7	5	2	4,09	3,97	3,8907	-0,44 ^b
Quercetin	302,24	127,45	5	7	12	1,88	1,63	3,51	5	1	4	2,64	2,68	1,9632	2,06 ^b

Quercitrin	448,38	186,37	7	11	18	2,30	2,84	5,14	7	3	4	3,46	3,45	2,9348	0,43 ^a
Rutin	610,52	265,52	10	16	26	3,02	4,32	7,34	10	6	4	4,55	4,41	3,9651	-0,86 ^a
Sylibin	482,44	155,14	5	10	15	1,39	2,58	3,97	5	2	3	3,57	3,57	3,2451	2,06 ^a
Tamarixetin	316,26	116,45	4	7	11	1,38	1,57	2,95	4	1	3	2,53	2,52	2,1041	2,18 ^a
Tangeretin	372,37	72,45	0	7	7	0,00	1,75	1,75	0	0	0	3,16	2,06	2,6677	2,87 ^a
Vitexin	432,38	177,14	7	10	17	2,31	2,76	5,07	6	3	3	3,38	3,52	2,8761	-0,09 ^a
Wogonin	284,26	75,99	2	5	7	0,57	0,99	1,56	2	0	2	2,13	2,11	1,9867	2,80 ^a

Πίνακας 5.3 : Φυσικοχημικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, όπως προκύπτουν από το πρόγραμμα ADME Boxes v.3.0.

a : Υπολογιστικές τιμές από το λογισμικό ADME Boxes v.3.0

b : Πειραματικές τιμές της βάσης δεδομένων του λογισμικού ADME Boxes v.3.0

Flavonoids	Pcaco	RP Amide	IAM.PC.DD	IAM.PC.MG
Baicalein	0,82	2,48	2,65	1,94
Baicalin	0,33	1,23	1,68	1,29
Chrysin	1,74	3,27	3,01	2,53
Daidzein	0,92	2,17	3,1	2,56
Daidzin	0,35	1,33	1,94	1,42
Eriodictyol	0,59	1,61	3,02	2,2
Formononentin	1,23	2,55	2,39	2,04
Genistein	1,04	2,89	2,87	2,18
Hesperetin	1,16	2,3	3,17	2,92
Isoquercitrin	0,69	1,76	1,94	1,54
Kaempferide	1,13	3,22	2,81	2,53
Luteolin	1,1	2,82	3,09	2,22
Morin	0,24	1,39	1,96	1,75
Myricetin	0,8	2,3	1,84	1,98
Naringenin	0,86	2,12	2,98	2,97
Quercetin	1,13	3,15	2,45	2,21
Quercitrin	0,86	2,24	2,33	1,55
Tamarixetin	1,34	2,96	2,52	2,03
Tangeretin	1,57	3,38	3,01	2,87
Wogonin	1,32	2,39	2,83	2,62

Πίνακας 5.4 : Τιμές P_{caco} και $Logk_w$ για τις στήλες RP Amide, IAM.PC.DD και IAM.PC.MG για τα 20 φλαβονοειδή.

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι χρωματογραφικοί δείκτες $\log k_w$ 33 φλαβονοειδών με την χρήση αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο σε οκτανόλη ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 7,4 ως υδατική συνιστώσα και μεθανόλη ως οργανικός τροποποιητής. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Discovery RP Amide C16. Διαπιστώθηκε παρόμοιος μηχανισμός έκλουσης για το σύνολο των φλαβονοειδών, εξαιρουμένων των γλυκοζιτών τους. Καταγράφηκε ικανοποιητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας για 20 φλαβονοειδή για τα οποία υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα. Η συσχέτιση που καταγράφηκε ήταν καλύτερη από τις αντίστοιχες συσχετίσεις με την χρήση στηλών ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών για την ομάδα εργασίας των 20 φλαβονοειδών. Με την εισαγωγή των όρων S και V βελτιώθηκε σημαντικά η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας. Επίσης, η εισαγωγή του όρου A βελτίωσε την εν λόγω συσχέτιση σε μικρότερο ωστόσο βαθμό συγκριτικά με την εισαγωγή των όρων S και V . Η εξίσωση που προέκυψε μεταξύ του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας και των παραμέτρων $\log k_w$, S , και V θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας φλαβονοειδών για τα οποία δεν υπάρχουν πειραματικές τιμές στην βιβλιογραφία.

Βιβλιογραφία

1. Middleton, E., Jr., *Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function*. Adv Exp Med Biol, 1998. **439**: p. 175-82.
2. Havsteen, B.H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. Pharmacol Ther, 2002. **96**(2-3): p. 67-202.
3. Dewick, P., *The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids*. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach, 2001: p. 137-186.
4. Griesbach, R., *Biochemistry and genetics of flower color*. Plant Breed Reviews, 2005. **25**: p. 89-114.
5. Ohnishi, A.T.T., *The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the international space station*. Biol Sci Space, 2004. **18**: p. 255-260.
6. A Samanta, D.G.D.S., *Roles of flavonoids in plants*. Pharm Sci Tech, 2011. **6**: p. 12-35.
7. Panche, A.N., A.D. Diwan, and S.R. Chandra, *Flavonoids: an overview*. J Nutr Sci, 2016. **5**: p. e47.
8. Burak M, I.Y., *Flavonoids and their antioxidant properties*. Turkiye Klin Tip Bil Derg, 1999. **19**(296-304).
9. Dixon, R.A. and G.M. Pasinetti, *Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience*. Plant Physiol, 2010. **154**(2): p. 453-7.
10. Kumar, S. and A.K. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 162750.
11. Panche A, C.S., Diwan A, et al., *Alzheimer's and current therapeutics: a review*. Asian J Pharm Clin Res, 2015. **8**(14-19).
12. C.A Rice-Evans, M.N.J., Paganga G, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med., 1996. **20**: p. 933-956.
13. Cholbi M.R, P.M., Alcaraz M.J, *Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation*. Experientia, 1991. **47**: p. 195-199.
14. Cook N.C, S.S., *Flavonoids-chemistry metabolism cardioprotective effects and dietary sources*. Journal Nutr. Biochem, 1996. **7**: p. 66-76.
15. Iriti, M., *Introduction to Polyphenols, Plant Chemicals for Human Health*. Mini Rev. Med. Chem, 2011. **11**: p. 1183-1185.
16. Robak, J., *Flavonoids as drugs inhibiting aggregation of blood platelets*. Farm. Polska, 1993. **49**: p. 1-4.

17. Middleton, E., *The flavonoids*. Trends in Pharmacological Sciences, 1984. **5**: p. 335-338.
18. Matthies, A., et al., *Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(15): p. 4847-52.
19. M Garazd, Y.G., V Khilya *Neoflavones. 1. Natural distribution and spectral and biological properties*. Chem Nat Comp, 2003. **39**: p. 54-121.
20. Panche N, D.A.D.a.C.S.R., *Flavonoids: an overview*.
21. Iwashina, T., *Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales (Review)*. Bull Natl Mus Nat Sci, 2013. **39**: p. 25-51.
22. Lee, S.B.C., Kwang Hyun; Selenge, Dangaa; Solongo, Amgalan; Nho, Chu Won *The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007. **30**(6): p. 1074-9.
23. M Giusti, R.W., *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. Biochem Eng J, 2003. **14**: p. 217-225.
24. Jiang, W., et al., *Modifications of the Method for Calculating Absolute Drug Bioavailability*. J Pharm Pharm Sci, 2016. **19**(2): p. 181-7.
25. Doherty, M.M. and K.S. Pang, *First-pass effect: significance of the intestine for absorption and metabolism*. Drug Chem Toxicol, 1997. **20**(4): p. 329-44.
26. Williamson, G. and M.N. Clifford, *Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?* Br J Nutr, 2010. **104 Suppl 3**: p. S48-66.
27. Day, A.J., et al., *Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase*. FEBS Lett, 2000. **468**(2-3): p. 166-70.
28. Hollman, P.C., et al., *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(6): p. 1276-82.
29. Day, A.J., et al., *Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity*. FEBS Lett, 1998. **436**(1): p. 71-5.
30. Cao, G., et al., *Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(5): p. 920-6.
31. Cassidy, A. and A.M. Minihane, *The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids*. Am J Clin Nutr, 2017. **105**(1): p. 10-22.

32. Hodek, P., P. Trefil, and M. Stiborova, *Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450*. Chem Biol Interact, 2002. **139**(1): p. 1-21.
33. Otake, Y. and T. Walle, *Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(2): p. 103-5.
34. Chen, Z., et al., *Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review*. Curr Drug Metab, 2014. **15**(1): p. 48-61.
35. Schöar MY, C.P., Hazim S, Ostertag LM, Kay CD, Potter JF, Cassidy A, *Orange juice-derived flavanone and phenolic metabolites do not acutely affect cardiovascular risk biomarkers: a randomized, placebo-controlled, crossover trial in men at moderate risk of cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 2015. **101**: p. 931-8.
36. Hidalgo Ij, R.T., Borchardt Rt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**: p. 736-749.
37. Artursson, P., *Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells*. J Pharm Sci, 1990. **79**(6): p. 476-82.
38. Hilgers Ar, C.R., Burton Ps, *Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa*. Pharm. Res., 1990. **7**: p. 902-910.
39. Artursson P, K.J., *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1991. **175**: p. 880-885.
40. van Breemen, R.B. and Y. Li, *Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. **1**(2): p. 175-85.
41. Wu, S.J. and J.R. Robinson, *Transport of human growth hormone across Caco-2 cells with novel delivery agents: evidence for P-glycoprotein involvement*. J Control Release, 1999. **62**(1-2): p. 171-7.
42. Gonzales, G.B., *In vitro bioavailability and cellular bioactivity studies of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts: questions, considerations and future perspectives*. Proc Nutr Soc, 2017. **76**(3): p. 175-181.
43. Rylski, M., H. Duriasz-Rowinska, and W. Rewerski, *The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test*. Acta Physiol Pol, 1979. **30**(3): p. 385-8.

44. Song, G.X., W.F. Tian, and L.H. Xiao, [*Magnetic resonance imaging in 80 cases of orbital tumors*]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 1994. **30**(6): p. 423-6.
45. Gong S, Z.Y.Y., Yu G.D, Chin. Tradit. Herbal. Drugs, 1996.
46. Ma C.G, X.Z.M., Xu S.Y, Chin. Pharmacol. Bull., 1991. **7**: p. 345.
47. Liu Y, L.Y.Y., Feng T.T, Hu J.M, Ma L, Wang L.J, Qiqihar J, Med. Univ., 2010. **31**: p. 2368.
48. Parveen, Z., et al., *Antiinflammatory and analgesic activities of Thesium chinense Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside*. Yakugaku Zasshi, 2007. **127**(8): p. 1275-9.
49. Loscalzo, L.M., et al., *Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines*. Eur J Pharmacol, 2008. **580**(3): p. 306-13.
50. Loscalzo, L.M., et al., *Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglycone, hesperetin, binds to mu-opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents*. Pharmacol Biochem Behav, 2011. **99**(3): p. 333-41.
51. Ei Q.K, X.H.S., Zhou M.M, Liaoning J, Univ. Tradit. Med, 2008. **10**: p. 145.
52. Kumar, S., R. Madaan, and A. Sharma, *Estimation of Apigenin, an Anxiolytic Constituent, in Turnera aphrodisiaca*. Indian J Pharm Sci, 2008. **70**(6): p. 847-51.
53. Xiao X, W.X., Gui X, Chen L, Huang B, *Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review*. Chem Bioviders, 2016. **13**(11): p. 1427-1440.
54. Herrera C.L, A.M., Barrientos L, Montenegro G, Salazar L.A, *The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on Candida spp*. Ciencia E Investigacion Agraria, 2010. **37**(1): p. 75-84.
55. Sitheeque, M.A., et al., *Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against Candida species*. Chemotherapy, 2009. **55**(3): p. 189-96.
56. Mulaudzi, R.B., et al., *Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever*. J Ethnopharmacol, 2012. **143**(1): p. 185-93.
57. Chen, M., L. Zhai, and M.C. Arendrup, *In vitro activity of 23 tea extractions and epigallocatechin gallate against Candida species*. Med Mycol, 2015. **53**(2): p. 194-8.
58. Liu, W., et al., *Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103442.
59. Belofsky, G., et al., *Fungal ABC transporter-associated activity of isoflavonoids from the root extract of Dalea formosa*. J Nat Prod, 2013. **76**(5): p. 915-25.

60. Mbaveng, A.T., et al., *Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from the twigs of Dorstenia mannii (Moraceae)*. BMC Complement Altern Med, 2012. **12**: p. 83.
61. Gabriela, N., et al., *The effect of Zuccagnia punctata, an Argentine medicinal plant, on virulence factors from candida species*. Nat Prod Commun, 2014. **9**(7): p. 933-6.
62. Zuzarte, M., et al., *Antifungal activity of phenolic-rich Lavandula multifida L. essential oil*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(7): p. 1359-66.
63. Seleem, D., V. Pardi, and R.M. Murata, *Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity in vitro*. Arch Oral Biol, 2017. **76**: p. 76-83.
64. Butterweck, V., et al., *Antidepressant effects of apocynum venetum leaves in a forced swimming test*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(7): p. 848-51.
65. Messaoudi, M., et al., *Antidepressant-like effects of a cocoa polyphenolic extract in Wistar-Unilever rats*. Nutr Neurosci, 2008. **11**(6): p. 269-76.
66. Zhang M.J, W.S.L., Shi D.F, Liu C.M, Chin. Tradit. Herbal Drugs, 2012. **43**: p. 2468.
67. Ishisaka, M., et al., *Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(9): p. 1481-6.
68. Guan, L.P. and B.Y. Liu, *Antidepressant-like effects and mechanisms of flavonoids and related analogues*. Eur J Med Chem, 2016. **121**: p. 47-57.
69. Mix, J.A. and W.D. Crews, Jr., *An examination of the efficacy of Ginkgo biloba extract EGb761 on the neuropsychologic functioning of cognitively intact older adults*. J Altern Complement Med, 2000. **6**(3): p. 219-29.
70. Mix, J.A. and W.D. Crews, Jr., *A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of Ginkgo biloba extract EGb 761 in a sample of cognitively intact older adults: neuropsychological findings*. Hum Psychopharmacol, 2002. **17**(6): p. 267-77.
71. Duffy, R., H. Wiseman, and S.E. File, *Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones*. Pharmacol Biochem Behav, 2003. **75**(3): p. 721-9.
72. Casini, M.L., et al., *Psychological assessment of the effects of treatment with phytoestrogens on postmenopausal women: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study*. Fertil Steril, 2006. **85**(4): p. 972-8.
73. Henderson, V.W., et al., *Long-term soy isoflavone supplementation and cognition in women: a randomized, controlled trial*. Neurology, 2012. **78**(23): p. 1841-8.

74. Scholey, A.B., et al., *Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort*. J Psychopharmacol, 2010. **24**(10): p. 1505-14.
75. Field, D.T., C.M. Williams, and L.T. Butler, *Consumption of cocoa flavanols results in an acute improvement in visual and cognitive functions*. Physiol Behav, 2011. **103**(3-4): p. 255-60.
76. Birks, J. and J. Grimley Evans, *Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD003120.
77. Kreijkamp-Kaspers, S., et al., *Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial*. JAMA, 2004. **292**(1): p. 65-74.
78. Kang, J.H., A. Ascherio, and F. Grodstein, *Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women*. Ann Neurol, 2005. **57**(5): p. 713-20.
79. Morris, M.C., et al., *Associations of vegetable and fruit consumption with age-related cognitive change*. Neurology, 2006. **67**(8): p. 1370-6.
80. Nurk, E., et al., *Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance*. J Nutr, 2009. **139**(1): p. 120-7.
81. Sofi, F., et al., *Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2010. **92**(5): p. 1189-96.
82. Shin, E.K., et al., *Chrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel diseases*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(4): p. 502-7.
83. Hsu, Y.M., et al., *3-Methyl-4,5-dihydro-oxepine, polyoxygenated seco-cyclohexenes and cyclohexenes from Uvaria flexuosa and their anti-inflammatory activity*. Phytochemistry, 2016. **122**: p. 184-192.
84. Paradkar, P.N., et al., *Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine*. Cancer Lett, 2004. **215**(1): p. 21-8.
85. Tunon, M.J., et al., *Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(3): p. 256-71.
86. Zeinali, M., S.A. Rezaee, and H. Hosseinzadeh, *An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances*. Biomed Pharmacother, 2017. **92**: p. 998-1009.

87. Arias, N., et al., *Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation*. Genes Nutr, 2014. **9**(1): p. 361.
88. Kannappan, S. and C.V. Anuradha, *Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome*. Eur J Nutr, 2010. **49**(2): p. 101-9.
89. Bahadoran, Z., P. Mirmiran, and F. Azizi, *Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review*. J Diabetes Metab Disord, 2013. **12**(1): p. 43.
90. Johnston, K., et al., *Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(7): p. 1653-7.
91. Jung, U.J., et al., *The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice*. J Nutr, 2004. **134**(10): p. 2499-503.
92. Ferreira, P.E., et al., *Diabetic neuropathy: an evaluation of the use of quercetin in the cecum of rats*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(38): p. 6416-26.
93. Shi, Y., et al., *Quercetin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury in vitro through Nrf-2/HO-1 activation and NF-kappaB inhibition*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(9): p. 1140-8.
94. Valensi, P., et al., *A multicenter, double-blind, safety study of QR-333 for the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. A preliminary report*. J Diabetes Complications, 2005. **19**(5): p. 247-53.
95. Pathak, N., et al., *Cancer chemopreventive effects of the flavonoid-rich fraction isolated from papaya seeds*. Nutr Cancer, 2014. **66**(5): p. 857-71.
96. Neuhouser, M.L., *Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies*. Nutr Cancer, 2004. **50**(1): p. 1-7.
97. Woo, H.D. and J. Kim, *Dietary flavonoid intake and smoking-related cancer risk: a meta-analysis*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75604.
98. Menezes, J.C., et al., *Natural and Synthetic Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Chemotherapeutic Potential for the Treatment of Leukemia*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016. **56 Suppl 1**: p. S4-S28.
99. Raffa, D., et al., *Recent discoveries of anticancer flavonoids*. Eur J Med Chem, 2017.
100. Gharib, H., et al., *American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi Medical Guidelines for*

- Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules--2016 Update*. Endocr Pract, 2016. **22**(5): p. 622-39.
101. Hua, X., et al., *Association among Dietary Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Ovarian Cancer Risk: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0151134.
 102. Tang, N.P., et al., *Flavonoids intake and risk of lung cancer: a meta-analysis*. Jpn J Clin Oncol, 2009. **39**(6): p. 352-9.
 103. Amawi, H., C.R. Ashby, Jr., and A.K. Tiwari, *Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting?* Chin J Cancer, 2017. **36**(1): p. 50.
 104. Hwang, K.A. and K.C. Choi, *Anticarcinogenic Effects of Dietary Phytoestrogens and Their Chemopreventive Mechanisms*. Nutr Cancer, 2015. **67**(5): p. 796-803.
 105. Zarrelli A, R.V., De Napoli L, et al, *Synthesis of new silybin derivatives and evaluation of their antioxidant properties*. Helv Chim Acta, 2015. **98**(3): p. 399-409.
 106. Bouchard, G., et al., *Lipophilicity and solvation of anionic drugs*. Chemistry, 2002. **8**(15): p. 3478-84.
 107. Ruey-Shiuan Tsai, G.L., Pierre-Alain Carrupt, Bernard Tes, *Centrifugal Partition Chromatography for Lipophilicity Measurements*. Lipophilicity in Drug Action and Toxicology, 2008.
 108. Andres, A., et al., *Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts*. Eur J Pharm Sci, 2015. **76**: p. 181-91.
 109. Χατζηϊωάννου Π.Θ, Κουππάρης Α.Μ, *Ενόργανη Ανάλυση*. 2014. **17**.
 110. Dorsey, J.G. and M.G. Khaledi, *Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography. Implications for biological partitioning processes*. J Chromatogr, 1993. **656**(1-2): p. 485-99.
 111. Pidgeon, C. and U.V. Venkataram, *Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids*. Anal Biochem, 1989. **176**(1): p. 36-47.
 112. Giaginis, C., S. Theocharis, and A. Tsantili-Kakoulidou, *Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs*. Anal Chim Acta, 2006. **573-574**: p. 311-8.
 113. Eksborg, S., *Reversed-phase liquid chromatography of adriamycin and daunorubicin and their hydroxyl metabolites adriamycinol and daunorubicinol*. J Chromatogr, 1978. **149**: p. 225-32.

114. Giaginis C., T.-K.A., *Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008. **31**: p. 79-96.
115. Carrupt, P.A., et al., *Morphine 6-glucuronide and morphine 3-glucuronide as molecular chameleons with unexpected lipophilicity*. J Med Chem, 1991. **34**(4): p. 1272-5.
116. El Tayar N, T.K.A., Roethlisberger T, Testa B, Gal J, J Chromatogr, 1988. **439**: p. 237-244.
117. Unger, S.H., J.R. Cook, and J.S. Hollenberg, *Simple procedure for determining octanol--aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid chromatography*. J Pharm Sci, 1978. **67**(10): p. 1364-7.
118. Minick, D.J., et al., *A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. J Med Chem, 1988. **31**(10): p. 1923-33.
119. Tate, P.A. and J.G. Dorsey, *Column selection for liquid chromatographic estimation of the $k'w$ hydrophobicity parameter*. J Chromatogr A, 2004. **1042**(1-2): p. 37-48.
120. Tian, X.J., et al., *Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model*. Int J Pharm, 2009. **367**(1-2): p. 58-64.
121. Tsopelas, F., et al., *Retention behavior of flavonoids on Immobilized Artificial Membrane Chromatography and correlation with cell- based permeability*. Biomed Chromatogr, 2017.