



**Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Τμήμα Φαρμακευτικής**  
**Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:**  
**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

**Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών φλαβονοειδών  
με τη χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών  
μεμβρανών και συσχέτισή τους με την εντερική διαπερατότητα**

**ΜΑΡΙΑ ΤΣΑΓΚΡΑΣΟΥΛΗ**

Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
*Αθήνα 2016*

## **Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

**Τσαντίλη- Κακουλίδου Άννα** (επιβλέπουσα καθηγήτρια)

Ομότιμη Καθηγήτρια του τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

**Γιαγκίνης Κωνσταντίνος**

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

**Παντερή Ειρήνη**

Αναπλ. Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα."

*(N. 5343/1932, άρθρο 202)*

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, της Φαρμακευτικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Παντερή Ειρήνης, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Φαρμακευτική Ανάλυση- Έλεγχος Ποιότητας» κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2014-2016.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Τσαντίλη- Κακουλίδου Άννα για την βοήθειά της καθώς ήταν σημαντική για τη βελτιστοποίηση της εργασίας και της επιστημονικής μου κατάρτισης. Επίσης, για τη διάθεση των εργαστηριακών χώρων για τη διεκπεραίωση του ερευνητικού μέρους της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες σε αυτό το σημείο οφείλω να εκφράσω στον καθηγητή κ. Γιαγκίνη Κωνσταντίνο για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής μου και τη συνεχή καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή της. Τον ευχαριστώ, επίσης, για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ και να κατανοήσω ένα ερευνητικό θέμα που άπτεται της επιστήμης της φαρμακευτικής χημείας. Η στήριξή του ήταν πολύτιμη κατά τη διάρκεια τόσο των προπτυχιακών όσο και των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Ποταμίτη, Μεταδιδακτορικό Συνεργάτη στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Η συνεργασία μας για τη προσκόμιση και μελέτη κρίσιμων φυσικοχημικών ιδιοτήτων, ήταν πολύτιμη έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η πρόβλεψη της σχέσης δομής- δράσης ενώσεων με φαρμακοθεραπευτικές ιδιότητες. Επίσης, τον Λέκτορα κ. Φώτη Τσόπελα, της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ για την συνεισφορά του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κ. Παντερή Ειρήνη, για τις συμβουλές και το επίπεδο των σπουδών που μου προσέφερε. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που απέδειξε καθόλη τη διάρκεια της φοίτησής μου. Ακόμη, τους συμφοιτητές μου με τους οποίους εργαστήκαμε παράλληλα στο πλαίσιο εκπόνησης των μεταπτυχιακών μας εργασιών και μοιραστήκαμε τις ανησυχίες μας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπογύφιο μεταπτυχιακό φοιτητή Ιωάννη Ρέρρα του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την εκμάθηση χειρισμού του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Ολοκληρώνοντας, δεν θα μπορούσα να παραβλέψω φυσικά την ίδια μου την οικογένεια, η οποία στεκόταν πάντα δίπλα μου, διακριτικά, σε όλη την διάρκεια κι αυτής της προσπάθειας.

*Μαρία Τσαγκρασούλη,*

*Αθήνα 2016*

Ο μηχανισμός συγκράτησης των 41 φλαβονοειδών αναλόγων στις δύο ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) στατικές φάσεις, IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2, μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε pH 7,4. Τα φλαβονοειδή ακολούθησαν έναν ενιαίο μηχανισμό έκλουσης και στις δύο στήλες, λαμβάνοντας υπόψη την ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των ανηγμένων τιμών  $\log k_{w(IAM)}$  και των κλίσεων  $S$ . Ικανοποιητική ήταν και η συσχέτιση μεταξύ των τιμών  $\log k_{w(IAM)}$  όπως προσδιορίστηκαν στις δύο στατικές φάσεις, παρόλο που οι τιμές  $\log k_w$  για την IAM.PC.DD2 στήλη ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές της IAM.PC.MG στήλης. Οι παράγοντες συγκράτησης συγκρίθηκαν, επίσης, με τους συντελεστές μερισμού σε σύστημα οκτανόλης- νερού ( $\log P$ ) και με τους συντελεστές κατανομής ( $\log D$ ) σε pH 7,4. Οι δύο αυτές εκφράσεις της λιποφιλίας παρουσίασαν ισχυρές γραμμικές συσχετίσεις με τις τιμές  $\log k_{w(IAM)}$ . Ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην IAM συγκράτηση ήταν λιγότερο έντονος σε σύγκριση με προηγούμενες μελέτες, εξαιτίας του περιορισμένου ιονισμού των υπό μελέτη ενώσεων σε pH 7,4. Τέλος, μελετήθηκε η συσχέτιση της IAM συγκράτησης με δεδομένα εντερικής διαπερατότητας κυττάρων τύπου Caco-2 ( $\log P_{app}$ ) που συλλέχθηκαν από την διεθνή βιβλιογραφία. Στατιστικώς σημαντικά γραμμικά και μη γραμμικά μοντέλα αναπτύχθηκαν μεταξύ παραγόντων συγκράτησης στην IAM και της πειραματικής Caco-2 διαπερατότητας, συμπεριλαμβανομένου των παραμέτρων βασικότητας  $B$  και οξύτητας  $A$  σε δεσμούς υδρογόνου, της γενικής εξίσωσης Abraham, ως πρόσθετους φυσικοχημικούς περιγραφικούς δείκτες. Αυτά τα μοντέλα ήταν, στατιστικώς, συγκρίσιμα με εκείνα που προέκυψαν από την προσομοίωση του συστήματος οκτανόλης/νερού. Οι δύο IAM στατικές φάσεις έδειξαν παρόμοια πρόβλεψη απόδοσης.

*Λέξεις-Κλειδιά:* Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών, Λιποφιλία, Φωσφολιποφιλία, Φλαβονοειδή, Εντερική διαπερατότητα, δοκιμασία Caco-2 διαπερατότητας

## Abstract

---

The retention behavior of 41 flavonoid analogues on two immobilized artificial membrane (IAM) stationary phases, IAM.PC.MG and IAM.PC.DD2 types was investigated using phosphate- buffered saline at pH=7.4 as eluent. The flavonoids followed a uniform elution mechanism on both columns, considering the strong linear correlation between extrapolated to pure aqueous phase retention factors,  $\log k_{w(IAM)}$  and the slopes,  $S$ , of the extrapolation procedure. The interrelation between  $\log k_{w(IAM)}$  values determined on the two stationary phases was satisfactory, although  $\log k_{w(IAM.PC.DD2)}$  values are generally higher than  $\log k_{w(IAM.PC.MG)}$ . IAM retention factors were also compared with octanol- water partition ( $\log P$ ) and distribution coefficient ( $\log D$ ) at pH= 7.4. Both expressions of lipophilicity exhibited similar performance on their linear correlations with  $\log k_{w(IAM)}$ . The role of electrostatic interactions to IAM retention of flavonoids was less pronounced compared to previous studies with structurally- diverse drugs due to the limited ionization of the investigated compounds at pH=7.4. Finally, the relationship between IAM retention and data of passage through Caco-2 cultured cell lines ( $\log P_{app}$ ) taken from the literature was established. Statistically significant linear and non- linear models between IAM retention factors and experimental Caco-2 permeability were constructed, including Abraham's acidity and basicity parameters as additional physicochemical descriptors. These models were comparable or better in terms of statistics with those constructed by the use of octanol- water partitioning. The two IAM stationary phases showed similar predictive performance towards cell- based permeability.

*Key-words:* Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography; Lipophilicity; Phospholipophilicity; Flavonoids; Intestinal permeability; Caco-2 permeability assay

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>Περίληψη</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Εισαγωγή</b> .....	9
<b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Φλαβονοειδή και Γενικά Χαρακτηριστικά</b> .....	11
1.1 Δομικά Χαρακτηριστικά Φλαβονοειδών- Ιδιότητες Φλαβονοειδών.....	11
1.2 Φάσμα Απορρόφησης Φλαβονοειδών .....	16
1.3 Διαιτητική πρόσληψη και πηγές φλαβονοειδών .....	17
1.3.1 Κατανάλωση φλαβονοειδών και ασφάλεια.....	17
1.3.2 Τρόφιμα πλούσια σε φλαβονοειδή.....	18
1.3.3 Φυτά πλούσια σε φλαβονοειδή .....	19
1.4 Μεταβολισμός και Βιοδιαθεσιμότητα φλαβονοειδών .....	21
<b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Βιολογικές Ιδιότητες Φλαβονοειδών</b> .....	27
2.1 Εισαγωγή .....	27
2.2 Φλαβονοειδή και Αντιοξειδωτικότητα .....	27
2.3 Φλαβονοειδή και Φλεγμονή .....	31
2.4 Φλαβονοειδή και Καρκίνος .....	33
2.5 Φλαβονοειδή και Καρδιαγγειακές παθήσεις .....	36
2.6 Φλαβονοειδή και Νευρικό Σύστημα.....	39
2.7 Φλαβονοειδή και Ηπατοπροστασία .....	41
<b>Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Εντερική Διαπερατότητα</b> .....	42
3.1 Αλληλεπίδραση φλαβονοειδών με τη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα .....	42
3.2 Διείσδυση φλαβονοειδών διαμέσου μεμβρανών του εντερικού επιθηλίου .....	44

3.3 Εντερική διαπερατότητα των φλαβονοειδών, με την χρήση του <i>in vitro</i> μοντέλου μονοστιβάδος Caco - 2 κυττάρων .....	45
<b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> Η φύση της λιποφιλίας .....</b>	<b>50</b>
4.1 Εισαγωγή .....	50
4.2 Κυτταρικές μεμβράνες και διαπερατότητα .....	51
4.3 Σχέση λιποφιλίας και φαινομένων υδρόφοβης σύνδεσης.....	53
4.4 Συντελεστής Μερισμού (Costas Giagkinis, 2008).....	53
4.5 Επίδραση του ιονισμού στην κατανομή (Costas Giagkinis, 2008).....	54
4.6 Προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού/ κατανομής ως μέτρο της λιποφιλίας	55
<b>Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> Χρωματογραφικές Τεχνικές .....</b>	<b>56</b>
5.1 Αντιστρόφου Φάσεως Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC).....	56
5.1.1 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία στην RP-HPLC .....	57
5.1.2 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία στην RP-HPLC.....	58
5.2 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial membrane chromatography) .....	60
5.2.1 Χρωματογραφικές συνθήκες στην χρωματογραφία IAM.....	61
5.2.2 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία IAM.....	62
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>67</b>
<b>Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών φλαβονοειδών με τη χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών και συσχέτισή τους με την εντερική διαπερατότητα .....</b>	<b>67</b>
6.1 Εξεταζόμενες Ενώσεις .....	67
6.2 Διαλύτες και Αντιδραστήρια .....	74
6.3 Όργανολογία .....	75

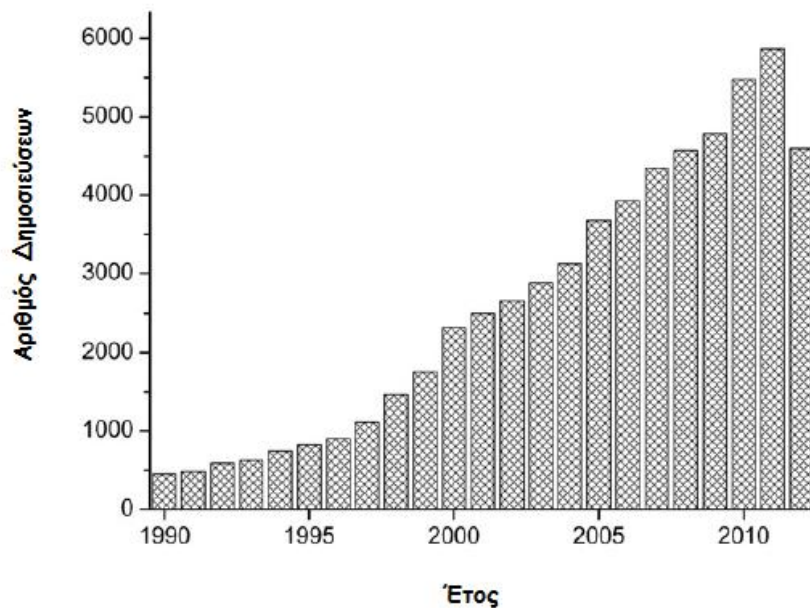


6.4 Χρωματογραφική Διαδικασία.....	78
6.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών $\log k_w$ .....	79
6.6 Υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων .....	79
6.7 Στατιστική Επεξεργασία .....	79
<b>Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup> Αποτελέσματα- Συζήτηση.....</b>	<b>80</b>
7.1 Χρωματογραφήματα.....	80
7.2 Γραφήματα $\log k/\phi$ και εξαγωγή τιμών $\log k_w$ .....	81
7.3 Συντελεστές μερισμού στο σύστημα οκτανόλης- νερού ( $\log P$ ) και συντελεστές κατανομής ( $\log D$ ) .....	89
7.4 Άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες .....	93
7.5 Συμπεριφορά συγκράτησης στις δύο IAM στατικές φάσεις, pH 7,4.....	96
7.6 Σχέσεις συγκράτησης στην IAM με συντελεστές κατανομής και μερισμού οκτανόλης-νερού.....	97
7.7 Συσχέτιση της IAM συγκράτησης με την Caco-2 εντερική διαπερατότητα .....	98
<b>Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup> Συμπεράσματα .....</b>	<b>105</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>107</b>

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### **Εισαγωγή**

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη μελέτη των φλαβονοειδών, ενώσεις για τις οποίες έχουν καταγραφεί πλήθος φαρμακολογικών ιδιοτήτων καθώς πολλές επιδημιολογικές μελέτες καθιστούν τα φλαβονοειδή πολύτιμα συστατικά της καθημερινής διαίτας. Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, ο αριθμός των μελετών στον τομέα αυτόν αποκάλυψε μια περίπου δεκαπλάσια αύξηση και πλέον φθάνει πάνω από 5000 δημοσιεύσεις ετησίως, *Σχήμα 1.1* (Yury S. Tarahovsky, 2014). Τα φλαβονοειδή ανήκουν στη χημική τάξη των πολυφαινολών με χημική δομή παρόμοια με αυτή του γ-βενζοπυρενίου και εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά. Συντίθενται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του φαίνυλο-προπανικού. Οι δευτερογενείς φαινολικοί μεταβολίτες φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων και των φλαβονοειδών, έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες (M. F. Mahomoodally, 2005), (Pandey, 2007). Τα φλαβονοειδή αποτελούν υδροξυλιωμένες φαινολικές ενώσεις οι οποίες συντίθενται από τα φυτά ως απάντηση στη μικροβιακή μόλυνση (R. A. Dixon, 1983). Η βιοδιαθεσιμότητα, ο μεταβολισμός και η βιολογική δραστηριότητα εξαρτώνται από τη χημική δομή τους. Η κατάταξη των φλαβονοειδών εξαρτάται από τη χημική δομή τους, τον βαθμό υδροξυλίωσής τους, την παρουσία άλλων υποκαταστατών και παραγόντων σύζευξης καθώς και τον βαθμό πολυμερισμού τους (E. H. Kelly, 2002).



**Σχήμα 1.1:** Αριθμός μελετών σχετικά με τα φλαβονοειδή που εκτελούνται σε διαφορετικά έτη σύμφωνα με το PubMed (NCBI, MD, USA). Η λέξη-κλειδί "φλαβονοειδή" χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση στη βάση δεδομένων με το λογισμικό Reference Manager (ICI Research Soft, USA).

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις ενώσεις αυτές λόγω των πιθανών ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία του ανθρώπου. Η περισσότερο μελετημένη δράση των φλαβονοειδών είναι η αντιοξειδωτική. Ειδικότερα, η αντιοξειδωτική τους δράση έχει συσχετιστεί κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη υδροξυλομάδων στο μόριό τους και αποδίδεται στη δέσμευση ελεύθερων ριζών ή/και την ικανότητα δέσμευσης μεταλλικών ιόντων (S. Kumar, 2013), (Pandey, 2013). Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η δέσμευση των μεταλλικών ιόντων πιθανόν να είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που προκαλούν βλάβες σε σημαντικά βιομόρια-στόχους συνεπώς και στην παρεμπόδιση λιπιδικής υπεροξειδωσης (M. Leopoldini, 2006). Παράλληλα, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να επάγουν την έκφραση προστατευτικών ενζυμικών συστημάτων στον άνθρωπο. Πολλά φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση. Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα φλαβονοειδή ρυθμίζουν τις φλεγμονώδεις διαδικασίες που σχετίζονται με αθηροσκλήρωση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μεταβολικές διαταραχές και άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, αφορούν στην αναστολή της φλεγμονώδους σηματοδότησης, τη μείωση παραγωγής φλεγμονωδών μορίων και την αναστολή της διηθητικής ικανότητας φλεγμονωδών κυττάρων (Min-Hsiung Pan,

2010). Ορισμένα φλαβονοειδή έχει διαπιστωθεί ότι επάγουν τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων (απόπτωση). Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν, επίσης, ότι η λήψη φλαβονοειδών σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο άσθματος και πρόκλησης καρδιαγγειακών και άλλων χρόνιων ασθενειών. Τα φλαβονοειδή δρουν, επίσης, σαν ένα δευτερεύον αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα στους ιστούς των φυτών που έχουν εκτεθεί σε εξωγενείς αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες. Τα φλαβονοειδή εντοπίζονται στον πυρήνα των μεσόφιλων κυττάρων, καθώς και σε κέντρα παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Έχει, επίσης, διαπιστωθεί ότι ρυθμίζουν ποικίλους αυξητικούς παράγοντες στους φυτικούς οργανισμούς, όπως η αυξήνη (G. Agati, 2012). Παράλληλα, έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλα γονίδια σε βακτήρια και μύκητες ως υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση φλαβονοειδών (F.Du, 2011).

Η απορρόφηση των φλαβονοειδών διαμέσου του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου θεωρείται ότι αποτελεί την πλέον κρίσιμη παράμετρο για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης. Πολλά από αυτά παρουσιάζουν πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και ως εκ τούτου κρίνεται ιδιαίτερα κρίσιμη η διερεύνηση των παραμέτρων εκείνων που επηρεάζουν την εντερική διαπερατότητά τους. Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες που επηρεάζει γενικότερα τη διάχυση των φαρμακομορίων διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών των εντεροκυττάρων και ως εκ τούτου και την εντερική διαπερατότητά τους είναι και η φωσφολιποφιλία τους.

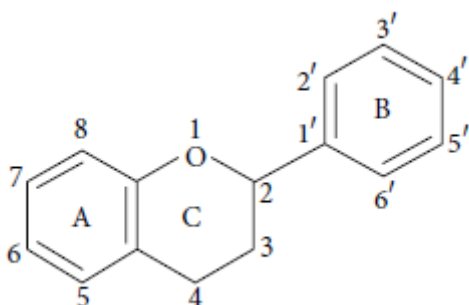
Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στο να προσδιορίσει χρωματογραφικούς δείκτες φωσφολιποφιλίας φλαβονοειδών αναλόγων και να διερευνήσει την πιθανή σχέση τους με την εντερική διαπερατότητά τους λαμβάνοντας υπόψη και πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορούν να προσδιοριστούν εύκολα και γρήγορα από εύχρηστα λογισμικά προγράμματα.

## **Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Φλαβονοειδή και Γενικά Χαρακτηριστικά**

### **1.1 Δομικά Χαρακτηριστικά Φλαβονοειδών- Ιδιότητες Φλαβονοειδών**

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια ομάδα φυσικών προϊόντων, φυτικής προέλευσης, με ετερογενείς φαινολικές δομές. Το 1930 μια νέα ουσία απομονώθηκε από τα πορτοκάλια. Οι επιστήμονες πίστεψαν, αρχικά, ότι ήταν μέλος μιας νέας οικογένειας βιταμινών και για τον λόγο αυτόν την ονόμασαν *βιταμίνη P*. Αργότερα, διαπιστώθηκε

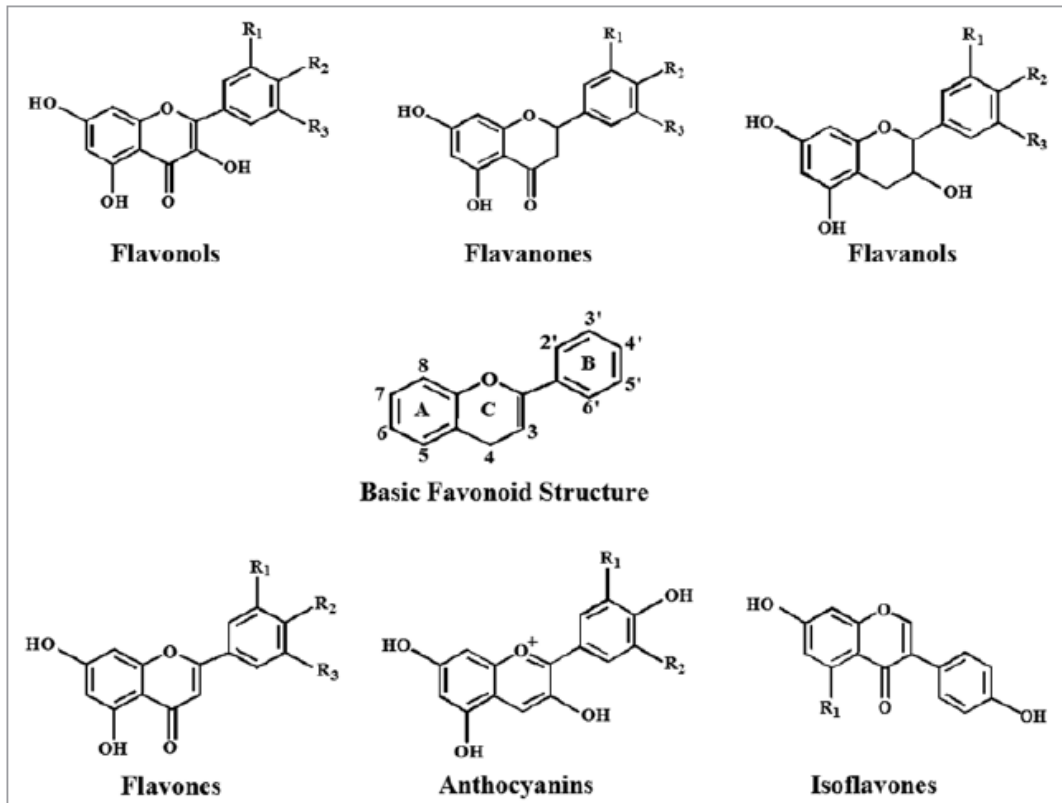
ότι πρόκειται για ένα φλαβονοειδές, τη ρουτίνη (rutin), ενώ μέχρι και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 4000 διαφορετικά φλαβονοειδή (Middleton, 1998).



**Εικόνα 1.1:** Βασική χημική δομή φλαβονοειδών

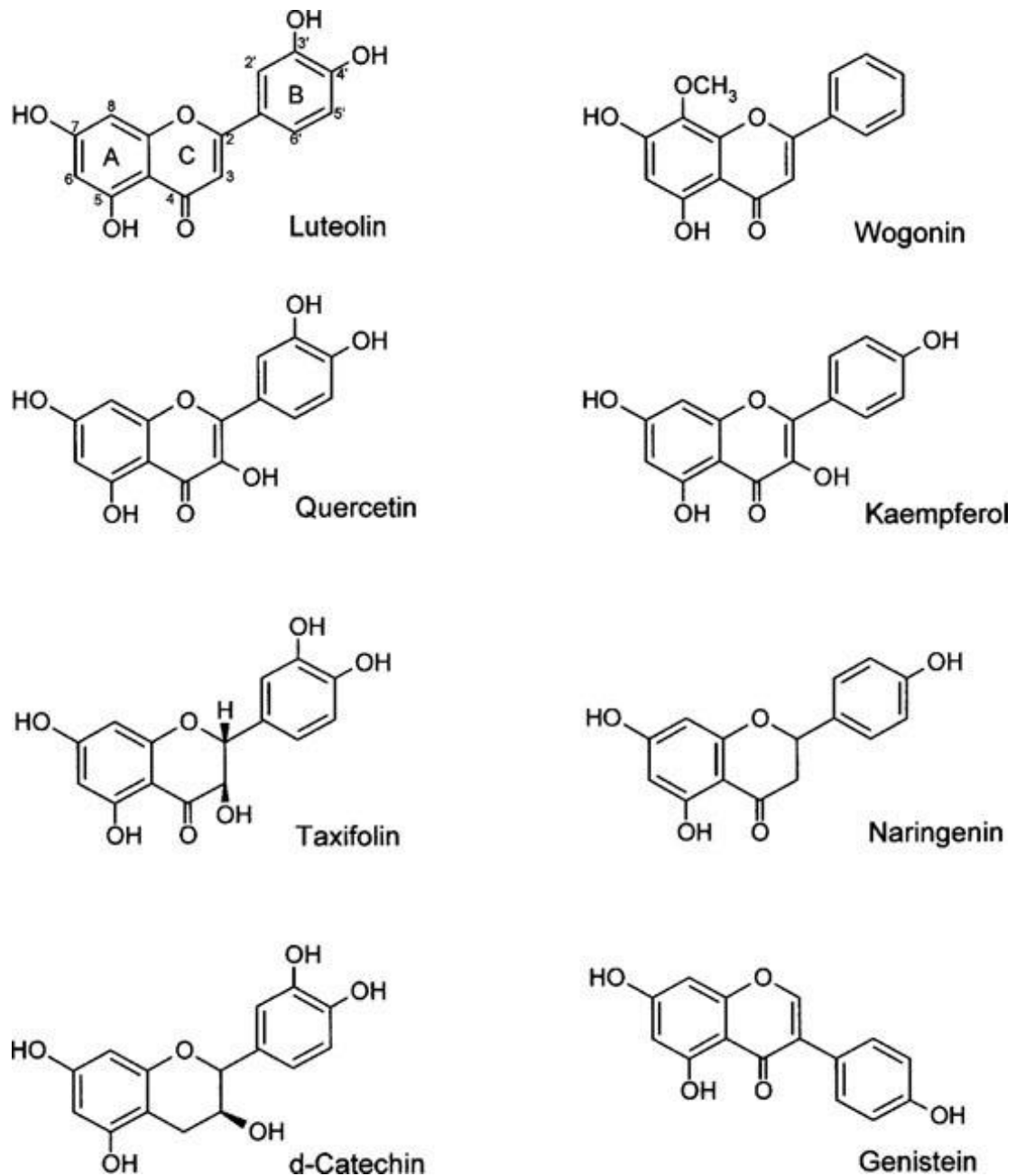
Από χημικής απόψεως, τα φλαβονοειδή αποτελούνται από έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6). Ειδικότερα, αποτελούνται από 2 βενζολικούς δακτυλίους (A και B δακτύλιοι), *Εικόνα 1.1*, οι οποίοι συνδέονται μέσω ενός ετεροκυκλικού πυρολικού δακτυλίου πυρανίου (C) (Middleton, 1998). Η παρουσία ενός διπλού δεσμού μεταξύ C2 και C3 στον δακτύλιο C στη δομή ενός φλαβονοειδούς επηρεάζει τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες. Η καρβονυλομάδα στη θέση C4 επιτρέπει στις ενώσεις να εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου ενώ η παρουσία της υδροξυλομάδας στη θέση C3 στον δακτύλιο C βοηθάει στην αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η ικανότητα εξουδετέρωσης ελεύθερων ριζών αυξάνει με τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου που είναι παρούσες στον δακτύλιο B, ειδικά στις θέσεις 3' και 4'. Η παρουσία των ομάδων υδροξυλίου στο C5 και C7 στον δακτύλιο A, C3' και C4' στον δακτύλιο B, καθώς και C3 στο δακτύλιο C ενισχύει, επίσης, την αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Rice-Evans, et al., 1996), (Iriti, 2011), (Robak, 1993), (Cholbi, et al., 1991), (Cook, et al., 1996).

Βάση τη χημική τους δομή τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε έξι ομάδες, φλαβόνες (π.χ απιγενίνη, λουτεολίνη), φλαβονόλες (π.χ κερκετίνη, καμπφερόλη, μυρισετίνη και φισετίνη), φλαβανόνες (π.χ φλαβανόνη, εσπεριτίνη, ναρινγενίνη), ανθοκυανίνες, ισοφλαβόνες και φλαβανόλες. Οι διάφορες τάξεις των φλαβονοειδών, *Εικόνα 1.2*, διαφέρουν στον βαθμό οξειδωσης και στο είδος των υποκαταστατών του δακτυλίου C, ενώ τα φλαβονοειδή της ίδιας τάξης διαφοροποιούνται ως προς τους υποκαταστάτες των δακτυλίων A και B (Spencer JP, 2008).



*Εικόνα 1.2: Δομές και υποκατηγορίες φλαβονοειδών*

Ειδικότερα, οι μεταβολές στη θέση του ετεροκυκλικού δακτυλίου, κατηγοριοποιούν τα φλαβονοειδή στις έξι μεγάλες υποκατηγορίες. Μεμονωμένες διαφορές στις δομές εντός της κάθε ομάδας μπορεί να προκύψουν από μεταβολές στον αριθμό και τη διάταξη των ομάδων υδροξυλίου και της έκτασής τους από αλκυλίωση ή/και γλυκοζυλίωση. Οι φλαβονόλες, όπως κερκετίνη και καμπερόλη (quercetin, kaempferol), έχουν μια 3-υδροξυ πυραν-4-όνη στον δακτύλιο C. Φλαβανόνες, όπως η ναριγκενίνη και η ταξιφολίνη (naringenin, taxifolin), έχουν έναν ακόρεστο δεσμό άνθρακα- άνθρακα στον δακτύλιο C. Αντίστοιχα, φλαβανόλες, όπως οι κατεχίνες (catechins) στερούνται τόσο την 3-υδροξυλομάδα όσο και την 4-όνη δομή στον δακτύλιο C. Οι φλαβόνες με τη σειρά τους, όπως η λουτεολίνη (luteolin), στερούνται μια υδροξυλομάδα στη θέση 3 του δακτυλίου C. Οι ανθοκυανίνες, όπως η κυανιδίνη (cyanidin), χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ιόντος οξονίου στον δακτύλιο C, ενώ τέλος, οι ισοφλαβόνες, όπως η γενιστεΐνη (genistein), ο δακτύλιος B συνδέεται με τον δακτύλιο C στην 3-θέση, αντί της 2-θέσης, όπως συμβαίνει με τα άλλα φλαβονοειδή (Rizvi, 2009). Ενδεικτικά, οι χημικές δομές των συνηθέστερων φλαβονοειδών φαίνονται στην *Εικόνα 1.3*.



**Εικόνα 1.3:** Χημικές δομές συνηθέστερων φλαβονοειδών. Φλαβόνες: *Luteolin*, *Wogonin*, Φλαβονόλες: *Quercetin*, *Kaempferol*, Φλαβανόνες: *Taxifolin*, *Naringenin*, Κατεχίνη: *d-Catechin*, Ισοφλαβόνη: *Genistein*

Τα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν με μορφή αγλυκονών, γλυκοζιτών ή μεθυλιωμένων παραγώγων. Η βασική δομή των φλαβονοειδών είναι η αγλυκόνη. Στο κέντρο της δομής των φλαβονοειδών είναι ένας εξαμελής δακτύλιος ενωμένος με ένα βενζολικό δακτύλιο είτε ως μια α-πυρανόνη είτε με την μορφή του διυδροξυ-



παραγώγου του (φλαβονόλες και φλαβανόνες). Η θέση του βενζολικού δακτυλίου (B) διαχωρίζει την τάξη των φλαβονοειδών σε φλαβονοειδή (θέση 2) και ισοφλαβονοειδή (θέση 3). Οι φλαβονόλες διαφέρουν από τις φλαβονόνες κατά μια ομάδα υδροξυλίου στην θέση 3 και έναν διπλό δεσμό στην θέση 2 (C2-C3). Τα φλαβονοειδή είναι συνήθως υδροξυλιωμένα στις θέσεις 3,5,7,2,3',4' ή/και 5'. 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 (Middleton, 1984).

## 1.2 Φάσμα Απορρόφησης Φλαβονοειδών

Μελέτες φασματογραφίας στα φλαβονοειδή έχουν δείξει ότι οι περισσότερες φλαβόνες και φλαβονόλες απορροφούν σε 2 περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Στην περιοχή I (320-385nm) όπου απορροφά ο δακτύλιος B, και στην περιοχή II (250-285nm) όπου απορροφά ο δακτύλιος A. Οι λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται ενωμένες με τον σκελετό των φλαβονοειδών μπορούν να προκαλέσουν μετατόπιση στην απορρόφηση, όπως στα 367nm στην περίπτωση της καμπφερόλης (3,5,7,4'- υδροξυλομάδες), στα 371 nm στην περίπτωση της κερκετίνης (3,4,7,3',4' υδροξυλομάδες), και στα 374 nm στην περίπτωση της μυρισετίνης (3,5,7,3',4',5' υδροξυλομάδες) (L. H. Yao, 2004). Η απουσία της 3-υδροξυλομάδας στις φλαβόνες είναι το χαρακτηριστικό εκείνο που τις διαφοροποιεί από τις φλαβονόλες. Οι φλαβανόνες έχουν ένα κορεσμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο C, χωρίς να υπάρχει το φαινόμενο συντονισμού μεταξύ των δακτυλίων A και B, όπως καθορίζεται και από το φάσμα απορρόφησης τους στο υπεριώδες (C. A. Rice-Evans, 1996). Οι φλαβανόνες παρουσιάζουν πολύ υψηλή απορρόφηση στην περιοχή II μεταξύ (270-295nm), κυρίως στα 288nm (ναρινγενίνη) και στα 285nm (ταξιφολίνη), και μια χαμηλή απορρόφηση στην περιοχή I στα 326-327nm. Στην περιοχή II εμφανίζεται μία κορυφή (270nm) σε ενώσεις με μονο-υποκατεστημένο δακτύλιο B, αλλά δύο κορυφές ή μία κορυφή (258nm) μαζί με μια μικρότερη (272nm) όταν είναι παρόν ένας δυ-, τρι-, ή Ο-υποκατεστημένος δακτύλιος. Οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν χαρακτηριστική κορυφή στην περιοχή I σε εύρος 450-560nm εξαιτίας του υδροξυ-κινναμολικού τους B δακτυλίου, και κορυφή στην περιοχή II σε εύρος 240-280nm εξαιτίας του

βενζολικού συστήματος A. Για το λόγο αυτό το χρώμα τους ποικίλει ανάλογα με τον αριθμό και την θέση των υδροξυλομάδων (Dietz, 1981).

### **1.3 Διαιτητική πρόσληψη και πηγές φλαβονοειδών**

Πρόσφατα, ένας από τους λόγους για τους οποίους το ερευνητικό ενδιαφέρον για τα φλαβονοειδή έχει αυξηθεί είναι η απαίτηση του σύγχρονου ανθρώπου να καταναλώνει φυσικά προϊόντα με ευεργετικές ιδιότητες για τον οργανισμό. Το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή έχουν ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου αξιοποιούν, επίσης, οι βιομηχανίες φαρμάκων καθώς αναζητούν διαρκώς φυτά τα οποία θα περιέχουν ουσίες με θεραπευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές δυσκολίες στη μελέτη της διαιτητικής πρόσληψης των φλαβονοειδών καθώς ο μεταβολισμός και η φαρμακοκινητική των φλαβονοειδών στους ανθρώπους δεν είναι εύκολα κατανοητά ενώ η έλλειψη κατανόησης των αλληλεπιδράσεων με άλλα διαιτητικά συστατικά καθιστούν ακόμη πιο πολύπλοκη τη μελέτη αυτή.

#### **1.3.1 Κατανάλωση φλαβονοειδών και ασφάλεια**

Επί του παρόντος, η κατανάλωση διαιτητικών φλαβονοειδών θεωρείται ασφαλής. Παρ' όλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία χρόνια η χρήση των φαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν υψηλές δόσεις βιοδραστικών ουσιών αυξάνεται. Τα συμπληρώματα παρέχουν μια εναλλακτική πηγή φλαβονοειδών με αυτά που λήφθηκαν από τη διατροφή. Ωστόσο, είναι ανησυχητικό το γεγονός ότι η τοξικότητα συμπυκνωμένων πηγών φλαβονοειδών είναι άγνωστη, μαζί με τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα διατροφικά συστατικά ή λαμβανόμενα φάρμακα. Η χορήγηση μεγάλων δόσεων ενός μόνο φλαβονοειδούς μπορεί να ασκήσει δυσμενή επίδραση στη λειτουργία του θυρεοειδούς. Υπάρχει μια ειδική ανησυχία για πιθανές παρενέργειες από ταυτόχρονη λήψη διαφόρων προϊόντων που περιέχουν φλαβονοειδή καθώς οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φλαβονοειδών είναι άγνωστες. Ο καταναλωτής μπορεί να παραπλανηθεί ότι τα φλαβονοειδή είναι απολύτως ασφαλή, καθώς καλούνται «φυσικά» προϊόντα. Όμως, ανεξέλεγκτη χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων που περιέχουν φλαβονοειδή πιθανών να βγει μειονεκτική για την υγεία. Επιπλέον, οι ετικέτες συσκευασίας για ορισμένα συμπληρώματα διατροφής έχουν λιγοστές πληροφορίες σχετικά με την ασφάλεια, τις

ανεπιθύμητες ενέργειες, τις αλληλεπιδράσεις, τις αντενδείξεις, και την αποτελεσματικότητα (Hig, 2009).

Είναι σαφές ότι οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης των φλαβονοειδών δεν έχουν πλήρως ερευνηθεί. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί, όπως προκύπτει από πρόσφατα ευρήματα, ότι η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα των αγλυκονών φλαβονοειδών σε συνδυασμό με τη μικρή χρονική περίοδο που παραμένουν στο λεπτό έντερο και ταυτόχρονα τη χαμηλή εντερική απορρόφησή τους, αποκλείουν την εμφάνιση τοξικών επιδράσεων, με εξαίρεση κάποιες περιπτώσεις αλλεργίας (Havsteen, 2002).

### **1.3.2 Τρόφιμα πλούσια σε φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι η πιο ευρέως κατανομημένη ομάδα φυτικών φαινολικών ενώσεων, που συναντάται σχεδόν σε όλα τα μέρη του φυτού αλλά κυρίως στα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη φωτοσύνθεση. Είναι οι βασικές εκείνες ουσίες που προσδίδουν χρώμα στα ανθοφόρα φυτά. Τα φλαβονοειδή αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής των ανθρώπων και των ζώων (R.Koes, 2005). Ως φυτοχημικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή δεν μπορούν να συντεθούν στον άνθρωπο και τα ζώα. Επομένως, τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα ζώα είναι φυτικής προέλευσης και δεν έχουν βιοσυντεθεί σε αυτά.

Η κατηγορία φαινολικών ενώσεων που συναντάται περισσότερο στα τρόφιμα είναι οι φλαβονόλες. Τα φλαβονοειδή στα τρόφιμα έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνα για το χρώμα, τη γεύση, την πρόληψη οξειδωσης των λιπών και συγχρόνως την προστασία των βιταμινών και των ενζύμων (L. H. Yao, 2004). Όσον αφορά την ανθρώπινη διατροφή, τα φλαβονοειδή που συναντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι τα ισοφλαβονοειδή της σόγιας, οι φλαβονόλες και οι φλαβονόνες. Παρόλο που τα περισσότερα φρούτα και όσπρια περιέχουν κατεχίνες, τα επίπεδά τους ποικίλουν σε ένα πολύ μεγάλο εύρος από 4,5 έως 610 mg/kg (I. C. W. Arts, 2000). Η προετοιμασία και η επεξεργασία των τροφίμων μπορεί να μειώσει τα επίπεδα φλαβονοειδών, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Χαρακτηριστικά, σε μια πρόσφατη μελέτη, ο χυμός πορτοκαλιού βρέθηκε να περιέχει 81-200mg/ L διαλυτές φλαβονόνες, ενώ το περιεχόμενο του μη διαλυτού κλάσματος σε φλαβονόνες ήταν 206-644mg/L. Αυτό φανερώνει ότι η μεγαλύτερη ποσότητα των φλαβονονών είναι συγκεντρωμένη στο μη διαλυτό κλάσμα το οποίο χάνεται κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση (A. Gil-Izquierdo, 2001).

Γενικότερα, είναι δύσκολο να γίνει μια ακριβής προσέγγιση της μέσης διαιτητικής πρόσληψης των φλαβονοειδών, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας τους και της εκτενούς διασποράς τους στα φυτά, καθώς επίσης και του διαφορετικού βαθμού κατανάλωσης από τον κάθε άνθρωπο (Clifford, 2000). Εκτιμάται ότι οι κάτοικοι της Δυτικής Ευρώπης καταναλώνουν κατά μέσο όρο 100-1000mg φλαβονοειδών ανά ημέρα/ άτομο (Majewska M., 2009), (Wilczyńska A., 2011). Αυτό επιβεβαιώθηκε από την Ευρωπαϊκή Προοπτική Μελέτη για τον Καρκίνο (EPIC), η οποία έδειξε ότι η μέση ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών για Έλληνες και Ισπανούς είναι 93 mg (n ≥ 28,000) και 126,1 mg (n = 40,683) ανά άτομο, αντίστοιχα (Dilis V., 2010), (Zamora-Ros R., 2010). Από την άλλη πλευρά, οι κάτοικοι χωρών της Άπω Ανατολής, όπως οι Ιάπωνες θεωρείται ότι καταναλώνουν έως και 2g φλαβονοειδών, ημερησίως (Wilczyńska A., 2011), λόγω της υψηλής κατανάλωσης οσπρίων, σόγιας και τσαγιού.

*Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση και διαιτητικές πηγές ορισμένων διαιτητικών φλαβονοειδών*

Τάξη	Φλαβονοειδές	Διαιτητική πηγή
Flavanol	(+)-Catechin, Epigallocatechin, (-)-epicatechin	Τσάι
Flavone	chrysin, apigenin, rutin, luteolin, luteolin glycosides	Φλοιός φρούτων, κόκκινο κρασί, μαύρο σιτάρι, κόκκινο πιπέρι, φλοιός τομάτας
Flavonol	kaempferol, quercetin, myricetin, tamarixetin	Κρεμμύδι, κόκκινο κρασί, ελαιόλαδο, βατόμουρο
Flavanone	naringin, naringenin, taxifolin, hesperedin	Εσπεριδοειδή
Isoflavone	genistin, daidzin	Σπόροι σόγιας
Anthocyanidine	apigenidin, cyanidin	Κεράσι, Φράουλα, Βατόμουρο

Σημαντικές πηγές φλαβονοειδών είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, οι σπόροι, ορισμένα δημητριακά σε συνδυασμό με κρασί, τσάι και ορισμένα μπαχαρικά. Ο Πίνακας 1.1 δείχνει, ενδεικτικά, την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή σε επιλεγμένα τρόφιμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία συγκεκριμένων φλαβονοειδών σε φρούτα και λαχανικά εξαρτάται από την ποικιλία της καλλιέργειας, την τοποθεσία και τον τύπο της καλλιέργειας καθώς επίσης και τα ειδικά μορφολογικά μέρη του φυτού (Hallmann E., 2007). Οι διαφορές στο περιεχόμενο των φλαβονοειδών μεταξύ διαφόρων ποικιλιών είναι συνήθως μικρές, αν και σε πολύ λίγες περιπτώσεις υψηλά ποσοστά φλαβονοειδών έχουν παρατηρηθεί σε ορισμένα μούρα και συγκεκριμένα είδη τσαγιού (Bhagwat S., 2011).

### 1.3.3 Φυτά πλούσια σε φλαβονοειδή

Πρόσφατες μελέτες έχουν αναζωπυρώσει το ερευνητικό ενδιαφέρον όσον αφορά τις πιθανές θεραπευτικές δράσεις των φαρμακευτικών φυτών, οι οποίες μπορεί να

οφείλονται στις φαινολικές τους ενώσεις, και συγκεκριμένα στα флаβονοειδή (F. Pourmorad, 2006), (Pandey, 2012). Τα флаβονοειδή έχει διαπιστωθεί ότι έχουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες που συμβάλουν στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και βοηθούν στην πρόληψη των ασθενειών. Η οξειδωμένη LDL χοληστερόλη θεωρείται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση. Το ισοβλαβονοειδές γλαμπριδίνη, μια πολυφαινόλη που βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες στο φυτό *Glycyrrhiza glabra* έχει διαπιστωθεί ότι αναστέλλει την οξείδωση της LDL χοληστερόλης μέσω μηχανισμού εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (B. Fuhrman, 1997). Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η συχνή κατανάλωση πράσινου ή μαύρου τσαγιού μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα και την αρτηριακή πίεση, προσδίδοντας έτσι κάποια προστασία ενάντια στην καρδιαγγειακή νόσο. Είναι επίσης γνωστό ότι τα флаβονοειδή επηρεάζουν την ποιότητα και τη σταθερότητα των τροφίμων δρώντας σαν ενισχυτές της οσμής και του χρώματος και ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες (Craig, 1999), (S. Kumar, 2012). Τα флаβονοειδή που εμπεριέχονται στα μούρα ασκούν θετική επίδραση ενάντια στην νόσο του Parkinson και πιθανόν να μπορούν να βελτιώσουν τη μνήμη των ηλικιωμένων ή να επιβραδύνουν την εξέλιξη νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα ολικά флаβονοειδή που περιέχονται στο φυτό *Astragalus complanatus* παρουσιάζουν αντιυπερτασική δράση σε υπερτασικούς αρουραίους (J. X. Li, 2005). Επίσης, η πρόσληψη αντιοξειδωτικών флаβονοειδών έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης άνοιας (D. Commenges, 2000). Στον Πίνακα 1.2 αναφέρονται κάποια φαρμακευτικά φυτά πλούσια σε флаβονοειδή.

Πίνακας 1.2: Φαρμακευτικά φυτά πλούσια σε φλαβονοειδή

Φυτό	Οικογένεια	Φλαβονοειδές
<i>Aloe Vera</i>	Asphodelaceae	Luteolin
<i>Acalypha indica</i>	Euphorbiaceae	Kaempferol glycosides
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Quercetin
<i>Andrographis paniculata</i>	Acanthaceae	5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone
<i>Bacopa moneira</i>	Scrophulariaceae	Luteolin
<i>Betula pendula</i>	Betulaceae	Quercetrin
<i>Butea monospermea</i>	Fabaceae	Genistein
<i>Bauhinia monandra</i>	Fabaceae	Quercetin-3-O-rutinoside
<i>Brysonima crassa</i>	Malpighiaceae	(+)-catechin
<i>Calendula officinalis</i>	Compositae	isorhamnetin
<i>Cannabis sativa</i>	Compositae	Quercetin
<i>Citrus medica</i>	Rutaceae	Hesperidin
<i>Clerodendrum phlomidis</i>	Verbenaceae	Pectolinarigenin
<i>Clitoria ternatea</i>	L Fabaceae	Kaempferol-3-neohesperidoside
<i>Glycyheriza glabra</i>	Leguminosae	Liquiritin
<i>Mimosa pudica</i>	Mimosoideae	Isoquercetin
<i>Limnophila indica</i>	Scrophulariaceae	3,4-methlenedioxyflavone
<i>Mentha longifolia</i>	Lamiaceae	Luteolin-7-O-glycoside
<i>Momordica clarantia</i>	Curcubitaceae	Luteolin
<i>Oroxylum indicum</i>	Bignoniaceae	chrysin
<i>Passiflora incarnate</i>	Passifloraceae	Vitexin
<i>Pongamia pinnata</i>	Fabaceae	Pongaflavonol
<i>Tephrosia purpurea</i>	Fabaceae	Purpurin
<i>Tilia cordata</i>	Tiliaceae	hyperoside

Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα των φλαβονοειδών συχνά αποτελεί πρόβλημα για την εκδήλωση της θεραπευτικής τους δράσης. Ως εκ τούτου δημιουργήθηκε η ανάγκη για την ανάπτυξη ημισυνθετικών υδατοδιαλυτών φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα οι υδροξυαιθυλορουτοσίδες και η ινοσιόυλο-2-φωσφατοκερκετίνη για τη θεραπεία της υπέρτασης και της μικροαιμορραγείας (Havsteen, 2002).

#### 1.4 Μεταβολισμός και Βιοδιαθεσιμότητα φλαβονοειδών

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων της Αμερικής (FDA), η βιοδιαθεσιμότητα, ορίζεται ως η φαρμοκινητική παράμετρος που εκφράζει το ρυθμό και την έκταση στην οποία απορροφάται το ενεργό συστατικό ή η δραστική ομάδα ενός φαρμακευτικού προϊόντος και καθορίζει το ποσό του φαρμάκου που υπάρχει διαθέσιμο στην κυκλοφορία και τελικά φτάνει στο σημείο δράσης. Αντίστοιχα, η ίδια αρχή μπορεί να εφαρμοστεί σε ενώσεις φλαβονοειδών στα τρόφιμα. Σύμφωνα με τον ορισμό, ο ρυθμός απορρόφησης και η διαθεσιμότητα στη

θέση δράσης είναι υψίστης σημασίας για ένα βιοενεργό συστατικό για να είναι αποτελεσματικό εντός βιολογικών συστημάτων και κατ' επέκταση να είναι *βιοδιαθέσιμο*. Συνεπώς, είναι επιτακτική ανάγκη να καθοριστεί όχι μόνο το ποσό ενός συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού ή βιοδραστικής ένωσης σε ένα τρόφιμο ή συμπλήρωμα διατροφής, αλλά συγχρόνως και η βιοδιαθεσιμότητά του. Παρά τους ισχυρισμούς υγείας των φλαβονοειδών, είναι γνωστό ότι η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι γενικά χαμηλή και μπορεί να ποικίλει μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών φλαβονοειδών καθώς και μεταξύ μεμονωμένων φλαβονοειδών ίδιας κατηγορίας. Η σχετική ουρική έκκριση ανθοκυανινών και η πρόσληψη του φλαβονοειδούς, daidzin ήταν 0,3% και 43%, αντίστοιχα, γεγονός που εξηγεί τη μεταβλητότητα της βιοδιαθεσιμότητας των φλαβονοειδών (Landete, 2012). Όταν πρόκειται για φλαβονοειδή με πολύπλοκες δομές και μεγαλύτερα μοριακά βάρη, η βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να είναι ακόμη χαμηλότερη (Landete, 2012), (Scalbert, et al., 2002).

Έχει αναφερθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των εντερικών μεταβολιτών που σχηματίζονται από λήψη ανθοκυανινών ήταν πιθανό να είναι προϊόντα σύζευξης πρωτοκατεχουϊκού οξέος και φλωρογλυκίνη αλδεΰδης (Kay, et al., 2009). Αυτές οι ενώσεις είναι προϊόντα αποδόμησης ανθοκυανινών. Μετά από 4 h επώασης κυανιδίνης και 3-O-γλυκοζίτη κυανιδίνης σε ένα μέσο καλλιέργειας ελεύθερο κυττάρων, το 96% της κυανιδίνης και το 57% του 3-O-γλυκοζίτη της κυανιδίνης ήταν αποδομημένα. Σε μέσο καλλιέργειας ανθρώπινων εντερικών κυττάρων σειράς Caco-2, αυτά τα προϊόντα αποδόμησης (πρωτοκατεχουϊκού οξέος και φλωρογλυκίνη αλδεΰδης) μεταβολίστηκαν στα γλυκουρονίδια και θειικά συζυγή τους (Kay, et al., 2009). Τα προϊόντα αποδόμησης και οι μεταβολίτες τους είναι, συνεπώς, μέρος της βιοδραστικότητας των ανθοκυανινών.

Μια άλλη πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη βιοδιαθεσιμότητα της γενιστεΐνης (genistein), αγλυκόνη και του γλυκοζίτη της, γενιστίνη (genistin) επιβεβαίωσε ότι η βιοδιαθεσιμότητα της αγλυκόνης ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τη μορφή του γλυκοζίτη της (Steensma, et al., 2006). Σημαντικές ποσότητες της γενιστεΐνης και των μεταβολιτών της ανακτήθηκαν από το περιεχόμενο του εντερικού αυλού και των περιττωμάτων. Το πείραμα διεξήχθη σε μη αναισθητοποιημένους αρουραίους, έπειτα από του στόματος λήψη των ενώσεων, ενώ το αίμα συλλέχθηκε

χρησιμοποιώντας έναν μόνιμα εισηγμένο σωληνίσκο στην πυλαία φλέβα. Το προφίλ ισοφλαβονών από το πλάσμα της πυλαίας φλέβας παρέχει μια εικόνα απογλυκοσυλίωσης των ισοφλαβονών στο λεπτό έντερο πριν υποστεί ηπατικό μεταβολισμό.

Η από του στόματος χορήγηση αγλυκονών φλαβονοειδών, εσπερετίνη (hesperetin) και ναριγκενίνη (narigenin), προερχόμενα από εσπεριδοειδή, σε ανθρώπους έδειξαν ταχεία απορρόφηση, αλλά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, σύμφωνα με σωρευτικά δεδομένα ανακτημένα από δείγμα ούρων (Kanaze, et al., 2007). Οι ενώσεις φάνηκε να υπόκεινται σε εκτεταμένο μεταβολισμό πρώτης διόδου από εντερικά βακτήρια και έπειτα να αποικοδομούνται σε φαινολικές ενώσεις. Οι συγκεντρώσεις εσπερετίνης και ναριγκενίνης παρατηρήθηκαν στο πλάσμα 20 λεπτά μετά τη λήψη και κορυφώθηκαν σε 4,0 και 3,5 ώρες, αντίστοιχα.  $C_{max}$  για εσπερετίνη και ναριγκενίνη ήταν  $825,78 \pm 410,63$  και  $2009,51 \pm 770,82$  ng/ml, αντίστοιχα.

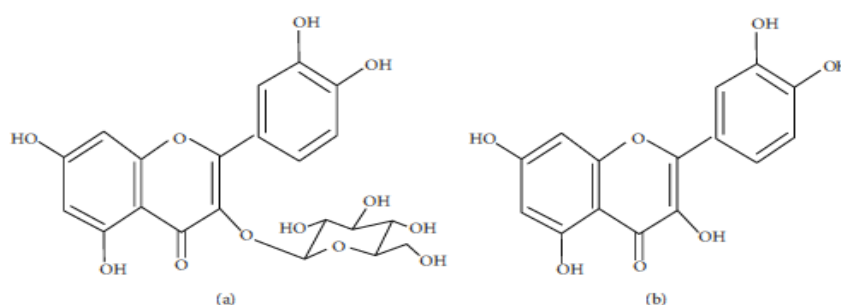
Ο μεταβολισμός των φλαβονοειδών σε γενικές γραμμές απεικονίζεται στο *Σχήμα 1.2*:

*Απορρόφηση*: Τα φλαβονοειδή μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο και σε μικρό βαθμό από το παχύ έντερο (κόλον). Η απορρόφηση τους εξαρτάται από την χημική δομή των φλαβονοειδών και ειδικότερα εάν πρόκειται για γλυκοζίτες ή αγλυκόνες. Τα περισσότερα φλαβονοειδή, εκτός από την κατηγορία των κατεχινών, βρίσκονται στα φυτά δεσμευμένα σε σάκχαρα όπως οι β-γλυκοζίτες, *Εικόνα 1.4* (P. C. H. Hollman, 1999). Οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν εύκολα από το λεπτό έντερο, ενώ οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών πρέπει να μετατραπούν στην αγλυκονική τους μορφή, να καταβολιστούν, δηλαδή, σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούν εύκολα να απορροφηθούν (Rupasinghe, 2013).

Οι υδρόφιλοι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών, όπως της κερκετίνη, μεταφέρονται μέσω του λεπτού εντέρου χρησιμοποιώντας τον συμμεταφορέα ιόντων  $Na^+$ /γλυκόζης (SGLT1) (P. C. H. Hollman, 1999). Ένας εναλλακτικός μηχανισμός περιλαμβάνει την υδρόλυση των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών από το ένζυμο υδρολάση φλωριγένης-γλυκόζης (LPH), μια β-γλυκοζιδάση των εντερικών κρυπών του λεπτού εντέρου. Ως αποτέλεσμα, η ελεύθερη αγλυκόνη μπορεί να απορροφηθεί από το λεπτό έντερο (A. J. Day, 2000). Η εξειδίκευση που παρουσιάζει το ένζυμο



LPH ως προς το υπόστρωμα διαφέρει για πολλούς γλυκοζίτες των φλαβονοειδών (γλυκοζίτες, γαλακτοζίτες, αραβινοζίτες, ξυλοζίτες, ραμνοζίτες) (T.Walle, 2004).

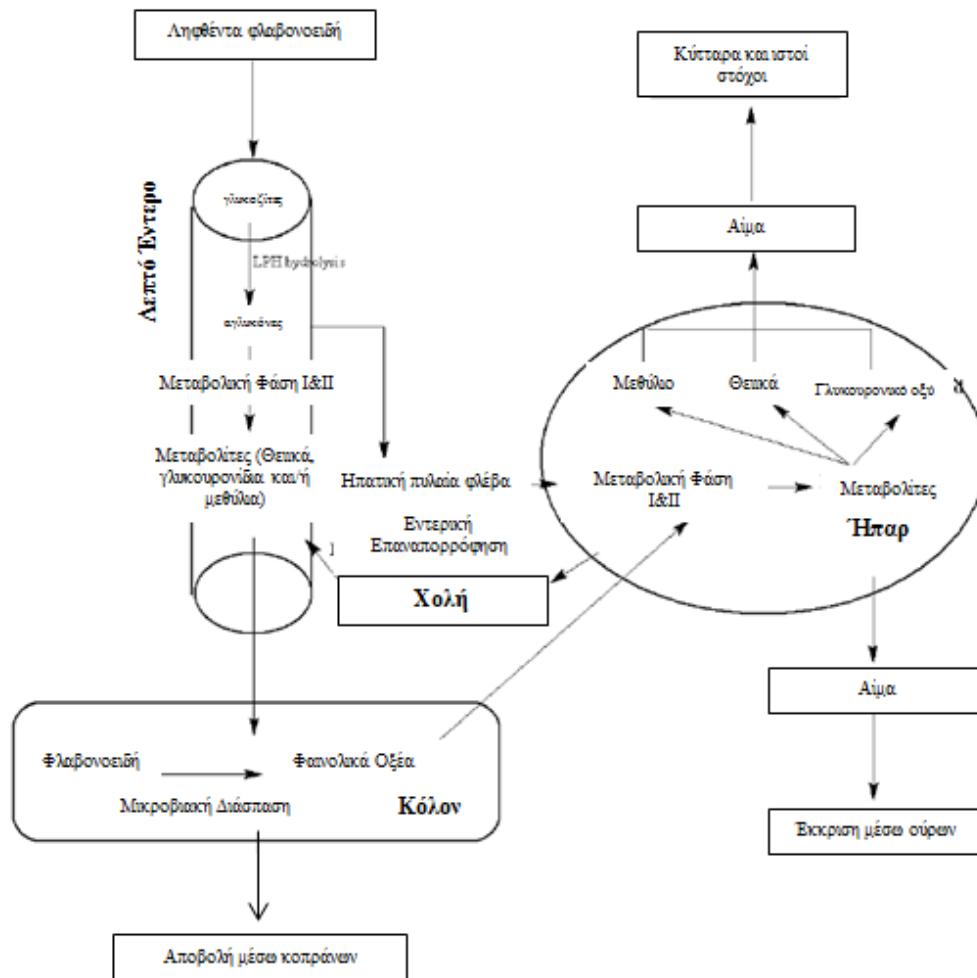


**Εικόνα 1.4:** Δομή (a) γλυκοζίτης φλαβονοειδούς και (b) αγλυκόνη φλαβονοειδούς

Ο μεταβολισμός, ο ρυθμός και το ποσό της απορροφηθείσας διαιτητικής κερκετίνης στον άνθρωπο φαίνεται να εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον τύπο και τη θέση της χαρακτηριστικής ομάδας του σακχάρου (Graefe, et al., 2001). Σύμφωνα με τον Graefe και τους συνεργάτες του, η βιοδιαθεσιμότητα των μεταβολιτών της κερκετίνης ήταν πέντε φορές υψηλότερη, όταν η κερκετίνη χορηγήθηκε ως 4'-Ο-γλυκοσίδιο κερκετίνης ( $C_{\max}$ :  $2.1 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ ;  $t_{\max}$ :  $0.7 \pm 0.3 \text{ h}$ ), σε αντίθεση με τη χορήγηση της κερκετίνης στη μορφή 3-Ο-ρουτινοσίδιο κερκετίνης ( $C_{\max}$ :  $0.3 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ ;  $t_{\max}$ :  $7.0 \pm 2.9 \text{ h}$ ) και η θέση της απορρόφησης για αυτά τα γλυκοσίδια ήταν διαφορετική. Ανεξάρτητα από τον τύπο του γλυκοζίτη της κερκετίνης που χορηγήθηκε, οι δυνητικά ενεργοί μεταβολίτες της κερκετίνης (γλυκουρονίδια), ήταν πανομοιότυποι στο ανθρώπινο πλάσμα. Η βιοδιαθεσιμότητα της λαμβανόμενης κερκετίνης εξαρτάται, επίσης, από τη διαιτητική πηγή της. Σε μια κλινική μελέτη, η κατανάλωση κρεμμυδιού σε σκόνη ( $C_{\max}$ :  $273.2 \pm 93.7 \text{ ng/mL}$ ;  $t_{\max}$ :  $2.0 \pm 1.7 \text{ h}$ ;  $t_{1/2}$ :  $14.8 \pm 4.8 \text{ h}$ ) οδήγησε σε ταχύτερη απορρόφηση, υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα και μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα σε σύγκριση με σκόνη από φλούδα μήλου ( $C_{\max}$ :  $63.8 \pm 22.4 \text{ ng/mL}$ ;  $t_{\max}$ :  $2.9 \pm 2.0 \text{ h}$ ;  $t_{1/2}$ :  $65.4 \pm 80.0 \text{ h}$ ). Γλυκοζίτες κερκετίνης στη σκόνη κρεμμυδιού ήταν κυρίως 3,4'-Ο-γλυκοζίτη της κερκετίνης και 4'-Ο-γλυκοσίδιο της κερκετίνης ενώ σε φλούδες μήλου ήταν 3-Ο-αραβινοσίδη της κερκετίνης, 3-Ο-γαλακτοσίδη, 3-Ο-γλυκοζίτη και 3-Ο-ραμνοζίδιο (Rupasinghe, et al., 2010).

Οι γλυκοζίτες οι οποίοι δεν είναι υποστρώματα για τα παραπάνω ένζυμα μεταφέρονται στο κόλον όπου υπάρχουν βακτήρια που έχουν την ιδιότητα να

υδρολύουν τους γλυκοζίτες των φλαβονοειδών και ταυτόχρονα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες αγλυκόνες (Scheline, 1973). Η ικανότητα απορρόφησης του κόλον είναι πολύ μικρότερη από εκείνη του λεπτού εντέρου, και για το λόγο αυτό αναμένεται να υπάρξει πολύ μικρή απορρόφηση αυτών των γλυκοζιτών.



**Σχήμα 1.2:** Μια απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού των φλαβονοειδών στον άνθρωπο. Τα λαμβανόμενα φλαβονοειδή υποβάλλονται σε εκτεταμένο εντερικό μεταβολισμό. Οι μεταβολίτες στη συνέχεια μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας και υφίστανται περαιτέρω μεταβολισμό. Οι μεταβολίτες στο ήπαρ μπορεί να μεταφερθούν σε στοχευμένα κύτταρα και ιστούς, απεκκρίνονται στη χολή και εισέρχονται στην εντεροηπατική κυκλοφορία ή αποβάλλονται μέσω των ούρων ή/και των κοπράνων. Οι αγλυκόνες ή οι μεταβολίτες των φλαβονοειδών που

φτάνουν στο παχύ έντερο μπορεί να υποστούν μικροβιακή διάσπαση και επαναπορρόφηση (Rupasinghe, 2013).

*Βιομετατροπή στο ήπαρ:* Η σύζευξη των φλαβονοειδών αρχικά πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο και έπειτα στο ήπαρ όπου μεταβολίζονται περαιτέρω. Τα φλαβονοειδή βιομετατέπονται στο ήπαρ μέσω γλυκουρονίωσης, σουλφούρωσης ή μεθυλίωσης και μεταβολίζονται σε μικρότερα φαινολικά συστατικά (Bravo, 1998). Λόγω των αντιδράσεων βιομετατροπής που υφίστανται, οι αγλυκόνες των φλαβονοειδών δεν μπορούν να βρεθούν ελεύθερες στο πλάσμα ή τα ούρα, εκτός από τις κατεχίνες (Hollman, 2004).

*Εντεροηπατική Κυκλοφορία:* Τα φλαβονοειδή που εκκρίνονται από τη χολή εισέρχονται εκ νέου στην εντεροηπατική κυκλοφορία και όσα δεν απορροφώνται από το λεπτό έντερο υδρολύονται από την εντερική μικροχλωρίδα σε αγλυκόνες. Ειδικότερα, η εντερική μικροχλωρίδα αποδομεί τη δομή του φλαβονοειδούς δακτυλίου. Τα oligομερή φλαβονοειδή είναι πολύ πιθανό να υδρολυθούν σε μονομερή και διμερή υπό όξινες συνθήκες στο στομάχι. Τα μεγαλύτερα μόρια καταλήγουν στο κόλον, όπου και αποδομούνται από την εντερική μικροχλωρίδα που υπάρχει σε αυτό (Pandey, 2013).

Το σακχαρικό τμήμα των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών αποτελεί κρίσιμο παράγοντα της βιοδιαθεσιμότητας τους. Η υδρόλυση σε διμερή έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών. Μεταξύ όλων των υποκατηγοριών των φλαβονοειδών, μέγιστη βιοδιαθεσιμότητα παρουσιάζουν οι ισοφλαβόνες. Μετά την πέψη πράσινου τσαγιού, τα φλαβονοειδή απορροφούνται ταχέως όπως μαρτυρούν τα αυξημένα επίπεδα τους στο πλάσμα και στα ούρα. Εισέρχονται στην συστηματική κυκλοφορία αμέσως μετά την διαδικασία της πέψης και προκαλούν αύξηση σε σημαντικούς αντιοξειδωτικούς βιοχημικούς δείκτες του πλάσματος. Όπως επανεξετάστηκε από τον Spencer και τους συνεργάτες του (Spencer, et al., 2001), οι μονομερείς φλαβον-3-όλες μεταβολίζονται εκτεταμένα σε Ο-μεθυλιωμένες μορφές ή/και συζεύγγονται σε γλυκουρονίδια ή θειικά άλατα κατά τη διάρκεια της συστηματικής απορρόφησης. Επιπλέον, μετά την εξέταση διαφόρων μελετών, οι κυριότερες βιοδραστικές μορφές των φλαβον-3-ολών καθώς και των προκυανιδίων είναι πιθανό να μεταβολίζονται σε συζυγή επικατεχίνης (Spencer, et al., 2001). Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την απορρόφηση και τον μεταβολισμό των

φλαβον-3-ολών στον άνθρωπο μετά την κατανάλωση έτοιμου προς κατανάλωση τσαγιού, επιβεβαίωσε τα παραπάνω, καθώς οκτώ μεταβολίτες και προϊόντα σύζευξης της επικατεχίνης είχαν απεκκριθεί από τα ούρα (Del Rio, et al., 2010). Σύμφωνα με τα στοιχεία, οι μεταβολίτες Ο-γλυκουρονίδιο της επιγαλλοκατεχίνης και θειική μεθυλοεπικατεχίνη είναι οι ενώσεις εκείνες που απεκκρίθηκαν περισσότερο από τα ούρα με τη μορφή μεταβολιτών.

## **Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Βιολογικές Ιδιότητες Φλαβονοειδών**

### **2.1 Εισαγωγή**

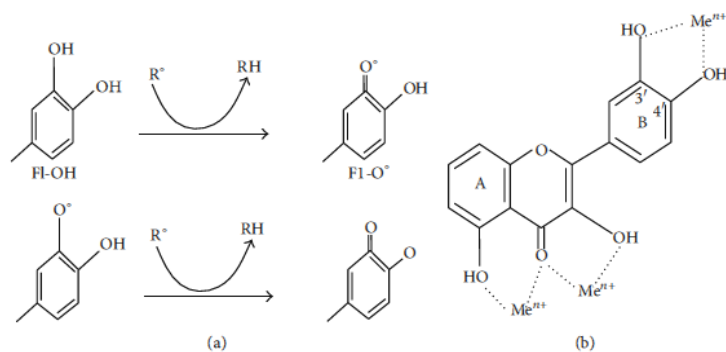
Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις από *in vitro* και *in vivo* επιδημιολογικές μελέτες ότι η μακροχρόνια χορήγηση φλαβονοειδών μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο κάποιων σοβαρών ασθενειών. Τα φλαβονοειδή έχουν προταθεί ως παράγοντες πρόληψης για καρδιαγγειακές παθήσεις, ασθένειες του ήπατος καθώς και για ορισμένους τύπους καρκίνου (Hodek P, 2002). Οι βιολογικές ιδιότητες των φλαβονοειδών εξαρτώνται ιδιαίτερα από τη χημική δομή και το σχετικό προσανατολισμό διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων στο μόριο τους. Ακόμη και μικρές αλλαγές στη χημική δομή, όπως η θέση της υποκατεστημένης ομάδας στο σκελετό του φλαβονοειδούς μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τις βιολογικές τους δραστηριότητες. Οι βιολογικές δραστηριότητες των φλαβονοειδών, συχνά, συνδέονται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες (η οξειδοαναγωγική δραστηριότητα συμβάλλει ιδιαίτερα στην άμυνα έναντι των ελεύθερων ριζών) και την ικανότητά τους να διαμορφώνουν αρκετά εξειδικευμένα ένζυμα, υποδοχείς κυττάρων και να διεγείρουν κάποιες ορμόνες και νευροδιαβιβαστές (BH, 2002). Τα φλαβονοειδή έχουν αναγνωριστεί ότι εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία, όπως αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, ηπατοπροστατευτική, αντικαρκινική και αντιαλλεργική δράση, όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Ross JA, 2002).

### **2.2 Φλαβονοειδή και Αντιοξειδωτικότητα**

Τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν πολλές βιολογικές ιδιότητες, αλλά χαρακτηριστικότερη όλων των ομάδων φλαβονοειδών είναι η ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά μέσα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών

βασίζεται στην διάταξη των λειτουργικών τους ομάδων γύρω από τον πυρήνα τους. Ειδικότερα, η θέση των υδροξυλίων, ο βαθμός υποκατάστασης και ο συνολικός αριθμός τους, επηρεάζει σημαντικά την δέσμευση των ελευθέρων ριζών και των μεταλλικών ιόντων (E. H. Kelly, 2002), (A. K. Pandey, 2012). Η θέση των υδροξυλίων του B δακτυλίου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για την εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) επειδή λειτουργεί ως δότης υδρογόνων, αλλά και ως δότης ενός ηλεκτρονίου σε υδροξύλια, ρίζες υπεροξειδίου και υπεροξυ-νιτρώδεις ρίζες, σταθεροποιώντας τες και δημιουργώντας μια σχετικά σταθερή κατάσταση στη φλαβονοειδική ρίζα (G. Cao, 1997).

Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση της δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) είτε μέσω αναστολής των ενζύμων είτε μέσω δέσμευσης ιχνοστοιχείων που συμμετέχουν στην διαδικασία δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Ακόμη, την καταστροφή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και τέλος, την προστασία των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (C.Gutteridge, 1998), (A. Mishra, 2013). Η δράση των φλαβονοειδών εμπεριέχει τους περισσότερους από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν. Επιμέρους δράσεις οι οποίες προέρχονται από τους μηχανισμούς αυτούς είναι πιθανό να είναι το συνολικό αποτέλεσμα της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών και της αλληλεπίδρασης ενζυμικών λειτουργιών. Τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τα ένζυμα που παράγουν δραστικές ενώσεις οξυγόνου, όπως είναι η μικροσωμική μονοοξυγενάση, η γλουταθειόνη, η S τρανσφεράση, η μιτοχονδριακή ηλεκτρική αφυδρογονάση, η NADH οξειδάση και άλλα ένζυμα (J. E. Brown, 1998).



**Σχήμα 2.1:** (a) Σάρωση ROS ( $R'$ ) από φλαβονοειδές ( $Fl-OH$ ) και (b) θέσεις δέσμευσης για μεταλλικά στοιχεία, όπου το  $Me$  υποδηλώνει τα μεταλλικά ιόντα.

Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελεί ένα συχνό αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες. Τα φλαβονοειδή προστατεύουν τα λιπίδια από οξειδωτικές βλάβες με πολλούς μηχανισμούς (S. Kumar, 2013), (Pandey, 2012). Τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα ενισχύουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών με τη μείωση της δράσης της υπεροξειδάσης του υδρογόνου μέσω της παραγωγής ριζών υδροξυλίου που αντιδρούν πιο εύκολα. Εξαιτίας της χαμηλής οξειδοαναγωγικής ικανότητάς τους, τα φλαβονοειδή είναι ικανά να μειώσουν τα επίπεδα ελευθέρων ριζών με υψηλή οξειδωτική ικανότητα, όπως οι σουπεροξειδικές, υπεροξυλικές, αλκοξυλικές και υδροξυλικές ρίζες με το να γίνουν δότες ατόμων υδρογόνου (Σχήμα 2.1(a)). Εξαιτίας της ικανότητάς τους να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα (σίδηρος, χαλκός κ.α ), τα φλαβονοειδή αναστέλλουν, επίσης, τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (A. Mishra, 2013), (A. Mishra, 2013). Ειδικότερα, η κερκετίνη είναι γνωστή για τις δεσμευτικές και σταθεροποιητικές ιδιότητές της όσον αφορά το σίδηρο. Τα μεταλλικά στοιχεία δεσμεύονται σε συγκεκριμένες θέσεις σε διαφορετικούς δακτυλίους στην δομή των φλαβονοειδών (A. Van, 1996). Τα μέρη δέσμευσης περιγράφονται στο Σχήμα 2.2(b).

Η παρουσία 3',4'-κατεχολικής ομάδας στη δομή των φλαβονοειδών ενισχύει τη δράση τους έναντι της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Αυτό το χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών τα καθιστά ως τους πιο αποτελεσματικούς εκκαθαριστές των υπεροξειδικών, σουπεροξειδικών και υπεροξυνιτρικών ριζών (E. H. Kelly, 2002). Η επικατεχίνη και η ρουτίνη αποτελούν ισχυρούς παράγοντες στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και αναστολείς της υπεροξειδωσης των λιπιδίων *in vitro* (Abbey, 1997). Εξαιτίας της οξείδωσης στην ομάδα της κατεχόλης του Β δακτυλίου δημιουργείται μια αρκετά σταθερή ρίζα ημιορθοοκινόνης που είναι ισχυρός αναστολέας ελευθέρων ριζών. Αντιθέτως, οι φλαβονόνες που δεν έχουν σύστημα κατεχόλης, όταν οξειδώνονται οδηγούν στο σχηματισμό μη σταθερών ριζών οι οποίες παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα εξουδετέρωσης (A. Sekher Pannala, 2001). Η βιβλιογραφία δείχνει ότι τα φλαβονοειδή που διαθέτουν έναν ακόρεστο διπλό ή τριπλό δεσμό σε συνδυασμό με μια 4-οξο λειτουργική ομάδα έχουν πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τα φλαβονοειδή που τους λείπει το ένα ή και τα δυο αυτά χαρακτηριστικά. Η σύνδεση μεταξύ των δακτυλίων Α και Β επιτρέπει να συμβεί ένα φαινόμενο συντονισμού του αρωματικού πυρήνα το οποίο παρέχει σταθερότητα στην ρίζα του φλαβονοειδούς.

Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος C των φλαβονοειδών προάγει την αντιοξειδωτική δράση τους, δημιουργώντας σύνδεση μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και του ελεύθερου 3-OH. Η απομάκρυνση του 3-OH δεν επιτρέπει την επιπεδοποίηση και την πραγματοποίηση του φαινομένου του συντονισμού, επηρεάζοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών (W. Bors, 1990). Οι ομάδες OH του δακτυλίου B δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με το 3-OH, ευθυγραμμίζοντας τον B δακτύλιο με τον δακτύλιο A. Εξαιτίας αυτού του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου, η επιρροή του 3-OH ενισχύεται από την παρουσία μιας 3',4'-κατεχόλης, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική δράση των φλαβαν-3-ολών και των φλαβον-3-ολών οι οποίες έχουν αυτό το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό. Παράλληλα, η Ο-μεθυλίωση των υδροξυλικών ομάδων των φλαβονολών έχει διαπιστωθεί ότι μειώνει την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών (C. A. Rice-Evans, 1996).

Οι συνθήκες, η θέση, η δομή και ο συνολικός αριθμός των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αγλυκόνες είναι πολύ πιο ικανοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες από τους αντίστοιχους γλυκοζίτες. Υπάρχουν αρκετές αναφορές που δείχνουν ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών από το τσάι μειώνονται όσο ο αριθμός των γλυκοζιτικών τμημάτων αυξάνεται (Das, 1988). Παρόλο που οι γλυκοζίτες είναι συνήθως πιο ασθενή αντιοξειδωτικά από τις αγλυκόνες, η βιοδιαθεσιμότητά τους συχνά είναι πιο αυξημένη λόγω της παρουσίας του σακχαρικού τμήματος. Στις τροφές, τα σακχαρικά τμήματα των γλυκοζιτών των φλαβονοειδών βρίσκονται συχνότερα στη θέση -3 ή στη θέση -7 (P. C. Hollman, 1999). Έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνοντας τον βαθμό του πολυμερισμού ενισχύεται η αποτελεσματικότητα των προκυανιδινών ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ελευθέρων ριζών. Επίσης, τα διμερή και τα τριμερή της προκυανιδίνης είναι πιο αποτελεσματικά από τα μονομερή φλαβονοειδών έναντι υπεροξειδικών ανιόντων. Τα τετραμερή θεωρούνται πιο αποτελεσματικά ενάντια στην υπεροξυνιτρική και υπεροξειδική οξείδωση σε σύγκριση με τα τριμερή, ενώ τα επταμερή και τα εξαμερή παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης υπεροξειδίων από τα τριμερή και τα τετραμερή (B. Vennart, 1994).

### 2.3 Φλαβονοειδή και Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία η οποία ενεργοποιείται ως απόκριση όταν οι ιστοί υπόκεινται σε τραυματισμό ή μικροβιακή παθογόνα μόλυνση ή κάποιον χημικό ερεθισμό. Η φλεγμονή ενεργοποιείται από τη μετανάστευση των ανοσοποιητικών κυττάρων του αίματος και την απελευθέρωση μεσολαβητών στην περιοχή του τραύματος. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται από συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων, απελευθέρωση ROS και RNS, και προφλεγμονωδών κυτοκινών για την εξάλειψη ξένων παθογόνων, και την επιδιόρθωση τραυματισμένων ιστών. Σε γενικές γραμμές, η φυσιολογική φλεγμονή είναι ταχεία και αυτοπεριοριζόμενη, αλλά η διάλυσή της με ανώμαλο τρόπο ή η παρατεταμένη φλεγμονή προκαλεί διάφορες χρόνιες ασθένειες (M. H. Pan, 2010).

Η χρόνια φλεγμονή έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην έναρξη και την ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών διαταραχών όπως η αρτηριοσκλήρυνση, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες ακόμη και ο καρκίνος. Η θεραπεία για χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές δεν έχει επιλυθεί και έχει προκύψει η ανάγκη για εξεύρεση νέων και ασφαλών αντιφλεγμονωδών ενώσεων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα φλαβονοειδή που εμφανίζουν μια ποικιλία ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία. Οι ιδιότητες των φλαβονοειδών έχουν, πρόσφατα, μελετηθεί προκειμένου να διαπιστωθεί η χρησιμότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες στη θεραπεία των φλεγμονωδών ασθενειών.

Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει επανειλημμένα ότι διαφορετικά μόρια φλαβονοειδών εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες. Έτσι, οι αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες φλαβονολών (κερκετίνη, ρουτίνη, μορίνη) και φλαβανονών (εσπεριτίνη, εσπεριδίνη) μελετήθηκαν σε οξείες και χρόνιες φλεγμονές σε ζωικά μοντέλα (Rotelli AE, 2003). Η ρουτίνη ήταν αποτελεσματική μόνο στη χρόνια διαδικασία, κυρίως σε αρθρίτιδα από ανοσοενισχυτικό. Σχετικά με τη νευρογενή φλεγμονή που προκαλείται από ξυλόλιο, μόνο οι φλαβανόνες ήταν αποτελεσματικές καθώς επίσης η κερκετίνη αποτελεί την πιο αποτελεσματική ένωση στη μείωση του οιδήματος του πέλματος που προκαλείται από καραγενάνη (Rotelli AE, 2003). Έχει αποδειχθεί, (Paradkar PN, 2004), ότι μια διατροφή που περιέχει ισοφλαβόνη με νταϊντζίνη, γενιστεΐνη και τους γλυκοζίτες τους μπορεί να διαμορφώσει την φλεγμονώδη αντίδραση στο ήπαρ και το έντερο ποντικών μετά από LPS ένεση. Αυτά



τα *in vivo* ευρήματα συνάδουν με την αντιφλεγμονώδη δράση της γενιστεΐνης όπως προέκυψε από μελέτες κυττάρων χρησιμοποιώντας ανθρώπινα εντερικά κύτταρα Caco-2.

Η αντιφλεγμονώδης δράση των φλαβονοειδών έχει επίσης διερευνηθεί σε *in vitro* μοντέλα, όπου μια σειρά από μελέτες έχουν διεξαχθεί για τη διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης της.

Τα φλαβονοειδή μπορούν να επηρεάσουν, συγκεκριμένα, τη λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων που έχουν σημαντική συμβολή στην δημιουργία των διεργασιών της φλεγμονής, ιδιαίτερα η τυροσίνη και οι πρωτεϊνικές κινάσες της σερίνης και την θρεονίνη (Nishizuka, 1988), (Hunter, 1995). Η αναστολή των κινασών οφείλεται στην ανταγωνιστική δέσμευση των φλαβονοειδών με ATP στα ενεργά κέντρα των ενζύμων. Αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν στη μεταγωγή σημάτων και σε διεργασίες κυτταρικών ενεργοποιήσεων, όπως στην περίπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή είναι σε θέση να αναστείλουν την έκφραση επαγόμενων ισόμορφων της συνθάσης του νιτρικού μονοξειδίου, της κυκλοοξυγενάσης και της λιποοξυγενάσης, που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας νιτρικού μονοξειδίου, προστανοειδών και λευκοτριενίων, αντίστοιχα, καθώς και άλλων διαμεσολαβητών της φλεγμονώδους διαδικασίας, όπως οι κυτταροκίνες, οι χυμοκίνες, ή μόρια προσκόλλησης (M. J. Tunon, 2009).

Τα φλαβονοειδή, επίσης, αναστέλλουν τις φωσφοδιεστεράσες που συμμετέχουν στην κυτταρική ενεργοποίηση. Μεγάλο μέρος της αντιφλεγμονώδους επίδρασης των φλαβονοειδών βασίζεται στην βιοσύνθεση πρωτεϊνικών κυτταροκινών που διαμεσολαβούν στην μεταφορά λευκών αιμοσφαιρίων για την επούλωση τραυμάτων. Συγκεκριμένα φλαβονοειδή είναι δραστικοί αναστολείς της παραγωγής των προσταγλανδινών, μιας ομάδας ισχυρών προφλεγμονωδών μορίων (A. Manthey, 2000). Η χορήγηση σιλυμαρίνης οδήγησε σε αντιστροφή των φλεγμονωδών αλλαγών που επάγονται από την καραγενίνη. Έχει, επίσης, διαπιστωθεί ότι η κερκετίνη αναστέλλει την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών IgG, IgM και IgA, *in vitro* (J. C. Cumella, 1987). Αρκετά φλαβονοειδή έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν σημαντικά την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε συγκέντρωση 1-10mM (Cazenave, 1988). Η επίδραση των φλαβονοειδών στα αιμοπετάλια έχει σχέση με την

αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος από το μονοξειδίο του άνθρακα (MacIouf, 1985). Ειδικότερα, συγκεκριμένα φλαβονοειδή έχουν διαπιστωθεί ότι είναι ισχυροί αναστολείς της κυκλικής AMP-φωσφοδιεστεράσης, και αυτό μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την ικανότητά τους να αναστέλλουν την λειτουργία των αιμοπεταλίων.

## **2.4 Φλαβονοειδή και Καρκίνος**

Οι διαιτητικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου. Φρούτα και λαχανικά τα οποία περιέχουν φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί ως παράγοντες χημικής παρεμπόδισης του καρκίνου (A. Mishra, 2013), (C. T. Ho, 1994). Κατανάλωση κρεμμυδιών ή/και μήλων, τα οποία αποτελούν δύο σημαντικές πηγές κερκετίνης, συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, του πνεύμονα, του στομάχου και του μαστού. Επιπλέον, άτομα με μέτρια κατανάλωση κρασιού φαίνεται να έχουν μικρότερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα, του ενδομητρίου, του οισοφάγου, του στομάχου, και του παχέος εντέρου (B. Koen, 2005). Η κρίσιμη σχέση πρόσληψης φρούτων και λαχανικών με την πρόληψη του καρκίνου έχει ερευνηθεί συστηματικά. Έχει προταθεί ότι μεγάλα οφέλη για την δημόσια υγεία θα μπορούσαν να επιτευχθούν μέσω της αύξησης της κατανάλωσης των προαναφερθέντων τροφίμων (G. Block, 1992). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για την επίδραση των φλαβονοειδών στα αρχικά στάδια και στα στάδια προαγωγής της καρκινογένεσης, που συμπεριλαμβάνουν επιδράσεις στην παραγωγή των ορμονών και στην ορμονική δραστηριότητα γενικότερα (G. G. Duthie, 2000).

Αρκετοί μηχανισμοί δράσης έχουν ταυτοποιηθεί για την πρόληψη του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της οιστρογονικής/ αντι-οιστρογονικής δραστηριότητας, του αντιπολλαπλασιασμού, της ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος υποδοχής, της πρόληψη της οξειδωσης, της επαγωγή ενζύμων αποτοξίνωσης, της αντιφλεγμονώδης δράσης και αλλαγών στην κυτταρική σηματοδότηση (Birt DF, 2001). Τα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τον μετασχηματισμό των κυττάρων είναι ιδιαίτερης σημασίας. Πολλές από τις μοριακές αλλοιώσεις που σχετίζονται με την καρκινογένεση συμβαίνουν στα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη

διαφοροποίηση. Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν διάφορες κινάσες (MAPK) και πρωτεϊνικές κινάσες (PK) οι οποίες εμπλέκονται στενά στις φλεγμονώδεις διαδικασίες. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση ή σίγηση αυτών των κινασών ή των παραγόντων μεταγραφής τους μπορεί να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη ή σε κακοήγη μετασχηματισμό (Fresco P, 2006). Μερικά φλαβονοειδή μπορούν να διαμορφώσουν αυτά τα μονοπάτια, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και βοηθούν στην αναστολή της καρκινογένεσης (Santangelo C, 2007).

Ορισμένοι από τους βασικότερους μοριακούς μηχανισμούς δράσης των φλαβονοειδών είναι η κατασταλτική ρύθμιση της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή κινασών τυροσινάσης και πρωτεϊνών θερμικού σοκ, η δεσμευτική ικανότητα δέκτη οιστρογόνων και η αναστολή της έκφρασης των Ras πρωτεϊνών.

Οι μεταλλάξεις της p53 είναι από τις πιο κοινές γενετικές ανωμαλίες στον καρκίνο. Η αναστολή της έκφρασης της p53 μπορεί να οδηγήσει στη παραμονή των καρκινικών κυττάρων στην G2-M φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα φλαβονοειδή έχει βρεθεί ότι μειώνουν την έκφραση της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης σε σχεδόν μη-ανιχνεύσιμα επίπεδα στον καρκίνο του μαστού (Matthew, 2000). Οι κινάσες τυροσινάσης είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που βρίσκονται μέσα ή κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχουν στη μεταγωγή των σημάτων για την απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων προς τον πυρήνα. Συμμετέχουν στην ογκογένεση μέσω της ικανότητάς τους να παρακάμπτουν τον κανονικό ρυθμιστικό έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης. Φάρμακα με ανασταλτική δράση κινασών τυροσινάσης θεωρείται ότι είναι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες χωρίς κυτταροτοξικές παρενέργειες κάτι το οποίο συνήθως παρατηρείται με την συμβατική χημειοθεραπεία. Η κερκετίνη ήταν η πρώτη ανασταλτική ουσία των κινασών τυροσινάσης που δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες φάσης I (D. R. Ferry, 1996).

Πρωτεΐνες που υπόκεινται σε θερμικό σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) δημιουργούν ένα σύμπλοκο με την μεταλλαγμένη p53, που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να παρακάμψουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς αναστολής του κυτταρικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες που υπόκεινται σε θερμικό σοκ επιτρέπουν, επίσης, την αύξηση του χρόνου επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων. Τα φλαβονοειδή είναι

γνωστό ότι αναστέλλουν την παραγωγή πρωτεϊνών που υπόκεινται σε θερμικό σοκ σε πολλά είδη κακοηθών όγκων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, της λευχαιμίας και του καρκίνου του παχέος εντέρου (Matthew, 2000).

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι το φλαβονοειδές epigallocatechin-3-gallate ανέστειλε την λιπογένεση και την δραστηριότητα της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FAS) σε κύτταρα του καρκίνου του προστάτη. Η συνθάση των λιπαρών οξέων έχει συνδεθεί με τον κυτταρικό κύκλο και τον κυτταρικό θάνατο (B. Koen, 2005), (K. Brusselmans, 2003). Σε αντίθεση με τους περισσότερους ιστούς η κανονική έκφραση του FAS είναι αισθητά αυξημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η έκφραση του FAS εκδηλώνεται νωρίς στην ανάπτυξη νεοπλασίας και ενισχύεται περαιτέρω σε πιο αναπτυγμένους κυτταρικούς όγκους (J. V. Swinnen, 2002). Η κερκετίνη είναι γνωστό ότι προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε λεμφοκύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού. Πέραν της αντινεοπλασματικής της δραστηριότητας, η κερκετίνη έχει διαπιστωθεί ότι ασκεί ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης κακοηθών κυττάρων, *in vitro*, συμπεριλαμβανομένων των P-388 κύτταρων λευχαιμίας, κυττάρων καρκίνου του στομάχου (HGC-27, NUGC-2, NKN-7, και MKN-28), κυττάρων καρκίνου του παχέος εντέρου (320DM), κυττάρων καρκίνου του μαστού, γλωσσαρκωματικών κυττάρων, καθώς και κυττάρων καρκίνου των ωοθηκών (Matthew, 2000). Ο Markaverich και οι συνεργάτες του (B. M. Markaverich, 1988) πρότειναν ότι η αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων από κερκετίνη μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με περιοχές δέσμωσης οιστρογόνων (nuclear) τύπου II (EBS). Έχει πειραματικά, επίσης, αποδειχθεί ότι η αυξημένη μεταγωγή σήματος σε κύτταρα καρκίνου του μαστού είναι σημαντικά μειωμένη όταν η κερκετίνη ενεργεί ως αντιπολλαπλασιαστικός παράγοντας (R. L. Singhal, 1995).

Ο Barnes, (Barnes, 1995), έχει εξετάσει εκτενώς τις αντικαρκινικές επιδράσεις της γενιστεΐνης (genistein) σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα. Η γενιστεΐνη (genistein) βρέθηκε να καταστέλλει την ανάπτυξη του χημικά επαγόμενου καρκίνου του μαστού χωρίς αναπαραγωγικές ή ενδοκρινικές τοξικότητες. Χορήγηση της γενιστεΐνης σε νεογνά ποντίκια παρουσίασε προστατευτική δράση κατά της μεταγενέστερης ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε αυτά (C. A. Lamartiniere, 1995). Η εσπεριδίνη (hesperidin), ένας γλυκοζίτης φλαβονόνης, είναι γνωστή για την

αναστολή του καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού σε ποντίκια που προκαλείται από αζοξυμεθανόλη (azoxymethanol) (W. Ren, 2003). Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των φλαβονοειδών που περιέχονται στα εσπεριδοειδή έχουν εξεταστεί συστηματικά από τον Carroll και τους συνεργάτες του (K. K. Carroll, 1998). Αρκετές φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, και η ισοφλαβόνη βιοχανίνη Α (biochanin A) έχει αναφερθεί ότι έχουν ισχυρή αντιμεταλλαξιογόνο δράση (R. Edenharder, 1993).

Η καρβονυλο-ομάδα στον 4<sup>ο</sup> άνθρακα (C4) στον πυρήνα των φλαβονοειδών βρέθηκε να είναι απαραίτητη για τη βιοδραστικότητα τους. Το φλαβονό-8-οξικό οξύ έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχει ογκοκατασταλτική δράση (L. L. Thomsen, 1991). Σε παλαιότερες μελέτες το ελλαγικό οξύ (ellagic οξύ), η ρομπινετίνη (robinetin), η κερκετίνη (quercetin) και η μυρισετίνη (myricetin) έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την επαγόμενη από BP-7, 8-diol-9, και 10-epoxide-2 στο δέρμα του ποντικίου ογκογένεση (R. L. Chang, 1985).

Μεγαλύτερη κατανάλωση φυτοοιστρογόνων (phytoestrogens), συμπεριλαμβανομένων ισοφλαβονών και άλλων φλαβονοειδών, έχει διαπιστωθεί ότι προσφέρει προστασία εναντίον του καρκίνου του προστάτη (M. H. Siess, 1996). Είναι γνωστό ότι λόγω της οξειδωτικής καταπόνησης μπορεί να πραγματοποιηθεί καρκινογένεση και κατά συνέπεια τα ισχυρά αντιοξειδωτικά έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναστείλουν την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Η δυνατότητα ενός αντιοξειδωτικού να δράσει ως αντικαρκινικός παράγοντα εξαρτάται από την ικανότητα του να αναστείλει ή να αδρανοποιήσει πλήρως τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (S. Kumar, 2013). Συνεπώς, δίαιτες πλούσιες σε ουσίες που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μειώνουν την καρκινική δράση των ελεύθερων ριζών (T. Sawa, 1999).

## **2.5 Φλαβονοειδή και Καρδιαγγειακές παθήσεις**

Οι καλά αναγνωρισμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών έχουν μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τη δυνατότητα πρόληψης καρδιαγγειακών παθήσεων (Majewska-Wierzbicka M., 2012). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε, με σαφήνεια, τα οφέλη των διαιτητικών φλαβονοειδών για την υγεία, καθώς υπήρξε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φλαβονοειδών και της μείωσης του κινδύνου θανάτου από καρδιαγγειακά αίτια σε ενήλικες Αμερικανούς (McCullough M.L, 2012).

Συγκεκριμένα, η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων φλαβονοειδών και από τα δύο φύλα συσχετίζεται με 18% χαμηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) σε σύγκριση με εκείνους που κατανάλωναν μικρότερες ποσότητες. Μια άλλη μελέτη (Cassidy A., 2011) έδειξε πως η υψηλή κατανάλωση φλαβονοειδών, κυρίως φλαβονών και φλαβανολών, προστατεύει από την υπέρταση ενώ παρουσιάζει 8% μείωση του κινδύνου ανάπτυξής της (Cassidy A., 2011).

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πολυπαραγοντική νόσος. Η υψηλή συγκέντρωση στο αίμα οξειδωτικής τροποποιημένης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (ox-LDL), επιταχύνει την ανάπτυξή της. Άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τη φλεγμονή των αιμοφόρων αγγείων και τη διαταραχή της πήξης του αίματος (Majewska-Wierzbicka M., 2012), (D., 1999). Εξαιτίας των αντιοξειδωτικών και χηλικών ιδιοτήτων τους, τα φλαβονοειδή, αδρανοποιούν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) μειώνοντας σημαντικά την οξείδωση της LDL στο πλάσμα και βελτιώνοντας τη φλεγμονή του ενδοθηλίου των αιμοφόρων αγγείων. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή μειώνουν τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, της NADPH οξειδάσης και της λιποξυγενάσης, δηλαδή τα ένζυμα τα οποία αυξάνουν την παραγωγή ROS. Η αντι-αρτηριοσκληρωτική δράση των φλαβονοειδών σχετίζεται επίσης με τη μείωση της φλεγμονής στο τοίχωμα αιμοφόρου αγγείου μέσω αναστολής εισροής λευκοκυττάρων. Τα φλαβονοειδή μειώνουν, επίσης, τη δραστηριότητα ενζύμων, όπως 15- λιποξυγενάση (15-LOX) και κυκλοοξυγενάση (COX, ιδίως COX-2). Αυτά τα ένζυμα συμμετέχουν στο σχηματισμό προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, ουσίες που διαμεσολαβούν στη φλεγμονή από το αραχιδονικό οξύ. Μείωση της έκκρισής τους οδηγεί σε μείωση της σύνθεσης της προσταγλανδίνης PGE<sub>2</sub>, λευκοτριενίων B<sub>4</sub> και θρομβοξάνης A<sub>2</sub>, που με τη σειρά τους οδηγούν στη μείωση της φλεγμονής και της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων. Η αναστολή αυτών των ενζύμων έχει, συγχρόνως, ως αποτέλεσμα την προστασία της LDL έναντι της οξείδωσης (Majewska-Wierzbicka M., 2012).

Πέρα από την προστασία των αιμοφόρων αγγείων έναντι της ox-LDL, η αντι-αθηρωματική δράση των φλαβονοειδών είναι αποτέλεσμα της καταστολής της δραστηριότητας της 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλ-συνενζύμου A αναγωγάσης (HMG-CoA). Αυτό το ένζυμο συμβάλλει σημαντικά στη σύνθεση της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα και επηρεάζει τα επίπεδα στο πλάσμα της. Η αναστολή της

δραστικότητάς του μειώνει τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής χοληστερόλης και έχει ως αποτέλεσμα την ακόλουθη αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της LDL. Αυτό με τη σειρά του αυξάνει την κυτταρική πρόσληψη λιποπρωτεϊνών και την απομάκρυνση της χοληστερόλης από την κυκλοφορία. Η εσπερετίνη (hesperetin), είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβονοειδούς, που βρίσκεται στα λεμόνια και τα πορτοκάλια, το οποίο μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα με τον προαναφερθέντα τρόπο (Majewska-Wierzbicka M., 2012). Ενδεικτικά, μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή μελέτη, που συμπεριλαμβάνει κυτταρική καλλιέργεια, έδειξε ότι η από του στόματος χορήγηση 500mg εσπερετίνης, ημερησίως, για πάνω από 3 εβδομάδες, σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο διεγείρει το σχηματισμό μονοξειδίου του αζώτου (NO) από το ενδοθήλιο, γεγονός το οποίο σχετίζεται με τη μειωμένη δραστηριότητα των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η διαιτητική συμπλήρωση με εσπερετίνη για τρεις εβδομάδες βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία, μειώνει τη φλεγμονή και συμβάλει στη βελτίωση του λιπιδικού προφίλ ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο (Rizza S., 2011).

Έχει διαπιστωθεί πως φλαβονοειδή, όπως η ρουτίνη (rutin) και τα παράγωγά της, μαζί με την εσπερετίνη, βοηθούν στην ενίσχυση του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων (Majewska-Wierzbicka M., 2012), (Miller E., 2008). Οι ουσίες αυτές, παρομοίως με τη βιταμίνη C, ενισχύουν τη σύνθεση κολλαγόνου καθιστώντας τον συνδετικό ιστό σε αιμοφόρα αγγεία περισσότερο ελαστικό. Η ρουτίνη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται ως φάρμακο με στόχο τη ρύθμιση της διαπερατότητας των τριχοειδών αγγείων και τη βελτίωση της περιφερικής κυκλοφορίας (Miller E., 2008). Ορισμένα φλαβονοειδή, όπως η ρουτίνη ή η κερκετίνη (quercetin), χαρακτηρίζονται από αντιθρομβωτικές ιδιότητες, συμμετέχοντας στη μείωση του κινδύνου σχηματισμού θρόμβων κοντά στο κατεστραμμένο ενδοθήλιο (Majewska-Wierzbicka M., 2012). Κατά την αλληλεπίδραση με ιντεγκρίνες αιμοπεταλίων, οι ουσίες αυτές εμποδίζουν τα αιμοπετάλια να κολλάνε. Μπορούν, επίσης, να διεγείρουν το σχηματισμό NO, στο αγγειακό ενδοθήλιο, γεγονός που διευκολύνει την αγγειοδιαστολή και ως εκ τούτου διαδραματίζει καίριο ρόλο στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος (Majewska-Wierzbicka M., 2012).

Η παχυσαρκία είναι ένας σημαντικός και ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα και συνδέεται στενά με τη δυσλιπιδαιμία, την αντίσταση στην ινσουλίνη και το διαβήτη τύπου 2 (Shabrova E.V., 2011). Έρευνα σε παχύσαρκα ποντίκια ή ποντίκια με φυσιολογική μάζα σώματος τα οποία κατανάλωναν διαιτητικά συμπληρώματα φλαβονοειδών, έδειξε βελτιωμένο λιπιδικό προφίλ, μειωμένη αντίσταση στην ινσουλίνη και μειωμένο σπλαχνικό λιπώδη ιστό σε σύγκριση με δίαιτα που δεν περιελάμβανε την πρόσληψη φλαβονοειδών. Τα μη παχύσαρκα ποντίκια που κατανάλωσαν φλαβονοειδή παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα του μη-HDL αθηρογόνου κλάσματος της χοληστερόλης (Shabrova E.V., 2011). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τις προστατευτικές επιδράσεις των φλαβονοειδών στο καρδιαγγειακό σύστημα.

## 2.6 Φλαβονοειδή και Νευρικό Σύστημα

Η αποτελεσματικότητα των φλαβονοειδών στην πρόληψη των νευροεκφυλιστικών παθήσεων έχει διερευνηθεί λεπτομερώς, τα τελευταία χρόνια. Ανάλογα με τις επιμέρους ανατομοπαθολογικές και παθοφυσιολογικές ιδιότητες, οι παθήσεις αφορούν την άνοια, τη νόσο του Πάρκινσον και ασθένειες του Alzheimer. Φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή έχουν ευεργετικές ιδιότητες στη διατήρηση των ανθρώπινων γνωστικών λειτουργιών, πιθανώς μέσω της προστασίας των νευρώνων, τη βελτίωση της λειτουργίας τους και την αναγέννησή τους (Youdim K. A., 2001). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών νευροεκφυλιστικών παθήσεων ενώ με τη σειρά τους, τα φλαβονοειδή, έχει αποδειχθεί να εξουδετερώνουν αποτελεσματικά την νευρωνική οξειδωτική βλάβη.

Το φλαβονοειδές, τανγκερετίνη (tangeretin), που ανήκει στην κατηγορία των φλαβονών και συναντάται, κυρίως, στα εσπεριδοειδή φαίνεται να προστατεύει από τη νόσο του Parkinson. Ειδικότερα, η κατάσταση αυτών των ζωικών μοντέλων βασίζεται στη ραβδο σωματική βλάβη από την νευροτοξική ουσία, 6-υδροξυντοπαμίνη, που με τη σειρά της οδηγεί σε βλάβη της μελαινοραβδωτής οδού που συνδέει τη μέλαινα ουσία με το ραβδωτό σώμα. Η τελευταία είναι υπεύθυνη, μεταξύ άλλων, για το σχεδιασμό των κινήσεων του σώματος. Βλάβη αυτής της περιοχής αποτελεί τη βάση της νόσου του Parkinson. Αποδείχθηκε, ότι η tangeretin που χορηγείται σε ποντίκια περνά τον αιμοτοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ) και



προστατεύει την μελαινοραβδωτή οδό από τις δυσμενείς επιπτώσεις της 6-υδροξυτοπαμίνης (Datla K.P., 2001).

Η μελέτη **PAQUID** Επιδημιολογίας και Βιοστατιστικής, Μπορντό, που δημοσιεύθηκε το 2007, ήταν η επιδημιολογική μελέτη της γνωστικής και λειτουργικής γήρανσης του γενικού πληθυσμού, που αφορά ιδίως την επιδημιολογία της νόσου του Alzheimer και των συναφών ασθενειών, αλλά και την επιδημιολογία της εξάρτησης σε ηλικιωμένα άτομα (Letenneur L., 2007). Η μελέτη αυτή μετά από 10 χρόνια μακράς παρακολούθησης 1640 ατόμων ηλικίας άνω των 65 ετών, χωρίς άνοια κατά την έναρξή της υποστηρίζει πως τα φλαβονοειδή βοηθούν στις γνωστικές λειτουργίες των ηλικιωμένων. Τα δεδομένα σχετικά με την κατανάλωση φλαβονοειδών συγκεντρώθηκαν και αξιολογήθηκαν με τη βοήθεια ενός ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων που περιελάμβανε τρόφιμα πλούσια στις εξεταζόμενες ουσίες. Οι συμμετέχοντες των οποίων η πρόληψη ήταν υψηλότερη από 13,6mg φλαβονοειδών ανά ημέρα είχαν καλύτερη γνωστική λειτουργία μετά από 10 χρόνια σε σχέση με εκείνους που κατανάλωναν λιγότερο από 10,38mg ανά ημέρα. Τα ευρήματα αυτά απέδειξαν πως η τακτική κατανάλωση διαιτητικών φλαβονοειδών ασκεί ευεργετική επίδραση στη συντήρηση της γνωστικής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Letenneur L., 2007).

Το πλήθος των αποτελεσμάτων που αφορούν την κατανάλωση φλαβονοειδών τόσο μέσα από τα τρόφιμα, όσο μέσα από συμπυκνωμένες πηγές, φαίνεται να σχετίζεται με δύο παράλληλες διαδικασίες. Η πρώτη αφορά τη ρύθμιση του νευρωνικού σήματος, γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης που προκαλείται από τη δράση νευροτοξικών ουσιών. Αυτό προάγει την νευρωνική επιβίωση και διαφοροποίηση (Vauzour D., 2008). Σύμφωνα με τη δεύτερη, τα φλαβονοειδή φαίνεται να ασκούν ευεργετικές επιδράσεις στο περιφερειακό και κεντρικό νευρικό σύστημα, μέσω μεταβολών στις εγκεφαλική ροή του αίματος. Ειδικότερα, οι μεταβολές αυτές μπορεί να προκαλέσουν αγγειογένεση και ανάπτυξη νέων νευρικών κυττάρων στον ιππόκαμπο. Αυτές οι διεργασίες είναι, αναντίρρητα, σημαντικές για τη συντήρηση των νευρωνικών και γνωστικών λειτουργιών του εγκεφάλου (Vauzour D., 2008).

## 2.7 Φλαβονοειδή και Ηπατοπροστασία

Τα περισσότερα φλαβονοειδή όπως η κατεχίνη, η απιγενίνη, η κερκετίνη, η ναρινγενίνη, η ρητίνη και η βενορουτόνη είναι γνωστά για τις ηπατοπροστατευτικές τους ιδιότητες (A. R. Tapas, 2008). Πολλές χρόνιες ασθένειες, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, είναι πιθανό να οδηγήσουν στην κλινική εκδήλωση ηπατικών διαταραχών. Η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της γλουταμινικής-κυστεϊνικής λιγάσης (Gclc), η γλουταθειόνη και τα επίπεδα ROS βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο ήπαρ αρουραίων που πάσχουν από διαβήτη. Οι ανθοκυανίνες έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας της προληπτικής τους δράσης ενάντια σε διάφορες ασθένειες. Ο Zhu και οι συνεργάτες του (W.Zhu, 2012) έδειξαν ότι ο γλυκοζίτης της ανθοκυανίνης κυανιδίνη-3-O-β (C3G) αυξάνει την ηπατική έκφραση του γονιδίου Gclc, αυξάνοντας τα επίπεδα cAMP και ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία με την σειρά της επαναρυθμίζει την φωσφορλίωση του cAMP (CREB) και προάγει την σύνδεση CREB-DNA προκειμένου να αυξήσει την μεταγραφή του Gclc. Η αύξηση της έκφρασης του Gclc έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου στο ήπαρ. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με C3G μειώνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων στο ήπαρ, αναστέλει την απελευθέρωση των προφλεγμονόδων κυτοκινών, και προστατεύει ενάντια στην εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης (W.Zhu, 2012).

Η σιλιμαρίνη είναι ένα φλαβονοειδές που περιέχει 3 επιμέρους δομικά συστατικά. Ειδικότερα, περιέχει την συλιβίνη, την σιλιδιανίνη και την σιλιχριστίνη οι οποίες προέρχονται από τους σπόρους και το γάλα του γαϊδουράγκαθου *Silybum marianum* (Compositae). Η σιλιμαρίνη έχει αναφερθεί ότι διεγείρει την ενζυμική δραστηριότητα της DNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης I και ακολούθως την βιοσύνθεση του RNA και των πρωτεϊνών, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την βιοσύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, οδηγώντας στην αναγέννηση των ηπατοκυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη (Zetl, 1986). Η σιλιμαρίνη έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ηπατικών κυττάρων που διαταράσσεται από την FB1 (φουμονισίνη B1, μια μυκοτοξίνη που παράγεται από το μύκητα *Fusarium verticillioides*) χωρίς να τροποποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων. Στις ευεργετικές ιδιότητες της σιλιμαρίνης συγκαταλέγονται η σωστή λειτουργία της διαπερατότητας και η διατήρηση της ακεραιότητας των κυτταρικών μεμβρανών, η αναστολή της σύνθεσης λευκοτριενίων,

η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών, η καταστολή της δράσης του συστήματος NF-κB, η καταστολή των πρωτεϊνικών κινασών, και η παραγωγή κολλαγόνου (Q. He, 2002). Η σιλιμαρίνη έχει κλινικές εφαρμογές στην θεραπεία της κίρρωσης, του ισχαιμικού τραυματισμού και της τοξικής ηπατίτιδας, η οποία προκαλείται από διάφορες τοξίνες, όπως η ακεταμινοφαίνη και τα δηλητηριώδημανιτάρια (R. Saller, 2001).

Ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες έχουν παρατηρηθεί και σε φλαβονοειδή του φυτού *Laggera alata* κατά την χορήγηση τους σε απομονωμένα ηπατοκύτταρα νεογνών αρουραίων που είχαν υποστεί βλάβη, καθώς και σε αρουραίους που είχαν υποστεί ηπατική βλάβη. Τα φλαβονοειδή αυτά σε συγκέντρωση μεταξύ 1-100μg/mL βελτίωσαν την βιωσιμότητα των ηπατοκυττάρων και ανέστειλαν την διαρροή της ηπατικής αμινοτρανσφεράσης της ασπαρτάμης (AST) και της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) που προκλήθηκαν από τον CCl<sub>4</sub> (Y.Wu, 2006). Ομοίως, σε ένα *in vivo* πείραμα, η χορήγηση φλαβονοειδών σε δόσεις 50, 100 και 200 mg/kg μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των AST και ALT, τη συνολική πρωτεΐνη, την αλβουμίνη ορού, την υδροξυπρολίνη και το σιαλικό οξύ στο ήπαρ. Διάφορες ιστοπαθολογικές αναλύσεις έδειξαν περαιτέρω ότι η χορήγηση φλαβονοειδών βελτίωσε την λειτουργία του ήπατος που είχε υποστεί βλάβη (Y.Wu, 2006).

Διάφορες κλινικές έρευνες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φλαβονοειδών όταν χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ηπατοχολιφόρων δυσλειτουργιών και των προβλημάτων δυσπεψίας, όπως η αίσθηση του κορεσμού, η απώλεια όρεξης, ναυτία, και κοιλιακό άλγος. Τα φλαβονοειδή που προέρχονται από το *Equisetum arvense* καθώς και η χιρουστρίνη και η αβικυλαρίνη, οι οποίες απομονώνονται από άλλες πηγές έχουν επίσης αναφερθεί ότι παρέχουν προστασία ενάντια σε ηπατοτοξικές που προκαλούν βλάβες στα HepG2 κύτταρα (J. P. E. Spencer, 2009), (S. M. Kim, 2011).

## **Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Εντερική Διαπερατότητα**

### **3.1 Αλληλεπίδραση φλαβονοειδών με τη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα**

Η λιποφιλία των φλαβονοειδών και η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις βιολογικές μεμβράνες αποτελούν σημαντικοί παράγοντες της φαρμακολογικής τους

δραστηριότητας. Παρόμοια με τις πολυφαινόλες, πολλά флаβονοειδή περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό υδροξυλομάδων που προσδίδουν κάποια πολικότητα και ασθενείς όξινες ιδιότητες στα μόρια. Η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των υδροξυλομάδων και της λιποφιλίας των флаβονοειδών έχει αποδειχθεί και πειραματικά (C. van Dijk, 2000). Η αλληλεπίδραση με τη λιπιδική διπλοστιβάδα εξαρτάται από το pH, το οποίο καθορίζει τα ηλεκτροστατικά φορτία των флаβονοειδών και των λιπιδικών μορίων. Σύμφωνα με έναν γενικό κανόνα, μια χαμηλή τιμή pH έχει ως αποτέλεσμα μια χαμηλή αποπρωτονίωση πολικών ομάδων και κατά συνέπεια μια μεγαλύτερη διείσδυση των флаβονοειδών στη λιπιδική διπλοστιβάδα (L. Movileanu, 2000). Αν και τα περισσότερα флаβονοειδή παρουσιάζουν κάποια λιποφιλικότητα, οι γλυκοζίτες τους είναι σημαντικά πιο υδατοδιαλυτοί (Y. Zhang, 2014).

Η ικανότητα των флаβονοειδών να αλληλεπιδρούν με τις πολικές/ ή μη πολικές περιοχές της λιπιδικής διπλοστιβάδας αποδείχθηκε με διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις. Η σκέδαση ακτίνων X και οι μοριακές προσομοιώσεις απέδειξαν ότι τα флаβονοειδή quercetin, genistein και daidzein βρρίσκονται κυρίως κοντά στην πολική περιοχή της διπλοστιβάδας που αποτελείται από καρβονυλομάδες λιπαρών οξέων. Οι μακριές αλυσίδες των флаβονοειδών είναι παράλληλες, ενώ τα επίπεδα των δακτυλίων είναι κάθετα προς το επίπεδο της διπλοστιβάδας (P. Kosinova, 2012), (M. Raghunathan, 2012). Μερικά флаβονοειδή εμφανίζουν φθορισμό δύο χρωμάτων και μπορούν να χρησιμεύσουν ως ευαίσθητοι φθορίζοντες ανιχνευτές για μελέτες αλληλεπίδρασής τους με τον υδρόφοβο πυρήνα και τις πολικές περιοχές της διπλοστιβάδας (B. Pahari, 2012). Έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των флаβονοειδών, ενσωματώνονται σε μια υδρόφοβη περιοχή της αλυσίδας λιπαρών οξέων, όπου είναι καλά προστατευμένα από το νερό (S. Chaudhuri, 2010). Η ταυτομερική συμπεριφορά της 3-υδροξυφλαβόνης, αποκαλύπτει ότι το ένα κλάσμα αυτού του флаβονοειδούς βρίσκεται στον εσωτερικό υδρόφοβο πυρήνα ενώ το άλλο βρίσκεται στην επιφάνεια που αλληλεπιδρά με το υδατικό περιβάλλον (M. Mohapatra, 2009). Μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού αποκάλυψαν ότι το 15% του флаβονοειδούς, dadzein, βρίσκεται στην υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης και το υπόλοιπο διανέμεται στον υδατικό όγκο και στη διασύνδεση ύδατος/μεμβράνης (K. Dwiecki, 2009). Οι τεχνικές φασματοσκοπίας φθορισμού και ERP έδειξαν ότι το флаβονοειδές, genistein, παρεμβάλλεται στην

περιοχή της φωσφολιπιδικής κεφαλής με κάποια έκταση στην διεπαφή πολικής-άπολης επιφάνειας και σε έναν ελάχιστο βαθμό στον υδρόφοβο πυρήνα της μεμβράνης (M. Kuzdzal, 2011). Συνεπώς, έχει προταθεί ότι η genistein μπορεί να ασκήσει αντι-μεταστατικές επιδράσεις μεταβάλλοντας τις μηχανικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, ενώ η daidzein θα πρέπει να εφαρμόζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από την genistein για την επίτευξη φαρμακολογικών επιδράσεων (V. Ajdzanovic, 2013).

### **3.2 Διείσδυση φλαβονοειδών διαμέσου μεμβρανών του εντερικού επιθηλίου**

Η καθημερινή κατανάλωση φλαβονοειδών εξαρτάται από την διατροφή και κυμαίνεται από μιλιγραμμάρια έως λίγα γραμμάρια (J.A.M. Kyle, 2006), (C.Manach, 2004). Στον εντερικό αυλό, οι Ο-γλυκοζίτες των φλαβονοειδών δέχονται επίθεση από τις υδρολάσες που παρουσιάζουν πολλαπλές ενζυματικές δραστηριότητες, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αγλυκονών φλαβονοειδών. Οι αγλυκόνες κατανέμονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω των μεμβρανών του εντερικού επιθηλίου, οι οποίες καλύπτουν περισσότερο από το 90% της εντερικής επιφάνειας (A.J. Day, 2000). Η βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών είναι πολύ χαμηλή. Λιγότερο από το 1% των καταναλωθέντων φλαβονοειδών εισέρχονται στο αίμα (C. Manach, 2005).

Η υδρόλυση των γλυκοζιτών με β-γλυκοσιδάση και η επακόλουθη προσάρτηση του γλυκουρονικού οξέος συμβαίνουν μετά τη διείσδυση των γλυκοζιτών στο κυτταρόπλασμα των εντεροκυττάρων, τα οποία είναι τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (J.M. Gee, 2000). Επιπλέον, μέσω της πυλαίας φλέβας μεταφέρονται αυτές οι ουσίες στο ήπαρ, όπου μεθυλιώνονται με τις κατάλληλες τρανσφεράσες (A.I. Alvarez, 2010). Έτσι, στο αίμα, μόνο το 5-10% των φλαβονοειδών δεν έχουν τροποποιηθεί (Clifford, 2004), ενώ κυριαρχούν τα γλυκουρονίδια (L. Zhang, 2007).

Ανάμεσα στα τρόφιμα που καταναλώνονται καθημερινά, το τσάι περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό των φλαβονοειδών. Χαρακτηριστικά, το πράσινο τσάι περιέχει 30%κατεχίνες. Δύο ώρες μετά την κατανάλωση μιας κούπας, το πλάσμα του αίματος περιέχει 0,3-1,0μM κατεχίνες. Σε υψηλότερες δόσεις, η συγκέντρωση κατεχινών μπορεί να φτάνει 10μM (V.C. Reddy, 2005), (A. Sugisawa, 2002), (T. Yamamoto, 2003). Η βιοδιαθεσιμότητα σε naringenin, quercetin, hesperidin είναι χαμηλότερη

από ότι σε κατεχίνες, αλλά η συγκέντρωσή τους στο αίμα μπορεί να αυξηθεί όταν καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες φρούτων και λαχανικών (I. Erlund, 2002).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα φλαβονοειδή ξεπερνούν το υδρόφοβο φράγμα των κυτταρικών μεμβρανών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι αγλυκόνες των φλαβονοειδών είναι ελαφρώς μόνο διαλυτές στο νερό και επαρκώς λιπόφιλες για την αυθόρμητη διείσδυση μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Παρά το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να βρεθούν στην περιφέρεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας, δεν αποκλείεται το γεγονός να βρεθούν στο κέντρο της (P. Kosinova, 2012).

Οι υδατοδιαλυτοί γλυκοζίτες των φλαβονοειδών, όπως οι μονογλυκοζίτες της quercetin, αλλά όχι οι διγλυκοζίτες μπορούν να περάσουν πάνω από τις μεμβράνες του επιθηλίου μέσω μεταφορέων γλυκόζης GLUT1 (A.J. Day, 2003), (S.Wolffram, 2002) και GLUT2 (C.H. Chen, 2007). Η μετατόπιση των γλυκοζιτών της quercetin μέσω μεταφορέων βρέθηκε να είναι αποδοτικότερη από την αυθόρμητη διείσδυση των αγλυκόνων της quercetin μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας (J.M. Gee, 2000). Επιπλέον, ο κύριος μεταφορέας γλυκόζης που ρυθμίζει την ινσουλίνη, GLUT4, μπορεί επίσης να συμμετέχει στη μετατόπιση υδρόφοβων αγλυκόνων φλαβονοειδών (P. Strobel, 2005). Είναι ενδιαφέρον ότι το φλαβονοειδές genistein μπορεί να αναστέλλει αυτόν τον μεταφορέα, ρυθμίζοντας, συνεπώς, τον ινσουλινοεξαρτώμενη μεταφορά γλυκόζης στα λιποκύτταρα (M. Bazuine, 2005). Ομοίως, τα φλαβονοειδή naringenin (J.M. Li, 2006) και phlorizin (J.R. Ehrenkranz, 2005), μπορούν να μειώσουν την απορρόφηση σακχάρων από το εντερικό επιθήλιο, γεγονός που θα ήταν χρήσιμο για τη θεραπεία του διαβήτη.

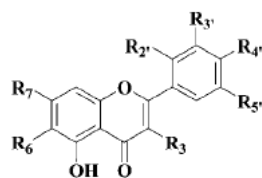
### **3.3 Εντερική διαπερατότητα των φλαβονοειδών, με την χρήση του *in vitro* μοντέλου μονοστιβάδος Caco - 2 κυττάρων**

Ο μηχανισμός απορρόφησης των φλαβονοειδών αποτελεί ένα ενδιαφέρον θέμα έρευνας. Η σχέση δομής- διαπερατότητας ορισμένων φλαβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων αγλυκόνων και γλυκοζιτών διερευνήθηκαν χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλο μονοστιβάδος Caco-2 κυττάρων (Artursson PA, 1991), (Barrington

R, 2009), (Chabane MN, 2009), (Tian XJ, 2006), (Tian XJ, 2009). Οι περισσότεροι γλυκοζίτες φλαβονοειδών είναι αδιαπέραστοι από τον εντερικό φραγμό. Ωστόσο, οι αγλυκόνες (για παράδειγμα φλαβόνες, κατεχίνες, φλαβονόνες, ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβονοειδή) μπορούν να απορροφηθούν ικανοποιητικά, μέσω παθητικής διακυτταρικής διάχυσης (Murota K, 2004), (Murota K, 2002). Ο συντελεστής κατανομής σε σύστημα ελαίου/ νερού, καθώς και ο αριθμός και η θέση των ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου βρέθηκαν να είναι οι βασικοί καθοριστικοί παράγοντες διαπερατότητας των φλαβονοειδών για την μονοστιβάδα Caco-2 κυττάρων (Tian XJ, 2009). Ορισμένα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη (quercetin) και η καμπφερόλη (kaempferol), μπορούν να μεταφερθούν κατά μήκος του επιθηλίου μέσω φορέων-διαμεσολαβητών διακυτταρικής διαδρομής (Morris ME, 2006).

Ενδεικτικά, μελετήθηκαν 6 πολλαπλά υποκατεστημένα φλαβονοειδή (selagin, apometzgerin, tricetin-3,4,5-trimethylether, quercetagetin-3,6,7-trimethylether, hispidulin και quercetagetin) τα οποία επελέγησαν έτσι ώστε να έχουν παρόμοιο βασικό σκελετό, που όμως διέφεραν οι υποκαταστάτες στον Β ετεροκυκλικό δακτύλιο (Πίνακας 3.1).

***Πίνακας 3.1: Οι χημικές δομές των εξεταζόμενων ενώσεων***



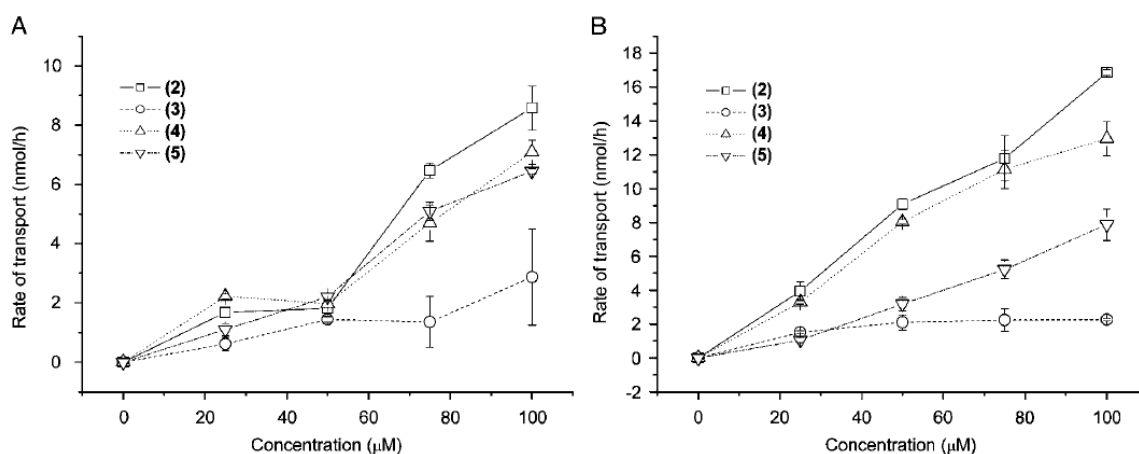
	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2'</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
Selagin (1)	H	OH	H	H	OH	OH	OMe
Apometzgerin (2)	H	OH	H	H	OH	OMe	OMe
Tricetin-3',4',5'-trimethylether (3)	H	OH	H	H	OMe	OMe	OMe
Hispidulin (4)	OMe	OH	H	H	H	OH	H
Quercetagetin-3,6,7-trimethylether (5)	OMe	OMe	OMe	H	OH	OH	H
Quercetagetin (6)	OH	OH	OH	H	OH	OH	H

Η διαπερατότητα σε όλη την Caco-2 μονοστιβάδα έξι επιλεγμένων φλαβονοειδών ήταν γραμμική συναρτήσει του χρόνου επώασης (0 έως 2,5 ώρες). Ο ρυθμός διαπερατότητας της μεμβράνης για τα φλαβονοειδή 2-5 (Πίνακας 3.1) αυξήθηκε σχεδόν γραμμικά με συγκεντρώσεις εύρους 0-100mM (Σχήμα 3.1). Ο ρυθμός μεταφοράς για την Quercetagetin (6) σε μια αρχική συγκέντρωση 200mM ήταν χαμηλός λόγω της χαμηλής διαπερατότητας. Ο ρυθμός μεταφοράς της Selagin (1) εμφάνισε μια υπερβολική απόκριση με το υπόστρωμα στο εύρος 0-200mM, ενώ η φαινομενική διαπερατότητα μειώθηκε όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος έφθασε στα 100mM. Η εκτίμηση των τιμών του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας των φλαβονοειδών οδήγησε στα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 3.2.

**Πίνακας 3.2:** Τιμές του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας και ισοζυγίου μάζας στα υπό μελέτη φλαβονοειδή στο μοντέλο των κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος Caco-2. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των ενώσεων ήταν 50mM και τα δεδομένα είναι μέσος όρος τριών ανεξάρτητων μετρήσεων.



Compound	$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/s)		$P_{app}(BL \rightarrow AP)$ to $P_{app}(AP \rightarrow BL)$ Ratio	Mass balance
	AP $\rightarrow$ BL	BL $\rightarrow$ AP		
Selagin (1)	$1.0 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.3$	2.8	$89 \pm 6$
Apometzgerin (2)	$11.1 \pm 1.0$	$13.4 \pm 1.2$	1.2	$99 \pm 4$
Tricetin-3',4',5'-trimethylether (3)	$8.0 \pm 0.4$	$7.1 \pm 0.2$	0.9	$102 \pm 4$
Hispidulin (4)	$6.6 \pm 0.9$	$12.8 \pm 0.3$	2.0	$77 \pm 6$
Quercetagein-3,6,7-trimethylether (5)	$8.1 \pm 0.7$	$7.2 \pm 0.7$	0.9	$93 \pm 4$
Quercetagein (6)	$0.2 \pm 0.1$	$\leq 0.2$	$\leq 1$	$96 \pm 4$
Propranolol	$33.7 \pm 3.2$	—	—	
Atenolol	$0.23 \pm 0.01$			



**Σχήμα 3.1:** Ο apical to basolateral (A) ή basolateral-to-apical (B) ρυθμός μεταφοράς των φλαβονοειδών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Όλα τα πειράματα διεξάχθηκαν σε τριπλέτες. Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται είναι ο μέσος όρος +/- τυπική απόκλιση.

Τα φλαβονοειδή selagin, apometzgerin, tricetin-3,4,5-trimethylether μοιράζονται τον ίδιο βασικό σκελετό αλλά διαφέρουν ως προς το βαθμό της μεθυλίωσης. Οι συντελεστές διαπερατότητας αυτών των φλαβονοειδών κυμαίνονταν στο εύρος  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  cm/s, υποδηλώνοντας διακυτταρικές οδούς διείσδυσης.

Η selagin φάνηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Το κλάσμα (2.8) του  $P_{app} BL,AP$  σε  $P_{app} AP,BL$  ήταν μεγάλο και ο  $P_{app} BL,AP$  μειώθηκε με τη συγκέντρωση του φλαβονοειδούς. Όλα αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν έναν ενεργό μηχανισμό εκροής για το selagin. Οι ρυθμοί μεταφοράς έφτασαν σε κορεσμό σε υψηλές συγκεντρώσεις ( $>100\mu M$ ), πιθανώς επειδή το selagin μπορεί να είναι το υπόστρωμα αλλά συγχρόνως και ο αναστολέας για τις πρωτεΐνες μεταφοράς και, επομένως, να μειώνει τον ρυθμό μεταφοράς σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Το φλαβονοειδές hispidulin έδειξε σχετικά καλή διαπερατότητα. Το συγκεκριμένο φλαβονοειδές φάνηκε να διαπερνά διαμέσου της μονοστιβάδας Caco-2 κυττάρων στην ακέραια μορφή του καθώς δεν εντοπίστηκαν γλυκουρονιδιωμένοι μεταβολίτες (Kanvadias D, 2004). Το χαμηλό ποσοστό ανάκτησης (περίπου 80%), ενδέχεται να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό συσσώρευσης κυττάρων εξαιτίας της μεμβράνης ή/ και της δεσμευτικής πρωτεΐνης στα Caco-2 κύτταρα. Ωστόσο, επειδή το κλάσμα (2.0) του  $Papp_{BL,AP}$  σε  $Papp_{AP,BL}$  ήταν μεγάλο, η ύπαρξη ενός μηχανισμού εκροής για το hispidulin, δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Τα φλαβονοειδή quercetagenin και quercetagenin 3,6,7-trimethylether διαφέρουν ως προς τον βαθμό μεθυλίωσης. Η μη μεθυλιωμένη quercetagenin παρουσίασε πολύ χαμηλή διαπερατότητα, υποδηλώνοντας ένα μονοπάτι παρακυτταρικής διάχυσης. Αντιθέτως, το quercetagenin 3,6,7-trimethylether παρουσίασε καλή διαπερατότητα (περίπου  $10^{-5}$  cm/s), συγκρίσιμη με την προπρανολόλη, έναν διακυτταρικό δείκτη ροής. Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεθυλίωση των υδροξυλομάδων είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για τη διαπερατότητα των φλαβονοειδών (Morris ME, 2006), (CR, 2003). Καθώς, όμως, οι φαινομενικοί συντελεστές διαπερατότητας δεν είναι ανάλογοι με τον αριθμό των μεθυλιωμένων ομάδων υδροξυλίου, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διερευνηθεί η σχέση της διαπερατότητας φλαβονοειδών με τον αριθμό και τη θέση των μεθυλομάδων υδροξυλίου.

Το εύρος του συντελεστή διαπερατότητας υποδηλώνει καλή από του στόματος απορρόφηση για τα φλαβονοειδή apometzgerin, tricetin 3,4,5-trimethylether, quercetagenin 3,6,7-trimethylether. Αυτά τα τρία φλαβονοειδή είναι μεθυλιωμένα προϊόντα, με τις μεθυλιωμένες ομάδες κυρίως στον Α δακτύλιο για το quercetagenin 3,6,7-trimethylether και στον Β δακτύλιο για τα apometzgerin, tricetin 3,4,5-trimethylether. Από αυτά, το φλαβονοειδές quercetagenin 3,6,7-trimethylether παρουσίασε τα καλύτερα υπογλυκαιμικά αποτελέσματα μεταξύ των εξεταζόμενων φλαβονοειδών, γεγονός που συσχετίζεται με την καλή απορρόφηση (Zou L, 2009). Τα φλαβονοειδή, apometzgerin και tricetin 3,4,5-trimethylether, είναι λιγότερα δραστικά, που δείχνει ότι ο Β δακτύλιος είναι πολύ σημαντικός για τη βιολογική δραστηριότητα των φλαβονοειδών.

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> Η φύση της λιποφιλίας

### 4.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον ορισμό της IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) η λιποφιλία/ λιποφιλικότητα (lipophilicity) αποτελεί την κυριότερη φυσικοχημική ιδιότητα που επηρεάζει τη μεταφορά ενός φαρμάκου και εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Είναι, δηλαδή, η ιδιότητα που καθορίζει τον μερισμό (κατανομή) κάθε ουσίας ανάμεσα στο νερό και ένα μη αναμειγνυόμενο οργανικό διαλύτη.

Η λιποφιλία αποτελεί φυσικοχημική ιδιότητα πρωταρχικής σημασίας για τη βιολογική δράση, διότι υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης επηρεάζοντας έτσι τη φαρμακοκινητική αλλά και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά.

Η λιποφιλία δεν ταυτίζεται με την υδροφοβία, η οποία είναι η συσσωμάτωση μη-πολικών ομάδων ή μορίων σε υδατικό περιβάλλον και η οποία οφείλεται στην τάση των μορίων του νερού να αποφεύγουν τα μη πολικά μόρια. Η λιποφιλία είναι σύνθετη ιδιότητα και θεωρείται ότι αποτελείται από δύο συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα όπως εκφράζεται μέσω της γενικής σχέσης (4.1).

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \quad (4.1)$$

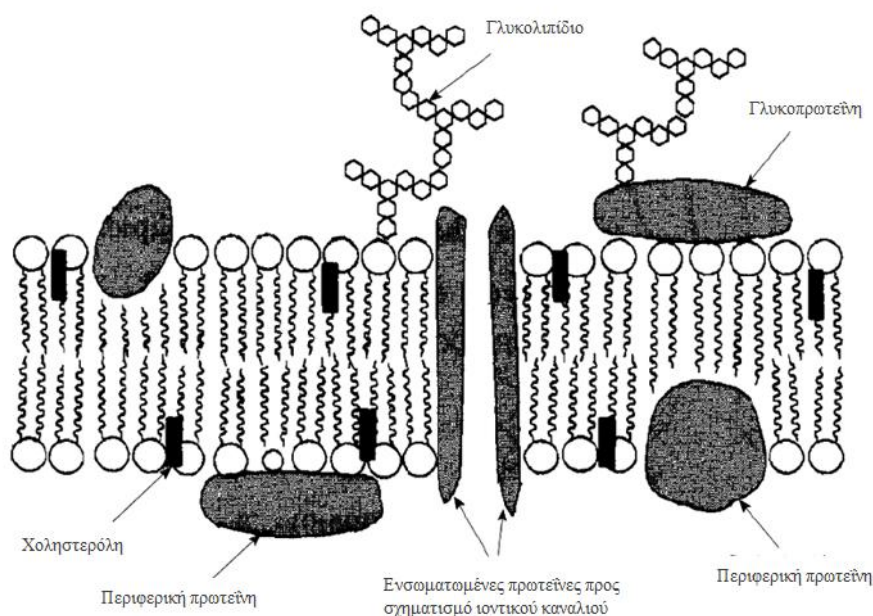
Οι συνιστώσες την παραπάνω σχέσης μπορούν να περιγραφούν με θεμελιώδεις μοριακές παραμέτρους. Η υδροφοβία μπορεί να εκτιμηθεί με παραμέτρους μοριακού όγκου, εμβαδού μοριακής επιφανείας, το μοριακό βάρος και την πολωσιμότητα ή τη μοριακή διαθλασιμότητα. Η πολικότητα εκφράζεται με τη διπολική ροπή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου καθώς και με ηλεκτρονιακές παραμέτρους.

Ο πειραματικός προσδιορισμός των τιμών logP παραμένει αναγκαίος για την αποφυγή λανθασμένων συμπερασμάτων ως προς την επίδραση της λιποφιλίας στη βιολογική δράση, ενώ παράλληλα συμβάλει στην κατανόηση της ίδιας της δομής του μορίου και στην αναγνώριση διαμοριακών/ ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με πιθανές προσαρμογές της διαμόρφωσης ανάλογα με το περιβάλλον.

## 4.2 Κυτταρικές μεμβράνες και διαπερατότητα

Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από την κυτταρική μεμβράνη, που το χωρίζει από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Η κυτταρική μεμβράνη λειτουργεί ως φραγμός διαπερατότητας που επιτρέπει στο κυτταρόπλασμα να διατηρεί σύσταση πολύ διαφορετική από εκείνη του εξωκυτταρίου υγρού. Από τα συστατικά στοιχεία των κυτταρικών μεμβρανών, οι πρωτεΐνες και τα φωσφολιπίδια είναι εκείνα που απαντούν σε μεγαλύτερη αφθονία. Στις βιολογικές μεμβράνες τα περισσότερα φωσφολιπιδικά μόρια έχουν δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας. Η φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα ελέγχει ορισμένες ιδιότητες παθητικής διαπερατότητας των βιολογικών μεμβρανών. Ουσίες που είναι ιδιαίτερα διαλυτές στο νερό διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες κατά κανόνα πολύ αργά, ενώ μη πολικές ενώσεις, που είναι περισσότερο διαλυτές σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες ταχύτερα.

Η τρέχουσα αποδεκτή δομή των τυπικών μεμβρανών είναι μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, στην οποία υπάρχουν μόρια χοληστερόλης και γλυκοπρωτεϊνών. Τα μόρια αυτά σχηματίζουν ένα μωσαϊκό μορίων που εντοπίζονται στο επίπεδο της μεμβράνης και παρουσιάζει δυναμική ρευστότητα.



**Εικόνα 4.1:** Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού για την πλασματική μεμβράνη

Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού, (Εικόνα 4.1), είναι συμβατό με πολλές ιδιότητες των βιολογικών μεμβρανών. Τα πολικά τμήματα των φωσφολιπιδίων είναι διατεταγμένα προς το εξωτερικό και τα υδρόφοβα τμήματα προς το εσωτερικό. Στο

διπλό αυτό στρώμα των φωσφολιπιδίων παρεμβάλλονται πλήθος πρωτεϊνών, μερικές από τις οποίες συνδέονται με υδατάνθρακες.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες ανήκουν σε δύο κύριες κατηγορίες: (1) ενσωματωμένες ή εσωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, που είναι «εντοιχισμένες» στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, και (2) περιφερειακές ή εξωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, που συνδέονται με την επιφάνεια της μεμβράνης. Οι περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη κυρίως μέσω ανταλλαγής ηλεκτρικών φορτίων με τις ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι περιφερικές και ενσωματωμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στις μεμβράνες είναι υπεύθυνες για την διεξαγωγή πολλών λειτουργιών των μεμβρανών όπως ότι δρουν σαν υποδοχείς μεταφοράς διαφόρων ουσιών μέσα και έξω από το κύτταρο. Ο σχηματισμός των πόρων, συμπεριλαμβανομένων των διαύλων ιόντων, σχετίζονται επίσης με τις ενσωματωμένες πρωτεΐνες (Fahr, 2011).

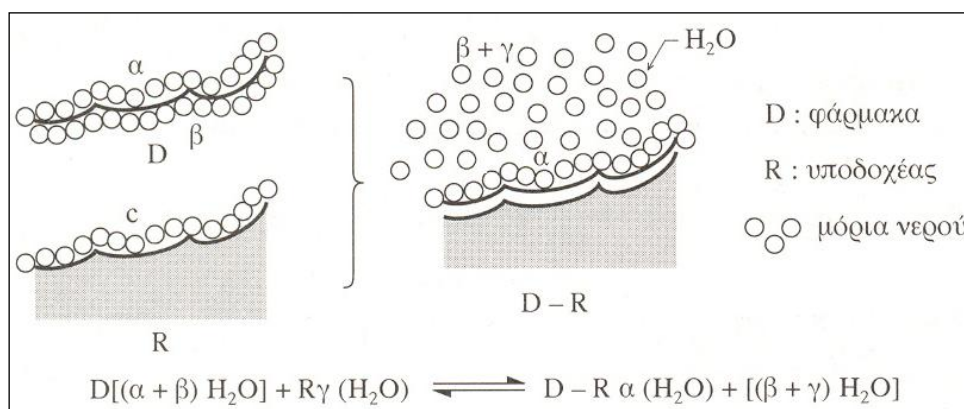
Τα λιπίδια που συνιστούν την κυτταρική μεμβράνη είναι κυρίως γλυκεροφωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη (Delattre J, 1993), (DD, 1993). Αυτά τα λιπιδικά συστατικά κατανέμονται ασύμμετρα σε όλη τη διπλοστιβάδα. Η εξωτερική μονοστιβάδα αποτελείται κυρίως από ηλεκτρικά ουδέτερα λιπίδια, όπως φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, ενώ τα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια, όπως φωσφατιδυλοσερίνη, βρίσκονται στην εσωτερική μονοστιβάδα (A., 1985). Αυτά τα μόρια λιπιδίων συγκρατούνται μαζί, μέσω ασθενών υδρόφοβων δεσμών και δυνάμεων van der Waals.

Οι μεμβράνες χωρίζουν δύο υδατικές φάσεις και αποτελούν λιπόφιλους φραγμούς τους οποίους πρέπει να περάσει το φάρμακο για να φτάσει στον τόπο δράσης. Η διείσδυση αυτή μέσω των μεμβρανών αποτελεί μια διαδικασία μερισμού (κατανομής) του φαρμάκου ανάμεσα στην λιποειδική και υδατική φάση και χαρακτηρίζεται ως *απορρόφηση*. Για την πλειοψηφία των φαρμάκων η διαπερατότητα μέσω των βιολογικών μεμβρανών λαμβάνει χώρα μέσω *παθητικής διάχυσης* και επηρεάζεται από δύο κυρίως φυσικοχημικές ιδιότητες, τη λιποφιλία και τον βαθμό ιονισμού. Η διαπερατότητα μέσω παθητικής διάχυσης πραγματοποιείται κυρίως μέσω τις διακυττάριας οδού. Στην περίπτωση αυτή ισχύει η υπόθεση «pH-μερισμού» σύμφωνα με την οποία για να απορροφηθεί μια ουσία πρέπει να υπάρχει ικανό ποσοστό της αδιάστατης μορφής (Τσαντίλη-Κακουλίδου, 1993). Η ευκολία της

παθητικής διακυτταρικής διάχυσης εξαρτάται από την ικανότητα του μορίου να κατανεμηθεί σε όλη την διπλοστοιβάδα. Για να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, η ένωση πρέπει να έχει μια βέλτιστη λιποφιλικότητα, γιατί αν η διαλυμένη ουσία είναι πολύ λιπόφιλη θα παραμένει παγιδευμένη στη μεμβράνη. Ένα μέτρο της λιποφιλικότητας μπορεί να ληφθεί με τους συντελεστές κατανομής σε διαφορετικά συστήματα διαλυτών (οκτανόλη/νερό).

### 4.3 Σχέση λιποφιλίας και φαινομένων υδρόφοβης σύνδεσης

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη σταθεροποίηση των μεμβρανών, της δομής των πρωτεϊνών καθώς και των συμπλοκών μακρομορίου-μακρομορίου (A.M. Davis, 1999), (Kauzmann, 1959). Η σταθεροποίηση αυτή λαμβάνει χώρα μέσω αύξησης της εντροπίας του συστήματος, λόγω αύξησης της αταξίας των μορίων του νερού, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.1.



**Σχήμα 4.1:** Σχηματική απεικόνιση της υδρόφοβης σύνδεσης

Η υδρόφοβη σύνδεση σχετίζεται άμεσα με την λιποφιλία των μορίων. Για τον λόγο αυτό έχουν προταθεί ημι-εμπειρικές σχέσεις οι οποίες συνήθως οδηγούν σε γραμμικές συσχετίσεις με τον συντελεστή μερισμού  $\log P$  ( $\log D$ ) καθώς και θεωρητικά μοντέλα.

### 4.4 Συντελεστής Μερισμού (Costas Giagkinis, 2008)

Η λιποφιλία εκφράζεται ποσοτικά από τον συντελεστή μερισμού (P) σε ένα διφασικό σύστημα μη μιγνύμενων διαλυτών. Όταν μια ουσία βρεθεί στο διφασικό αυτό περιβάλλον λαμβάνει χώρα ισορροπία, η οποία εκφράζεται από τον συντελεστή

μερισμού. Υπό τον όρο συντελεστής μερισμού (P) νοείται ο λόγος της συγκέντρωσης μιας μοναδικής ηλεκτρονιακής μορφής (single electrical species) της ουσίας στην οργανική φάση ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή της στο νερό και αποτιμάται με τη μορφή του λογαρίθμου του (logP) (4.2).

$$\log P = \log(C_{\text{οργ.}} / C_{\text{υδατ.}}) \quad (4.2)$$

όπου  $C_{\text{υδατ.}}$  η συγκέντρωση της αδιάστατης μονομερούς μορφής της ουσίας στην υδατική φάση και  $C_{\text{οργ.}}$  η αντίστοιχη συγκέντρωση στην οργανική φάση αντίστοιχα. Ο συντελεστής μερισμού είναι επίσης σταθερός όταν οι δυο φάσεις βρίσκονται σε επαφή μεταξύ τους, δηλαδή όταν οι συνθήκες ικανοποιούν τον νόμο κατανομής του Nernst (*σ'ένα σύστημα υγρών φάσεων μη αναμίξιμων- σ'επαφή μεταξύ τους, ο συντελεστής κατανομής της τρίτης ουσίας είναι σταθερός*).

Το ιδανικό σύστημα διαλυτών για τον πειραματικό προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού είναι αυτό του οποίου η οργανική φάση εμφανίζει ομοιότητες με τις λιποειδικές φάσεις του οργανισμού. Ειδικότερα, οι οργανικές φάσεις των συγκρινόμενων συστημάτων θα πρέπει να έχουν παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες και να μην διαφέρουν σημαντικά ως προς την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Συνεπώς, οι συντελεστές μερισμού όπως προσδιορίστηκαν σε ένα τέτοιο σύστημα διαλυτών θα μπορούν να συσχετιστούν με τους συντελεστές μερισμού σε ένα βιολογικό σύστημα όπου ο προσδιορισμός είναι, αναντίρρητα, πολύ πιο δύσκολος.

#### **4.5 Επίδραση του ιονισμού στην κατανομή (Costas Giagkinis, 2008)**

Η πρόβλεψη του συντελεστή μερισμού ή/και κατανομής πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μεθόδων υπολογισμού που βασίζονται στον προσθετικό και συντακτικό χαρακτήρα του logP/logD. Η πλειονότητα των αλγόριθμων έχει αναπτυχθεί για τον υπολογισμό του συντελεστή μερισμού (logP), δηλαδή της ουδέτερης μονομερούς (μη ιονισμένης) μορφής των μορίων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο συντελεστής μερισμού αποτελεί σημαντική έκφραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που σχετίζονται άμεσα με τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά ενός μορίου. Όμως, τα περισσότερα φαρμακομόρια εμπεριέχουν μια ή περισσότερες ομάδες που είναι ιονισμένες, ανάλογα με το pH του (βιο)περιβάλλοντος. Έτσι, ο υπολογισμός του

συντελεστή κατανομής τους ( $\log D$ ) ενδιαφέρει ιδιαίτερα για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως της διαπερατότητας βιολογικών φραγμών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο συντελεστής κατανομής ( $\log D$ ) αναφέρεται στη λιποφιλία του μίγματος όλων των υφιστάμενων ηλεκτρονιακών μορφών της ένωσης σε συγκεκριμένο pH. Ο συντελεστής κατανομής χρησιμοποιείται υπό τη λογαριθμική του μορφή ( $\log D$ ) όπως και ο πραγματικός συντελεστής μερισμού ( $\log P$ ) και είναι πάντοτε μικρότερος από αυτόν, όπως φαίνεται από τη σχέση 4.3 που τους συνδέει:

$$\log P = \log D + Q \quad (4.3)$$

όπου Q διόρθωση η οποία εξαρτάται από το  $pK_a$  της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος. Στη συνέχεια αναφέρονται οι διορθωτικοί παράγοντες Q για μονοπρωτικά οξέα, βάσεις και αμφολύτες όπως έχουν προκύψει από την εξίσωση Henderson-Hasselbach:

$$\text{Για μονοπρωτικά οξέα : } Q = \log(1+10^{pH-pK_a}) \quad (4.4)$$

$$\text{Για μονοπρωτικές βάσεις : } Q = \log(1+10^{pK_a-pH}) \quad (4.5)$$

$$\text{Για διπρωτικά οξέα: } \log(1+10^{pH-pK_{a1}}+10^{pH-pK_{a1}-pK_{a2}}), \text{ εάν } pK_{a1} < pK_{a2} \quad (4.6)$$

$$\text{Για διπρωτικές βάσεις: } \log(1+10^{pK_{a1}-pH}+10^{pK_{a1}+pK_{a2}-2pH}), \text{ εάν } pK_{a1} > pK_{a2} \quad (4.7)$$

$$\text{Για αμφολύτες: } \log(1+10^{pH-pK_{a1}}+10^{pH-pK_{a2}}), \text{ εάν } pK_{a2} \text{ (οξύ)} > pK_{a1} \text{ (βάση)} \quad (4.8)$$

#### 4.6 Προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού/ κατανομής ως μέτρο της λιποφιλίας

Ποσοτική έκφραση της λιποφιλίας αποτελεί ο συντελεστής μερισμού ή κατανομής P (Partition Coefficient). Ο συντελεστής μερισμού/κατανομής προσδιορίζεται με άμεσες μεθόδους όπως η κλασσική μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (shake-flask method), η ποτενσιομετρική μέθοδος και η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (CPC). Εναλλακτικά, μπορεί έμμεσα να προσδιοριστεί με σύγχρονες χρωματογραφίες



αντιστρόφου φάσεως όπως Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (RP-TLC), που έχει αποδειχθεί ότι προσομοιώνουν την κατανομή σε σύστημα οκτανόλης/νερού και θεωρούνται ιδανικές εναλλακτικές τεχνικές για την εκτίμηση της λιποφιλίας. Οι συγκεκριμένες τεχνικές πλεονεκτούν έναντι άλλων λόγω της ταχύτητας, της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας, της μεγάλης δυναμικής περιοχής μετρήσεων ενώ συγχρόνως δεν απαιτούν μεγάλες ποσότητες των εξεταζόμενων ουσιών και δεν υπεισέρχονται σφάλματα λόγω έλλειψης καθαρότητας (Axel Andrés a, 2015). Οι έμμεσες μέθοδοι επιτρέπουν τον προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού μέσω καμπύλης αναφοράς. Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητικές προσπάθειες εστιάζονται στην αντιστοίχιση των χρωματογραφικών δεικτών όπως προκύπτουν από τις έμμεσες χρωματογραφικές τεχνικές με τους συντελεστές μερισμού ή κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού.

## **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> Χρωματογραφικές Τεχνικές**

### **5.1 Αντιστρόφου Φάσεως Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)**

Η αντιστρόφου φάσεως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί την πλέον διαδεδομένη τεχνική για την εξαγωγή δεικτών λιποφιλίας. Τα τελευταία χρόνια τείνει να αντικαταστήσει την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας δεδομένου ότι παρέχει πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα, ως αποτέλεσμα μεγαλύτερου αριθμού θεωρητικών πλακών και χαρακτηρίζεται από καλύτερη ευαισθησία. Είναι ευκολότερο επίσης να επιτευχθεί σταθεροποίηση και έλεγχος των πειραματικών συνθηκών απ' ό,τι στην TLC, ενώ είναι δυνατόν να εξασφαλιστεί πλήρης αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.

Η χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) αποτελεί έναν ειδικό τύπο χρωματογραφίας που ανήκει στη χρωματογραφία κατανομής και στη χρωματογραφία προσρόφησης. Η RP-HPLC περιγράφει μια κατάσταση όπου η στατική φάση είναι μικρότερης πολικότητας από την κινητή φάση.

Το νερό επηρεάζει σημαντικά την εκλουστική ισχύ στην RP-HPLC. Ειδικότερα, το νερό δε μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πολικές αλκυλομάδες που

φέρει η χημικά συνδεδεμένη στατική φάση λόγω της υδροφοβίας των ομάδων αυτών. Συνεπώς, θεωρείται ότι το νερό αποτελεί μια κινήτη φάση με τη χαμηλότερη εκλουστική ισχύ από τους υπόλοιπους διαλύτες. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του νερού στην κινήτη φάση, τόσο μεγαλύτεροι χρόνοι συγκράτησης παρατηρούνται κατά τη διάρκεια μιας χρωματογραφικής διαδικασίας.

### **5.1.1 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία στην RP-HPLC**

Στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία ως στατική φάση συνήθως χρησιμοποιείται υπόστρωμα σίλικα το οποίο έχει επικαλυφθεί με υγρή στατική φάση μη πολικού χαρακτήρα ή υπόστρωμα σίλικα η οποία έχει υποστεί χημική κατεργασία με κάποια αντιδραστήρια και η επιφάνεια της πλέον φέρει αλυσίδες μήκους 18 ατόμων άνθρακα ( $C_{18}$ ) ή μήκους 8 ατόμων άνθρακα ( $C_8$ ) (Martin, 1941). Εναλλακτικά, μπορεί να φέρει άλλες ομάδες με αποτέλεσμα να τροποποιείται τελείως η δραστική επιφάνεια της σίλικα. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στατική φάση για τον προσδιορισμό δεικτών λιποφιλίας είναι αυτή με τα δεκαοκτώ άτομα άνθρακα (ODS: Octadecylsilane), διότι θεωρείται ότι προσομοιώνει καλύτερα την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού.

### **Άλλες στατικές φάσεις στην RP-HPLC**

Ειδικότερα, για την εξαγωγή δεικτών λιποφιλίας χρησιμοποιούνται επίσης οι εξής στατικές φάσεις αντιστρόφου φάσεως:

**α) στατικές φάσεις που φέρουν πολυμερές οκταδεκυλιωμένης πολυβινυλαλκοόλης (ODP: Octadecylpolyvinyl copolymer) (H. van de Waterbeemd, 1996)**

Αυτές οι στατικές φάσεις δεν έχουν περιορισμούς ως προς το pH και είναι απαλλαγμένες από σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις, διότι δεν έχουν ως υλικό στήριξης πήγμα διοξειδίου του πυριτίου. Μειονεκτούν στο γεγονός ότι λόγω της υψηλής υδροφοβίας τους, απαιτείται μεγάλος χρόνος για τη σταθεροποίηση της στήλης, ενώ οι χρόνοι ανάσχεσης είναι μεγαλύτεροι σε σχέση με αυτούς που λαμβάνονται με τις στήλες σιλανοποιημένου πήγματος διοξειδίου του πυριτίου. Τα προβλήματα αυτά γίνονται εντονότερα εάν η κινήτη φάση περιέχει μεγάλο ποσοστό νερού και περιορίζονται με τη χρήση μικρότερης στήλης.

## **β) Στατικές φάσεις εμποτισμένες με οκτανόλη (H. van de Waterbeemd, 1996)**

Για την καλύτερη προσομοίωση του συστήματος οκτανόλης-νερού επιχειρήθηκε η κατασκευή στατικών φάσεων που αποτελούνται από υλικά εμποτισμένα με οκτανόλη (R. Mannhold et al, 1996). Ως προσροφητικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν σιλανοποιημένη γη διατομών (Kieselgur), καθώς και πήγμα διοξειδίου του πυριτίου, πάνω στα οποία δημιουργήθηκε ένα λεπτό στρώμα οκτανόλης (M.S. Mirtlees, 1976). Η κινητή φάση αποτελούνταν από νερό κορεσμένο σε οκτανόλη. Οι προσδιορισμοί όμως των δεικτών λιποφιλίας δεν έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα και οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών  $\log k$  και  $\log P$  ήταν κατώτερες από αυτές που λαμβάνονται με τις χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις C-8 και C-18. Η οκτανόλη λόγω του ότι δεν είναι χημικά συνδεδεμένη με το πήγμα οξειδίου του πυριτίου, απομακρύνεται σταδιακά από τη στήλη, με συνέπεια έλλειψη της σταθερότητας της στήλης και κακή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η μελέτη των πολύ λιπόφιλων ουσιών ήταν ουσιαστικά αδύνατη, αφού η προσθήκη οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση επιβάρυνε ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα της στήλης. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιήθηκαν αναγεννώμενες στατικές φάσεις οκτανόλης, όπου με κατάλληλες διαδικασίες αποφεύγεται το φαινόμενο της αποβολής μέρους της στατικής φάσης κατά την χρωματογραφική διαδικασία (M. Cichna, 1995). Στην περίπτωση αυτή, η σταθερότητα της στήλης ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα και εφόσον διαπιστωθεί πρόβλημα εισάγεται στην στήλη κινητή φάση κορεσμένη σε οκτανόλη, ώστε να αποκατασταθεί η πιθανή απώλειά της από τη στατική φάση.

Άλλες στατικές φάσεις οι οποίες αναπτύχθηκαν σχετικά πρόσφατα είναι οι στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM: Immobilized Artificial Membranes) (C.Y. Yang, 1997), οι οποίες θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια.

### **5.1.2 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία στην RP-HPLC**

Η κινητή φάση στην RP-HPLC μπορεί να είναι σταθερής σύνθεσης όπου το ποσοστό των διαλυτών στην κινητή φάση είναι σταθερό καθόλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής διαδικασίας (ισοκρατική χρωματογραφία). Εναλλακτικά, μπορεί να είναι μεταβαλλόμενης σύνθεσης, όπου το ποσοστό των διαλυτών μεταβάλλεται έτσι ώστε να μεταβάλλεται η εκλουστική ισχύς της κινητής φάσης (βαθμωτή χρωματογραφία). Η ισοκρατική χρωματογραφία χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό

μίγματος με μικρό αριθμό ενώσεων ενώ αντίθετα η βαθμωτή προτιμάται στο διαχωρισμό μίγματος με μεγάλο αριθμό ενώσεων.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κινητές φάσεις στην RP-HPLC, είναι μίγματα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με κάποιον οργανικό τροποποιητή, συνήθως μεθανόλη (MeOH), ακετονιτρίλιο (ACN) ή τετραυδροφουράνιο (THF). Ωστόσο, το ACN βρέθηκε να έχει τις περισσότερες ασύμμετρες κορυφές στην ανάλυση οργανικών βάσεων (Cimpran, et al., 1998). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αδυναμία του ακετονιτριλίου να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανόλες, σε αντίθεση με τη μεθανόλη και το THF.

Στα πλαίσια εκτίμησης της λιποφιλίας, η MeOH φαίνεται να είναι ο καταλληλότερος οργανικός τροποποιητής για την RP-HPLC, καθώς δε μπορεί να διαταράξει το δίκτυο δεσμών υδρογόνου του ύδατος (Karger, et al., 1976). Ειδικότερα, τα μόρια της μεθανόλης λόγω του μικρού τους μεγέθους και της σχετικής ομοιότητας με το νερό δεν διαταράσσουν πολύ τη συντεταγμένη δομή των μορίων του νερού, ενώ λόγω του υδροξυλίου που διαθέτουν παρουσιάζουν την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου τόσο ως δέκτες όσο και ως δότες πρωτονίων. Συγκριτικά με το νερό, η μεθανόλη εμφανίζεται ως ασθενέστερος δότης και ελαφρώς ισχυρότερος δέκτης πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου (N. El Tayar, 1985). Ωστόσο, τα προβλήματα που εμφανίζονται όταν χρησιμοποιείται μεθανόλη ως οργανικός τροποποιητής είναι οι σχετικά μεγάλοι χρόνοι ανασχεσης λόγω της χαμηλής της λιποφιλίας. Επίσης, η μεθανόλη οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους της κινητής φάσης με αποτέλεσμα αύξηση της πίεσης στην κορυφή της στήλης (Πούλου, 1997).

Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος του υδατικού μέρους της κινητής φάσης έχει, επίσης, ιδιαίτερη σημασία για τη συγκράτηση των πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων οι οποίες μπορούν να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων με τα αντισταθμιστικά ιόντα. Το ρυθμιστικό διάλυμα MOPS (3-(N μορφολινο)προπανοσουλφονικό οξύ), θεωρείται το πλέον κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την εκτίμηση της λιποφιλίας με την τεχνική της HPLC (Tsantili-Kakoulidou, et al., 1987), (Minick, et al., 1988), (Lombardo, et al., 2001). Το διάλυμα MOPS εμφανίζει μια μεγάλη ικανότητα ρύθμισης του pH, σε συνδυασμό με μικρή ικανότητα σχηματισμού ζεύγους ιόντων λόγω της αμφολυτικής ιοντικής φύσης του

και ως εκ τούτου δεν αλληλεπιδρά με τους αναλύτες ή με τη στατική φάση δεδομένου ότι δεν σχηματίζονται εσωτερικά άλατα (Tsantili-Kakoulidou, 2008).

Αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία χρόνια προτείνεται επίσης η προσθήκη μικρής ποσότητας οκτανόλης στην κινητή φάση, ώστε να προσομοιώνει καλύτερα το χρωματογραφικό σύστημα με το σύστημα οκτανόλης-νερού. Γενικά, παρουσία οκτανόλης λαμβάνονται μικρότεροι χρόνοι ανάσχεσης ίσως λόγω επικάλυψης των σιλανόφιλων θέσεων (C. Giaginis, 2006).

## **5.2 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial membrane chromatography)**

Ο κύριος λόγος χρήσης ενός χρωματογραφικού συστήματος για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας είναι η δημιουργία ενός μοντέλου που περιγράφει τη διαδικασία μεταφοράς ενός φαρμάκου διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών (Xiangli Liu, 2011). Η επιλογή του συστήματος *n*-οκτανόλης-νερού για τη διαμόρφωση μιας πρότυπης κλίμακας λιποφιλίας που προσομοιώνει τις βιολογικές μεμβράνες έχει δεχτεί πολλές κριτικές και θέμα μελέτης για να διαπιστωθεί η δυνατότητα ενός διαλύτη να αποτελέσει ρεαλιστικό μοντέλο της διπλοστιβάδας των λιπιδίων. Αντίθετα τα λιποσώματα φωσφολιπιδίων, αποτελούμενα από διπλοστιβάδες λιπιδίων, εμφανίζουν περισσότερες ομοιότητες με τις κυτταρικές μεμβράνες, και θεωρούνται ότι αποτελούν άμεσα μοντέλα των βιολογικών μεμβρανών. Οι δυσκολίες ωστόσο στην παρασκευή πρότυπων λιποσωμάτων και στη σταθερότητάς τους αλλά και τα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων κατανομής, αποτελούν τους λόγους για τους οποίους τα λιποσώματα δεν μπόρεσαν μέχρι στιγμής να βρουν ευρεία εφαρμογή ως εναλλακτικό σύστημα για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας.

Η χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM) από την άλλη, χρησιμοποιώντας στατικές φάσεις που περιέχουν φωσφολιπίδια, συνδυάζει την κατανομή σε μεμβράνες με την ταχύτητα και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Ως εκ τούτου η τεχνική αυτή προσελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί συσχετίσεις χρωματογραφικών δεδομένων που προκύπτουν από στήλες IAM με τους συντελεστές κατανομής στο

σύστημα οκτανόλης-νερού και σε λιποσώματα φωσφατιδυλοχολίνης καθώς και με μεγέθη διαπερατότητας και άλλες φαρμακοκινητικές παραμέτρους.

Οι στατικές φάσεις IAM αποτελούνται από μονοστιβάδες φωσφολιπιδίων (κυρίως φωσφατιδυλοχολίνης) ομοιοπολικά συνδεδεμένων στο σκελετό του πηγματος οξειδίου του πυριτίου μέσω ομάδων προπυλαμίνης. Οι στήλες διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο δέσμευσης των υπολειπόμενων ομάδων προπυλαμίνης και ως προς την παρουσία *μονο-ή δισ-*ακυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης. Στον Σχεδιασμό Φαρμάκων χρησιμοποιούνται συνήθως στήλες φωσφατιδυλοχολίνης με διπλή αλυσίδα, η IAM.PC.MG και η IAM.PC.DD2, μήκους 30-150mm και 10-150mm, αντιστοίχως, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την *Regis Technologies*.

### 5.2.1 Χρωματογραφικές συνθήκες στην χρωματογραφία IAM

Τα χρωματογραφικά μεγέθη που χαρακτηρίζουν τη χρωματογραφία IAM δεν διαφέρουν από τα αντίστοιχα της αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας. Η συγκράτηση των ουσιών στη στατική φάση και κατά συνέπεια η συγγένεια τους με τις τεχνητές μεμβράνες, εκφράζεται με τον παράγοντα χωρητικότητας ( $k$ ) ο οποίος αντιπροσωπεύει το λόγο του αριθμού των μορίων της ουσίας που κατανέμονται στη στατική φάση προς τον αριθμό των μορίων στην κινητή φάση μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας (5.1).

$$k = n_{\text{στατ}}/n_{\text{κιν}} \quad (5.1)$$

Ο παράγοντας χωρητικότητας όπως και στην αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία προσδιορίζεται από το χρόνο συγκράτησης  $t_r$  της ουσίας και το νεκρό χρόνο  $t_0$  και χρησιμοποιείται υπό τη λογαριθμική του μορφή (σχέση 5.2).

$$\log k_{IAM} = \log [t_r - t_0/t_0] \quad (5.2)$$

Ο δείκτης λιποφιλίας που λαμβάνεται από την IAM χρωματογραφία είναι ο συντελεστής  $\log k_{IAMw}$  σε 100% υδατική φάση. Για τις υδρόφιλες ενώσεις, ο  $\log k_{IAMw}$  μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας με τη χρήση της υδατικής κινητής φάσης. Για τα λιπόφιλα φάρμακα, είναι απαραίτητο να προστεθεί ένας οργανικός

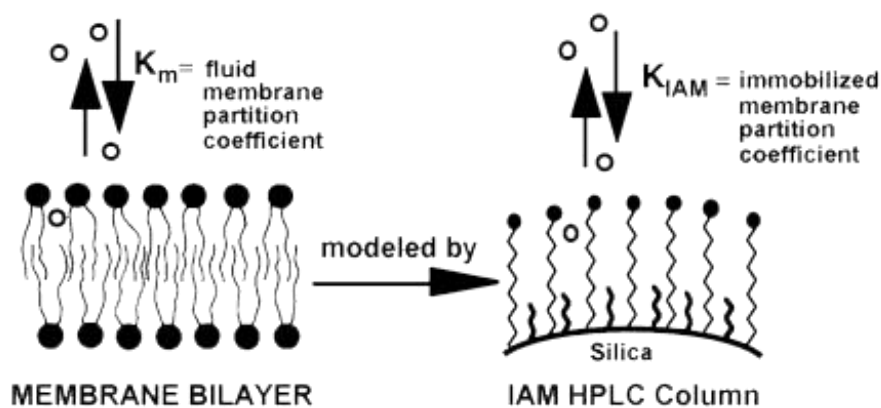
τροποποιητής (μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο) στην κινητή φάση έτσι ώστε να επιταχυνθεί η έκλουση. Σε αυτήν την περίπτωση, ο  $\log k_{IAMw}$ , μπορεί να προσδιοριστεί από τον παράγοντα κατακράτησης  $\log k$  ισοκρατικής έκλουσης, σε διαφορετικές αναλογίες οργανικού τροποποιητή φ, χρησιμοποιώντας τη Σχέση 5.3.

$$\log k' = -S\phi + \log k_w \quad (5.3)$$

όπου  $\log k_w$  η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας που αντιστοιχεί σε κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα και S η κλίση της ευθείας (Xiangli Liu, 2011).

### 5.2.2 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία IAM

Οι κυτταρικές μεμβράνες παρέχουν ένα σταθερό περιβάλλον για την προστασία των οργανιδίων ενώ συγχρόνως προστατεύουν τα κύτταρα από την είσοδο ανεπιθύμητων σωματιδίων. Έχει γίνει όλο και πιο σαφές ότι οι αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-μεμβράνης είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη δραστηριότητα του φαρμάκου, την επιλεκτικότητα και την τοξικότητα (J.K. Seydel, 2002). Για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-μεμβράνης και τις συναφείς φυσιολογικές δραστηριότητες, οι τεχνητές μεμβράνες, οι οποίες έχουν πολλές εντυπωσιακές ομοιότητες με τις αντίστοιχες βιολογικές μεμβράνες, έχουν αναπτυχθεί ως απλά μοντέλα, για να μιμηθούν το μεμβρανώδες περιβάλλον του κυττάρου, με διάφορες τεχνικές (Quinn, 1976). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τεχνική της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM), αποτελούμενες από στατικές φάσεις μονοστιβάδων φωσφολιπιδίων ομοιοπολικά συνδεδεμένων στο σκελετό του πήγματος οξειδίου του πυριτίου (*Εικόνα 5.1*) (C. Pidgeon, 1989), (P. Artursson, 1991), οι οποίες έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για την πρόβλεψη μεταφοράς φαρμάκων διαμέσου της μεμβράνης καθώς και τον καθαρισμό πρωτεϊνών (P. Artursson, 1991), (K.L. Valko, 2011), (M.E. Scharf, 1998).



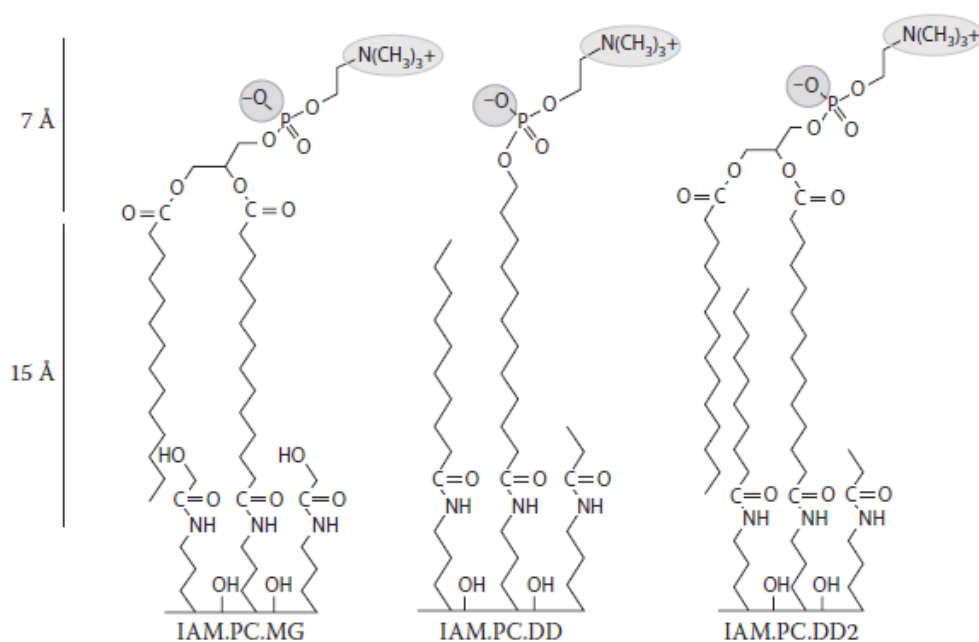
**Εικόνα 5.1:** Οι IAM επιφάνειες αποτελούνται από στατικές φάσεις μονοστιβάδων φωσφολιπιδίων ομοιοπολικά συνδεδεμένων στο σκελετό του πηγματος οξειδίου του πυριτίου. Τα αποτελέσματα από τη στήλη IAM συσχετίζονται, επαρκώς, με τις κλασσικές *in vitro* μεθόδους, όπως είναι κύτταρα του εντερικού ιστού και Caco-2 κύτταρα, αλλά είναι ταχύτερη και φθηνότερη.

Η πρώτη IAM στήλη πυριτίου, η οποία αναφέρθηκε ως IAM.PC, παρασκευάστηκε με την ομοιοπολική σύνδεση της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) στον σκελετό του πηγματος οξειδίου του πυριτίου, μέσω των  $\omega$ -καρβοξυλικών ομάδων της C2 αλυσίδας λιπαρών οξέων από τον Charles Pidgeon το 1989 προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού (C. Pidgeon, 1989). Η παρουσία υπολειπόμενων μορίων προπιλαμίνης προκαλεί μείωση τη χημικής σταθερότητας των IAM.PC επιφανειών της στατικής φάσης και επηρεάζει τη χρωματογραφική συμπεριφορά, αυξάνοντας τη συγκράτηση όξινων μορίων και μειώνοντας τη συγκράτηση βασικών ενώσεων (R.J. Markovich, 1989), (R.J. Markovich, 1991). Προκειμένου να βελτιωθεί η χημική σταθερότητα των IAM.PC επιφανειών, οι υπολειμματικές ελεύθερες προπιλαμίνες επικαλύπτονται με γλυκιδόλη/ μεθυλο-γλυκολικό οξύ (MG) ή δεκανοϊκό/προπιονικό ανυδρίτη (C. Pidgeon, 1991). Η εμπορικά διαθέσιμη στατική φάση αυτού του τύπου είναι η **IAM.PC.MG** και η **IAM.PC.DD2**, αντιστοίχως. Για να αυξηθεί η επιφανειακή πυκνότητα των φωσφολιπιδίων και κυρίως η πυκνότητα των πολικών κεφαλών και η σταθερότητα της στήλης σε όξινες συνθήκες, παρασκευάστηκε μια στήλη φωσφατιδυλοχολίνης μονής αλυσίδας με την εμπορική ονομασία **IAM.PC.DD** (S. Ong, 1995) (Εικόνα 5.2). Ωστόσο, οι ομάδες σιλανόλης που δεν αντέδρασαν και οι υπολειμματικές αμινοομάδες εξακολουθούν να υπάρχουν στις IAM επιφάνειες (R.J. Markovich, 1991), (D. Rhee, 1994), γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει



σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις και υδρόλυση αμιδικών δεσμών. Το πρόβλημα των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στη χρωματογραφία IAM δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με προσθήκη υδρόφοβων αμινών στην κινητή φάση (πχ. δεκυλαμίνη), δεδομένου ότι αυτές θα αλληλεπιδράσουν όχι μόνο με τις σιλανόφιλες ομάδες αλλά και με τις φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Οι επίπονες διαδικασίες παρασκευής τους περιορίζουν την εφαρμογή τους στο εργαστήριο. Ως εκ τούτου, έχει μεγάλο ενδιαφέρον η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου παρασκευής IAM στατικών φάσεων. Πρόσφατα, ο Verzele και οι συνεργάτες του (D. Verzele, 2012), ετοίμασαν για πρώτη φορά μια στήλη IAM σφιγγομυελίνης, χρησιμοποιώντας το αμίδιο ως υποκαταστάτη των εστέρων της IAM.PC, μέσω μιας μεθόδου σύνθεσης στερεάς φάσης, η οποία όχι μόνο αυξάνει την αξιοπιστία και τη διάρκεια ζωής της στήλης, αλλά συγχρόνως παρέχει ένα *in vitro* μοντέλο πρόβλεψης για την διαπερατότητα των φαρμάκων μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Παρόλο που οι IAM επιφάνειες έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα λιποσώματα, τα δύο αυτά συστήματα παρουσιάζουν, επίσης, ορισμένες σημαντικές διαφορές. Το IAM σύστημα είναι στερεής φάσης, όπου μια μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το σκελετό του πυριτίου. Εν αντιθέσει, τα λιποσώματα, αποτελούν μια ρευστή φάση, όπου κάθε κυστίδιο σχηματίζεται από μία διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, η οποία διαχωρίζει την εξωτερική από την εσωτερική υδατική φάση. Κατά συνέπεια, στην IAM επιφάνεια, τα ακινητοποιημένα φωσφολιπίδια είναι πιο διατεταγμένα και υποβαθμισμένα από τις μοριακές δυνάμεις. Επίσης, η πυκνότητα των πολικών κεφαλών στην IAM επιφάνεια είναι μικρότερη από αυτήν στα λιποσώματα. Ωστόσο, και στα δύο συστήματα οι ομάδες χολίνης επιδεικνύουν μεγαλύτερες κινησιακές διακυμάνσεις από τις φωσφορικές ομάδες και υπάρχει ανάλογη κατανομή του νερού κοντά στις πολικές κεφαλές (Q. Sheng, 1995). Όσον αφορά τα δομικά χαρακτηριστικά, τα συνθετικά φωσφολιπίδια στην IAM επιφάνεια είναι πλήρως κορεσμένα και περιέχουν συνήθως ακυλο αλυσίδες με άτομα 16 άνθρακα (συμπεριλαμβανομένου της προπυλαμίνης), ενώ το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φωσφολιπίδιο για προετοιμασία λιποσωμάτων περιέχει πλέον ακυλο αλυσίδες και *cis* διπλούς δεσμούς (S. Ong, 1996), (Lasic, 1993).



**Εικόνα 5.2:** Στατικές φάσεις IAM φωσφατιδυλοχολίνης. Κυκλωμένα είναι τα αρνητικά και θετικά φορτισμένα κέντρα.

Συγκριτικές μελέτες για τις τρεις στατικές φάσεις έδειξαν ότι αυτές εμφανίζουν ανάλογη συμπεριφορά, με τους εξαγόμενους παράγοντες χωρητικότητας να έχουν πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ τους, να αποκλίνουν όμως από την ένα προς ένα συσχέτιση λόγω του διαφορετικού υδρόφοβου χαρακτήρα των στηλών (Ong, et al., 1995), (Taillardat-Bertschinger, et al., 2002). Συγκεκριμένα ο υδρόφοβος χαρακτήρας των τριών στατικών φάσεων ακολουθεί την αύξουσα σειρά:

$$\text{IAM.PC.DD} < \text{IAM.PC.MG} < \text{IAM.PC.DD2.}$$

Οι χρωματογραφικοί δείκτες που προσδιορίζονται με την διπλής αλυσίδας στατική φάση IAM.PC.MG διαπιστώθηκε ότι δίνουν καλύτερες συσχετίσεις με βιολογικά δεδομένα συγκριτικά με τους χρωματογραφικούς δείκτες που προσδιορίζονται με την απλής αλυσίδας IAM.PC.DD (Markovich, et al., 1989), (Barbato F., 2004). Θεωρήθηκε ως εκ τούτου ότι η διπλή αλυσίδα προσομοιώνει καλύτερα τη δομή των φυσικών φωσφολιπιδίων. Δεν υπάρχουν ωστόσο αντίστοιχες πληροφορίες για τις στήλες IAM.PC.DD2.

### 5.2.3 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία IAM

Οι IAM στήλες, εν αντιθέσει με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, επιτρέπουν τη χρήση υδατικών κινητών φάσεων χωρίς την προσθήκη οργανικού τροποποιητή. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα να υπολογιστούν απευθείας οι τιμές  $\log k_w$ , μειώνοντας σημαντικά το χρόνο ανάλυσης (Tsantili-Kakoulidou, 2008). Η δυνατότητα αυτή αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα της χρωματογραφίας IAM γιατί το νερό έχει την μικρότερη εκλουστική ισχύ από όλους τους διαλύτες, διότι δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις υδρόφοβες αλκυλομάδες που φέρει η χημικά συνδεδεμένη στατική φάση. Κατά συνέπεια, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση, τόσο μεγαλύτεροι είναι οι χρόνοι ανάλυσης που παρατηρούνται. Για ιονιζόμενες ενώσεις, συνήθως, το pH ρυθμίζεται με ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer saline, PBS). Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (**Phosphate Buffer Saline**: 8.00 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού, ενώ η αυξημένη ιονική ισχύς του δημιουργεί σταθερές συνθήκες ως προς το σχηματισμό ιοντικών ζευγών. Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS χρησιμοποιείται συνήθως στις στήλες IAM. Τα όρια του pH της στήλης περιορίζουν τη μέτρηση σε ένα εύρος pH 2,5 έως 7,4. Πολλοί συγγραφείς προτιμούν τη χρήση του pH 7, το οποίο προσεγγίζει το φυσιολογικό pH του αίματος και είναι αναντίρρητα ασφαλέστερο για τη στήλη (Espinosa, et al., 2002), (Markovich, et al., 1989).

Στην περίπτωση ενώσεων με μεγάλη συγγένεια με την επιφάνεια της στήλης IAM, η προσθήκη οργανικού τροποποιητή και η εξαγωγή ανηγμένων τιμών του παράγοντα χωρητικότητας,  $\log k_w$ , είναι αναγκαία. Ειδικότερα, ο καταλληλότερος οργανικός τροποποιητής είναι το ακετονιτρίλιο (ACN), σε αντίθεση με τη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως όπου συνιστάται η χρήση μεθανόλης. Στη χρωματογραφία IAM η μεθανόλη αποφεύγεται διότι είναι δυνατό να προκαλέσει μεθανόλυση των φωσφολιπιδίων της στατικής φάσης συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του χρόνου ζωής της στήλης. Το ακετονιτρίλιο είναι πιο υδρόφοβο από τη μεθανόλη και έτσι παρατηρείται μείωση των χρόνων ανάλυσης των ουσιών και δεν απαιτούνται μεγάλα ποσοστά. Εάν το ποσοστό ακετονιτριλίου δεν υπερβαίνει το 30% της σύστασης της κινητής φάσης θεωρείται ότι δεν προκαλεί σημαντική διατάραξη της διάταξης των μορίων του νερού. Στην περίπτωση που γίνεται προσθήκη οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση οι τιμές  $\log k_w$  ανακτώνται από τη

γραμμική εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς (Morse, et al., 2001), (Rhee, et al., 1994), (Taillardat-Bertschinger, et al., 2002).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

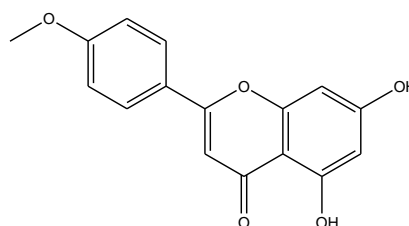
**Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών φλαβονοειδών με τη χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών και συσχετίσή τους με την εντερική διαπερατότητα**

### **6.1 Εξεταζόμενες Ενώσεις**

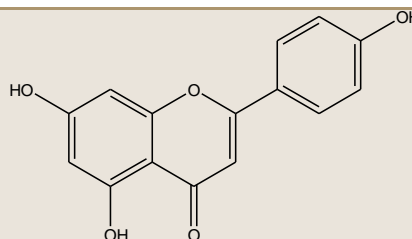
Τα 41 φλαβονοειδή που μελετήθηκαν καθώς και οι χημικές δομές τους παραθέτονται στον πίνακα που ακολουθεί. Οι χημικές δομές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ChemDrawn 9.0.

**Πίνακας 6.1:** Χημικές δομές εξεταζόμενων φλαβονοειδών

**1. acacetin**

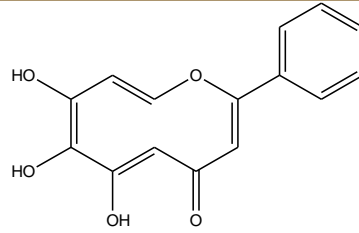


**2. apigenin**

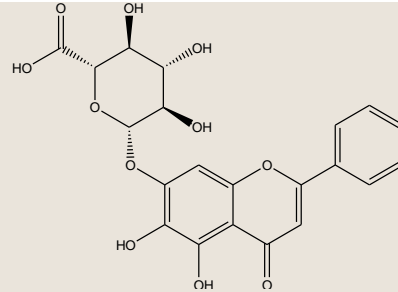


---

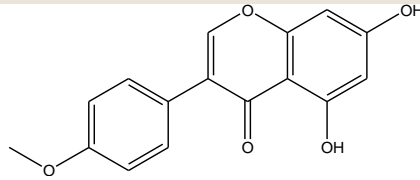
**3. baicalein**



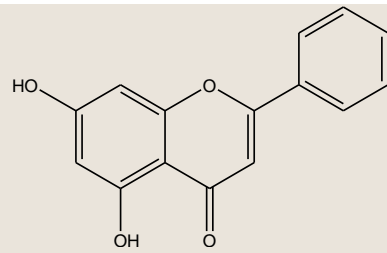
**4. baicalin**



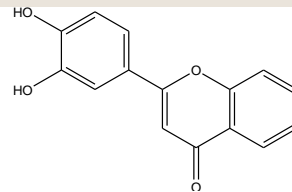
**5. biochanin-A**



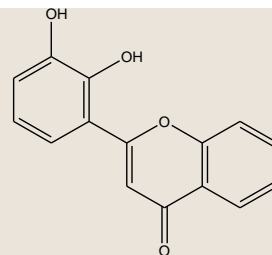
**6. chrysin**



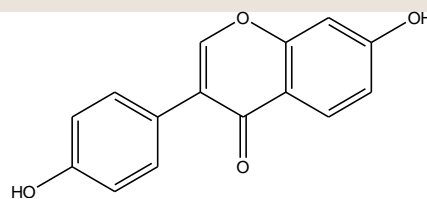
**7. 3',4'-dihydroxyflavone**



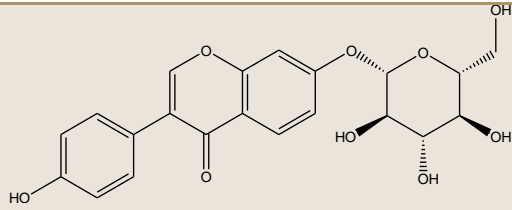
**8. 2',3'-dihydroxyflavone**



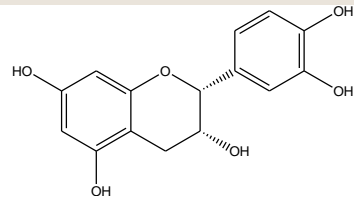
**9. daidzein**



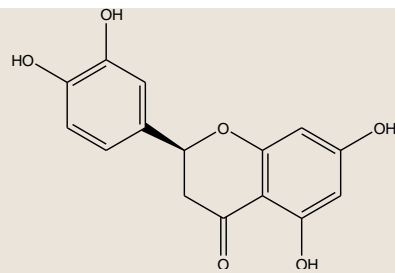
10. daidzin



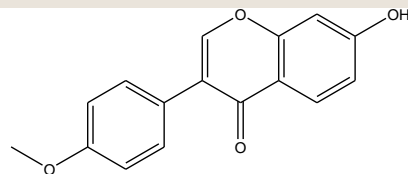
11. (-)-epicatechin



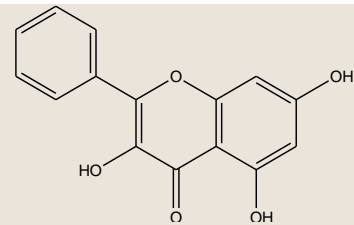
12. eriodictyol



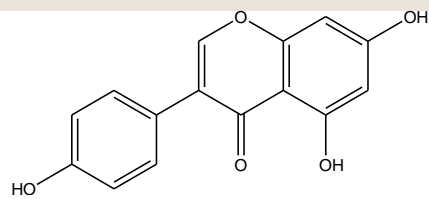
13. formonentin



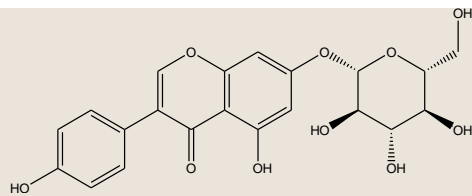
14. galangin



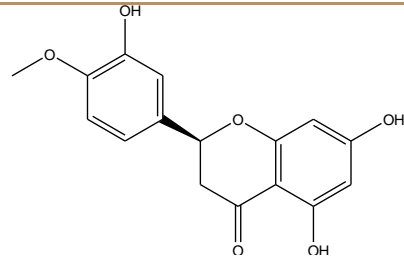
15. genistein



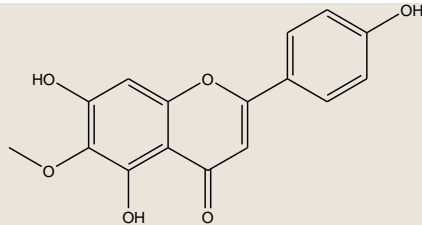
16. genistin



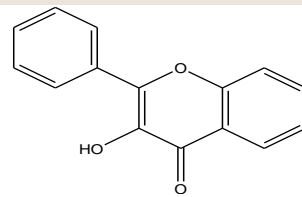
17. hesperetin



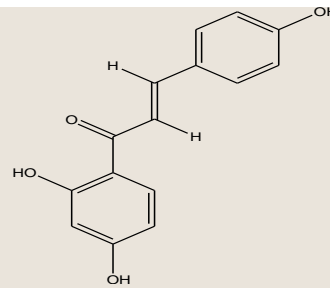
18. hispidulin



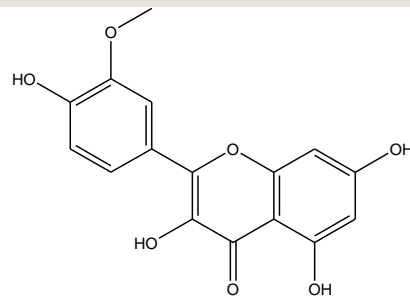
19. 3-hydroxyflavone



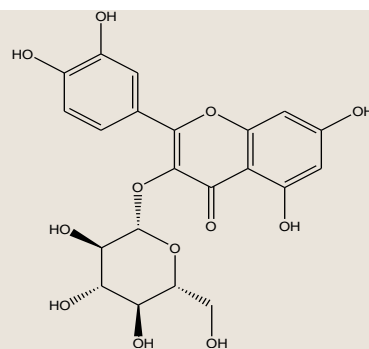
20. Isoliquiritigenin



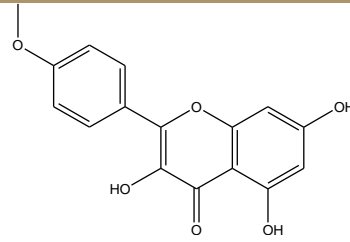
21. isorhamnetin



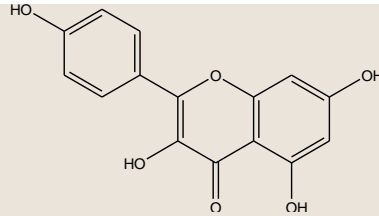
22. isoquercitrin



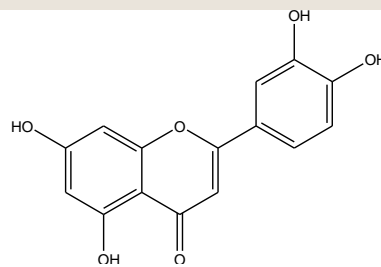
**23. kaempferide**



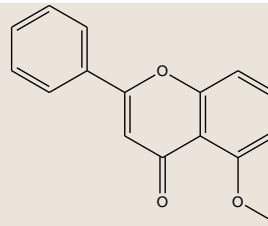
**24. kaempferol**



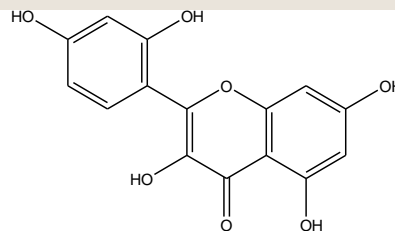
**25. luteolin**



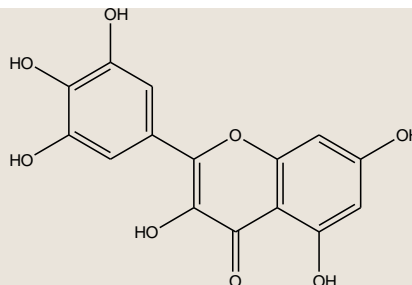
**26. 5'-methoxyflavone**



**27. morin**

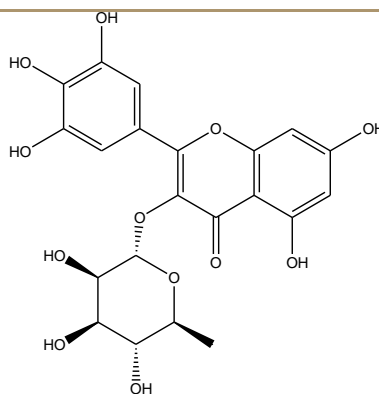


**28. myricetin**

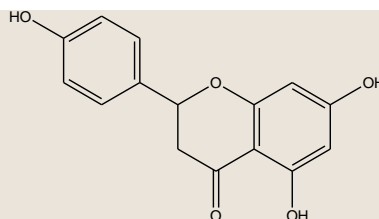




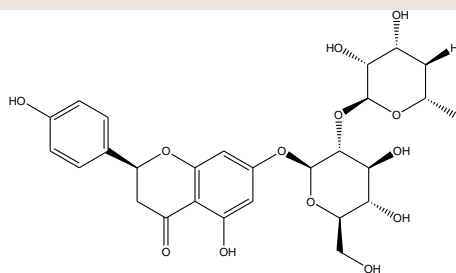
29. myricitrin



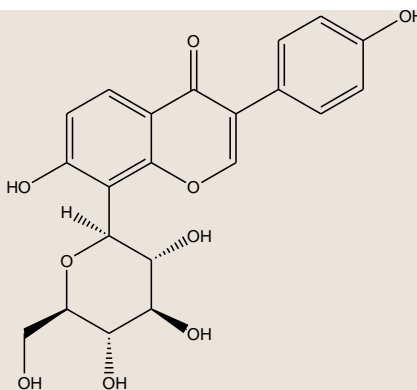
30. naringenin



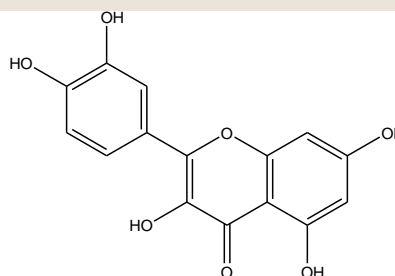
31. naringin



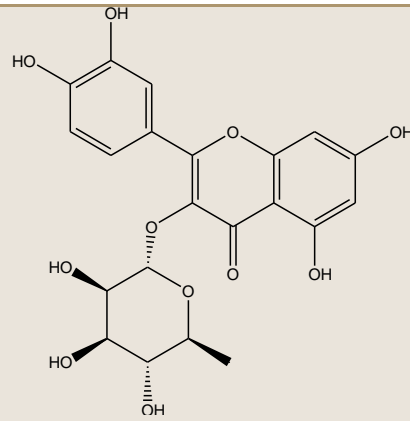
32. puerarin



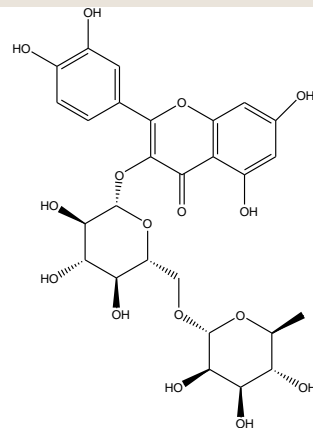
33. quercetin



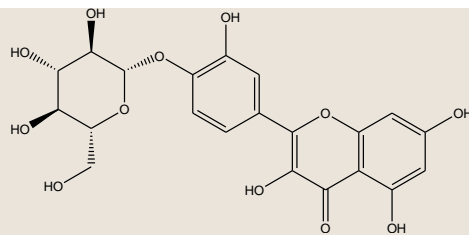
**34. quercitrin**



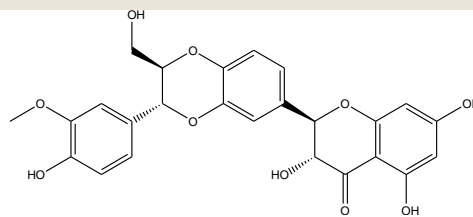
**35. rutin**



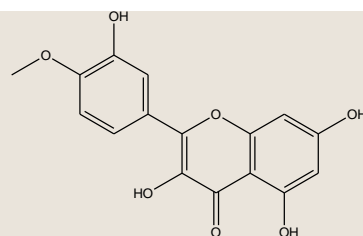
**36. spiraeoside**



**37. sylibin**

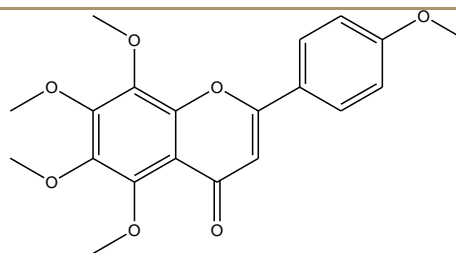


**38. tamarixetin**

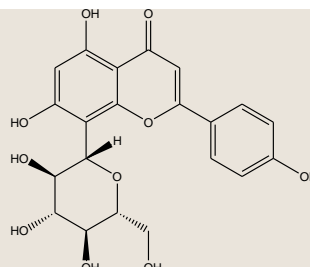


---

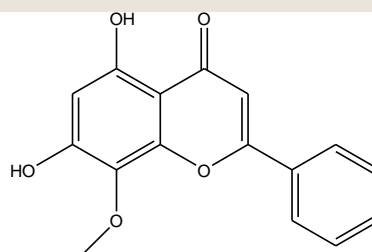
**39. tangeretin**



**40. vitexin**



**41. wogonin**



Για την ταυτοποίηση της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στο εξεταζόμενο φλαβονοειδές, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα καθαρών ουσιών. Οι υψηλής καθαρότητας ουσίες αραιώθηκαν σε υδατική μεθανόλη. Έπειτα, ακολούθησε ανακίνηση σε συσκευή Vortex. Έστερα από μια σειρά δοκιμών, βασιζόμενων σε βιβλιογραφικές πληροφορίες, όσον αφορά τα διαλύματα των δειγμάτων, παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικής συγκέντρωσης  $10^{-5}$  M ενώ το μήκος κύματος στο οποίο οι ουσίες παρουσιάζουν τη μέγιστη απορρόφηση είναι τα 254 nm. Τα διαλύματα των δειγμάτων φυλάσσονται σε γυάλινα φιαλίδια σε συνθήκες ψύξης για την περαιτέρω χρήση τους.

## 6.2 Διαλύτες και Αντιδραστήρια

Τα φλαβονοειδή προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Alfa Aesar- Thermo Fisher Scientific (Germany), Extrasynthese (France) and Cayman Chemical Company (Michigan, USA) και ήταν καθαρότητας τουλάχιστον 95%. Οι χημικές δομές παραθέτονται στον Πίνακα 6.1. Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC-grade). Για την

προετοιμασία των κινητών φάσεων χρησιμοποιήθηκαν KCl ( $\geq 99.5\%$ , Riedel-de Haen),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99.5\%$ , Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $\geq 99.0\%$ , Sigma- Aldrich), NaCl ( $\geq 99.5\%$ , Sigma- Aldrich),  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\geq 99.9\%$ , LC gradient grade, Merck). Το νερό ήταν καθαρότητας HPLC μέσω του συστήματος παραγωγής νερού Milli-Q Plus (Millipore).

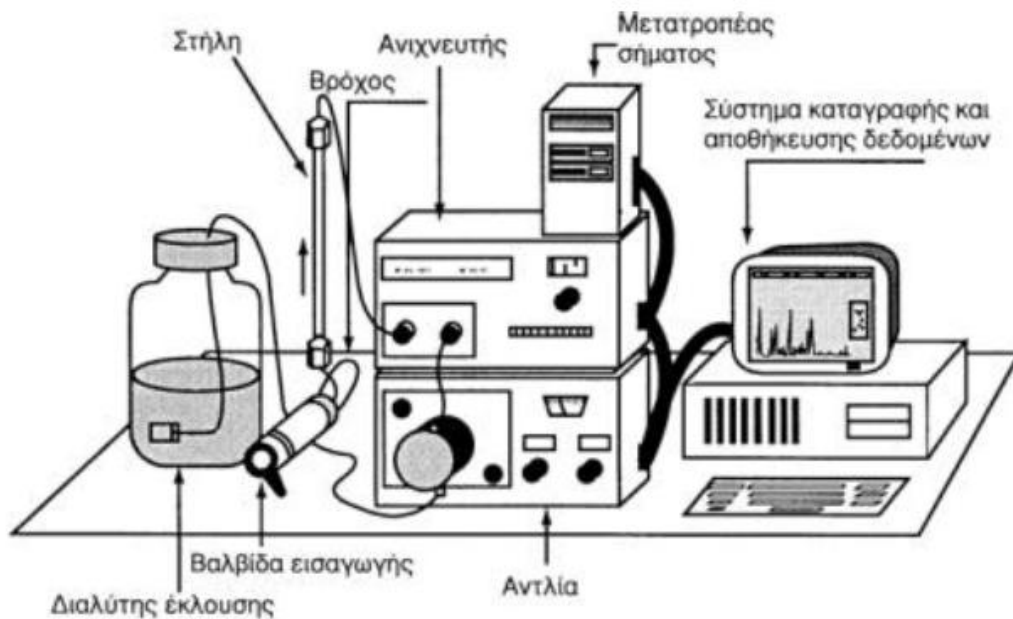
Για τη χρήση των στηλών **IAM.PC.DD.2** και **IAM.PC.MG** ως υδατική φάση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα με τον παρακάτω τρόπο παρασκευής:

**α) Ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer saline, PBS), σε pH 7,4.**

Ζυγίστηκαν 8.00 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Το διάλυμα παρασκευάστηκε με διάλυση των ουσιών αυτών σε 1000mL νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με προσθήκη διαλύματος NaOH 0,1M.

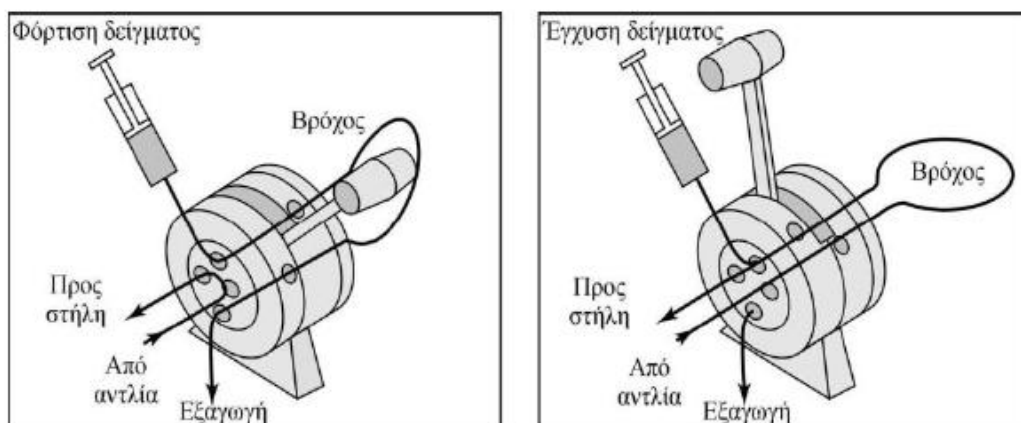
### **6.3 Όργανολογία**

Ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC αποτελείται από μία αντλία, η οποία διοχετεύει την κινητή φάση προς τη χρωματογραφική στήλη, ένα σύστημα έγχυσης δείγματος, τη χρωματογραφική στήλη, που αποτελεί τη στατική φάση, τον ανιχνευτή που ανιχνεύει τα συστατικά μετά τον διαχωρισμό τους στη στατική φάση και έναν καταγραφέα, ο οποίος αποδίδει το χρωματογράφημα (*Εικόνα 6.1*).



**Εικόνα 6.1:** Αποτελούμενα μέρη και διάταξη ενός HPLC συστήματος

- Ο *διαλύτης έκλουσης* συνήθως βρίσκεται σε κατάλληλη φιάλη περιεκτικότητας έως 0,5L, αφού πρώτα έχει υποστεί απαέρωση μέσω ενός συστήματος διήθησης υπό κενό. Για την IAM χρωματογραφία, ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου – ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS): pH 7,4 [ $\log k_w^{IAM}$ ] σε διάφορες αναλογίες με περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο από 10% έως 30%.
- Οι *αντλίες* διοχετεύουν την κινητή φάση προς τη χρωματογραφική στήλη και έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσουν ταχύτητα ροής κινητής φάσης λειτουργώντας και υπό υψηλές πιέσεις.
- Το διάλυμα του δείγματος ενίεται με σύριγγα στο *σύστημα έγχυσης* με τη χρήση βαλβίδας με βρόγχο (loop injection valve), σταθερού όγκου 20μl (Εικόνα 6.2).



**Εικόνα 6.2:** Βρόχος δειγματοληψίας υγροχρωματογραφίας. Με τη χειρολαβή της βαλβίδας, όπως δείχνεται στο αριστερό σχήμα, ο βρόχος γεμίζει από τη σύριγγα και η κινητή φάση ρέει από την αντλία προς τη στήλη. Όταν η βαλβίδα τοποθετηθεί στη θέση που δείχνεται στο δεξιό σχήμα, ο βρόχος παρεμβάλλεται μεταξύ αντλίας και στήλης, οπότε η κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα προς τη στήλη.

- Σε όλα τα συστήματα υγρής χρωματογραφίας η στήλη μπορεί εύκολα να αντικατασταθεί από άλλη. Η στήλη μπορεί να βρίσκεται μέσα σε κατάλληλο χώρο ρύθμισης της θερμοκρασίας (φούρνος θερμοστάτησης), εφόσον ένας διαχωρισμός βελτιστοποιείται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία διαφορετικής από την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν οι ακόλουθες στήλες για την ανάλυση των δειγμάτων:
  1. Στήλη **IAM.PC.DD.2 10 $\mu$ m (30x4,6 mm i.d.), Regis Technology**. Το υλικό πληρώσεως της στήλης είναι πήγμα οξειδίου του πυριτίου-προπυλαμίνης σιλανοποιημένο με μόρια φωσφατιδυλοχολίνης.
  2. Στήλη **IAM.PC.MG 10 $\mu$ m (150x4,6 mm i.d.), Regis Technology**. Ως υλικό πληρώσεως χρησιμοποιείται glycidol και μεθυλο-γλυκολικό οξύ (MG) το οποίο σχηματίζει χημικώς ουδέτερα αμίδια.
- Ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στην HPLC είναι ο υπεριώδους-ορατού, ο οποίος ρυθμίστηκε στα 254nm. Άλλοι ανιχνευτές που

χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν φασματομέτρα μάζας (MS), φθορισμού καθώς και ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές.

Εκτός από το Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) σε σύζευξη με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός, συσκευή Vortex, συσκευή διήθησης υπό κενό, pHμετρική συσκευή.

#### 6.4 Χρωματογραφική Διαδικασία

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη **IAM.PC.DD.2 10 $\mu$ m (30 x4,6 mm i.d.), Regis Technology** και στη συνέχεια η στήλη **IAM.PC.MG 10 $\mu$ m (150x4,6 mm i.d.), Regis Technology**. Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου-ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), pH 7,4 [ $\log k_w(\text{PBS})$ ], (βλ. §6.2), σε διάφορες αναλογίες με περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο από 10% έως 30%.

Η κινητή φάση απαερώνεται με διήθηση υπό κενό. Για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης αφήνεται το χρωματογραφικό σύστημα να λειτουργήσει για τουλάχιστον 30 λεπτά με ροή κινητής φάσης 1 ml/min. Στη συνέχεια ενίεται χωριστά το διάλυμα της κάθε ουσίας σε μεθανόλη, μετράται ο χρόνος ανάσχεσης ( $t_r$ ) που αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις διπλούν. Λήφθηκε ο μέσος όρος των χρόνων και υπολογίστηκε ο παράγοντας χωρητικότητας ( $k'$ ) σύμφωνα με τη σχέση του θεωρητικού μέρους (6.1):

$$\log k' = \log \left( \frac{t_r - t_0}{t_0} \right) \quad (6.1)$$

όπου  $t_0$  ο νεκρός χρόνος που λαμβάνεται ως ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση της κύριας κορυφής της μεθανόλης. Ως νεκρός χρόνος  $t_0$  χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος συγκράτησης της κυστεΐνης για την στήλη IAM.PC.DD.2 και του κιτρικού νατρίου για τη στήλη IAM.PC.MG. Οι νεκροί χρόνοι ήταν της τάξεως των 0.4 min για ροή 1.0 ml/min, 0.3 min για ροή 1.5 ml/min, 0.25 min για ροή 2.0 ml/min και 0.2 min για ροή 3.0 ml/min. Η διαφορά στους χρόνους ανάσχεσης ήταν της τάξεως του 0,01s. Ακολούθως αλλάζει η κινητή φάση και επαναλαμβάνεται η διαδικασία εξισορρόπησης με τη στήλη πριν την ένεση των δειγμάτων. Τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο.

## 6.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών $\log k_w$

Για την διεξαγωγή 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 (6.2):

$$\log k' = -S\phi + \log k_w \quad (6.2)$$

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

## 6.6 Υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων

Για τον υπολογισμό των συντελεστών μερισμού καθώς και άλλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα λογισμικά προγράμματα:

- Η χημική δομή των φλαβονοειδών σχεδιάστηκε με το λογισμικό πρόγραμμα **ChemDrawn 9.0**.
- Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **ADME Boxes v.3.0** (Advanced Pharma Algorithms, Inc., Toronto, Canada) για τον προσδιορισμό του αριθμού δεσμών υδρογόνου ως δότη (HBD) και ως δέκτη (HBA), της συνολικής πολική επιφάνεια επαφής (TPSA), του συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού  $\log P$  και του μοριακού βάρους (MW). Η εισαγωγή των δομών πραγματοποιείται είτε σχεδιαστικά, είτε με την κωδικοποίηση SMILES.
- **ALOGPs 2.1** της εταιρίας Virtual Computational Chemistry Laboratory (εφαρμογή Συσχετιζόμενων Νευρωνικών Δικτύων με δεδομένα εισαγωγής ηλεκτροτοπολογικούς δείκτες), στο οποίο η εισαγωγή των δομών πραγματοποιείται είτε σχεδιαστικά, είτε με την κωδικοποίηση SMILES.
- **MedChem Designer 3.0**

## 6.7 Στατιστική Επεξεργασία



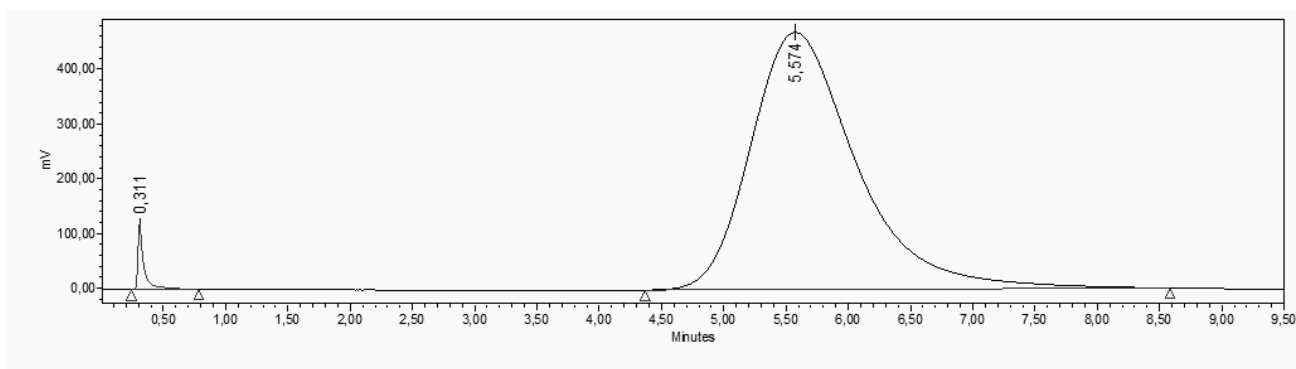
Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, γραμμική και πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Microsoft Excel και Statmost-Axa 7.0.

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup> Αποτελέσματα- Συζήτηση

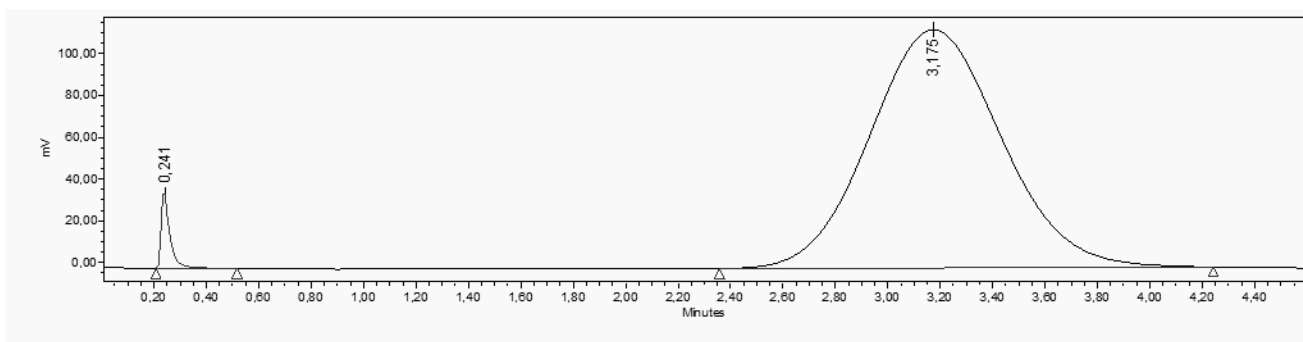
### 7.1 Χρωματογραφήματα

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων, για τη χρωματογραφική ανάλυση των φλαβονοειδών επιλέχθηκε η στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών **IAM.PC.DD.2** και ακολούθως η στήλη **IAM.PC.MG**. Ενδεικτικά, χρωματογραφήματα ορισμένων φλαβονοειδών που μελετήθηκαν με τη στήλη IAM.PC.DD.2 παραθέτονται στη συνέχεια:

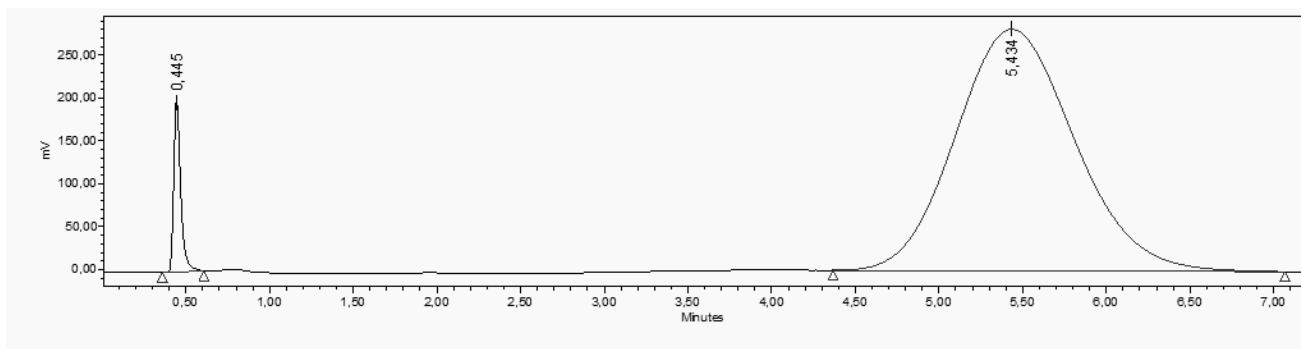
**α)**



**β)**



γ)



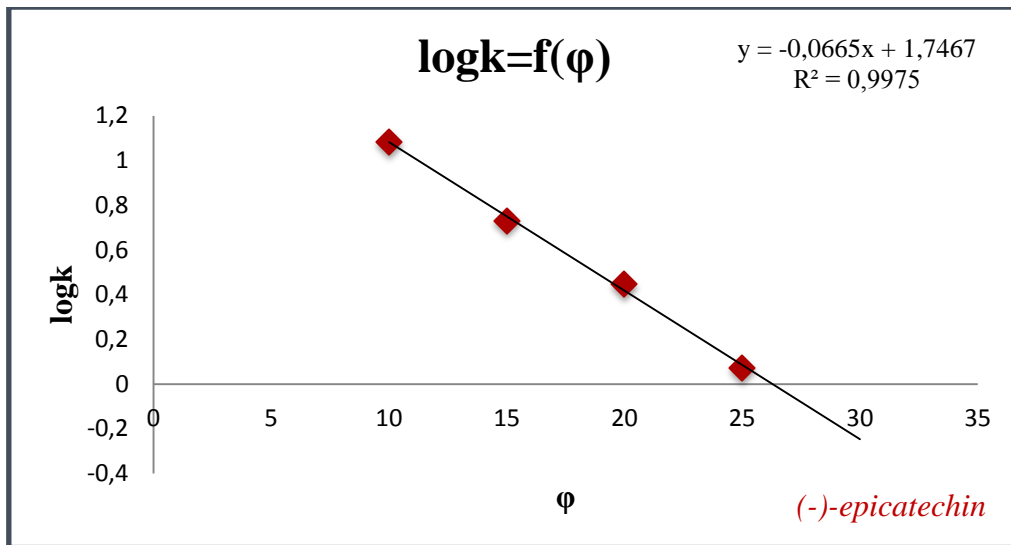
**Σχήμα 7.1 α):** Χρωματογράφημα του φλαβονοειδούς, *tamarixetin*, που λήφθηκε μετά από HPLC ανάλυση. Στατική φάση: IAM.PC.DD.2, Κινητή φάση:25/75 ACN/ PBS, ροή:1,5ml/min., όπου  $t_0$  0,311 ο νεκρός χρόνος που αντιστοιχεί στην κορυφή της μεθανόλης και  $t_r$  5,574 ο χρόνος ανάσχεσης που αντιστοιχεί στην κορυφή του φλαβονοειδούς *tamarixetin*.

β) Χρωματογράφημα του φλαβονοειδούς, *daidzein*, που λήφθηκε μετά από HPLC ανάλυση. Στατική φάση: IAM.PC.DD.2, Κινητή φάση:20/80 ACN/ PBS, ροή:2ml/min., όπου  $t_0$  0,241 ο νεκρός χρόνος που αντιστοιχεί στην κορυφή της μεθανόλης και  $t_r$  3,175 ο χρόνος ανάσχεσης που αντιστοιχεί στην κορυφή του φλαβονοειδούς *daidzein*.

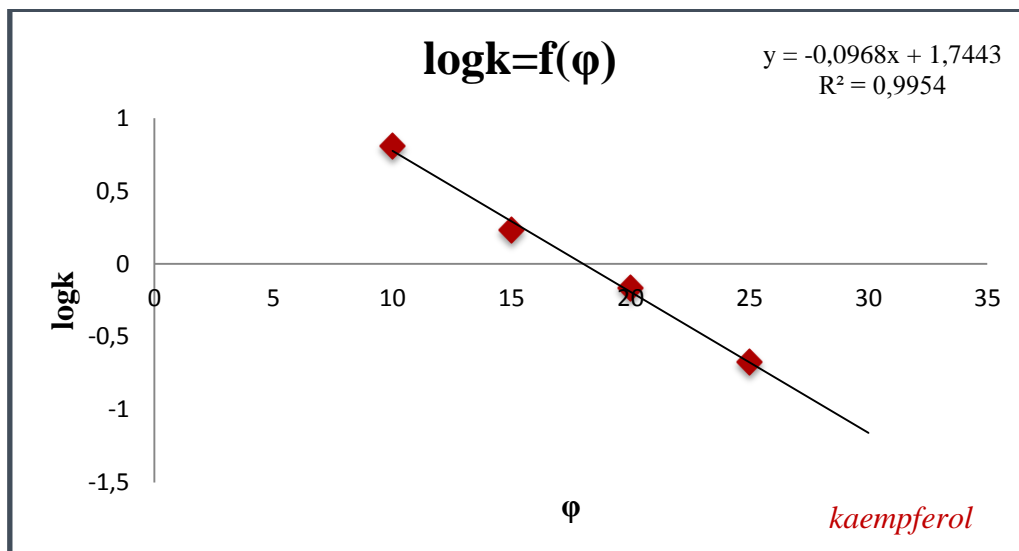
γ) Χρωματογράφημα του φλαβονοειδούς, *genistein*, που λήφθηκε μετά από HPLC ανάλυση. Στατική φάση: IAM.PC.DD.2, Κινητή φάση:30/70 ACN/ PBS, ροή:1ml/min., όπου  $t_0$  0,445 ο νεκρός χρόνος που αντιστοιχεί στην κορυφή της μεθανόλης και  $t_r$  5,434 ο χρόνος ανάσχεσης που αντιστοιχεί στην κορυφή του φλαβονοειδούς *genistein*.

## 7.2 Γραφήματα $\log k/\phi$ και εξαγωγή τιμών $\log k_w$

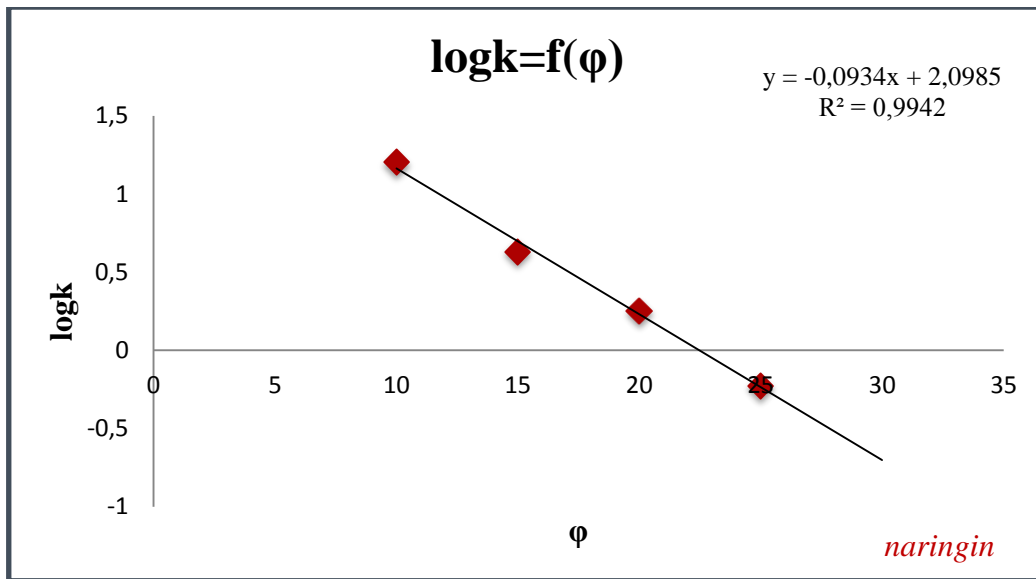
Τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά ποσοστά ακετονιτριλίου χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του γραμμικού τμήματος της σχέσης  $\log k/\phi$ . Όλοι οι δείκτες  $\log k_w$  συνοδεύτηκαν από υψηλούς συντελεστές συσχέτισης ( $r^2 > 0.991$ ). Ακολουθούν κάποια γραφήματα ( $\log k/\phi$ ) των ουσιών που αναλύθηκαν στη στήλη IAM.PC.DD.2:



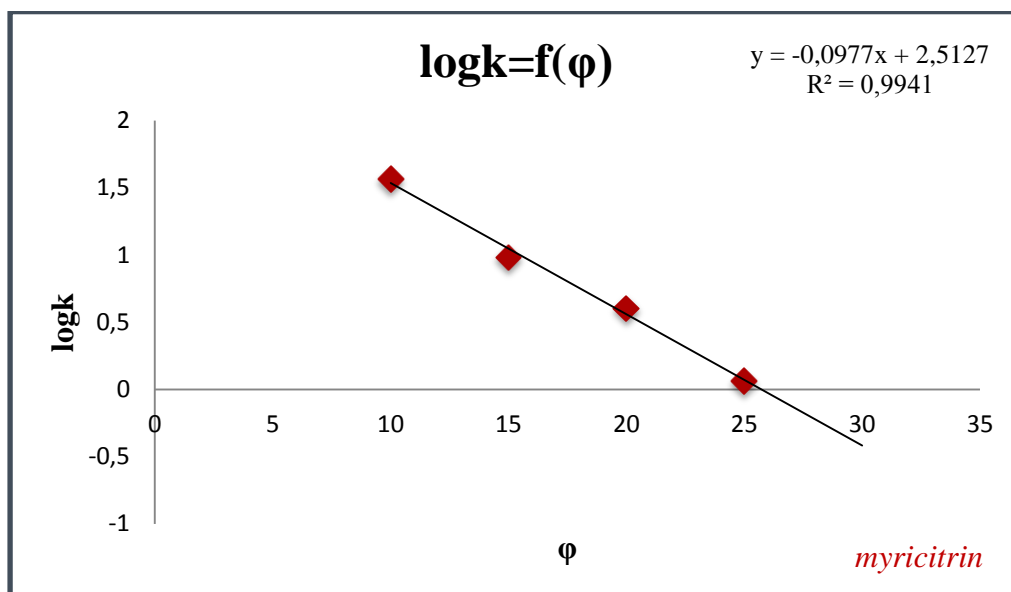
**Σχήμα 7.3:** Διάγραμμα  $\log k/\phi$ , όπου  $\log k$  ο παράγοντας συγκράτησης και  $\phi$  το % ποσοστό οργανικού τροποποιητή για την ουσία *(-)-epicatechin*.



**Σχήμα 7.4:** Διάγραμμα  $\log k/\phi$ , όπου  $\log k$  ο παράγοντας συγκράτησης και  $\phi$  το % ποσοστό οργανικού τροποποιητή για την ουσία *kaempferol*.

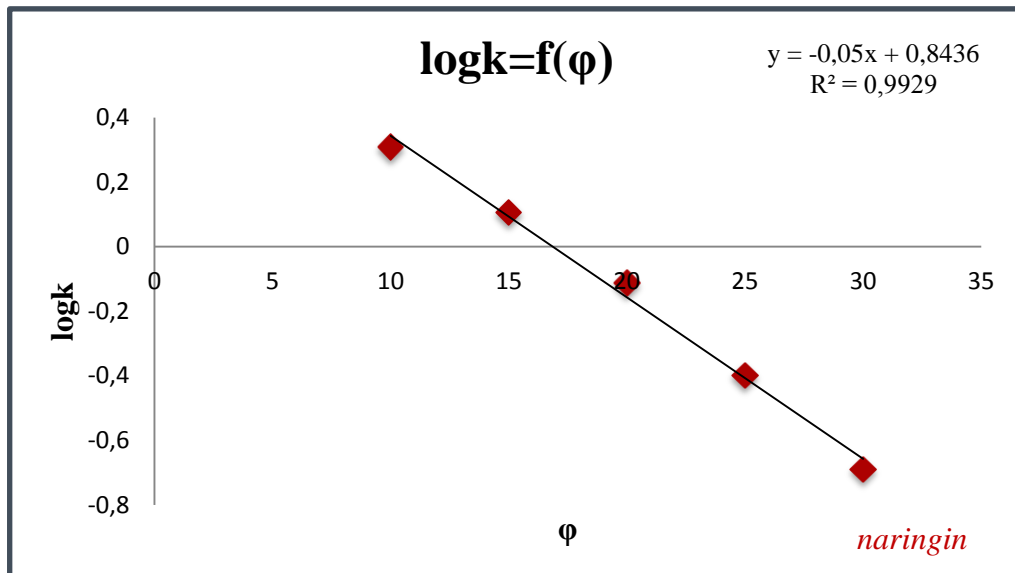


**Σχήμα 7.5:** Διάγραμμα  $\log k/\phi$ , όπου  $\log k$  ο παράγοντας συγκράτησης και  $\phi$  το % ποσοστό οργανικού τροποποιητή για την ουσία *naringin*.



**Σχήμα 7.6:** Διάγραμμα  $\log k/\phi$ , όπου  $\log k$  ο παράγοντας συγκράτησης και  $\phi$  το % ποσοστό οργανικού τροποποιητή για την ουσία *myricitrin*.

Αντίστοιχα, ενδεικτικό γράφημα των ουσιών που αναλύθηκαν στην στήλη **IAM.PC.MG** είναι το ακόλουθο:



**Σχήμα 7.7:** Διάγραμμα  $\log k/\phi$ , όπου  $\log k$  ο παράγοντας συγκράτησης και  $\phi$  το % ποσοστό οργανικού τροποποιητή για την ουσία *naringin*.

Οι πραγματικές και οι ανηγμένες τιμές  $\log k_w$  σε pH 7,4 που προσδιορίστηκαν παρουσία διαφορετικών ποσοστών ακετονιτριλίου χρησιμοποιώντας το γραμμικό τμήμα της σχέσης  $\log k/\phi$  παρατίθενται στον Πίνακα 7.1 μαζί με τις αντίστοιχες κλίσεις S.

**Πίνακας 7.1:** Οι πραγματικές και οι ανηγμένες τιμές  $\log k_w$  που λαμβάνονται σε pH 7,4 μαζί με τις αντίστοιχες κλίσεις S.

No	Φλαβονοειδή	IAM.PC.MG column			IAM.PC.DD2 column		
		Slope x 100	Extrapolated logk <sub>w</sub>	Actual logk <sub>w</sub>	Slope x 100	Extrapolated logk <sub>w</sub>	Actual logk <sub>w</sub>
1.	Acacetin	3.94 ± 0.14	2.56 ± 0.06		5.13 ± 0.19	2.71 ± 0.08	
2.	Apigenin	3.48 ± 0.15	2.05 ± 0.05		4.87 ± 0.17	2.28 ± 0.06	
3.	Baicalein	3.12 ± 0.12	1.94 ± 0.05		4.73 ± 0.15	2.65 ± 0.05	
4.	Baicalin	2.67 ± 0.11	1.34 ± 0.04	1.29 ± 0.02	3.82 ± 0.15	1.57 ± 0.05	1.68 ± 0.05
5.	Biochanin A	4.12 ± 0.14	2.75 ± 0.07		5.62 ± 0.21	3.48 ± 0.06	
6.	Chrysin	4.21 ± 0.13	2.53 ± 0.04		5.12 ± 0.18	3.01 ± 0.05	
7.	3,4- Dihydroxyflavone	4.37 ± 0.15	2.60 ± 0.05		5.25 ± 0.20	2.72 ± 0.10	
8.	2,3- Dihydroxyflavone	4.41 ± 0.16	2.59 ± 0.06		5.78 ± 0.21	3.20 ± 0.11	
9.	Daidzein	4.22 ± 0.14	2.56 ± 0.05		5.19 ± 0.19	3.10 ± 0.10	
10.	Daidzin	2.90 ± 0.12	1.37 ± 0.04	1.42 ± 0.03	3.95 ± 0.15	1.94 ± 0.07	
11.	(-)- Epicatechin	2.77 ± 0.12	1.63 ± 0.04	1.60 ± 0.03	4.12 ± 0.14	2.05 ± 0.04	
12.	Eriodictyol	3.68 ± 0.14	2.20 ± 0.07		5.57 ± 0.15	3.02 ± 0.09	
13.	Formononetin	3.47 ± 0.12	2.04 ± 0.06		4.92 ± 0.15	2.39 ± 0.06	

14.	Galangin	3.65 ± 0.16	2.55 ± 0.07		5.23 ± 0.17	2.77 ± 0.08	
15.	Genistein	3.77 ± 0.15	2.18 ± 0.05		5.01 ± 0.18	2.87 ± 0.09	
16.	Genistin	3.01 ± 0.11	1.88 ± 0.03		3.87 ± 0.13	2.07 ± 0.05	
17.	Hesperetin	4.78 ± 0.17	2.92 ± 0.09		5.69 ± 0.20	3.17 ± 0.11	
18.	Hispidulin	4.09 ± 0.12	2.68 ± 0.07		5.36 ± 0.18	2.74 ± 0.09	
19.	3-Hydroxyflavone	4.34 ± 0.16	2.75 ± 0.12		5.12 ± 0.17	2.88 ± 0.11	
20.	Isoliquiritigenin	3.22 ± 0.13	2.29 ± 0.08		4.98 ± 0.14	2.95 ± 0.06	
21.	Isorhamnetin	3.27 ± 0.15	1.81 ± 0.09		4.88 ± 0.16	2.49 ± 0.08	
22.	Isoquercitrin	2.95 ± 0.10	1.59 ± 0.04	1.54 ± 0.03	4.01 ± 0.12	1.94 ± 0.05	
23.	Kaempferide	3.96 ± 0.14	2.53 ± 0.09		4.88 ± 0.15	2.81 ± 0.08	
24.	Kaempferol	3.43 ± 0.13	2.37 ± 0.08		4.97 ± 0.15	2.44 ± 0.09	
25.	Luteolin	3.77 ± 0.14	2.22 ± 0.08		5.32 ± 0.18	3.09 ± 0.09	
26.	5-Methoxyflavone	4.41 ± 0.14	2.85 ± 0.11		5.98 ± 0.19	3.41 ± 0.10	
27.	Morin	3.22 ± 0.12	1.75 ± 0.05		4.13 ± 0.14	1.96 ± 0.06	
28.	Myricetin	3.12 ± 0.10	1.98 ± 0.03		4.10 ± 0.13	1.84 ± 0.04	

<b>29.</b>	Myricitrin	2.57 ± 0.09	1.54 ± 0.03	1.49 ± 0.03	4.66 ± 0.13	2.21 ± 0.04	
<b>30.</b>	Naringenin	4.53 ± 0.13	2.97 ± 0.10		4.83 ± 0.12	2.98 ± 0.05	
<b>31.</b>	Naringin	2.64 ± 0.09	1.56 ± 0.04	1.54 ± 0.03	4.12 ± 0.13	1.80 ± 0.07	
<b>32.</b>	Puerarin	3.27 ± 0.10	1.74 ± 0.05		4.04 ± 0.11	1.91 ± 0.06	
<b>33.</b>	Quercetin	3.88 ± 0.10	2.21 ± 0.06		4.88 ± 0.13	2.45 ± 0.08	
<b>34.</b>	Quercitrin	2.59 ± 0.08	1.53 ± 0.03	1.55 ± 0.03	4.52 ± 0.12	2.33 ± 0.06	
<b>35.</b>	Rutin	2.45 ± 0.09	1.10 ± 0.04	1.08 ± 0.02	3.57 ± 0.10	1.61 ± 0.05	1.66 ± 0.02
<b>36.</b>	Spiraeoside	2.21 ± 0.08	1.07 ± 0.03	1.06 ± 0.03	3.86 ± 0.10	1.42 ± 0.04	1.45 ± 0.03
<b>37.</b>	Sylibin	3.75 ± 0.12	2.31 ± 0.07		5.02 ± 0.15	2.87 ± 0.12	
<b>38.</b>	Tamarixetin	3.88 ± 0.12	2.03 ± 0.08		4.65 ± 0.13	2.52 ± 0.07	
<b>39.</b>	Tangeretin	4.39 ± 0.10	2.87 ± 0.07		5.12 ± 0.14	3.01 ± 0.11	
<b>40.</b>	Vitexin	2.09 ± 0.08	1.17 ± 0.03	1.11 ± 0.03	3.64 ± 0.09	1.45 ± 0.04	1.41 ± 0.04
<b>41.</b>	Wogonin	4.05 ± 0.13	2.62 ± 0.07		5.32 ± 0.15	2.83 ± 0.08	





### 7.3 Συντελεστές μερισμού στο σύστημα οκτανόλης- νερού (logP) και συντελεστές κατανομής (logD)

Οι συντελεστές μερισμού στο σύστημα οκτανόλης- νερού (logP) και οι συντελεστές κατανομής (logD) που λαμβάνονται σε pH 7,4 των εξεταζόμενων φλαβονοειδών παρατίθενται στον Πίνακα 7.2. Οι πειραματικές τιμές logP είναι διαθέσιμες για 13 μόνο φλαβονοειδή και συγκεκριμένα για τα φλαβονοειδή apigenin, chrysin, daidzin, (-)-epicatechin, eriodictyol, formononetin, hesperetin, luteolin, morin, naringenin, naringin, puerarin και quercetin. Για την πρόβλεψη των τιμών logP των υπολοίπων 28 φλαβονοειδών χρησιμοποιήθηκε ένα ευρύ φάσμα σχετικών λογισμικών. Η εγκυρότητα των τιμών logP που ανακτήθηκαν από τα διάφορα λογισμικά προγράμματα ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς τις πειραματικές τιμές των 13 φλαβονοειδών και λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορά προβλεπόμενης/ πειραματικής τιμής logP. Λαμβάνοντας υπόψη την απόλυτη διαφορά  $| \text{πειραματική logP} - \text{προβλεπόμενη logP} | = 0.50$  ως αποδεκτή, οι πιο ακριβείς προβλέψεις ελήφθησαν από τα προγράμματα ADME Boxes v. 3.0 software (PharmaAlgorithms), MedChem Designer software (Simulations Plus Inc.) και Estimation Program Interface (EPI) Suite Software v. 4.11 (US Environmental Protection Agency (EPA)), όπως φαίνεται στον Πίνακα 7.3.

**Πίνακας 7.2** Συντελεστές μερισμού (logP) και κατανομής (logD) σε pH 7,4 και τα αντίστοιχα μοριακά κλάσματα ιονισμένης μορφής ( $F^-$ ) και ( $F^+$ ). Περιλαμβάνονται επίσης από την γενική εξίσωση Abraham η παράμετρος βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου.

No	Φλαβονοειδή	logP <sup>a</sup>	logD <sup>b</sup>	F <sup>+</sup> <sup>c</sup>	F <sup>-</sup> <sup>c</sup>	A <sup>c</sup>	B <sup>c</sup>
1.	Acacetin	3.20	2.86	0.000	0.311	0.80	1.14
2.	Apigenin	1.74 <sup>d</sup>	1.49 <sup>e</sup>	0.000	0.311	1.30	1.20
3.	Baicalein	3.04	2.78	0.000	0.184	1.02	0.99

4.	Baicalin	0.62	-1.77 <sup>f</sup>	0.000	1.000	1.65	2.52
5.	Biochanin A	3.07	2.74	0.000	0.311	0.80	1.14
6.	Chrysin	3.52 <sup>d</sup>	3.30 <sup>e</sup>	0.000	0.311	0.80	0.92
7.	3,4- Dihydroxyflavone	2.64	2.64	0.000	0.002	0.77	1.20
8.	2,3- Dihydroxyflavone	2.87	2.87	0.000	0.184	0.77	1.20
9.	Daidzein	2.91 <sup>d</sup>	2.86 <sup>e</sup>	0.000	0.102	1.16	1.27
10.	Daidzin	0.44	0.39	0.000	0.007	1.49	2.80
11.	(-)- Epicatechin	0.51 <sup>d</sup>	0.49 <sup>e</sup>	0.000	0.022	2.00	1.70
12.	Eriodictyol	2.02 <sup>d</sup>	1.74 <sup>e</sup>	0.000	0.311	1.57	1.29
13.	Formononetin	2.58 <sup>d</sup>	2.54 <sup>e</sup>	0.000	0.102	0.66	1.21
14.	Galangin	2.85	2.79	0.000	0.311	1.11	1.21
15.	Genistein	2.57	2.26	0.000	0.311	1.30	1.20
16.	Genistin	0.45	0.22	0.000	0.184	1.63	2.73
17.	Hesperetin	2.60 <sup>d</sup>	2.36 <sup>e</sup>	0.000	0.311	1.07	1.23
18.	Hispidulin	2.49	2.20	0.000	0.184	0.96	1.20
19.	3-Hydroxyflavone	3.33	3.33	0.000	0.102	0.31	1.07
20.	Isoliquiritigenin	2.96	2.76	0.000	0.184	1.30	1.02
21.	Isorhamnetin	2.16	2.08	0.000	0.311	1.38	1.57
22.	Isoquercitrin	-0.46	-0.46	0.000	0.311	2.57	3.16
23.	Kaempferide	2.82	2.71	0.000	0.311	1.11	1.43
24.	Kaempferol	2.45	2.24	0.000	0.311	1.61	1.49
25.	Luteolin	2.53 <sup>d</sup>	2.24 <sup>e</sup>	0.000	0.311	1.57	1.34
26.	5-Methoxyflavone	3.52	3.48	0.000	0.000	0.00	0.94
27.	Morin	1.54 <sup>d</sup>	1.20 <sup>e</sup>	0.000	0.311	2.11	1.71
28.	Myricetin	1.63	1.28	0.000	0.311	2.27	1.78
29.	Myricitrin	0.12	-0.18	0.000	0.311	2.68	2.99

<b>30.</b>	Naringenin	2.52 <sup>d</sup>	2.27 <sup>e</sup>	0.000	0.311	1.30	1.14
<b>31.</b>	Naringin	-0.44 <sup>d</sup>	-0.53 <sup>e</sup>	0.000	0.184	2.10	3.86
<b>32.</b>	Puerarin	1.34 <sup>d</sup>	1.32 <sup>e</sup>	0.000	0.102	2.18	2.84
<b>33.</b>	Quercetin	2.06 <sup>d</sup>	1.76 <sup>e</sup>	0.000	0.311	1.88	1.63
<b>34.</b>	Quercitrin	0.43	0.29	0.000	0.311	2.30	2.84
<b>35.</b>	Rutin	-0.86	-0.86	0.000	0.311	3.02	4.32
<b>36.</b>	Spiraeoside	-0.39	-0.39	0.000	0.311	2.38	3.16
<b>37.</b>	Sylibin	2.06	1.96	0.000	0.311	1.39	2.58
<b>38.</b>	Tamarixetin	2.18	2.11	0.000	0.311	1.38	1.57
<b>39.</b>	Tangeretin	2.87	2.87	0.000	0.000	0.00	1.75
<b>40.</b>	Vitexin	-0.09	-0.43	0.000	0.311	2.31	2.76
<b>41.</b>	Wogonin	2.80	2.58	0.000	0.184	0.57	0.99

<sup>a</sup> Η μέση τιμή logP ανακτήθηκε από τα λογισμικά (a) ADME Boxes v. 3.0 software (PharmaAlgorithms), (b) MedChem Designer software (Simulations Plus Inc.) και (c) Estimation Program Interface (EPI) Suite Software v. 4.11 (US Environmental Protection Agency (EPA)).

<sup>b</sup> Η μέση τιμή logD ανακτήθηκε από τα λογισμικά (a) ADME Boxes v. 3.0 software (PharmaAlgorithms) και (b) MedChem Designer software (Simulations Plus Inc.).

<sup>c</sup> Προβλεπόμενες τιμές όπως προκύπτουν από το λογισμικό ADME Boxes v. 3.0 software (PharmaAlgorithms).

<sup>d</sup> Πειραματικές τιμές όπως προκύπτουν από τη βάση δεσμομένων ADME Boxes v. 3.0 software (PharmaAlgorithms).

<sup>e</sup> Διορθωμένες τιμές από τη διαφορά μεταξύ προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών logP.

<sup>f</sup> Υπολογισμένες σύμφωνα μόνο με το λογισμικό MedChem Designer software (Simulations Plus, Inc.) καθώς το λογισμικό ADME Boxes έδινε μη αξιόπιστες, πολύ χαμηλές τιμές σε σχέση με το logP.

*Πίνακας 7.3: Προβλεπόμενες τιμές logP από διαφορετικά λογισμικά και πειραματικές τιμές των φλαβονοειδών. Οι μη αποδεκτές τιμές logP (διαφορά μεταξύ προβλεπόμενων-πειραματικών τιμών logP μεγαλύτερη από 0,50) επισημαίνονται σε γκρι πλαίσιο*

No	Φλαβονοειδή	Πειραματικές τιμές logP	Προβλεπόμενες τιμές logP από διαφορετικά λογισμικά				
			ADME Boxes	EPI Suite	MedChem Designer	Chem Drawn	ClogP
2.	Apigenin	1.74	2.43	2.84	2.86	1.90	2.91
6.	Chrysin	3.52	3.05	3.32	3.50	2.29	3.56
9.	Daidzein	2.91	2.52	2.55	2.58	2.13	2.08
11.	(-)- Epicatechin	0.51	0.71	1.18	0.78	1.50	0.53
12.	Eriodictyol	2.02	1.87	2.13	1.81	1.24	1.85
13.	Formononetin	2.58	3.10	3.08	3.02	2.40	2.64
17.	Hesperetin	2.60	2.18	2.44	2.14	1.50	2.29
25.	Luteolin	2.53	1.96	2.36	2.43	1.51	2.31
27.	Morin	1.54	2.04	1.48	1.92	0.35	0.73
30.	Naringenin	2.52	2.33	2.61	2.42	1.63	2.44
31.	Naringin	-0.44	-0.67	-0.52	-0.26	-1.10	-0.09
32.	Puerarin	1.34	-0.61	0.02	0.42	-0.49	0.02
33.	Quercetin	2.06	2.34	1.48	1.96	0.35	1.30

Ως εκ τούτου, για τα υπόλοιπα 28 φλαβονοειδή η μέση τιμή logP προβλέφθηκε από τα τρία λογισμικά προγράμματα.

Δεδομένου ότι το λογισμικό EPI Suite Software υπολογίζει μόνο logP τιμές, οι logD τιμές των φλαβονοειδών θεωρήθηκαν ως η μέση τιμή των τιμών logD που προβλέφθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes v. 3.0 software (PharmaAlgorithmhs) και από το MedChem Designer software (Simulations Plus Inc.). Όσον αφορά τα 13

φλαβονοειδή με τις πειραματικές τιμές logP, οι τιμές logD διορθώθηκαν από τη διαφορά μεταξύ προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών logP. Στην περίπτωση της Baicalin, η τιμή logD υπολογίστηκε από το λογισμικό πρόγραμμα MedChem Designer software (Simulations Plus, Inc.) καθώς το ADME Boxes έδινε μη αξιόπιστη, πολύ χαμηλή τιμή logD, η οποία δε συμφωνεί με τη σχετικά ισχυρή IAM συγκράτηση.

#### 7.4 Άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες

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. Για τον προσδιορισμό του αριθμού δεσμών υδρογόνου ως δότη (HBD) και ως δέκτη (HBA), της συνολική πολική επιφάνεια επαφής (TPSA), του συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού logP και του μοριακού βάρους (MW), όπως συνοψίζονται στον Πίνακα 7.4, καθώς επίσης την παράμετρο βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένα το PhysChem και Absolv που περιλαμβάνονται στο ADME Boxes v.3.0 Από την γενική εξίσωση Abraham η παράμετρος βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου εισάγονται στα τελικά μοντέλα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7.2.

No	Flavonoids	M.W.	HBD	HBA	TPSA	RB	LogP	A	B	S	E	V	LogD pH=7,4
1	Acacetin	284,26	2	5	75,99	2	3,01	0,80	1,14	2,13	2,20	1,9867	2,83
2	Apigenin	270,24	3	5	86,99	1	2,43	1,30	1,20	2,25	2,36	1,8458	2,25
3	Baicalein	270,24	3	5	86,99	1	2,84	1,02	0,99	2,23	2,24	1,8458	2,74
4	Baicalin	446,36	6	11	183,21	4	0,44	1,65	2,52	3,49	3,17	2,8918	-4,05
5	Biochanin A	284,26	2	5	75,99	2	3,01	0,80	1,14	2,13	2,20	1,9867	2,83
6	Chrysin	254,24	2	4	66,76	1	3,05	0,80	0,92	2,04	2,13	1,7871	2,87
7	3',4'-Dihydroxyflavone	254,24	2	4	66,76	1	2,34	0,77	1,20	2,21	2,15	1,7871	2,34
8	2',3'-Dihydroxyflavone	254,24	2	4	66,76	1	2,34	0,77	1,20	2,21	2,15	1,7871	2,34
9	Daidzein	254,24	2	4	66,76	1	2,52	1,16	1,27	2,23	2,21	1,7871	2,47
10	Daidzin	416,38	5	9	145,91	4	0,24	1,49	2,80	3,29	3,19	2,8174	0,24
11	(-)-Epicatechin	290,27	5	6	110,38	1	0,71	2,00	1,70	2,26	2,48	1,9905	0,70
12	Eriodictyol	288,25	4	6	107,22	1	1,87	1,57	1,29	2,37	2,38	1,9475	1,69
13	Formononetin	268,26	1	4	55,76	2	3,10	0,66	1,21	2,12	2,04	1,9280	3,05
14	Galangin	270,24	3	5	86,99	1	3,42	1,11	1,21	2,25	2,31	1,8458	3,24
15	Genistein	270,24	3	5	86,99	1	2,43	1,30	1,20	2,25	2,36	1,8458	2,25
16	Genistin	432,38	6	10	166,14	4	0,31	1,63	2,73	3,31	3,34	2,8761	0,21
17	Hesperetin	302,28	3	6	96,22	2	2,18	1,07	1,23	2,25	2,22	2,0884	2,00
18	Hispidulin	300,26	3	6	96,22	2	2,03	0,96	1,20	2,32	2,30	2,0454	1,93
19	3-Hydroxyflavone	238,24	1	3	46,53	1	3,8	0,31	1,07	2,04	1,95	1,7284	3,74
20	Isoliquiritigenin	256,25	3	4	77,76	3	2,66	1,30	1,02	2,13	2,11	1,8957	2,56
21	Isorhamnetin	316,26	4	7	116,45	2	2,65	1,38	1,57	2,53	2,52	2,1041	2,47
22	Isoquercitrin	464,38	8	12	206,60	4	0,23	2,57	3,16	3,70	3,67	2,9935	0,06
23	Kaempferide	300,26	3	6	96,22	2	3,38	1,11	1,43	2,35	2,38	2,0454	3,20
24	Kaempferol	286,24	4	6	107,22	1	2,80	1,61	1,49	2,46	2,54	1,9045	2,62
25	Luteolin	286,24	4	6	107,22	1	1,96	1,57	1,34	2,42	2,50	1,9045	1,79

26	5-Methoxyflavone	252,26	0	3	35,53	2	3,41	0	0,94	1,9	1,82	1,8693	3,41
27	Morin	302,24	5	7	127,45	1	2,05	2,11	1,71	2,66	2,75	1,9632	1,87
28	Myricetin	318,23	6	8	147,68	1	1,75	2,27	1,78	2,82	2,85	2,0219	1,57
29	Myricitrin	464,38	8	12	206,60	3	0,24	2,68	2,99	3,64	3,61	2,9935	0,06
30	Naringenin	272,25	3	5	86,99	1	2,33	1,30	1,14	2,19	2,23	1,8888	2,15
31	Naringin	580,53	8	14	225,06	6	-0,67	2,10	3,86	4,09	3,97	3,8907	-0,77
32	Puerarin	416,38	6	9	156,91	3	-0,61	2,18	2,84	3,36	3,37	2,8174	-0,66
33	Quercetin	302,24	5	7	127,45	1	2,34	1,88	1,63	2,64	2,68	1,9632	2,16
34	Quercitrin	448,38	7	11	186,37	3	0,83	2,30	2,84	3,46	3,45	2,9348	0,65
35	Rutin	610,52	10	16	265,52	6	-0,62	3,02	4,32	4,55	4,41	3,9651	-0,79
36	Spiraeoside	464,38	8	12	206,60	4	0,08	2,38	3,16	3,70	3,67	2,9935	-0,09
37	Sylibin	482,44	5	10	155,14	4	2,44	1,39	2,58	3,57	3,57	3,2451	2,26
38	Tamarixetin	316,26	4	7	116,45	2	2,65	1,38	1,57	2,53	2,52	2,1041	2,47
39	Tangeretin	372,37	0	7	72,45	6	2,42	0,00	1,75	3,16	2,06	2,6677	2,42
40	Vitexin	432,38	7	10	177,14	3	-0,71	2,31	2,76	3,38	3,52	2,8761	-0,89
41	Wogonin	284,26	2	5	75,99	2	2,58	0,57	0,99	2,13	2,11	1,9867	2,49

**Πίνακας 7.4:** Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, όπως προκύπτουν από το πρόγραμμα ADME Boxes v.3.0 (Advanced Pharma Algorithms, Inc., Toronto, Canada).



## 7.5 Συμπεριφορά συγκράτησης στις δύο IAM στατικές φάσεις, pH 7,4

Η συμπεριφορά συγκράτησης για τα 41 φλαβονοειδή που μελετήθηκαν έδειξε μια πολύ καλή γραμμικότητα ( $R^2 > 0.979$ ) μεταξύ των ισοκρατικών τιμών  $\log k_{IAM}$  και των δύο στατικών φάσεων και του ποσοστού  $\phi$  του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση. Οι ανηγμένοι παράγοντες συγκράτησης  $\log k_{w(IAM)}$  που υπολογίστηκαν από την Εξ. (7.1) συμφωνούν με τις αντίστοιχες πραγματικές, για εκείνα τα φλαβονοειδή που θα μπορούσαν να μετρηθούν υπό τις δύο διαφορετικές συνθήκες, όπως επισημαίνεται στον Πίνακα 7.1. Πολύ μικρές αποκλίσεις ( $\Delta \log k_{w(IAM.PC.MG)} \leq 0.06$  και  $\Delta \log k_{w(IAM.PC.DD2)} \leq 0.11$ ) βρέθηκαν σύμφωνα με ευρήματα αντίστοιχων μελετών που αφορούν την IAM.PC.MG καθώς επίσης την IAM.PC.DD2 στήλη. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει ότι οι πραγματικές τιμές  $\log k_{w(IAM)}$  μπορούν να συνδυαστούν με τις αντίστοιχες ανηγμένες, στην περίπτωση ενώσεων που εμφανίζουν σημαντική συγκράτηση στις IAM στατικές φάσεις.

Είναι ευρέως γνωστό ότι στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως οι κλίσεις, Εξ. 7.1, που χρησιμοποιούνται στη μορφή  $S^* = 100 \times S$ , 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  $\log k_{w(IAM)}$  ως συνάρτηση της κλίσης  $S^*$  των εξεταζόμενων φλαβονοειδών, ισχυρές γραμμικές συσχετίσεις ελήφθησαν και από τις δύο IAM στατικές φάσεις, όπως εκφράζονται από τις Εξισώσεις (7.2) και (7.3):

$$\log k = \log k_w - S \cdot \phi \quad (7.1)$$

$$\log k_{w(IAM.PC.MG)} = (0.74 \pm 0.04) \cdot S^*_{(IAM.PC.MG)} - (0.50 \pm 0.14) \quad (7.2)$$

$$(n=41, R= 0.952, R^2=0.907, s=0.169, F= 378)$$

$$\log k_{w(IAM.PC.DD2)} = (0.81 \pm 0.05) \cdot S^*_{(IAM.PC.DD2)} - (1.38 \pm 0.23) \quad (7.3)$$

$$(n=41, R= 0.939, R^2=0.881, s=0.191, F= 288)$$

Οι αναλύτες στην παρούσα έρευνα δύσκολα μπορούν να ιονιστούν σε IAM περιβάλλον. Πράγματι, όλα τα φλαβονοειδή που μελετήθηκαν, με εξαίρεση την baicalin, είναι ουδέτερες ενώσεις ή ασθενή οξέα με βαθμό ιονισμού μικρότερο ή ισοδύναμο του 31% (Πίνακας 7.2) σε pH 7,4. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αποκλίσεις στη γραμμικότητα της σχέσης  $\log k_w/S$ , αφορούν κυρίως μη συστηματικές δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις, όπως οι πρόσθετες ελκτικές δυνάμεις μεταξύ IAM φωσφορικών ανιόντων και πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων ή διπολικών ιόντων, οι οποίες δεν περιέχονται στις υπό μελέτη ενώσεις. Αναφορικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ των IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2 στηλών, ανακτήθηκε μια σχεδόν 1:1 συσχέτιση μεταξύ των τιμών  $\log k_w$  μετρούμενες στις δύο IAM στατικές φάσεις, όπως διαπιστώνεται από την Εξίσωση (7.4):

$$\log k_{w(\text{IAM.PC.DD2})} = (0.90 \pm 0.07) \cdot \log k_{w(\text{IAM.PC.MG})} + (0.61 \pm 0.16) \quad (7.4)$$

$$(n= 41, R= 0.894, R^2= 0.799, s= 0.248, F= 155)$$

Από την Εξίσωση (7.4), εύκολα προκύπτει πως οι τιμές  $\log k_w$  (IAM.PC.DD2) είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές  $\log k_w$  (IAM.PC.MG), γεγονός που συμφωνεί με τον υδρόφοβο χαρακτήρα της IAM.PC.DD2 στατικής φάσης.

## 7.6 Σχέσεις συγκράτησης στην IAM με συντελεστές κατανομής και μερισμού οκτανόλης-νερού

Οι IAM παράγοντες κατακράτησης αναμένεται να συσχετίζονται με τον μερισμό στο σύστημα οκτανόλης – νερού και τους συντελεστές κατανομής επειδή η έκλυση επί των φωσφολιπιδικών στατικών φάσεων διέπεται κυρίως από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Πράγματι, μια ισχυρή  $\log k_{w(\text{IAM})} / \log P$  συσχέτιση ήταν εμφανής για αμφότερες τις IAM στατικές φάσεις, όπως υποδεικνύεται από τις Εξ. (7.5) και (7.6).

$$\log k_{w(\text{IAM.PC.MG})} = (0.38 \pm 0.03) \cdot \log P + (1.40 \pm 0.07) \quad (7.5)$$

(n= 41, R= 0.886, R<sup>2</sup>= 0.786, s= 0.255, F= 143)

$$\log k_{w(IAM.PC.DD2)} = (0.37 \pm 0.04) \cdot \log P + (1.81 \pm 0.08) \quad (7.6)$$

(n= 41, R= 0.862, R<sup>2</sup>= 0.743, s= 0.281, F= 113)

Ο ρόλος της λιποφιλίας στην IAM συγκράτηση των φλαβονοειδών διερευνήθηκε περαιτέρω αντικαθιστώντας τον δείκτη logP με τον δείκτη logD σε pH 7,4. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι οι δείκτες logD συσχετίζονται παρόμοια με τους δείκτες logP, με τιμές logk<sub>w(IAM)</sub>, όπως φαίνεται στις Εξ. (7.7) και (7.8):

$$\log k_{w(IAM.PC.MG)} = (0.36 \pm 0.03) \cdot \log D + (1.53 \pm 0.06) \quad (7.7)$$

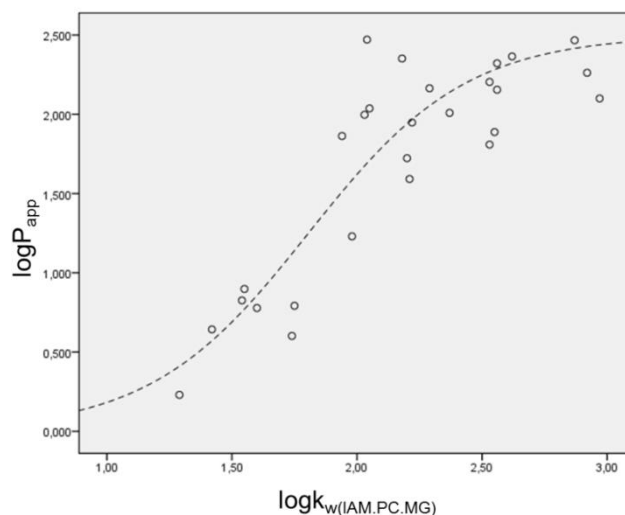
(n= 41, R= 0.882, R<sup>2</sup>= 0.779, s= 0.260, F= 137)

$$\log k_{w(IAM.PC.DD2)} = (0.35 \pm 0.03) \cdot \log D + (1.93 \pm 0.07) \quad (7.8)$$

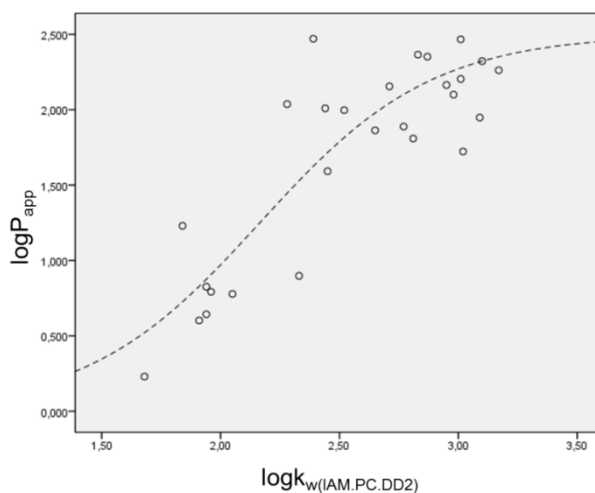
(n= 41, R= 0.861, R<sup>2</sup>= 0.741, s= 0.281, F= 111)

### 7.7 Συσχέτιση της IAM συγκράτησης με την Caco-2 εντερική διαπερατότητα

Στην παρούσα μελέτη, τα πειραματικά δεδομένα Caco-2 διαπερατότητας για 27 από τα εξεταζόμενα φλαβονοειδή συλλέχθηκαν από μία μόνο έρευνα, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα αποτελέσματα από διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να μην είναι συγκρίσιμα. Συσχετίζοντας τον λογάριθμο για την Caco-2 διαπερατότητα εκφρασμένη σε nm·s<sup>-1</sup> (logP<sub>app</sub>) ως συνάρτηση των logk<sub>w(IAM.PC.MG)</sub> ή logk<sub>w(IAM.PC.DD2)</sub>, μια αρκετά σιγμοειδής γραφική παράσταση προέκυψε (Σχ. 7.1α και 7.1β).



**Σχήμα 7.1α)**



**Σχήμα 7.1β)**

Η συσχέτιση  $\log P_{app} / \log k_{w(IAM)}$  μπορεί να εκφραστεί από την Εξ. (7.9):

$$\log P_{app} = \frac{a}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_{w(IAM)} + a_2 \cdot A + a_3 \cdot B)}} \quad (7.9)$$

Όπου,  $X_1$  είναι  $\log k_{w(IAM)}$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ , .. επιπλέον φυσικοχημικές παραμέτροι και  $a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_2$ , ... είναι οι συντελεστές παλινδρόμησης που λαμβάνονται από μη γραμμική προσαρμογή. Ως πρόσθετες φυσικοχημικές παραμέτροι εξετάστηκαν οι MW, TPSA,

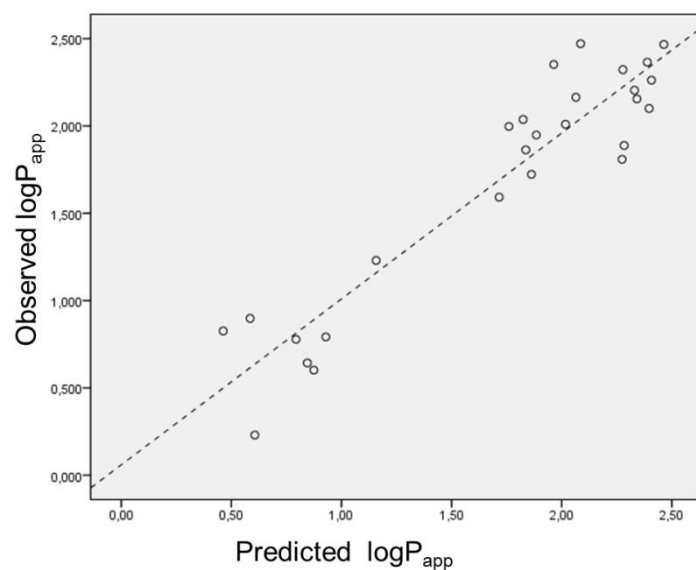
HBD, HBA καθώς και από την γενική εξίσωση Abraham η παράμετρος βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου. Μόνο οι παράμετροι A και B, που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 7.2, αποδείχθηκε ότι είναι στατιστικά σημαντικοί. Οι συντελεστές παλινδρόμησης των διαφόρων όρων και στατιστικών στοιχείων λαμβάνονται από μια ομάδα εξισώσεων  $10^{a-e}$  που συνοψίζονται στον Πίνακα 7.5:

**Πίνακας 7.5:** Συντελεστές Παλινδρόμησης και στατιστικά δεδομένα της εξίσωσης

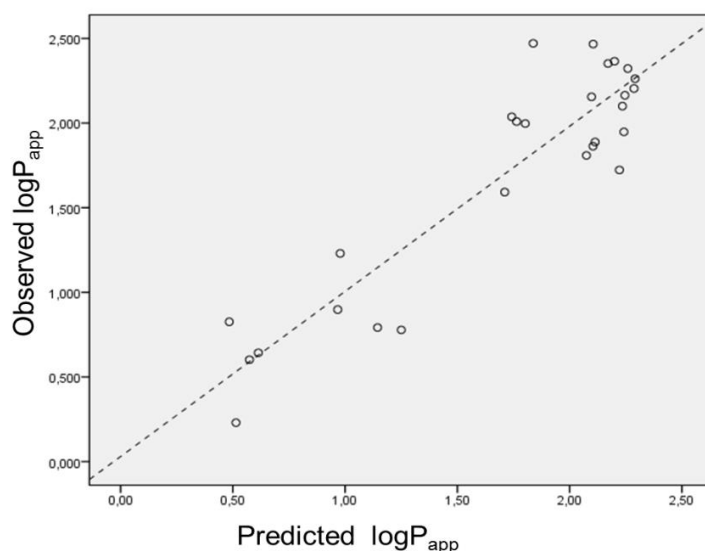
$$\log P_{\text{app}} = \frac{a}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot \log k_w(\text{IAM}) + a_2 \cdot A + a_3 \cdot B)}}$$

Model	Regression coefficients					Statistical data		
	a	a <sub>0</sub>	logk <sub>w</sub>	A	B	N	R <sup>2</sup>	s
<b>IAM.PC.MG stationary phase</b>								
<b>10a</b>	2.228 ± 0.117	-3.413 ± 0.742	1.970 ± 0.440			27	0.819	0.292
<b>10b</b>	2.285 ± 0.103	-1.447 ± 0.559	1.363 ± 0.269	-0.522 ± 0.170		27	<b>0.889</b>	0.228
<b>IAM.PC.DD2 stationary phase</b>								
<b>10c</b>	2.191 ± 0.126	-3.897 ± 1.037	1.890 ± 0.521			27	0.780	0.322
<b>10d</b>	2.304 ± 0.164	-1.635 ± 0.823	1.139 ± 0.360	-0.426 ± 0.203		27	0.825	0.287
<b>10e</b>	2.260 ± 0.149	-1.624 ± 0.880	1.172 ± 0.414		-0.400 ± 0.138	27	<b>0.844</b>	0.271

Η γραφική παράσταση των παρατηρούμενων/ προβλεπόμενων τιμών logP<sub>app</sub> από τα μοντέλα 10b και 10e παρουσιάζονται στα Σχήματα 7.2α και 7.2β, αντιστοίχως.



*Σχήμα 7.2α)*



*Σχήμα 7.2β)*

Τα μοντέλα εξισώσεων 10b και 10e χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, για την εκτίμηση των τιμών  $\log P_{app}$  των 14 φλαβονοειδών, των οποίων τα πειραματικά δεδομένα δεν ήταν διαθέσιμα. Περιλαμβάνονται στον Πίνακα 7.6.

**Πίνακας 7.6:** Εκτιμώμενες  $\log P_{app}$  τιμές ( $P_{app}$  τιμές εκφρασμένες σε  $nm \cdot s^{-1}$ ) σύμφωνα με τα IAM σιγμοειδή (Εξ. 10b και 10e) και γραμμικά μοντέλα (Εξ. 12 and 13) όπως δημιουργήθηκαν στην παρούσα μελέτη

No	Flavonoid	IAM.PC.MG sigmoidal model	IAM.PC.DD2 sigmoidal	IAM.PC.MG	IAM.PC.DD2
		(Eq. (10b))	model (Eq. (10e))	linear model (Eq. (7.10))	linear model (Eq. (7.11))
5.	Biochanin A	2.40	2.38	2.39	2.61
7.	3,4- Dihydroxyflavone	2.36	2.09	2.29	2.15
8.	2,3- Dihydroxyflavone	2.36	2.31	2.28	2.43
16.	Genistin	1.41	0.76	1.03	0.93
18.	Hispidulin	2.36	2.10	2.28	2.10
19.	3-Hydroxyflavone	2.44	2.21	2.56	2.44
21.	Isorhamnetin	1.47	1.78	1.51	1.68
26.	5-Methoxyflavone	2.46	2.39	2.76	2.90
29.	Myricitrin	0.38	0.77	0.39	0.59
31.	Naringin	0.67	0.23	0.26	0.21
35.	Rutin	0.12	0.13	-0.46	-0.33

---

<b>36.</b> Spiraeoside	0.21	0.23	0.17	0.17
<b>37.</b> Sylibin	2.05	1.68	1.40	1.54
<b>40.</b> Vitexin	0.24	0.29	0.38	0.31

---



Εάν θεωρηθεί γραμμική η συσχέτιση  $\log P_{app}/ \log k_{w(IAM)}$ , λαμβάνονται μοντέλα τριών παραμέτρων εκφρασμένα από τις Εξ. 7.10 και 7.11:

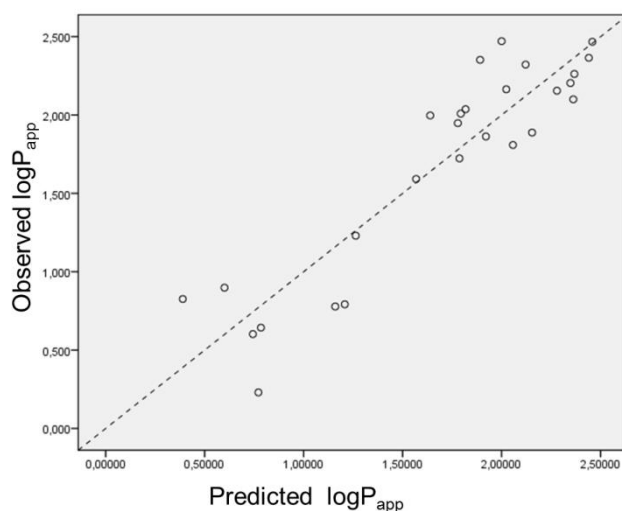
$$\log P_{app} = (0.57 \pm 0.19) \cdot \log k_{w(IAM.PC.MG)} - (0.30 \pm 0.14) \cdot A - (0.39 \pm 0.13) \cdot B + (1.51 \pm 0.62) \quad (7.10)$$

$$(n= 27, R= 0.914, R^2= 0.836, s= 0.290, F= 39.1, |t|_A = 2.18, |t|_B = 2.94)$$

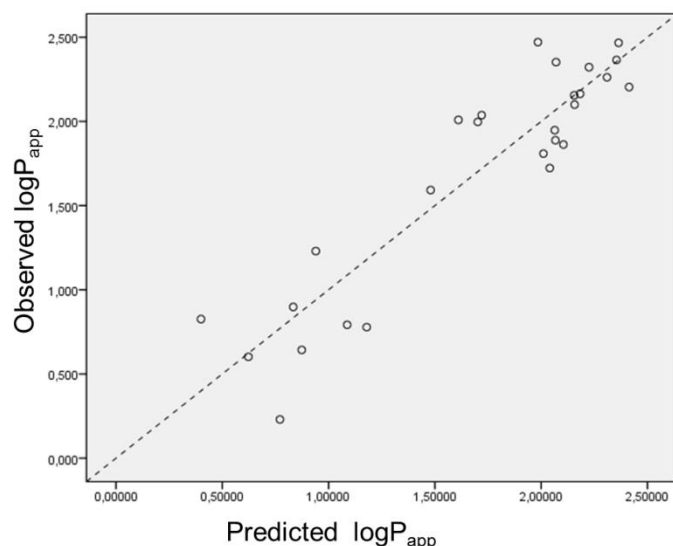
$$\log P_{app} = (0.59 \pm 0.19) \cdot \log k_{w(IAM.PC.DD2)} - (0.32 \pm 0.13) \cdot A - (0.36 \pm 0.13) \cdot B + (1.22 \pm 0.67) \quad (7.11)$$

$$(n= 27, R= 0.918, R^2= 0.843, s= 0.284, F= 41.2, |t|_A = 2.42, |t|_B = 2.79)$$

Οι γραφικές παραστάσεις των παρατηρούμενων/προβλεπόμενων τιμών  $\log P_{app}$  από τις Εξ. 7.10 και 7.11 παρουσιάζονται στα Σχήματα 7.3α και 7.3β, αντιστοίχως.



*Σχήμα 7.3α)*



**Σχήμα 7.3β)**

Για λόγους σύγκρισης, οι τιμές  $\log P_{app}$  των 14 φλαβονοειδών όπως προκύπτουν από τις Εξ. (7.10) και (7.11) περιλαμβάνονται επίσης στον Πίνακα 7.6. Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ Caco-2 διαπερατότητας και μερισμού σε σύστημα οκτανόλης-νερού γραμμικές συσχετίσεις  $\log P_{app}$  με  $\log P$  ( $R^2 = 0,738$ ) και  $\log D$  ( $R^2 = 0,767$ ) έχουν καθοριστεί. Μόνο το A είναι στατιστικά σημαντική παράμετρος στη συσχέτιση  $\log P_{app} / \log D$ , η οποία οδηγεί σε Εξ. (7.12) με καλύτερα στατιστικά στοιχεία.

$$\log P_{app} = (0,37 \pm 0,07) \cdot \log D - (0,36 \pm 0,14) \cdot A + (1,52 \pm 0,30) \quad (7.12)$$

$$(n = 27, R = 0,905, R^2 = 0,819, s = 0,298, F = 54,5, |t|_A = 2,64)$$

## **Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup> Συμπεράσματα**

Η βιομμητική χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών αποτελεί μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την γρήγορη διεξαγωγή του πειραματικού προσδιορισμού της λιποφιλίας και την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας των φλαβονοειδών. Τα 41 φλαβονοειδή που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ακολουθούν έναν ενιαίο μηχανισμό έκλουσης τόσο για την IAM.PC.MG όσο και για IAM.PC.DD2 στατική φάση, παρά το γεγονός ότι οι τιμές  $\log k_w$  για την IAM.PC.DD2 στήλη είναι γενικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες της IAM.PC.MG στήλης. Ελήφθησαν γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ των τιμών  $\log k_w(IAM)$

και των τιμών  $\log P$  ή  $\log D$  με παρόμοια στατιστικά στοιχεία. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν ήταν ιδιαίτερος ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην συγκράτηση της IAM στατικής φάσης, καθώς στην παρούσα έρευνα ήταν περιορισμένος ο ιονισμός των εξεταζόμενων ενώσεων σε pH 7,4. Στατιστικώς σημαντικά γραμμικά και μη γραμμικά μοντέλα αναπτύχθηκαν μεταξύ παραγόντων συγκράτησης στην IAM και της πειραματικής Caco-2 διαπερατότητας, συμπεριλαμβανομένου των παραμέτρων βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου, της γενικής εξίσωσης Abraham, ως πρόσθετους φυσικοχημικούς περιγραφικούς δείκτες. Αυτά τα μοντέλα ήταν, στατιστικώς, συγκρίσιμα με εκείνα που προέκυψαν από την προσομοίωση του συστήματος οκτανόλης/νερού. Οι δύο IAM στατικές φάσεις έδειξαν παρόμοια πρόβλεψη απόδοσης. Ως εκ τούτου, και οι δύο IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2 στατικές φάσεις προτείνονται ως υποσχόμενα εργαλεία για την ταυτοποίηση υποψήφιων φαρμάκων βελτιωμένης διαπερατότητας. Σε σύγκριση με το σύστημα οκτανόλης/νερού, η χρωματογραφία IAM αποτελεί μια απλή, φιλική τεχνική που χαρακτηρίζεται από επαναλήψιμες μετρήσεις και με ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα του αναλύτη. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβάλλουν περαιτέρω στην κατανόηση των μηχανισμών απορρόφησης των φλαβονοειδών διαμέσου του εντερικού βλεννογόνου στην κυκλοφορία του αίματος.

## Βιβλιογραφία

- A. Albert** Selective toxicity. The physico-chemical basis of therapy, London, (1985).
- A. Gil-Izquierdo M. I. Gil, F. Ferreres, and F. A. Tomas Barberan** In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1035-1041, vol. 49, no 2, (2001).
- A. J. Day F. J. Canada, J. C. Diaz et al.** Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase, *FEBS Letters*, vol. 468, no 2-3, pp. 166-170, (2000).
- A. K. Pandey A. K. Mishra, and A. Mishra** Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 58, pp. 142-147, (2012).
- A. Mishra A. K. Sharma, S. Kumar, A. K. Saxena, and A. K. Pandey** *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities, *BioMed Research International*, (2013).
- A. Mishra S. Kumar, and A. K. Pandey** Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*, *The Scientific World Journal*, (2013).
- A. R. Tapas D. M. Sakarkar, and R. B. Kakde** Flavonoids as nutraceuticals: a review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 7, pp. 1089–1099, (2008).
- A. Sekher Pannala T. S. Chan, P. J. O'Brien, and C. A. Rice- Evans** Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 282, no 5, pp. 1161–1168, (2001).
- A. Sugisawa K. Umegaki** Physiological concentrations of (–)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells, *J. Nutr.*, vol. 132, pp. 1836-1839, (2002).
- A. Van S. A. B. E. van den Berg, D. J. M. N. J. L. Tromp et al.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 20, no 3, pp. 331-342, (1996).
- A.I. Alvarez R. Real, M. Perez, G. Mendoza, J.G. Prieto, G. Merino** Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response, *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, pp. 598-617, (2010).
- A.J. Day J.M. Gee, M.S. DuPont, I.T. Johnson, G. Williamson** Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 65, pp. 1199–1206, (2003).

- A.M. Davis S.J. Teague**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 38, pp. 737-749, (1999).
- A.Manthey J.** Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation, *Microcirculation*, vol. 7, no 1, pp. 29-34, (2000).
- Abbey N. L. Kerry and M.** Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from redwine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro, *Atherosclerosis*, vol. 135, no 1, pp. 93-102, (1997).
- Artursson PA Karlsson J.** Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 175, pp. 880-885, (1991).
- Axel Andrés a Martí Rosés , Clara Ràfols, Elisabeth Bosch, Sonia Espinosa, Víctor Segarra, Josep M. Huerta** Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 76, pp. 181-191, (2015).
- B. Fuhrman S. Buch, and J.Vaya** Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 66, no 2, pp. 267-275, (1997).
- B. Koen V. Ruth, V. Guido, and V. S. Johannes** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no 7, pp. 5636–5645, (2005).
- B. M. Markaverich R. R. Roberts, M. A. Alejandro, G. A. Johnson, B. S. Middleditch, and J. H. Clark** Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition, *Journal of Steroid Biochemistry*, vol. 30, no 1-6, pp. 71-78, (1988).
- B. Pahari S. Chakraborty, S. Chaudhuri, B. Sengupta, P.K. Sengupta** Binding and antioxidant properties of therapeutically important plant flavonoids in biomembranes: insights from spectroscopic and quantum chemical studies, *Chem. Phys. Lipids.*, vol. 165, pp. . 488-496, (2012).
- B. Vennat M. A. Bos, A. Pourrat, and P. Bastide** Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 17, no 12, pp. 1613–1615, (1994).
- Barbato F. G. di Martino, G. Grunetto, MI La Rotonda**, *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 22, p. 261, (2004).
- Barnes S.** Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer, *Journal of Nutrition*, vol. 125, no 3, pp. 777-783, (1995).

**Barrington R Williamson G, Bennett RN, Davis BD, Brodbelt JS, Kroon PA** Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal Caco-2/TC7 cell model, *J Funct Food.*, vol. 1, pp. 74-78, (2009).

**BH Havsteen** The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol Therapeut.*, no 96, pp. 67-202, (2002).

**Bhagwat S. Haytowits D. B., Holden J. M.** USDA Database for the flavonoid content of selected foods, Beltsville Human Nutrition Research Center Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture, Nutrient Data Laboratory, pp. 1-159, (2011).

**Birt DF Hendrich S, Wang W.** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids, *Pharmacol Therapeutics*, vol. 90, pp. 157-177, (2001).

**Bravo L.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews*, vol. 56, no 11, pp. 317-333, (1998).

**C. A. Lamartiniere J. Moore, M. Holland, and S. Barnes,** Neonatal *genistein* chemoprevents mammary cancer, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 208, no 1, pp. 120-123, (1995).

**C. A. Rice-Evans N. J. Miller, and G. Paganga** Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 20, no 7, pp. 933-956, (1996).

**C. Giaginis S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou,** *ACA*, vol. 573, pp. 311-318, (2006).

**C. Manach G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Remesy** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 81, pp. 230-242, (2005).

**C. Pidgeon C. Marcus, F. Alvarez, J.W. Kelly, T.O. Baldwin** Immobilized artificial membrane chromatography: surface chemistry and applications, in: *Applications of Enzyme Biotechnology*, *Plenum Press*, (1991).

**C. Pidgeon U.V. Venkataram** Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids, *Anal. Biochem.*, vol. 176, pp. 36-47, (1989).

**C. T. Ho T. Osawa, M. T. Huang, and R. T. Rosen** Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. Teas, Spices, and Herbs, *American Chemical Society*, Oxford University Press, (1994).

**C. van Dijk A.J. Driessen, K. Recourt** The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 60, pp. 1593-1600, (2000).

**C.Gutteridge B.Halliwell and J. M.** Free Radicals in Biology and Medicine, *Oxford University Press*, (1998).

**C.H. Chen H.J. Hsu, Y.J. Huang, C.J. Lin** Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters, *Planta Med.*, vol. 73, pp. 348-354, (2007).

**C.Manach A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez** Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, pp. 727-747, (2004).

**C.Y. Yang S.J. Cai, H. Liu, C. Pidgeon** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 23, pp. 229-256, (1997).

**Cassidy A. O'Reilly E.J, Kay C., Samson L., Franz M.,Forman J.P., Curhan G., Rimm E.B.** Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults, *Am J Clin Nutr.*, vol. 93, pp. 338-347, (2011).

**Cazenave A. Beretz and J. P.** The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions in Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties, pp. 187-200, (1988).

**Chabane MN Ahmad AA, Peluso J, Muller CD, Ubeaud G.** Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells, *J Pharm Pharmacol*, vol. 61, pp. 1473-1483, (2009).

**Cholbi M.R., Paya M. και Alcaraz M.J.** Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation, *Experientia*, vol. 47, pp. 195-199, (1991).

**Cimpan G. [και συν.]** Role of stationary phase and eluent composition on the determination of log P values of N-hydroxyethylamide of aryloxyalkylen and pyridine carboxylic acids by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, vol. 714, pp. 247-261, (1998).

**Clifford F. A. Tomas-Barberan and M. N.** Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, pp. 1073-1080, (2000).

**Clifford M.N.** Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health, *Planta Med.*, vol. 70, pp. 1103-1114, (2004).

**Cook N.C. και Samman S.** Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, vol. 7, pp. 66-76, (1996).

**Costas Giagkinis Anna Tsantili-Kakoulidou** Alternative Measures of Lipophilicity: From Octanol–Water Partitioning to IAM Retention, *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, vol. 97, no 8, (2008).

**CR Evans** Flavonoids and isoflavonoids: Absorption, metabolism, and bioactivity, *Life Sci.*, vol. 36, pp. 827-828, (2003).

**Craig W. J.** Health-promoting properties of common herbs, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70, no 3, pp. 491-499, (1999).

**D. Commenges V. Scotet, S. Renaud, H. Jacqmin-Gadda, P. Barberger-Gateau, and J. F. Dartigues** Intake of flavonoids and risk of dementia, *The European Journal of Epidemiology*, vol. 16, no 4, pp. 357-363, (2000).

**D. R. Ferry A. Smith, and J.Malkhandi** Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition, *Clinical Cancer Research*, vol. 2, no 4, pp. 659-668, (1996).

**D. Rhee R. Markovich, W.G. Chae, X. Qiu, C. Pidgeon** Chromatographic surfaces prepared from lyso phosphatidylcholine ligands, *Anal. Chim. Acta.*, vol. 297, pp. 377-386, (1994).

**D. Szostak-Węgierek** The role of flavonoids in the prevention of atherosclerosis, *Med Metabol.*, vol. 3, no 2, pp. 28-40, (1999).

**D. Verzele F. Lynen, M. De Vrieze, A.G. Wright, M. Hanna-Brown, P. Sandra** Development of the first sphingomyelin biomimetic stationary phase for immobilized artificial membrane (IAM) chromatography, *Chem. Commun.(Camb.)*, vol. 48, pp. 1162-1164, (2012).

**Das A. K. Ratty and N. P.** Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship, *Biochemical Medicine and Metabolic Biology.*, vol. 39, no 1, pp. 69-79, (1988).

**Datla K.P. Christidou M., Widmer W. W., Rooprai H.K., Dexter D.T.** Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease, *NeuroReport.*, vol. 12, pp. 3871-3875, (2001).

**DD Lasic** Liposomes: from physics to applications, Amsterdam : Elsevier, (1993).

**Del Rio D. [και συν.]** Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea, *Nutrition*, vol. 26, pp. 528-533, (2010).

**Delattre J Couvreur P, Puisieux F, Philippot JR, Schuber F.** Les liposomes aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques, Paris, (1993).

**Dietz E. Wollenweber and V. H.** Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants, *Phytochemistry*, vol. 20, no 5, pp. 869-932, (1981).

**Dilis V. Trichopoulou A.** Antioxidant intakes and food sources in Greek Adults, *J Nutr.*, vol. 140, pp. 1274-1279, (2010).



**E. H. Kelly R. T. Anthony, and J. B.Dennis** Flavonoid antioxidants:chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no 10, pp. 572-584, (2002).

**Espinosa S. [et al.]** Change of mobile phase pH during gradient reversed-phase chromatography with 2,2,2-trifluoroethanol-water as mobile phase and its effect on the chromatographic hydrophobicity index determination, *J. Chromatogr. A.*, vol. 954, pp. 77-87, (2002).

**F. Pourmorad S. J.Hosseinimehr, and N. Shahabimajd** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *The African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no 11, pp. 1142-1145, (2006).

**F.Du F. Zhang, F. Chen et al.** Advances in microbial heterologous production of flavonoids, *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no 18, pp. 2566-2574, (2011).

**Fahr Xiangli Liu & Bernard Testa & Alfred** Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation, *Pharm Res.*, vol. 28, pp. 962-977, (2011).

**Fresco P Borges F, Diniz C, Marques MPM** New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols, *Med Res Rev.*, vol. 26, pp. 747-766, (2006).

**G. Agati E. Azzarello, S. Pollastri, and M. Tattini** Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance, *Plant Science*, vol. 196, pp. 67-76, (2012).

**G. Block B. Patterson, and A. Subar** Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutrition and Cancer*, vol. 18, no 1, pp 1-29, (1992).

**G. Cao E. Sofic, and R. L. Prior** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 22, no 5, pp. 749-760, (1997).

**G. G. Duthie S. J. Duthie, and J. A.M. Kyle** Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants, *Nutrition Research Reviews*, vol. 13, no 1, pp. 79-106, (2000).

**Graefe E.U. [και συν.]** Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans, *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 41, pp. 492-499, (2001).

**Hallmann E. Rembialowska E., Szafirowska A., Grudzień K.** Importance of fruits and vegetables from organic production in preventive medicine at the example of peppers from organic farming, vol. 58, no 1, pp. 77-82, (2007).

**Havsteen B. H.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 96, no 2-3, pp. 67-202, (2002).

**Hig Rocz Panstw Zakl** Contemporary view of plant antioxidants role in prevention of civilization diseases, vol. 60, no 3, pp. 201-206, (2009).

**Hodek P Trefil P, Stiborova M.** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chem Biol Interact.*, vol. 139. pp. 1-21, (2002).

**Hollman P. C. H.** Absorption, bioavailability and metabolism of flavonoids, *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, pp. 74-83, (2004).

**Hunter T.** Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell.*, vol. 80, no 2, pp. 225-236, (1995).

**I. C. W. Arts V. B. Putte, and P. C. H. Hollman** Catechins contents of foods commonly consumed in the Netherlands 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no 5, pp. 1746-1751, (2000).

**I. Erlund M.L. Silaste, G. Alfthan, M. Rantala, Y.A. Kesaniemi, A. Aro** Plasma concentrations of the flavonoids *hesperetin*, *naringenin* and *quercetin* in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables, *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 56, pp. 891-898, (2002).

**Iriti M.** Introduction to Polyphenols, Plant Chemicals for Human Health, *Mini Rev. Med. Chem.*, vol.11, pp. 1183-1185, (2011).

**J. C. Cumella H. Faden, and F. Middleton** Selective activity of plant flavonoids on neutrophil chemiluminescence (CL), *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 77, no 131, (1987).

**J. E. Brown H. Khodr, R. C. Hider, and C. Rice-Evans** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties, *Biochemical Journal*, vol. 330, no 3, pp. 1173-1178, (1998).

**J. P. E. Spencer D. Vauzour, and C. Rendeiro** Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 492, no 1-2, pp. 1-9, (2009).

**J. V. Swinnen T. Roskams, S. Joniau et al.** Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer, *International Journal of Cancer*, vol. 98, no 1, pp. 19-22, (2002).

**J. X. Li B. Xue, Q. Chai, Z. X. Liu, A. P. Zhao, and L.B. Chen** Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* in hypertensive rats, *The Chinese Journal of Physiology*, vol. 48, no 2, pp. 101-106, (2005).

**J.A.M. Kyle G.G. Duthie** Flavonoid in food. Chemistry, Biochemistry and Applications, pp. 219-262, (2006).

**J.K. Seydel M. Wiese** Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling, pp. 217-232, (2002).

**J.M. Gee M.S. DuPont, A.J. Day, G.W. Plumb, G. Williamson, I.T. Johnson** Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway, *J. Nutr.*, vol. 130, pp. 2765–2771, (2000).

**J.M. Li C.T. Che, C.B. Lau, P.S. Leung, C.H. Cheng** Inhibition of intestinal and renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter by *naringenin*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38., pp. 985-995, (2006).

**J.R. Ehrenkranz N.G. Lewis, C.R. Kahn, J. Roth** Phlorizin: a review, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, vol. 21, pp. 31-38, (2005).

**Joseph A. Rothwell Andrea J. Day, Michael R.A. Morgan** Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids, *J. Agric. Food Chem*, American Chemical Society, vol. 53, pp. 4355-436, (2005).

**K. Brusselmans E. de Schrijver, W. Heyns, G. Verhoeven, and J. V. Swinnen** Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells, *International Journal of Cancer*, vol. 106, no 6, pp. 856-862, (2003).

**K. Dwiecki G. Neunert, P. Polewski, K. Polewski** Antioxidant activity of *daidzein*, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes, *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 96, pp. 242-248, (2009).

**K. K. Carroll N. Guthrie, F. V. So, and A. F. Chambers** Anticancer properties of flavonoids with emphasis on citrus flavonoids in *Flavonoids in Health and Disease*, pp. 437–446, (1998).

**K.L. Valko S.B. Nunhuck, A.P. Hill** Estimating unbound volume of distribution and tissue binding by in vitro HPLC-based human serum albumin and immobilized artificial membrane-binding measurements, *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, pp. 849-862, (2011).

**Kanaze F.I. [et al.]** Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects, *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 61, pp. 472-477, (2007).

**Karger B.L. [και συν.]** Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, vol. 128, pp. 65-78, (1976).

**Kauzmann W.** *Adv. Protein Chem.*, vol. 14, pp. 1-63, (1959).

**Kavvadias D Sand P, Youdim KA, et al.** The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood–brain barrier and exhibits anticonvulsive effects, *Br J Pharmacol.*, vol. 142, pp. 811-820, (2004).

**Kay C.D., Kroon P.A. και Cassidy A.** The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products, *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 53, pp. 92-101, (2009).

**L. H. Yao Y. M. Jiang, J. Shi et al.** Flavonoids in food and their health benefits, *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 59, no 3, pp. 113-122, (2004).

**L. L. Thomsen L. M. Ching, L. Zhuang, J. B. Gavin, and B. C. Baguley** Tumordependent increased plasma nitrate concentrations as an indication of the antitumor effect of flavone-8-acetic acid and analogues in mice, *Cancer Research*, vol. 51, no 1, pp. 77-81, (1991).

**L. Movileanu I. Neagoe, M.L. Flonta** Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers, *Int. J. Pharm.*, vol. 205, pp. 135-146, (2000).

**L. Zhang Z. Zuo, G. Lin** Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids, *Mol. Pharm.*, vol. 4, pp. 833-845, (2007).

**Landete J.M.** Updated knowledge about polyphenols: Functions, bioavailability, metabolism, and health, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 52, pp. 936-948, (2012).

**Lasic D.D.** *Liposomes: From physics to applications*, Elsevier, (1993).

**Letenneur L. Proust-Lima C., Gouge A.L., Dartigues J.F., Barberger-Gateau P.** Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period, *Am J Epidemiol.*, vol. 165, pp. 1364-1367, (2007).

**Lombardo F. [et al]** ElogDoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds, *J. Med. Chem.*, vol. 44, pp. 2490-2497, (2001).

**M. Bazuine P.J. van den Broek, J.A. Maassen** *Genistein* directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 326, pp. 511-514, (2005).

- M. Cichna P. Markl, J.F.K. Huber, J. Pharm. Biom. Anal.**, vol. 13, pp. 339-351, (1995).
- M. F. Mahomoodally A. Gurib-Fakim, and A. H. Subratty** Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius, *Pharmaceutical Biology*, vol. 43, no 3, pp. 237–242, (2005).
- M. H. Pan C. S. Lai, and C. T.Ho** Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids, *Food and Function*, vol. 1, no 1, pp. 15-31, (2010).
- M. H. Siess A. M. Le Bon, M. C. Canivenc-Lavier et al.** Flavonoids of honey and propolis: characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no 8, pp. 2297–2301, (1996).
- M. J. Tunon M. V. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos, and J. Gonzalez-Gallego** Potential of flavonoids as antiinflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways, *Current Drug Metabolism*, vol. 10, no 3, pp. 256-271, (2009).
- M. Kuzdzal O. Wesolowska, J. Strancar, K. Michalak** Fluorescence and ESR spectroscopy studies on the interaction of isoflavone genistein with biological and model membranes, *Chem. Phys. Lipids*, vol. 164, pp. 283-291, (2011).
- M. Leopoldini N. Russo, S. Chiodo, and M. Toscano** Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid *quercetin*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no 17, pp. 6343-6351, (2006).
- M. Mohapatra U. Subuddhi, A.K. Mishra** Photophysical behaviour of ground state anion and phototautomer of 3-hydroxyflavone in liposome membrane, *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 8, pp. 1373-1378, (2009).
- M. Raghunathan Y. Zubovski, R.M. Venable, R.W. Pastor, J.F.Nagle, S. Tristram-Nagle** Structure and elasticity of lipidmembranes with *genistein* and *daidzein* bioflavinoids using X-ray scattering and MD simulations, *J. Phys. Chem. B.*, vol. 116, pp. 3918-3927, (2012).
- M.E. Scharf J.J. Neal, C.B. Marcus, G.W. Bennett** Cytochrome P450 purification and immunological detection in an insecticide resistant strain of German cockroach (*Blattella germanica*, L.), *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 28, pp. 1-9, (1998).
- M.S. Mirrlees S.J. Moulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor, J. Med. Chem.**, vol. 19, no 5, pp. 615-619, (1976).

**Maclouf E. Corvazier and J.** Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 835, no 2, pp. 315-321, (1985).

**Majewska M. Czeczot H.** Flavonoids in prevention and therapy diseases, vol. 65, no 5, pp. 369-377, (2009).

**Majewska-Wierzbicka M. Czeczot H.** Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases, *Pol Merk Lek.*, vol. 32, pp. 50-54, (2012).

**Markovich R. J., Stevens J. M. και Pidgeon C.** Fourier transform infrared assessed of membrane lipids immobilized to silica : leaching and stability of immobilized artificial membrane –bonded phase, *Anal. Biochem.*, vol. 182, pp. 237-244, (1989).

**Markovich R.J., Stevens J.M. και Pidgeon C.** Fourier transform infrared assessed of membrane lipids immobilized to silica: leaching and stability of immobilized artificial membrane–bonded phase, *Anal. Biochem.*, vol. 182, pp. 237-244, (1989).

**Martin Syngé J.** *Biochem.*, vol. 35, pp. 1358-1368, (1941).

**Matthew W. L. Davis and S. B.** Antioxidants and cancer III: *quercetin*, *Alternative Medicine Review*, vol. 5, no 3, pp. 196-208, (2000).

**McCullough M.L Peterson J.J., Patel R., Jacques P.F, Shah R., Dwyer J.T.** Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults, *Am J Clin Nutr.*, vol. 95, pp. 454-464, (2012).

**Middleton E. J.** Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 439, pp. 175-182, (1998).

**Middleton E.** The flavonoids, *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 5, pp. 335-338, (1984).

**Miller E. Malinowska K., Gałęcka E., Mrowicka M., Kędzióra J.** Role of flavonoids as antioxidants in human organism, *Pol Merk Lek.*, vol. 24, pp. 556-560, (2008).

**Min-Hsiung Pan Ching-Shu Lai and Chi-Tang Ho** Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids, *The Royal Society of Chemistry*, vol. 1, pp. 15-31, (2010).

**Minick D.J. [et al.]** A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Med. Chem.*, vol. 31, pp. 1923-1933, (1988).

**Morris ME Zhang SZ** Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters, *Life Sci.*, vol. 78, pp. 2116-2130, (2006).

**Morse K. και Pidgeon C.** Importance of mobile phase in immobilized artificial membrane chromatography, *In Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, pp. 351-381, (2001).

**Murota K Shimizu S, Chujo H, Moon JH, Terao J.** Efficiency of absorption and metabolic conversion of *quercetin* and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2, *Arch Biochem Biophys.*, vol. 384, pp. 391-397, (2004).

**Murota K Shimizu S, Miyamoto S, et al.** Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids, *J Nutr.*, vol. 132, pp. 1956-1961, (2002).

**Nishizuka Y.** The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation, *Nature*, vol. 334, no 6184, pp. 661-665, (1988).

**Ong S. [et al.]** Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, vol. 67, pp. 755-762, (1995).

**P. Artursson J. Karlsson** Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 175, pp. 880-885, (1991).

**P. C. H. Hollman M. N. C. P. Buijsman, Y. van Gameren, P. J. Cnossen, J. H. M. de Vries, and M. B. Katan** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man, *Free Radical Research*, vol. 31, no 6, pp. 569-573, (1999).

**P. Kosinova K. Berka, M. Wykes, M. Otyepka, P. Trouillas** Positioning of antioxidant quercetin and its metabolites in lipid bilayer membranes: implication for their lipid-peroxidation inhibition, *J. Phys. Chem. B.*, vol. 116, pp. 1309-1318, (2012).

**P. Strobel C. Allard, T. Perez-Acle, R. Calderon, R. Aldunate, F. Leighton** *Myricetin*, *quercetin* and *catechin-gallate* inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes, *Biochem. J.*, vol. 386, pp. 471-478, (2005).

**Pandey A. K.** Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Pariheniumhisterophorus*: an in vitro study, *National Academy Science Letters*, vol. 30, no 11-12, pp. 383-386, (2007).

**Pandey S. Kumar and A. K.** Antioxidant, lipo-protective and antibacterial activities of phytoconstituents present in *Solanum xanthocarpum* root, *International Review of Biophysical Chemistry*, vol. 3, no 3, pp. 42-47, (2012).

**Pandey S. Kumar and A. K.** Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts, *Vegetos*, vol. 26, pp. 301-307, (2013).

**Pandey Shashank Kumar and Abhay K.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The ScientificWorld Journal*, (2013).

**Paradkar PN Blum PS, Berhow MA, Bauman H, Kuo SM** Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced inflammatory reaction in liver and intestine, *Cancer Lett.*, vol. 215, pp. 21-28, (2004).

**Q. He J. Kim, and R. P. Sharma** Silymarin protects against liver damage in balb/c mice exposed to fumonisin b1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases, *Toxicological Sciences*, vol. 80, no 2, pp. 335-342, (2002).

**Q. Sheng K. Schulten, C. Pidgeon** Molecular dynamics simulation of immobilized artificial membranes, *J. Phys. Chem.*, vol. 99, pp. 1018-1027, (1995).

**Quinn P.J.** The Molecular Biology of Cell Membranes, pp. 151-163, (1976).

**R. A. Dixon P. M. Dey, and C. J. Lamb** Phytoalexins: enzymology and molecular biology, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 55, pp. 1-136, (1983).

**R. Edenharder I. P. Von, and R. Rauscher** Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food, *Mutation Research*, vol. 287, no 2, pp. 261-274, (1993).

**R. L. Chang M. T. Huang, A. W. Wood et al.** Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo[a]pyrene and (+/-)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on mouse skin and in the newborn mouse, *Carcinogenesis*, vol. 6, no 8, pp. 1127-1133, (1985)

**R. L. Singhal Y. A. Yeh, N. Prajda, E. Olah, G. W. Sledge, and G. Weber** *Quercetin* down-regulates signal transduction in human breast carcinoma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 208, no 1, pp. 425-431, (1995).

**R. Saller R.Meier, and R. Brignoli** The use of silymarin in the treatment of liver diseases, *Drugs*, vol. 61, no 14, pp. 2035-2063, (2001).

**R.J. Markovich J.M. Stevens, C. Pidgeon** Fourier transform infrared assessed of membrane lipids immobilized to silica: leaching and stability of immobilized artificial membrane-bonded phases, *Anal. Biochem.*, vol. 182, pp. 237-244, (1989).

**R.J. Markovich X. Qiu, D.E. Nichols, C. Pidgeon, B. Invergo, F.M. Alvarez** Silica subsurface amine effect on the chemical stability and chromatographic properties of



end-capped immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, vol. 63, pp. 1851-1860, (1991).

**R.Koes W.Verweij, and F.Quattrocchio** Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways, *Trends in Plant Sciences*, vol. 10, no 5, pp. 236-242, (2005).

**Rhee D. [et al.]** Chromatographic surfaces prepared from lyse phosphatidylcholine ligands, *Anal. Chim. Acta.*, vol. 297, pp. 377-386, (1994).

**Rice-Evans C.A., Miller N.J. και Paganga G.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, pp. 933-956, (1996).

**Rizvi Kanti Bhooshan Pandey and Syed Ibrahim** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Landes Bioscience*, vol. 2, no 5, pp. 270-278, (2009).

**Rizza S. Muniyappa R., Iantorno M., Kim J.A., Chen H., C., Pullikotil P., Senese N., Tesauro M., Lauro D., Cardillo C., Quon M.J.** Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome, *J Clin Endocrinol Metab.*, vol. 30, no 2, pp.182-187, (2011).

**Robak J.** Flavonoids as drugs inhibiting aggregation of blood platelets, *Farm. Polska.*, vol. 49, pp. 1-4, (1993).

**Ross JA Kasum CM.** Dietary flavonoids: Bioavailability,metabolic effects, and safety, *Annu Rev Nutr .*, vol. 22, pp. 19-34, (2002).

**Rotelli AE Guardia T, Jua´rez AO, de la Rocha NE** Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation, *Pharmacol Res.*, vol. 48, pp. 601-606, (2003).

**Rupasinghe H.P.V., Erkan N. και Yasmin A.** Antioxidant protection of eicosapentaenoic acid and fish oil oxidation by polyphenolic-enriched apple skin extract, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, pp. 1233-1239, (2010).

**Rupasinghe Surangi H. Thilakarathna and H. P. Vasantha** Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement, *Nutrients*, vol. 5, pp. 3367-3387, (2013).

**S. Chaudhuri B. Pahari, B. Sengupta, P.K. Sengupta** Binding of the bioflavonoid robinetin with model membranes and hemoglobin: inhibition of lipid peroxidation and protein glycosylation, *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 98, pp. 12-19, (2010).

- S. Kumar A. Mishra, and A. K. Pandey** Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, (2013).
- S. Kumar G. Chashoo, A. K. Saxena, and A. K. Pandey** *Parthenium hysterophorus*: a probable source of anticancer antioxidant and anti-HIV agents, *BioMed Research International.*, pp. 1-11, (2013).
- S. Kumar U. K. Sharma, A. K. Sharma, and A. K. Pandey** Protective efficacy of *Solanum xanthocarpum* root extracts against free radical damage: phytochemical analysis and antioxidant effect, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 58, no 1, pp. 171-178, (2012).
- S. M. Kim K. Kang, E. H. Jho et al.** Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneata* against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide, *Phytotherapy Research*, vol. 25, no 7, pp. 1011-1017, (2011).
- S. Ong H. Liu, C. Pidgeon** Immobilized artificial membrane chromatography: Measurements of membrane partition coefficient and predicting drug permeability, *J. Chromatogr. A.*, vol. 728, pp. 113-128, (1996).
- S. Ong H. Liu, X. Qiu, G. Bhat, C. Pidgeon** Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces, *Anal. Chem.*, vol. 65, pp. 755-762, (1995).
- S. Wolfram M. Block, P. Ader** *Quercetin-3-glucoside* is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine, *J. Nutr.*, vol. 132, pp. 630-635, (2002).
- Santangelo C Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R.** Polyphenols, intracellular signalling and inflammation, *Ann Ist Super Sanita*, vol. 43, pp. 394-405, (2007).
- Scalbert A. [et al.]** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, pp. 276-282, (2002).
- Scheline R. R.** Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms, *Pharmacological Reviews*, vol. 25, no 4, pp. 451-532, (1973).
- Shabrova E.V. Tarnopolsky O., Singh A.P., Singh A.P., Plutzky J., Vorsa N., Quadro L.** Insights into the molecular mechanism of the anti-atherogenic actions of flavonoids in normal and obese mice, *Plos One*, vol. 6, (2011).
- Spencer J.P. [et al.]** Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: Gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo, *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 3, pp. 1023-1039, (2001).

**Spencer JP Abd El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC** Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research, *Br J Nutr.*, vol. 99, pp. 12-22, (2008).

**Steensma A. [et al.]** Bioavailability of *genistein* and its glycoside *genistin* as measured in the portal vein of freely moving unanesthetized rats, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 8006-8012, (2006).

**T. Sawa M. Nakao, T. Akaike, K. Ono, and H. Maeda** Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the antitumor-promoter effect of vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no 2, pp. 397-402, (1999).

**T. Yamamoto S. Hsu, J. Lewis, J. Wataha, D. Dickinson, B. Singh, W.B. Bollag, P. Lockwood, E. Ueta, T. Osaki, G. Schuster** Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 307, pp. 230-236, (2003).

**T.Walle** Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens:absorption, metabolism, and bioactivity): absorption and metabolism of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no 7, pp. 829-837, (2004).

**Taillardat-Bertschinger A. [et al.]** *Helv.Chim. Acta*, vol. 85, pp. 519-532, (2002).

**Taillardat-Bertschinger A. [και συν.]** Immobilized artificial membrane (IAM)-HPLC: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements, *J. Chromatogr. A.*, vol. 953, pp. 39-53, (2002).

**Tian XJ Yang XD, Wang K, Yang XW** The efflux of flavonoids morin, isorhamnetin-3-O-rutinoside and diosmetin-7-O-D-xylopyranosyl-(1-6)-D-glucopyranoside in the human intestinal cell line Caco-2, *Pharm Res*, vol. 23, pp. 1721-1728, (2006).

**Tian XJ Yang XW, Yang XD, Wang K.** Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model, *Int J Pharm.*, vol. 367, pp. 58-64, (2009).

**Tsantili-Kakoulidou A. [et al.]** Structural effects in the lipophilicity of di- and polysubstituted benzenes as measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, vol. 389, pp. 33-45, (1987).

**Tsantili-Kakoulidou Costas Giaginis and Anna** Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 31, pp. 79-96, (2008).

**V. Ajdzanovic M. Mojic, D. Maksimovic-Ivanic, M. Bulatovic, S. Mijatovic, V. Milosevic, I. Spasojevic** Membrane fluidity, invasiveness and dynamic phenotype of metastatic prostate cancer cells after treatment with soy isoflavones, *J. Membr. Biol.*, vol. 246, pp. 307-314, (2013).

**V.C. Reddy G.V. Vidya Sagar, D. Sreeramulu, L. Venu, M. Raghunath** Addition of milk does not alter the antioxidant activity of black tea, *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 49, pp. 189-195, (2005).

**Vauzour D. Vafeiadou K., Rodrigues-Mateos A., Rendeiro C., Spencer J.P.E.** The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects, *Genes Nutr.*, vol. 3, pp. 115-126, (2008).

**W. Bors W. Heller, C. Michel, and M. Saran** Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 343-355, (1990).

**W. Ren Z. Qiao, H.Wang, L. Zhu, and L. Zhang** Flavonoids:promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, vol. 23, no 4, pp. 519-534, (2003).

**W.Zhu Q. Jia,Y.Wang, Y. Zhang, and M.Xia** The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: involvement of a cAMP-PKA dependent signaling pathway, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no 2, pp. 314-327, (2012).

**Wilczyńska A. Retel M.** Evaluation of polyphenol dietary intake considering participation of honey, *Probl Hig Epidemiol.*, vol. 92, no 4, pp. 709-712, (2011).

**Xiangli Liu Bernard Testa, Alfred Fahr** Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation, *Pharm Res.*, vol. 28, pp. 962-977, (2011).

**Y. Wang Qi Wu, Xiu-Wei Yang, Xiaoda Yang, Kui Wang** The Membrane Transport of Flavonoids from *Crossostephium chinense* across the Caco-2 Monolayer, *BIOPHARMACEUTICS & DRUG DISPOSITION*, John Wiley & Sons, Ltd., vol. 32, pp. 16-24, (2011).

**Y. Zhang X.Wang, L.Wang, M. Yu, X. Han** Interactions of the *baicalin* and *baicalein* with bilayer lipidmembranes investigated by cyclic voltammetry and UV-vis spectroscopy, *Bioelectrochemistry*, vol. 95, pp. 29-33, (2014).

**Y.Wu F.Wang,Q.Zheng et al.** Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage, *Journal of Biomedical Science*, vol. 13, no 4 pp. 569-578, (2006).

**Youdim K. A. Joseph J.A.** A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects, *Free Radic Biol Med.*, vol. 30, pp. 583-594, (2001).

**Yury S. Tarahovsky Yuri A. Kim, Elena A. Yagolnik, Eugeny N. Muzafarov** Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling, *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier B.V., pp. 1235-1246, (2014).

**Zamora-Ros R. Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R., Berenguer T., Jakszyn P., Barricarte A., Ardanaz E., Amiano P., Dorronsoro M., Larranaga N., Martinez C. Sanchez M.J., Navarro C., Chirlaque M.D., Tormo M.j., Quiros J.R., Gonzalez C.A.** Estimation of dietary sources and flavonoid intake in Spanish adult population, *J Am Diet Assoc.*, vol. 110, pp. 390-398, (2010).

**Zetl J. Sonnenbichler and I.** Biochemical effects of the flavonolignan silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers, *Progress in Clinical and Biological Research.*, vol. 213, pp. 319-331, (1986).

**Zou L Wu Q, Yang XW, Fu DX.** Effects of chemical constituents of *Crossostephium chinense* on insulin secretion in rat islets *in vitro*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, vol. 34, pp. 1401-1405, (2009).

**Zujko M.E. Witkowska A.M., Waśkiewicz A., Sygnowska E.** Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population, *Adv Med Sci.*, vol. 57, no 2, pp. 375-384, (2012).

**H. van de Waterbeemd M. Kansy, B. Wanger, H. Fischer** Lipophilicity Measurement by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), *Lipophilicity in drug action and toxicology*, pp. 73-87, (1996).

**N. El Tayar Han Van De Waterbeemd, B. Testa** *J. Chromatogr.*, vol. 320, pp. 305-312, (1985).

**Πούλου Μ.** Τεχνικές Διαχωρισμού Στη Φαρμακευτική Ανάλυση, σσ. 131-171, (1997).

**Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα,** Ειδικά Μαθήματα Φαρμακευτικής Χημείας: Βασικές Αρχές Σχεδιασμού Φαρμάκων, (1993).