



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: «ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ
ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗΝ
ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΥ
ΦΑΣΗΣ (ΣΤΗΛΗ LC-18-DB) ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ
ΤΗΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γιαγκίνης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης
Τροφίμων & Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου

Ντότσικας Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Γκίκας Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κωνσταντίνο Γιαγκίνη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Λέκτορα κύριο Φώτη Τσόπελα, την κυρία Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα από το Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, καθώς και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Χρύσανθο Στεργιόπουλο για την υποδοχή, τη στήριξη, τη βοήθεια και την φιλική τους στάση όλο αυτό το διάστημα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Καθηγητές του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας και ιδιαίτερα τους Ι. Ντότσικα, Ε. Γκίκα και Ε. Παντερή για το ενδιαφέρον τους και το επίπεδο σπουδών που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζαν για την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φλαβονοειδή αποτελούν ομάδα φυσικών προϊόντων, φυτικής προέλευσης, που ανήκουν στη χημική τάξη των πολυφαινολών. Παρουσιάζουν ποικιλία χημικών δομών και χαρακτηριστικών, καθώς και σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Οι ευεργετικές δράσεις τους περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαθηρωματικές. Για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης, η πλέον κρίσιμη παράμετρος θεωρείται ότι είναι η απορρόφησή τους διαμέσου του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου. Η λιποφιλία μίας ουσίας καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την απορρόφησή της διαμέσου του εντερικού επιθηλίου.

Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκαν οι χρωματογραφικοί δείκτες λιποφιλίας $\log k_w$ 29 φλαβονοειδών με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC). Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη SUPELCOSIL LC-18-DB. Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε ως υδατική συνιστώσα, κορεσμένο σε οκτανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 7,4 και ως οργανικός τροποποιητής, μεθανόλη. Προσδιορίστηκε μεγάλος αριθμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φλαβονοειδών με την χρήση λογισμικών προγραμμάτων. Τα δεδομένα εντερικής διαπερατότητας των υπό μελέτη φλαβονοειδών συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία.

Διαπιστώθηκε παρόμοιος μηχανισμός έκλουσης για το σύνολο των φλαβονοειδών με μικρές αποκλίσεις. Καταγράφηκε μέτρια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας για 21 φλαβονοειδή για τα οποία υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα. Με την εισαγωγή του όρου $\log D_{7,4}$ βελτιώθηκε σημαντικά η συσχέτιση μεταξύ των δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας. Η τελική εξίσωση που προέκυψε θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας φλαβονοειδών για τα οποία δεν υπάρχουν διαθέσιμες πειραματικές τιμές στην βιβλιογραφία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Φλαβονοειδή, Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσης (RP-HPLC), Λιποφιλία, Εντερική διαπερατότητα, κύτταρα Caco-2, LC-18-DB

ABSTRACT

Flavonoids are a group of natural products, of plant origin, belonging to the chemical class of polyphenols. They present a variety of chemical structures and characteristics, as well as important pharmacological properties. Their beneficial effects include antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-atherosclerotic. The most critical parameter for the manifestation of their biological activity is thought to be their absorption through the small intestinal mucosa. Lipophilia of a substance significantly determines its absorption through the intestinal epithelium.

In the present study, the chromatographic $\log k_w$ indices of 29 flavonoids were determined by the use of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). SUPELCOSIL LC-18-DB was used as static phase. For the preparation of mobile phase, octanol-saturated MOPS buffer with pH 7.4 was used aqueous component and methanol as organic modifier. A large number of physicochemical properties of flavonoids were determined using software programs. The intestinal permeability data of the flavonoids studied were collected from the literature.

A similar elution mechanism was found for all flavonoids with minor deviations. A moderate linear correlation was observed between $\log k_w$ chromatographic indices and intestinal permeability coefficient for 21 flavonoids for which bibliographic data were available. The introduction of the term $\log D_{7,4}$ significantly improved the correlation between the $\log k_w$ indices and the intestinal permeability coefficient. The resulting equation could be used to estimate the intestinal permeability of flavonoids for which no experimental values are available in the literature.

KEYWORDS: Flavonoids, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), Lipophilicity, Intestinal Absorption, Caco-2 cells, LC-18-DB

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	5
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	7
1.1.1 Εισαγωγή.....	7
1.1.2 Χημική Δομή και Ταξινόμηση.....	8
1.1.3 Πηγές Φλαβονοειδών.....	12
1.1.4 Χημικές ιδιότητες.....	13
1.1.5 Βιοσύνθεση.....	16
1.1.6 Απορρόφηση, Βιοδιαθεσιμότητα, Μεταβολισμός, Απέκκριση.....	17
1.1.7 Φαρμακολογικές Ιδιότητες Φλαβονοειδών.....	20
1.2 ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ – ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ.....	23
1.2.1 Λιποφιλία.....	23
1.2.2 Εντερική διαπερατότητα.....	27
1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	30
1.3.1 Εισαγωγή.....	30
1.3.2 Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High - Performance Liquid Chromatography).....	31
1.3.3 Κανονικής και Αντίστροφης Φάσης Χρωματογραφία.....	32
1.3.4 Οργανολογία.....	33
1.3.5. Στατικές φάσεις στην RP-HPLC.....	35
1.3.6 Κινητές φάσεις στην RP-HPLC.....	36
1.3.7 RP-HPLC και δείκτες λιποφιλίας.....	38
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
2.1. ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	41
2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	47
2.2.1 Αντιδραστήρια.....	47
2.2.2 Οργανολογία.....	47
2.2.3 Προγράμματα και Βάσεις Δεδομένων.....	47
2.2.4 Πειραματικό Πρωτόκολλο.....	48
2.2.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών $\log k_w$	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
3.1 ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ $\log k/\phi$ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΙΜΩΝ $\log k_w$	52
3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ CACO-2 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ.....	65
3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΣΧΕΣΕΩΝ PCACO / $\log k_w$ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΣΕΩΝ.....	69
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	73
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

1.1.1 Εισαγωγή

Τα φλαβονοειδή είναι μία σημαντική ομάδα φυσικών προϊόντων που ανήκουν σε μία κατηγορία φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους, έχουν πολυφαινολικές δομές, και αποτελούν μία από τις πιο χαρακτηριστικές τάξεις ενώσεων στα ανώτερα φυτά. Βρίσκονται ευρέως σε φρούτα, λαχανικά, και κάποια ποτά. (1) Είναι τα πιο κοινά φυτικά φαινολικά συστατικά, τα οποία εμφανίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών και ιδιαίτερα στα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη φωτοσύνθεση, και αποτελούν βασικές χρωστικές των ανθοφόρων φυτών στις περισσότερες οικογένειες αγγειόσπερμων. Επιπλέον, έχουν ευθύνη και για τη γέυση, την πρόληψη της οξειδωσης των λιπαρών και την προστασία των βιταμινών και των ενζύμων των φυτών. (2)

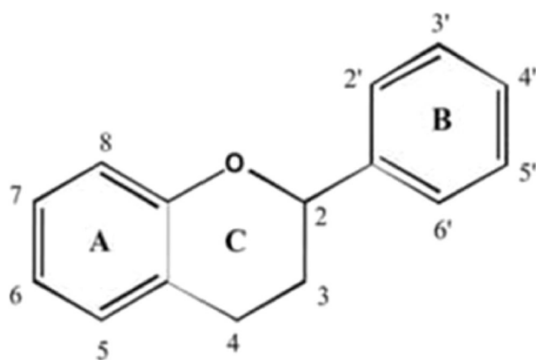
Έχουν ευρεθεί αρκετές αποδείξεις για το ρόλο τους στη γονιδιακή ρύθμιση και το μεταβολισμό της ανάπτυξης των φυτών. Ο μεταλλαξιγόνο ρόλος τους έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους βοτανολογικούς ταξινομιστές και τους ιατρούς, λόγω των ενδεχόμενων κινδύνων από την κατανάλωση φυσικών προϊόντων. Οι διατροφολόγοι εκτιμούν τη μέση ημερήσια κατανάλωση φλαβονοειδών από ανθρώπους με κανονική διατροφή σε 1-2 g, ποσότητα που θεωρείται μεγάλη για σχετικά άγνωστα συστατικά και αποτελεί λόγο για περαιτέρω μελέτη στους τομείς της τοξικολογίας και της διατροφής. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι μέχρι στιγμής έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στη μελέτη υψηλής τοξικότητας συστατικών σε μικρές συγκεντρώσεις, αλλά όχι στη μεγάλη πρόσληψη ασθενών τοξινών. Ωστόσο κρίνεται ότι δεν υπάρχει ιδιαίτερος λόγος ανησυχίας, καθώς αυτή η κατάσταση υφίσταται από καταβολής του ανθρωπίνου είδους. (3)

Για τους φυτικούς οργανισμούς, εκτός από τη συμβολή τους στο χρώμα και το άρωμα των άνθεων, τα φλαβονοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο και σε άλλες λειτουργίες. Για παράδειγμα, συμμετέχουν στην προσέλκυση επικονιαστών ώστε να αναπαραχθούν τα φυτά ή βοηθούν στη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη των δενδρυλλίων. Επιπλέον, προστατεύουν τα φυτά από διάφορα στρες, βιοτικά και αβιοτικά, δρουν ως μοναδικά φίλτρα κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας, και λειτουργούν ως μοριακοί σηματοδότες, φυτοαλεξίνες, αποτοξινωτικοί παράγοντες και αντιμικροβιακά συστατικά.

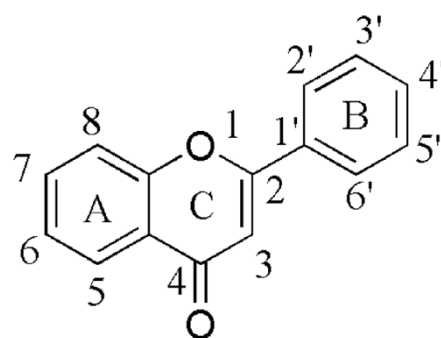
Μία ακόμη ιδιότητά τους, είναι ο ρόλος που διαδραματίζουν εναντίον αντίξοων συνθηκών όπως οι πολύ χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος, η ξηρασία, η υπεριώδης ακτινοβολία ή άλλες καταπονήσεις. (4), (5)

1.1.2 Χημική Δομή και Ταξινόμηση

Τα φλαβονοειδή έχουν πολυφαινολική δομή, η οποία βασίζεται στον πυρήνα της φλαβάνης (Εικόνα 1). Ο σκελετός τους αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα, τα οποία είναι διατεταγμένα σε δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) που ενώνονται μεταξύ τους με μία γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα (C6-C3-C6) και από αυτή προκύπτει ένας ετεροκυκλικός πυρολικός δακτύλιος (C). Ο σκελετός αυτός, καθώς και η αρίθμηση του, φαίνεται στην εικόνα 2 (6), (7):



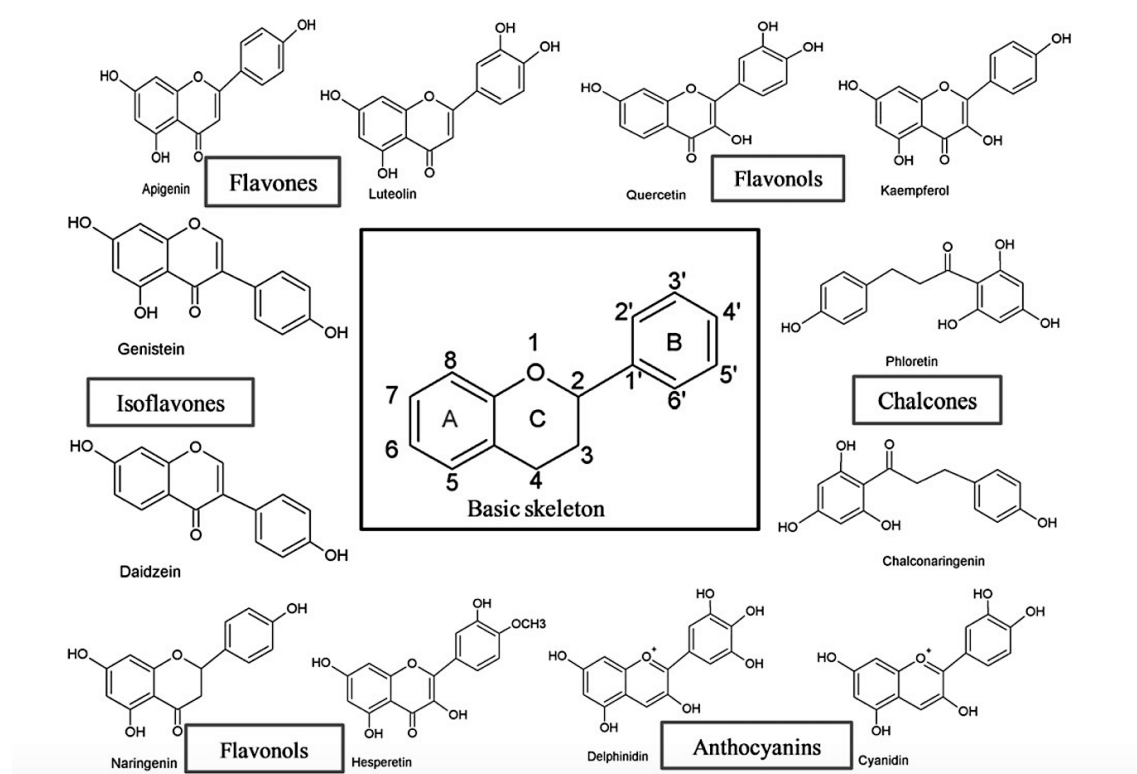
Εικόνα 1: Δομή Φλαβάνης (8)



Εικόνα 2: Βασικός σκελετός φλαβονοειδών (5)

Τα φλαβονοειδή υποδιαιρούνται σε διάφορες υποομάδες ανάλογα με το άτομο άνθρακα του C-δακτυλίου στον οποίο συνδέεται ο Β-δακτύλιος, και στο βαθμό ακορεστότητας και οξείδωσης του C-δακτυλίου: τα φλαβονοειδή στα οποία ο Β-δακτύλιος συνδέεται στη θέση 3 του C-δακτυλίου ονομάζονται ισοφλαβόνες, ενώ εκείνα στα οποία ο Β-δακτύλιος συνδέεται στη θέση 4 του C-δακτυλίου ονομάζονται νεοφλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή στα οποία ο Β-δακτύλιος συνδέεται στη θέση 2, χωρίζονται σε επιπλέον υποκατηγορίες με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά του C-δακτυλίου. Οι υποκατηγορίες αυτές είναι οι φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανονόλες, φλαβανόλες ή κατεχίνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες. (Εικόνα 3) (1), (9)

Τα φλαβονοειδή βρίσκονται στη φύση με τη μορφή αγλυκονών, γλυκοζιτών και μεθυλιωμένων παραγώγων. Επιπλέον, μπορεί να ευρεθούν με τη μορφή μεθυλ-αιθέρων και ακετυλ-εστέρων της υδροξυλομάδας. Οι γλυκοζίτες σχηματίζονται συνήθως στις θέσεις 3 (3-O-γλυκοζίτες) και 7, και τα σάκχαρα είναι συνήθως L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, γλυκοραμνόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη ή ξυλόζη, με τη γλυκόζη να αποτελεί το πλέον σύνθηες. Η σύνδεση με γλυκουρονικό ή γαλακτουρονικό οξύ είναι σπάνια. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή μπορεί να σχηματίσουν γλυκοζιτικό δεσμό με δισακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες, με τις πλέον συνηθισμένες περιπτώσεις να είναι η ρουτινόζη (6-O-α-L-ραμνοζυλ-D-γλυκόζη) και η νεοεσπεριδόζη (2-O-α-L-ραμνοζυλ-D-γλυκόζη). Μερικές φορές, μπορεί να παρατηρηθεί και ακυλίωση των γλυκοζιτών, όπου ένα ή περισσότερα από τα υδροξύλια των σακχάρων σχηματίζουν παράγωγα οξέων όπως το οξικό, το φερουλικό, το μαλονικό, το σιναπικό, το p-κουμαρικό ή το καφεϊκό. Ακόμη πιο σπάνια, μπορεί να παρατηρηθούν θειικά άλατα φλαβονοειδών, τα οποία περιέχουν 1 ή περισσότερα θειικά κατάλοιπα, συνδεδεμένα με φαινολική ή υδροξυλομάδα σακχάρου. (2), (10), (11)



Εικόνα 3: Ταξινόμηση Φλαβονοειδών (1)

Φλαβόνες: Οι φλαβόνες αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές υποκατηγορίες φλαβονοειδών. Βρίσκονται σε διάφορα μέρη του φυτού ως γλυκοζίτες. Κάποιες από τις σημαντικότερες πηγές τους είναι το σέλινο, ο μαϊντανός, οι κόκκινες πιπεριές, το χαμομήλι, η μέντα και το ginkgo biloba. Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν τα φλαβονοειδή λουτεολίνη (luteolin), απιγενίνη (apigenin) και τανγκερετίνη (tangeritin). Έχουν διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων 2 και 3 και κετονικό καρβοξύλιο στη θέση 4 του C-δακτυλίου. Επιπλέον, οι περισσότερες φλαβόνες σε φρούτα και λαχανικά έχουν υδροξυλομάδα στη θέση 5 του A-δακτυλίου, ενώ υδροξυλίωση μπορεί να γίνει και σε άλλες θέσεις, κυρίως στη θέση 7 του A-δακτυλίου ή στις θέσεις 3' και 4' του B-δακτυλίου, ανάλογα με την ταξινομική κατάταξη του συγκεκριμένου είδους λαχανικού ή φρούτου.

Φλαβονόλες: Οι φλαβονόλες είναι φλαβονοειδή με μία κετονική καρβοξυλομάδα. Η διαφορά τους με τις φλαβόνες, έγκειται στο υδροξύλιο της θέσης 3 του C-δακτυλίου, το οποίο μπορεί να γλυκοζυλιωθεί. Όσο οι φλαβόνες, τόσο και οι φλαβονόλες υπόκεινται συχνά σε μεθυλίωσεις και υδροξυλιώσεις και αποτελούν ίσως την πιο κοινή και τη μεγαλύτερη υποομάδα φλαβονοειδών σε φρούτα και λαχανικά, στα οποία βρίσκονται σε αφθονία. Τα πλέον μελετημένα αυτής της κατηγορίας, είναι η καιμπερόλη (kaempferol), η κερκετίνη (quercetin), η μυρισετίνη (myricetin) και η φισετίνη (fisetin). Καλές πηγές τους θεωρούνται τα κρεμμύδια, οι τομάτες, τα μήλα, τα σταφύλια και τα μούρα, καθώς και το τσάι και το κόκκινο κρασί. Η πρόσληψη φλαβονολών έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με πολλά οφέλη για την υγεία, τα οποία περιλαμβάνουν αντιοξειδωτική δράση και μείωση του ρίσκου αγγειακής νόσου.

Φλαβανόνες: Οι φλαβανόνες αποτελούν μία ακόμα σημαντική ομάδα, η οποία βρίσκεται κυρίως στα εσπεριδοειδή και ευθύνεται για την πικρή γεύση του χυμού και του φλοιού τους. Καλούνται επίσης διυδροφλαβόνες, επειδή ο C-δακτύλιός τους είναι κορεσμένος, και για το λόγο αυτό σε αντίθεση με τις φλαβόνες, ο διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 είναι κορεσμένος. Αυτό αποτελεί και τη μοναδική δομική διαφορά των δύο αυτών υποομάδων φλαβονοειδών. Οι φλαβανόνες σχετίζονται με αρκετά οφέλη για την υγεία, λόγω της ιδιότητάς τους να εξαλείφουν τις ελεύθερες ρίζες. Τα πιο γνωστά παραδείγματα φλαβονοειδών που ανήκουν στην κατηγορία αυτή, είναι η εσπερετίνη (hesperitin), η ναρινγενίνη (naringenin) και η εριοδικτυόλη (eriodictyol).

Ισοφλαβονοειδή: Τα ισοφλαβονοειδή αποτελούν επίσης μία μεγάλη και διακριτή ομάδα φλαβονοειδών. Έχουν περιορισμένη εξάπλωση στο φυτικό βασίλειο και βρίσκονται κυρίως στη σόγια και σε άλλα όσπρια. Κάποια ισοφλαβονοειδή βρίσκονται επίσης και σε μικρόβια. Γενικά φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο ως πρόδρομα μόρια για την παραγωγή φυτοαλεξινών κατά την αλληλεπίδραση μικροβίων των φυτών. Οι ισοφλαβόνες γενιστεΐνη (genistein) και η δαϊδζεΐνη (daidzein) θεωρούνται ως φυτοοιστρογόνα, λόγω της οιστρογονικής δράσης τους σε συγκεκριμένα ζωικά μοντέλα

Νεοφλαβονοειδή: Είναι επίσης πολυφαινολικές ενώσεις. Η διαφορά τους από τα φλαβονοειδή είναι ότι ενώ εκείνα έχουν σκελετό 2-φαινυλχρωμεν-4-όνης, τα νεοφλαβονοειδή έχουν σκελετό 4-φαινυλχρωμενίου χωρίς ομάδα υδροξυλίου στη θέση 2. Το πρώτο φυσικής προέλευσης νεοφλαβονοειδές που απομονώθηκε ήταν το καλοφυλλολίδιο (calophyllolide) από τα σπέρματα του *Calophyllum inophyllum*.

Φλαβανόλες ή φλαβαν-3-όλες ή κατεχίνες: Ονομάζονται επίσης διυδροφλαβονόλες και είναι 3-υδροξυ-παράγωγα των φλαβανονών. Συνήθως είναι πολύ-υποκατεστημένα μόρια. Η ομάδα υδροξυλίου συνδέεται πάντοτε στη θέση 3 του C-δακτυλίου, και για το λόγο αυτό ονομάζονται και φλαβαν-3-όλες. Σε αντίθεση με πολλά φλαβονοειδή, δεν υπάρχει διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3. Στη φύση βρίσκονται ευρέως σε μπανάνες, μήλα, βατόμουρα, ροδάκινα και αγλάδια.

Ανθοκυανίνες: Είναι χρωστικές υπεύθυνες για το χρωματισμό των άνθεων και των φρούτων των φυτών. Η κυανιδίνη (cyanidin), η δελφινιδίνη (delphinidin), η μαλβιδίνη (malvidin), η πελαργονιδίνη (pelargonidin) και η πεονιδίνη (peonidin) είναι οι πλέον μελετημένες ανθοκυανίνες. Βρίσκονται κυρίως στις εξωτερικές κυτταρικές στιβάδες διάφορων φρούτων, όπως η σταφίδα, τα κόκκινα σταφύλια, τα βατόμουρα, οι φράουλες, τα σμέουρα και άλλα. Το χρώμα τους εξαρτάται από το pH καθώς και από τη μεθυλίωση ή ακυλίωση στις υδροξυλομάδες των A- και B-δακτυλίων.

Χαλκόνες: Χαρακτηρίζονται από την απουσία του C-δακτυλίου του βασικού σκελετού των φλαβονοειδών. Για το λόγο αυτό, ονομάζονται και φλαβονοειδή ανοικτής αλύσου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα χαλκονών είναι οι φλοριδζίνη (phloridzin), η αρμπουτίνη (arbutin), η φλορετίνη (phloretin) και η χαλκοναρινγενίνη (chalconaringenin). Αυτή η

ομάδα συστατικών βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες σε τομάτες, φράουλες, και ορισμένα προϊόντα σίτου. Οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους θεωρούνται ότι έχουν πολυάριθμες θρεπτικές και βιολογικές ιδιότητες. (1)

1.1.3 Πηγές Φλαβονοειδών

Τροφές πλούσιες σε φλαβονοειδή, θεωρούνται τα φρούτα και τα λαχανικά, το τσάι, το κακάο, το κόκκινο κρασί, τα κόκκινα φασόλια, το ρόδι, τα σταφύλια και οι διάφοροι τύποι μούρων. Επίσης, πολλά κόκκινα και κίτρινα φρούτα καθώς και κάποιοι ξηροί καρποί αποτελούν εξίσου καλές πηγές αυτών των φυτικών συστατικών.

Τα μύρτιλλα, αποτελούν μία από τις σημαντικότερες πηγές ανθοκυανιδινών, ακολουθούμενα από τις μπανάνες και τις φράουλες. Οι καρποί του σαμπούκου (elderberries) και η ευρωπαϊκή μαύρη σταφίδα, είναι επίσης σημαντικές πηγές των συστατικών αυτών, με περιεκτικότητες 769 και 272 mg/100 g αντίστοιχα.

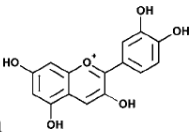
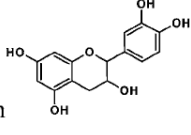
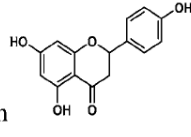
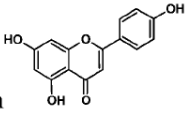
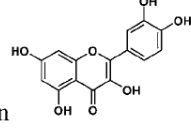
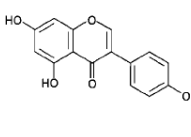
Το μαύρο τσάι αποτελεί την πλουσιότερη πηγή φλαβαν-3-ολών, ενώ το πράσινο τσάι περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες (ενδεικτικά 128 mg/100 g). Φλαβονόλες βρίσκονται όμως σε μεγάλες ποσότητες και στα σταφύλια, το κρασί, το κακάο και τη σοκολάτα.

Οι φλαβονόνες ευρίσκονται κυρίως σε πορτοκάλια και άλλα εσπεριδοειδή, όπως γκρέιπφρουτ και λεμόνια. Επίσης, μικρότερες ποσότητες φλαβονονών βρίσκονται και στις τομάτες, οι οποίες καταναλώνονται ευρέως.

Ο μαϊντανός, φρέσκος ή αποξηραμένος, περιέχει πολύ υψηλές ποσότητες φλαβονών και συνεισφέρει σημαντικά στη διατροφική πρόσληψη φλαβονοειδών, παρόλο που καταναλώνεται σε μικρές ποσότητες.

Το τσάι και τα κρεμμύδια, παρέχουν μαζί πάνω από 50% της διατροφικής πρόσληψης φλαβονολών. Φλαβονόλες υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες και σε κάποια είδη πιπεριών και στις λαχανίδες (kale). (12), (13), (14), (15)

Στην εικόνα 4, παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα κατηγοριών φλαβονοειδών μαζί με τις διατροφικές πηγές τους.

Flavonoid group	Examples	Food sources	Chemical structure
Anthocyanins	Cyanidin, Pelargonidin, Peonidin	Aubergine, blackberry, black currant, blueberry	 Cyanidin
Flavan-3-ols, Procyanidins	Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin	Chocolate, green tea, beans, cherry	 Epicatechin
Flavanones	Hesperidin, Naringenin, Eriodictyol	Orange juice, grapefruit juice, lemon juice	 Naringenin
Flavones	Apigenin, Luteolin	Parsley, celery, capsicum pepper	 Apigenin
Flavonols	Quercetin, Kaempferol, Myricetin	Onions, apples, curly kale, leek	 Quercetin
Isoflavones	Genistein, Daidzein, Glycitein	Soy flour, soybeans, soymilk	 Genistein

Εικόνα 4: Διατροφικές πηγές φλαβονοειδών (13)

1.1.4 Χημικές ιδιότητες

Τα φλαβονοειδή λόγω της δομής τους παρουσιάζουν ποικιλία χημικών ιδιοτήτων, με κάποιες χαρακτηριστικές να παρουσιάζονται στη συνέχεια:

α) Οξειδοαναγωγικές: Τα φλαβονοειδή ως φαινολικά συστατικά είναι επιρρεπή στην οξείδωση σε κινόνες. Η διαδικασία, η οποία μπορεί να συνοδεύεται και από διάνοιξη του δακτυλίου στον άνθρακα C1, που συμβαίνει στην περίπτωση των ανθοκυανιδινών,

πραγματοποιείται εύκολα με την παρουσία υπεριώδους φωτός, ειδικά αν συνυπάρχουν και ιόντα βαρέων μετάλλων.

Δεδομένου ότι τα φλαβονοειδή μπορούν να προστατεύσουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα στις μεμβράνες, καθώς και τα ασκορβικά, από την οξειδωσή τους, μπορεί να εκτιμηθεί ο φυσιολογικός οξειδοαναγωγικός τους ρόλος. Επιπλέον, η συνύπαρξη μεγάλου αριθμού φλαβονοειδών στα φυτικά κύτταρα, στο σύστημα μεταφοράς του χυμού των φυτών και στα φυτικά προϊόντα, οδηγεί σε αναμενόμενα μεγάλο αριθμό καταλυτών μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση των φυσιολογικών συστημάτων οξειδωσης. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί ίσως μία σημαντική φυσιολογική λειτουργία των φλαβονοειδών και έναν ευεργετικό παράγοντα, αποδεδειγμένο σε κάποιες περιπτώσεις, για την ανθρώπινη υγεία.

β) Ιδιότητες οξέως-βάσης: Οι τιμές των σταθερών pK μεγάλου αριθμού φαινολικών, μη φλαβονοειδικών ενώσεων, είναι γνωστές. Οι τιμές αυτές είναι ευαίσθητες στη φύση και τη θέση γειτονικών ομάδων στο μόριο, και συνήθως είναι σε εύρος pH 8–10,5. Η κατάσταση ιοντισμού των φαινολικών ομάδων των φλαβονοειδών επηρεάζει την απορρόφηση φωτός (χρώμα) και τα φάσματα φθορισμού των ουσιών αυτών, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται και οι συνθήκες ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσής τους. Αυτό οφείλεται στη φωτοτροπική ταυτομέρεια, φαινόμενο μάλλον υπεύθυνο για το χρωματισμό των άνθων και των καρπών.

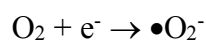
γ) Απορρόφηση και φάσματα φθορισμού φλαβονοειδών: Δεδομένου ότι τα χρώματα των άνθων αποτελούν τους κύριους παράγοντες προσέλκυσης των μελισσών και άλλων εντόμων (τα οποία έχοντας ως στόχο την αναπαραγωγή τους διασπείρουν γύρη σε φυτά) και εφόσον τα φλαβονοειδή είναι οι κυρίαρχες χρωστικές των πετάλων, οφείλουν τις φυσιολογικές τους δράσεις στις ηλεκτρονιακές τους ιδιότητες. Στην περίπτωση αυτή, η απορρόφηση του φωτός συνδέεται με τη νευρική διέγερση, ενώ στις αιμοπρωτεΐνες (που αποτελούν επίσης γνωστό παράδειγμα σύνδεσης των ηλεκτρονιακών ιδιοτήτων με τις φυσιολογικές δράσεις) η απορρόφηση σχετίζεται με τη μεταφορά υποστρωμάτων και μεταβολιτών, όπως O_2 , CO_2 , 2,3-διφωσφογλυκερικό, νιτρικό οξύ $[NO]$, CO και άλλα. Τα ηλεκτρονιακά φάσματα των φλαβονοειδών αποτελούν πλούσια πηγή για πληροφορίες της δομής τους. Ο φθορισμός χρησιμοποιείται συχνά για την ταυτοποίησή τους π.χ. σε

χρωματογραφικές πλάκες λεπτής στοιβάδας ή στον ημιποσοτικό προσδιορισμό τους σε εκχυλίσματα φυτικού υλικού, προϊόντων μελισσών ή διαιτητικών συστατικών. Ωστόσο ο φθορισμός μπορεί να εξαρτηθεί πολύ από την παρουσία υποκαταστατών στον αρωματικό πυρήνα και να εξαλειφθεί, από συνοδευτικά ιόντα για παράδειγμα. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία χρησιμοποιείται με ασφάλεια, τουλάχιστον για σκοπούς ταυτοποίησης, εάν οι αγλυκόνες έχουν διαχωριστεί από τους γλυκοσίδες με υδρόλυση και/ή απόσπαση, πριν τη χρωματογραφική διαδικασία.

δ) Οπτική ενεργότητα: Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία κατηγορία φυσικών προϊόντων που εντυπωσιάζουν περισσότερο με την ποικιλία και των αριθμό τους, παρά με την πολυπλοκότητα της δομής τους. Συνήθως υδροξυλιώνονται συνήθως στις θέσεις 3, 5, 7, 3', 4' και 5'. Κάποιες από τις υδροξυλομάδες αυτές είναι συχνά μεθυλιωμένες, ακετυλιωμένες ή σουλφονυλομένες. Όταν σχηματίζονται γλυκοσίδες, ο γλυκοσιδικός δεσμός βρίσκεται φυσιολογικά στη θέση 3 ή 7, όπως έχει προαναφερθεί. Τα χαρακτηριστικά αυτά ισχύουν για περίπου 3×10^5 φλαβονοειδή. Ο πραγματικός αριθμός φλαβονοειδών που έχουν ευρεθεί μέχρι στιγμής και των οποίων η δομή έχει αποσαφηνιστεί πλήρως είναι μεγάλος, αλλά δεν υπερβαίνει το 1% του θεωρητικού αριθμού. Ο αριθμός αυτός των φλαβονοειδών, αυξάνεται ακόμα περισσότερο με την ύπαρξη χειρόμορφων κέντρων. Δεδομένου ότι το ηλεκτρονιακό ή το φάσμα φθορισμού πολλών στερεοϊσομερών δεν διαφέρουν σημαντικά, η οπτική ενεργότητά τους αποτελεί συχνά χρήσιμη αναλυτική παράμετρο. Προσπίπτοντα γραμμικώς ή κυκλικώς πολωμένα ηλεκτρομαγνητικά κύματα αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια την εξεταζόμενης ουσίας, με αποτέλεσμα να προκαλείται αλλαγή στην οπτική περιστροφή. Αυτό το φαινόμενο εξαρτάται από το μήκος κύματος και συμβαίνει κυρίως στην περιοχή του υπεριώδους. Κατά ανάλογο τρόπο, φάσματα διασποράς οπτικής περιστροφής ή φάσματα κυκλικού διχροϊσμού είναι πολύ χρήσιμα για τη διάκριση μεταξύ των στερεοϊσομερών, την ταυτοποίηση την απόλυτης διαμόρφωσης της δομής και την αναγνώριση των χειρόμορφων κέντρων των στερεοϊσομερών.

ε) Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών: Μία εξέχουσα και ιατρικώς χρήσιμη ιδιότητα των φλαβονοειδών είναι η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες εμφανίζονται στην πορεία πολλών φυσιολογικών διαδικασιών. Έχουν υψηλή δραστηριότητα, και παράγονται κυρίως στην αναπνευστική αλυσίδα και σε αντιδράσεις οξειδωσης που καταλύονται από οξυγενάσες. Οι αντιδράσεις αυτές είναι πολύ κοινές στη

φύση, δεδομένου ότι το μοριακό οξυγόνο είναι πολύ καλός δέκτης ηλεκτρονίων. Η υψηλή του συγγένεια για τα ηλεκτρόνια, αποτελεί τη θερμοδυναμική κινητήρια δύναμη, αλλά σε αντίθεση με άλλους δέκτες ηλεκτρονίων, το O₂ αντιδρά πολύ αργά απουσία καταλύτη. Η μεταφορά 4 ηλεκτρονίων στο O₂ παράγει 2 μόρια ύδατος, αλλά η αναγωγή που πραγματοποιείται μερικώς οδηγεί στο σχηματισμό εξαιρετικά τοξικών ενώσεων, παραδείγματος χάριν του ανιόντος υπεροξειδίου •O₂⁻:



Οι ρίζες αυτές σχηματίζονται, για παράδειγμα, από τα μακροφάγα ως πρώτης γραμμής άμυνα εναντίον της εισβολής ξένων για τον οργανισμό κυττάρων ή τμήματα ιών. Πρόκειται για μία γενικώς επιθυμητή αντίδραση, αλλά η περίσσεια ανιόντων υπεροξειδίου πρέπει να απομακρύνεται ταχέως από τον οργανισμό πριν καταστρέψει μεγάλο αριθμό απαραίτητων στοιχείων του, όπως ακόρεστα λιπαρά στις μεμβράνες ή σουλφυδρυλομάδες που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων.

Εάν το υπεροξείδιο, π.χ. λόγω μετουσίωσης του ενζύμου, διαφύγει από την πρωτεΐνη της αίμης πριν την πλήρη αναγωγή του, αυτή η ελεύθερη ρίζα πυροδοτεί αλυσιδωτή αντίδραση, στην οποία μπορεί να συμμετέχουν βάσεις νουκλεϊκών οξέων καθώς και πολλά ακόμα ζωτικής σημασίας κυτταρικά στοιχεία. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε μεταλλάξεις, διαταραχές του μεταβολισμού και ενδεχομένως και καρκίνο.

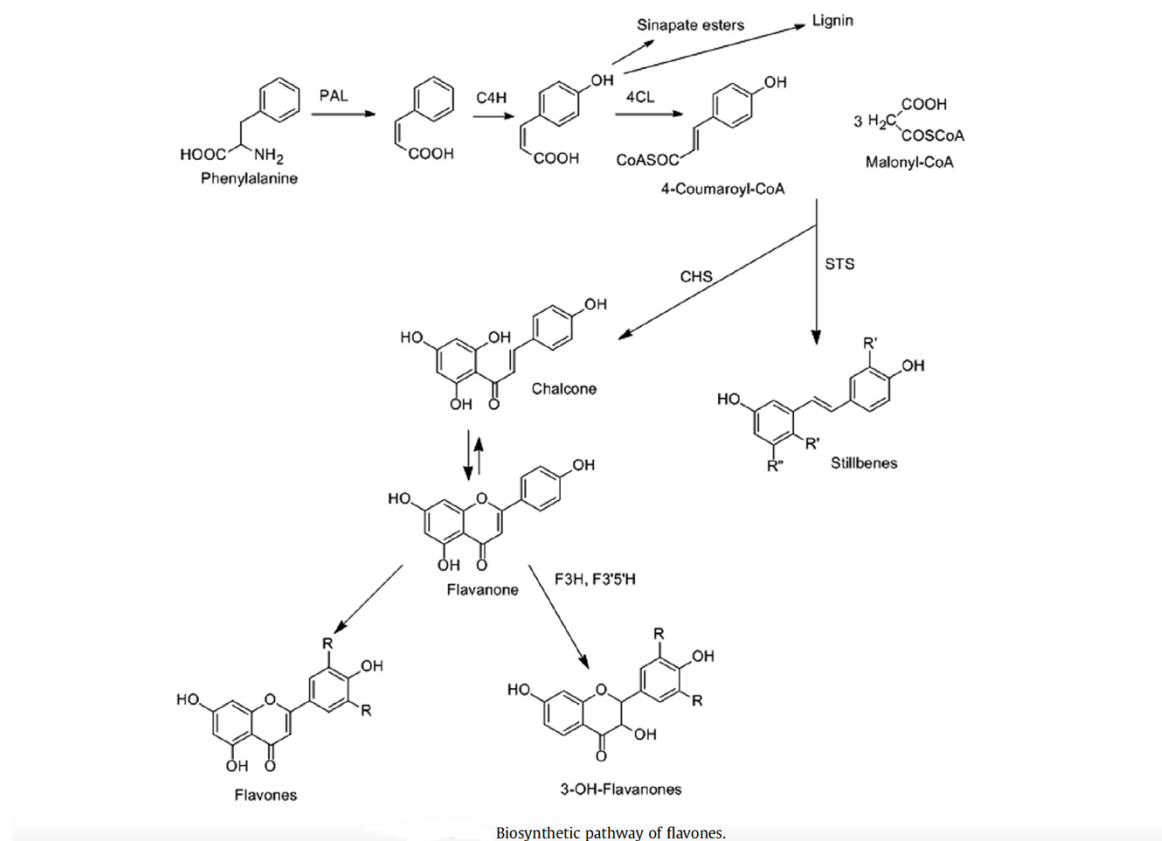
Από τη χημεία των φλαβονοειδών, είναι εμφανής η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, καθώς τα δυναμικά αναγωγής των ριζών φλαβονοειδών είναι χαμηλότερα από εκείνα των αλκυλ-υπεροξυλ-ριζών και των ριζών υπεροξειδίου. Αυτό σημαίνει ότι τα φλαβοειδή μπορούν να απενεργοποιούν τις ρίζες αυτές και να αποτρέπουν τις συνέπειες των αντιδράσεών τους. (3), (16)

1.1.5 Βιοσύνθεση

Τα φλαβονοειδή βιοσυντίθενται από τη μεταβολική οδό των φαινυλπροπανοϊδών, κατά την οποία από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη παράγεται το 4-κουμαροϋλο-συνένζυμο A (4 coumaroyl-CoA). Το προϊόν αυτό συνδυάζεται με το μαλονυλο-συνένζυμο A (malonyl-CoA) οδηγεί στο σχηματισμό του βασικού σκελετού των φλαβονοειδών, μία ομάδα ενώσεων που ονομάζονται χαλκόνες και περιέχουν 2 φαινολικούς δακτυλίους. Με το κλείσιμο των δακτυλίων σύζευξης των χαλκονών σχηματίζεται η γνωστή μορφή φλαβονοειδών: η δομή με τους τρεις δακτυλίους μιας φλαβόνης. Η μεταβολική οδός

συνεχίζεται μέσω μιας σειράς ενζυματικών τροποποιήσεων για να δώσει με τη σειρά φλαβανόνες, διυδροφλαβονόλες και ανθοκυανιδίνες. Στην πορεία αυτού του μεταβολικού μονοπατιού, μπορούν να σχηματιστούν πολλά προϊόντα, όπως φλαβονόλες, 3-φλαβονόλες, προανθοκυανιδίνες (ταννίνες) και πλήθος άλλων πολυφαινολικών ενώσεων. (4), (17), (18)

Στην εικόνα 5, φαίνεται η βιοσυνθετική οδός των φλαβονοειδών.



Εικόνα 5: Βιοσυνθετική οδός φλαβονοειδών (19)

1.1.6 Απορρόφηση, Βιοδιαθεσιμότητα, Μεταβολισμός, Απέκκριση

Απορρόφηση είναι η διαδικασία με την οποία ένα δραστικό συστατικό περνά από τη θέση χορήγησης στον οργανισμό, πρακτικά στο αίμα και τα λεμφαγγεία. Ως βιοδιαθεσιμότητα, ορίζεται η φαρμοκινητική παράμετρος που εκφράζει το ρυθμό και την έκταση στην οποία απορροφάται ένα δραστικό συστατικό και καθορίζει το ποσό του δραστικού αυτού συστατικού που υπάρχει διαθέσιμο στη συστηματική κυκλοφορία, ώστε τελικά να φτάσει στο επιθυμητό σημείο δράσης (όργανο-στόχος). Ο ρυθμός απορρόφησης ενός βιολογικώς

ενεργού και η διαθεσιμότητά του στη θέση δράσης είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την αποτελεσματικότητά του εντός βιολογικών συστημάτων. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό να μπορεί να καθοριστεί όχι μόνο το ποσό ενός θεραπευτικού συστατικού ή ένωσης σε ένα φάρμακο, τρόφιμο ή συμπλήρωμα διατροφής, αλλά και η βιοδιαθεσιμότητά του. Η βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών, μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη διατροφική πηγή τους. Για παράδειγμα η απορρόφηση της κερκετίνης που προέρχεται από κρεμμύδια, είναι 4 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που προέρχεται από τα μήλα ή το τσάι. (2), (20), (21)

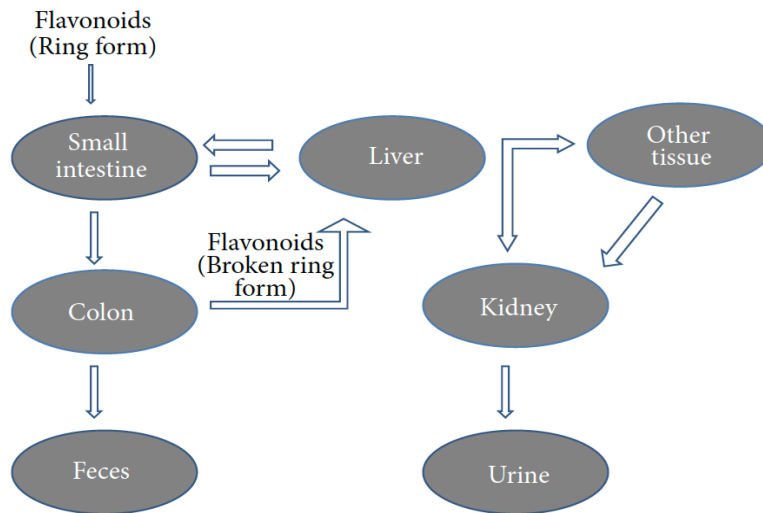
Η απορρόφηση των φλαβονοειδών που προέρχονται από τη διατροφή, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως το μοριακό τους βάρος, τη χημική δομή, τη λιποφιλικότητα, τη διαλυτότητα και την τιμή σταθεράς διάστασης οξέος (pKa). Μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο ή να περάσουν στο παχύ έντερο (κόλον), από όπου απορροφώνται σε μικρότερο βαθμό. Ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα αποτελεί η σύνδεσή τους με κάποιο σάκχαρο, αν δηλαδή πρόκειται για γλυκοζίτες ή αγλυκόνες. Τα περισσότερα φλαβονοειδή, με εξαίρεση τις κατεχίνες, βρίσκονται στα φυτά με τη μορφή β-γλυκοζιτών. Οι αγλυκόνες μπορούν να απορροφηθούν εύκολα από το λεπτό έντερο, ενώ οι γλυκοζίτες πρέπει να μετατραπούν στην αγλυκονική τους μορφή, να καταβολιστούν δηλαδή σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούν εύκολα να απορροφηθούν. Οι υδρόφιλοι γλυκοζίτες, όπως η κερκετίνη, μεταφέρονται εντός του λεπτού εντέρου, μέσω νατριοεξαρτώμενων συμμεταφορέων γλυκόζης (Sodium-glucose transport proteins ή SGLT1). Στη συνέχεια, υδρολύονται από ενδοκυτταρικές β-γλυκοζιδάσες.

Σύμφωνα με ένα εναλλακτικό μηχανισμό, οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών υδρολύονται από την υδρολάση λακτάσης – φλοριζίνης (LPH) μία β-γλυκοζιδάση που βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του λεπτού εντέρου. Η LPH είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος για μια σειρά φλαβονοειδών-O-β-D-γλυκοζιτών. Συνεπώς, οι αγλυκόνες μπορεί να εισέλθουν στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιποφιλίας τους. Η εξειδίκευση του υποστρώματος αυτού του ενζύμου, ποικίλει ανάλογα με το είδος του σακχάρου με το οποίο είναι συνδεδεμένο ένα φλαβονοειδές. Τα ολιγομερή φλαβονοειδών μπορούν να υδρολυθούν σε μονομερή και διμερή υπό την επίδραση των όξινων συνθηκών του στομάχου, ενώ μεγαλύτερα μόρια φτάνουν στο παχύ έντερο.

Τα φλαβονοειδή που εκκρίνονται με τη χολή στο έντερο και αυτά που δεν μπορούν να απορροφηθούν από το λεπτό έντερο γιατί οι γλυκοζίτες τους δεν αποτελούν υποστρώματα αυτών των ενζύμων, μεταφέρονται στο παχύ έντερο, όπου τα βακτήρια μπορούν να τους υδρολύσουν και ταυτόχρονα να καταβολίσουν τις αγλυκόνες που απελευθερώνονται σε μικρότερα μόρια, όπως φαινολικά κι αρωματικά οξέα, τα οποία μπορεί να γίνουν βιοδιαθέσιμα. (2), (22), (23), (24)

Μετά την απορρόφηση, τα φλαβονοειδή εντός του εντερικού επιθηλίου, υποβάλλονται σε αντιδράσεις μεταβολισμού φάσης I, με τους μεταβολίτες που προκύπτουν να μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Στο ήπαρ, μεταβολίζονται περαιτέρω με αντιδράσεις φάσης I και φάσης II που οδηγούν σε περισσότερο πολικές ενώσεις και οι οποίες λειτουργούν ως μεσολαβητές βιολογικών επιδράσεων στους ιστούς-στόχους. Κατά τις αντιδράσεις φάσης I μπορεί να υποστούν οξειδωση ή Ο-απομεθυλίωση από μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450. Κατά το μεταβολισμό φάσης II, υφίστανται μεθυλίωση, σουλφονίωση, σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ ή μεταβολισμό προς φαινολικά συστατικά μικρότερου μοριακού βάρους. Ως ένα από τα κύρια μεταβολικά ένζυμα της φάσης II, η κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (COMT) καταλύει τα φλαβονοειδή σε τμήμα κατεχόλης στο δακτύλιο Β. Τα φλαβονοειδή με ελεύθερες υδροξυλομάδες υφίστανται ευκολότερα αντιδράσεις σύζευξης. Λόγω των αντιδράσεων αυτών σύζευξης, αγλυκόνες φλαβονοειδών δεν εντοπίζονται στο πλάσμα ή τα ούρα, με εξαίρεση τις κατεχίνες.

Η αποβολή των φλαβονοειδών από το σώμα πραγματοποιείται μέσω των νεφρών, από το εντερικό επιθήλιο και μέσω της απέκκρισης της χολής. Τα φλαβονοειδή που εκκρίνονται μέσω της χοληφόρου οδού στο δωδεκαδάκτυλο, υποβάλλονται στη δράση των μικροβιακών ενζύμων και μπορεί να επαναπορροφηθούν και να υποβληθούν σε εντεροηπατική ανακύκλωση. (2), (9), (21), (25)



Compartments involved in the metabolism of flavonoid.

Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας των φλαβονοειδών στον οργανισμό (2)

1.1.7 Φαρμακολογικές Ιδιότητες Φλαβονοειδών

Πέρα από το ρόλο τους ως δομικά και σηματοδοτικά μόρια για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών, πολλά φλαβονοειδή (όπως και πολλές άλλες φαινολικές ενώσεις) έχουν πιθανές κυτταροταροξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επιπλέον, ορισμένα φλαβονοειδή μπορούν να επιδράσουν και στην ανθρώπινη υγεία. Έχει ευρεθεί ότι έχουν ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως αντιαλλεργικές, αντιβακτηριακές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικές, αντιμεταλλαξιογόνες, αντικαρκινικές, κυτταροτοξικές, αντιθρομβωτικές, αντιαθηροσκληρωτικές, ηπατοπροστατευτικές, οιστρογονικές, αντιοξειδωτικές, αντιγηραντικές, καρδιοπροστατευτικές και εντομοκτόνες.

Επιπροσθέτως, κάποια φλαβονοειδή παράγονται ως αντιμικροβιακοί φραγμοί στα φυτά, ως απάντηση στη μικροβιακή μόλυνση. Για το λόγο αυτό, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι *in vitro* έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματικά εναντίον μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών. (18), (26), (27), (28)

Παρόλο που ο τρόπος δράσης τους δεν έχει αποσαφηνιστεί τελείως, έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί που εξηγούν την *in vivo* αντιφλεγμονώδη δράση των φλαβονοειδών. Ο πιο σημαντικός μηχανισμός, είναι η αναστολή των ενζύμων που παράγουν

εικοσανοειδή, όπως η φωσφολιπιδάση A2, οι κυκλοξυγενάσες και οι λιποξυγενάσες, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι συγκεντρώσεις των προστανοειδών και των λευκοτριενίων, που δρουν ως μεσολαβητές φλεγμονής. Άλλοι μηχανισμοί που έχουν προταθεί, περιλαμβάνουν την αναστολή της απελευθέρωσης ισταμίνης, φωσφοδιεστεράσης, πρωτεϊνικών κινασών και ενεργοποίησης της μεταγραφάσης. (28)

Η βιολογική δράση των φλαβονοειδών που έχει μελετηθεί και περιγραφεί καλύτερα είναι η ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Η ιδιότητά τους αυτή εξαρτάται από τη διάταξη των λειτουργικών ομάδων. Η διαμόρφωση, η υποκατάσταση και ο συνολικός αριθμός ομάδων υδροξυλίου, επηρεάζουν αρκετούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς όπως είναι η δέσμευση ελευθέρων ριζών και η ικανότητα σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα. Πιο συγκεκριμένα, η διαμόρφωση του B-δακτυλίου είναι καθοριστικής σημασίας για τη δέσμευση ριζών οξυγόνου (ROS ή Reactive oxygen species) και αζώτου (RNS ή Reactive nitrogen species), καθώς μπορεί να δώσει υδρογόνο και ένα ηλεκτρόνιο σε ρίζα υδροξυλίου, υπεροξυλίου και υπεροξυνιτρόδους, και να τις σταθεροποιήσει, δίνοντας μία σχετικά σταθερή ρίζα φλαβονοειδούς. Κάποιοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των φλαβονοειδών που έχουν προταθεί, περιλαμβάνουν: α) καταστολή του σχηματισμού ROS είτε με αναστολή ενζύμων είτε με σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με ιχνοστοιχεία που εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, β) δέσμευση των ROS, γ) ρύθμιση προς τα πάνω (upregulation) ή προστασία των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή μπορούν να αναστείλουν και ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή ROS, όπως η μικροσωμική μονοοξυγενάση, η S-τρανσφεράση γλουταθειόνης, η μιτοχονδριακή σουκκινοξειδάση, η NADH οξειδάση και άλλα. Τα φλαβονοειδή, έχει ευρεθεί ότι συμβάλλουν και στην προστασία των λιπιδίων του οργανισμού ενάντια στην υπεροξειδωσή τους, που αποτελεί συνέπεια του οξειδωτικού στρες.

Κάποια φλαβονοειδή με γνωστή αντιοξειδωτική δράση, είναι η κερκετίνη (η οποία σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου και τα σταθεροποιεί), η επικατεχίνη και η ρουτίνη (οι οποίες δεσμεύουν ισχυρά ελεύθερες ρίζες και αναστέλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων in vitro). (2)

Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φλαβονοειδών, έχει ευρεθεί ότι κάποια μπορούν να δράσουν, in vitro, εναντίον στελεχών των *Pseudomonas aeruginosa* και

Acinetobacter baumannii, με αποτελεσματικότητα παρόμοια με αυτή των κινολονών (οξφλοξασίνη και σιπροφλοξασίνη). Επίσης έδειξαν παρόμοια αποτελεσματικότητα με αυτή της λεβοφλοξασίνης, εναντίον στελεχών *Staphylococcus aureus* και *Enterococcus faecalis*.

Παράλληλα, τα φλαβονοειδή έχουν δράση εναντίον και των μυκήτων. Τα είδη *Candida* είναι σήμερα οι πιο διαδεδομένοι και απειλητικοί παθογόνοι μύκητες, και ευθύνονται για την πλειοψηφία των μυκητιασικών λοιμώξεων. Μεταξύ αυτών, το είδος *Candida krusei* είναι ένα παθογόνο που εμπλέκεται συνήθως σε λοιμώξεις της ουροποιητικής οδού σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, και είναι πιο ανθεκτικό στους συνήθως χρησιμοποιούμενους παράγοντες τριαζόλης, όπως η φλουκοναζόλη. Εναντίον αυτού του είδους *Candida* κάποια φλαβονοειδή έχουν επιδείξει ισχυρότερη δράση συγκριτικά με τη φλουκοναζόλη. (26)

Από μελέτες για την επίδραση των φλαβονοειδών που προσλαμβάνονται από τη διατροφή, σε καρδιαγγειακές νόσους, έχουν προκύψει αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί ωφέλιμης δράσης. Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή ενδέχεται να συμβάλλουν στην αναστολή της πήξης, το σχηματισμό θρόμβων καθώς και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Αυτό πραγματοποιείται πιθανώς μέσω αναστρέψιμου ανταγωνισμού στον υποδοχέα θρομβοξάνης A2 ή μέσω άλλων πιο πολύπλοκων μηχανισμών.

Μία ακόμη ευεργετική δράση των φλαβονοειδών, είναι η ικανότητά τους να ρυθμίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης και να βελτιώνουν το βαθμό της αθηροσκλήρωσης. Αρχικά, μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και επομένως να μειώσουν την ανοχή στη γλυκόζη, με την αύξηση της χρήσης λιπαρών οξέων. Κατά αυτόν τον τρόπο, απλοποιούν τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης στους περιφερειακούς ιστούς. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή αλληλοεπιδρούν με τους μεταφορείς γλυκόζης GLUT1, GLUT2, GLUT4 και τους νατριο-εξαρτώμενους μεταφορείς γλυκόζης τύπου 1 (SGLT-1) και αναστέλλουν τη μεταφορά της σε διάφορα κύτταρα *in vitro*. Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή μπορούν να ασκήσουν αντιδιαβητική δράση μέσω διέγερσης της της λιπόλυσης που επάγεται από την ινσουλίνη και μέσω μείωσης της ενσωμάτωση γλυκόζης σε λιπίδια, που διεγείρεται από την ινσουλίνη. (29)

1.2 ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ – ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ

1.2.1 Λιποφιλία

Ο όρος λιποφιλία (ή λιποφιλικότητα) αναφέρεται στη συγγένεια μίας χημικής ένωσης ή τμήματός της προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον, όπως λίπη, έλαια, λιπίδια και μη πολικοί διαλύτες (π.χ. εξάνιο ή τολουόλιο). Είναι, δηλαδή, η ιδιότητα που καθορίζει την κατανομή της κάθε ουσίας ανάμεσα σε μια υδατική και μία οργανική φάση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως παρόλο που περιγράφουν την ίδια τάση συμμετοχής στη δύναμη διασποράς London, η λιποφιλία δεν ταυτίζεται με την υδροφοβία, η οποία οφείλεται στην τάση των μορίων του νερού να αποφεύγουν τα μη πολικά μόρια. Η λιποφιλία είναι μία σύνθετη ιδιότητα, που αποτελείται από δύο συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα των ενώσεων, οι οποίες συνδέονται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

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

Η λιποφιλία τυπικά εκτιμάται ως η κατανομή μίας ένωσης μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, μίας υδατικής και ενός οργανικού διαλύτη, που συνήθως είναι η 1-οκτανόλη. Αυτός ο τρόπος μέτρησης της λιποφιλίας, αποτελεί ένα απλοποιημένο μοντέλο της κατανομής μίας ουσίας σε ένα βιολογικό σύστημα, το οποίο αποτελείται και από υδρόφιλα και από λιπόφιλα συστατικά. Συνήθως, εκφράζεται ως ο συντελεστής μερισμού (partition coefficient ή logP) ή συντελεστής κατανομής (distribution coefficient ή logD) και υπολογίζεται ως:

$$\log P = \log \frac{[\text{Drug}]_{\text{oct}}}{[\text{Drug}]_{\text{aq}}}, \quad (1.1)$$

όπου $[\text{Drug}]_{\text{oct}}$ η συγκέντρωση της αδιάστατης μονομερούς μορφής ενός φαρμάκου (ή άλλης ουσίας) στη φάση της οκτανόλης, δηλαδή στην οργανική, ενώ $[\text{Drug}]_{\text{aq}}$ η αντίστοιχη συγκέντρωση του φαρμάκου (ή ουσίας) στην υδατική φάση. Ο συντελεστής μερισμού logP αφορά την κατανομή μη ιονισμένων ή ουδέτερων ενώσεων μεταξύ δύο φάσεων, ενώ ο συντελεστής κατανομής logD αναφέρεται στην κατανομή και μη ιονισμένων και ιονισμένων ενώσεων μεταξύ δύο φάσεων σε συγκεκριμένη τιμή pH. Για ενώσεις που ιονίζονται, ο συντελεστής logD εξαρτάται από το pH και υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{-(pK_a - pH)}) \quad (1.2)$$

Η σχέση αυτή προϋποθέτει ότι μόνο η ουδέτερη μορφή της ένωσης κατανέμεται στην n-οκτανόλη. Ωστόσο από πειραματικές διαδικασίες έχει επιβεβαιωθεί ότι και ιονισμένα μόρια συνεισφέρουν στην «πραγματική» τιμή του logD ως ιοντικά ζεύγη (ion-pairs), τα οποία μπορούν να κατανεμηθούν στην n-οκτανόλη, και ιδιαίτερα στην περίπτωση ιονισμού υψηλού βαθμού. Επιπλέον, εφόσον η n-οκτανόλη διαλύει αρκετά μεγάλη ποσότητα ύδατος τα ιόντα μπορεί να κατανεμηθούν σε αυτό, συνοδευόμενα από ένα ιόν αντίθετου φορτίου, ώστε να διατηρείται το ουδέτερο φορτίο.

Η τιμή logD_{7.4} μίας ένωσης (ή ενός φαρμάκου) αναπαριστά το συντελεστή κατανομής της ένωσης (ή του φαρμάκου) σε pH 7,4 και θεωρείται ιδιότητα εξαιρετικής σημασίας, λόγω της φυσιολογικής της συσχέτισης και της ομοιότητάς της με την κατανομή σε πραγματικά βιολογικά συστήματα. (30), (31), (32)

Ο πλέον συνήθης οργανικός διαλύτης για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας είναι η 1-οκτανόλη, που αποτελείται από μία πολική κεφαλή η οποία συνδέεται με μία υδρόφοβη αλυσίδα, με αποτέλεσμα να προσομοιάζεται η δομή των φωσφολιπιδίων των βιολογικών μεμβρανών. Το σύστημα οκτανόλης-ύδατος επιτρέπει τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου και προσομοιάζει την πρωτεϊνική σύνδεση καθώς και τις βιολογικές μεμβράνες. Παρόλα αυτά, για κάποια είδη μεμβρανών και βιολογικών φραγμών, υπάρχουν άλλα συστήματα διαλυτών που θεωρούνται καταλληλότερα. Για παράδειγμα, μεμβράνες που δεν περιέχουν δότες και δέκτες πρωτονίων προσομοιάζονται καλύτερα από το σύστημα κυκλοεξανίου-ύδατος. (31)

Λόγω της δομής τους, πολλά φάρμακα διαθέτουν ένα ή/και περισσότερα κέντρα ιονισμού, με αποτέλεσμα να εντοπίζονται στα διάφορα βιολογικά υγρά όχι μόνο με την αδιάστατη αλλά και με την ιονισμένη τους μορφή. Ο βαθμός ιονισμού τους εξαρτάται από το pH και από την σταθερά ιονισμού pK_a του εκάστοτε μορίου. Σε αυτές τις περιπτώσεις για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας δεν χρησιμοποιείται ο συντελεστής μερισμού αλλά ο συντελεστής κατανομής (D). Ο συντελεστής αυτός αναφέρεται στον λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων των ιονισμένων μορφών και της αδιάστατης μορφής στην οργανική και υδατική φάση.

$$D = \Sigma c_{org} / \Sigma c_{\text{δατ}} \quad (1.3)$$

Έτσι, ο συντελεστής κατανομής (logD) αναφέρεται στη λιποφιλία του μίγματος όλων των υφιστάμενων ιοντικών μορφών της ένωσης σε συγκεκριμένο pH. Ο συντελεστής κατανομής logD είναι πάντοτε μικρότερος από τον συντελεστή μερισμού logP.

Θεωρώντας ότι πρακτικά στην οκτανόλη κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή, ισχύει η σχέση:

$$\log P = \log D + Q \quad (1.4)$$

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

$$\text{Για μονοπρωτικά οξέα : } Q = \log (1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}) \quad (1.5)$$

$$\text{Για μονοπρωτικές βάσεις : } Q = \log (1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}) \quad (1.6)$$

Για διπρωτικές βάσεις και οξέα και αμφολύτες οι διορθώσεις Q γίνονται περισσότερο πολύπλοκες. (33)

Τεχνικές προσδιορισμού του συντελεστή μερισμού

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά τον πειραματικό προσδιορισμό ενός συντελεστή κατανομής, αλλά η πλέον ευθεία και αποδεκτή είναι αυτή της ανακινούμενης φιάλης, η οποία στηρίζεται στην άμεση κατανομή των ουσιών ανάμεσα στην n-οκτανόλη και το νερό. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, ένα υδατικό διάλυμα ενός συστατικού αναμιγνύεται σε μία φιάλη με οργανικό διαλύτη (συνήθως κορεσμένη n-οκτανόλη. Στη συνέχεια, η φιάλη ανακινείται ώστε να επέλθει ισορροπία ανάμεσα στις δύο φάσεις, οι φάσεις αυτές διαχωρίζονται, και στο τέλος η συγκέντρωση του αναλύτη μετρείται και στις δύο φάσεις. Λόγω της απλότητας και της ξεκάθαρης σχέσης της με το φαινόμενο της κατανομής, η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς έναντι άλλων, οι οποίες απαιτείται να επικυρωθούν. (32)

Η κλασική αυτή μέθοδος άμεσου προσδιορισμού του συντελεστή μερισμού ή κατανομής είναι χρονοβόρα, επίπονη, και μη κατάλληλη για ασταθείς ενώσεις που διασπώνται. Επίσης, παρουσιάζει περιορισμούς όσον αφορά τις μετρήσιμες τιμές logP ή logD, οι οποίες περιορίζονται σε εύρος -2.5 – 4. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι γενικώς χαμηλή και εξαρτάται από τις προσδιοριζόμενες τιμές, ιδιαίτερα στις ακραίες. Η ευαισθησία στις προσμίξεις, η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, ο

περιορισμός στο εύρος λιποφιλίας της εξεταζόμενης ένωσης, η ακρίβεια του όγκου των φάσεων, η σταθερότητα και η πτητικότητα της διαλυμένης ουσίας, οι προσμίξεις της, ο σχηματισμός μικρογαλακτωμάτων (που εμποδίζει το διαχωρισμό των φάσεων) και η λήψη των αποτελεσμάτων σε ξεχωριστό στάδιο αποτελούν κάποια επιπλέον μειονεκτήματα της μεθόδου.

Μία άλλη διαδεδομένη τεχνική προσδιορισμού της κατανομής μίας ένωσης είναι η ποτενσιομετρική μέθοδος, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση των σταθερών ιοντισμού και των τιμών $\log P$ ενώσεων που ιοντίζονται. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν μία ιοντιζόμενη ένωση σε υδατικό διάλυμα τιτλοδοτείται παρουσία οργανικής φάσης, η καμπύλη τιτλοδότησης παρουσιάζει μετατόπιση προς τα δεξιά για τα οξέα και προς τα αριστερά για τις βάσεις. Η μετατόπιση αυτή σχετίζεται με την τιμή pK_a και τη λιποφιλία και της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής της ένωσης, καθώς και με την αναλογία όγκου των δύο φάσεων.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η δυνατότητα χρήσης ποικιλίας διαλυτών και το μεγάλο εύρος των τιμών $\log P$ που μπορούν να υπολογιστούν. Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν είναι πάντα εύκολη διαδικασία. Επιπλέον, η μέθοδος ποτενσιομετρικής τιτλοδότησης είναι μεν κατάλληλη για ενώσεις που ιοντίζονται, αλλά απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, ο οποίος δεν είναι πάντοτε διαθέσιμος σε ένα αναλυτικό εργαστήριο. (33), (34), (35)

Η φυγόκεντρη χρωματογραφία κατανομής (centrifugal partition chromatography ή CPC) αποτελεί μία επιπλέον μέθοδο υπολογισμού της λιποφιλίας, και έχει επιδείξει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών. Πρόκειται για μία μοναδική μορφή χρωματογραφίας κατανομής υγρού – υγρού που δεν περιέχει στερεή υποστήριξη, κατά την οποία δύο μη αναμίξιμοι διαλύτες χρησιμοποιούνται ως κινητές και στατικές φάσεις. Έτσι, αποφεύγεται το πρόβλημα της απορρόφησης και οι φυγόκεντρες δυνάμεις διατηρούν τη στατική φάση καθώς η κινητή φάση αντλείται από το σύστημα. Η μέθοδος αυτή παρέχει άμεσα συντελεστές κατανομής και όχι παράγοντες χωρητικότητας, σε ποικιλία συστημάτων διαλυτών, με σημαντικά μεγαλύτερη ακρίβεια και εξοικονόμηση χρόνου, συγκριτικά με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης. (36)(37)

Ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού μπορεί έμμεσα να πραγματοποιηθεί με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών, και συγκεκριμένα με Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Αντίστροφης Φάσης (RP-TLC) και Υγρο-χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης (RP-HPLC), με τη χρήση καμπυλών αναφοράς. Κατά τις τεχνικές

αυτές και υπό κατάλληλες συνθήκες, οι συντελεστές κατακράτησης προσομοιώνουν τους συντελεστές κατανομής στο σύστημα οκτανόλης/ύδατος και πλεονεκτούν έναντι άλλων (π.χ. μέθοδος ανακινούμενης φιάλης). Στα πλεονεκτήματα αυτά συμπεριλαμβάνονται η ταχεία εκτέλεση των πειραμάτων με μείωση του πειραματικού χρόνου, η μεγαλύτερη ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η ανάλυση δειγμάτων με μεγαλύτερου εύρος λιποφιλίας (ιδιαίτερα στις περιοχές υψηλών τιμών λιποφιλίας), η εμφάνιση των αποτελεσμάτων σε ένα στάδιο, η χρήση μικρών ποσοτήτων δείγματος, η μηδενική ευαισθησία σε προσμίξεις, η μικρή κατανάλωση οργανικών διαλυτών, καθώς και η ικανότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου. Οι συντελεστές κατακράτησης, είτε οι ισοκρατικοί ($\log k$) είτε αυτοί που έχουν προκύψει από αναγωγή σε 100% υδατική φάση ($\log k_w$), συνδέονται με το συντελεστή $\log P$ σύμφωνα με τη σχέση:

$$\log P = a \cdot \log k \text{ (ή } \log k_w) + b \text{ (1.7)}$$

(33), (38)

Ο προσδιορισμός με υγρο-χρωματογραφία αποτελεί, παρόλα αυτά, έμμεση τεχνική όπως προαναφέρθηκε. Τα αποτελέσματα πρέπει να συγκρίνονται με την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης/ύδατος. Για πολλές δεκαετίες η έρευνα έχει εστιάσει στην καθιέρωση των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών για την προσομοίωση του συντελεστή μερισμού/κατανομής. (40)

1.2.2 Εντερική διαπερατότητα

Όλα σχεδόν τα φάρμακα, όταν χορηγούνται από το στόμα, απορροφώνται κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου με παθητική διάχυση. Προκειμένου να απορροφηθεί ένα φάρμακο ή μία ουσία, πρέπει να περάσει μέσα από μία σειρά φραγμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν από την πλευρά του βλεννογόνου, τη στιβάδα πηκτώματος βλέννας (mucus gel layer), τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria) και το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων. Μεταξύ αυτών, η μονή στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί τον πιο σημαντικό φραγμό για την απορρόφηση. Ως εκ τούτου, η *in vivo* παθητική απορρόφηση φαρμάκων θα ήταν λογικό να μελετάται με τη χρήση μονοστιβάδων εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Η κυτταρική σειρά Caco-2, προέρχεται από καρκινικά, επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπινου κόλου. Διαφέρει από άλλες κυτταρικές σειρές παρόμοιας προέλευσης, λόγω του ότι διαφοροποιείται αυτόματα σε μονοστιβάδες πολωμένων εντερικών κυττάρων κάτω από συμβατικές συνθήκες

κυτταροκαλλιέργειας. Η μονοστιβάδα κυττάρων Caco-2, λοιπόν, προσομοιάζει το ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο και εμφανίζει λειτουργικές ιδιότητες του ανθρώπινου εντέρου. Για το λόγο αυτό είναι το μοντέλο που χρησιμοποιείται συχνότερα για την πρόβλεψη της εντερικής απορρόφησης φαρμάκων και άλλων ενώσεων.

Τα κύρια πλεονεκτήματα των κυττάρων Caco-2, είναι η ευκολία στην καλλιέργειά τους και η καλή πειραματική τους αναπαραγωγικότητα. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν πρωτεΐνες μεταφοράς, πρωτεΐνες εκροής, και ένζυμα συζεύξεως φάσης II για το σχηματισμό ποικιλίας διακυτταρικών οδών και για τη μεταβολική τροποποίηση των υπό μελέτη ενώσεων. Ωστόσο, μία από τις λειτουργικές διαφορές με τα φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπινου εντέρου είναι η έλλειψη έκφρασης του ισοενζύμου CYP3A4, του κυτοχρώματος P450, το οποίο είναι συνήθως σε υψηλά επίπεδα στο έντερο. Κατά συνέπεια, η πρόβλεψη της διαπερατότητας μίας ένωσης που αποτελεί υπόστρωμα για το CYP3A4, μπορεί να υπερεκτιμηθεί. Ένα άλλο μειονέκτημα που παρουσιάζουν σε σχέση με αντίστοιχες κυτταρικές σειρές είναι ότι η καλλιέργειά τους απαιτεί 14–21 ημέρες. (41), (42), (43), (44)

Απομονωμένα από αδenoκαρκίνωμα ανθρώπινου παχέος εντέρου, κύτταρα Caco-2 υποβάλλονται σε αυθόρμητη εντεροκυτταρική διαφοροποίηση στην καλλιέργεια, ώστε να προσομοιάζουν τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας που προσδιορίζονται για ενώσεις αναφοράς σε μονοστιβάδες κυττάρων Caco-2 έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν καλή συσχέτιση με την απορρόφηση *in vivo*. Έτσι, η Caco-2 κυτταρική μονοστιβάδα έχει γίνει ένα πρότυπο *in vitro* μοντέλο για την αξιολόγηση της εντερικής διαπερατότητας και της μεταφοράς υποψήφιων φαρμάκων. (44), (45)

Για τον υπολογισμό του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας, οι προς εξέταση ενώσεις προστίθενται στις κορυφαίες ή στις πλαγιοβασικές πλευρές της μονοστιβάδας. Ακολουθεί επώαση για διάφορα χρονικά διαστήματα και τελικά τα δείγματα του ρυθμιστικού διαλύματος από αντίθετους θαλάμους αφαιρούνται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ενώσεων και τον υπολογισμό του ρυθμού διαπερατότητας κάθε ένωσης, που αποκαλείται φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας (Papp) και υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$P_{app} = V_T \times (dC) / (dt) \times 1 / AC_0 \quad (1.8)$$

Όπου:

V_T , είναι ο όγκος του διαμερίσματος παραλήπτη

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

A, η επιφάνεια της μεμβρανικής περιοχής και

C_0 , η αρχική συγκέντρωση στο θάλαμο δότη (44), (46), (47)

Ο συντελεστής Papp δεν είναι σταθερός, αλλά ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες της δοκιμασίας, καθώς και τα χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών Caco-2 από παρτίδα σε παρτίδα. Για να μπορέσει να γίνει σύγκριση των τιμών Papp για προσδιορισμούς ενώσεων σε διαφορετικές ημέρες ή και σε διαφορετικά εργαστήρια απαιτείται να μετρούνται μερικές ενώσεις αναφοράς σε κάθε δοκιμασία.

Επιπλέον, η μεταφορά μιας ουσίας ή ενός φαρμάκου *in vivo*, έχει υψηλή συσχέτιση με τις τιμές Papp που υπολογίζονται πειραματικά, με τη χρήση κυτταρικών σειρών Caco-2. Αυτό συμβαίνει για ορισμένες ουσίες (όπως η υδροχλωρική ρανιτιδίνη, η μετοπρολόλη, η πιροξικάμη, η μινοξιδίλη, η ναπροξένη κ.α.), οι οποίες είναι γνωστό ότι απορροφώνται με παθητική διάχυση τόσο από το εντερικό επιθήλιο όσο και από τα κύτταρα Caco-2. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, η διαπερατότητα στα Caco-2 θεωρείται ότι συσχετίζεται περισσότερο με την παθητική διάχυση και όχι τόσο με την ενεργητική μεταφορά, και έχει βρεθεί ότι είναι πολύ χαμηλότερη για τις υδρόφιλες ουσίες που απορροφώνται με παθητική διάχυση. Για παράδειγμα, η Caco-2 διαπερατότητα για τα φάρμακα τερβουταλίνη και ατενολόλη, είναι 79 και 27 φορές, αντίστοιχα, μικρότερη σε σχέση με τη διαπερατότητα από τη νήστιδα του λεπτού εντέρου. Επιπλέον, για φάρμακα όπως η L-dopa, η L-λευκίνη και η D-γλυκόζη, των οποίων η απορρόφηση μεσολαμβάνεται από μεταφορείς, οι ρυθμοί απορρόφησης βρέθηκαν επίσης πολύ χαμηλότεροι στα Caco-2 κύτταρα, σε σχέση με την ανθρώπινη νήστιδα. Από τα δεδομένα αυτά, προκύπτει ότι τα κύτταρα Caco-2 είναι χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη της παθητικής εντερικής μεταφοράς ουσιών, αλλά δεν αποτελούν τόσο καλό μοντέλο για τη μεταφορά υδρόφιλων και μορίων που υφίστανται ενεργητική μεταφορά, όπως οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών. Αυτό αποδίδεται στην έλλειψη μεταφορέων και έκφρασης ενζύμων στις κυτταρικές σειρές Caco-2, σε αντίθεση με το ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο. (48), (49), (50)

1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

1.3.1 Εισαγωγή

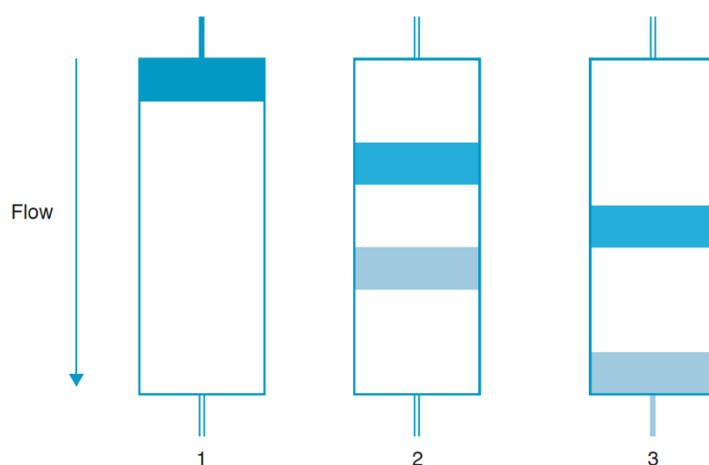
Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903), στην προσπάθειά του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Αυτός εκχέισε τα πράσινα μέρη των φύλλων σε πετρελαϊκό αιθέρα και διαβίβασε το εκχύλισμα μέσα από στήλη από κονιοποιημένο CaCO_3 , οπότε τα συστατικά, δηλαδή οι χλωροφύλλες, διαχωρίστηκαν σε έγχρωμες ζώνες. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, η τεχνική ονομάστηκε «χρωματογραφία».

Η χρωματογραφική ανάλυση, περιλαμβάνει σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού των συστατικών ενός μίγματος ανόργανων ή οργανικών ουσιών. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές, που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μίγματος, όπως η πολικότητα, το σημείο ζέσεως, το μέγεθος των μορίων, τα ηλεκτρικά φορτία κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης. Έτσι, η κινητή φάση, διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτή των συστατικών του μίγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και συνήθως εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού, εκτός από το διαχωρισμό και παράλληλα με αυτόν, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών.

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι ταξινομούνται ανάλογα με τη φύση των φάσεων που χρησιμοποιούνται σε αεριοχρωματογραφία και υγροχρωματογραφία. Ανάλογα με το είδος του φαινομένου που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, κατατάσσονται σε χρωματογραφία με μηχανισμό προσρόφησης (adsorption chromatography), χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography), χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένων φάσεων, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography) ή χρωματογραφία διήθησης πηκτής (gel filtration chromatography), χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion-exchange chromatography), χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (ion-pair chromatography) και χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography). Τέλος, ανάλογα με την τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης οι χρωματογραφικές τεχνικές ταξινομούνται σε χρωματογραφία επί στήλης (column chromatography), χρωματογραφία επί χάρτου (paper chromatography)

και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin-layer chromatography), και ανάλογα με τον τρόπο μετακίνησης της κινητής φάσης διακρίνονται σε χρωματογραφία ανάπτυξης και χρωματογραφία έκλουσης.

Σήμερα, η χρωματογραφία αποτελεί την καλύτερη τεχνική διαχωρισμού και αναλύσεως πολύπλοκων μειγμάτων και απομονώσεως ουσιών με χρήση σε πολλά επιστημονικά πεδία. (51), (52)



Εικόνα 7: Χρωματογραφικός διαχωρισμός (53)

1.3.2 Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High - Performance Liquid Chromatography)

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος χρωματογραφίας για την πραγματοποίηση διαχωρισμών, είναι η υγροχρωματογραφία κατά την οποία χρησιμοποιούνται πολύ μικρά σωματίδια και σχετικά υψηλή πίεση. Η χρωματογραφία αυτή ονομάζεται υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography) ή υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης (High-pressure Liquid Chromatography), και σύντομα HPLC. Έχει εφαρμογές στη βιομηχανία (κατά την παραγωγή φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων), για νομικούς σκοπούς (π.χ. ανίχνευση παραγόντων βελτίωσης απόδοσης ή doping στα ούρα αθλητών), ερευνητικούς σκοπούς (π.χ. για το διαχωρισμό συστατικών ενός πολύπλοκου βιολογικού ή χημικού μίγματος), καθώς και για ιατρικούς σκοπούς, όπως η ανίχνευση της βιταμίνης D στον ορό του αίματος. Ο λόγος αυτής της ευρείας χρήσης και της πληθώρας εφαρμογών είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για

διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία. (54)

Η Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης αποτελεί εξέλιξη της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης. Στην κλασική υγροχρωματογραφία στήλης, η ταχύτητα μερισμού των συστατικών του μίγματος μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης εξαρτάται κυρίως από τη διάχυση. Η διάχυση όμως στα υγρά είναι εξαιρετικά αργή συγκριτικά με αυτή στα αέρια, και για την ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης πρέπει να τηρείται μία βασική προϋπόθεση. Η προϋπόθεση αυτή αφορά το υλικό πλήρωσης της στατικής φάσης, το οποίο πρέπει να αποτελείται από σωματίδια λεπτού διαμερισμού (πολύ μικρής διαμέτρου) και υψηλής σφαιρικής κανονικότητας, ώστε να αυξάνεται το εμβαδόν επιφάνειας της στατικής φάσης και να επιτυγχάνεται μεγάλου βαθμού ομοιομορφία και πυκνότητα πλήρωσης, και κατά συνέπεια να βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων συστατικών. (51)

1.3.3 Κανονικής και Αντίστροφης Φάσης Χρωματογραφία

Κατά την IUPAC, ως χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase chromatography) ορίζεται η διαδικασία έκλουσης κατά την οποία η στατική φάση είναι υψηλότερης πολικότητας από την κινητή φάση. Στην πράξη, οι πλέον χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις είναι οξειδίο του πυριτίου (SiO_2), αλούμινα (Al_2O_3) ή μαγνησία (MgO_2). Έτσι, οι πιο πολικές ενώσεις στο προς διαχωρισμό μίγμα, αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, σε σύγκριση με τις άπολες ενώσεις, οι οποίες διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκλούνται από αυτή νωρίτερα. Ο κυρίαρχος μηχανισμός αλληλεπίδρασης με την κινητή φάση είναι οι δεσμοί υδρογόνου.

Αντίθετα, ως χρωματογραφία αντίστροφης φάσης χαρακτηρίζεται η διαδικασία έκλουσης κατά την οποία η κινητή φάση είναι υψηλότερης πολικότητας από τη στατική φάση. Η στατική φάση αποτελείται συνήθως από οξειδίο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (δεκαοκτύλιο, οκτύλιο ή ακετύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα μη πολικό χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών (όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με ύδωρ. Προσφέρει

αρκετά πλεονεκτήματα, όπως ταχύτητα, αναπαραγωγιμότητα, δυνατότητα αυτοματοποίησης, ευαισθησία στις προσμίξεις ή στα προϊόντα αποικοδόμησης, απαίτηση για πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, καθώς και δυνατότητα διαχωρισμού των προσμίξεων ενός μίγματος, παράλληλα με τον διαχωρισμό (on line διαχωρισμός). (38), (55)

Η αντιστρόφου φάσεως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC), έχει αποδειχθεί ότι προσομοιώνει το σύστημα οκτανόλης-νερού και θεωρείται ως μία δημοφιλής εναλλακτική λύση για την αξιολόγηση της λιποφιλίας.

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

$$\log k = \log \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1.9)$$

όπου: t_r : ο χρόνος κατακράτησης της υπό ανάλυσης ουσίας και t_0 : ο νεκρός χρόνος (δηλαδή ο χρόνος κατακράτησης ουσίας που δεν συγκρατείται από τη στήλη).

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

$$\log k = a \log P + b \quad (1.10)$$

Οι σταθερές a και b της εξίσωσης προκύπτουν με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης, ενώ η ποιότητα των στατιστικών στοιχείων που συνοδεύουν την εξίσωση εξαρτάται από τις χρωματογραφικές συνθήκες και την φύση των υπό μελέτη ουσιών. (56), (57)

1.3.4 Οργανολογία

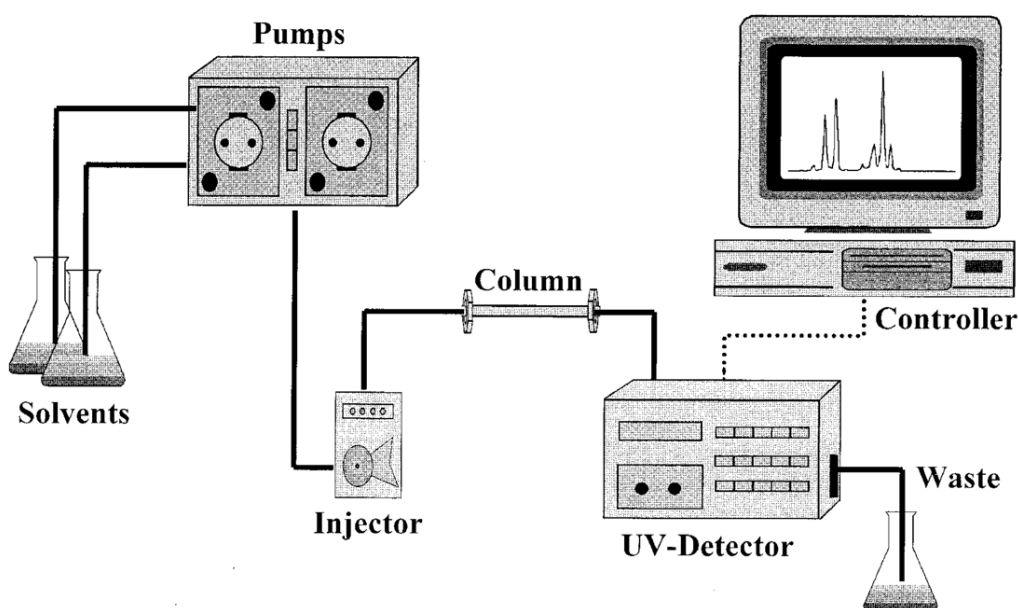
Μία βασική εργαστηριακή διάταξη HPLC αποτελείται από 5 βασικά μέρη:

- Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).

- Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρείται η απορρόφηση του φωτός. Επίσης, άλλα διαδεδομένα είδη ανιχνευτών, αποτελούν ο ανιχνευτής φθορισμού, ο ηλεκτροχημικός και ο διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης.
- Καταγραφέας: Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται συνεχώς κατά τη διάρκεια μίας ανάλυσης στέλνεται στη συνέχεια σε κάποιον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης. Πρέπει να χαρακτηρίζεται από ταχεία απόκριση και να έχει τη δυνατότητα επιλογής ενίσχυσης του σήματος.

Επιπλέον, αποτελείται από:

- Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες.
- Απαερωτή κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- Δεξαμενή αποβλήτων: Είναι η δεξαμενή όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. (51), (55), (56)

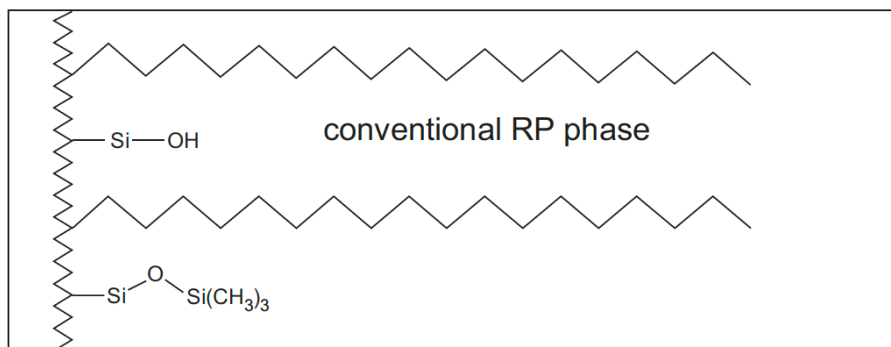


Εικόνα 8: Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης HPLC (57)

1.3.5. Στατικές φάσεις στην RP-HPLC

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

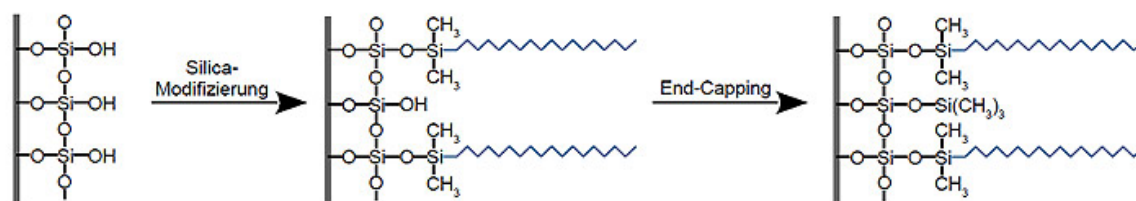
Ωστόσο, η παρεμβολή σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων στο μηχανισμό κατανομής της RP-HPLC έχει αναγνωριστεί ως σοβαρό μειονέκτημα, ιδίως στην περίπτωση των βασικών φαρμάκων. (39) Ως σιλανόφιλες καλούνται οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των υπό προσδιορισμό ουσιών και των ελεύθερων υδροξυλίων του πήγματος διοξειδίου του πυριτίου που δεν αντέδρασαν κατά την παρασκευή της στατικής φάσης με τις αλκυλικές αλυσίδες λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Οι σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις αποδίδονται στις ελεύθερες θέσεις σιλανόλης και περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου καθώς και ηλεκτροστατικές δυνάμεις, ειδικά στην περίπτωση θετικά φορτισμένων βασικών ενώσεων, προκαλώντας σημαντικές αυξήσεις στην κατακράτηση. Εξαρτώνται επίσης από τον βαθμό ιονισμού των ομάδων σιλανόλης, που είναι λιγότερο έντονος σε χαμηλά επίπεδα pH. Ένα ακόμα μειονέκτημα των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων είναι ότι προκαλούν «ουρά» (tailing) στις κορυφές των χρωματογραφημάτων και γενικότερα ασυμμετρία στις χρωματογραφικές κορυφές, γεγονότα που περιορίζονται αυξάνοντας τον αριθμό των ατόμων του άνθρακα στην αλκυλική αλυσίδα. (35), (60), (61), (62)



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση στήλης αντίστροφης φάσης, με ελεύθερες ομάδες σιλανόλης

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

- Η πρώτη στηρίζεται στην προσθήκη διάφορων παραγόντων επικάλυψης των ελεύθερων υδροξυλίων του πηγματος του οξειδίου του πυριτίου στην κινητή φάση. Συνήθως χρησιμοποιούνται υδρόφοβες αμίνες, όπως η n-δεκυλαμίνη, οι οποίες στην πρωτονιωμένη τους μορφή αλληλεπιδρούν με ελεύθερα υδροξύλια. (63)
- Η δεύτερη στοχεύει στην παραγωγή στατικών φάσεων με τέτοιον τρόπο ώστε να διαθέτουν πολύ περιορισμένο αριθμό προσβάσιμων ελεύθερων υδροξυλίων. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με δέσμευση των υδροξυλίων που δεν αντιδρούν με αλκύλια μικρού μήκους ώστε να δημιουργούνται end-capped BDS στήλες, είτε με τη χρήση στηλών που είναι διαμορφωμένες έτσι ώστε τα ελεύθερα υδροξύλια να είναι εγκλωβισμένα στο εσωτερικό της στατικής φάσης και όχι εκτεθειμένα στην επιφάνεια της («polar-embedded» στήλες). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει και η στήλη SUPELCOSIL LC-18-DB. (64)



Εικόνα 10: End-capping στήλης αντίστροφης φάσης

1.3.6 Κινητές φάσεις στην RP-HPLC

Στην RP-HPLC οι φάσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι μίγματα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με οργανικό τροποποιητή, συνήθως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή τετραϋδροφουράνιο. Ωστόσο, το ακετονιτρίλιο (σε αντίθεση με τη μεθανόλη και το THF) λόγω της αδυναμίας του να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τις υπολειμματικές ομάδες σιλανόλης, δεν προτιμάται στην ανάλυση των οργανικών βάσεων, διότι έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ασύμμετρων κορυφών. Όσον αφορά την εκτίμηση της λιποφιλίας, φαίνεται ότι η μεθανόλη είναι ο καταλληλότερος οργανικός τροποποιητής για την RP-HPLC, καθώς δεν διαταράσσει το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου του νερού. Επιπλέον, κατά την εξισορρόπηση, τα μόρια μεθανόλης συνδέονται με τη στατική φάση

σχηματίζοντας μια μονοστιβάδα, η οποία παρέχει τη ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου σε καλύτερη συμφωνία με την η-οκτανόλη.

Η σύνθεση του ρυθμιστικού υδατικού συστατικού στην κινητή φάση παίζει επίσης ενεργό ρόλο στη συγκράτηση πρωτονιωμένων βασικών ενώσεων, οι οποίες μπορεί να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων με αντίθετα ιόντα. Το μορφιλινο-προπανο-σουλφονικό οξύ (MOPS), θεωρείται ως ο ρυθμιστικός παράγοντας επιλογής για την εκτίμηση της λιποφιλίας με μεθόδους HPLC. Παρουσιάζει μεγάλη ρυθμιστική ικανότητα σε συνδυασμό με μικρή ικανότητα σχηματισμού ζευγών ιόντων λόγω της αμφολυτικής του φύσης, και συνεπώς δεν παρεμβαίνει ούτε στις διαλυμένες ουσίες ούτε στη στατική φάση. Από την άλλη, τα πειράματα κατανομής για τον προσδιορισμό του $\log D$ συνήθως εκτελούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ή σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (phosphate buffered saline ή PBS), που περιέχει NaCl και KCl σε συνολική συγκέντρωση περίπου 0,16 M, ώστε να προσομοιάζονται οι φυσιολογικές ισοτονικές συνθήκες. Συνεπώς, αυτή η επιλογή χρησιμοποιείται συχνά και στην HPLC. Ωστόσο, τα φωσφορικά άλατα και κυρίως τα χλωριούχα ανιόντα είναι ικανά να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων με πρωτονιωμένα μόρια με σταθερές εκχύλισης που μπορεί να διαφέρουν από εκείνες του συστήματος οκτανόλης-νερού. Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι το MOPS είναι καταλληλότερο από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για την εξαγωγή των δεικτών λιποφιλίας, δίνοντας καλύτερες συσχετίσεις με τις αντίστοιχες τιμές $\log D_{7,4}$. (35), (65)

Για την καλύτερη προσομοίωση του χρωματογραφικού συστήματος με το σύστημα οκτανόλης/ύδατος προτείνεται επίσης η προσθήκη οκτανόλης. Η οκτανόλη και το νερό παρουσιάζουν την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, ενώ η οκτανόλη αποτελείται από μία πολική κεφαλή και μία υδρόφοβη αλυσίδα, δομή δηλαδή παρόμοια με αυτή των φωσφολιπιδίων των βιολογικών μεμβρανών. Η συμπερίληψη της 1-οκτανόλης στο έκλουσμα, και συγκεκριμένα στο οργανικό τμήμα της κινητής φάσης, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ελαχιστοποίηση της επίδρασης διαφορικού δεσμού υδρογόνου που παρατηρείται στις περισσότερες μεθόδους RP-HPLC. Η οκτανόλη είναι σημαντικά πιο λιπόφιλη από τη μεθανόλη και θα εμπλουτιστεί στη στατική φάση σε σχέση με τον όγκο του εκλούσματος, δημιουργώντας μία φάση που θα προσομοιάζει εκείνη της οκτανόλης και ελαχιστοποιώντας τη διάκριση των δεσμών υδρογόνου. (66)

1.3.7 RP-HPLC και δείκτες λιποφιλίας

Για τον υπολογισμό των δεικτών λιποφιλίας, στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί δύο διαδικασίες παρέκτασης από τα πειραματικά δεδομένα. Η πρώτη είναι εμπειρική σχέση και χρησιμοποιεί γραμμική παρέκταση προκειμένου να ληφθούν οι σταθερές υδροφοβίας:

$$\log k'_\phi = \log k'_w - S\phi_{\text{MeOH}} \quad (1.11)$$

όπου ο όρος ϕ_{MeOH} είναι το κλάσμα όγκου της μεθανόλης στο έκλουσμα και ο όρος $\log k'_\phi$ είναι ο λογάριθμος του μετρούμενου λόγου χωρητικότητας με το αντίστοιχο ποσοστό οργανικού τροποποιητή. Η τομή (σταθερός όρος της εξίσωσης) $\log k'_w$ αναπαριστά τη συγκράτηση του διαλύτη υπό υποθετικές χρωματογραφικές συνθήκες, και ο όρος S την κλίση της ευθείας που προκύπτει από τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Ο δεύτερος τρόπος παρέκτασης, περιλαμβάνει τη χρήση μιας τετραγωνικής εξίσωσης των δεδομένων $\log k'_\phi$ ως προς το ϕ_{MeOH} . Η έκφραση της σχέσης αυτής φαίνεται στη παρακάτω εξίσωση:

$$\log k'_\phi = \alpha_1 (\phi_{\text{MeOH}})^2 + \alpha_2 (\phi_{\text{MeOH}}) + \log k'_w \quad (1.12)$$

Σε αντίθεση με τη γραμμική προσέγγιση, η οποία είναι εμπειρική, έχουν γίνει προσπάθειες ώστε να αιτιολογηθεί η χρήση της τετραγωνικής εξίσωσης σε θεωρητικό επίπεδο. (66)

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

$$\log k = A\phi + B\phi^2 + E\sqrt{\phi} + \log k_w \quad (1.13)$$

Τα A , B και E είναι συντελεστές προσαρμογής και ο παράγοντας $\log k_w$ είναι η τιμή που αντιστοιχεί σε 100% υδατική κινητή φάση (τομή με τον y -άξονα). Ο όρος $B\phi^2$ αντιστοιχεί στην καμπυλότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οργανικών τροποποιητών που αποδίδεται εν μέρει σε σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις, ενώ το $E\sqrt{\phi}$ αντιπροσωπεύει την καμπυλότητα που παρατηρείται σε πλούσιες σε νερό κινητές φάσεις ($\phi < 0.2$) λόγω προβλημάτων διάλυσης της στατικής φάσης. Το σφάλμα στις τιμές $\log k_w$, που παράγεται ως αποτέλεσμα της καμπυλότητας στις χαμηλότερες τιμές κλασμάτων του οργανικού τροποποιητή, διερευνήθηκε από τον Tate et al. Η σωστή εκτίμηση της παρεκτάσεως των

χρωματογραφικών δεικτών εξαρτάται επίσης από τη στατική φάση. Πράγματι, μια πολικά ενσωματωμένη στήλη (embedded) με βάση το υδρίδιο παράγαγε ελαφρώς μικρότερο σφάλμα στην διαδικασία παρέκτασης από μια endcapped στήλη με πολικά άκρα και μια endcapped συμβατική στήλη με μη πολικά άκρα, ως αποτέλεσμα τόσο της μικρότερης επιφάνειας όσο και των λιγότερων επιφανειακών σιλανολών.

Παρόλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις N-N μεμονωμένων ζευγών μεταξύ των ενσωματωμένων αμιδικών ομάδων και των διαλυμένων ουσιών που περιέχουν άτομα αζώτου, όπως οι βασικές ενώσεις, φαίνεται να επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά συγκράτησης και κατά συνέπεια την ακρίβεια της παρέκτασης. Επιπλέον, η τετραγωνική παρέκταση με τη χρήση της υψηλότερης συγκέντρωσης οργανικού τροποποιητή, μπορεί κι εκείνη να οδηγήσει σε εσφαλμένο υπολογισμό των δεικτών λιποφιλίας.

Όταν χρησιμοποιείται ως οργανικός τροποποιητής η μεθανόλη σε κλάσματα $>0,2$ μαζί με έναν παράγοντα κάλυψης, το γραμμικό τμήμα της προηγούμενης εξίσωσης είναι επαρκώς ευρύ. Ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή ανηγμένων τιμών $\log k_w$ σύμφωνα με το μοντέλο της γραμμικής αντοχής διαλύτη Snyder μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Log}k = -S\phi + \log k_w \quad (1.14)$$

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

Οι τιμές $\log k_w$ πλεονεκτούν έναντι των τιμών $\log k'$, δεδομένου ότι είναι ανεξάρτητες των χρωματογραφικών συνθηκών, ενώ αποφεύγονται σφάλματα ως προς την εκτίμηση της λιποφιλίας λόγω αναστροφής της λιποφιλίας σε διαφορετικά ποσοστά οργανικού τροποποιητή. Επιπλέον, ο υπολογισμός της παραμέτρου $\log k_w$ μέσω γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης οδηγεί σε άρση των αναπόφευκτων σφαλμάτων στις μετρήσεις της παραμέτρου $\log k'$ σε μικρά ποσοστά νερού. Τέλος, ο προσδιορισμός της λιποφιλίας μέσω της παραμέτρου $\log k_w$ καλύπτει μεγάλο εύρος λιποφιλίας. (67)

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

$$\log P = a \log k_w + b \quad (1.15)$$

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

Θεωρητικά οι τιμές $\log k_w$ δεν επηρεάζονται από το είδος του οργανικού τροποποιητή. Ωστόσο, πολλές φορές παρατηρούνται αποκλίσεις και οι τιμές $\log k_w$ διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του οργανικού τροποποιητή. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να οφείλεται στην επίδραση του φαινομένου των σιλανόφιλων αλληλεπιδράσεων, ενώ η υδροφοβία και η διπολική ροπή του διαλύτη φαίνεται επίσης να παίζει ενεργό ρόλο, ιδίως όσον αφορά τις σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις και την δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. (18), (35), (39), (67)

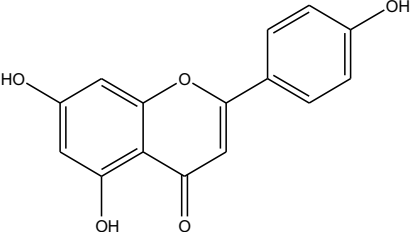
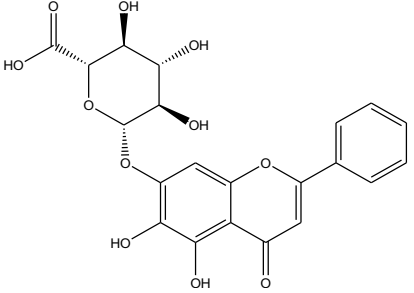
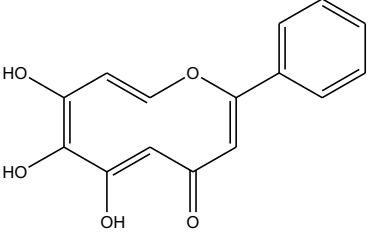
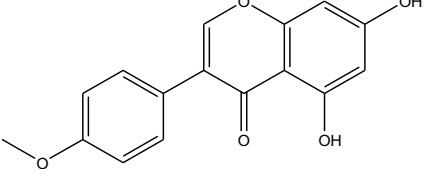
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

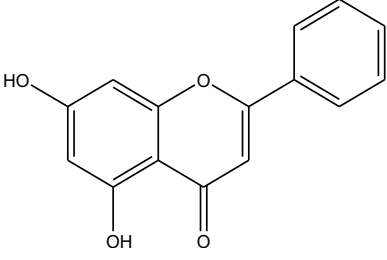
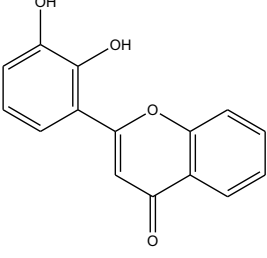
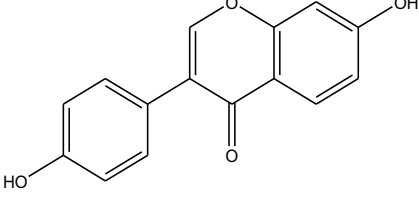
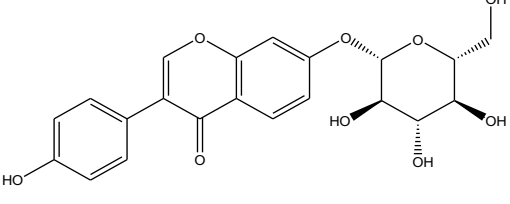
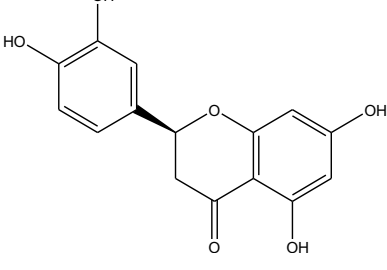
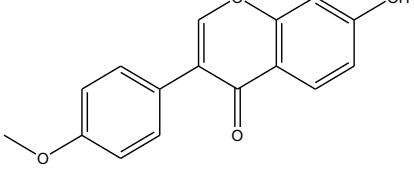
Προσδιορισμός λιποφιλίας φλαβονοειδών μέσω προσδιορισμού των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$.

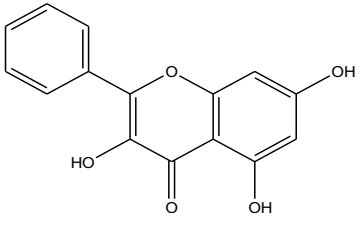
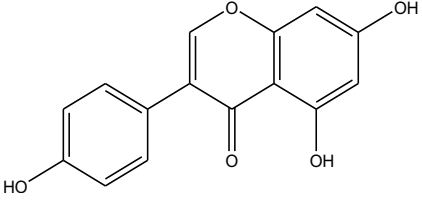
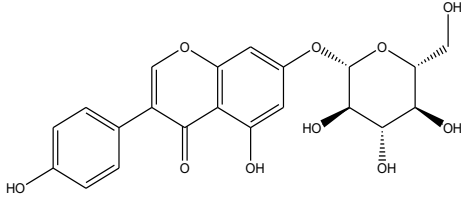
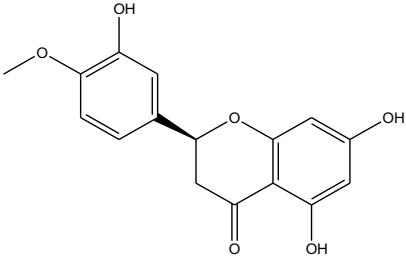
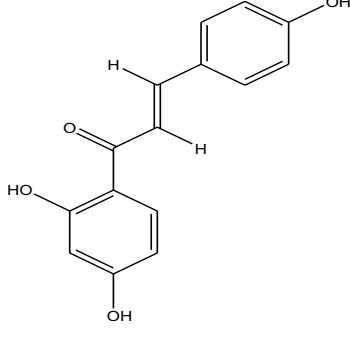
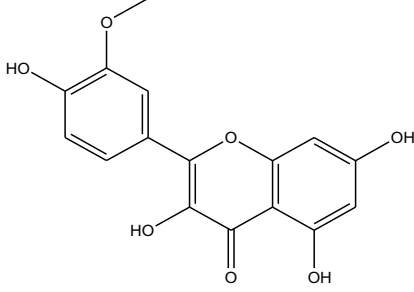
2.1. ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

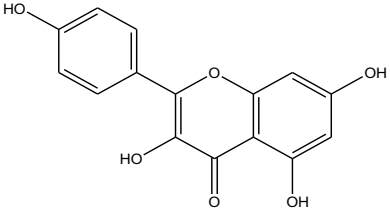
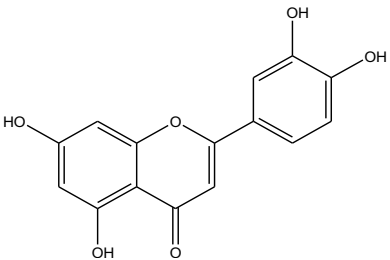
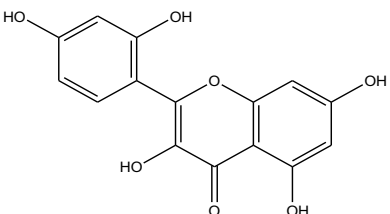
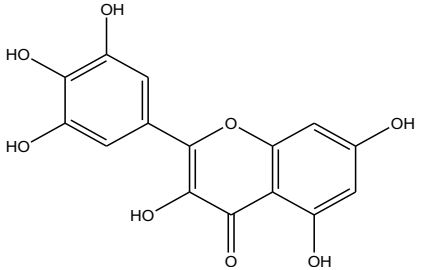
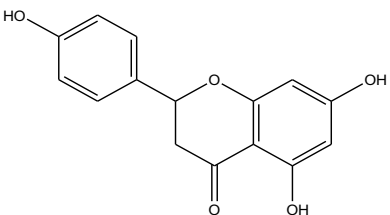
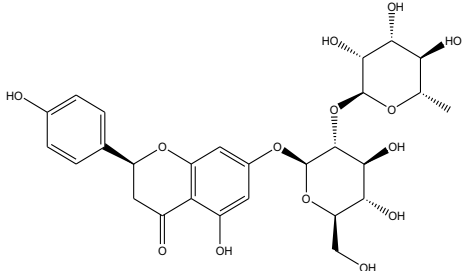
Παρακάτω παρουσιάζονται οι χημικές δομές των 29 φλαβονοειδών που μελετήθηκαν:

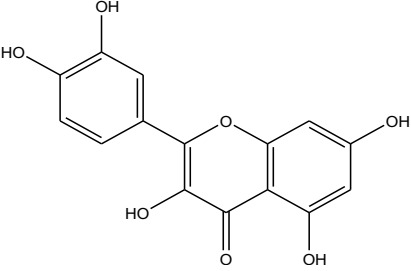
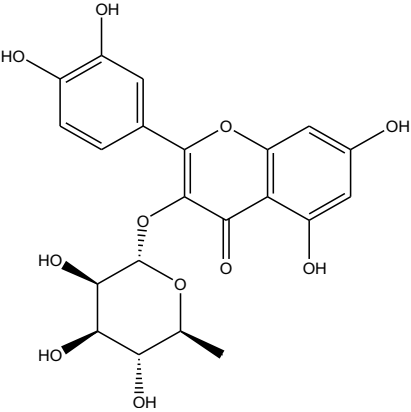
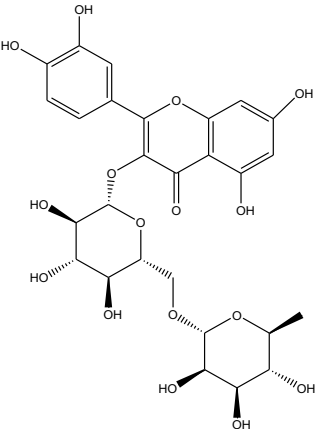
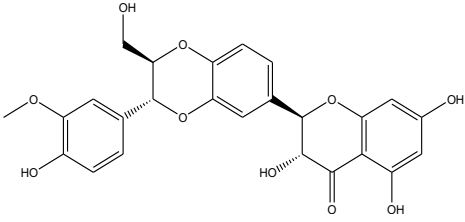
Πίνακας 2.1: Χημικές Δομές εξεταζόμενων φλαβονοειδών

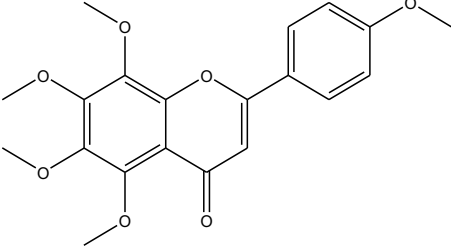
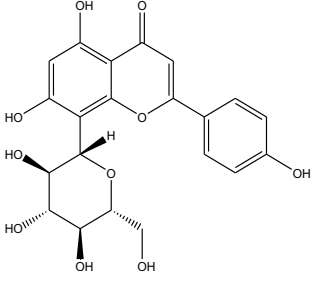
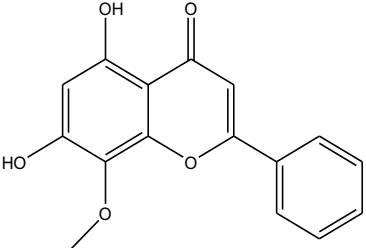
1. Apigenin	
2. Baicalin	
3. Baicalein	
4. Biochanin-A	

<p>5. Chrysin</p>	
<p>6. 2',3'-dihydroxyflavone</p>	
<p>7. Daidzein</p>	
<p>8. Daidzin</p>	
<p>9. Eriodictyol</p>	
<p>10. Formonentin</p>	

<p>11. Galangin</p>	
<p>12. Genistein</p>	
<p>13. Genistin</p>	
<p>14. Hesperetin</p>	
<p>15. Isoliquiritigenin</p>	
<p>16. Isorhamnetin</p>	

<p>17. Kaempferol</p>	
<p>18. Luteolin</p>	
<p>19. Morin</p>	
<p>20. Myricetin</p>	
<p>21. Naringenin</p>	
<p>22. Naringin</p>	

<p>23. Quercetin</p>	 <p>The structure shows a flavan-3-ol core. It consists of a central pyrone ring fused to a benzene ring (C6-C7) and another benzene ring (C8-C14). The C6 ring has hydroxyl groups at positions 5 and 7. The C7 ring has a hydroxyl group at position 2. The C8 ring has hydroxyl groups at positions 3 and 4. The C14 ring has a hydroxyl group at position 3.</p>
<p>24. Quercitrin</p>	 <p>The structure is identical to Quercetin, but with a rhamnose sugar attached to the C3 position of the C8 ring via an ether linkage. The rhamnose is shown in its pyranose form with hydroxyl groups at positions 2, 3, and 6.</p>
<p>25. Rutin</p>	 <p>The structure is identical to Quercitrin, but with a glucose sugar attached to the C3 position of the C8 ring via an ether linkage. The glucose is shown in its pyranose form with hydroxyl groups at positions 2, 3, and 6.</p>
<p>26. Sylibin</p>	 <p>The structure is a dimeric flavan-3-ol. It consists of two flavan-3-ol units linked at their C4 positions. The left unit has a methoxy group at C7 and a hydroxyl group at C5. The right unit has hydroxyl groups at C5 and C7. The C8 ring of the right unit has a hydroxyl group at C3.</p>

<p>27. Tangeretin</p>	
<p>28. Vitexin</p>	
<p>29. Wogonin</p>	

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

Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε ο χρόνος ανάσχεσης των φλαβονοειδών σε διαφορετικές αναλογίες κινητής φάσης. Αρχικά παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αυτών, με διάλυση των υψηλής καθαρότητας ουσιών σε καθαρή μεθανόλη και προσθήκη ποσότητας νερού στη συνέχεια. Τα μεθανολικά διαλύματα των φλαβονοειδών αποθηκεύτηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη για την περαιτέρω χρήση τους. Το μήκος κύματος του ανιχνευτή που επιλέχθηκε για τη μελέτη ήταν τα 254nm, καθώς τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν εκεί τη μέγιστη απορρόφηση.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 Αντιδραστήρια

Τα φλαβονοειδή προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Alfa Aesar - Thermo Fisher Scientific (Germany), Extrasynthese (France), Cayman Chemical Company (Michigan, USA) και Tokyo Chemical Industry Co.,LTD (Japan) και ήταν καθαρότητας $\geq 95\%$. Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC gradient, Sigma Aldrich). Για την προετοιμασία των κινητών φάσεων χρησιμοποιήθηκε μορφολινοπροπανοσουλφονικό οξύ (MOPS $\geq 99,5\%$, Serva), οκτανόλη ($\geq 99\%$ Alfa Aesar), και υδατικά διαλύματα υδροχλωρικού οξέος (30% Merck) και καυστικού νατρίου (Sodium hydroxide solution, Honeywell/Fluka). Το νερό ήταν καθαρότητας HPLC μέσω του συστήματος παραγωγής νερού EASYpure II (Barnstead International, USA). Για τη λήψη του νεκρού χρόνου χρησιμοποιήθηκε μεθανολικό διάλυμα κιτρικού νατρίου (Sodium citrate, Mallinckrodt).

2.2.2 Οργανολογία

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

2.2.3 Προγράμματα και Βάσεις Δεδομένων

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

Για τις προβλεπόμενες τιμές του logP (συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης – νερού) των εξεταζόμενων φλαβονοειδών όσο και για το μοριακό τους βάρος (MW), την πολική τους επιφάνεια επαφής (TPSA), τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου τους ως δότη (HBD) και ως δέκτη (HBA) αλλά και για τις τιμές Abraham (οξύτητα (A) και βασικότητα

(B) των δεσμών υδρογόνου) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ADME Boxes v. 3.0 (Pharma Algorithms).

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

2.2.4 Πειραματικό Πρωτόκολλο

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μίγματα μεθανόλης και ρυθμιστικού διαλύματος MOPS σε pH 7,4 κορεσμένα σε οκτανόλη σε διάφορες αναλογίες (ποσοστό μεθανόλης 30-70% με βήμα 5%).

➤ Στατική φάση

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη SUPELCOSIL™ LC-18-DB 15cm × 4mm, 5μm. Οι στήλες SUPELCOSIL LC-18-DB είναι απενεργοποιημένες για τις ενώσεις με βασικές ιδιότητες. Παρέχουν μικρότερους χρόνους κατακράτησης, καλύτερες χρωματογραφικές κορυφές και πιο υψηλή αποδοτικότητα για οργανικές βάσεις, συγκριτικά με τις συμβατικές στήλες αντίστροφης φάσης. Οι στήλες αυτές έχουν καθιερωθεί στη βιομηχανία για την ανάλυση βασικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται ως «δύσκολες», και ιδιαίτερα στη φαρμακοβιομηχανία.

Οι συμβατικές στήλες αντιστρόφου φάσης έχουν ως βάση τη silica τύπου A ή B, οι οποίες έχουν ομάδες Si-OH στην επιφάνειά της, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις ενώσεις με βασικές ιδιότητες (σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις). Αυτός ο δευτερεύων μηχανισμός συγκράτησης είναι τυπικά μη επιθυμητός και προκαλεί κακές χρωματογραφικές κορυφές. Το πρόβλημα των αυτό αντιμετωπίζεται μερικώς από τη χρήση στηλών με μειωμένες ελεύθερες ή προσιτές θέσεις σιλανόλης. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των στηλών

LC-18-DB οι στατικές φάσεις διαθέτουν πολύ περιορισμένο αριθμό προσβάσιμων ελεύθερων υδροξυλίων, έχοντας υποστεί επεξεργασία του τύπου “endcapping”.

➤ Παρασκευή νερού κορεσμένου σε οκτανόλη

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

➤ Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

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

➤ Παρασκευή κινητής φάσης

Ανάλογα με την επιθυμητή αναλογία της κινητής φάσης, αναμιγνύονται κάθε φορά κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος και μεθανόλης. Για παράδειγμα, η κινητή

φάση αναλογίας 50:50 και τελικού όγκου 500mL, θα περιέχει 250mL μεθανόλης και 250mL ρυθμιστικού διαλύματος.

Αρχικά, μέσω του προγράμματος Eurochrom, δημιουργήθηκε μέθοδος με ροή κινητής φάσης 1mL/min και το μήκος κύματος του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στα 254nm.

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

$$\log k' = \log\left(\frac{t_r - t_0}{t_0}\right) \quad (2.1)$$

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

2.2.5 Προσδιορισμός ανηγμένων τιμών $\log k_w$

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

$$\log k' = -S\phi + \log k_w \quad (2.2)$$

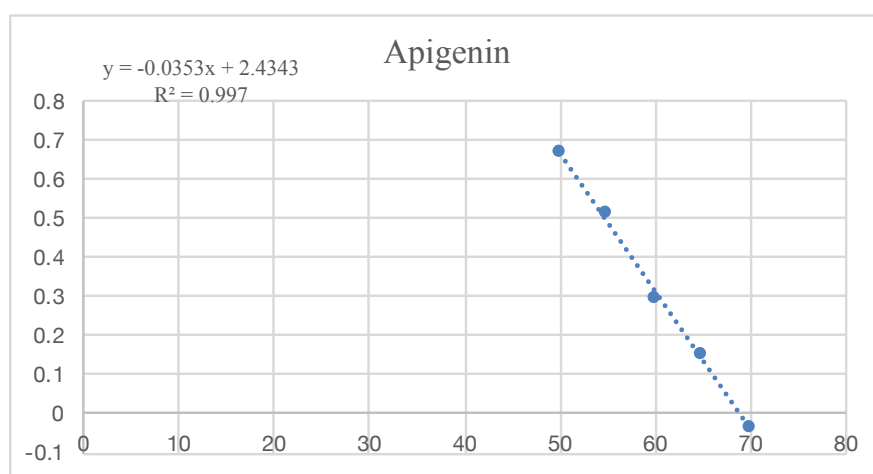
όπου $\log k_w$ η τιμή του παράγοντα χωρητικότητας που αντιστοιχεί σε κινητή φάση 100% ρυθμιστικό διάλυμα και S η κλίση της ευθείας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

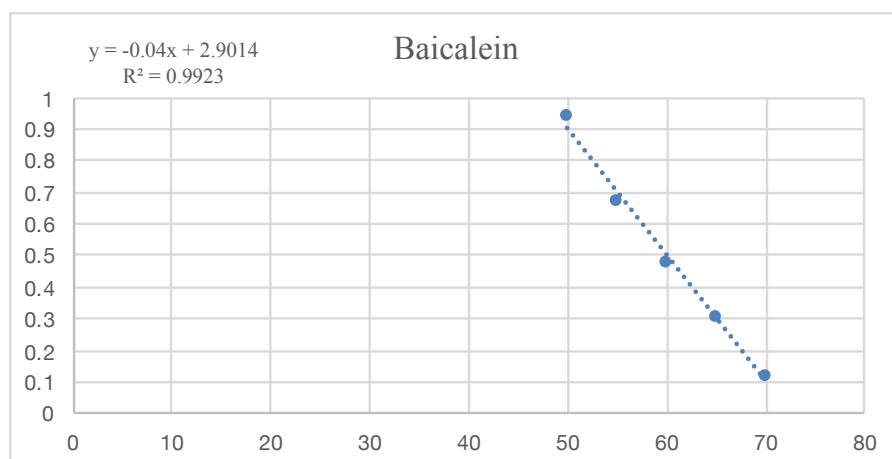
3.1 ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ $\log k/\varphi$ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΙΜΩΝ $\log k_w$

Για κάθε διάλυμα φλαβονοειδούς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε τουλάχιστον 4 διαφορετικές αναλογίες κινητής φάσης, ώστε να μπορεί να γίνει η εξαγωγή της γραμμικότητας της σχέσης $\log k$ ως προς φ (ποσοστό μεθανόλης στην κινητή φάση) ($\log k/\varphi$).

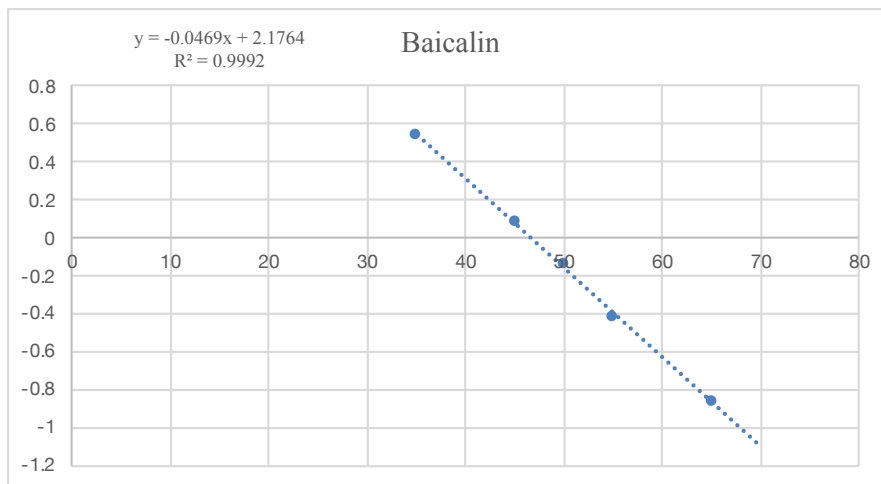
Παρατίθενται τα γραφήματα των φλαβονοειδών που αναλύθηκαν:



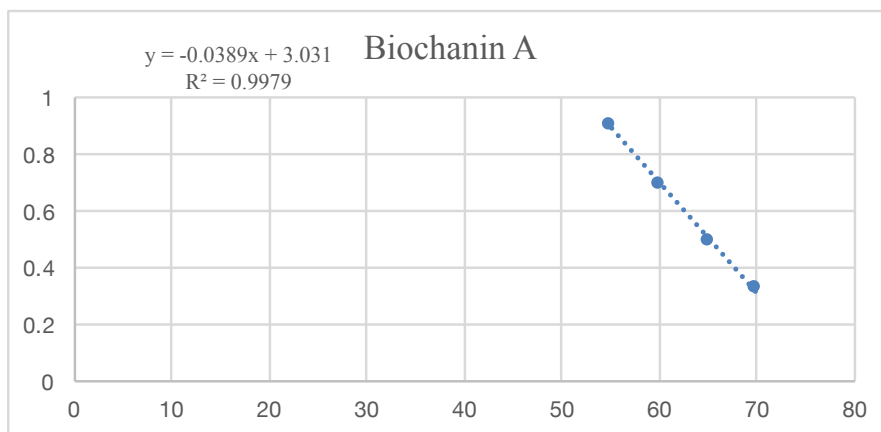
Σχήμα 3.1: Γραφική παράσταση $\log k/\varphi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, φ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές arigenin.



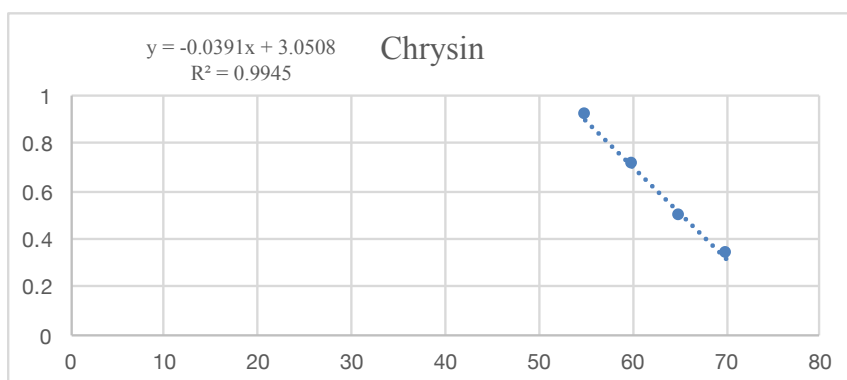
Σχήμα 3.2: Γραφική παράσταση $\log k/\varphi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, φ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές baicalein.



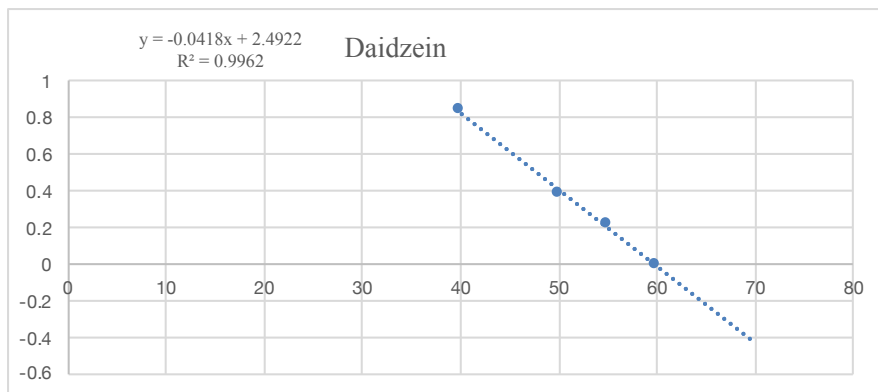
Σχήμα 3.3: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές baicalin.



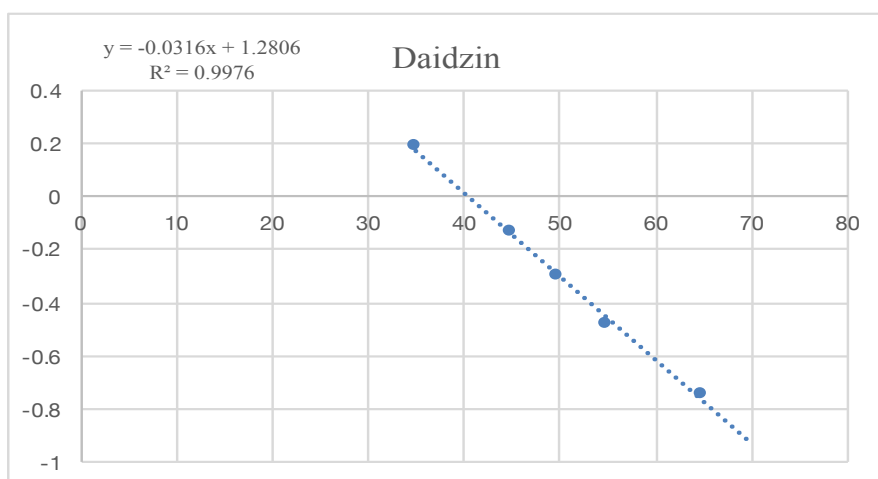
Σχήμα 3.4: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές biochanin A.



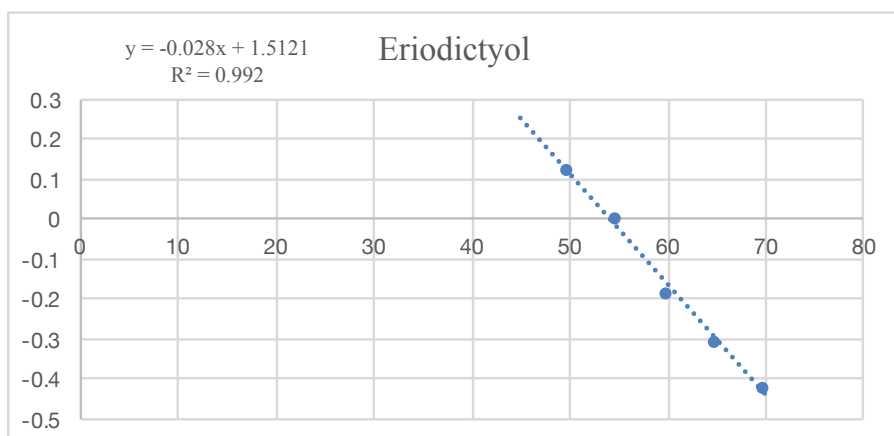
Σχήμα 3.5: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές chrysin.



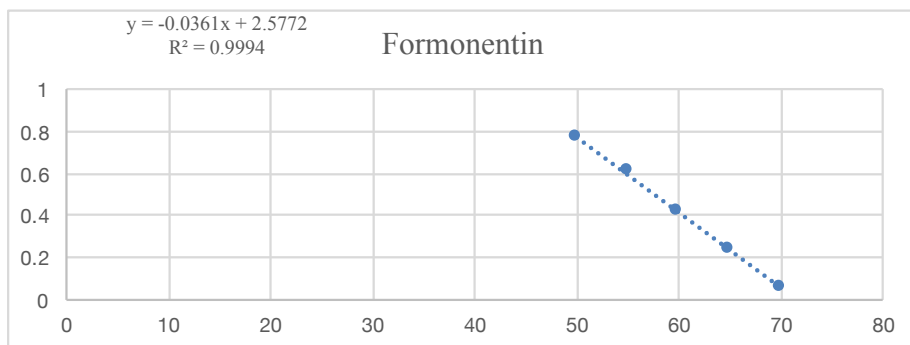
Σχήμα 3.6: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές daidzein.



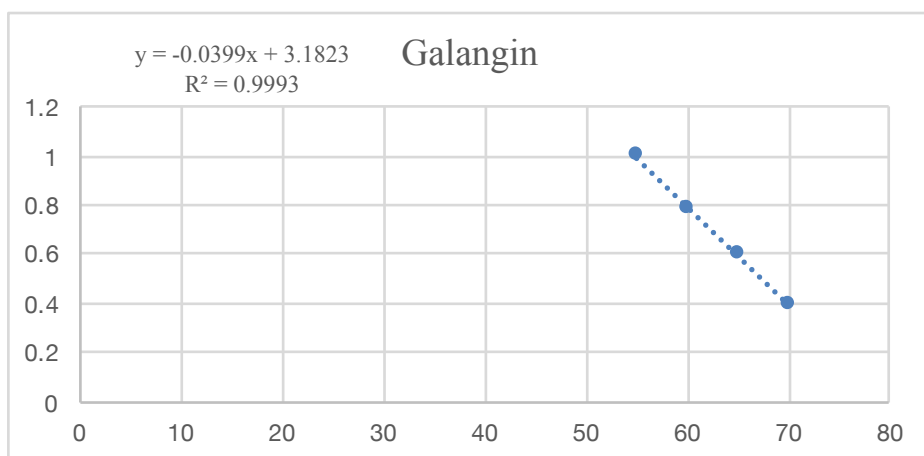
Σχήμα 3.7: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές daidzin.



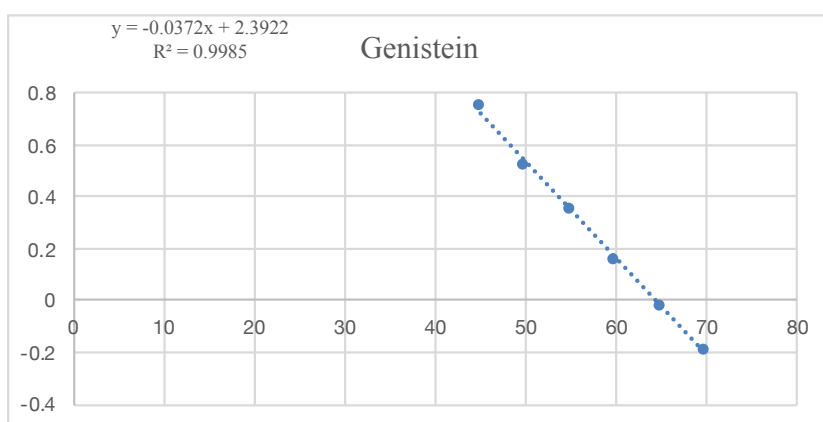
Σχήμα 3.8: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές eriodictyol.



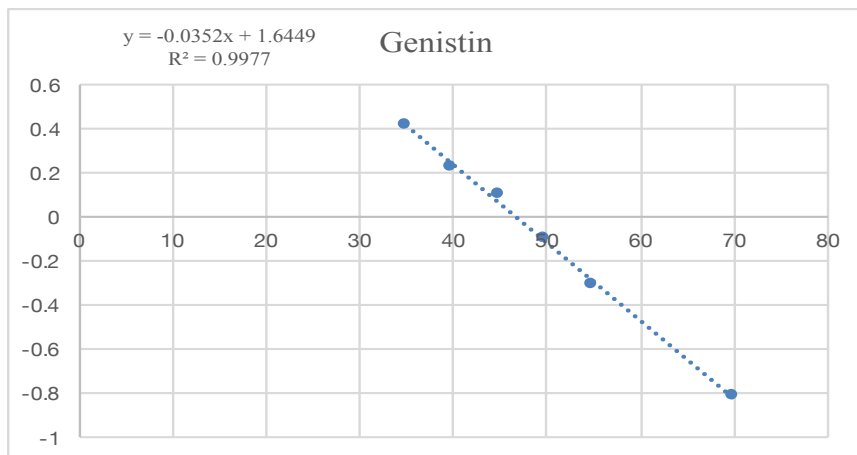
Σχήμα 3.9: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές formonentin.



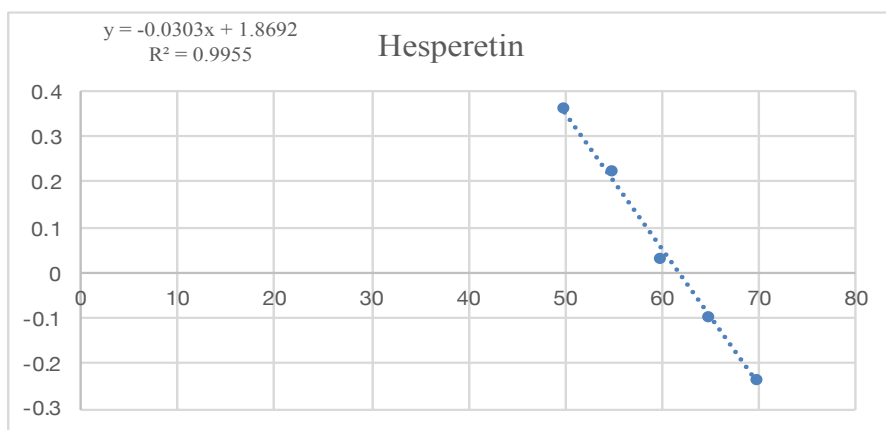
Σχήμα 3.10: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές galangin.



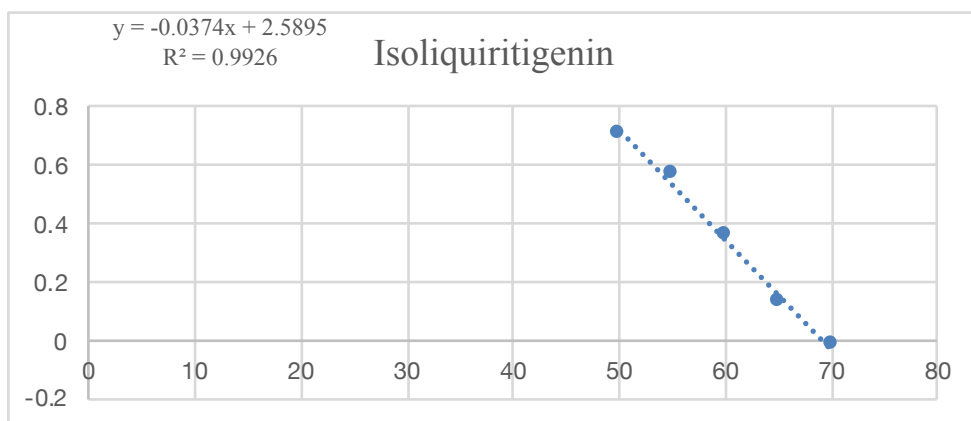
Σχήμα 3.11: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές genistein.



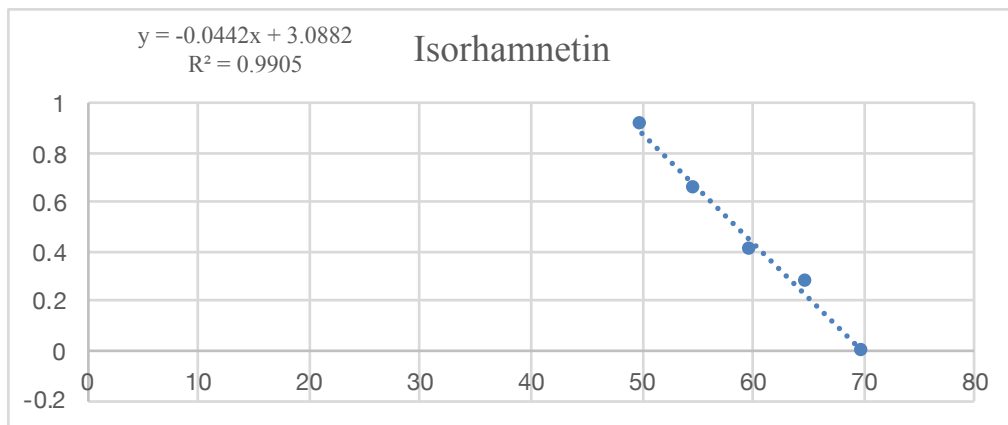
Σχήμα 3.12: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές genistin.



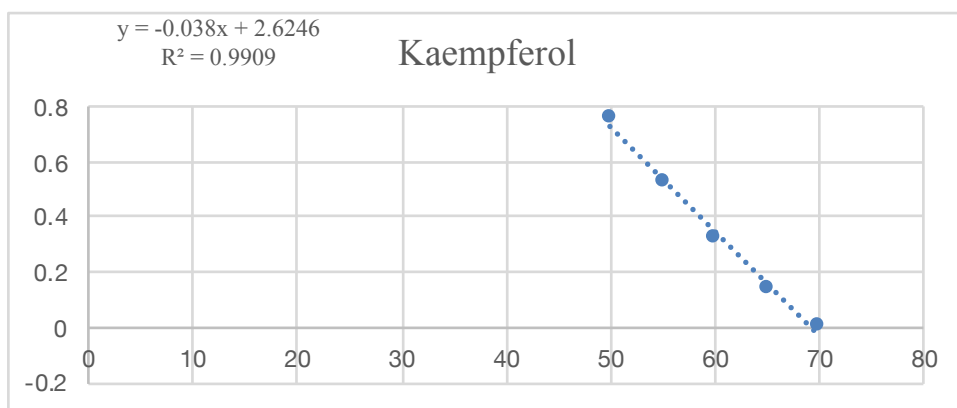
Σχήμα 3.13: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές hesperetin.



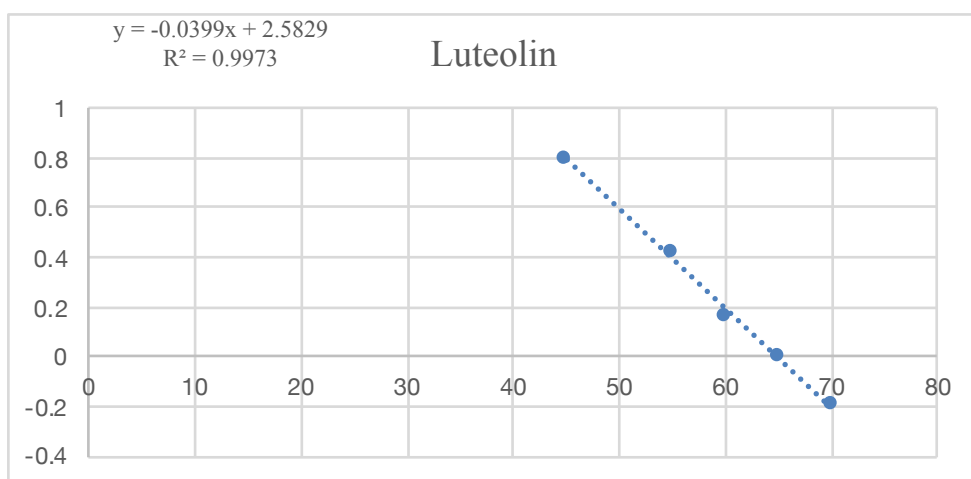
Σχήμα 3.14: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές isoliquiritigenin.



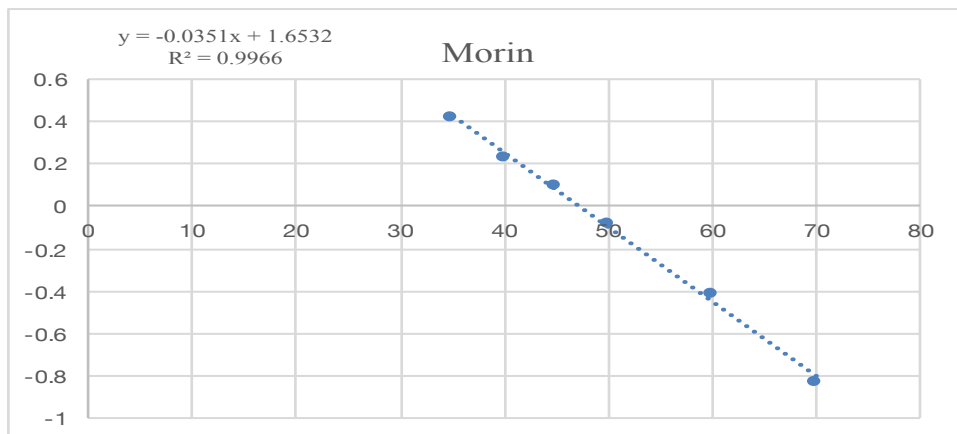
Σχήμα 3.15: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές isorhamnetin.



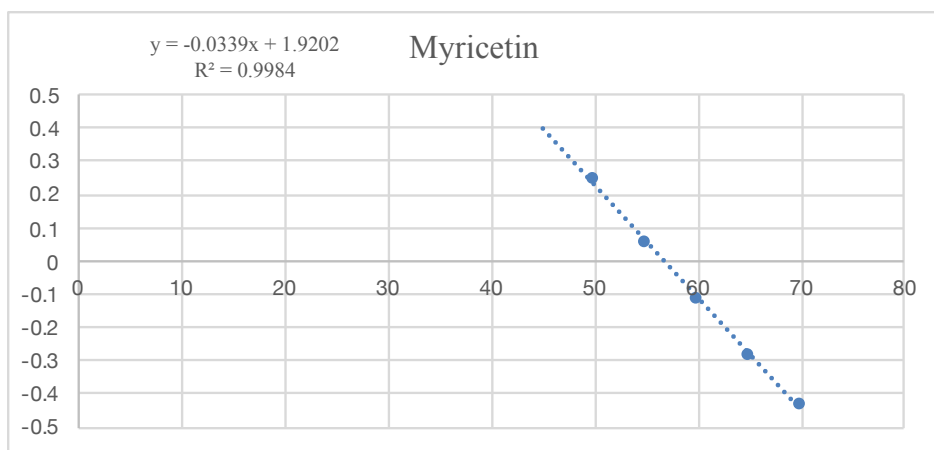
Σχήμα 3.16: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές kaempferol.



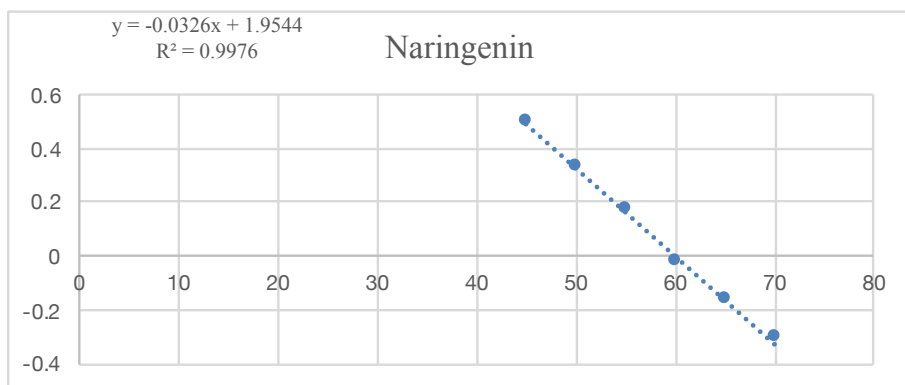
Σχήμα 3.17: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές luteolin.



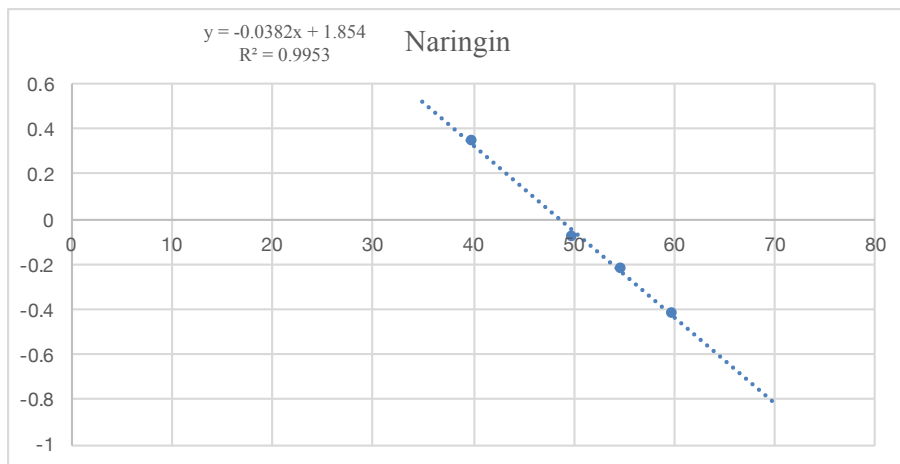
Σχήμα 3.18: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές morin.



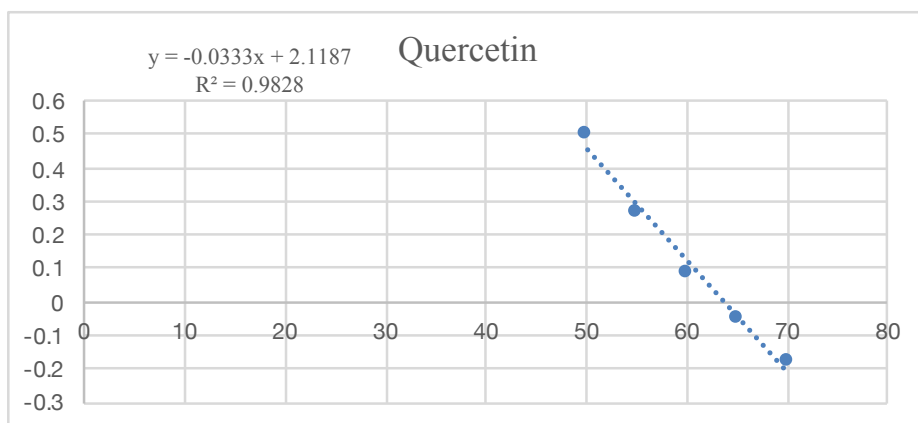
Σχήμα 3.19: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές myricetin.



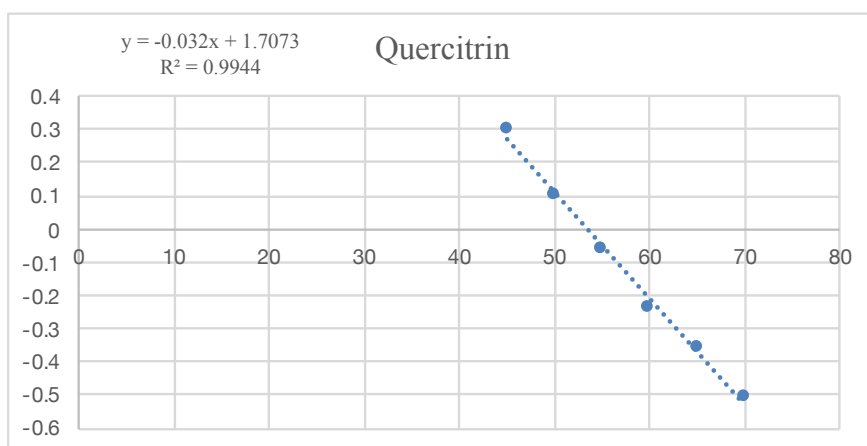
Σχήμα 3.20: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές naringenin.



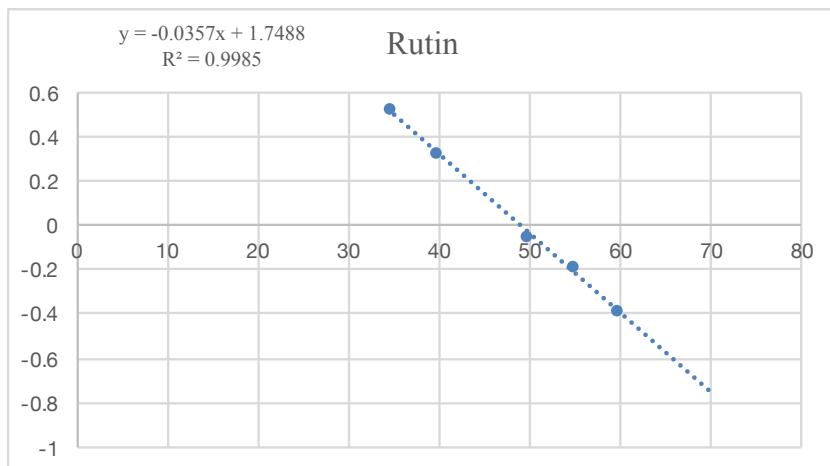
Σχήμα 3.21: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές naringin.



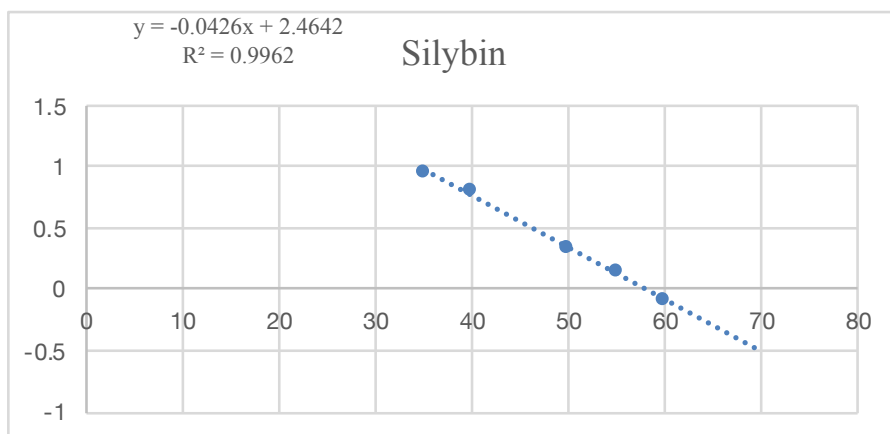
Σχήμα 3.22: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές quercetin.



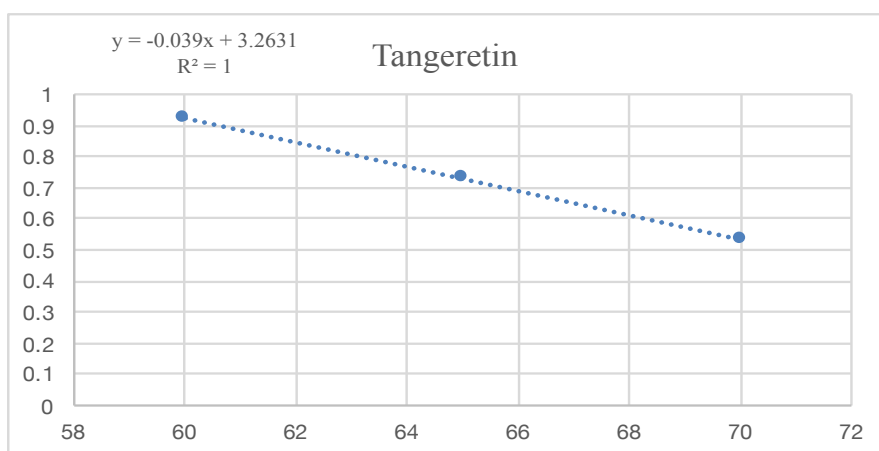
Σχήμα 3.23: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές quercitrin.



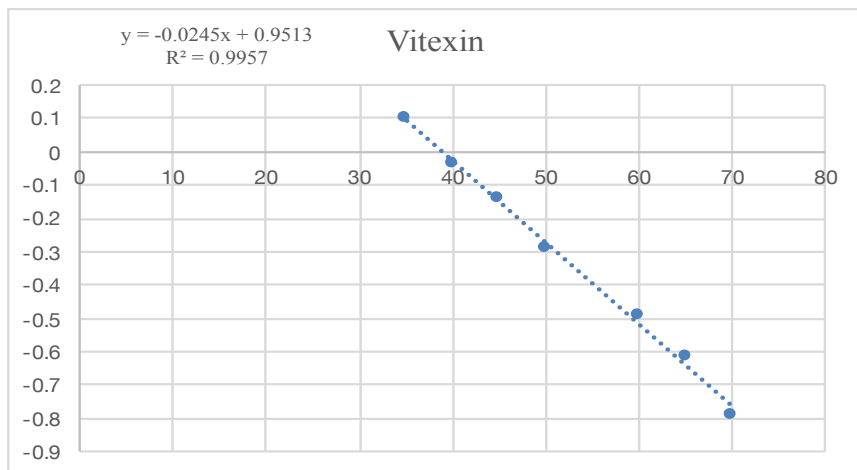
Σχήμα 3.24: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές rutin.



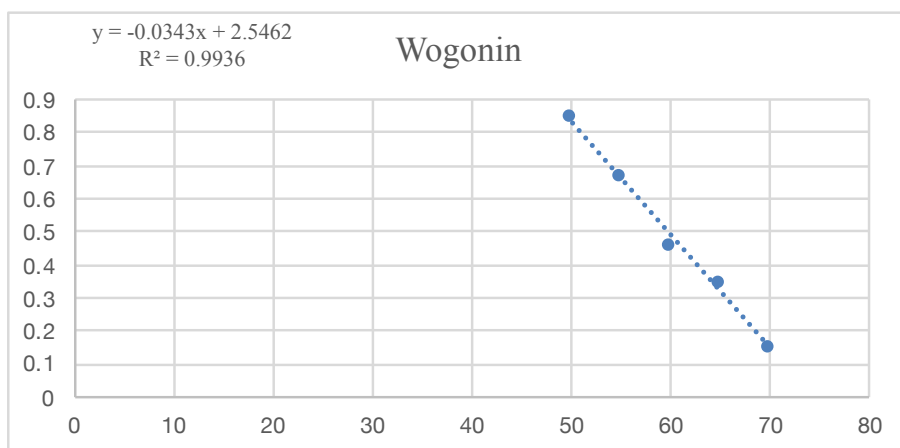
Σχήμα 3.25: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές silybin.



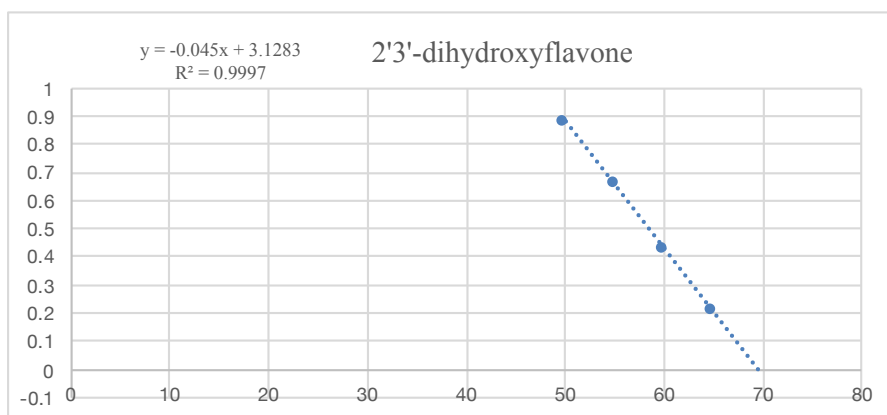
Σχήμα 3.26: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το φλαβονοειδές tangeretin.



Σχήμα 3.27: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το флаβονοειδές vitexin.



Σχήμα 3.28: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το флаβονοειδές wogonin.



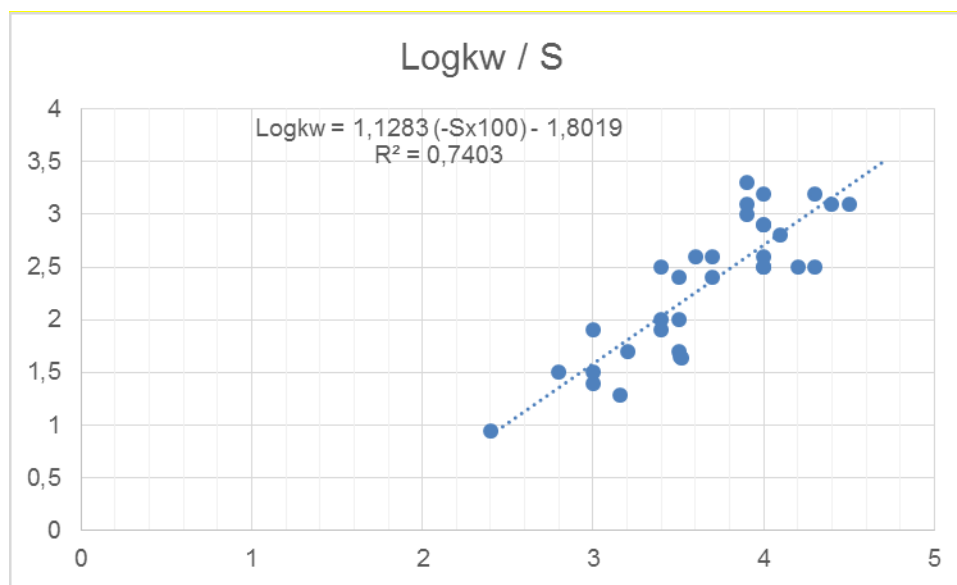
Σχήμα 3.29: Γραφική παράσταση $\log k/\phi$ (όπου $\log k$ ο παράγοντας συγκράτησης, ϕ το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή) για το флаβονοειδές 2', 3'- dihydroxyflavone.

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

Πίνακας 3.1: Ανηγμένες τιμές $\log k_w$ για pH 7,4 μαζί με τις αντίστοιχες κλίσεις S και τις τυπικές αποκλίσεις τους.

Φλαβονοειδή	$\log k_w$	Slope x (-100)
Apigenin	2,43 (\pm) 0,07	3,53 (\pm) 0,11
Baicalein	2,90 (\pm) 0,12	4,00 (\pm) 0,20
Baicalin	2,18 (\pm) 0,04	4,69 (\pm) 0,08
Biochanin A	3,03 (\pm) 0,08	3,89 (\pm) 0,13
Chrysin	3,05 (\pm) 0,13	3,91 (\pm) 0,20
2',3'- dioxhydroxyflavone	3,13 (\pm) 0,03	4,50 (\pm) 0,05
Daidzein	2,49 (\pm) 0,09	4,18 (\pm) 0,18
Daidzin	1,28 (\pm) 0,05	3,16 (\pm) 0,09
Eriodictyol	1,51 (\pm) 0,09	2,80 (\pm) 0,15
Formonentin	2,58 (\pm) 0,03	3,61 (\pm) 0,05
Galangin	3,18 (\pm) 0,05	3,99 (\pm) 0,07
Genistein	2,39 (\pm) 0,04	3,72 (\pm) 0,07
Genistin	1,64 (\pm) 0,04	3,52 (\pm) 0,08
Hesperetin	1,87 (\pm) 0,07	3,03 (\pm) 0,12
Isoliquiritigenin	2,59 (\pm) 0,11	3,74 (\pm) 0,19

Isorhamnetin	3,09 (±) 0,15	4,42 (±) 0,25
Kaempferol	2,62 (±) 0,13	3,80 (±) 0,21
Luteolin	2,58 (±) 0,07	3,99 (±) 0,12
Morin	1,65 (±) 0,05	3,51 (±) 0,10
Myricetin	1,92 (±) 0,05	3,39 (±) 0,08
Naringenin	1,95 (±) 0,05	3,26 (±) 0,08
Naringin	1,85 (±) 0,10	3,82 (±) 0,19
Quercetin	2,12 (±) 0,15	3,33 (±) 0,25
Quercitrin	1,71 (±) 0,07	3,20 (±) 0,12
Rutin	1,75 (±) 0,04	3,57 (±) 0,08
Sylibin	2,46 (±) 0,07	4,26 (±) 0,15
Tangeretin	3,26 (±) 0,01	3,90 (±) 0,02
Vitexin	0,95 (±) 0,04	2,45 (±) 0,07
Wogonin	2,55 (±) 0,10	3,43 (±) 0,16



Σχήμα 3.3: Διάγραμμα συσχέτισης των τιμών $\log k_w$ με τις αντίστοιχες τιμές της κλίσης S για τα φλαβονοειδή που αναλύθηκαν.

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

$$\log k_w = 1,13(\pm 0,10)S - 1,80 (\pm 0,42) \quad (3.1)$$

$$(n = 33, R = 0,8620, R^2 = 0,7403, SE = 0,28)$$

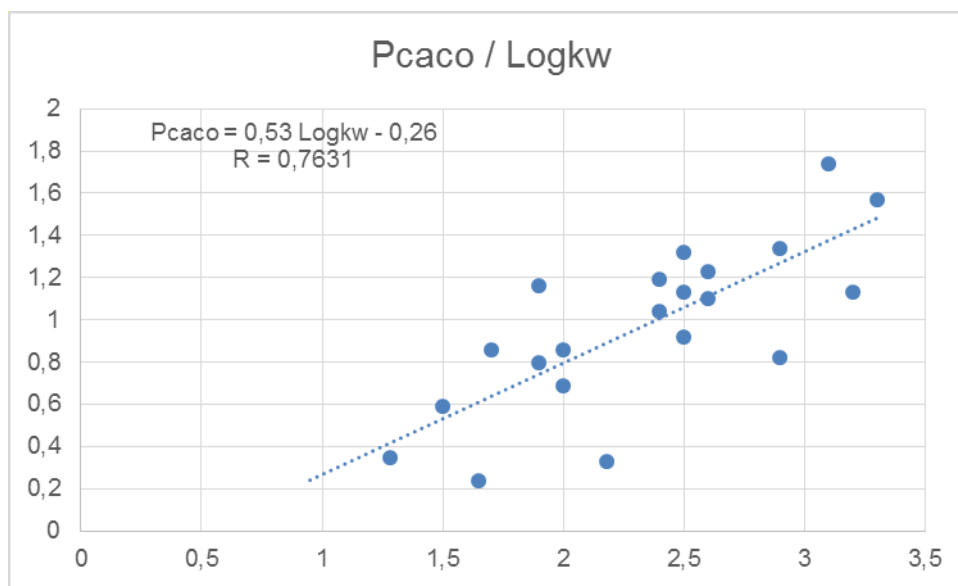
Από την παραπάνω γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης εξαιρέθηκε η baicalin η οποία αποτελεί γλυκοζίτη της baicalein και η εξαίρεση της οποίας βελτίωσε σημαντικά την γραμμικότητα της σχέσης $\log k_w/S$. Τα 27 φλαβονοειδή της ομάδας μελέτης είναι αγλυκόνες και τα υπόλοιπα 7 είναι γλυκοζίτες. Ωστόσο, μόνο ο γλυκοζίτης baicalin φαίνεται να διαφοροποιείται από την γραμμική σχέση $\log k_w/S$ της ομάδας μελέτης.

3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ Caco-2 ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ

Για τη συσχέτιση που ακολουθεί, τα δεδομένα εντερικής διαπερατότητας για τα 21 φλαβονοειδή που συμμετέχουν σε αυτή, συλλέχθηκαν από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ένα ερευνητικό εργαστήριο (40). Για μερικά από τα φλαβονοειδή υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα από άλλα διαφορετικά ερευνητικά εργαστήρια. Τα δεδομένα αυτά δεν κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν, διότι το πειραματικό πρωτόκολλο προσδιορισμού του συντελεστή διαπερατότητας παρουσιάζει σχετικά χαμηλή διεργαστηριακή επαναληψιμότητα. Πραγματοποιήθηκε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας (P_{caco}) για τα κύτταρα Caco-2 και του $\log k_w$. Η εξίσωση που προέκυψε είναι η εξής :

$$P_{caco} = 0,53(\pm 0,10)\log k_w - 0,26(\pm 0,24) \quad (3.2)$$

$$(n = 21, R = 0,7631, R^2 = 0,5824, SE = 0,26)$$



Σχήμα 3.33: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας P_{caco} και του $\text{Log}k_w$.

Ως σχετικές ιδιότητες, ο αριθμός δεσμών υδρογόνου ως δότη (HBD) και ως δέκτη (HBA), η συνολική πολική επιφάνεια επαφής (TPSA), ο συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού ($\log P$), το μοριακό βάρος (MW), καθώς επίσης η παράμετρος βασικότητας B και οξύτητας A σε δεσμούς υδρογόνου και οι παράγοντες S (διπολικότητα / πολικότητα), E (πλεονάζουσα μοριακή διαθλασιμότητα, εκφράζει στεरिकές ιδιότητες και αποτελεί μέτρο των δυνάμεων συνοχής Van der Waals) και V (χαρακτηριστικός όγκος

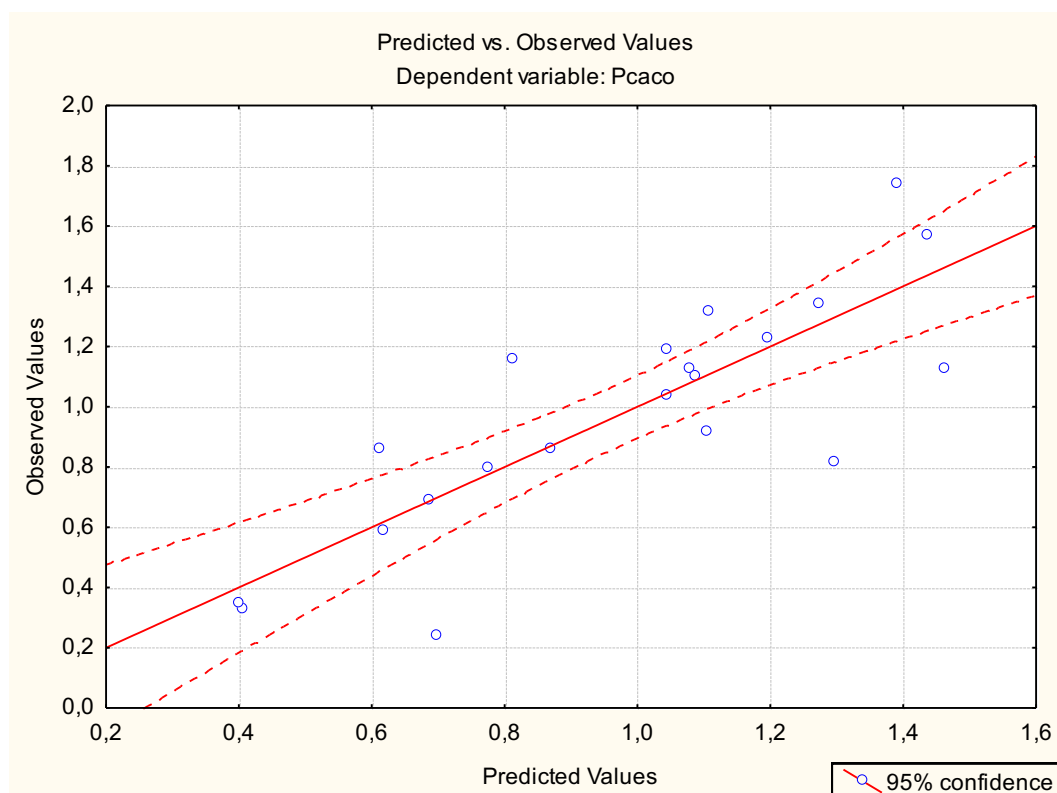
McGowan, μοριακός όγκος) από την γενική εξίσωση Abraham, εξετάστηκαν ως προς τη συσχέτιση τους με την παραπάνω εξίσωση. Για τον υπολογισμό φυσικοχημικών ιδιοτήτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **ADME Boxes v.3.0** (Advanced Pharma Algorithms, Inc., Toronto, Canada). Η εισαγωγή των δομών πραγματοποιήθηκε είτε σχεδιαστικά, είτε με την κωδικοποίηση SMILES. Οι τιμές των ιδιοτήτων αυτών για κάθε ένα από τα φλαβονοειδή που εξετάστηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3.

Ύστερα από Πολλαπλή Ανάλυση Παλινδρόμησης, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στην εξίσωση μεταξύ $P_{caco} - \log k_w$, βρέθηκε πως υπάρχει σημαντική βελτίωση της προσαρμογής των δεδομένων στο γραμμικό μοντέλο εάν ληφθεί υπόψιν ο παράγοντας $\log D_{7,4}$. Συγκεκριμένα, η εξίσωση διαμορφώθηκε ως εξής :

$$P_{caco} = 0,42(\pm 0,20)\log k_w + 0,09(\pm 0,03)\log D_{7,4} + 0,15(\pm 0,22) \quad (3.3)$$

$$(n = 21, R = 0,8236, R^2 = 0,6782, SE = 0,22)$$

Η εξίσωση 3.3 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του συντελεστή διαπερατότητας φλαβονοειδών για τα οποία δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα. Μία πρώτη εκτίμηση μέσω της εξίσωσης 3.3 θεωρείται σχετικά αξιόπιστη κάτι που αποτυπώνεται και στο γράφημα μεταξύ των πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας.



Σχήμα 3.34 : Συσχέτιση πειραματικών και αντίστοιχων προβλεπόμενων τιμών του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας.

Στον Πίνακα 3.2 αναφέρονται οι πειραματικές τιμές του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας, καθώς και οι αντίστοιχες εκτιμώμενες τιμές έτσι όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση 3.3. Η διαφορά μεταξύ πειραματικών και εκτιμώμενων τιμών Pcaco (residuals) κυμαίνεται κατά απόλυτη τιμή από 0,00 έως $|0,47|$, η οποία είναι σχετικά ικανοποιητική.

Πίνακας 3.2: Πειραματικές και εκτιμώμενες τιμές του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας και οι διαφορές αυτών.

Φλαβονοειδή	Observed Pcaco	Predicted Pcaco	Residuals
Apigenin	1,19	1,04	0,15
Baicalein	0,82	1,29	-0,47

Baicalin	0,33	0,40	-0,07
Chrysin	1,74	1,39	0,35
Daidzein	0,92	1,10	-0,18
Daidzin	0,35	0,40	-0,05
Eriodictyol	0,59	0,61	-0,02
Formononetin	1,23	1,20	0,03
Genistein	1,04	1,04	0,00
Hesperetin	1,16	0,81	0,35
Isoquercitrin	0,69	0,69	0,00
Kaempferide	1,13	1,46	-0,33
Luteolin	1,10	1,09	0,01
Morin	0,24	0,69	-0,45
Myricetin	0,80	0,78	0,02
Naringenin	0,86	0,87	-0,01
Quercetin	1,13	1,08	0,05
Quercitrin	0,86	0,61	0,25
Tamarixetin	1,34	1,27	0,07
Tangeretin	1,57	1,43	0,13

Wogonin	1,32	1,11	0,21
---------	------	------	------

3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΣΧΕΣΕΩΝ $P_{caco} / \text{Log}k_w$ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΤΑΤΙΚΩΝ ΦΑΣΕΩΝ

Στον πίνακα 3.4 περιλαμβάνονται όλες οι εξισώσεις $P_{caco} / \text{log}k_w$ που έχουν προκύψει με την χρήση διαφορετικών στατικών φάσεων. Οι εξισώσεις που έχουν προκύψει με την χρήση στατικών φάσεων φωσφολιπιδίων (IAM) παρουσιάζουν χαμηλότερα ποιοτικά στατιστικά στοιχεία σε σύγκριση με τις εξισώσεις που έχουν προκύψει με την χρήση στατικών φάσεων αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας (RP). Η εξίσωση που έχει προκύψει με την χρήση της στατικής φάσης Discovery RP-Amide C-16 υπερτερεί, παρουσιάζοντας υψηλότερα ποιοτικά στατιστικά στοιχεία σε σύγκριση με τις εξισώσεις των υπόλοιπων δύο στατικών φάσεων αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας.

Πίνακας 3.4 Εξισώσεις $P_{caco} / \text{log}k_w$ που έχουν προκύψει με την χρήση διαφορετικών στατικών φάσεων.

Στατική φάση	Εξίσωση $P_{caco} / \text{Log}k_w$	N	R	SE
IAM.DD	$P_{caco} = 0,48(\pm 0,13) \text{Log}k_w - 0,18(\pm 0,35)$	21	0,6095	0,32
IAM.MG	$P_{caco} = 0,53(\pm 0,14) \text{Log}k_w - 0,19(\pm 0,30)$	21	0,6698	0,30
LC-18-DB	$P_{caco} = 0,53(\pm 0,10) \text{Log}k_w - 0,26(\pm 0,24)$	21	0,7632	0,26
ODS C-18	$P_{caco} = 0,49(\pm 0,08) \text{Log}k_w - 0,29(\pm 0,22)$	21	0,8045	0,24
Discovery RP-Amide C-16	$P_{caco} = 0,54(\pm 0,06) \text{Log}k_w - 0,31(\pm 0,15)$	21	0,8941	0,18

Πίνακας 3.3 : Φυσικοχημικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, όπως προκύπτουν από το πρόγραμμα ADME Boxes v.3.0.

Flavonoid	MW ^a	TPSA ^a	HBD ^a	HBA ^a	HBT ^b	A ^a	B ^a	AB ^c	nOH	AlOH	PhOH	S	E	V	logP
Baicalein	270.24	86.99	3	5	8	1.02	0.99	2.01	3	0	3	2.23	2.24	1.8458	3.04 ^a
Baicalin	446.36	183.21	6	11	17	1.65	2.52	4.17	5	3	2	3.49	3.17	2.8918	0.62 ^a
Biochanin A	284.26	75.99	2	5	7	0.80	1.14	1.94	2	0	2	2.13	2.20	1.9867	3.07 ^a
Chrysin	254.24	66.76	2	4	6	0.80	0.92	1.72	2	0	2	2.04	2.13	1.7871	3.52 ^b
3,4- Dihydroxyflavone	254.24	66.76	2	4	6	0.77	1.20	1.97	2	0	2	2.21	2.15	1.7871	2.64 ^a
2,3- Dihydroxyflavone	254.24	66.76	2	4	6	0.77	1.20	1.97	2	1	1	2.21	2.15	1.7871	2.87 ^a
Daidzein	254.24	66.76	2	4	6	1.16	1.27	2.43	2	0	2	2.23	2.21	1.7871	2.91 ^b
Daidzin	416.38	145.91	5	9	14	1.49	2.80	4.29	4	3	1	3.29	3.19	2.8174	0.44 ^a
Eriodictyol	288.25	107.22	4	6	10	1.57	1.29	2.86	4	0	4	2.37	2.38	1.9475	2.02 ^b
Formononetin	268.26	55.76	1	4	5	0.66	1.21	1.87	1	0	1	2.12	2.04	1.9280	2.58 ^b
Galangin	270.24	86.99	3	5	8	1.11	1.21	2.32	3	1	2	2.25	2.31	1.8458	2.85 ^a
Genistein	270.24	86.99	3	5	8	1.30	1.20	2.50	3	0	3	2.25	2.36	1.8458	2.57 ^a
Genistin	432.38	166.14	6	10	16	1.63	2.73	4.36	5	3	2	3.31	3.34	2.8761	0.45 ^a

Hesperetin	302.28	96.22	3	6	9	1.07	1.23	2.30	3	0	3	2.25	2.22	2.0884	2.60 ^b
Isoliquiritigenin	256.25	77.76	3	4	7	1.30	1.02	2.32	3	0	3	2.13	2.11	1.8957	2.96 ^a
Isorhamnetin	316.26	116.45	4	7	11	1.38	1.57	2.95	4	1	3	2.53	2.52	2.1041	2.16 ^a
Isoquercitrin	464.38	206.60	8	12	20	2.57	3.16	5.73	7	3	4	3.70	3.67	2.9935	-0.46 ^a
Kaempferide	300.26	96.22	3	6	9	1.11	1.43	2.54	3	1	2	2.35	2.38	2.0454	2.82 ^a
Kaempferol	286.24	107.22	4	6	10	1.61	1.49	3.10	4	1	3	2.46	2.54	1.9045	2.45 ^a
Luteolin	286.24	107.22	4	6	10	1.57	1.34	2.91	4	0	4	2.42	2.50	1.9045	2.53 ^b
Morin	302.24	127.45	5	7	12	2.11	1.71	3.82	5	1	4	2.66	2.75	1.9632	1.54 ^b
Myricetin	318.23	147.68	6	8	14	2.27	1.78	4.05	6	1	5	2.82	2.85	2.0219	1.63 ^a
Myricitrin	464.38	206.60	8	12	20	2.68	2.99	5.67	8	3	5	3.64	3.61	2.9935	0.12 ^a
Naringenin	272.25	86.99	3	5	8	1.30	1.14	2.44	3	0	3	2.19	2.23	1.8888	2.52 ^b
Naringin	580.53	225.06	8	14	22	2.10	3.86	5.96	7	5	2	4.09	3.97	3.8907	-0.44 ^b
Quercetin	302.24	127.45	5	7	12	1.88	1.63	3.51	5	1	4	2.64	2.68	1.9632	2.06 ^b
Quercitrin	448.38	186.37	7	11	18	2.30	2.84	5.14	7	3	4	3.46	3.45	2.9348	0.43 ^a
Rutin	610.52	265.52	10	16	26	3.02	4.32	7.34	10	6	4	4.55	4.41	3.9651	-0.86 ^a
Sylibin	482.44	155.14	5	10	15	1.39	2.58	3.97	5	2	3	3.57	3.57	3.2451	2.06 ^a

Tamarixetin	316.26	116.45	4	7	11	1.38	1.57	2.95	4	1	3	2.53	2.52	2.1041	2.18 ^a
Tangeretin	372.37	72.45	0	7	7	0.00	1.75	1.75	0	0	0	3.16	2.06	2.6677	2.87 ^a
Vitexin	432.38	177.14	7	10	17	2.31	2.76	5.07	6	3	3	3.38	3.52	2.8761	-0.09 ^a
Wogonin	284.26	75.99	2	5	7	0.57	0.99	1.56	2	0	2	2.13	2.11	1.9867	2.80 ^a

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

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

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι χρωματογραφικοί δείκτες $\log k_w$ 29 φλαβονοειδών με τη χρήση αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε κορεσμένο σε οκτανόλη ρυθμιστικό διάλυμα MOPS pH 7,4 ως υδατική συνιστώσα και μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η endcapped στήλη αντιστρόφου φάσεως Supelcosil LC-18-DB. Διαπιστώθηκε παρόμοιος μηχανισμός έκλουσης για το σύνολο των φλαβονοειδών με μικρές αποκλίσεις. Καταγράφηκε μέτρια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας P_{aco} για 21 φλαβονοειδή για τα οποία υπήρχαν βιβλιογραφικά δεδομένα. Με την εισαγωγή του όρου $\log D_{7,4}$ βελτιώθηκε σημαντικά η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών δεικτών $\log k_w$ και του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας. Η εξίσωση που προέκυψε μεταξύ του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας P_{aco} και των παραμέτρων $\log k_w$ και $\log D_{7,4}$ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας φλαβονοειδών αναλόγων για τα οποία δεν υπάρχουν πειραματικές τιμές P_{aco} στην βιβλιογραφία. Οι εξισώσεις $P_{\text{aco}}/\log k_w$ που προέκυψαν με την στήλη Supercosil LC-18-DB παρουσίασαν ελαφρώς χειρότερα στατιστικά στοιχεία σε σύγκριση με τις αντίστοιχες εξισώσεις της στήλης Supercosil Discovery RP Amide C-16 (polar embedded) και της στήλης Hypersil ODS C-18 (endcapped).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47.
2. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J.* 2013;2013:1–16.
3. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002 Nov;96(2–3):67–202.
4. Samanta A, Das G, Das SK. ROLES OF FLAVONOIDS IN PLANTS. 2011;6(1):25.
5. Takahashi A, Ohnishi T. The Significance of the Study about the Biological Effects of Solar Ultraviolet Radiation using the Exposed Facility on the International Space Station. *Biol Sci Space.* 2004;18(4):255–60.
6. Cook NC, Samman S. Flavonoids---Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. :11.
7. Middleton E. Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function. In: Manthey JA, Buslig BS, editors. *Flavonoids in the Living System* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1998 [cited 2019 Sep 11]. p. 175–82. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-5335-9_13
8. Mukherjee N, Kumar AP, Ghosh R. DNA Methylation and Flavonoids in Genitourinary Cancers. *Curr Pharmacol Rep.* 2015 Apr;1(2):112–20.
9. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci.* 2018 Jan;13(1):12–23.
10. Ahmad A, Kaleem M, Ahmed Z, Shafiq H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Res Int.* 2015 Nov;77:221–35.
11. Corradini E, Foglia P, Giansanti P, Gubbio R, Samperi R, Laganà A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat Prod Res.* 2011 Mar;25(5):469–95.
12. Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys.* 2018 May;646:107–12.
13. Egert S, Rimbach G. Which Sources of Flavonoids: Complex Diets or Dietary Supplements? *Adv Nutr.* 2011 Jan 1;2(1):8–14.
14. Haytowitz, D.B., Bhagwat, S., Harnly, J., Holden, J.M., Gebhardt, S.E. Sources of Flavonoids in the U.S. Diet Using USDA’s Updated Database on the Flavonoid Content of Selected Foods. In USDA, Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient Data Laboratory and Food Composition Laboratory, Beltsville, MD 20705;

15. Chabane MN, Ahmad AA, Peluso J, Muller CD, Ubeaud-Séquier G. Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol.* 2009 Nov;61(11):1473–83.
16. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996 Jan;20(7):933–56.
17. Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* 2001 Jun 1;126(2):485–93.
18. Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J.* 2007 Oct;2(10):1214–34.
19. Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem.* 2014 Sep;84:206–39.
20. Wei Jiang, Juan-juan Yang, Lei Cao, Xue Xiao, Xiao-lian Shi, Yong-xiao Cao. Modifications of the Method for Calculating Absolute Drug Bioavailability. *J Pharm Pharm Sci.* 2016 May 23;19(2):181–7.
21. Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med.* 2004 Apr;36(7):827–8.
22. Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr.* 2010 Oct;104(S3):S48–66.
23. Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, et al. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-L-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.* 1998;5.
24. Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000 Feb 25;468(2–3):166–70.
25. Cassidy A, Minihane A-M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr.* 2017 Jan;105(1):10–22.
26. Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res.* 2010 Aug;165(6):496–504.
27. Verma AK, Pratap R. Chemistry of biologically important flavones. *Tetrahedron.* 2012 Oct;68(41):8523–38.
28. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflamm Allergy - Drug Targets.* 2009 Jul 1;8(3):229–35.

29. Siasos G, Tousoulis D, Tsigkou V, Kokkou E, Oikonomou E, Vavuranakis M, et al. Flavonoids in Atherosclerosis: An Overview of Their Mechanisms of Action. *Curr Med Chem*. 2013 May 1;20(21):2641–60.
30. Low YW (Ivan), Blasco F, Vachaspati P. Optimised method to estimate octanol water distribution coefficient (logD) in a high throughput format. *Eur J Pharm Sci*. 2016 Sep;92:110–6.
31. Tsopeles F, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2017 Sep 2;12(9):885–96.
32. Andrés A, Rosés M, Ràfols C, Bosch E, Espinosa S, Segarra V, et al. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur J Pharm Sci*. 2015 Aug;76:181–91.
33. Giaginis C, Tsopeles F, Tsantili-Kakoulidou A. The Impact of Lipophilicity in Drug Discovery: Rapid Measurements by Means of Reversed-Phase HPLC. In: Mavromoustakos T, Kellici TF, editors. *Rational Drug Design* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [cited 2019 Nov 8]. p. 217–28. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8630-9_12
34. Lipophilicity and Solvation of Anionic Drugs. :7.
35. Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2007 Oct;31(1):79–96.
36. Altomare C, Tsai R-S, Tayar NE, Testa B, Carotti A, Cellamare S, et al. Determination of Lipophilicity and Hydrogen-bond Donor Acidity of Bioactive Sulphonyl-containing Compounds by Reversed-phase HPLC and Centrifugal Partition Chromatography and their Application to Structure-activity Relations. *J Pharm Pharmacol*. 1991 Mar;43(3):191–7.
37. Tsai R-S, Lisa G, Carrupt P-A, Testa B. Centrifugal Partition Chromatography for Lipophilicity Measurements. In: Pliška V, Testa B, van de Waterbeemd H, editors. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008 [cited 2019 Nov 25]. p. 89–107. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527614998.ch6>
38. John G. Dorsey, Morteza G. Khaledi. Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography: Implications for biological partitioning processes. *J Chromatogr A*. 1993;656(1–2):485–99.
39. Giaginis C, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs. *Anal Chim Acta*. 2006 Jul;573–574:311–8.
40. Ghasemi J, Saaidpour S. QSRR Prediction of the Chromatographic Retention Behavior of Painkiller Drugs. *J Chromatogr Sci*. 2009 Feb 1;47(2):156–63.

41. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. 1989;96(3):14.
42. Tian X-J, Yang X-W, Yang X, Wang K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *Int J Pharm.* 2009 Feb;367(1–2):58–64.
43. Ungell A-LB. Caco-2 replace or refine? *Drug Discov Today Technol.* 2004 Dec;1(4):423–30.
44. Artursson P, 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.* 1991 Mar;175(3):880–5.
45. Allen R, Hilgers, Robert A, Conradi, Philip S, Burton. Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharm Res.* 1990 Sep;7(9):902–10.
46. Hellinger É, Bakk ML, Pócza P, Tihanyi K, Vastag M. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *Eur J Pharm Sci.* 2010 Sep;41(1):96–106.
47. Artursson P. Epithelial Transport Of Drugs In Cell Culture. I: A Model For Studying The Passive Diffusion Of Drugs Over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci.* 1990 Jun;79(6):476–82.
48. Wu S-J, Robinson JR. Transport of human growth hormone across Caco-2 cells with novel delivery agents: evidence for P-glycoprotein involvement. *J Controlled Release.* 1999 Nov;62(1–2):171–7.
49. Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm.* 1996 Jan;127(1):103–7.
50. Gonzales GB. In vitro bioavailability and cellular bioactivity studies of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts: questions, considerations and future perspectives. *Proc Nutr Soc.* 2017 Aug;76(3):175–81.
51. Χατζηιωάννου Θεμιστοκλής Π, Κουπάρης Μιχαήλ Α. *Ενόργανη ανάλυση.* 2014. 588 p.
52. Lloyd R, Snyder, Joseph J, Kirkland, Joseph L, Glajch. *Practical HPLC Method Development.* 2nd Edition. 1997. 800 p.
53. Wellings DA. *A practical handbook of preparative HPLC.* Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2006. 180 p.
54. Gerber F, Krummen M, Potgeter H, Roth A, Siffirin C, Spoenlin C. Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *J Chromatogr A.* 2004 May;1036(2):127–33.

55. Ettre LS. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). *Pure Appl Chem*. 1993 Jan 1;65(4):819–72.
56. Pidgeon C, Venkataram UV. Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal Biochem*. 1989;176(1):36–47.
57. Tache F, Naşcu-Briciu RD, Sârbu C, Micăle F, Medvedovici A. Estimation of the lipophilic character of flavonoids from the retention behavior in reversed phase liquid chromatography on different stationary phases: A comparative study. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 Jan;57:82–93.
58. Al-Fartusie F. Engineering and Characterisation of Novel Protein Covalent Linkages in Horseradish Peroxidase (HRP): Effect on structure and function. :237.
59. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacterium Species. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct 1;14(4):704–26.
60. Eksborg S. Reversed-phase liquid chromatography of adriamycin and daunorubicin and their hydroxyl metabolites adriamycinol and daunorubicinol. 1978 Feb 11; *J Chromatogr*.(149):225–32.
61. Paesen J, Claeys P, Roets E, Hoogmartens J. Evaluation of silanol-deactivated silica-based reversed phases for liquid chromatography of erythromycin. *J Chromatogr A*. 1993 Feb;630(1–2):117–22.
62. Lombardo F, Shalaeva MY, Tupper KA, Gao F. ElogD oct : A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. 2. Basic and Neutral Compounds. *J Med Chem*. 2001 Jul;44(15):2490–7.
63. Carrupt PA, Testa B, Bechalany A, El Tayar N, Descas P, Perrissoud D. Morphine 6-glucuronide and morphine 3-glucuronide as molecular chameleons with unexpected lipophilicity. *J Med Chem*. 1991 Apr;34(4):1272–5.
64. El Tayar N, Tsantili-Kakoulidou A, Roethlisberger T, Testa B, Gal J. Different partitioning behaviour of sulphonyl-containing compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography and octanol-water systems. *J Chromatogr A*. 1988 Jan;439(2):237–44.
65. Cimpan G, Irimie F, Gocan S, Claessens HA. 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 Biomed Sci App*. 1998 Sep;714(2):247–61.
66. Minick DJ, Frenz JH, Patrick MA, Brent DA. A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Med Chem*. 1988 Oct;31(10):1923–33.
67. Tate PA, Dorsey JG. Column selection for liquid chromatographic estimation of the k_w' hydrophobicity parameter. *J Chromatogr A*. 2004;1042(1–2):37–48.