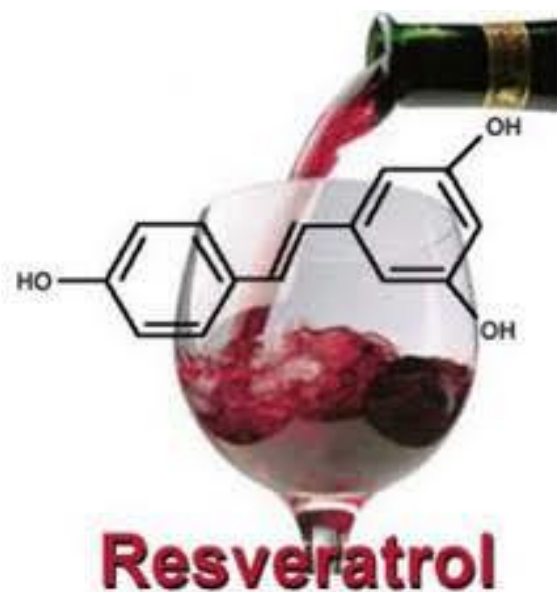


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ
ΟΥΣΙΑ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΞΕΝΑ ΚΡΑΣΙΑ**

ΛΟΪΖΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Άρτεμις Ντονά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τοξικολογίας

ΑΘΗΝΑ 2020

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΞΕΝΑ ΚΡΑΣΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ποικιλίες ελληνικών κρασιών ερυθρών, λευκών και ροζέ με σκοπό τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς τους στην αντιοξειδωτική ουσία ρεσβερατρόλη. Επιλέχθηκαν κρασιά αρκετών ποικιλιών έχοντας ως στόχο να παρατηρηθεί εάν υπάρχει διαφορά στην περιεκτικότητα της υπό μελέτης ουσίας καθώς η διαφορετική παρασκευή του κάθε οίνου, θεωρητικά τουλάχιστον, επηρεάζει τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης σε αυτόν. Ο λόγος που αποφασίστηκε η μελέτη της ρεσβερατρόλης σχετίζεται με τις ευεργετικές επιδράσεις που έχει η εν λόγω ουσία και συγκεκριμένα η *trans*-ρεσβερατρόλη για τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως αντικαρκινική, αντιγηραντική και αντιοξειδωτική δράση που θα αναλυθούν στη συνέχεια της εργασίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ρεσβερατρόλης στα δείγματα κρασιών πραγματοποιήθηκε μετά από ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθοδολογίας χρησιμοποιώντας την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS) μετά από κατάλληλη προκατεργασία των δειγμάτων με εκχύλιση στερεάς φάσης και παραγωγοποίηση του αναλύτη. Οι τιμές των συγκεντρώσεων που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τις τιμές κρασιών ελληνικής και γαλλικής προέλευσης που αναφέρονται σε βιβλιογραφικές πηγές και βρέθηκαν παρόμοιες ή μεγαλύτερες από τις προαναφερθείσες τιμές. Σε επόμενο στάδιο της εργασίας, θεωρήθηκε σκόπιμο να ακολουθήσει περαιτέρω έρευνα *in vivo* στον άνθρωπο, ώστε να εξεταστεί εάν είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί η αναλυτική μέθοδος της παρούσας εργασίας για τον προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης σε βιολογικά υγρά και συγκεκριμένα στο αίμα. Βάσει προκαταρκτικών αποτελεσμάτων, η ίδια μέθοδος που ανιχνεύει τη ρεσβερατρόλη στο κρασί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της και στο αίμα. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν ότι υπάρχουν σχετικές «απώλειες» της αρχικής λαμβανόμενης ουσίας μέσω της κατανάλωσης οίνου, όταν ακολούθησε ο υπολογισμός της ρεσβερατρόλης στον οργανισμό. Οι απώλειες αυτές δεν παρατηρούνται όταν ο προσδιορισμός των επιπέδων ρεσβερατρόλης πραγματοποιείται σε αίμα στο οποίο έχει εμβολιαστεί γνωστή συγκέντρωση ρεσβερατόλης. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν λειτουργίες του οργανισμού κατά τις οποίες η ρεσβερατρόλη δεσμεύεται με γλυκουρονικό ή/και θειϊκό οξύ με αποτέλεσμα να μην είναι ελεύθερη στο αίμα και να μην είναι εφικτός ο προσδιορισμός της. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να προηγηθεί ένα στάδιο αποδέσμευσης, μετά από επώαση με τα

κατάλληλα ένζυμα, και παραλαβής της ελεύθερης μορφής, ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της και στη συνέχεια υπολογισμός της ολικής συγκέντρωσης ρεσβερατόλης η οποία προσλαμβάνεται από τον οργανισμό. Με τον τρόπο αυτό θα συσχετιστεί η συγκέντρωση αυτή με τις φαρμακολογικές ιδιότητες της *trans*-ρεσβερατρόλης στον άνθρωπο, δηλαδή τις ευεργετικές επιδράσεις στον οργανισμό.

Λέξεις-κλειδιά: *trans*-ρεσβερατρόλη, κρασί, βιολογικός ρόλος, GC-MS, αναλυτική μέθοδος.

DETERMINATION OF THE ANTIOXINANT RESVERATROL CONTENT IN GREEK WINES AND COMPARISON WITH THAT OF WINES OF FOREIGN ORIGIN

ABSTRACT

In the present study, we used varieties of red, rosé and white Greek wines in order to determine their content in the antioxidant resveratrol. Wines of several varieties have been selected with the aim to observe whether there is a difference in the content of the compound under study as the different preparation of each wine, at least theoretically, affects resveratrol levels. The reason why we selected resveratrol for studying is related to its beneficial effects, in particular those of the *trans*-resveratrol on the human body, such as anti-cancer, anti-aging and antioxidant activity that will be analyzed later in the study. The quantitative determination of resveratrol in wine samples was performed after development and optimization of analytical methodology using the technique of gas chromatography in combination with mass spectrometry (GC-MS) after appropriate pre-processing of the samples by solid phase extraction and derivatization. The values of the obtained concentrations were compared with resveratrol levels of wines of Greek and French origin that refer to bibliographic sources and were found similar or higher than the aforementioned levels. As a future perspective, further research will be performed *in vivo* (in humans) to examine whether the analytical method of the present work can be further used to determine resveratrol in biological fluids and specifically in blood. Based on some preliminary results, the above method that detects resveratrol in wine can be used to detect and quantify this substance in blood as well. However, it has been observed that there are relative "losses" of resveratrol obtained through the consumption of wine, when the calculation of resveratrol in the body followed. These losses are not observed when the determination of resveratrol levels is performed in blood in which a known resveratrol concentration has been spiked. This has led to the conclusion that there are functions of the body in which resveratrol binds to glucuronic and/or sulfuric acid so that it is not free in the blood and cannot be determined. For this reason, it is necessary to precede a stage of release, after incubation with appropriate enzymes, which yields the free form, so that it is possible to determine and then calculate the total concentration of resveratrol which is absorbed by the body. In this way, this concentration will be correlated with the pharmacological properties of *trans*-resveratrol in humans, i.e. the beneficial effects on the body.

Keywords: *trans-resveratrol*, wine, biological role, GC-MS, analytical method.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας καθ. Χαρά Σπηλιοπούλου που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε τη δυνατότητα να δουλέψω στο Εργαστήριο. Θα ήθελα να ακόμη ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής: τον Καθηγητή Τοξικολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του ΕΚΠΑ Σωτήριο Αθανασέλη που με την εμπειρία του και την καθοδήγησή του, υπήρξε αρωγός της επιτυχούς ολοκλήρωσης της παρούσας εργασίας, την Καθηγήτρια Τοξικολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του ΕΚΠΑ κυρία Μαρία Στεφανίδου που ήταν δίπλα μου να με συμβουλεύει σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και της παρουσίας μου στο εργαστήριο, και την επιβλέπουσά μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του ΕΚΠΑ κυρία Άρτεμι Ντονά. Η κ. Ντονά μου παρείχε διαρκή στήριξη και συμβουλές και ήταν δίπλα μου βοηθώντας στο σχεδιασμό και την υλοποίηση όλων των διαδικασιών και απαιτούμενων εργασιών για την πραγματοποίηση και περάτωση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας. Μου στάθηκε όχι μόνο σαν επιβλέπουσα της εργασίας αλλά και σε μερικές εξαιρετικά δύσκολες στιγμές με υπομονή και διαρκή στήριξη. Είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη όλων των καθηγητών και τις πολύτιμες συμβουλές και εμπειρίες που αποκόμισα όντας δίπλα τους.

Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας για τη βοήθειά τους σε όλη την πορεία των πειραμάτων. Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Επίκουρο Καθηγητή Δικαστικής Τοξικολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του ΕΚΠΑ κύριο Ιωάννη Παπουτσή, καθώς οι συμβουλές του ειδικά στο πειραματικό μέρος της εργασίας ήταν καθοριστικές για την επιτυχή ολοκλήρωσή της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στα μέλη ΔΕΠ του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αναπληρωτή Καθηγητή κο Προκόπη Μαγιάτη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Χαλαμπαλάκη Μαρία για την ευγενική χορηγία της πρότυπης ουσίας, ρεσβερατρόλης, και δείγματα οίνων διαφόρων ποικιλιών και προέλευσης με σκοπό την υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

Εκ βάθους καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την post doc Δρ. Μαρία Κατσέλου, η παρουσία της οποίας στο Εργαστήριο ήταν κομβικής σημασίας για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Η Μαρία ήταν μαζί μου σε κάθε βήμα με συμβουλές και βοήθεια τόσο σε όλα τα πειράματα, όσο και στην ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων, καθώς επίσης και σε θέματα και δυσκολίες που υπήρξαν εκτός της εργαστηριακής ζωής και με βοήθησε να βελτιωθώ και ως επιστήμονας και ως άνθρωπος.

Θα ήθελα κλείνοντας να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Βάσω, Σούλα και Αρετή, καθώς επίσης τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κωνσταντίνο και Νεκταρία, αλλά και την φοιτήτρια Ιωάννα. Όλοι μαζί δημιουργήσαμε ένα ωραίο κλίμα συνεργασίας στο εργαστήριο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
2. ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ.....	14
2.1. Ταξινόμηση-Γενικές παρατηρήσεις.....	14
2.2. Πολυφαινόλες και φυτοαλεξίνες.....	16
2.3. Βιολογικός ρόλος	20
2.3.1. Καρδιοπροστατευτική δράση	20
2.3.2. Αντιοξειδωτική δράση	26
2.3.3. Αντικαρκινική δράση	27
2.3.4. Αντιγηραντική δράση	32
3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΣΕ ΚΡΑΣΙ	41
3.1. Μέθοδοι.....	41
3.1.1. Αέρια χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	41
3.2. Παραγωγοποίηση με BSTFA.....	50
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	52
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	53
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
5.1 Μέθοδος.....	54
5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	55
5.3 Διαλύτες και αντιδραστήρια.....	56
5.4 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ρεσβερατρόλης και μεθακουαλόνης.....	56
5.5 Διαλύματα εργασίας για την παρασκευή προτύπων δειγμάτων κρασιού.....	57

5.6 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος.....	59
6. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
7. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ TRANS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΣΕ ΚΡΑΣΙ.....	62
Εισαγωγή.....	62
7.1 Εκλεκτικότητα.....	62
7.2 Ειδικότητα.....	63
7.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης.....	63
7.4 Γραμμικότητα.....	64
7.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	64
7.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα.....	65
7.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών.....	66
7.8 Απόλυτη ανάκτηση.....	67
7.9 Ανθεκτικότητα.....	67
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ TRANS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΣΕ ΚΡΑΣΙ.....	69
8.1 Εισαγωγή.....	69
8.2 Εκλεκτικότητα.....	69
8.3 Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	70
8.4 Γραμμικότητα.....	70
8.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης.....	71
8.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα.....	72
8.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών.....	73
8.8 Απόλυτη ανάκτηση.....	75
8.9 Ανθεκτικότητα.....	76

9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ TRANS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ-ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΡΑΣΙΟΥ.....77

10.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....81

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1. Συντακτικός τύπος της ρεσβερατρόλης 15

Σχήμα 2.2. Λιπιδική υπεροξειδωση 22

Σχήμα 2.3. Πορεία ανάπτυξης καρκινικού όγκου 28

Σχήμα 2.4. Η σύνθετη σχέση μεταξύ της AMPK και της SIRT1 στους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της ρεσβερατρόλης 38

Σχήμα 3.1. Συνδεσμολογία χρωματογραφικής-φασματοσκοπικής ανάλυσης GC-MS 43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Συνοπτική περιγραφή αντιπροσωπευτικών δημοσιευμένων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό ρεσβερατρόλης με τη χρήση GC-MS48

Πίνακας 2. Παρασκευή προτύπων κρασιών για τη βαθμονόμηση (calibration samples, Cal) και τον έλεγχο ποιότητας (quality control samples, QC).....58

Πίνακας 3. Απεικόνιση % της αναλογίας *trans-cis* ρεσβερατρόλης του μίγματος.....61

Πίνακας 4. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού ρεσβερατρόλης σε κρασί.....68

Πίνακας 5. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 3 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την *trans*-ρεσβερατρόλη στο κρασί, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων71

Πίνακας 6. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την *trans*-ρεσβερατρόλη σε κρασί.72

Πίνακας 7. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την *trans*-ρεσβερατρόλη σε κρασί.....74

Πίνακας 8. Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα και ορθότητα δια των ημερών (3 ημέρες) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.....75

Πίνακας 9. Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί.....75

Πίνακας 10. Μέτρηση επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης σε πραγματικά δείγματα διαφόρων τύπων κρασιού με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού της σε κρασί με GC-MS.....77

Πίνακας 11. Τιμές συγκέντρωσης *cis*- και *trans*- ρεσβερατρόλης σε οίνους ξένης προέλευσης.80

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *trans*-ρεσβερατρόλη (*trans*-3,4',5-τριυδροξυστυλβένιο) είναι μία πολυφαινόλη μικρού μοριακού βάρους της οποίας η δράση, που αφορά ένα ευρύ φάσμα πιθανών θεραπευτικών λειτουργιών, έχει μελετηθεί εντατικά κατά τα τελευταία είκοσι έτη. Η φυσική παρουσία της ρεσβερατρόλης σε μία ποικιλία φυτικών ειδών, ιδίως στην άμπελο, έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον όχι μόνον της επιστημονικής κοινότητας, αλλά και του κοινού στις δυνατότητες χρήσης της στη φαρμακευτική και στη διατροφή (Kulkarni και Canto, 2015).

Στον τομέα της ιαπωνικής και της κινεζικής παραδοσιακής ιατρικής εδώ και αιώνες παρασκευάζονται σκευάσματα πλούσια σε ρεσβερατρόλη με πρώτη ύλη τις ρίζες του φυτικού είδους *Polygonum cuspidatum*, τα οποία χρησιμοποιούνται ως φάρμακα σε παθήσεις του καρδιαγγειακού και του ήπατος (Zhang et al., 2013). Εξάλλου, επί πολλούς αιώνες τα στέμφυλα (τα στερεά υπολείμματα από το πάτημα των σταφυλιών και την αφαίρεση του μούστου) και ο κόκκινος οίνος αξιοποιούνταν για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών ασθενειών (Klatsky, 2003).

Για να καταστεί περισσότερο κατανοητή η σημασία της ρεσβερατρόλης στην επιστημονική κοινότητα και την κοινή γνώμη, θα πρέπει αρχικά να αναφερθεί η έννοια του «γαλλικού παραδόξου» (“French paradox”). Ο όρος αντιστοιχεί στη φαινομενική συμβατότητα μίας δίαιτας που είναι πλούσια σε λιπαρά με τη χαμηλή συχνότητα της στεφανιαίας νόσου σε έναν δεδομένο πληθυσμό. Το «γαλλικό παράδοξο» αποτέλεσε την αρχική ένδειξη των ευεργετικών δράσεων της ρεσβερατρόλης και αφορούσε στην παρατήρηση ότι πληθυσμοί που ενσωμάτωναν στη διατροφή τους κόκκινο οίνο εμφάνιζαν μειωμένη συχνότητα καρδιαγγειακών παθήσεων. Αν και ο περιορισμός του κινδύνου οφείλεται κατά βάση στην αιθανόλη, η οποία λειτουργεί ως αιμοστατικός παράγοντας σε μικρές ποσότητες, εντείνει την κυκλοφορία των λιπροπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας και παρεμποδίζει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν οι πολυφαινόλες που περιέχονται στον οίνο. Ο όρος «γαλλικό παράδοξο» καθιερώθηκε από τους ιατρούς Renaud και de Lorgeril το 1992, καθώς βάσει στατιστικών ερευνών διαπιστώθηκε ότι οι Γάλλοι, αν και κατανάλωναν

μεγαλύτερη ποσότητα κρέατος και άλλων λιπαρών τροφίμων ανά άτομο, παρουσίαζαν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικών επεισοδίων συγκριτικά με άλλους βορειοευρωπαϊκούς πληθυσμούς, (Renaud και de Lorgeril, 1992).

Στόχος της παρούσας εργασίας, πέραν της ανάδειξης του πιθανού πολυδιάστατου βιολογικού ρόλου της ρεσβερατρόλης (της αντιοξειδωτικής, αντιγηραντικής, καρδιοπροστατευτικής και αντικαρκινικής της δράσης) είναι και η ανάπτυξη μιας πειραματικής τεχνικής για τον προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης σε δείγματα κρασιού διαφορετικής προέλευσης και βιολογικά δείγματα αίματος με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Στους τελικούς στόχους της εργασίας περιλαμβάνεται η σύγκριση των επιπέδων της ρεσβερατρόλης στο αίμα που προκύπτουν από κατανάλωση ελληνικού οίνου σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που προκύπτουν έπειτα από κατανάλωση οίνων ξένης προέλευσης.

2. ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

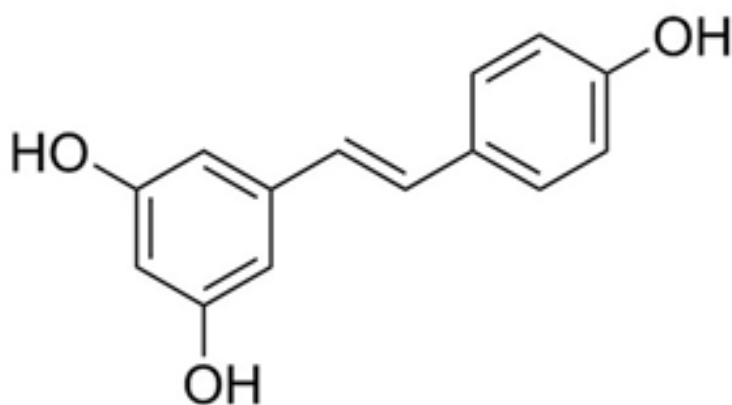
2.1. Ταξινόμηση-Γενικές παρατηρήσεις

Η ρεσβερατρόλη ($C_{14}H_{12}O_3$) αποτελεί ένα φυσικό συστατικό που ανήκει στην κατηγορία των φυτοαλεξινών και εμφανίζει τη βασική δομή των στυλβενίων (1,2-διφαινυλο-αιθυλενίων). Η δομή της, όπως αποτυπώνεται στο Σχήμα 2.1, είναι απλή, και το μόριό της περιέχει τρία υδροξύλια σε αντιδιαμετρικές θέσεις των δύο βενζολικών δακτυλίων. Γενικά, η ρεσβερατρόλη αποτελεί ρακεμικό μίγμα της *cis*- και *trans*- μορφής. Οι βενζολικοί δακτύλιοι ευρίσκονται σε *trans*-θέση της αιθυλενικής ομάδας η οποία τους ενώνει. Η *cis*-μορφή δεν έχει προσδιοριστεί σε εκχυλίσματα που προέρχονται από σταφύλια (Soleas et al., 1997).

Η ρεσβερατρόλη είναι ένωση που οξειδώνεται εύκολα, ενώ είναι δύσκολο να διατηρηθεί καθαρή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για αυτόν τον λόγο, οι κρύσταλλοι της ρεσβερατρόλης αποκτούν είτε μία υποκίτρινη είτε μία πιο σκούρα απόχρωση. Η ρεσβερατρόλη συναντάται συνήθως σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φλούδα των καρπών των σταφυλιών, ιδιαίτερα των κόκκινων ποικιλιών, στα φύλλα του ελάτου και του ευκαλύπτου, στα μούρα, στους ξηρούς καρπούς (π.χ. bilberries, blueberries, cranberries, mulberries), καθώς και σε άλλα 70 φυτικά προϊόντα σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Εν γένει, η ρεσβερατρόλη παράγεται από αρκετά περιορισμένο αριθμό φυτικών ειδών, 31 γενών και συγκεκριμένα των γενών *Vitis*, *Pinus* και *Arachis*. Η περιεκτικότητα της φλούδας των φρέσκων κόκκινων σταφυλιών σε ρεσβερατρόλη εκτιμάται ότι είναι από 50 έως 100 $\mu\text{g/g}$, στον κόκκινο δε οίνο οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ 1.5 και 3 mg/L . Ο λευκός οίνος περιέχει μικρότερες ποσότητες ρεσβερατρόλης, καθώς κατά τη λευκή οινοποίηση απομακρύνονται οι φλούδες των σταφυλιών, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συναντώνται σε σταφύλια που καλλιεργούνται σε ψυχρά κλίματα (Soleas et al., 1997).

Η ρεσβερατρόλη ανήκει στη γενική κατηγορία των πολυφαινολών, ουσιών με σημαντική αντιοξειδωτική δράση, και προστατεύει τα φυτά από μύκητες και έντομα, αλλά και από την οξείδωση και την αρνητική επίδραση των χαμηλών

θερμοκρασιών. Αξίζει δε να αναφερθεί ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη ανακαλύφθηκε πρόσφατα (μόλις το 1976 σε κλήματα του είδους *Vitis vinifera*, ήτοι στο γνωστό αμπέλι, και μόλις το 1992 στον οίνο) (Soleas et al., 1997; Stivala et al., 2001; Bianchini και Vainio, 2003). Η αντιοξειδωτική δράση προστατεύει τα φυτικά είδη από τις διάφορες σχηματιζόμενες οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες, αλλά και ενώσεις με έντονο οξειδωτικό χαρακτήρα, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι οποίες μέσω μεταβολικών αντιδράσεων επιφέρουν οξειδωτικές βλάβες σε ποικίλα κρίσιμα βιομόρια. Τέτοιες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στο σύνολο των αερόβιων οργανισμών, δηλαδή των οργανισμών που αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα με επαρκή περιεκτικότητα σε οξυγόνο, ήτοι σε οξειδωτικές ατμοσφαιρικές συνθήκες (Soleas et al., 1997).



Σχήμα 2.1. Συντακτικός τύπος της ρεσβερατρόλης (Pubchem, 2019).

Η ρεσβερατρόλη συνιστά πρόδρομο μόριο για την παραγωγή μίας ποικιλίας μορίων, όπως των μεθυλιωμένων της παραγώγων (πτεροστιλβενίων) ή των ολιγομερών της (ε- και α-βινιφερίνη). Ορισμένα από τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται από μυκητοστατική δράση που είναι υψηλότερη σε σχέση με το πρόδρομο μόριο.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν δημοσιευθεί εκατοντάδες άρθρα σχετικά με το βιολογικό ρόλο της ρεσβερατρόλης και τις πιθανές προστατευτικές επιδράσεις από την πρόσληψή της. Οι σημαντικότερες επιδράσεις που αναφέρονται είναι η αντιοξειδωτική, η αντι-αρτηριοσκληρυντική, η καρδιοπροστατευτική, η αντι-μεταλλαξιόγόνος, η νευροπροστατευτική, η

αντιγηραντική και η χημειοπροστατευτική της δράση στην αντιμετώπιση και την πρόληψη των καρκινικών όγκων. Η χρόνια πρόσληψη ή χορήγηση είναι πιθανόν να συνεπάγεται μικρή τοξικότητα, ιδιότητας που άλλωστε συνιστά βασικό χαρακτηριστικό των χημειοπροστατευτικών συστατικών, λαμβανομένων υπ' όψιν των γεγονότων ότι ότι εμπεριέχεται σε συνήθη τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1, η ρεσβερατρόλη κατέστη ευρύτατα γνωστή κατά τη διάρκεια ερευνών που αφορούσαν το «γαλλικό παράδοξο», καθώς υποστηρίχτηκε η συσχέτισή της με το εν λόγω φαινόμενο, λόγω της δυνατότητας τροποποίησης του μεταβολισμού των λιπιδίων, της αγγειοδιασταλτικής δραστηριότητάς της, καθώς και της παρεμπόδισης της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων. Επίσης, συνιστά ισχυρότερη αντιοξειδωτική ουσία σε σχέση με τη βιταμίνη Ε σε ό,τι αφορά την αποτροπή της οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (low-density lipoprotein, LDL) (Hung et al., 2000; Filip et al., 2002; Salehi et al., 2018; Terplova et al., 2018).

2.2. Πολυφαινόλες και φυτοαλεξίνες

Οι βιολογικές και οι φαρμακολογικές ιδιότητες των συστατικών της ομάδας των πολυφαινολών, δηλαδή των ενώσεων των οποίων το μόριο διαθέτει περισσότερα από ένα φαινύλια, έχουν αποτελέσει κατά τις τελευταίες δεκαετίες αντικείμενο εντατικής έρευνας. Σειρές ερευνών έχουν τεκμηριώσει σε σημαντικό βαθμό της βιοδραστικότητά τους που περιλαμβάνει την αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιθρομβωτική, αντιμεταλλαξιογόνο και αγγειοδιασταλτική τους δράση (Filip et al., 2002; Terplova et al., 2018). Έχει δε διαπιστωθεί ότι οι πολυφαινόλες διαθέτουν αξιόλογη δράση κατά των ιών *Influenza*, *Rhinovirus*, *Herpes simplex* και HIV, αλλά και λειτουργούν ως αναστολείς των κινασών καρκινικών κυτταρικών σειρών (Salehi et al., 2018).

Είναι μεγάλος ο αριθμός των επιδημιολογικών μελετών που αναφέρονται στον ρόλο των πολυφαινολών ως συστατικών που συμμετέχουν στην πρόληψη ποικίλων ειδών καρκίνου. Σε έρευνα των Dai et al. (2002), η οποία έλαβε χώρα στη Σαγκάη με συμμετοχή 250 γυναικών που έπασχαν από καρκίνο του μαστού, κατεγράφη ότι η συγκέντρωση λιγνανίων και ισοφλαβονοειδών (πολυφαινολικών

συστατικών) στα ούρα τους ήταν αρκετά μικρότερη, εν συγκρίσει με δείγμα υγιών γυναικών. Τα αποτελέσματα της έρευνας αποτελούν ένδειξη ότι μια διατροφή που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή ενδεχομένως να σχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Σε μεγάλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Φινλανδία, διήρκεσε 25 έτη και περιλάμβανε άτομα μεγάλου ηλικιακού εύρους (από 15 έως 90 ετών) διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της προσλαμβανόμενης ποσότητας πολυφαινολών μέσω της διατροφής συσχετιζόταν αρνητικά με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και άλλων όγκων κακοήθους χαρακτήρα, αφού στην ομάδα των ατόμων με δαιτολόγιο φτωχό σε πολυφαινολικά συστατικά αντιστοιχούσε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των κακοήθων όγκων. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη κερκετίνης από τον ανδρικό πληθυσμό συνεπαγόταν μείωση του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα, η δε αυξημένη πρόσληψη μυρισετίνης συσχετίστηκε με την πρόληψη εμφάνισης του καρκίνου του προστάτη (Knekt et al., 1997).

Οι παραπάνω έρευνες είναι ενδεικτικές και τα εν λόγω αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί και από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες, ενώ μάλιστα έχει βρεθεί ότι η πρόσληψη πολυφαινολικών συστατικών συνεπάγεται μείωση της πιθανότητας εμφάνισης του καρκίνου της στοματικής κοιλότητας, του καρκίνου του φάρυγγα και του καρκίνου του οισοφάγου κατά 70% (De Stefani et al., 1999, Le Marchand et al., 2000). Θα πρέπει, ωστόσο, να αναφερθεί ότι ορισμένες πολυφαινόλες, όπως η γενιστεΐνη και η δαϊδσεΐνη, είναι πιθανόν να εμφανίζουν δυσμενείς επιπτώσεις στους καρκινικούς όγκους των οποίων η ανάπτυξη είναι ορμονοεξαρτώμενη. Εξάλλου, η αντικαρκινική δράση των πολυφαινολών εξαρτάται, πέρα από το είδος του συστατικού, από το είδος του καρκίνου, το είδος των κυττάρων και την προσλαμβανόμενη δόση των πολυφαινολών (Zhou et al., 2016).

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών συστατικών φαίνεται ότι προκύπτει διαμέσου της άμεσης αλληλεπίδρασής τους με τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τον σχηματισμό των οποίων περιορίζει με χηλίωση στοιχείων μετάπτωσης ή/και με ρύθμιση της

δραστηριότητας των ενζύμων που είναι υπεύθυνα είτε για την παραγωγή είτε για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Επί παραδείγματι, έχει παρατηρηθεί ότι οι πολυφαινόλες αύξησαν σημαντικά τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε καλλιέργεια αορτικών κυττάρων αρουραίων και σε άλλα βιολογικά συστήματα (Tili και Michaille, 2016).

Οι φυτοαλεξίνες (κυρίως φλαβονοειδή και στυλβένια) παράγονται από τους φυτικούς οργανισμούς σε συνθήκες αβιοτικού ή βιοτικού στρες, όπως επί παραδείγματι κατά τη διάρκεια προσβολών από μικροοργανισμούς, εξαιτίας κακώσεων των ιστών που προκαλεί η έκθεση των οργανισμών στην υπεριώδη ακτινοβολία, σε συνθήκες ξηρασίας, υψηλής αλατότητας του εδάφους, υπερβολικά χαμηλών ή υψηλών θερμοκρασιών ή περιορισμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Οι παραπάνω καταστάσεις συνεπάγονται περιορισμένη διάχυση του διοξειδίου του άνθρακα το οποίο είναι αναγκαίο για την αποδοτική φωτοσύνθεση. Υπό αυτές τις συνθήκες παρατηρείται μία σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των αντιοξειδωτικών ενζύμων στους χλωροπλάστες η οποία αντισταθμίζεται από μία αύξηση της ποσότητας των φλαβονοειδών με αντιοξειδωτική δράση (Hatier και Gould, 2008). Η δράση των φλαβονοειδών και, πιο συγκεκριμένα, η άμεση αλληλεπίδρασή τους με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της ακεραιότητας των μεμβρανικών δομών υπό οξειδωτικές συνθήκες (Erlejman et al., 2004).

Η μορφή των στυλβενίων που δρουν ως φυτοαλεξίνες ποικίλλει αναφορικά με τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων που συνδέονται με τους αρωματικούς δακτυλίους, αλλά και σε σχέση με τον βαθμό στον οποίο οι παραπάνω ομάδες συνδέονται με μεθύλια, μεθοξυλομάδες, σάκχαρα και άλλα τμήματα μορίων, σε σχέση με τη στερεοχημική διαμόρφωσή τους και αναφορικά με την ικανότητα συμμετοχής τους σε αντιδράσεις παραγωγής πολυμερών (Soleas et al., 1997).

Οι φυτοαλεξίνες φλαβονοειδούς και στυλβενικής φύσεως διαδραματίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην πραγματοποίηση των αντιδράσεων φυτοανθεκτικότητας. Έχει παρατηρηθεί ότι η μόλυνση σιτηρών με παθογόνο μύκητα του γένους *Puccinia*

συνεπαγόταν την παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων γλυκοζιτών της απιγενίνης και της λουτεολίνης (φυτοαλεξινών φλαβονοειδούς φύσης). Επιπροσθέτως, παρατήρηθηκε ότι το περιεχόμενο σικάλεως σε γλυκοζίτες φλαβονοειδών αυξήθηκε κατά περίπου 50% στα αρχικά στάδια της μόλυνσης των φυτών με σπόρους *Puccinia graminis*, ενώ παρατηρήθηκε ο *de novo* σχηματισμός φυτοαλεξινών φλαβονοειδούς φύσης σε φυτά που είχαν μολυνθεί με *Septoria nodorum*. Οι εν λόγω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή των φυτοαλεξινών στην ειδική ανοσοαπόκριση φυτικών ειδών κατά την ανάπτυξη μυκητογόνου παθολογίας (Volynets, 2010).

Επίσης, διάφορες φυτοαλεξίνες φλαβονοειδούς φύσης δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφής. Συσώρευση των φλαβονοειδών στους πυρήνες κυττάρων έχει παρατηρηθεί σε διάφορα φυτικά είδη (*Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Picea abies*, *Taxus baccata* κ.ά.). Έχει υποτεθεί ότι οι παραπάνω ενώσεις μπορούν άμεσα ή έμμεσα να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που αποκωδικοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς της φυτοορμόνης αυξίνης (Naoumkina και Dixon, 2008).

Άλλες έρευνες έχουν εστιάσει στη βιολογική δράση των φυτοαλεξινών φλαβονοειδούς και στιλβενικής φύσης σε θηλαστικά. Στο ήπαρ των θηλαστικών, τα φαινορικά συστατικά υφίστανται μία σειρά μετατροπών, συμπεριλαμβανομένης της μεθυλίωσης, της σουλφούρωσης και της γλυκουρονίδωσης, με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους σε συστατικά μικρότερου μοριακού βάρους. Το φυτό *Ampelopsis grossedentata* («τσάι moyeam»), του οποίου η κύρια βιολογικώς δραστική ουσία είναι η διυδρομυρικετίνη, μία φλαβονοειδής φυτοαλεξίνη, χρησιμοποιήθηκε επί αιώνες στην κινεζική ιατρική για την καταπολέμηση της υπέρτασης, του κρουολογήματος, του πυρετού, της χρόνιας αρθρίτιδας και άλλων παθήσεων. Οι Liang και συν. (2014) παρατήρησαν ότι ως αντιοξειδωτικό συστατικό η διυδρομυρικετίνη προκάλεσε αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και περιορισμό της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η προστατευτική δράση της διυδρομυρικετίνης στα επιθηλιακά κύτταρα έναντι του οξειδωτικού στρες που οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου, καθώς και αναστολή της παραγωγής των ROS (Hou et al., 2015). Η

βιολογική δράση της άλλης σημαντικής (και ίσως σημαντικότερης) φυτοαλεξίνης, της ρεσβερατρόλης θα αναλυθεί στο επόμενο Υποκεφάλαιο της εργασίας.

Ως μηχανισμοί της *in vitro* και *in vivo* δράσης των φλαβονοειδών και στυλβενικών φυτοαλεξινών έχουν προταθεί οι ακόλουθοι (Terlona et al., 2018):

1. Λειτουργία των φυτοαλεξινών ως αντιοξειδωτικών και αντι/προοξειδωτικών σε κυτταρικά συστήματα με μεταβολή των επιπέδων των ROS διά μέσου ενζυματικών και μη ενζυματικών οδών.
2. Λειτουργία των φυτοαλεξινών ως ρυθμιστών της μεταγραφής.
3. Συμμετοχή των φυτοαλεξινών στα μονοπάτια σηματοδότησης των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών.

2.3. Βιολογικός ρόλος

2.3.1. Καρδιοπροστατευτική δράση

Η καρδιοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης έχει παρατηρηθεί σε αρουραίους με διαβήτη. Η ρεσβερατρόλη θεωρείται ότι συμβάλλει στη διατήρηση των λειτουργικών ικανοτήτων καρδιακών βλαστοκυττάρων και προγονικών κυττάρων, καθώς και ώριμων καρδιακών κυττάρων. Επιπλέον, βελτιώνει το καρδιακό περιβάλλον διά της υποχώρησης της φλεγμονώδους κατάστασης, αλλά και μειώνει την ανεπιθύμητη κολπική αναδιάταξη των διαβητικών καρδιακών συστημάτων, οδηγώντας σε ανάκαμψη της κολπικής λειτουργίας, σύμφωνα με τους Delucchi και συν. (2012).

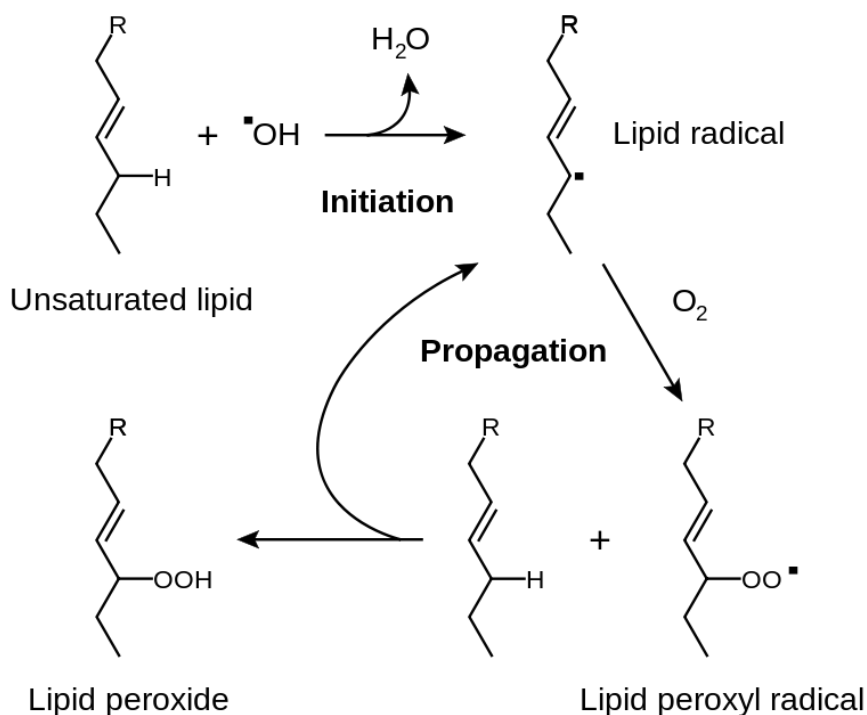
Έχει καταγραφεί, επίσης, η θετική επίδραση της ρεσβερατρόλης στην καρδιακή ανεπάρκεια διά μέσου της βελτίωσης της λειτουργίας του αριστερού κόλπου και του περιορισμού της καρδιακής υπερτροφίας, της συσταλτικής δυσλειτουργίας και αναδιάταξης, της ιδιοπαθούς ινώσεως και των επιπέδων του B-τύπου νατριουρητικού πεπτιδίου (BNP) του πλάσματος (Riba et al., 2017).

Οι πιθανοί μοριακοί μηχανισμοί της καρδιοπροστατευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης περιλαμβάνουν την παρεμπόδιση της δράσης των μορίων προ-υπερτροφικής σηματοδότησης, τη βελτίωση της διαχείρισης των ιόντων ασβεστίου

του μυοκαρδίου, τη φωσφορυλίωση των μονοπατιών προστατευτικής (pro-survival) σηματοδότησης (Akt-1, GSK-3β) και σηματοδότησης συνθηκών «στρες» (MKP-1), καθώς και τον περιορισμό του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής (δραστηριότητα των iNOS και της κυκλοοξυγενάσης-2 και σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου) (Riba et al., 2017). Οι Yan και συν. (2018) πρότειναν ότι η ρεσβερατρόλη δρα εμποδίζοντας την έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου, καθώς και την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης, αλλά και καταπολεμώντας την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p38 σε αρουραίους που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου το οποίο σχετίζεται με τον διαβήτη. Επιπρόσθετα, η χορήγηση ρεσβερατρόλης στους αρουραίους συνεπαγόταν μειωμένα επίπεδα γλυκόζης του αίματος, μειωμένο σωματικό βάρος, μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, μειωμένο καρδιακό ρυθμό και μειωμένο λόγο επιπέδων ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST) προς τα επίπεδα αλανινικής τρανσαμινάσης (ALT), ενώ παράλληλα τα επίπεδα της ολικής ισουλίνης του πλάσματος ήσαν αυξημένα. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Bishayee και συν. (2010), η ρεσβερατρόλη δύναται να περιορίσει σημαντικά την παραγόμενη ποσότητα των παραγόντων που ευνοούν την ανάπτυξη φλεγμονής και της μαλοναλδεΐδης, η οποία συνιστά δείκτη οξειδωτικού στρες. Ως εκ τούτου, θεωρείται ότι η πρόσληψη ρεσβερατρόλης είναι δυνατόν να βελτιώσει τη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος με περιορισμό της βλάβης που προκαλείται από ισχαιμία-επαναιμάτωση και της αθηροσκλήρωσης. Από τα παραπάνω, συνάγεται ότι η καρδιοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης έχει συνδεθεί με ποικίλους μοριακούς στόχους και ότι είναι πιθανόν η χορήγησή της να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καινοτόμος θεραπεία για την αθηρομάτωση, το μεταβολικό σύνδρομο, την ισχαιμία-επαναιμάτωση και την καρδιακή ανεπάρκεια (Salehi et al., 2018).

Οι Carrizzo και συν. (2013) αποδίδουν την καρδιοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της. Υπογραμμίζουν την πιθανή της αλληλεπίδρασή της με την ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου και, ως εκ τούτου, τη συσχέτισή της με την

ενεργοποίηση της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου, αναφέροντας, επίσης, και την ικανότητά της να «παγιδεύει» τις δραστικές μορφές οξυγόνου και να αποτρέπει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Σχήμα 2.2), αναστέλλοντας έτσι την καταστροφή των κυττάρων. Η εντατικοποίηση της σύνθεσης μονοξειδίου του άνθρακα υπό την επίδραση της ρεσβερατρόλης αποτελεί ένδειξη των ενδοθηλιοπροστατευτικών (της χαλαρωτικής επίδρασης και της προστασίας των αγγειακών τοιχωμάτων) ιδιοτήτων της ρεσβερατρόλης.



Σχήμα 2.2. Λιπιδική υπεροξείδωση (Mader, 2010).

Οι Hattori και συν. (2002) εστίασαν στον ρόλο της ρεσβερατρόλης στην αποτροπή των διαταραχών που σχετίζονται με τον ρυθμό επαναιμάτωσης, διαπιστώνοντας τη δυνατότητα περιορισμού της θνησιμότητας εξαιτίας της μυοκαρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, η πρόσληψη ρεσβερατρόλης συνεπαγόταν μείωση του αριθμού και της χρονικής διάρκειας της κολπικής ταχυκαρδίας και της κολπικής μαρμαρυγής, ταυτόχρονα με την αύξηση της ποσότητας του παραγόμενου μονοξειδίου του αζώτου και με τη

μείωση της περιεκτικότητας του αίματος του καρωτιδικού κόλπου σε γαλακτική δεϋδρογονάση.

Σύμφωνα με τους Diaz και συν. (2016), η ρεσβερατρόλη χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των παθήσεων που σχετίζονται με τη θρόμβωση των αγγείων, καθώς θεωρείται ότι χαρακτηρίζεται από αντι-συγκολλητική δράση. Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, η συγκεκριμένη δράση εκδηλώνεται διά μέσου της αναστολής του σχηματισμού και της επακόλουθης οξειδωτικής απενεργοποίησης της περιοχής της SHP-2 (φωσφατάσης τυροσίνης 2).

Επιπλέον, αναφέρθηκαν ενδείξεις σχετικά με την άμεση προστασία που παρέχει η ρεσβερατρόλη στα μυοκαρδιακά κύτταρα οργανισμών με διαβητική καρδιομυοπάθεια. Η ρεσβερατρόλη μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση που επάγεται από τη γλυκόζη διά του περιορισμού της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου, σχηματιζόμενων από την οξειδάση του NADPH, και διά της ενδογενούς αντιοξειδωτικής προστασίας. Οι προστατευτικές επιδράσεις της ρεσβερατρόλης συσχετίστηκαν με τη λειτουργία της AMP-κινάσης. Μία ενδελεχής περιγραφή της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στην πρόληψη διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων παρουσιάζεται στη βιβλιογραφική ανασκόπηση του Bonnefont-Rousselot (2016), όπου αναλύονται οι αντίστοιχοι πιθανοί μηχανισμοί πρόληψης έναντι της αθηροσκλήρωσης, της υπέρτασης, του εγκεφαλικού επεισοδίου, του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της καρδιακής ανεπάρκειας και συγκρίνονται τα αποτελέσματα προ-κλινικών ερευνών με τα αντίστοιχα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών.

Οι Vang και συν. (2011) υπογραμμίζουν ότι το κοινό λαμβάνει συμπληρώματα διατροφής πλούσια σε ρεσβερατρόλη χωρίς να υφίστανται επαρκή επιστημονικά δεδομένα που να τεκμηριώνουν τις θετικές επιδράσεις στους ανθρώπινους οργανισμούς. Οι ίδιοι ερευνητές έθεσαν τα ακόλουθα ερευνητικά δεδομένα κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης βιβλιογραφικής ανασκόπησης σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων:

1. Μπορεί η ρεσβερατρόλη να χορηγηθεί ως παράγοντας αποτροπής ή θεραπείας ασθενειών σε ανθρώπους;

2. Έχουν παρατηρηθεί ανεπιθύμητες ενέργειες από τη λήψη ρεσβερατρόλης στον άνθρωπο;
3. Ποια είναι η συνιστώμενη δόση ρεσβερατρόλης;
4. Ποια δεδομένα έχουν καταγραφεί που συνηγορούν υπέρ μιας θετικής επίδρασης σε άλλους οργανισμούς οι οποίοι έχουν μελετηθεί κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης σχετικών πειραμάτων;
5. Ποιοι μηχανισμοί δράσης της ρεσβερατρόλης έχουν στοιχειοθετηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό;

Από την επισκόπηση αυτή προκύπτει ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικά ευρήματα που να τεκμηριώνουν τη λήψη ρεσβερατρόλης σε δόση πέραν αυτής που μπορεί να προσληφθεί από τις συνήθεις διατροφικές πηγές. Πειραματικά δεδομένα από δοκιμές σε ζώα φαίνεται να συνηγορούν υπέρ της δυνατότητας της ρεσβερατρόλης να αποτρέψει την εμφάνιση όχι μόνον καρδιαγγειακών νοσημάτων, αλλά και την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνων, στεφανιαίας νόσου και διαβήτη. Επίσης, οι ερευνητές καταλήγουν στο ότι κανένας μηχανισμός δράσης της ρεσβερατρόλης δεν έχει στοιχειοθετηθεί επαρκώς (Vang et al., 2011).

Υπέρ της θεώρησης των Vang και συν. (2011) και εκφράζοντας ίσως μία ακόμη πιο συντηρητική θέση, οι Sahebkar και συν. (2015) πραγματοποίησαν πρόσφατα μία συστηματική επισκόπηση και μετα-ανάλυση των πιο πρόσφατων άρθρων όπου κατεγράφησαν τα αποτελέσματα τυχαιοποιημένων δοκιμών ελέγχου, τα οποία αξίζει να παρατεθούν αναλυτικά παρακάτω καθώς προέρχονται από σχετικά πρόσφατα δημοσιευμένες (2010-2014) κλινικές δοκιμές. Οι Sahebkar και συν. (2015) διαπίστωσαν ότι δεν υπήρχαν επαρκή τεκμήρια από κλινικές δοκιμές που να στοιχειοθετούν την καρδιοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης και, συγκεκριμένα, την αρνητική συσχέτιση της προσλαμβανόμενης δόσης της ρεσβερατρόλης με τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) στο πλάσμα, καθώς και με άλλους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ή επιδείνωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η CRP περιέχεται στο αίμα και η συγκέντρωσή της αυξάνεται με ταχύ ρυθμό έπειτα από εκδήλωση φλεγμονής, για αυτόν τον λόγο και χαρακτηρίζεται ως πρωτεΐνη «οξείας φάσης». Διάφορες έρευνες

έχουν δείξει ότι αυξημένες συγκεντρώσεις της CRP σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης υπέρτασης και καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πέραν των επιπέδων της CRP στο πλάσμα, ως δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της χοληστερόλης λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL-Cholesterol ή LDL-C), της γλυκόζης και της χοληστερόλης λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (High-Density Lipoprotein-Cholesterol ή HDL-C), αλλά και η συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ και ΔΑΠ, αντιστοίχως).

Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης των Sahebkar και συν. (2015) έδειξαν ότι η χορήγηση συμπληρωματικών (επιπρόσθετων) ποσοτήτων ρεσβερατρόλης δεν συνεπαγόταν μεταβολή των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα (σταθμισμένη μέση διαφορά [weighed-mean difference ή WMD]: -0.144 mg/L, 95% CI (confidence interval ή διάστημα εμπιστοσύνης): -0.968-0.680, $P=0.731$), καθώς και των επιπέδων της LDL-C (WMD: -0.31 mg/dL, 95% CI: -9.57-8.95, $P=0.948$, των τριγλυκεριδίων (WMD: 2.67 mg/dL, 95% CI: -28.34-33.67, $P=0.866$) και της γλυκόζης (WMD: 1.28 mg/dL, 95% CI: -5.28-7.84, $P=0.703$). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης συνεπαγόταν μία μικρή μείωση των επιπέδων της HDL-C (WMD: -4.18 mg/dL, 95% CI: -6.54 έως -1.82, $P=0.001$). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της χορήγησης ρεσβερατρόλης στη συστολική πίεση (WMD: 0.82 mm Hg, 95% CI: -8.86-10.50, $P=0.868$), αλλά και τη διαστολική πίεση (WMD: 1.72 mm Hg, 95% CI: -6.29-9.73, $P=0.674$). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν εκείνα της μετα-ανάλυσης των Liu και συν. (2015) τα οποία αφορούσαν την επίδραση της ρεσβερατρόλης στην πίεση του αίματος στη βάση της επεξεργασίας και ανάλυσης σχετικών τυχαιοποιημένων δοκιμών ελέγχου. Οι Sahebkar και συν. (2015) αναφέρουν ότι μία πιθανή αιτία για την αποτύπωση αυτής της εικόνας αντιστοιχεί στο ότι τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης στο εύρος των μικρών δόσεων μπορεί να μην επαρκούν για την αποτύπωση ενός θετικού αποτελέσματος, καθώς αυτά διαφοροποιούνται σε σχέση με τις θετικές δοκιμές σε ζωικούς οργανισμούς όπως αρουραίους. Υποθέτουν,

ακόμη, ότι το «γαλλικό παράδοξο» μπορεί να ανάγεται στη συνολική ποσότητα των πολυφαινολών και όχι αποκλειστικά της ρεσβερατρόλης.

2.3.2. Αντιοξειδωτική δράση

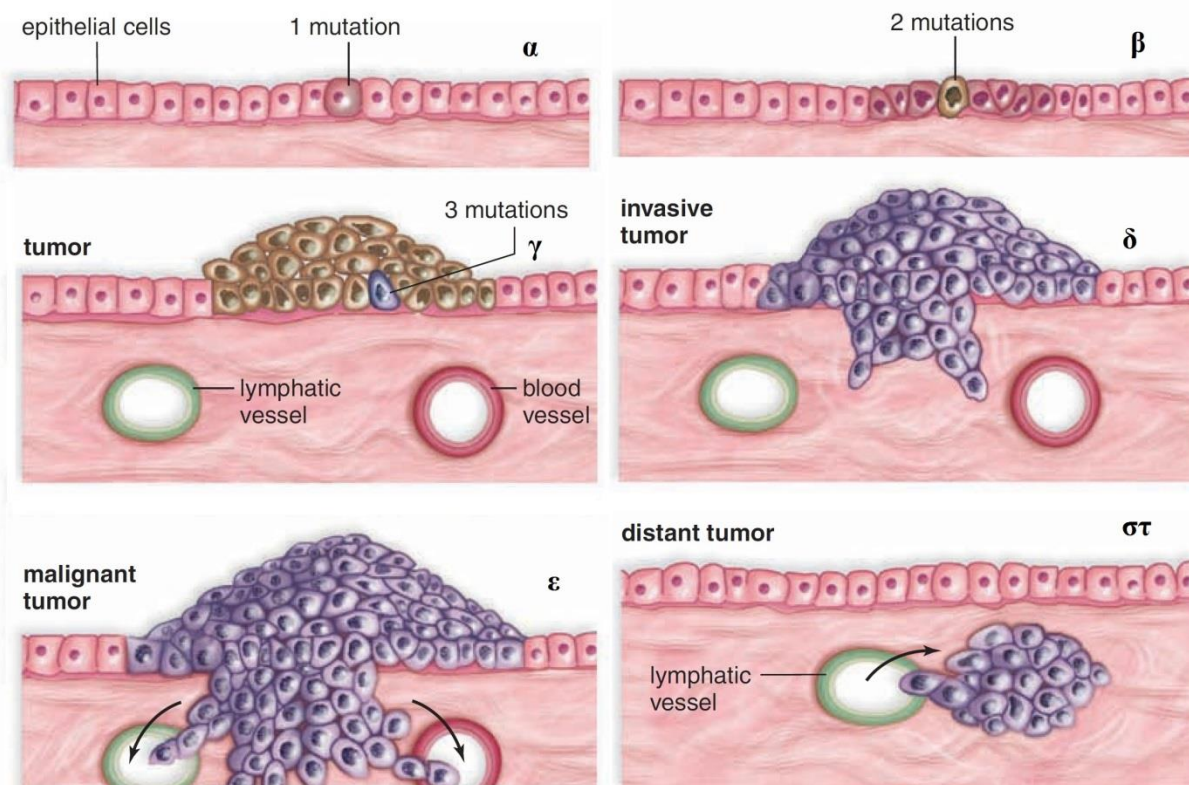
Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης είναι ίσως εκείνες που έχουν περιγραφεί εκτενέστερα έως τώρα. Οι διάφοροι μηχανισμοί που υπεισέρχονται στην αντιοξειδωτική της δράση σχετίζονται με τη δομή της, όπως για παράδειγμα με τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίων. Πιο συγκεκριμένα, η εν λόγω δράση σχετίζεται με την ικανότητά της να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και να συμμετέχει στη δημιουργία χηλικών συμπλόκων με ιόντα μετάλλου. Οι Iuga και συν. (2012) έδειξαν ότι η υδροξυλομάδα της θέσης 4' δεν είναι το μόνο στοιχείο της δομής της ρεσβερατρόλης που είναι υπεύθυνο για την αντιοξειδωτική της δράση, αλλά και οι υδροξυλομάδες στις θέσεις 3' και 5' συμβάλλουν στην ενίσχυση αυτής. Μελέτη των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της ρεσβερατρόλης έναντι των ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου σε υδατικό περιβάλλον και με βάση υπολογιστικές μεθόδους έδειξε ότι η *trans*-ρεσβερατρόλη μπορεί να λειτουργήσει ως συστατικό εκκαθάρισης των ριζών υπεροξειδίου και πιθανόν των ριζών $\cdot\text{OOR}$. Η ρεσβερατρόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ελαχιστοποίηση ή την αποτροπή της λιπιδικής οξείδωσης σε φαρμακευτικά σκευάσματα, την επιβράδυνση της παραγωγής τοξικών προϊόντων οξείδωσης και τη διατήρηση της διατροφικής ποιότητας και την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής φαρμακευτικών σκευασμάτων. Έχει καταγραφεί ότι η προκατεργασία κυττάρων με ρεσβερατρόλη συνεπαγόταν την επιβίωση των κυττάρων και την προστασία τους έναντι του κυτταρικού θανάτου που σχετίζεται με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η ενίσχυση της κυτταρικής αντίστασης ενδεχομένως επιτυγχάνεται, τουλάχιστον εν μέρει, εξαιτίας της ικανότητας της ρεσβερατρόλης να δρα ως άμεσο αντιοξειδωτικό μέσο και, έμμεσα, διά μέσου της τροποποίησης πολλών αντιοξειδωτικών μονοπατιών των κυττάρων, με διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων (Salehi et al., 2018).

Θα πρέπει, ωστόσο, να τονιστεί η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρόλης, η οποία αντισταθμίζει ως ένα σημείο τις αντιοξειδωτικές της

ικανότητες. Έχουν επιχειρηθεί πολλές προσπάθειες για την παραγωγή παραγώγων ρεσβερατρόλης διά μέσου της εστεροποίησης, ούτως ώστε να αυξηθεί η λιποφιλικότητά της ρεσβερατρόλης και η αξιοποίησή της σε λιπαρά τρόφιμα και σε βιολογικά συστήματα. Έως το 2018 είχαν συντεθεί γύρω στα 12 διαφορετικά εστεροποιημένα ακυλο-χλωρίδια. Τα εν λόγω παράγωγα διαθέτουν την ικανότητα να αναστέλλουν την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) που προκαλείται από τα ιόντα χαλκού, καθώς και τη διάσπαση του DNA που προκαλείται από την επαφή του με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Τα παραπάνω αποτελέσματα, σύμφωνα με τους Salehi et al. (2018), υπογραμμίζουν τη δυνατότητα χρήσης των παραγώγων της ρεσβερατρόλης ως πιθανών αντιοξειδωτικών ουσιών σε τρόφιμα και σε βιολογικά συστήματα.

2.3.3. Αντικαρκινική δράση

Ενώ το στάδιο της έναρξης αφορά τη μετάλλαξη ενός κυττάρου που αρχίζει να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, η φάση της προαγωγής περιλαμβάνει τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων που αποτελούν πλέον έναν όγκο, ώστε να πολλαπλασιαστούν. Κατά τη διαίρεσή τους εμφανίζονται κύτταρα που έχουν υποστεί περισσότερες μεταλλάξεις. Η φάση μπορεί να διακοπεί, αν όχι να αντιστραφεί, αν διακοπεί και η έκθεση στην ένωση που προξενεί την προώθηση. Η πρόοδος ενός όγκου, εν τούτοις, θεωρείται αναντίστροφη και χαρακτηρίζεται από αυξανόμενη αστάθεια του γονιδιώματος και σταδιακή ανάπτυξη κακοήθειας και αυτόνομης ανάπτυξης των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ένα κύτταρο υφίσταται μια χαρακτηριστική μετάλλαξη που του επιτρέπει να έχει ένα εκλεκτικό πλεονέκτημα επί των άλλων που συναποτελούν τον καρκινικό όγκο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, μέχρις ότου αναπτυχθεί ένα κύτταρο με ικανότητα να επηρεάσει τους γύρω ιστούς με την παραγωγή μιας πρωτεΐνης. Ο όγκος εξελίσσεται σε κακοήθη όταν τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν τη δυνατότητα να εισβάλουν στα λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία. Από τη στιγμή που εισβάλουν σε αυτά τα συστήματα είναι πιθανή η έναρξη ενός νέου όγκου σε κάποιο απομακρυσμένο ιστό (μετάσταση) (Mader, 2010). Η πορεία ανάπτυξης ενός καρκινικού όγκου απεικονίζεται συνοπτικά στο Σχήμα 2.3.



Σχήμα 2.3. Πορεία ανάπτυξης καρκινικού όγκου (Mader, 2010).

Διάφορες έρευνες έχουν υποστηρίξει ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί έναντι της ανάπτυξης των καρκινικών όγκων και ότι αποτελεί μία από τις πιθανές υποψήφιες ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία και την πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου. Οι αντικαρκινικές της ιδιότητες έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες στις οποίες υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να αναστείλει όλα τα στάδια της καρκινογένεσης, ήτοι της έναρξης, της διάδοσης και της προόδου του καρκίνου. Από ποικίλες έρευνες έχουν προκύψει στοιχεία υπέρ των χημειοπροφυλακτικών ιδιοτήτων του συγκεκριμένου συστατικού, αλλά και υπέρ των χημειοθεραπευτικών του ιδιοτήτων, οι οποίες σχετίζονται με την αντιοξειδωτική, την αντιφλεγμονώδη και την αντιπολλαπλασιαστική της δράση (Van Ginkel et al., 2007).

Πράγματι, η ρεσβερατρόλη θεωρείται ότι στοχεύει συστατικά που συμμετέχουν στα μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, όπως σε ρυθμιστές της κυτταρικής επιβίωσης και της κυτταρικής απόπτωσης, συστατικά που δρουν ως

προ-φλεγμονώδεις παράγοντες και αναστολείς της αγγειογένεσης των όγκων και της μετάστασης αυτών διά μέσου της παρέμβασης στη δράση διαφόρων ομάδων παραγόντων μεταγραφής, μέσω αναρροϊκής ρύθμισης (upstream) κινασών και των συστατικών που ρυθμίζουν τα παραπάνω. Για παράδειγμα, οι Li και συν. (2018) έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη έχει αποπτωτική και αντιπολλαπλασιαστική επίδραση σε ανθρώπινο καρκίνωμα του τραχήλου διά μέσου της συρρίκνωσης των κυττάρων HeLa και της απόπτωσης διά μέσου της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και -9, της ανάντη ρύθμισης της έκφρασης της προ-αποπτωτικής συσχετιζόμενης με το διάχυτο από β-κύτταρα λέμφωμα (Bcl)-2-πρωτεΐνης X και της κατάντη ρύθμισης της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-2-υπερ-μεγέθη σε κύτταρα της γραμμής HeLa, καθώς και της αύξησης της έκφρασης της πρωτεΐνης p53, η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων και την προώθηση του κυτταρικού κύκλου.

Οι Cheng και συν. (2018) έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη εμφάνισε αντικαρκινική δράση σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα διά μέσου του περιορισμού της έκφρασης της NAF-1 και, πιο συγκεκριμένα, διά μέσου της ενεργοποίησης της σηματοδότησης του παράγοντα μεταγραφής Nrf2 και της προώθησης της συσσώρευσης κυτταρικών δραστικών μορφών οξυγόνου οι οποίες επιτέλεσαν την ενεργοποίηση της απόπτωσης και εμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό των παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων. Η ρεσβερατρόλη θεωρείται επίσης και ως αναστολέας της απακετυλάσης της ιστόνης ο οποίος εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστική δράση μέσω της ενεργοποίησης της διαδικασίας αναστολής του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης και της αυτοφαγίας, της αναστολής της αγγειογένεσης, της αύξησης της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου που προκαλούν οξειδωτικό στρες στα καρκινικά κύτταρα και του μιτωτικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων. Η παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 4' σε συνδυασμό με την *trans*-δομή της ρεσβερατρόλης είναι απολύτως απαραίτητα για την εκδήλωση της ικανότητας του συστατικού να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Ενζυμικές δοκιμές έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση της σύνθεσης DNA από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να προκαλείται διά μέσου της άμεσης αλληλεπίδρασης της ρεσβερατρόλης με τις DNA-πολυμεράσες. Οι Shukla και Singh (2011) ανέφεραν ότι η ρεσβερατρόλη εκδηλώνει τη χημειοθεραπευτική της δράση διά μέσου της απενεργοποίησης του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ που παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα και ελέγχει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Παρουσία του NF-κΒ τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται ανθεκτικά στην προσβολή τους από χημικές ουσίες αντικαρκινικής φύσεως, γεγονός που καθιστά εφικτό τον πολλαπλασιασμό τους. Η ρεσβερατρόλη παρεμποδίζει τη δράση του εν λόγω παράγοντα μεταγραφής, δίνοντας τη δυνατότητα στις χημειοθεραπευτικές ουσίες να δράσουν στα σημεία-στόχους. Η ρεσβερατρόλη περιορίζει επίσης την ακετυλίωση, τη φωσφορυλίωση και την πυρηνική μετακίνηση του NF-κΒ, ενώ αναστέλλει την έκφραση του iNOS, ενζύμου-κλειδιού στην ογκογένεση του παχέος εντέρου που σχετίζεται με τη δράση προ-φλεγμονωδών συστατικών και κυτοκινών. Επίσης, η ρεσβερατρόλη παρεμποδίζει τα μονοπάτια IGF-1R/Akt/Wnt και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53 με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του όγκου. Εν γένει, ωστόσο, οι Salehi και συν. (2018) διακρίνουν δύο είδη αντικαρκινικής δράσεως της ρεσβερατρόλης:

1. Αντιπολλαπλασιαστικές και προ-αποπτωτικές επιδράσεις που είναι καλά τεκμηριωμένες σε καρκινικές κυτταρικές γραμμές
2. Χημειοπροστατευτικές επιδράσεις που δεν έχουν επαρκώς τεκμηριωθεί και που σχετίζονται με την επίδραση της ρεσβερατρόλης στο στάδιο έναρξης των καρκινικών ογκογενέσεων.

Επιπροσθέτως, οι Sinha και συν. (2016) εστίασαν στη δυνατότητα αξιοποίησης της ρεσβερατρόλης στην αποτροπή και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, όπως επί παραδείγματι κατά τη διάρκεια συνδυαστικής θεραπείας. Έχει καταγραφεί ο πιθανός ρόλος της ρεσβερατρόλης ως ενώσεως που μπορεί να αναστρέφει την αντοχή των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία σε μία ποικιλία κυτταρικών συστημάτων *in vitro* καθιστώντας, όπως προαναφέρθηκε, τα καρκινικά κύτταρα περισσότερο ευαίσθητα στη φαρμακευτική δράση. Μία τέτοια περίπτωση

κατέγραψαν οι Cheng και συν. (2018) σε μελέτη τους που αφορούσε τη χημειοθεραπευτική δράση της ρεσβερατρόλης έναντι καρκινικών παγκρεατικών κυττάρων. Διάφορες έρευνες *in vitro* και σε ζωικούς οργανισμούς *in vivo* έχουν δείξει παρόμοια αποτελέσματα σε μία ποικιλία καρκινικών κυττάρων (προστάτη, πνευμόνων, κ.ά.), σύμφωνα με τους Aliyev και συν. (2012), Zulueta και συν. (2015) και με άλλες ερευνητικές ομάδες.

Επίσης, οι Shen και συν. (2017) διαπίστωσαν την αντικαρκινική δράση νανοσωματιδίων εφοδιασμένων με ρεσβερατρόλη (που οφειλόταν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του συστατικού, σύμφωνα με τους ερευνητές), ενώ οι Mitra και Dash (2018) ανέφεραν ότι η αντικαρκινική της δράση εκδηλώνεται ακόμη και στην περίπτωση που η ρεσβερατρόλη υιοθετείται ως επιπρόσθετο μέτρο, ήτοι σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία και τη θεραπεία με χρήση ακτινοβολίας.

Με βάση τα παραπάνω, οι Salehi και συν. (2018) κατέληξαν στο ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για τους ακόλουθους σκοπούς:

1. Ως εισαγωγική θεραπεία πριν την πραγματοποίηση χειρουργικής επέμβασης προς περιορισμό του μεγέθους του όγκου, εξαιτίας της πιθανής ικανότητάς της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και να προωθεί την απόπτωση.
2. Ως φάρμακο ανοσοενισχυτικής χημειοθεραπείας για την παρεμπόδιση της πρώιμης διάδοσης του όγκου και της μετάστασης έπειτα από την πραγματοποίηση της χειρουργικής επέμβασης.
3. Ως παράγοντας ευαισθητοποίησης των καρκινικών κυττάρων έναντι της θεραπείας με χρήση ακτινοβολίας ή της χημειοθεραπείας, σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως την καψαϊκίνη, την δοσεταξέλη, την δοξορουβικίνη, τη γεμισταβίνη και την τεμοζολομίδη, καθώς είναι πιθανόν να βελτιώνει την αντικαρκινική δράση των παραπάνω συστατικών.
4. Ως παράγοντας αποτροπής εμφάνισης καρκινωμάτων σε άτομα που εμφανίζουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκινικού όγκου.

5. Ως ραδιοπροστατευτικός παράγοντας προς περιορισμό των αρνητικών συνεπειών της ακτινοθεραπείας, συμπεριλαμβανομένων της ξηροστομίας (που σχετίζεται με την ακτινοθεραπεία) και της φλεγμονής των βλεννογόνων.

Για την ερμηνεία της πιθανής αντικαρκινικής δράσης της ρεσβερατρόλης έχει προταθεί από τους Jang και συν. (1997) ένας μηχανισμός με βάση τον οποίον η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τη δράση των κυκλοοξυγενασών. Οι τελευταίες καταλύουν τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προφλεγμονώδη συστατικά, όπως προσταλανδίνες, που δρουν ως κρίσιμοι αγγελιοφόροι δευτέρου βαθμού κατά την ανοσοαπόκριση και προωθούν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων. Οι Jang και συν. (1997) διενέργησαν μία μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα του φυτού *Cassia quinquangulata*, γνωστού για την ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση των κυκλοοξυγενασών. Οι ερευνητές προσδιόρισαν ότι το δραστικό συστατικό για την αναστολή της δράσης της κυκλοοξυγενάσης-1 (COX-1) ήταν η ρεσβερατρόλη, σε μέση συγκέντρωση της τάξης των 15 μM . Η ρεσβερατρόλη μπορούσε να αναστείλει και τη δράση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), αλλά σε δόσεις περίπου 50 φορές μεγαλύτερες. Οι Das και Das (2007) αναφέρουν ότι η αναστολή της δράσης των κυκλοοξυγενασών διά της παρέμβασης στις διαδικασίες μεταγραφής, δηλαδή όχι με άμεσο τρόπο (κατάντη ρύθμιση των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι Akt, MAPK και NF- κ B). Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη αναφέρεται ότι μπορεί να αναστείλει τη δράση των λιποοξυγενασών, η οποία επίσης περιλαμβάνεται στη σύνθεση των λευκοτριενίων, η οποία οδηγεί στην παραγωγή άλλων φλεγμονωδών και καρκινογενών σημάτων (Kulkarni και Canto, 2015).

2.3.4. Αντιγηραντική δράση

Η γήρανση του οργανισμού αποτελεί σύνθετο φαινόμενο, για το οποίο είναι υπεύθυνοι μια σειρά από παράγοντες, έμμεσα ή άμεσα, όπως η οξειδωση. Στην παρούσα υποενότητα με την έννοια «αντιγηραντική δράση» θα εννοηθεί και η καταπολέμηση των γενικότερων αρνητικών επιπτώσεων που συνδέονται με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της ηλικίας, όπως οι μεταβολές που εμφανίζουν

οι μεταβολικές λειτουργίες και η αυξημένη ευαισθησία και τρωτότητα του οργανισμού στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών και παθήσεων, καθώς και η αύξηση της διάρκειας ζωής που εμφανίζουν οι οργανισμοί.

Βασισμένοι στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες σιρτουίνες συνιστούν κρίσιμα ενδιάμεσα βιομόρια στην ευεργετική επίδραση του περιορισμού των θερμίδων στην αύξηση της διάρκειας ζωής και την αντιμετώπιση της υποβάθμισης των βιολογικών λειτουργιών των οργανισμών, οι Howitz και συν. (2003) χρησιμοποίησαν μία *in vitro* τεχνική διαλογής για την ταυτοποίηση των μορίων μικρού μοριακού βάρους που είναι πιθανόν να δρουν ως ενεργοποιητές της σιρτουίνης 1 (SIRT1). Η διαδικασία διαλογής προσδιόρισε ένα πλήθος πολυφαινολών ως πιθανούς ενεργοποιητές της SIRT1, με τη ρεσβερατρόλη να συνιστά έναν από τους πιο ισχυρούς. Ακολούθως, προέκυψαν ενδείξεις ότι η ρεσβερατρόλη μπορούσε να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των κατώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ζυμών, σκωλήκων και μυγών (Wood et al., 2004). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η πρόσληψη ρεσβερατρόλης από τους εν λόγω οργανισμούς θεωρήθηκε επαρκής για να συνδεθεί με τον περιορισμό των θερμίδων. Η χρόνια πρόσληψη ρεσβερατρόλης (400 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα) από μύες θεωρήθηκε ότι είχε δραματικές επιπτώσεις στη μεταβολική υγεία, καθώς μύες που λάμβαναν τροφή πλούσια σε λίπη αποδείχτηκε ότι προστατεύονταν σε μεγάλο βαθμό έναντι της πρόσληψης σωματικού βάρους και εμφάνιζαν μία σημαντική βελτίωση σε σχέση με τα επίπεδα διαταραγμένης γλυκόζης ολόκληρου του σώματός τους, καθώς και σε σχέση με τη λιπιδική ομοιόστασή τους. Τα μεταβολικά οφέλη της λήψης διατροφικών συμπληρωμάτων πλούσιων σε ρεσβερατρόλη ανέδειξε και η έρευνα των Baur και συν. (2006) οι οποίοι διερεύνησαν την επίδραση της χορήγησης περίπου 25 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα στη διάρκεια ζωής σε πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε διαιτολόγιο πλούσιο σε θερμίδες. Η λήψη της παραπάνω δόσης ρεσβερατρόλης από μύες ηλικίας ενός έτους βρέθηκε ότι προκαλούσε μεταβολές στο μεταγραφικό προφίλ των θεμελιωδών μεταβολικών ιστών παρόμοιες με εκείνες που προκαλεί ο περιορισμός των θερμίδων. Στους ηπατικούς και τους μυικούς ιστούς οι εν λόγω αλλαγές συσχετίστηκαν με τα προφίλ γονιδιακής

έκφρασης των ζώων που είναι νεότερα σε ηλικία. Σύμφωνα δε με τους Pearson και συν. (2008), η λήψη διατροφικών συμπληρωμάτων πλούσιων σε ρεσβερατρόλη περιορίζει την οστεοπόρωση, τον καταρράκτη, την αγγειακή δυσλειτουργία και τον ανεπαρκή συντονισμό των κινήσεων που σχετίζεται με την αυξημένη ηλικία. Ωστόσο, στα πειράματα των Pearson και συν. (2008) σε μύες με διαιτολόγιο χαμηλών λιπαρών δεν παρατηρήθηκε αύξηση της διάρκειας ζωής.

Στις έρευνες που υποστηρίζουν την αντιγηραντική επίδραση της ρεσβερατρόλης, αναδεικνύεται η πιθανή ικανότητα της τελευταίας να αυξάνει την κατανάλωση ενέργειας από τους οργανισμούς των μυών διά μέσου της προώθησης της μιτοχονδριακής αναπνοής και της οξείδωσης των λιπιδίων. Δεδομένου ότι η υποβάθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας έχει συσχετισθεί με την αντίσταση στην ινσουλίνη και με άλλες παθοφυσιολογικές δυσλειτουργίες που σχετίζονται με την αύξηση της ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, φαίνεται ότι η βελτίωση της μιτοχονδριακής λειτουργίας συνιστά έναν από τους βασικούς μηχανισμούς καταπολέμησης των συγκεκριμένων δυσλειτουργιών. Δρώντας ως μόριο ενεργοποίησης της SIRT1, η ρεσβερατρόλη ενεργοποιεί την απο-ακετυλίωση των διαφόρων μεταβολικών ρυθμιστών της μεταγραφής. Για παράδειγμα, ένας από τους γνωστούς στόχους της SIRT1 είναι ο παράγοντας μεταγραφής PGC-1α, ο οποίος λειτουργεί ως το μόριο οργάνωσης της μιτοχονδριακής βιογενέσεως. Ύστερα από την απο-ακετυλίωση που προκαλεί η SIRT1, η δραστικότητα του PGC-1α ως συν-ενεργοποιητή διαφόρων παραγόντων μεταγραφής και πυρηνικών υποδοχέων που ρυθμίζουν την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων επιτείνεται. Επιπλέον, η χορήγηση ρεσβερατρόλης έδειξε να οδηγεί σε μεγάλη αύξηση του μιτοχονδριακού περιεχομένου βασικών μεταβολικών ιστών, όπως των σκελετικών μυικών ιστών και των καφέ λιπωδών ιστών.

Σύμφωνα με τους Hubbard και συν. (2013), ενεργοποιητές της SIRT1 με μικρό μοριακό βάρος, όπως η ρεσβερατρόλη, μπορεί να δρουν ως άμεσοι υποστηρικτικοί αλλοστερικοί ενεργοποιητές. Σε αυτή την περίπτωση τα μόρια αυτά δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη SIRT1, αλλά προσδέονται σε ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος που λειτουργεί σε μόνιμη κατάσταση (steady-state). Οι ίδιοι

ερευνητές έδειξαν ότι τα αμινοξέα-στόχοι για την απο-ακετυλίωση που προκαλεί η SIRT1 μπορεί να χρειάζεται να εμφανίζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως το υδρόφοβο αμινοξύ στη θέση +1. Στη γραμμή αυτή, η έρευνα των Lakshminarasimhan και συν. (2013) έδειξε ότι η ρεσβερατρόλη προωθεί την απο-ακετυλίωση που διενεργεί η SIRT1 με έναν τρόπο ο οποίος εξαρτάται από το υπόστρωμα και σε αυτό συνέκλιναν αποτελέσματα που έδειχναν ακόμη και αναστολή της δράσης της SIRT1 παρουσία συγκεκριμένων υποστρωμάτων. Τα στοιχεία αυτά έδειχναν ότι η ρεσβερατρόλη δεν είναι ένας καθολικός ενεργοποιητής της SIRT1, αλλά πιθανόν επηρεάζουν την απο-ακετυλίωση μόνον εφόσον υφίστανται συγκεκριμένα υποστρώματα.

Εν τούτοις, ορισμένα ευρήματα έχουν αμφισβητήσει το ενδεχόμενο της ρεσβερατρόλης να δρα ως άμεσος ενεργοποιητής της SIRT1. Σε διάφορα εργαστήρια έχει αποδειχτεί ότι η ρεσβερατρόλη αποτυγχάνει να ενεργοποιήσει τη SIRT1 που περιέχει φυσικά πεπτίδια ή πρωτεϊνικά υποστρώματα πλήρους μήκους, ενώ ενεργοποιεί πράγματι τη SIRT1 παρουσία πεπτιδίων με φθορίζουσες ουσίες. Επιπλέον, υφίσταται μία ποικιλία αναντιστοιχιών μεταξύ της *in vivo* επίδρασης της χορήγησης ρεσβερατρόλης και των γενετικών μοντέλων αυξημένης λειτουργικότητας (“gain-of-function” models). Επί παραδείγματι, ενώ φαίνεται ότι η ρεσβερατρόλη προστατεύει έναντι της πρόσληψης σωματικού βάρους στο πλαίσιο ενός διαιτολογίου πλούσιου σε λίπη, οι διαγονιδιακοί (SIRT1) μύες προσλαμβάνουν βάρος κατά τρόπο παρόμοιο με τους μύες της ομάδας ελέγχου. Ομοίως, η πρόσληψη ρεσβερατρόλης, αλλά όχι η υπερ-έκφραση της SIRT1 ή ο περιορισμός των θερμίδων, οδηγεί σε μία δραματική αύξηση του μιτοχονδριακού περιεχομένου των σκελετικών μυικών ινών. Στην πραγματικότητα, ενώ τα περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ρεσβερατρόλη αυξάνει την γλυκόζη των σκελετικών μυικών ινών, η διαγένεση SIRT1 στον μυικό ιστό δεν επιδρά στη δράση της ινσουλίνης. Πιο συγκεκριμένα, οι θετικές συνέπειες της διαγένεσης SIRT1 στην καθολική ευαισθησία στην ινσουλίνη φαίνεται να ανάγονται σε συντριπτικό ποσοστό στην προστατευτική δράση κατά της ηπατικής μεταβολικής βλάβης. Αξίζει δε να αναφερθεί ότι η πρόσληψη ρεσβερατρόλης σχετίστηκε με βελτίωση της ομοιόστασης της γλυκόζης

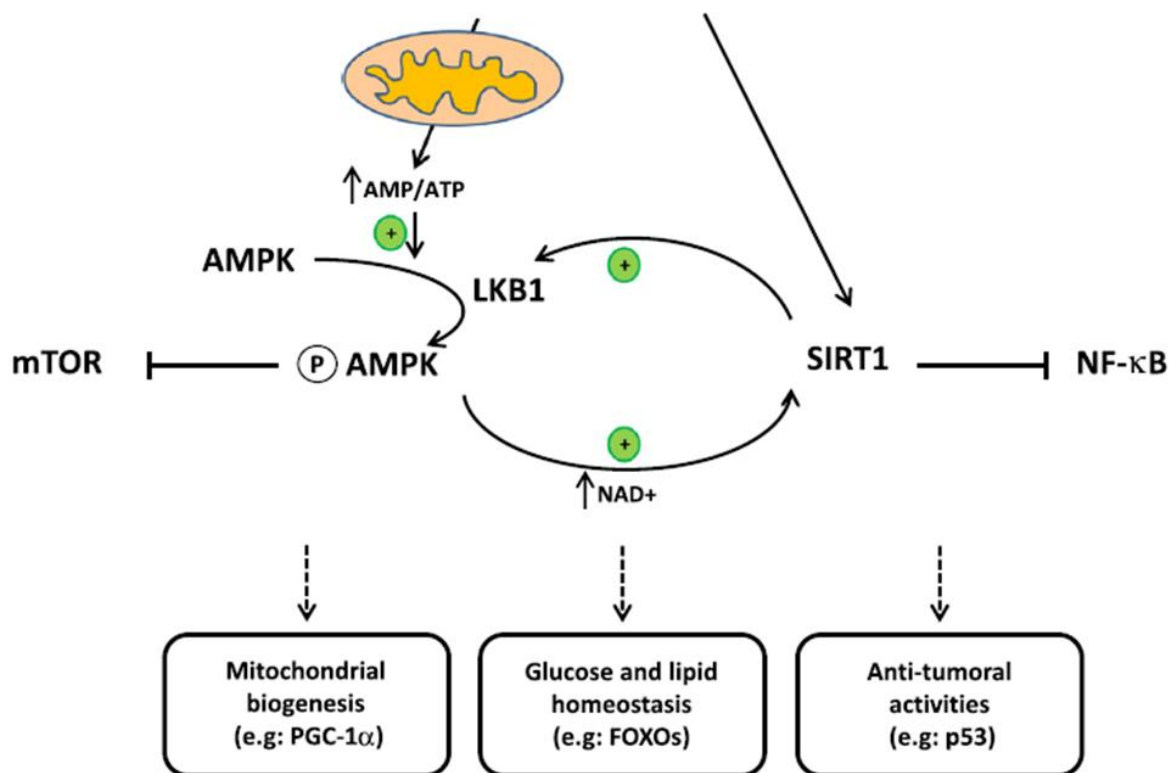
σε μύες με ανεπάρκεια SIRT1 που προσλάμβαναν τροφή πλούσια σε λίπη και, κατά συνέπεια, επιζητείται ο προδιορισμός επιπρόσθετων μηχανισμών που ερμηνεύουν την πιθανή αντιγηραντική δράση.

Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί αντιστοιχεί στον ρόλο της ρεσβερατρόλης στην ενεργοποίηση της AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMP-activated protein kinase, AMPK), ένζυμο που διαθέτει την ικανότητα ρύθμισης μεταβολισμού ολόκληρου του σώματος. Σε διάφορες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η πρόσληψη ρεσβερατρόλης συσχετίστηκε με ενεργοποίηση της AMPK εντός μερικών λεπτών στην πλειοψηφία των κυττάρων που διερευνήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων ηπατικών και καλλιεργούμενων σκελετικών μυικών κυττάρων και μάλιστα με μεγαλύτερη ταχύτητα σε σχέση με την ενεργοποίηση της SIRT1. Μύες που έλαβαν δόσεις ρεσβερατρόλης μεταξύ 25 και 400 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης της AMPK στο ήπαρ, τους σκελετικούς μυικούς ιστούς και τους λευκούς λιπώδεις ιστούς. Ο πιθανότερος μηχανισμός διαμέσου του οποίου η ρεσβερατρόλη μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση της AMPK αφορά, σύμφωνα με τους Gledhill και συν. (2007), την ικανότητα του εν λόγω συστατικού καθώς και παρόμοιων πολυφαινολών να προσδένονται άμεσα στο Σύμπλοκο V μιτοχονδριακή F1F0-ATPάση/ATP συνθάση, απενεργοποιώντας το και, κατά συνέπεια, δυσχεραίνοντας την παραγωγή ATP. Οι Kulkarni και Canto (2015) αναφέρθηκαν σε διάφορες πειραματικές έρευνες που φαίνεται να υποστηρίζουν ότι η μεταβολική επίδραση της ρεσβερατρόλης συναρτάται άμεσα με την ενεργοποίηση της AMPK. Για παράδειγμα, οι Hou και συν. (2008) παρατήρησαν ότι απαιτείτο η παρουσία της AMPK, ώστε η πρόσληψη ρεσβερατρόλης να οδηγήσει σε περιορισμό της λιπιδικής συσσώρευσης σε κύτταρα HepG2. Επιπλέον, οι Breen και συν. (2008) διαπίστωσαν ότι η πρόσληψη ρεσβερατρόλης επέφερε την προώθηση της μεταφοράς της σκελετικής μυικής γλυκόζης με μηχανισμό όπου συμμετείχε η AMPK. Επίσης, οι Um και συν. (2010) παρατήρησαν ότι η πρόσληψη ρεσβερατρόλης απαιτούσε την παρουσία AMPK, ώστε να προκαλέσει μεταβολικές βελτιώσεις στους οργανισμούς μυών, καθώς σε μύες με ανεπάρκεια AMPK η πρόσληψη ρεσβερατρόλης δεν

βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη, την αντοχή στη γλυκόζη, τη φυσική αντοχή και τη μιτοχονδριακή βιογένεση.

Βασισμένοι στις παραπάνω παρατηρήσεις οι Kulkarni και Canto (2015) υπέθεσαν ότι αντιγηραντική δράση της ρεσβερατρόλης μπορεί να ερμηνευθεί τόσο από τη δράση της AMPK όσο και από τη δράση της SIRT1 (Σχήμα 2.4). Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η δράση της AMPK είναι η κορύφωση της διαδικασίας. Η AMPK μεταφράζει τα μηνύματα στη SIRT1 η οποία επάγει τη μεταγραφική απόκριση των κυττάρων που στοχεύει στη βελτιστοποίηση της παραγωγής ενέργειας από συστατικά που δεν είναι υδατάνθρακες.

Σε κάθε περίπτωση, οι Kulkarni και Canto (2015) θεωρούν απίθανο ότι στην πιθανή αντιγηραντική δράση της ρεσβερατρόλης συμμετέχουν μόνον η AMPK και η SIRT1. Σύμφωνα μάλιστα με τους Park και συν. (2012) υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η άμεση αναστολή της δράσης των φωσφοδιεστερασών μπορεί να ευρίσκεται στο θεμέλιο ερμηνείας των ενδεχόμενων ευεργετικών μεταβολικών συνεπειών που σχετίζονται με την πρόσληψη ρεσβερατρόλης. Η άμεση αναστολή των φωσφοδιεστερασών (PDE) PDE1, 3 και 4 σε δόσεις (IC_{50}) μεταξύ 6 και 14 μM μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και φωσφορυλίωση της AMPK με μηχανισμό που εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου, αύξηση της διαθεσιμότητας του NAD^+ και, εν τέλει, σε αυξημένη δραστηριότητα της SIRT1. Απαιτείται, ωστόσο, καλύτερη τεκμηρίωση του παραπάνω μηχανισμού.



Σχήμα 2.4. Η σύνθετη σχέση μεταξύ της AMPK και της SIRT1 στους πιθανούς μηχανισμούς δράσης της ρεσβερατρόλης (Kulkarni και Canto, 2015).

Αρκετά δεδομένα έχουν συλλεχθεί τα οποία υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της ρεσβερατρόλης με την οικογένεια παραγόντων μεταγραφής του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ). Οι συγκεκριμένοι παράγοντες διατηρούνται εν γένει στο κυτταρόπλασμα διά μέσου της αλληλεπίδρασής τους με την ανασταλτική πρωτεΐνη ΙκΒ, που εμποδίζει τη μετατόπιση των NF-κΒ και του πυρήνα. Υπετέθη αρχικά ότι η ρεσβερατρόλη ενδέχεται να περιορίζει την παρουσία του NF-κΒ στον πυρήνα ή να εμπλέκεται στη σχετική μεταγραφική δραστηριότητα. Ο μηχανισμός που υπεισέρχεται στην παραπάνω αλληλεπίδραση παραμένει αδιευκρίνιστος.

Επίσης, δεδομένου ότι μία μέτρια αναστολή του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης μπορεί να αυξήσει τη διάρκεια ζωής πρακτικά σε όλους τους οργανισμούς οι οποίοι διερευνήθηκαν, οι Frojdo και συν. (2007) διατύπωσαν την υπόθεση ότι η αντιγηραντική δράση της ρεσβερατρόλης μπορεί να ερμηνευθεί

μέσω της απενεργοποίησης της σηματοδότησης της PI3K ανεξαρτήτως της παρουσίας της SIRT1. Τα αποτελέσματα της σχετικής έρευνας έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη στοχεύει στο σημείο πρόσδεσης της ATP με μη ομοιοπολικό τρόπο και σε δόσεις (IC_{50}) μεταξύ 25 και 50 μ M. Κατά συνέπεια, η ρεσβερατρόλη προκαλεί την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της Akt (πρωτεϊνικής κινάσης Β) μέσω διαφόρων ερεθισμάτων. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να ερμηνεύσει τις πολλαπλές μορφές των ευρημάτων που αντιστοιχούν στον περιορισμό της σηματοδότησης της Akt που έχει παρατηρηθεί σε διάφορες κυτταρικές ομάδες έπειτα από πρόσληψη ρεσβερατρόλης, γεγονός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη της χημειοπροφυλακτικής δράσης της ρεσβερατρόλης (Kulkarni και Canto, 2015).

Στους άλλους μηχανισμούς που έχουν υποτεθεί για την καταπολέμηση δυσμενών μεταβολικών παθήσεων, περιλαμβάνεται η παρέμβαση στη σηματοδότηση του στόχου ραπαμυκίνης των θηλαστικών (mammalian target of rapamycin, mTOR) ή/και στη σηματοδότηση των κινασών ενεργοποιούμενων από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinases, MAPK) (Kulkarni και Canto, 2015).

Σημαντικός τομέας που σχετίζεται με την αντιγηραντική δράση της ρεσβερατρόλης είναι η προστασία από νευροεκφυλιστικές ασθένειες οι οποίες συχνά σχετίζονται με την αύξηση της ηλικίας. Σύμφωνα με τους Sun και συν. (2010), η ρεσβερατρόλη μπορεί να προστατεύσει από τις ασθένειες Alzheimer, Huntington και Parkinson, από την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και από νευροεκφυλιστικές παθήσεις που ανάγονται στην κατανάλωση αλκοόλ. Σύμφωνα, λοιπόν, με τους Salehi και συν. (2018), η πρόσληψη ρεσβερατρόλης συνεπάγεται τη διευκόλυνση της νευροδιαβίβασης στους χολινεργικούς νευροδιαβιβαστές και την έκφραση του νευροτροφικού παράγοντα εγκεφαλικής προελεύσεως, ενώ προωθεί τον καθαρισμό από πεπτίδια του β-αμυλοειδούς και τη διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP), ενώ περιορίζει την απόπτωση των νευρώνων. Η μετα-ανάλυση των Farzaei και συν. (2018) έχει δείξει ότι η πρόσληψη ρεσβερατρόλης συνεπάγεται στατιστικά σημαντικά μειωμένο «Προφίλ Καταστάσεων Διάθεσης» (“Profile of Mood States”), συμπεριλαμβανομένης της

ενεργητικότητας και της κοπώσεως, αλλά δεν συνεπαγόταν κάποια στατιστικά σημαντική θετική επίδραση στη μνήμη και την αντιληπτική ικανότητα. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί η βελτίωση των κινητικών ικανοτήτων αρουραίων που προσλάμβαναν ρεσβερατρόλη και η απενεργοποίηση της νευροφλεγμονώδους αντίδρασης που ακολουθούσε την ενδοεγκεφαλική αιμορραγία η οποία εκδηλωνόταν στους συγκεκριμένους οργανισμούς (Singh et al., 2017).

Η σύγκριση της δράσης της ρεσβερατρόλης με τις συνέπειες του περιορισμού των θερμίδων κατεγράφη και σε μια πρόσφατη έρευνα των Li και συν. (2017) συγκριτικού χαρακτήρα που διενεργήθηκε τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Κύτταρα ανθρώπινου πνεύμονα υπέστησαν κατεργασία με 2,2-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο)-υδροχλωρίδιο (AAPH) με στόχο τη διαμόρφωση ενός προφίλ κυτταρικής γήρανσης, ενώ ως ζωικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε D-γαλακτόζη. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης και ο περιορισμός των θερμίδων συνεπάγονταν παρόμοια αντιγηραντική δράση ενδείξεις της οποίας ήταν η αναστολή της διαδικασίας γήρανσης και της απόπτωσης, καθώς και η αποκατάσταση της αντιληπτικής ικανότητας και των οξειδωτικών βλαβών. Επιπροσθέτως, τόσο η χορήγηση ρεσβερατρόλης όσο και ο περιορισμός των θερμίδων μπόρεσαν να ρυθμίσουν ανάντη τη δραστηριότητα της τελομεράσης, να αυξήσουν την παραγόμενη (εκφρασμένη) ποσότητα των SIRT1, Foxo3a, ενεργού ρυθμιστή της SIRT1 (AROS) και του Hu αντιγόνου R (HuR). Η χορήγηση ρεσβερατρόλης σε συγκεντρώσεις 10 μ M *in vitro* και σε 20 μ M *in vivo* συνεπαγόταν σχετικά ισχυρότερη αντιγηραντική δράση και σχετικά αυξημένα επίπεδα SIRT1 σε σχέση με τον περιορισμό των θερμίδων.

Η αντιγηραντική δράση της ρεσβερατρόλης έχει αποτελέσει αντικείμενο σχετικής μετα-ανάλυσης των Hector και συν. (2012) στην οποία περιελήφθησαν 19 δημοσιευμένα επιστημονικά άρθρα στα οποία διερευνήθηκαν οι αντιγηραντικές επιπτώσεις σε διάφορους οργανισμούς, αν και όχι ανθρώπινους (ζύμες, νηματώδη, μύες, μύγες και ψάρια). Το γενικό συμπέρασμα των ερευνητών ήταν ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης συνεπαγόταν την αύξηση της διάρκειας ζωής των υπό εξέταση ειδών, αλλά τα αποτελέσματα που αντιστοιχούσαν στους ανώτερους βιολογικά

οργανισμούς δεν χαρακτηρίζονταν από την ίδια αξιοπιστία με εκείνη των αποτελεσμάτων που προέκυψαν ύστερα από χορήγηση ρεσβερατρόλης στους κατώτερους βιολογικά οργανισμούς. Τα χρησιμοποιούμενα μοντέλα έδειξαν μία σημαντική διαφοροποίηση των κατώτερων σε βιολογική κλίμακα οργανισμών και των ανώτερων (μυγών και ψαριών) ως προς την αντιγηραντική επίδραση της ρεσβερατρόλης, κάτι που δεν έχει παρατηρηθεί ότι ισχύει στην περίπτωση του περιορισμού των θερμίδων. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντιγηραντική δράση των πλούσιων σε ρεσβερατρόλη διατροφικών συμπληρωμάτων στον ανθρώπινο οργανισμό παραμένει ακόμη αβέβαιη (Hector et al., 2012).

3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΣΕ ΚΡΑΣΙ

3.1. Μέθοδοι

3.1.1. Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η έννοια της χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε αρχικά για το διαχωρισμό των τριών χρωστικών ουσιών που συναποτελούν τη χλωροφύλλη. Συνιστά έναν γενικό ορισμό που αναφέρεται σε μεγάλο φάσμα φυσικοχημικών διεργασιών διαχωρισμού. Ο διαχωρισμός των ενώσεων ενός μείγματος με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα της σχετικής κίνησης μίας στατικής φάσης και μίας κινητής εν σχέσει με τη στατική φάση. Τα συστατικά προς διαχωρισμό κινούνται κατά μήκος της στατικής φάσης με διαφορετικές ταχύτητες, με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Η ταχύτητα κίνησης του κάθε συστατικού εκφράζεται από τον συντελεστή κατανομής που δίνεται από τη σχέση $K = C_s/C_m$, όπου C_s και C_m οι συγκεντρώσεις της ένωσης στη στατική και την κινητή φάση αντιστοίχως (Λιοδάκης, 2001, Χατζηιωάννου και Κουππάρης, 2003).

Η κατανομή των συστατικών στην κινητή και τη στατική φάση ανάγεται σε φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων της διαλυτότητας, της πτητικότητας, της προσρόφησης, της ιοντοανταλλαγής και του μεγέθους και του σχήματος των μορίων και ιόντων, οπότε προκύπτουν και τα αντίστοιχα είδη χρωματογραφίας, όπως:

1. Χρωματογραφία κατανομής
2. Χρωματογραφία προσροφήσεως
3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
4. Χρωματογραφία μοριακών ηθμών

Η στατική φάση είναι δυνατόν να είναι υγρή ή στερεή και να αποτελεί μία στήλη, ένα φύλλο διήθησης ή μία πλάκα που είναι επιστρωμένη με κατάλληλο υλικό. Η κινητή φάση μπορεί να είναι αέρια ή υγρή, οπότε γίνεται λόγος για αέρια και υγρή χρωματογραφική τεχνική αντιστοίχως.

Από τους συνδυασμούς των επιμέρους φάσεων και ιδιοτήτων προκύπτουν οι παρακάτω χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού:

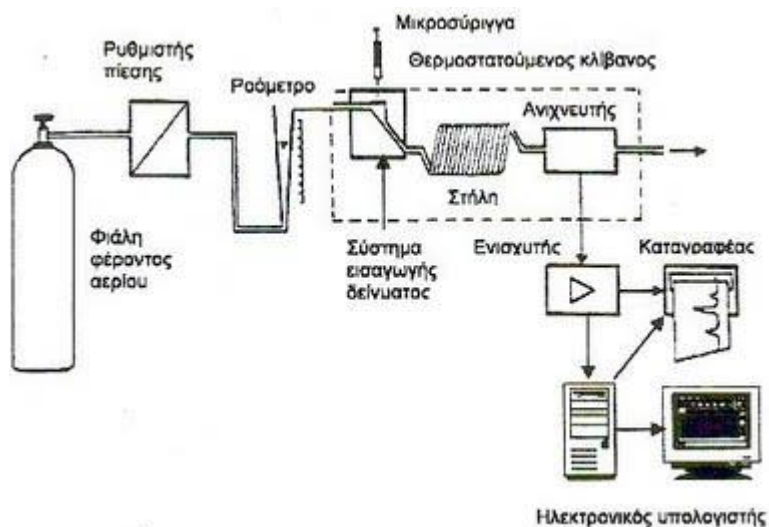
1. Προσροφήσεως (στερεή στατική φάση)
2. Κατανομής (υγρή στατική φάση)
3. Ιοντοανταλλαγής
4. Μοριακών ηθμών

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας (gas chromatography, GC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS). Η συνδυασμένη τεχνική είναι μια εύχρηστη και ευαίσθητη μέθοδος ανάλυσης, συνήθης για περιβαλλοντικά δείγματα. Ο χρωματογράφος αξιοποιείται για να διαχωριστούν τα συστατικά που περιέχονται στο δείγμα (μείγμα χημικών ενώσεων), ενώ ο φασματογράφος μάζας για να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν τα συγκεκριμένα συστατικά, γεγονός ουσιαστικής σημασίας καθώς τα βιολογικά δείγματα περιλαμβάνουν μία πληθώρα συστατικών και, ως εκ τούτου, ο απλός χρωματογραφικός διαχωρισμός χαρακτηρίζεται από εγγενείς δυσκολίες. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η τεχνική της GC-MS συνιστά μία από τις πλέον κατάλληλες αναλυτικές μεθόδους, ιδιαίτερα όταν απαιτείται η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πτητικών ή σχετικά πτητικών συστατικών (Χατζηγιάννου και Κουμπάρης, 2003).

Το προς ανάλυση δείγμα, που τοποθετείται στη θυρίδα έγχυσης διά μέσου ενός ελαστικού διαφράγματος, εξαερώνεται, καθώς στη θυρίδα επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες και μεταφερόμενο με τη βοήθεια αδρανούς αερίου (π.χ. ηλίου) αλληλεπιδρά με τη στατική φάση εντός τριχοειδούς στήλης. Από τους χρόνους ανάσχεσής τους εντός της στήλης (retention times, Rt) ταυτοποιούνται τα συστατικά του μείγματος και ποσοτικοποιούνται με ολοκλήρωση των εμβαδών των κορυφών με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Η διάταξη του χρωματογραφικού συστήματος ανάλυσης σε συνδυασμό με το φασματοόμετρο μάζας περιλαμβάνει τα εξής κύρια μέρη (Σχήμα 3.1):

1. Φιάλη φέροντος αερίου, στην οποία συνδέονται μανόμετρο και ροόμετρο.
2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος μέσω ελαστικού διαφράγματος (septum), το οποίο αντικαθίσταται περιοδικά.
3. Τριχοειδή στήλη, με στατική φάση (π.χ. άμορφο διοξείδιο του πυριτίου)
4. Σύστημα κενού
5. Σύστημα ανίχνευσης φασματομετρίας μάζας ταχείας σάρωσης, συζευγμένο με τον χρωματογράφο. Αποτελείται από το θάλαμο ιοντισμού, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή.
6. Ηλεκτρονικός υπολογιστής ως καταγραφέας, για την εξαγωγή των χρωματογραφημάτων



Σχήμα 3.1. Συνδεσμολογία χρωματογραφικής-φασματοσκοπικής ανάλυσης GC-MS (Χατζηιωάννου και Κουμπάρης, 2003).

Η τεχνική MS βασίζεται στη δημιουργία ιόντων τα οποία διαχωρίζονται με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z), ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των ομάδων μεταξύ τους. Στο θάλαμο ιονισμού η ένωση μετατρέπεται σε ιόντα, ενώ στον αναλυτή μαζών πραγματοποιείται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z , με στόχο την τελική ανίχνευσή τους από τον ανιχνευτή. Εν τέλει, στην ιδανική περίπτωση σε κάθε συστατικό αντιστοιχεί μία ορισμένη φασματική κορυφή που καταγράφεται ηλεκτρονικά και της οποίας το εμβαδόν υπολογίζεται και καταγράφεται αυτομάτως (Niessen, 2001).

Αναλυτικότερα, οι τεχνικές ανάλυσης οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φασματομετρία μάζας είναι οι εξής:

1. Τεχνική πλήρους σάρωσης (“Full Scan”), όπου λαμβάνεται το συνολικό φάσμα που αντιστοιχεί μεταξύ δύο τιμών λόγου m/z για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η ανάλυση σε κατάσταση πλήρους σάρωσης αποσκοπεί στην ταυτοποίηση της δομής ή τον προσδιορισμό ενός άγνωστου συστατικού διά της εκτίμησης του μοριακού της βάρους ή διά της σύγκρισης του φάσματος που λαμβάνεται με πρότυπα φάσματα. Με την αύξηση του χρόνου σάρωσης επιτυγχάνεται αύξηση της ευαισθησίας της ανάλυσης, αφού κατ’ αυτόν τον τρόπο αυξάνεται ο αριθμός των ιόντων που καταγράφονται από τον ανιχνευτή.

2. Τεχνική για την επιλεκτική παρακολούθηση των ιόντων (“Single Ion Monitoring”, SIM), η οποία ακολουθείται εφόσον η ανάλυση στοχεύει στην ποσοτικοποίηση συστατικών των οποίων τα φάσματα είναι γνωστά. Αναλύονται για συγκεκριμένο συστατικό χαρακτηριστικά ιόντα που ανήκουν στο φάσμα του και ο ανιχνευτής μεταβαίνει με μεγάλη ταχύτητα μεταξύ των μαζών καταγράφοντας μόνον αυτές. Κατ’ αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται μεγάλη ευαισθησία, όμως υφίσταται ο κίνδυνος για καταγραφή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, αφού οποιοδήποτε συστατικό που σχετίζεται με το καταγραφόμενο ιόν ενδέχεται να συμπροσδιοριστεί.

3. Τεχνική διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (“Tandem mass spectrometry”, MS/MS), που αντιστοιχεί στη χρήση δύο ή παραπάνω επιπέδων φασματομετρικής ανάλυσης. Με χρήση τριπλών τετράπολων ή υβριδικών διατάξεων τα επιμέρους τμήματα έχουν τη δυνατότητα να επιλέξουν συγκεκριμένο ιόν. Τα ιόντα, μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων, ενδέχεται να υποστούν ποικίλες καταστάσεις, όπως σύγκρουση με δραστικά ή αδρανή αέρια, ιόντα ή ηλεκτρόνια, να επιταχυνθούν, να επιβραδυνθούν, να σταθεροποιηθεί η ταχύτητά τους κ.ο.κ. Η επιλογή μεταξύ των διαφόρων αναλυτών σάρωσης ή μη και μεταξύ των διαφόρων επιμέρους διαδικασιών που υφίστανται τα ιόντα δίνει τη δυνατότητα για την πραγματοποίηση μεγάλου αριθμού πειραμάτων τα οποία είναι σε θέση να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες αναφορικά με τη δομή της προς ανάλυση ένωσης αυξάνοντας την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία της μέτρησης (Χατζηγιάννου και Κουμπάρης, 2003).

Ένα πλήθος χρωματογραφικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης (ή/και της *cis* -) σε κρασί, φρούτα αλλά και διάφορα βιολογικά υλικά (πλάσμα, ορός, ούρα) έχουν δημοσιευθεί. Οι μεθοδολογίες αυτές έχουν αναπτυχθεί κυρίως με τη χρήση GC-MS και έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενός (*trans*) ή και των δύο ισομερών της ρεσβερατρόλης μόνων τους ή μεταξύ άλλων πολυφαινολών, μετά από κατάλληλη κατεργασία του δείγματος (Πίνακας 1).

Η GC είναι η πιο κοινή αναλυτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται σε αρκετά ερευνητικά εργαστήρια που είναι διαθέσιμη παγκοσμίως. Οι πιο αντιπροσωπευτικές μεθοδολογίες οι οποίες αναπτύχθηκαν με τη χρήση GC περιγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.

Οι πιο πρόσφατες GC μέθοδοι χρησιμοποιούν τριχοειδείς στήλες διοξειδίου του πυριτίου διαφορετικής πολικότητας. Οι στήλες αυτές, λόγω του μεγαλύτερου μήκους τους, προσφέρουν καλύτερο διαχωρισμό από τις πακεταρισμένες στήλες που χρησιμοποιούνταν παλιότερα, αλλά υπερφορτώνονται πιο εύκολα από μεγάλη ποσότητα δείγματος. Ως φέρον αέριο έχει χρησιμοποιηθεί το ήλιον. Στις περισσότερες από τις μεθόδους έχει χρησιμοποιηθεί κατάλληλο βαθμιδωτό,

θερμοκρασιακό πρόγραμμα, το οποίο είναι ανάλογο της στήλης που χρησιμοποιείται, για το διαχωρισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης, των ισομερών της ρεσβερατρόλης και άλλων πολυφαινολών που συνυπάρχουν στα προς ανάλυση δείγματα κρασιού (ή βιολογικά δείγματα).

Οι ανιχνευτές, όπως ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) (Blache et al. 1997), έχουν πολύ περιορισμένη εφαρμογή σήμερα αν και δίνουν χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Η ανίχνευση με φασματομετρία μαζών με κρούση ηλεκτρονίων (electron impact, EI) με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (selected ion monitoring, SIM) έχει ως επί το πλείστον χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης με GC. Τα αποτελέσματα των μεθόδων αυτών ήταν πολύ ικανοποιητικά όσο αναφορά στα όρια ανίχνευσης ή/και στα όρια ποσοτικοποίησης (Πίνακας 1). Η φασματομετρία μαζών αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αναλυτικό εργαλείο, το οποίο παρέχει πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα κατά την ανάλυση ουσιών ή φαρμάκων σε διάφορα υλικά (βιολογικά ή μη) συγκρινόμενη με άλλες τεχνικές ανίχνευσης. Προσφέρει το πλεονέκτημα της αντιστοίχισης μίας χρωματογραφικής κορυφής με ένα φάσμα μαζών, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε αυξημένη βεβαιότητα ότι η ουσία του ενδιαφέροντος υπάρχει στο αναλυόμενο δείγμα. Για το λόγο αυτό, η εν λόγω μέθοδος ανίχνευσης θεωρείται ως η τυπική αναλυτική μέθοδος αναφοράς για ένα ευρύ φάσμα ουσιών και φαρμάκων και εφαρμόζεται ευρέως για γνωστά ή/και άγνωστα δείγματα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μεγάλου εύρους ουσιών με μία μόνο ένεση και απαιτεί σχετικά χαμηλό κόστος ανά δείγμα.

Πριν την ανάλυση με GC, απαιτείται η απομόνωση της ουσίας του ενδιαφέροντος από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Τεχνικές απομόνωσης *trans*-ρεσβερατρόλης από το εκάστοτε υλικό που έχουν χρησιμοποιηθεί και περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία είναι: Η υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE) και η εκχύλιση στερεής φάσης (solid-phase extraction, SPE), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις το δείγμα ενίεται απευθείας στο χρωματογραφικό σύστημα, όπου και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του αναλύτη από τα συστατικά του βιολογικού δείγματος (Πίνακας 1).

Το στάδιο της εκχύλισης και της απομόνωσης της ρεσβερατρόλης ακολουθούν η εξάτμιση του διαλύτη ή του συστήματος διαλυτών εκχύλισης και η παραλαβή των αναλυτών με κάποιον άλλο συνήθως οργανικό διαλύτη.

Στην LLE, ο διαλύτης που έχει χρησιμοποιηθεί στις δημοσιευμένες εργασίες του Πίνακα 1 για την απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης είναι ο οξικός αιθυλεστέρας. Οι τιμές των ανακτήσεων με το διαλύτη αυτόν κυμαίνονται από 88,8% έως 101% (Soleas et al. 2001a, Soleas et al. 2001b, Francioso et al. 2019)

Η SPE πραγματοποιείται με τη χρήση κατάλληλων στηλών διαφόρων τύπων, η επιλογή των οποίων γίνεται ανάλογα με τη χημική συμπεριφορά των προσδιοριζόμενων ουσιών. Για την απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης έχουν χρησιμοποιηθεί στήλες εκχύλισης κυρίως πολικές. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, οι τιμές της ανάκτησης της *trans*-ρεσβερατρόλης, μετά από κατεργασία με SPE και τους διάφορους διαλύτες κυμαίνονται από 92% έως 108%. Στη βιβλιογραφία περιγράφεται, ακόμη, και η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (solid-phase microextraction, SPME) μέσω ανάλυσης της υπερκείμενης φάσης, η οποία έχει εφαρμοστεί για την απομόνωση της *trans*-ρεσβερατρόλης από κρασί. Πριν την εφαρμογή μεθόδων εκχύλισης αυτού του τύπου, πρέπει γενικά να εξετάζεται η θερμική σταθερότητα του εκάστοτε αναλύτη, προκειμένου να αποφευχθεί η αποδόμηση του μορίου και η κακή επαναληψιμότητα, αλλά και να αυξηθούν τα ποσοστά ανάκτησης. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 1, οι τιμές της ανάκτησης της *trans*-ρεσβερατρόλης, μετά από κατεργασία με SPME κυμαίνονται από 83,6% έως 116%. Η τεχνική SBSE η οποία χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή της *cis* και *trans*-ρεσβερατρόλης από κρασί (Cacho et al. 2013) είναι μία τεχνική εκχύλισης χωρίς διαλύτες, είναι σημαντικά ταχύτερη από τις περισσότερες συμβατικές τεχνικές ανάλυσης και έως και 1000 φορές πιο ευαίσθητη από την SPME. Άλλες τεχνικές μικροεκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι: DSDME (Viñas et al. 2011) και DLLME (Rodríguez-Cabo et al. 2012), όπου η κατεργασία του δείγματος βασίζεται στην ένεση ενός διαλύτη εκχύλισης (που δεν αναμιγνύεται με το νερό), η οποία υποβοηθείται από διαλύτη διασποράς (αναμίξιμο τόσο σε νερό όσο και σε διαλύτες εκχύλισης) εντός υδατικού διαλύματος.

Πίνακας 1. Συνοπτική περιγραφή αντιπροσωπευτικών δημοσιευμένων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό ρεσβερατρόλης με τη χρήση GC-MS.

Βιβλιογραφία	Υλικό	Μέθοδος εκχύλισης	Χρωματογραφική στήλη	Τεχνική	LOD/LOQ	Ανάκτηση (%)	Γραμμικότητα	Εσωτερικό πρότυπο
Blache et al. (1997)	Αίμα	Βλ. Blache et al. (1997) και παραγωγή με TMS και μίγμα BSA-TMCS-TSIM σε πυριδίνη (30:70, v/v)	Τριχοειδής στήλη (OV1701, 0.1-mm thickness 25×30.32 mm i.d.)	GC-FID	LOD= 50 ng/mL	96.8%	0.1–10 µg/mL (trans)	Epico-prostanol
Soleas et al. (1997)	Κρασί και χυμό	SPE (στήλες C18) και παραγωγή με BSTFA (70 °C για 60 min)	DB-5HT 5% phenyl, 95% methyl 30m × 0,25mm i.d., 0,10µm film thickness	GC-MSD	LOD= 10 µg/L	Δεν αναφέρεται	52-2600 µg/L	Δεν αναφέρεται
Soleas et al. (2001a)	Αίμα και ούρα (αρουραίου και ανθρώπου)	LLE (εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα) και παραγωγή με BSTFA (70°C για 2 h)	DB-5, 15 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness	GC-MS	LOD= 0.1 µg/L LOQ= 1 µg/L	88.8-96.6%	1-100 µg/L	-
Soleas et al. (2001b)	Ορός αίματος, πλάσμα, ούρα	LLE (εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα) και παραγωγή με BSTFA (70°C για 2 h)	DB-5, 15 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness	GC-MS	LOD= 0.01 µg/L LOQ= 0.1 µg/L	89.6-94.3%	1–2500 µg/L	Fisetin
Tokuzoglu et al. (2005)	Ξηροί καρποί	SPE και παραγωγή με BSTFA	DB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm)	GC-MS	Δεν αναφέρεται	Δεν αναφέρεται	0.01-6.0 mg/L	Δεν αναφέρεται
Ragab et al. (2006)	Φλούδα ντομάτας ή γκρέιπφρουτ	LLE (εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα) και παραγωγή με πυριδίνη και MSTFA (37°C για 30 min)	VF-5MS 0.25 mm × 0.25 µm × 30 m με προστήλη 10 m	GC-MS (EI)	LLOQ= 9 ng/g	Δεν αναφέρεται	Δεν αναφέρεται	Δεν αναφέρεται
Cai et al. (2008)	Κρασί κόκκινο / νερό	SPME με BSTFA on-fiber παραγωγή	SPME	GC-MS	LOD= 7,08 ng/L (κρασί) Και 2,85 ng/L (νερό)	83,6± 5,6%	10-5000 ng/L	Δεν αναφέρεται
Viñas et al. (2009)	Κρασί, σταφύλι	SMPE και παραγωγή με BSTFA		GC-MS	Κρασί LOD=0.3	85-116%	1-150 ng/mL	Δεν αναφέρεται

		(για 15 min στους 50°C)			ng/mL, LOQ= 0.09 ng/mL Σταφύλι LOD= 0.4 ng/g, LOQ= 1.4 ng/g			
Montes et al. (2010)	Κρασί κόκκινο, λευκό	SPE (0,45 μm φίλτρα PVDF) προσθήκη δείγματος (σε μεθανόλη νερό: 1:1), παραγωγοποίηση με οξικό ανυδρίτη και 5% K ₂ HPO ₄ , παραλαβή με 2ml ισοοκτάνιο	Varian Factor Four, BP-5 (30m x 0,25mm i.d., 0,25μm)	GC-MS (EI)	LOQ= 0.8 μg/mL	92-108%	Μέχρι 2500 μg/mL	Δεν αναφέρεται
Viñas et al. (2011)	Φυτικά διαλύματα, φρούτα και λειτουργικά τρόφιμα	DSDME και παραγωγοποίηση με BSTFA	Τριχοειδής στήλη HP-U1MS (100% Dimethyl polysiloxane, 30m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm thickness)	GC-MS (EI)	0.011/ 0.037 ng/mL (trans) 0.11/ 0.36 ng/ml (cis)	81-116%	0.05-200 ng/mL (trans) 0.5-200 ng/mL (cis)	Δεν αναφέρεται
Rodríguez-Cabo et al. (2012)	Κρασί	DLLME	HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm)	GC-MS	LOQ= 0.6 ng/mL	85.7-117%	10-5000 ng/mL	¹³ C ₆ -trans-resveratrol
Cacho et al. (2013)	Κρασί	SBSE extraction step	HP-5MS (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, 30m x 0.25 mm, 0.25 μm)	GC-MS (EI)	LOQ= 14.6 ng/L (trans); 14.4 ng/L (cis)	79-109%	0.1-15 μg/L	Bisphenol F
Francioso et al. (2019)	Κρασί	LLE (εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα) και παραγωγοποίηση με MTBSTFA στους 70°C στο σκοτάδι	HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm) με 5%-phenyl-95%-dimethyl polysiloxane	GC-MS (EI)	LOQ= 0.05 μg/mL (trans) 0.04 μg/mL (cis)	99.8-101.0% (trans) 98.6-100.7% (cis)	0.02-10 μg/mL (cis και trans)	Pinostilbene

Συνομημύσεις: DSDME, directly suspended droplet microextraction; DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction; FID, ανιχνευτής ιονισμού φλόγας; LLE, υγρό-υγρό εκχύλιση; LLOQ, κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης; LOD, όριο ανίχνευσης; LOQ, όριο ποσοτικοποίησης; MSTFA, N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction; SPE, εκχύλιση στερεής φάσης.

3.2. Παραγωγοποίηση με BSTFA

Πριν την ανάλυση με GC, σε κάποιες περιπτώσεις προηγείται ένα επιπλέον στάδιο, όπου πραγματοποιείται παραγωγοποίηση σε κάποιους από τους αναλύτες προκειμένου να βελτιωθεί η χρωματογραφική τους απόδοση. Το στάδιο της παραγωγοποίησης είναι γενικά απαραίτητο όταν οι μελετούμενες ουσίες διαθέτουν ενεργές λειτουργικές ομάδες που καθορίζουν τη διέλευση και τον τρόπο έκλυσης των μορίων από τη χρωματογραφική στήλη. Λόγω της παρουσίας των ομάδων αυτών η υπό μελέτη ουσία, στη συγκεκριμένη περίπτωση η ρεσβερατρόλη, εμφανίζει μη οξείες και ασύμμετρες χρωματογραφικές κορυφές, παρουσιάζοντας «ουρά» (tailing), κατά την έκλυσή τους από τη στήλη, οπότε προκύπτουν σημαντικά προβλήματα στο διαχωρισμό και στην ολοκλήρωση των κορυφών. Το στάδιο της παραγωγοποίησης αφορά στις λειτουργικές ομάδες του κάθε μορίου και αποσκοπεί στη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς του εκάστοτε αναλύτη, καθώς αυξάνει την πτητικότητα και τη θερμοανθεκτικότητα των αναλυτών, διαφοροποιεί τη χρωματογραφική τους συμπεριφορά, άρα διευκολύνει το διαχωρισμό. Επιπρόσθετα, με την αλλαγή του μορίου και την αύξηση του μοριακού βάρους, κατά τη θραυσματοποίηση παράγονται πιο χαρακτηριστικά θραύσματα με μεγαλύτερη ιοντική μάζα. Συνεπώς το στάδιο της παραγωγοποίησης, ενισχύει την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα και την ειδικότητα της μεθόδου (Orata, 2012).

Η ρεσβερατρόλη, διαθέτει ενεργές λειτουργικές ομάδες (-OH) τρεις στον αριθμό και δύναται να παραγωγοποιηθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Στη βιβλιογραφία (Πίνακας 1), ως αντιδραστήρια παραγωγοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί το BSTFA (Soleas et al. 2001a, Soleas et al. 2001b., Tokusoglu et al. 2005, Cai et al. 2008, Viñas et al. 2009, Viñas et al. 2011), MTBSTFA (Francioso et al. 2019), TMS και μίγμα BSA-

TMCS–TSIM σε πυριδίνη (Blache et al. 1997), MSTFA (Ragab et al. 2006) και οξικό ανυδρίτη (Montes et al. 2010).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής εργασίας η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ήταν η βελτιστοποίηση και επικύρωση κατάλληλης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό ρεσβερατρόλης σε κρασιά με τη χρήση της τεχνικής GC-MS κατόπιν παραλαβής της με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE).

Η αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS), είναι μία αξιόπιστη και ευαίσθητη αναλυτική τεχνική και δεδομένου ότι χρησιμοποιείται ως η πλέον βασική αναλυτική τεχνική στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε και για τις μετρήσεις της ρεσβερατρόλης σε κρασιά ελληνικής προέλευσης. Με τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου, δείγματα ελληνικών οίνων μελετήθηκαν και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους σε *trans*-ρεσβερατρόλη και εν συνεχεία οι συγκεκριμένες τιμές συγκρίθηκαν με αντίστοιχες τιμές οίνων ξένης προέλευσης που είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία καθώς δεν ήταν εφικτή η αγορά τους με σκοπό τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της *trans*-ρεσβερατρόλης. Για τον προσδιορισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης στα ξένα κρασιά, χρησιμοποιήθηκε μεν η τεχνική GC-MS, αλλά οι ερευνητικές ομάδες ακολούθησαν διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους που περιελάμβαναν διαφορετική μέθοδο κατεργασίας.

Ως τελευταίο στάδιο της παρούσας εργασίας, θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί αν η παρούσα μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης σε βιολογικά υγρά. Συγκεκριμένα, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε αίμα και από τα αποτελέσματα (δε παρουσιάζονται) προέκυψε ότι είναι εφικτή τόσο η ανίχνευση όσο και ο ποσοτικός προσδιορισμός της υπό μελέτης ουσίας.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Μέθοδος

Για τη συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο. Αρχικώς, παρασκευάζεται διάλυμα Δ₁, το οποίο είναι μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος pH 7 και μεθανόλης (95:5, v:v). Αναμιγνύονται 5 mL μεθανόλης (MeOH) με 95 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 7 υπό ανάδευση.

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται:

- 0,5 mL Δείγματος
- 30 μL MQ (μεθακουαλόνη C= 10.00 μg/mL ως εσωτερικό πρότυπο)
- 5 mL Διαλύματος Δ₁ στάγδην, υπό συνεχή ανάδευση (vortex)
- Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 10 min
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 10 min
- Ενεργοποιούνται οι στήλες εκχύλισης στερεής φάσης εφαρμόζοντας κατά σειρά με γυάλινες βαθμονομημένες πιπέτες (Δίνεται προσοχή ώστε το υπόστρωμα της στήλης να μην ξηραίνεται)
 - ✓ 2 mL MeOH
 - ✓ 2 mL Διαλύματος Δ₁
- Παραλαβή της υπερκείμενης στοιβάδας των δειγμάτων και μεταφορά της στις στήλες εκχύλισης στερεής φάσης (SPE, Bond Elut Certify, Agilent), χρησιμοποιώντας πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης.
- Τα δείγματα διέρχονται από τη στήλη με ταχύτητα ροής περίπου 1-2 mL/min.
- Γίνεται πλύσιμο των στηλών εφαρμόζοντας κατά σειρά με γυάλινη βαθμονομημένη πιπέτα και ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα:
 - ✓ 2mL Διαλύματος Δ₁
 - ✓ Κενό αέρος (≥ 10mmHg) για περίπου 10 sec
 - ✓ 100 μL ακετόνη
 - ✓ Κενό αέρος (≥ 10mmHg) για περίπου 10 min

- Παρασκευή διαλύματος Β, το οποίο αποτελείται:
 - ✓ Διχλωρομεθάνιο : Ισοπροπανόλη : Αμμωνία (85 : 15 : 2)
- Τοποθέτηση εσφυρισμένων δοκιμαστικών σωλήνων
- Γίνεται έκλουση της ρεσβερατρόλης εφαρμόζοντας στις στήλες 2×1,5 mL Διαλύματος Β χρησιμοποιώντας γυάλινη βαθμονομημένη πιπέτα.
- Εξάτμιση των δειγμάτων μέχρι ξηρού υπό συνεχή ροή Αζώτου (N₂)
- Αμμόλουτρο για την αποφυγή υγρασίας εντός των δοκιμαστικών σωλήνων
- Προσθήκη 50 μL ακετονιτριλίου (ACN)
- Προσθήκη 50 μL αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης BSTFA
- Παραγωγοποίηση σε αμμόλουτρο στους 70°C για 30 min
- Παραλαβή και μεταφορά σε vials για GC-MS ανάλυση

Το σύστημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου περιελάμβανε:

1. Αέριο χρωματογράφο Agilent GC/MSD μοντέλο 6890N/5975.
2. Φασματογράφο μαζών Agilent, με πηγή ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, electron impact, EI.
3. Χρωματογραφική στήλη: DB-5MS (30m × 0.25mm i.d., 0.25 μm film thickness).

5.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο ακόλουθος:

1. Ατομικοί αναδευτήρες περιδίνισης (Vortex), της εταιρείας Chiltren.
2. Θερμαινόμενη πλάκα της εταιρείας Fisher.
3. Σύστημα εξάτμισης εννέα θέσεων συνδεδεμένο με φιάλη αζώτου (Reactive Var), της εταιρείας Pierce.
4. Φυγόκεντρος, της εταιρείας Alresa.
5. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (2-20 μL), της εταιρείας Thermo.
6. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (20-200 μL), της εταιρείας Gilson.
7. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (200-1000 μL), της εταιρείας Gilson.

8. Ρύγχοι πιπετών (2-200 μL), της εταιρείας Gilson.
9. Ρύγχοι πιπετών (200-1000 μL), της εταιρείας Gilson.
10. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσεως, της εταιρείας Sarstest.
11. Γυάλινοι βαθμονομημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
12. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες.
13. Γυάλινα βαθμονομημένα σιφώνια (1.00, 2.00, 5.00 και 10.0 mL).
14. Ογκομετρικός κύλινδρος (100 mL).
15. Αναλυτικός ζυγός, της εταιρείας Rawwag.

5.3. Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

1. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
2. Ακετόνη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
3. Διχλωρομεθάνιο αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck.
4. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
6. Ισοπροπανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
7. Νερό καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
8. Οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck.
9. Αμμωνία αναλυτικής καθαρότητας, περιεκτικότητας 25%, της εταιρείας Merck
10. N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμιδίου (BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS), της εταιρείας Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
11. Οξικός ανυδρίτης 97% (acetic anhydride), της εταιρείας Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
12. Τριφθοροξικός ανυδρίτης 99% (trifluoroacetic anhydride, TFAA), της εταιρείας Fluka (Steinheim, Germany).

5.4. Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ρεσβερατρόλης και μεθακουαλόνης

Στην παρούσα εργασία, ως πρότυπες ουσίες αναφοράς (chemical reference standards) χρησιμοποιήθηκαν η ρεσβερατρόλη (υπό εξέταση αναλύτης) και η μεθακουαλόνη (εσωτερικό πρότυπο).

Παρασκευάστηκε πυκνό πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης για τη ρεσβερατρόλη συγκέντρωσης 2.00 mg/mL, σε μεθανόλη, και μεθακουαλόνης συγκέντρωσης 1.00 mg/mL.

Το διάλυμα της ρεσβερατρόλης καθώς και τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονταν σε γυάλινα φιαλίδια σκούρου χρώματος στους 4°C τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να αποφευχθεί η έκθεση των διαλυμάτων στο φως που προκαλεί μετατροπή του *trans*-ισομερούς σε *cis*. Το διάλυμα παρακαταθήκης της μεθακουαλόνης και το αραιωμένο διάλυμα αυτής φυλάσσονταν σε γυάλινα φιαλίδια σκούρου χρώματος στους 4°C.

5.5. Διαλύματα εργασίας για την παρασκευή προτύπων δειγμάτων κρασιού

Κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού της ρεσβερατρόλης, για τη διενέργεια των απαραίτητων δοκιμασιών για τον προσδιορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών της αναλυτικής τεχνικής και της τεχνικής προκατεργασίας των κρασιών, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- *Διάλυμα ρεσβερατρόλης Α συγκέντρωσης 100 µg/mL σε μεθανόλη:* Από το διάλυμα παρακαταθήκης της ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 2.00 mg/mL ελήφθησαν 125 µL και ακολούθησε αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 2.5 mL .
- *Διάλυμα μεθακουαλόνης συγκέντρωσης 10.0 µg/mL σε μεθανόλη:* Από το διάλυμα παρακαταθήκης της μεθακουαλόνης συγκέντρωσης 1.00 mg/mL ελήφθησαν 100 µL και ακολούθησε αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1.0 mL .

Κατά το στάδιο της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού στο κρασί παρασκευάστηκαν εκτός από το εργασίας Α και τρία αραιότερα διαλύματα σε μεθανόλη, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- *Διάλυμα A₁ (10.00 µg/mL),* το οποίο παρασκευάστηκε με παραλαβή 300 µL από το διάλυμα Α συγκέντρωσης 100 µg/mL και αραιώση μέχρι τελικού όγκου 3.0 mL.

- Διάλυμα A_2 (20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$), το οποίο παρασκευάστηκε με παραλαβή 400 μL από το διάλυμα A συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και αραιώση μέχρι τελικού όγκου 2.0 mL.
- Διάλυμα A_3 (1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$), το οποίο παρασκευάστηκε με παραλαβή 40 μL από το διάλυμα A συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και αραιώση μέχρι τελικού όγκου 4.0 mL.

Τα παραπάνω διαλύματα A, A_1 - A_3 χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων κρασιών βαθμονόμησης της ρεσβερατρόλης (calibration samples, Cal). Για την παρασκευή προτύπων κρασιών ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QC) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη βαθμονόμησης, τα οποία, όμως, είχαν τις ίδιες συγκεντρώσεις με τα διαλύματα A και A_3 , αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στα διαλύματα εργασίας που παρασκευάστηκαν, οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό mL κρασιού, καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των προτύπων κρασιών που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Παρασκευή προτύπων κρασιών για τη βαθμονόμηση (calibration samples, Cal) και τον έλεγχο ποιότητας (quality control samples, QC).

Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 0.5 mL κρασί	Διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Τελική συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$) προτύπου κρασιού	ονομασία προτύπου κρασιού
25	A_3 (1.00)	0.05	Cal 1
50	A_3 (1.00)	0.10	Cal 2
75	A_3 (1.00)	0.15	QC1-STB
25	A_1 (10.00)	0.50	Cal 3
25	A_2 (20.00)	1.00	Cal 4
50	A_2 (20.00)	2.00	Cal 5
50	A_2 (20.00)	2.00	QC2-STB

20	A (100.0)	4.00	QC3-STB
25	A (100.0)	5.00	Cal 6

5.6. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (0.1 M): Ζυγίστηκαν 3.58 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και διαλύθηκαν σε 100 mL απιονισμένου νερού (διάλυμα I) και σε άλλα 100 mL απιονισμένου νερού διαλύθηκαν 3.54 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (διάλυμα II). Αναμίχθηκαν 19.5 mL του διαλύματος I με 30.5 mL του διαλύματος II. Ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 mL με απιονισμένο νερό. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH 1.0 M.

6. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ–ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Προκαταρκτική χρωματογραφική ανάλυση

Πριν την έναρξη των δοκιμασιών για τη βελτιστοποίηση της παραγωγοποίησης και της χρωματογραφικής ανάλυσης, συγκεκριμένη ποσότητα ρεσβερατρόλης ενέθηκε στον αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών για τη λήψη φάσματος μάζας με λειτουργία πλήρους σάρωσης ιόντων σε μία ευρεία περιοχή μαζών (m/z 50 έως 600). Συγκεκριμένα, 50 μL από πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα εργασίας ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια έγινε ανασύσταση με 70 μL οξικού αιθυλεστέρα και έγχυση 1 μL του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα.

Κατά την ανάλυση του χρωματογραφήματος, παρατηρήθηκαν δύο χρωματογραφικές κορυφές που, όπως προέκυψε από περαιτέρω διερεύνηση και βιβλιογραφική συσχέτιση, αντιστοιχούν στην *trans*- και *cis*-ρεσβερατρόλη, αντίστοιχα. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η πρότυπη ουσία ρεσβερατρόλη που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις φάσεις των πειραμάτων αφορά στο ρακεμικό μίγμα αυτής.

Η δομή της ρεσβερατρόλης, όπως αποτυπώνεται στο σχήμα 2.1 είναι απλή, καθώς το μόριό της περιέχει τρία υδροξύλια στις διαμετρικές θέσεις δύο βενζολικών

δακτυλίων. Οι βενζολικοί δακτύλιοι ευρίσκονται σε *trans*-θέση της αιθυλενικής ομάδας η οποία τους ενώνει. Λόγω της παρουσίας αυτών των χαρακτηριστικών ομάδων στη δομή της, κατά την ανάλυσή της με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας η ουσία αυτή εμφανίζει μη οξείες και μη συμμετρικές χρωματογραφικές κορυφές και «ουρά» (tailing), με αποτέλεσμα η μέθοδος να εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η τεχνική της παραγωγοποίησης που αποσκοπεί στη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς μίας ουσίας, αφού παράλληλα αυξάνεται η πτητικότητα και η θερμοανθεκτικότητά της. Επιπλέον, με την αύξηση του μοριακού τους βάρους και την αλλαγή στη δομή του μορίου, η θραυσματοποίηση που πραγματοποιείται οδηγεί στην παραγωγή πιο χαρακτηριστικών θραυσμάτων με μεγαλύτερη ιοντική μάζα. Συνεπώς, το στάδιο της παραγωγοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας και τη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς.

Βελτιστοποίηση της διαδικασίας της παραγωγοποίησης

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η τεχνική της παραγωγοποίησης πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες με διάφορα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης και ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των παραγώγων της ρεσβερατρόλης, με λειτουργία πλήρους σάρωσης ιόντων σε μία ευρεία περιοχή μαζών (m/z 50 έως 600). Σε κάθε δοκιμασία παραγωγοποίησης, 50 μL από διάλυμα των παραγωγοποιήσιμων ουσιών συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για την κάθε ουσία εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης και τα δείγματα παρέμεναν για 30 λεπτά σε αμμόλουτρο ρυθμισμένο στους 70°C. Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που δοκιμάστηκαν (5 διαφορετικές δοκιμασίες) και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. 50 μL πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη 99% (PFPA) και παραλαβή με 50 μL οξικού αιθυλεστέρα.
2. 10 mL διαλύματος όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4) pH ίσου με 9,3 και 2mL ισοοκτάνιο. Φυγοκέντριση (3500rpm \times 3'), παραλαβή υπερκείμενου μετά από εξάτμιση με οξικό ανυδρίτη και παραλαβή με 50 μL ισοοκτάνιο.

3. 50 μL τριφθοροξικού ανυδρίτη (TFAA) και παραλαβή με 50μL οξικού αιθυλεστέρα.
4. 50 μL N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμιδίου (BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS) σε 50 μL ακετονιτρίλιο
5. 50 μL οξικού ανυδρίτη και παραλαβή με 50 μL οξικού αιθυλεστέρα

Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης που επιλέχτηκε ήταν το N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμιδίου BSTFA καθώς ήταν αυτό που έδινε την καλύτερη εικόνα συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα και τις καλύτερες χρωματογραφικές κορυφές για τα δύο ισομερή της ρεσβερατρόλης, τη *cis*- και *trans*- μορφή. Η παραγωγοποίηση με οξικό ανυδρίτη σε διάλυμα όξινου φωσφορικού καλίου (K₂HPO₄) ήταν αυτή που έδινε τη χειρότερη εικόνα, γεγονός που εξηγείται από την παρουσία H₂O, το οποίο δεν επιτρέπει την καλή λειτουργία του οξικού ανυδρίτη και η παραγωγοποίηση ήταν ανεπιτυχής. Στην περίπτωση του πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη 99% (PFPA), η εικόνα της παραγωγοποίησης ήταν ικανοποιητική, αν και λιγότερο συγκριτικά με την περίπτωση του BSTFA. Ένα επιπλέον πρόβλημα στην παραγωγοποίηση με το PFPA ήταν και το μεγάλο μοριακό βάρος μετά την αντικατάσταση των υδροξυλικών ομάδων, γεγονός που δυσκόλευε την ανίχνευση των ιόντων πολύ μεγάλου μοριακού βάρους που προέκυπταν.

Πίνακας 3. Απεικόνιση % της αναλογίας *trans-cis* ρεσβερατρόλης του μίγματος.

Συγκέντρωση διαλύματος ρεσβερατρόλης	Θραύσμα (m/z)	Rt cis (min)	Rt trans (min)	trans %	cis %
1 μg/mL	444	6,7	7,76	94,4	5,6
1 μg/mL	444	6,7	7,76	95,7	4,3
500 ng/mL	444	6,7	7,76	95,9	4,1
500 ng/mL	444	6,7	7,76	97,01	2,9

Στο διάλυμα της ρεσβερατρόλης παρουσιάζεται αναλογία *trans/cis* ίση με 10/1. Είναι φανερό ότι δεν είναι εφικτός ο ακριβής υπολογισμός της *cis*-ρεσβερατρόλης σε ένα τόσο καθαρό μίγμα. Για το λόγο αυτό, διάλυμα ρεσβερατρόλης αφέθηκε σε ηλιακό φως ώστε να επιτευχθεί η μετατροπή του *trans*-

ισομερούς της ρεσβερατρόλης σε *cis*-. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν έδειξαν επαρκή μετατροπή και η αναλογία διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα παρά την επίδραση της UV ακτινοβολίας. Θεωρώθηκε, λοιπόν, ότι το διάλυμα περιέχει την *trans*-μορφή της ρεσβερατρόλης και δε δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη για τη *cis*-ρεσβερατρόλη, η οποία έτσι και αλλιώς δεν παρουσιάζει το ίδιο ενδιαφέρον συγκριτικά με τη *trans*-ρεσβερατρόλη, η οποία εμφανίζει πολυδιάστατο ευεργετικό βιολογικό ρόλο για τον οργανισμό.

7. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ *TRANS*-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΣΕ ΚΡΑΣΙ

Εισαγωγή

Η μέθοδος προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί επικυρώθηκε μερικώς και σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 2001), της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002), του ICH (International Conference on Harmonization) (ICH, 2005) και της EURACHEM (Eurachem, 2014). Στο πλαίσιο της μερικής επικύρωσης της βελτιστοποιημένης αναπτυχθείσας μεθόδου για το κρασί ελέγχθηκαν οι παρακάτω παράμετροι για τρεις ημέρες εργασίας: εκλεκτικότητα (selectivity), ευαισθησία με τον προσδιορισμό των κατώτατων ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), γραμμικότητα (linearity), επαναληψιμότητα (intraday precision) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (interday precision), ορθότητα εντός της ημέρας (intraday accuracy) και δια των ημερών (intraday accuracy), απόλυτη ανάκτηση και ανθεκτικότητα (robustness).

7.1. Εκλεκτικότητα

Η μελέτη της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι τυφλών δειγμάτων αραιωμένου λευκού κρασιού διαφορετικής προέλευσης και τον έλεγχο των χρωματογραφημάτων, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσσεις από ενδογενή συστατικά του κρασιού στους χρόνους ανάσχεσης του αναλύτη (*trans*-ρεσβερατρόλης) και του εσωτερικού προτύπου (μεθακουαλόνης) (FDA, 2001,

Eurachem, 2014). Τα δείγματα κατεργάσθηκαν χωρίς την προσθήκη του αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

7.2. Ειδικότητα

Η μελέτη της ειδικότητας πραγματοποιείται με την ανάλυση έξι διαλυμάτων εργασίας μίγματος (δεκάδων) διαφορετικών ουσιών γνωστής συγκέντρωσης, οι οποίες ενδέχεται να συνυπάρχουν στα δείγματα κρασιού (π.χ. φλαβονοειδή). Επιπλέον, παρασκευάζονται έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα κρασιού των υπό εξέταση προτύπων ουσιών και χωρίς την προσθήκη ρεσβερατρόλης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία δεν πραγματοποιήθηκε καθώς η μέθοδος που παρουσιάζεται είναι βελτιστοποιημένη μιας ήδη αναπτυχθείσας μεθόδου (FDA, 2001, Eurachem, 6).

7.3. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης θεωρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που είχε απόκριση μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος τουλάχιστον κατά τρεις (LOD, $S/N > 3:1$) και δέκα φορές (LOQ, $S/N > 10:1$), αντίστοιχα. Επίσης, τα κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για τον κάθε αναλύτη υπολογίσθηκαν βάσει των στοιχείων της αντίστοιχης εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης για την κάθε ημέρα και στη συνέχεια υπολογίσθηκε η μέση τιμή (ICH, 2005).

Η μαθηματική εξίσωση, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους ήταν η εξής:

$$\text{LOD ή LOQ} = \frac{\kappa \times SD_{\beta}}{\alpha}$$

όπου:

- κ είναι ο παράγοντας που εξαρτάται από την πιθανότητα κατανομής των τιμών τυφλού δείγματος και από την επιθυμητή τιμή σφάλματος τύπου «B». Για το κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η τιμή του κ είναι 3.33 και 10,

αντίστοιχα, για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (όπου υπάρχει πιθανότητα σφάλματος τύπου «B» 5%).

- SD_{β} είναι η τυπική απόκλιση της τομής (β) του άξονα των τιμών y , στην εξίσωση $y=ax+\beta$.
- α είναι η κλίση της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης.

7.4. Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων βαθμονόμησης επτά σημείων σε 3 διαφορετικές ημέρες σε αραιωμένο λευκό κρασί. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης ($y=ax+\beta$) των διαγραμμάτων βαθμονόμησης υπολογίσθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και με συντελεστή βαρύτητας $1/x^2$, όπου το x αντιστοιχεί στην ονομαστική (θεωρητική) τιμή του λόγου της συγκέντρωσης του αναλύτη (*trans*-ρεσβερατρόλη) εκφρασμένη σε $\mu\text{g/mL}$ προς τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (μεθακουαλόνη) εκφρασμένη σε $\mu\text{g/mL}$, ενώ το y αντιστοιχεί στο λόγο της απόκρισης του αναλύτη προς την απόκριση του εσωτερικού προτύπου. Στο πλαίσιο της μελέτης της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίσθηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2) για κάθε εξίσωση παλινδρόμησης και έπρεπε να ισχύει ότι $R^2 \geq 0.98$ (ICH, 2005, Eurachem, 2014).

7.5. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Τα δείγματα βαθμονόμησης κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας τις αναπτυχθείσες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, έγιναν επαναποσοτικοποιήσεις των βαθμονομητών με την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων για την κάθε ημέρα και υπολογίσθηκε το σχετικό σφάλμα ($\% E_r$) των τιμών αυτών, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% Er = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

όπου x είναι η τιμή της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε κατά την επαναποσοτικοποίηση και μ η αντίστοιχη αναμενόμενη συγκέντρωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα αποδεκτά όρια αποκλίσεων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις έπρεπε να ήταν έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα και έως $\pm 20\%$ για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

7.6. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα

Η επαναληψιμότητα (εντός της ημέρας, intraday precision) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα (δια των ημερών, interday precision), ελέγχθηκαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό (συγκέντρωσης 3πλάσιας του πρώτου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης), ένα μεσαίο (συγκέντρωσης περίπου στο μέσο του δυναμικού εύρους του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) και ένα υψηλό (συγκέντρωσης ίσης με το 80% της συγκέντρωσης του τελευταίου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) επίπεδο. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) που επιλέχθηκαν για το κρασί αναφέρονται στον Πίνακα 2. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις τρεις ημέρες ανάλυσης (συνολικά 18 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Η συγκέντρωση του αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογίζονταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος των μεθόδων και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 3 διαφορετικές

ημέρες για το κρασί. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές της % RSD, που εκφράζουν την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας (FDA, 2001).

Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει τη μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα των μεθόδων, εκτιμήθηκε και από το % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης, που ελήφθησαν σε διαφορετικές ημέρες ανάλυσης (Eurachem, 2014).

7.7. Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας της κάθε ημέρας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης και υπολογιζόταν η μέση τιμή των μετρήσεων για τα έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης. Η ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών, αποτελεί μέτρο του συστηματικού σφάλματος μίας μεθόδου και εκτιμήθηκε από το % σχετικό σφάλμα (% E_r), που υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% Er = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

για δείγματα ελέγχου ποιότητας που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και στο σύνολο των ημερών, αντίστοιχα. Το % E_r δείχνει πόσο απέχει η τιμή (x) των μετρήσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, από την ονομαστική (θεωρητική) τιμή (μ), δηλαδή την συγκέντρωση του αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα ελέγχου ποιότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές του % E_r , που εκφράζουν την ορθότητα της μεθόδου, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

7.8. Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για την trans-ρεσβερατρόλη εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας στο κρασί. Επίσης, υπολογίστηκε η απόλυτη ανάκτηση του εσωτερικού προτύπου, της μεθακουαλόνης. Αναλύθηκαν από έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, χαμηλό, μεσαίο και υψηλό με βάση την αναπτυχθείσα μέθοδο. Για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης του αναλύτη και του εσωτερικού του προτύπου, γινόταν παράλληλα απευθείας έγχυση έξι μεθανολικών διαλυμάτων ρεσβερατρόλης αντίστοιχων συγκεντρώσεων μετά από παραγωγοποίηση. Η απόλυτη ανάκτηση υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απόλυτη ανάκτηση} = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου:

E_1 είναι το εμβαδόν επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη μετά από την εκχύλιση του κρασιού και παραγωγοποίηση, και E_2 είναι το μέσο εμβαδόν επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης (FDA, 2001, Eurachem, 2014).

7.9. Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα εκτιμήθηκε προκαλώντας σκόπιμα μεταβολές, εντός συγκεκριμένων ορίων, σε παραμέτρους της μεθόδου που είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αξιοπιστία της ανάλυσης. Η μελέτη της ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε στο κρασί στο μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC2).

Στη μελέτη ανθεκτικότητας, οι παράμετροι της μεθόδου πρέπει να μεταβάλλονται στην τάξη μεγέθους των αποκλίσεων που μπορεί να συμβούν, όπως μεταβολές ± 0.5 μονάδες στο pH, $\pm 3-5^\circ\text{C}$ στις θερμοκρασίες και $\pm 3\%$ της αριθμητικής

τιμής σε άλλες παραμέτρους που χρησιμοποιούνται σε μία μέθοδο (Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002, ICH, 2005). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν να μεταβληθούν τρεις παράμετροι από το στάδιο κατεργασίας του δείγματος κρασιού και τέσσερις παράμετροι από τις χρωματογραφικές συνθήκες των μεθόδων που αναπτύχθηκαν. Οι μεταβολές που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν:

- στη θερμοκρασία παραγωγοποίησης των δειγμάτων, μετά την έκλουση και εξάτμιση υπό N₂, από 70°C σε 75°C,
- στην αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλουσης των αναλυτών (διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία, v/v/v) από 85:15:2 σε 80:15:3,
- στην αρχική θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης από 100°C σε 95°C,
- στη θερμοκρασία του σημείου έγχυσης του δείγματος από 260°C σε 255°C, και
- στο δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματόμετρου μαζών το οποίο αυξήθηκε κατά 3% της τιμής του δυναμικού λειτουργίας που ελήφθη από την τελευταία ρύθμιση του φασματόμετρου μαζών (tuning).

Πίνακας 4. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού ρεσβερατρόλης σε κρασί

Χρωματογραφικές συνθήκες	
Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	260°C
Θερμοκρασία πηγής ιονισμού	200°C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	300°C
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1.0 mL/min
Αρχική θερμοκρασία στήλης (χρόνος ανάσχεσης)	100°C (1 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας	40°C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης (χρόνος ανάσχεσης)	300°C (17 min)

Στη μελέτη ανθεκτικότητας, οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το λόγο των αποκρίσεων του αναλύτη προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου. Στη

συνέχεια, έγινε σύγκριση της μέσης τιμής του λόγου των αποκρίσεων από δείγματα που αναλύθηκαν με τις αναπτυχθείσες μεθόδους (χωρίς μεταβολές), με τη μέση τιμή του λόγου των αποκρίσεων από δείγματα με τις τροποποιημένες μεθόδους με τις μεταβολές που προαναφέρθηκαν, και υπολογίστηκε η διαφορά τους (D_i) κάθε φορά. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD_i) σύμφωνα με την παρακάτω μαθηματική εξίσωση:

$$SD_i = \sqrt{2 \times \sum \left(D_i^2 / n \right)}$$

όπου n , το πλήθος των μεταβολών που πραγματοποιήθηκαν (Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002).

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ TRANS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ΣΕ ΚΡΑΣΙ

8.1. Εισαγωγή

Η *trans*-ρεσβερατρόλη, σύμφωνα με τη βελτιστοποιημένη μεθοδολογία, απομονωνόταν από τα δείγματα κρασιού μετά από καταβύθιση ενδογενών συστατικών (του κρασιού) με ακετονιτρίλιο και εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες Bond Elut LRC Certify . Στη συνέχεια, τα εκλούσματα που περιείχαν τους αναλύτες εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και γινόταν παραγωγοποίηση με BSTFA σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά. Μετά από εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και ανασύσταση με 70 μ L οξικού αιθυλεστέρα, γινόταν έγχυση 1 μ L από το δείγμα σε αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Η μέθοδος προσδιορισμού των ισομερών *cis*- και *trans*-ρεσβερατρόλης έχει περιγραφεί αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

8.2. Εκλεκτικότητα

Έξι διαφορετικά τυφλά δείγματα αραιωμένου λευκού κρασιού αίματος, κατεργάσθηκαν όπως έχει περιγραφεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο της μεθόδου

προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί, χωρίς την προσθήκη του αναλύτη ή του εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, δεν παρατηρήθηκε κάποια παρεμπόδιση από τα συστατικά του κρασιού στους χρόνους ανάλυσης της *trans*-ρεσβερατρόλης και του εσωτερικού προτύπου (μεθακουαλόνη).

8.3. Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το κατώτατο όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί, υπολογίστηκαν, με βάση:

- το λόγο της απόκρισης του αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος λευκού κρασιού στο χρόνο ανάλυσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 3 ($S/N > 3:1$) και βρέθηκε να είναι 0.50 ng/mL.
- το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος κρασιού στο χρόνο ανάλυσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 10 ($S/N > 10:1$) και βρέθηκε να είναι 0.050 µg/mL.

8.4. Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης στο κρασί πραγματοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές ημέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων, που παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση. Οι συγκεντρώσεις των 6 σημείων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τον εν λόγω αναλύτη, καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρονται στον Πίνακα 2. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής $y=ax+\beta$, όπου:

y = λόγος επιφάνειας κορυφής του αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής του εσωτερικού προτύπου και

x = λόγος της συγκέντρωσης του αναλύτη εκφρασμένη σε µg/mL προς τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου εκφρασμένη σε µg/mL.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί για τις 3 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) της κλίσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 για την *trans*-ρεσβερατρόλη. Η επί τοις εκατό (%) σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) της κλίσης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης αποτέλεσε κριτήριο της ενδοργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση για εύρος συγκεντρώσεων της *trans*-ρεσβερατρόλης από 0.05 έως 5.00 µg/mL στο κρασί. Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων σε όλες τις σειρές ανάλυσης ($R^2 \geq 0.990$).

Πίνακας 5. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 3 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την *trans*-ρεσβερατρόλη στο κρασί, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=4.3258 \cdot x+0.4398$	0.9979
2 ^η	$y=4.2300 \cdot x+0.6580$	0.9900
3 ^η	$y=4.6396 \cdot x+0.2657$	0,9965
Μέση εξίσωση	$y=4.3985 (\pm 0.2143) \cdot x+0.4545 (\pm 0.1966)$	
% RSD κλίσεων	4.9	

8.5. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης κρασιού σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους (% E_r) για την κάθε ημέρα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 για την *trans*-ρεσβερατρόλη. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -14 και 15, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και για το σύνολο των ημερών. Οι τιμές αυτές ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ (στο LOQ $\pm 20\%$).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για την *trans*-ρεσβερατρόλη σε κρασί.

Ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6
		Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0.05	0.1	0.5	1.00	2.00
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0.044	0.09	0.56	1.13	2.01	4.97
	% E _r	-12	-10	12	13	0.5	-0.6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0.057	0.09	0.43	1.1	2.29	4.73
	% E _r	14	-10	-14	10	14.5	-5.4
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0.045	0.11	0.44	1.15	2.10	4.93
	% E _r	-10	10	-12	15	5	-1.4

8.6. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί, εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας:

- 0.15 μg/mL (QC1, χαμηλό επίπεδο)
- 2.00 μg/mL (QC2, μεσαίο επίπεδο)
- 4.00 μg/mL (QC3, υψηλό επίπεδο)

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου για τις 3 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7, για την *trans*-ρεσβερατρόλη.

Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται στον

Πίνακα 8. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκε από την % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης των 3 ημερών και ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ($\leq 5\%$) και συγκεκριμένα 4.9% για τη ρεσβερατρόλη.

8.7. Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας κτασιού, για την κάθε ημέρα και οι μεγαλύτερες, κατά απόλυτη τιμή, μέσες τιμές του % E_r που παρατηρήθηκαν ήταν:

- στο χαμηλό επίπεδο ελέγχου ποιότητας (QC1), 0.0% (εύρος, -14 έως 10%),
- στο μεσαίο επίπεδο ελέγχου ποιότητας (QC2), 6.3% (εύρος, -12.5 έως 15%),
- στο υψηλό επίπεδο (QC3), 5.9% (εύρος, -12.5 έως 15%) για την *trans*-ρεσβερατρόλη.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου εντός της ημέρας σε κρασί για τις 3 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7 για την *trans*-ρεσβερατρόλη.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου δια των ημερών (3 ημέρες) σε κρασί παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 8. Οι τιμές για την ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Πίνακας 7. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την *trans*-ρεσβερατρόλη σε κρασί.

Ημέρα	QC1 (0.15 µg/mL)			QC2 (2.00 µg/mL)			QC3 (4.00 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ⁿ	0.14 ± 0.01	7.14	-6.7	2.05 ± 0,23	11	2.5	4.15 ± 0.40	11	3.8
2 ⁿ	0.13 ± 0.01	7.69	-13	2.02 ± 0,21	10	1.0	4.11 ± 0.24	5.9	2.8
3 ⁿ	0.15 ± 0.01	6.67	0.0	2.07 ± 0,13	6.3	3.5	3.90 ± 0.37	9.4	-2.5

Πίνακας 8. Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα και ορθότητα δια των ημερών (3 ημέρες) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

Αναλύτης	Αναμενόμενη Συγκέντρωση (µg/mL)	Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mL)	Ορθότητα δια των ημερών (% E _r)	Ενδοεργαστηριακή Αναπαραγωγικότητα (% RSD, n=18)
trans-ρεσβερατρόλη	0.15	0.14 ± 0.01	-6.7	7.1
	2.00	2.05 ± 0.18	2.4	8.8
	4.00	4.05 ± 0.34	1.3	8.4

8.8. Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου σε κρασί προσδιορίστηκε για την *trans*-ρεσβερατρόλη στα τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Επί τοις εκατό (%) ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί.

Αναλύτης	Συγκέντρωση (µg/mL) (n=6)	% απόλυτη ανάκτηση (± SD)
trans-ρεσβερατρόλη	0.15	105 ± 5
	2.00	95 ± 8
	4.00	108.8 ± 5.2

8.9. Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε μεταβάλλοντας σκόπιμα τις επτά παραμέτρους που επιλέχθηκαν από τα στάδια της κατεργασίας των δειγμάτων και της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης. Παρασκευάστηκαν είκοσι εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2) και κατεργάστηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί. Τα τέσσερα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τις χρωματογραφικές παραμέτρους της αναπτυχθείσας μεθόδου, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα αναλύθηκαν ανά τέσσερα με τη μέθοδο τροποποιημένη ως προς: α) την αρχική θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης, β) τη θερμοκρασία του σημείου έγχυσης του δείγματος και γ) το δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματογράφου μαζών. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν 8 εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2), εκ των οποίων τέσσερα δείγματα μετά την έκλυση των αναλυτών και την εξάτμιση (υπό N₂) παραγωγοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 75°C, και τέσσερα δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας την αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλυσης (από 85:15:2 σε 80:15:3).

Βάσει των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν για την *trans*-ρεσβερατρόλη, η απόκλιση αυτή θεωρείται αμελητέα και ως εκ τούτου δεν μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα της ανάλυσης.

9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ *TRANS*-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ-ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΡΑΣΙΟΥ

Εισαγωγή

Η μέθοδος προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης που αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε, εφαρμόστηκε και σε πραγματικά δείγματα κρασιού. Τα κρασιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δείγματα κρασιών που αποκτήθηκαν από χορηγία των ανθρώπων του εργαστηρίου, από προσωπική χρήση καθώς επίσης και δειγμάτων που ελήφθησαν από τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ κύριο Μαγιάτη Προκόπη.

Στόχος ήταν η ανίχνευση και ο υπολογισμός των επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης των μελετούμενων ελληνικών κρασιών με σκοπό τη σύγκρισή τους με ξένα κρασιά.

Πίνακας 10. Μέτρηση επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης σε πραγματικά δείγματα διαφόρων τύπων κρασιού με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού της σε κρασί με GC-MS.

Κωδικός	Τύπος κρασιού	Συγκέντρωση της <i>trans</i> -ρεσβερατρόλης (μg/mL)
W1	Merlot Μαρκόπουλο Α	0.56
W2	Merlot Αγιωργήτικο Μαρκόπουλο	2.88
W3	Merlot Μαρκόπουλο Β	4.72
W4	Merlot Μαρκόπουλο Γ	2.53
W6	Αγιωργήτικο Μουχτάρι Μέγαρο	1.42
W7	Αγιωργήτικο Ροζέ Α	0.082
W8	Αγιωργήτικο Πείραμα	0.031
W9	Αγιωργήτικο Νεμέας Α	2.66

W10	Αγιοργήτικο Ροζέ Β	0.51
W11	Αγιοργήτικο Κορωπί	1.28
W12	Αγιοργήτικο Νεμέας Β	0.84
W13	Ροζέ Πειραματικό	0.81
W14	Μοσχοφίλερο Κόρινθος	0.31
W15	Ρετσίνα Αττικής	0.07
W16	Σαββατιανό–Ροδίτη Μέγαρο-Αχαΐα Α	0.23
W17	Σαββατιανό-Ροδίτη Μέγαρο Αχαΐα Β	0.15
W18	Αμπελώνας Παπαϊώαννου Π.Γ.Ε. Κορινθία Ροδίτης-Sauvignon Λευκός Ξηρός 2019	0.083
W19	Μοναστήρι Πάρνηθας Θρακομακεδόνες «Χειροποίητο»	0.35
W20	Calliga 2011 Π.Γ.Ε. Στερεά Ελλάδα Cabernet Sauvignon-Ελληνικά Κελάρια	0.72
W21	«Χειροποίητο» Λαμία	0.13
W23	Genesis Stelios Kechris family Sauvignon blanc-roditis Dry W.W Π.Γ.Ε Μακεδονία	0.22
W24	Αγιοργήτικο Μποστάρη 2015 Νεμέα ΠΟΠ ερυθρό	2.61
W25	Thestia Winery Dry Rose 2015Ποικιλιακός Οίνος (Merlot+Οίνος Ξηρός Ερυθρωπός)	1.45
W26	DioFili Siatista Winery Xinomavro 2011 Dry Red wine P.G.I. Siatista	1.54
W27	Οίνος σπιτικός 1 ερυθρός	1.88
W28	Οίνος σπιτικός 2 ερυθρός	1.15
W29	Οίνος σπιτικός 1 λευκός	0.12
W30	Οίνος σπιτικός 2 λευκός	0.25

W31	Οίνος σπιτικός 3 ερυθρός	0.79
W32	Οίνος σπιτικός 4 ερυθρός	1.44
W33	Οίνος σπιτικός 3 λευκός	0.019
W34	Οίνος σπιτικός 4 λευκός	0.46
W35	Οίνος σπιτικός 5 ερυθρός	0.60
W36	Οίνος σπιτικός 6 ερυθρός	3.86
W37	Οίνος σπιτικός 7 ερυθρός	1.40
W38	Οίνος σπιτικός 8 ερυθρός	3.28
W39	Οίνος σπιτικός 9 ερυθρός	0.92
W40	Οίνος σπιτικός 10 ερυθρός	1.70
W41	Οίνος σπιτικός 5 λευκός	0.46
W42	Οίνος σπιτικός 6 λευκός	0.38

Πίνακας 11. Τιμές συγκέντρωσης *cis*- και *trans*- ρεσβερατρόλης σε οίνους ξένης προέλευσης (Soleas et al. 1997).

Varietal	<i>cis</i> -Resveratrol (mg/L)	<i>trans</i> -Resveratrol (mg/L)
Cabernet Sauvignon	0.90	0.54
Cabernet Sauvignon	1.19	0.75
Cabernet Sauvignon	4.62	4.59
Pinot noir	1.35	0.54
Pinot noir	0.56	0.74
Pinot noir	0.73	1.12
Pinot noir	1.43	1.00
Cabernet franc	0.57	0.91
Cabernet franc	0.52	0.68
Cabernet franc	0.64	0.34
Cabernet franc	0.73	1.03
Gamay noir	0.30	0.82
Gamay noir	0.68	0.72
Gamay noir	0.77	1.56
Gamay noir	2.23	1.74
Merlot	0.94	1.15
Merlot	0.75	0.38
Marechal Foch	1.22	1.04
DeChaunac	0.10	0.04
Baco noir	0.90	0.03
Concord	0.03	0.19
Chardonnay	0.06	<0.01
Muscat (exp.)	<0.01	<0.01
Seyval blanc	0.04	0.02
Vidal	0.03	0.11

10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ρεσβερατρόλη αποτελεί φυσικό συστατικό της γενικής κατηγορίας των πολυφαινολών, ουσιών με σημαντική αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική, αντιγηραντική και αντικαρκινική δράση. Συναντάται συνήθως σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φλούδα των καρπών των σταφυλιών, ιδιαίτερα των κόκκινων ποικιλιών, στα φύλλα του ελάτου και του ευκαλύπτου, στα μούρα, στους ξηρούς καρπούς, καθώς και σε άλλα 70 φυτικά προϊόντα σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση και επικύρωση κατάλληλης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό της (*trans*) ρεσβερατρόλης σε κρασιά με τη χρήση της τεχνικής GC-MS κατόπιν παραλαβής της με εκχύλιση στερεής φάσης (SPE).

Το στάδιο της προκατεργασίας των δειγμάτων κρασιού περιελάμβανε τον καθαρισμό τους, την απομόνωση και το διαχωρισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης, που αποτελεί το δραστικό ισομερές του ρακεμικού μίγματος της ρεσβερατρόλης, από τα ενδογενή συστατικά του κρασιού. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες τύπου Bond Elut LRC Certify μετά από καταβύθιση των ενδογενών συστατικών με ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε παραγωγοποίηση του υπό μελέτη αναλύτη με BSTFA και ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής της.

Η αναπτυχθείσα και βελτιστοποιημένη μέθοδος προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης σε (κόκκινο και λευκό) κρασί είναι :

- εκλεκτική ως προς τα ενδογενή συστατικά του εκάστοτε κρασιού,
- ειδική,
- ταχεία και χαμηλού κόστους,
- υψηλής ευαισθησίας, όπως υποδηλώνεται από τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης,
- ακρίβειας και
- επαναληψιμότητας .

Η μέθοδος αυτή προσφέρει μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων της *trans*-ρεσβερατρόλης που καλύπτει τις πιθανές συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται σε διάφορες ποικιλίες κρασιού. Πράγματι κατέστη εφικτός, ο προσδιορισμός της ουσίας αυτής ακόμη σε δείγματα κρασιού που η συγκέντρωσή της ήταν εξαιρετικά χαμηλή. Επίσης, παρουσιάζει υψηλά ποσοστά % απόλυτης ανάκτησης του αναλύτη και σημαντική ανθεκτικότητα σε μεταβολές ορισμένων χρωματογραφικών συνθηκών και παραμέτρων της προκατεργασίας των δειγμάτων κρασιού. Επιπλέον η αναλυτική τεχνική GC-MS (EI), η οποία χρησιμοποιήθηκε, αποτελεί μία από τις πλέον διαδεδομένες και διαθέσιμες αναλυτικές τεχνικές σε ερευνητικά εργαστήρια παγκοσμίως.

Συγκριτικά με άλλες δημοσιευμένες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούν GC-MS, η μεθοδολογία αυτή πλεονεκτεί στα παρακάτω σημεία:

- Επιτυγχάνει το διαχωρισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης από το *cis* ισομερές. Αυτό μας επιτρέπει, να μη γνωρίζουμε απλώς τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης ως σύνολο, αλλά να γνωρίζουμε ακριβώς σε τι ποσοστό η ωφέλιμη για τον οργανισμό *trans*-ρεσβερατρόλη μετατρέπεται στη *cis*-μορφή, η οποία δε διαθέτει τις ευεργετικές για τον οργανισμό ιδιότητες. Η μετατροπή συμβαίνει, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας του ηλιακού φωτός. Επομένως, με τη χρήση της παρούσας μεθόδου, δίνεται η δυνατότητα αναγνώρισης κρασιών με υψηλή περιεκτικότητα σε *trans*-ρεσβερατρόλης, αλλά, επίσης, πιθανόν, μέσω αλλαγών στη διαδικασία παραγωγής των κρασιών, ο περιορισμός της μετατροπής της στο *cis* ισομερές.
- Έχει πραγματοποιηθεί πλήρης επικύρωση της βελτιστοποιημένης μεθόδου, πλην του ελέγχου σταθερότητας (καθότι δεν κρίθηκε απαραίτητο) για τον προσδιορισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης σε κρασί, η οποία δεν περιλαμβάνεται σε όλες τις αντίστοιχες δημοσιευμένες εργασίες (Tokuzoglu et al. 2005, Ragab et al. 2006, Cai et al. 2008).

- Η αναπτυχθείσα μέθοδος προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης παρουσιάζει χαμηλά όρια ανίχνευσης, συνεπώς και βελτιωμένη (Πίνακας 1) ή παρόμοια (Viñas et al. 2009) ευαισθησία σε σχέση με όλες τις ήδη δημοσιευμένες μεθόδους με GC-MS. Όσο αναφορά στο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ = 0,5 µg/mL) της εν λόγω μεθόδου, αυτό είναι χαμηλότερο (Soleas et al.2001a, Soleas et al.2001b), παρόμοιο (Montes et al. 2010) ή υψηλότερο (Blache et al. 1997, Viñas et al. 2009, Viñas et al. 2011, Rodríguez-Cabo et al. 2012, Cacho et al. 2013, Francioso et al 2019).
- Τα ποσοστά ανάκτησης από την SPE της *trans*- ρεσβερατρόλης που αναλύθηκε είναι συγκρίσιμα με εκείνα άλλων μεθοδολογιών που χρησιμοποιούν GC, και εφάρμοσαν την LLE, την SPE, την SPME ή άλλες μεθόδους εκχύλισης για την απομόνωση του αναλύτη από το κρασί (Πίνακας 1).
- Η βελτιστοποιημένη μέθοδος σε κρασί παρουσιάζει σημαντική ανθικότητα σε μεταβολές ορισμένων χρωματογραφικών συνθηκών και παραμέτρων της προκατεργασίας των δειγμάτων κρασιού, η οποία δεν ελέγχεται πάντα σε αντίστοιχες δημοσιευμένες εργασίες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Στη συνέχεια, η ανωτέρω μέθοδος εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της *trans*-ρεσβερατρόλης σε οίνους ελληνικής προέλευσης (Πίνακας 10). Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της υπό μελέτη ουσίας είναι 1,13 µg/mL (εύρος, 0,019-4,72 µg/mL). Το μεγάλο εύρος των επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης αποδίδεται στη μέτρηση τόσο ερυθρών οίνων(υψηλές τιμές συγκεντρώσεων) όσο και λευκών και ροζέ ποικιλιών (χαμηλές τιμές συγκεντρώσεων). Όπως αναφέρθηκε οι συγκεντρώσεις αυτές αφορούν στο δραστικό *trans*-ισομερές το οποίο επιτελεί πολυδιάστατο βιολογικό ρόλο. Σε όλα τα δείγματα κρασιού που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε επίσης η ύπαρξη του *cis* ισομερούς που όμως δεν ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της εν λόγω μεθόδου.

Σύμφωνα με δεδομένα προηγούμενων ερευνών, οι αντίστοιχες μέσες τιμές (εύρος) συγκεντρώσεων της *trans*-ρεσβερατρόλης σε γαλλικά κρασιά ήταν 0,78 μg/mL (από <0,01 έως 4,59 μg/mL) (Soleas et al. 1997). Ο προσδιορισμός των επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης στα συγκεκριμένα γαλλικά κρασιά πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση με τη χρήση της τεχνικής GC-MS, κατόπιν κατεργασίας των δειγμάτων με SPE και παραγωγοποίησης του αναλύτη με BSTFA. Καθώς τα δείγματα κρασιού ελληνικής και γαλλικής προέλευσης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ίδια χρωματογραφική τεχνική (GC-MS) και μετά από αντίστοιχη κατεργασία (SPE, αντιδραστήριο παραγωγοποίησης) αν και από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες με διαφορετικές μεθόδους και σε διαφορετική χρονική στιγμή τα αποτελέσματα των αναλύσεων μπορούν έμμεσα να συγκριθούν. Έτσι σε ό,τι αφορά στη σύγκριση των επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης στα ελληνικά (Πίνακας 10) και ξένα (Πίνακας 11) κρασιά, έμμεσα διαπιστώνεται ότι η παρουσία της *trans*-ρεσβερατρόλης στα ελληνικά κρασιά ήταν υψηλότερη (1,13 μg/mL) από την αντίστοιχη των γαλλικών κρασιών (0,78 μg/mL). Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων ελληνικής προέλευσης που αναλύθηκε ήταν σχεδόν διπλάσιος από τον αριθμό των γαλλικών. Στα ξένα κρασιά σύμφωνα με τον Πίνακα 11, την υψηλότερη τιμή παρουσιάζει το Cabernet Sauvignon. Ο συγκεκριμένος οίνος, έχει συγκέντρωση *trans*-ρεσβερατρόλης ίση με 4,59 μg/mL. Τα υπόλοιπα μελετηθέντα κρασιά, εμφανίζουν τιμές σημαντικά μικρότερες, με υψηλότερη την τιμή του Gamay noir που εμφανίζει συγκέντρωση *trans*-ρεσβερατρόλης ίση με 1,74 μg/mL. Αντιθέτως, τα ελληνικά κρασιά που μελετήθηκαν με τη μέθοδο που βελτιστοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, εμφανίζουν υψηλότερες τιμές. Ειδικά το Merlot Μαρκόπουλο Β, έχει συγκέντρωση *trans*-ρεσβερατρόλης ίση με 4,72 μg/ml. Ακόμη αρκετοί ελληνικοί οίνοι, εμφανίζουν σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις *trans*-ρεσβερατρόλης, γεγονός που τα καθιστά πλούσια στο μελετούμενο μόριο, το οποίο παρουσιάζει όλα τα ευεργετικά οφέλη για τον οργανισμό που αναλύθηκαν νωρίτερα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Αυτό μας επιτρέπει να πούμε με σχετική ασφάλεια ότι τα

ελληνικά κρασιά, σε ότι αφορά στα επίπεδα της ρεσβερατρόλης και συγκεκριμένα του *trans* ισομερούς, έχουν υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα ξένα (γαλλικά) κρασιά.

Αναφορικά με μετρήσεις ελληνικών κρασιών στη διεθνή βιβλιογραφία, ο προσδιορισμός των επιπέδων της *trans*-ρεσβερατρόλης σε αυτά έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (Dourtoglou et al. 1999) ή φθορισμού (Gortzi et al. 2013). Ωστόσο, λόγω της διαφορετικής χρωματογραφικής τεχνικής και μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε σε αυτές τις εργασίες, αναφορικά με τη μέθοδο που αναλύθηκε και βελτιστοποιήθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, κρίνεται ότι η σύγκριση των αποτελεσμάτων δεν είναι δόκιμη και ασφαλής. Εντούτοις, η συγκέντρωση της *trans*-ρεσβερατρόλης στην ποικιλία κρασιού Cabernet, είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη τιμή του Calliga 2011 Π.Γ.Ε. Στερεά Ελλάδα Cabernet Sauvignon-Ελληνικά Κελάρια (Πίνακας 10). Στα δείγματα ποικιλιών Cabernet που αναλύθηκαν από τους Dourtoglou και συν. 1999, τα επίπεδα της *trans*-ρεσβερατρόλης ήταν ελαφρώς υψηλότερα σχετικά με τις ποικιλίες Cabernet του Πίνακα 10. Η διαφορά αυτή πιθανόν οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης και παραγωγής των εν λόγω κρασιών καθώς και στη διαφορετική περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης στα σταφύλια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των οίνων τη χρονιά εκείνη .

Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε για το σκοπό της παρούσας εργασίας και μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της *trans*-ρεσβερατρόλης που περιέχεται σε κάθε είδος οίνου (κόκκινο, λευκό ή ροζέ, ελληνικής ή ξένης προέλευσης) μπορεί να καταστεί δυνατή και η δημιουργία συστήματος ταξινόμησης των οίνων σύμφωνα με την περιεκτικότητά τους στην αναλυθείσα ουσία.

Σε ό,τι αφορά στον υπολογισμό της ρεσβερατρόλης σε αίμα ατόμου, τα αποτελέσματα είναι άκρως ενθαρρυντικά. Κατέστη εφικτός ο ακριβής υπολογισμός της ρεσβερατρόλης εμβολιασμένης σε αίμα, γεγονός που μας επιτρέπει τη χρήση της παρούσας μεθόδου για τον υπολογισμό της σε δείγμα αίματος *in vivo*. Το πρόβλημα που παρουσιάζεται στον υπολογισμό της ρεσβερατρόλης στο αίμα μετά την κατανάλωση του κρασιού δεν οφείλεται σε αστοχία της μεθόδου, αλλά στη φύση της ρεσβερατρόλης και στο γεγονός ότι δεσμεύεται σε πολλά διαφορετικά μόρια του οργανισμού κατά τη διαδικασία της βιομετατροπής.

Πρέπει να διευκρινιστεί ότι σύμφωνα με έρευνες μόνο ένα μικρό μέρος της λαμβανόμενης ρεσβερατρόλης φτάνει στους ιστούς των θηλαστικών (Kulkarni et al 2014) . Σε δόσεις παρόμοιες με αυτές που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης στο πλάσμα είτε δεν ανιχνεύονται καθόλου είτε είναι σαφώς κάτω από το όριο ανίχνευσης που χρησιμοποιείται *in vitro*. Ακόμη και σε δόσεις 5 g θα οδηγούσαν μόνο σε πολύ χαμηλές μικρομοριακές συγκεντρώσεις στο αίμα (2-4 μM) (Almeida et al., 2009, Boocock et al., 2007, Patel et al., 2013). Είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψιν ότι η ρεσβερατρόλη είναι ένα λιπόφιλο μόριο που μπορεί να μετακινείται γρήγορα δια μέσου των μεμβρανών. Επόμενως τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης ενδοκυτταρικά και στους ιστούς του ανθρώπου αναμένεται να είναι υψηλότερα από ότι τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης στο πλάσμα υποδηλώνουν. Αυτή η υπόθεση, υποστηρίζεται από πρόσφατα στοιχεία τα οποία έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να μεταβολιστεί γρήγορα σε ανθρώπινα κύτταρα του παχέος εντέρου σε σταθερές μορφές ρεσβερατρόλης συζευγμένης με θειικό οξύ, οι οποίες σταδιακά θα αποκτήσουν την αρχική τους μορφή παρέχοντας τα ευεργετικά αποτελέσματα της δράσης της ρεσβερατρόλης *in vivo* (Patel et al., 2013). Εάν η ρεσβερατρόλη συζευγμένη με θειικό οξύ μεταβολίζεται με τον ίδιο τρόπο και σε άλλους ιστούς, για παράδειγμα σε περιφερικούς ιστούς όπως είναι ο μυϊκός ή ο λιπώδης ιστός είναι κάτι το οποίο πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω. Για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου προβλήματος είναι απαραίτητη η ενζυμική

κατεργασία του δείγματος του αίματος ώστε να αποδεσμευτεί εκ νέου η ρεσβερατρόλη και να είναι εφικτός ο υπολογισμός της συγκέντρωσής της. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει να προηγηθεί επώαση του δείγματος αίματος με τα ένζυμα σουλφατάση και γλυκουρονιδάση σε συγκεκριμένες συνθήκες, ώστε η ρεσβερατρόλη να είναι ελεύθερη στο αίμα και να μπορεί στη συνέχεια να προσδιοριστεί με τη χρήση της βελτιστοποιημένης μεθόδου. Ως μελλοντικό αντικείμενο έρευνας, προτείνεται η διεξαγωγή πειράματος που στόχος του θα είναι η μελέτη των επιπέδων της ρεσβερατρόλης σε αίμα ασθενούς με τη χρήση της υπάρχουσας μεθόδου. Αναλυτικότερα, ο υπολογισμός δειγμάτων αίματος ασθενούς πριν και μετά την κατανάλωση οίνου γνωστής συγκέντρωσης ρεσβερατρόλης και κατόπιν υπολογισμός της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης έπειτα από κατεργασία του δείγματος με τα ένζυμα σουλφατάση και γλυκουρονιδάση ώστε να είναι εφικτός ο υπολογισμός της ρεσβερατρόλης που απελευθερώνεται στο αίμα με τη δράση των εν λόγω ενζύμων. Τέλος, συνιστάται και ο προσδιορισμός (γνωστής συγκέντρωσης) ρεσβερατρόλης που έχει εμβολιαστεί στο αίμα του ασθενούς, ποσότητας ίσης με την ποσότητα της ρεσβερατρόλης η οποία λαμβάνεται μέσω του κρασιού.

Επιπροσθέτως, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές η ρεσβερατρόλη δεσμεύεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια (αλλιώς RBCs). Για τον υπολογισμό της ποσότητας που εγκλωβίζεται στα RBCs δεν υπάρχει γνωστός τρόπος που να επιτρέπει την απελευθέρωσή της. Ενδεχομένως, η κατακρήμνιση και καταστροφή των RBCs να οδηγεί στην αποδέσμευση της ρεσβερατρόλης στο αίμα, ωστόσο δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε εάν και σε τι βαθμό θα επηρεάζεται η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου λόγω της απελευθέρωσης των υπόλοιπων ουσιών που φυσιολογικά υπάρχουν στα RBCs.

11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aluyen J.K., Ton Q.N., Tran T., Yang A.E., Gottlieb H.B., and Bellanger R.A. (2012) Resveratrol: Potential as anticancer agent. *J. Diet. Suppl.* 9, pp. 45–56.

Almeida, L., Vaz-da -Silva, M., Falcão, A., Soares, E., Costa, R., Loureiro, A. I., et al. (2009) Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res.* 53(S1), pp., S7–15.

Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, pp. 337–342.

Bianchini, F., and Vainio, H. (2003) Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention ? *Eur J Cancer Prev.* 12(5), pp.417-425.

Bishayee A., Barnes K.F., Bhatia D., Darvesh A.S., Carroll R.T. (2010) Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev. Res.* 3, pp. 753–763.

Blache, D., Rustan, I., Durand, P., Lesgards, G., and Loreau, N. (1997) Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 702(1-2), pp. 103–110.

Bonnefont-Rousselot, D. (2016) Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, 8(5), pp. 250.

D.J. Boocock, K.R. Patel, G.E. Faust, D.P. Normolle, T.H. Marczylo, J.A. Crowell, D.E.

Brenner, T.D. Booth, A. Gescher, W.P. Steward, Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 848 (2007) 182–187.

Breen, D.M., Sanli, T., Giacca, A., and Tsiani, E. (2008) Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, pp. 117–122.

Cacho J.I., Campillo N., Viñas P., and Hernández-Córdoba M. (2013) Stir bar sorptive extraction with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol isomers in wines. *J Chromatogr A.*, 1315, pp. 21–27.

Cai, L., Koziel, J. A., Dharmadhikari, M., and (Hans) van Leeuwen, J. (2009) Rapid determination of trans-resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1216(2), pp. 281–287.

Carrizzo, A., Forte, M., Damato, A., Trimarco, V., Salzano, F., Bartolo, M., et al. (2013) Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem. Toxicol.* 61(2), pp. 215–226.

Cheng L., Yan B., Chen K., Jiang Z., Zhou C., Cao J., Qian W., Li J., Sun L., Ma J., et al.(2018) *Resveratrol-induced downregulation of NAF-1 enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine via the ROS/Nrf2 signaling pathways.* *Oxid. Med. Cell. Longev.* 9482018.

Dai, Q., Franke, A.A., Jin, F. et al. (2002) Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11(9), pp. 815–821.

Das, S., and Das, D.K. (2007) Anti-inflammatory responses of resveratrol, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 6, pp. 168–173.

De Stefani, E., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Mendilaharso, M., Carzoglio, J.C., Ronco, A. and Olivera, L. (1999) Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, 34, pp. 100–110.

Delucchi F., Berni R., Frati C., Cavalli S., Graiani G., Sala R., Chaponnier C., Gabbiani G., Calani L., Rio D.D., et al. (2012) Resveratrol treatment reduces cardiac progenitor cell dysfunction and prevents morpho-functional ventricular remodeling in type-1 diabetic rats. *PLoS ONE*, 7, e39836.

Diaz, M., Degens, H., Vanhees, L., Austin, C., and Azzawi, M. (2016). The effects of resveratrol on aging vessels. *Exp. Gerontol.*, 85, pp. 41-47.

Erlejman, A.G., Verstraeten, S.V., Fraga, C.G., and Oteiza, P.I. (2004) The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.*, 38(12), pp. 1311–1320.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods (2014). Διαθέσιμο στη διεύθυνση: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>. Πρόσβαση: 7 Ιουνίου 2020.

Farzaei M.H., Rahimi R., Nikfar S., and Abdollahi M. (2018) Effect of resveratrol on cognitive and memory performance and mood: A meta-analysis of 225 patients. *Pharmacol. Res.*, 128, pp. 338–344.

Filip V., Plockova, M., Smidrkal, J., Spickova, Z., Melzoch, K., and Schmidt, S. (2003) Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 83(4), pp. 585-593.

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2001).

Francioso, A., Laštovičková, L., Mosca, L., Boffi, A., Bonamore, A., and Macone, A. (2019). A gas chromatographic–mass spectrometric method for the simultaneous determination of resveratrol isomers and 2,4,6-trihydroxyphenanthrene in red wines exposed to UV-light. *J Agric Food Chem.* 67(42), pp. 11752–11757.

Frojdo, S., Cozzone, D., Vidal, H., et al. (2007) Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor. *Biochem J.*, 406, pp. 511–18.

Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., and Walker, J.E. (2007) Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, pp. 13632–13637.

Gortzi, O., Metaxa, X., Mantanis, G., and Lalas, S. (2013). Effect of artificial ageing using different wood chips on the antioxidant activity, resveratrol and catechin concentration, sensory properties and colour of two Greek red wines. *Food Chem.* 141(3), pp. 2887-2895.

Hatier, J.H.B., and Gould, K.S. (2008) Foliar anthocyanins as modulators of stress signals. *J. Theor. Biol.*, 253(3), pp. 625–627.

Hattori, R., Otani, H., Maulik, N., and Das, D.K. (2002) Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282(4), H1988–H1995.

Hector, K.L., Lagisz, M., and Nakagawa, S. (2012) The effect of resveratrol on longevity across species: a meta-analysis. *Biol Lett.*, 8(5), pp. 790-793.

Hou, X., Tong, Q., Wang, W., Xiong, W., Shi, C., and Fang, J. (2015) Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sci.*, 130(1), pp. 38–46.

Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Cohen, R.A., and Zang, M., (2008) SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 20015–20026.

Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B., and Sinclair, D.A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, pp. 191–196.

Hubbard, B.P., Gomes, A.P., Dai, H., Li, J., Case, A.W., Considine, T., Riera, T.V., and Lee, J.E. (2013) Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 339, pp. 1216–1219.

Hung, L.-M., Chen, J.-K., Huang, S.-S., Lee, R.-S. and Su, M.-J. (2000) Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research* 47(3), pp. 549-555.

International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonized tripartite guideline. Validation of Analytical procedures Text and methodology Q2(R1), step 4, 2005.

Iuga C., Alvarez-Idaboy J.R., and Russo N. (2012) Antioxidant activity of trans-resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: A quantum chemical and computational kinetics study. *J. Org. Chem.* 77, pp. 3868–3877.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., et al. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, pp. 218–220.

Klatsky A.L. (2003) Drink to your health? *Sci Am* 288, pp. 74–81.

Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellevoara, M., Teppo, L., Pukkala, E., and Aromaa, A. (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol.* 146(3), pp. 223-230.

Kulkarni, S.S., and Canto, C. (2015) The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852, pp. 1114-1123.

Lakshminarasimhan, M., Rauth, D., Schutkowski, M., and Steegborn, C. (2013) Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Aging* 5, pp. 151–154.

Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., and Kolonel, L.N. (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, pp. 154–160.

Li L., Qiu R.L., Lin Y., Cai Y., Bian Y., Fan Y., and Gao X.J. (2018) Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncol. Lett.* 15, pp. 9845–9851.

Li, J., Zhang, C.-X., Liu, Y.-M., Chen, K.-L., and Chen, G. (2017) A comparative study of anti-aging properties and mechanism: resveratrol and caloric restriction. *Oncotarget.* 8(39), pp. 65717-65729.

Liang, X., Wu, Y.P., Qiu, J.H., Zhong, K., and Gao, H. (2014) A Potent Antibrowning Agent from Pine Needles of *Cedrus deodara*: 2R,3R-Dihydromyricetin. *Food Sci.* 79(9), pp. 1643–1648.

Liu, Y., Ma, W., Zhang, P., He, S., and Huang, D. (2015) Effect of resveratrol on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin. Nutr.* 34, pp. 27–34.

Mader, S.S. (2010) *Human Biology*. 11th ed. New York, NY: McGraw-Hill.

Mitra S., and Dash R. (2018) Natural products for the management and prevention of breast cancer. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 23.

Montes, R., García-López, M., Rodríguez, I., and Cela, R. (2010) Mixed-mode solid-phase extraction followed by acetylation and gas chromatography mass spectrometry for the reliable determination of trans-resveratrol in wine samples. *Anal Chim Acta.* 673(1), pp. 47–53.

Montes, R., García-López, M., Rodríguez, I., and Cela, R. (2010) Mixed-mode solid-phase extraction followed by acetylation and gas chromatography mass spectrometry for the reliable determination of trans-resveratrol in wine samples. *Anal Chim Acta.* 673(1), pp. 47–53.

Naoumkina, M., and Dixon, R.A. (2008) Subcellular localization of flavonoid natural products: a signalling function? *Plant Signal. Behav.* 3(8), pp. 573–575.

Niessen, W.M.A., 2001. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Orata F. (2012) Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analytes, In *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biochemical and Industrial Applications*, Mold MA (ed.), InTech., pp. 83-108.

Park, S.J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, Rehmman, H., Taussig, R., Brown, A.L., et al. (2012) Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 148, pp. 421–433.

K.R. Patel, C. Andreadi, R.G. Britton, E. Horner-Glister, A. Karmokar, S. Sale, V.A. Brown, D.E. Brenner, R. Singh, W.P. Steward, A.J. Gescher, K. Brown, Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence, *Sci. Transl. Med.* 5 (2013) 205ra133.

Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., et al. (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* 8, pp. 157–168.

Pubchem (2019) *Resveratrol*. [Διαδικτυακά] Διαθέσιμο στο: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resberatrol>> [Ανακτήθηκε στις 7.9.2019].

Ragab, A. S., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J.-H., and Bobzin, S. C. (2006) Detection and Quantitation of Resveratrol in Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Agric Food Chem.* 54(19), pp. 7175–7179.

Renaud, S., and de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339(8808), pp. 1523-1526.

Riba A., Deres L., Sumegi B., Toth K., Szabados E., and Halmosi R. (2017) Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 6819281.

Rodríguez-Cabo, T., Rodríguez, I., & Cela, R. (2012) Determination of hydroxylated stilbenes in wine by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1258, pp. 21-29.

Sahebkar, A., Serban, C., Ursoniu, S., Wong, N.D., Muntner P., Graham, I.M., Mikhailidis, D.P., Rizzo, M., Rysz, J., Sperling, and LS, Lip, G.Y., Banach, M., Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration Group. (2015) Lack of efficacy of resveratrol on C-reactive protein and selected cardiovascular risk factors-Results from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol*. 189, pp. 47-55.

Salehi, B., Mishra, A.P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P.V.T., Martins, N., and Sharifi-Rad, J. (2018) Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines* 6(3), pp. 91.

Shen, Y., Cao, B., Snyder, N.R., Woepfel, K.M., Eles, J.R., and Cui, X.T., 2017. ROS responsive resveratrol delivery from LDLR peptide conjugated PLA-coated mesoporous silica nanoparticles across the blood–brain barrier. *Journal of Nanobiotechnology* 16, pp. 13.

Shukla Y. and Singh R. (2011) Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, pp. 1–8.

Singh N., Bansal Y., Bhandari R., Marwaha L., Singh R., Chopra K., and Kuhad A. (2017) Resveratrol protects against ICV collagenase-induced neurobehavioral and biochemical deficits. *J. Inflamm.* (Lond.) 14, pp. 14.

Sinha D., Sarkar N., Biswas J., and Bishayee A. (2016) Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* 40–41, pp. 209–232.

Soleas, G. ., Yan, J., and Goldberg, D. (2001b) Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological

fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 757(1), pp. 161–172.

Soleas, G. J., Yan, J., and Goldberg, D. M. (2001a) Measurement of trans-resveratrol, (+)-catechin, and quercetin in rat and human blood and urine by gas chromatography with mass selective detection. *Methods Enzymol.* 335, pp. 130–145.

Soleas, G.J., Diamandis, E.P., and Goldberg, D.M. (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem.* 30(2), pp. 91-113.

Stivala, L.A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U.M., Albin, A., Prosperi, E., and Vannini, V. (2001) Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* 276(25), pp. 22586-22594.

Sun A.Y., Wang Q., Simonyi A., and Sun G.Y. (2010) Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 41, pp. 375–383.

Teplova, V.V., Isakova, E.P., Klein, O.I., Dergachova, D.I., Gessler, N.N., and Deryabina, Y.I. (2018) Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 54(3), pp. 221-237.

Tili, E., and Michaille, J.J. (2016) Promiscuous effects of some phenolic natural products on inflammation at least in part arise from their ability to modulate the expression of global regulators, namely microRNAs. *Molecules* 21, E1263.

Tokuşoglu, O., Unal, M.K., and Yemiş, F. (2005) Determination of the Phytoalexin Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High-Performance Liquid Chromatographic Diode Array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem.* 53(12), pp. 5003-9.

Um, J.H., Park, S.J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M.W., Kim, M.K., Viollet, B., and Chung, J.H. (2010) AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59, pp. 554–563.

Van Ginkel P.R., Sareen D., Subramanian L., Walker Q., Darjatmoko S.R., Lindstrom M.J., Kulkarni A., Albert D.M., and Polans A.S. (2007) Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin. Cancer Res.* 13, pp. 5162–5169.

Vang, O., Ahmad, N., Baile, C.A., Baur, J.A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D.K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H.-Y., Ma, Q.-Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J.M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y.-J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., and Wu, J.M. (2011) What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. *PLoS One* 6(6), e19881.

Viñas, P., Campillo, N., Martínez-Castillo, N., and Hernández-Córdoba, M. (2009) Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1216(9), pp. 1279–1284.

Viñas, P., Martínez-Castillo, N., Campillo, N., and Hernández-Córdoba, M. (2011) Directly suspended droplet microextraction with in injection-port derivatization coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polyphenols in herbal infusions, fruits and functional foods. *J Chromatogr A.* 1218(5), pp. 639–646.

Volynets, A.P. (2010). *Fenol'nye soedineniya: fundamental'nye i prikladnye aspekty (Phenolic Compounds: Fundamental and Applied Aspects)*. Στο: Zagoskin, N.V. and Burlakov, E.B (επιμ.), Moscow: Nauchnyi mir.

Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M., and Sinclair, D. (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans, *Nature* 430, pp. 686–689.

Yan F., Sun X., and Xu C. (2018) Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes. *Exp. Ther. Med.* 15, pp. 1728–1734

Zhang H, Li C, Kwok ST, Zhang QW, Chan SW. (2013) A Review of the Pharmacological Effects of the Dried Root of *Polygonum cuspidatum* (Hu Zhang) and Its Constituents. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, pp. 1-13.

Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.P., Li, S., Chen, Y.M., and Li, H.B. (2016) Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients* 8(8), E515.

Zulueta A., Caretti A., Signorelli P., and Ghidoni R. (2015) Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 21, pp. 10636–10643.

Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657ΕΚ, σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνία των αποτεσμάτων, 2002.

Λιοδάκης, Σ., 2001. *Αναλυτική Χημεία*. Αθήνα: Παπασωτηρίου.

Χατζηιωάννου, Θ.Π. και Κουμπάρης, Μ.Α., 2003. *Ενόργανη ανάλυση*. Αθήνα: Ιδιωτική έκδοση.