



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ LC-MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ: Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ
ΝΑΡΙΝΓΕΝΙΝΗΣ

ΕΥΓΕΝΙΟΣ ΣΤΥΛΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2023

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σταμάτης Χαράλαμπος – Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεροθανάσης Ιωάννης – Ομότιμος Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τζάκος Ανδρέας – Αναπληρωτής Καθηγητής (Συνεπιβλέπων)

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κούκκου Άννα-Ειρήνη – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αλίβερτης Δημήτριος – Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αφένδρα Αμαλία - Σοφία – Επίκουρη Καθηγήτρια

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Καταπόδης Πέτρος – Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σταμάτης Χαράλαμπος – Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεροθανάσης Ιωάννης – Ομότιμος Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τζάκος Ανδρέας – Αναπληρωτής Καθηγητής (Συνεπιβλέπων)

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα ήθελα, αρχικά, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Σταμάτη Χαράλαμπο (Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών) για την ανάθεση του θέματος και για την ορθή καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, για τις συμβουλές και τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους, καθώς και για την παρότρυνση τους για έρευνα, ξεκινώντας από τον κ. Τζάκο Ανδρέα (Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας και συνεπιβλέποντα της διατριβής) ο οποίος υπήρξε πάντα πρόθυμος όλα αυτά τα χρόνια, να ακούσει τους προβληματισμούς και τις απογοητεύσεις μου, μεταδίδοντας πάντα αισιοδοξία και προτείνοντας λύσεις καθώς επίσης και τον κ. Γεροθανάση Ιωάννη (Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Χημείας) ο οποίος συνέβαλλε ουσιαστικά στην ανάπτυξη του θέματος της παρούσας μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται και στα άλλα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην εξέταση μου και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για το όμορφο και αλληλέγγυο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας διατριβής καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής. Θα ήθελα ωστόσο να ξεχωρίσω την Μαρία Χατζηαθανασιάδου για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη γυναίκα μου Γιολάντα για τη δύναμη που μου δίνει η παρουσία της, την κόρη μας Βασιλική - Ιωάννα που με το χαμόγελό της ομορφαίνει τη ζωή μας καθώς και τους γονείς μου που είναι πάντα δίπλα μου για να με στηρίζουν και στους οποίους οφείλω ό,τι είμαι σήμερα.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- 1 **Stylos EK.** et al. Tailoring naringenin conjugates with amplified and triple antiplatelet activity profile: Rational design, synthesis, human plasma stability and *in vitro* evaluation. *Biochim Biophys Acta*, 2017 Nov, 1861(11 Pt A), 2609-2618.
 2. **Stylos, EK.** et al. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2017 Mar 15, 1047:15-38.
 3. **Goulas, V.** et al. Functional Components of Carob Fruit: Linking the Chemical and Biological Space. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 1875.
-

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΠΑΡΑΛΛΗΛΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

2019

1. **Liapakis** et. al. Discovery of a stable tripeptide targeting the N-domain of CRF1 receptor. *Amino Acids* volume 52, pages1337–1351(2020).
2. **Vrettos I. E.** et al. Single Peptide Backbone Surrogate Mutations to Regulate Angiotensin GPCR Subtype Selectivity. *Chemistry* 2020 Aug 21;26(47):10690-10694. doi: 10.1002/chem.202000924. Epub 2020 Jul 21.
3. **Renziehausen** et. al. Encapsulation of temozolomide in a calixarene nanocapsule improves its stability and enhances its therapeutic efficacy against glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2019 Jun 18. pii: molcanther.1250.2018.
4. **Ntountaniotis** et. al. Host-Guest Interactions between Candesartan and Its Prodrug Candesartan Cilexetil in Complex with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: On the Biological Potency for Angiotensin II Antagonism. *Mol Pharm.* 2019 Mar 4;16(3):1255-1271.
5. **Magafa** et al. Novel stable analogues of the neurotensin C-terminal hexapeptide containing unnatural amino acids. *Amino Acids.* 2019 Jul;51(7):1009-1022.

2018

6. **Stylos EK.** et al. Development of a validated LC-MS/MS method for the *in vitro* and *in vivo* quantitation of sunitinib in glioblastoma cells and cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Nov 14;164:690-697.
7. **Stylos EK.** et. al. Development and validation of simple step protein precipitation UHPLC-MS/MS methods for quantitation of temozolomide in cancer patient plasma samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2019 Jan 5;162:164-170.
8. **Tsiailanis A.** et al. Designing Natural Product Hybrids Bearing Triple Antiplatelet Profile and Evaluating Their Human Plasma Stability. *Methods Mol Biol.* 2018;1824:371-385.

- 9.** **Stylos, EK.** et al. Tailoring Acyclovir Prodrugs with Enhanced Antiviral Activity: Rational Design, Synthesis, Human Plasma Stability and In vitro Evaluation. *Amino Acids*. 2018 Aug;50 (8):1131-1143.

- 10.** **Chatziathanasiadou MV.** et. al. Amplifying and broadening the cytotoxic profile of quercetin in cancer cell lines through bioconjugation. *Amino acids*, 2018 Feb;50(2):279-291.

2017

- 11.** **Vrettos I. E.** et al. Unveiling and tackling guanidinium peptide coupling reagent side reactions towards the development of peptide-drug conjugates. *RSC Adv.*, 2017, 7, 50519-50526.
-

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Stylos E. et al. Tailoring naringenin conjugates with amplified and triple antiplatelet activity profile: Rational design, synthesis, human plasma stability and *in vitro* evaluation. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο του ΙΜΕΘΑ, 21–23 Σεπτεμβρίου, 2017 (Προφορική παρουσίαση)

Stylos E. et al. Anticoagulant activity and determination of bioavailability of phytochemical compounds through LC-MS/MS. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο του ΙΜΕΘΑ, 22–24 Σεπτεμβρίου, 2016 (Γραπτή ανακοίνωση)

Stylos E. et al. Bioactivity amplification of naringenin through enzymatic sculpting. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο του ΙΜΕΘΑ, 22–24 Σεπτεμβρίου, 2016 (Γραπτή ανακοίνωση)

Stylos E. et al. Development, validation and application of UHPLC-MS/MS based methods for the quantitative analysis of sunitinib in human plasma and cancer lines-ISO 17025 Accreditation. 67ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 2016 (Γραπτή ανακοίνωση)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυσικά προϊόντα (NPs) διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας τους στη φύση, γεγονός που επιτρέπει τον εντοπισμό μορίων ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων. Επιπλέον, μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τη συνθετική και φαρμακευτική χημεία στο πλαίσιο της ανάπτυξης νέων παραγώγων με ενισχυμένη βιολογική δράση. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή θεωρούνται από τα σημαντικότερα NPs εξαιτίας των βιολογικών τους ιδιοτήτων και από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενώσεις παγκοσμίως. Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για φυσικά προϊόντα με πιθανά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, ενισχύει την ανάγκη για πιο αποτελεσματικές και εξελιγμένες αναλυτικές μεθόδους.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη μεθόδων υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS) για την ανάλυση φυσικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική της LC-MS χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο σταθερότητας της ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα, μιας φλαβονόνης που ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών καθώς και υβριδικών παραγώγων αυτής, που συντέθηκαν με σκοπό την ενίσχυση της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης.

Αρχικά, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη δομή, την προέλευση, τη βιοσύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες της γενικής κατηγορίας των φλαβονοειδών. Σε αυτή την κατηγορία NPs έχουν εστιάσει πολλές ερευνητικές μελέτες και πιο συγκεκριμένα στην εξεύρεση νέων πηγών με αυξημένη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Το χαρούπι το οποίο είναι ένα φυσικό προϊόν που έχει προσελκύσει την προσοχή της ερευνητικής κοινότητας εξαιτίας των πολυάριθμων οφελών του στην ανθρώπινη υγεία, αποτέλεσε αντικείμενο μιας εκτεταμένης βιβλιογραφικής ανασκόπησης εξαιτίας της περιεκτικότητας του σε φλαβονοειδή αλλά και σε ναρινγενίνη.

Η ναρινγενίνη επιλέχθηκε ως πρόδρομη ένωση για την ανάπτυξη νέων αντιαιμοπεταλιακών παραγώγων, όχι μόνο λόγω των βιολογικών και φαρμακολογικών της ιδιοτήτων, αλλά εξαιτίας της ελκυστικής της δομής που προσφέρει τη δυνατότητα τροποποίησης με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών. Πιο συγκεκριμένα συντέθηκαν τα υβρίδια 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη και 4'-DHA-ναρινγενίνη.

Για την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των σχεδιασμένων και νεοσυντιθέμενων αναλόγων ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα, απαραίτητο και σημαντικό βήμα είναι ο προσδιορισμός της σταθερότητας τους σε αυτό. Για να επιτευχθεί αυτό, αναπτύξαμε

πρωτόκολλα LC-MS για την ποσοτικοποίηση τόσο της σταθερότητας των υβριδίων ναρινγενίνης, όσο και για την παρακολούθηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ναρινγενίνης που απελευθερώνεται από την διάσπαση των συζευγμάτων αυτών στο ανθρώπινο πλάσμα, κατά τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο. Τέτοιες μεθοδολογίες έχουν μεγάλη σημασία για την ανάλυση των φυσικών προϊόντων και των κύριων μεταβολιτών τους σε πολύπλοκες μήτρες, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα, το πλάσμα, τα ούρα κτλ.

Αποδείχθηκε ότι το συζυγές 4'-DHA-ναρινγενίνη έχει επταπλάσια υψηλότερη σταθερότητα σε σχέση με την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη, η οποία αποικοδομήθηκε ταχέως και επέδειξε σημαντική ανασταλτική δράση και στις τρεις οδούς συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων επαγόμενης από τα ADP, AA και TRAP-6. Αυτό ήταν ιδιαίτερα σημαντικό, διότι επιτύχαμε να προσομοιώσουμε την ταυτόχρονη χορήγηση τριών αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων (φαρμάκων) σε ένα μόνο μόριο. Από την παρούσα μελέτη αναδεικνύεται εκ νέου η σημαντική συμβολή της LC-MS στον ποιοτικό έλεγχο των φυσικών προϊόντων, καθώς και στην ανακάλυψη νέων μεταβολιτών βιοτεχνολογικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος.

Λέξεις κλειδιά: φυσικά προϊόντα, χαρούπι, φλαβονοειδή, ναρινγενίνη, LC-MS/MS, αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία

ABSTRACT

Natural products (NPs) play a key role in the drug discovery process because of their great diversity in nature, which allows the identification of molecules of interest for the development of new therapeutic agents. In addition, they can form the basis for synthetic and medicinal chemistry in the context of the development of new derivatives with enhanced biological activity. In particular, flavonoids are considered among the most important NPs due to their biological properties and among the most commonly used compounds worldwide. The ever-increasing demand for natural products with potential benefits for human health, reinforces the need for more efficient and sophisticated analytical methods.

The aim of this thesis is the development of liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC-MS) methods for the analysis of natural products. More specifically, the LC-MS technique was used for the quantification and stability evaluation of naringenin, a flavanone belonging to the flavonoid group, and its hybrid derivatives synthesized, to enhance its antiplatelet activity.

Initially, special emphasis was placed on the structure, origin, biosynthesis and biological properties of the general class of flavonoids. Many research studies have focused on this class of NPs and more specifically on finding new sources with increased polyphenol content. Carob, which is a natural product that has attracted the attention of the research community due to its numerous benefits to human health, has been the subject of an extensive literature review based on its flavonoid content including naringenin.

Naringenin was chosen as a precursor compound for the development of new antiplatelet agents, not only because of its biological and pharmacological properties, but also due to its attractive structure that offers the possibility of modification with a wide variety of substituents. In particular, the hybrids 4'-acetyl-naringenin and 4'-DHA-naringenin were synthesized.

To evaluate the bioactivity of designed and newly synthesized naringenin analogues in human plasma, a necessary and important step is the determination of their stability in human plasma. To achieve this, we developed LC-MS protocols to quantify both the stability of the naringenin hybrids and to monitor and quantify the naringenin released by the cleavage of these conjugates in human plasma, in a time-dependent manner. Such methodologies are of great importance for the analysis of natural products and their major metabolites in complex matrices such as plant extracts, plasma, urine, etc.

It was proved that 4'-DHA-naringenin conjugate has seven-fold higher stability than 4'-acetyl-naringenin, which was rapidly degraded and showed significant inhibitory activity on all three ADP-, AA- and TRAP-6-induced platelet aggregation pathways. This was particularly important because we were able to simulate the simultaneous administration of three antiplatelet agents (drugs) in a single molecule. The present study re-emphasizes the important contribution of LC-MS in the quality control of natural products, as well as in the discovery of new metabolites of biotechnological and industrial interest.

Keywords: natural products, carob, flavonoids, naringenin, LC-MS/MS, antiplatelet therapy

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° Βιοσύνθεση και βιολογικές δράσεις φυσικών προϊόντων.....	1
1.1. Φυσικά προϊόντα: Προέλευση και δομή	3
1.2. Κατηγορίες φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης.....	5
1.2.1. Φλαβονοειδή.....	6
1.2.1.1. Εισαγωγή.....	6
1.2.1.2. Δομή και κατάταξη των φλαβονοειδών.....	7
1.2.1.3. Βιοσύνθεση φλαβονοειδών	8
1.3. Ναρινγενίνη	14
1.3.1. Δομική χημεία της ναρινγενίνης.....	14
1.3.2. Βιοσύνθεση ναρινγενίνης και οργανική σύνθεση.....	15
1.3.3. Πηγές της ναρινγενίνης.....	16
1.3.4. Βιοδιαθεσιμότητα, ασφάλεια και τοξικότητα της ναρινγενίνης	17
1.3.5. Βιολογικές δράσεις και θεραπευτικές εφαρμογές της ναρινγενίνης.....	19
1.3.5.1. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες	20
1.3.5.2. Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.....	21
1.3.5.3. Ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες.....	22
1.3.5.4. Αντικαρκινικές ιδιότητες.....	22
1.3.5.5. Αντι-ϊικές ιδιότητες	23
1.3.5.6. Καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες.....	25
1.4. Σκοπός διδακτορικής διατριβής.....	27
1.5. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων από φυσικές πηγές και προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων για ανάλυση με LC-MS.....	37
2.1. Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων.....	39
2.2. Προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων για ανάλυση με την μέθοδο LC-MS.....	40
2.2.1. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών	43
2.2.2. Εκχύλιση υγρού-υγρού	44
2.2.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	45
2.3. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3° Η σημασία της φασματομετρίας μαζών στην ανάλυση φυσικών προϊόντων.....	49
3.1. Εισαγωγή.....	51
3.2. Υγρή χρωματογραφία	52
3.2.1. Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).....	58
3.3. Φασματομετρία μαζών.....	59
3.3.1. Εισαγωγή	59

3.3.2. Οργανολογία	60
3.3.3. Σύστημα Εισαγωγής Δειγμάτων	61
3.3.4. Τεχνικές Ιοντισμού.....	62
3.3.4.1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό	64
3.3.5. Αναλυτές μαζών.....	69
3.3.5.1. Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole, Q).....	72
3.3.6. Ανιχνευτές ιόντων.....	79
3.3.7. Σύστημα κενού.....	79
3.3.8. Σύστημα Η/Υ	80
3.4. Φασματομετρία μάζας φυσικών προϊόντων: παρελθόν, παρόν και μελλοντικές προοπτικές.....	80
3.5. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές	83
3.6. Βιβλιογραφικές αναφορές	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας των κυριότερων κατηγοριών φυτοχημικών ουσιών με βάση την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS)	89
4.1. Εισαγωγή.....	93
4.2. Φαρμακοκινητική και ποσοτική ανάλυση των διαφόρων τάξεων φυτοχημικών.....	95
4.2.1. Γλυκοσίδες.....	95
4.2.2. Φλαβονοειδή.....	104
4.2.3. Τερπένια.....	116
4.2.4. Σαπωνίνες.....	124
4.2.5. Αλκαλοειδή.....	131
4.2.6. Άλλες κατηγορίες φυτοχημικών	135
4.3. Συμπεράσματα.....	138
4.4. Βιβλιογραφικές αναφορές	140
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο Λειτουργικά συστατικά του χαρουπιού: Συνδέοντας το χημικό και βιολογικό χώρο	149
5.1. Εισαγωγή.....	151
5.2. Λειτουργικά χημικά συστατικά χαρουπιού	152
5.2.1. Σάκχαρα	156
5.2.2. Κυκλιτόλες.....	157
5.2.3. Διαιτητικές ίνες.....	158
5.2.4. Κόμμι χαρουπιού (LBG).....	159
5.2.5. Πολυφαινόλες	160
5.2.6. Αμινοξέα.....	166
5.2.7. Μέταλλα.....	167
5.3. Ευεργετικές ιδιότητες του χαρουπιού στην ανθρώπινη υγεία	168
5.3.1. Αντι-πολλαπλασιαστική και αποπτωτική δραστηριότητα έναντι καρκινικών κυττάρων.....	170
5.3.2. Αντι-διαβητική δράση.....	172

5.3.3. Αντι-διαρροϊκή δράση	173
5.3.4. Αντι-υπερλιπιδαιμική δράση	173
5.4. Χαρούπι και Κλινικές Δοκιμές	174
5.4.1. Βρεφική Παλινδρόμηση	175
5.4.2. Υπερχοληστεραιμία	176
5.4.3. Διάρροια	177
5.5. Πολυφαινόλες χαρουπιού και βιοδιαθεσιμότητα	178
5.6. Το LBG ως φορέας για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων	179
5.7. Οικονομικός αντίκτυπος	182
5.8. Συλλογή δεδομένων	183
5.9. Μελλοντικές κατευθύνσεις - Συμπεράσματα	183
5.10. Βιβλιογραφικές αναφορές	186
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο Ανάπτυξη συζευγμάτων ναρινγενίνης με ενισχυμένο και τριπλό αντιαιμοπεταλιακό προφίλ: Σχεδιασμός, σύνθεση και in vitro αξιολόγηση σταθερότητας σε ανθρώπινο πλάσμα.....	197
6.1. Εισαγωγή.....	199
6.2. Υλικά και Μέθοδοι	201
6.2.1. Χημικά και Αντιδραστήρια.....	201
6.2.2. Σύνθεση εναντιοεκλεκτικών συζευγμάτων ναρινγενίνης	202
6.2.3. <i>In silico</i> μελέτες της ναρινγενίνης και των παραγώγων / συζευγμάτων της: Ανάλυση κύριων συνιστωσών και υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης σε τρεις υποδοχείς που εμπλέκονται στη θρόμβωση	203
6.2.3.1. Μέθοδος ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA).....	203
6.2.3.2. Υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης.....	204
6.2.4. Πειράματα LC-MS/MS.....	204
6.2.4.1. Συνθήκες λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών για την 4'-ακέτυλο- ναρινγενίνη.....	204
6.2.4.2. Συνθήκες λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών για το υβρίδιο της 4'- DHA-ναρινγενίνης	205
6.2.4.3. Μελέτη σταθερότητας των υβριδίων της ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος	208
6.2.5. Μελέτες της δράσης της ναρινγενίνης και των συζευγμάτων της έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	210
6.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	211
6.3.1. <i>In silico</i> ανάλυση της αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας της ναρινγενίνης.....	211
6.3.2. <i>In vitro</i> μελέτες της ναρινγενίνης σε ανθρώπινα αιμοπετάλια.....	214
6.3.3. Ορθολογικός σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων της ναρινγενίνης	214
6.3.4. <i>In silico</i> ανάλυση των αναλόγων της ναρινγενίνης	215
6.3.5. Αξιολόγηση της σταθερότητας των αναλόγων ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα	218

6.3.6. Αντιαιμοπεταλιακή δραστικότητα των αναλόγων ναρινγενίνης.....	223
6.4. Συμπεράσματα.....	225
6.5. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	227
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	234
A1. Κατηγορίες φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης.....	234
A1.1. Τερπενοειδή.....	234
A1.2. Αλκαλοειδή.....	237
A1.3. Φαινυλοπροπανοειδή – Φαινολικά παράγωγα.....	240
A2. Διαδικτυακοί πόροι φυσικών προϊόντων: Διαθεσιμότητα και χαρακτηριστικά.....	243
A3. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	256
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	259
B1. Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων.....	259
B1.1. Συμβατικοί μέθοδοι εκχύλισης.....	259
B1.1.1. Εκχύλιση με διαβροχή.....	259
B1.1.2. Εκχύλιση Soxhlet.....	260
B1.1.3. Εκχύλιση μέσω βρασμού.....	261
B1.2. Μη συμβατικές προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης.....	262
B1.2.1. Εκχύλιση με υπερήχους.....	262
B1.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	263
B1.2.3. Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό.....	264
B1.2.4. Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση.....	265
B1.2.5. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία.....	265
B1.2.6. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό.....	267
B2. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	269
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ	273
Γ1. Οργανολογικά χαρακτηριστικά της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.....	273
Γ2. Παράμετροι που επηρεάζουν την λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού.....	274
Γ3. Αναλυτές μαζών.....	277
Γ3.1. Αναλυτής μαγνητικής εκτροπής απλής εστίασης.....	277
Γ3.2. Αναλυτής μαγνητικής εκτροπής διπλής εστίασης.....	279
Γ3.3. Παγίδα ιόντων (Ion trap, IT).....	279
Γ3.4. Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF).....	281
Γ3.5. Αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR).....	282
Γ4. Φασματομετρία μάζας φυσικών προϊόντων: παρελθόν, παρόν και μελλοντικές προοπτικές.....	284
Γ4.1. Φασματομετρία μάζας φυσικών προϊόντων.....	284
Γ4.2. Υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματομετρία μάζας (HR-MS).....	285

Γ4.3. Δίδυμη φασματομετρία μάζας (MS/MS).....	286
Γ4.4. Οργανολογία φασματομετρίας μάζας και ιοντισμός.....	289
Γ4.4.1. Άμεσος ιοντισμός άθικτου φυτικού υλικού σε συνθήκες περιβάλλοντος.....	292
Γ4.4.2. Φασματομετρική Απεικόνιση Μαζών (MS imaging) με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος.....	294
Γ4.4.3. Φασματομετρική απεικόνιση μαζών αποτυπώματος άθικτου φυτικού υλικού με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος.....	294
Γ4.4.4. Ανάλυση μικροοργανισμών με MS σε συνθήκες περιβάλλοντος.....	296
Γ4.4.5. MS μικρού μεγέθους (φορητοί) και εφαρμογές τους.....	296
Γ5. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	299

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1. Γενική δομή των φλαβονοειδών.	7
Εικόνα 1.2. Η οδός των φαινυλοπροπανοειδών οδηγεί σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδείς πολυφαινόλες (στιλβένια και προανθοκυανιδίνες). Το παράγωγο της φαινυλαλανίνης συμπυκνώνεται με 3 μόρια του μηλονυλο-συνενζύμου A (CoA) από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS) προς σχηματισμό χαλκόνης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ναρινγενίνη, πρόδρομη ουσία των φλαβονοειδών, από την ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Εναλλακτικά, το ένζυμο συνθάση στιλβενών (STS) παράγει στιλβένια από τις ίδιες πρόδρομες ουσίες. Οι ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των στιλβενίων διαθέτουν σκελετό με βάση τη δομή της trans-ρεσβερατρόλης. Οι προανθοκυανιδίνες είναι ολιγομερή ή πολυμερή παράγωγα φλαβανόλης που προκύπτουν από μονομερείς μονάδες κατεχίνης.	9
Εικόνα 1.3. Αντιπροσωπευτικά φλαβονοειδή από κάθε υποομάδα και οι φυσικές τους πηγές (A) φλαβόνες, (B) φλαβονόλες, (C) φλαβανόλες, (D) φλαβανόνες, (E) ισοφλαβόνες, (F) ανθοκυανιδίνες.	13
Εικόνα 1.4. Χημική δομή ναρινγενίνης.	14
Εικόνα 1.5. Βιοσύνθεση της ναρινγενίνης.	15
Εικόνα 1.6. Θεραπευτικές ιδιότητες της ναρινγενίνης.	20
Εικόνα 1.7. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της ναρινγενίνης έναντι του COVID-19. ACE2, μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2; NRG, ναρινγενίνη; NF-κB, πυρηνικός παράγοντας kappa B; 3CLpro, Πρωτεάση προσομοιάζουσα την 3-χυμοθρυψίνη; SARS, Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο.	24
Εικόνα 1.8. Καρδιαγγειακές δράσεις και μοριακοί στόχοι της ναρινγενίνης.	25
Εικόνα 2.1. Κατηγοριοποίηση των κυριότερων μεθόδων εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων.	40
Εικόνα 3.1. Τυπικό HPLC σύστημα.	54
Εικόνα 3.2. Διαχωρισμός δύο ενώσεων βάσει διαφορετικού βαθμού συγγένειας με την κινητή και τη στατική φάση (προσαρμοσμένο σχήμα από εγχειρίδιο λειτουργίας φασματομέτρου μάζας της Bruker Daltonics).	55
Εικόνα 3.3. Μήκος στήλης και μηχανική ικανότητα διαχωρισμού (ίδιο μέγεθος σωματιδίων).	56

Εικόνα 3.4. Μέγεθος σωματιδίων και μηχανική ικανότητα διαχωρισμού (ίδιο μήκος στήλης).	57
Εικόνα 3.5. Στατική φάση στήλης με βάση το SiO ₂ και αλυσίδες άνθρακα (C ₁₈).	59
Εικόνα 3.6. Διάταξη των βασικών δομικών στοιχείων ενός φασματομέτρου μάζας.	61
Εικόνα 3.7. Σχηματική απεικόνιση ESI πηγής.	65
Εικόνα 3.8. Ο ηλεκτροφορητικός μηχανισμός του ESI (θετικός ιοντισμός).	67
Εικόνα 3.9. α) 10 % επικάλυψη διαδοχικών κορυφών για τον ορισμό της διαχωριστικής ικανότητας, β) διαχωριστική ικανότητα με βάση το πλήρες πλάτος στο μισό μέγιστο της κορυφής ενδιαφέροντος.	70
Εικόνα 3.10. Χαρακτηριστικά επίδοσης αναλυτή μάζας.	71
Εικόνα 3.11. Σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή μαζών.	73
Εικόνα 3.12. Φασματομετρία μάζας με διάταξη τριπλού τετραπόλου (QqQ) (Εικόνα προσαρμοσμένη από το εγχειρίδιο λειτουργίας του Enoq Elite ER TQ της Bruker Daltonics).	75
Εικόνα 3.13. Απεικόνιση της επαγόμενης διάσπαση μέσω σύγκρουσης στην κυψελίδα σύγκρουσης σε δίδυμη φασματομετρία μαζών.	76
Εικόνα 3.14. Α) Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product Ion scanning), Β) Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion scanning), Γ) Απώλεια ουδέτερου μορίου (Neutral Loss scanning), Δ) Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (Single/Multiple Reaction Monitoring).	79
Εικόνα 4.1. Χημικές δομές διάφορων γλυκοσιδών.	103
Εικόνα 4.2. Χημικές δομές διάφορων φλαβονοειδών.	116
Εικόνα 4.3. Χημικές δομές διάφορων τερπενίων.	124
Εικόνα 4.4. Χημική δομή διάφορων σαπωνινών.	130
Εικόνα 4.5. Χημική δομή διάφορων αλκαλοειδών.	135
Εικόνα 4.6. Χημική δομή αταξινόμητων φυτοχημικών ουσιών.	138
Εικόνα 5.1. Κύρια χημικά συστατικά στον πολτό και τους σπόρους του χαρουπιού με θρεπτική αξία και ιδιότητες που προάγουν την υγεία.	153
Εικόνα 5.2. Δομές των σημαντικότερων βιοδραστικών συστατικών στον καρπό του χαρουπιού.	155
Εικόνα 5.3. Χημικές δομές των σημαντικότερων σακχάρων στο χαρούπι.	157
Εικόνα 5.4. Η χημική δομή της D-πινιτόλης.	158

Εικόνα 5.5. Οι χημικές δομές των συστατικών του LBG στο χαρούπι.	160
Εικόνα 5.6. Χημικές δομές φαινολικών οξέων στο χαρούπι.	163
Εικόνα 5.7. Χημικές δομές φλαβονοειδών στο χαρούπι.	164
Εικόνα 5.8. Χημικές δομές των τανινών.	166
Εικόνα 5.9. Χημικές δομές αμινοξέων που περιέχονται στο χαρούπι.	167
Εικόνα 6.1. Χημική σύνθεση του υβριδίου της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης.	203
Εικόνα 6.2. Χημική σύνθεση του υβριδίου της 4'-DHA-ναρινγενίνης. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (i) DCC, DMAP, CH ₂ Cl ₂ , RT, 2 h.	203
Εικόνα 6.3. Οι βέλτιστες θραυσματοποιήσεις μέσω MRM για τα δύο ανάλογα, τη ναρινγενίνη και το ροσμαρινικό οξύ (IS).	207
Εικόνα 6.4. Πορεία προκατεργασίας δειγμάτων για αξιολόγηση σταθερότητας σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος μέσω LC-MS/MS.	210
Εικόνα 6.5. A) PCA των αντιθρομβωτικών φαρμάκων (μπλε διαμάντι) και της ναρινγενίνης (κόκκινο διαμάντι). Οι πιο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης της ναρινγενίνης στις κρυσταλλικές δομές των: B) PAR-1 C) P2Y₁₂ υποδοχέα και D) COX-1 . Με αστέρι υποδηλώνεται ο ενεργός μεταβολίτης του σχετικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.	213
Εικόνα 6.6. A) PCA των αντιθρομβωτικών φαρμάκων (μπλε διαμάντι) και της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης (κόκκινο διαμάντι). Οι πιο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης στις κρυσταλλικές δομές των: B) PAR-1, C) P2Y₁₂ υποδοχέα και D) COX-1 . Με αστέρι υποδηλώνεται ο ενεργός μεταβολίτης του σχετικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.	216
Εικόνα 6.7. A) PCA των αντιθρομβωτικών φαρμάκων (μπλε διαμάντι) και της 4'-DHA-ναρινγενίνης (κόκκινο διαμάντι). Οι πιο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης της 4'-DHA-ναρινγενίνης στις κρυσταλλικές δομές των: B) PAR-1, C) P2Y₁₂ υποδοχέα και D) COX-1 . Με αστέρι υποδηλώνεται ο ενεργός μεταβολίτης του σχετικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.	218
Εικόνα 6.8. Καμπύλες ποσοτικοποίησης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος του: A) 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης, B) του 4'-DHA-ναρινγενίνης και Γ) της ναρινγενίνης.	219
Εικόνα 6.9. Χρωματογραφήματα της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης μαζί με τα δύο κυριότερα παραγόμενα ιόντα και το πιο άφθονο από τα δύο.	220

Εικόνα 6.10. **A)** Προφίλ αποικοδόμησης της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης μετά από επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 60 min. **B)** Ρυθμός αποικοδόμησης του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης κατά την επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 120 min. 221

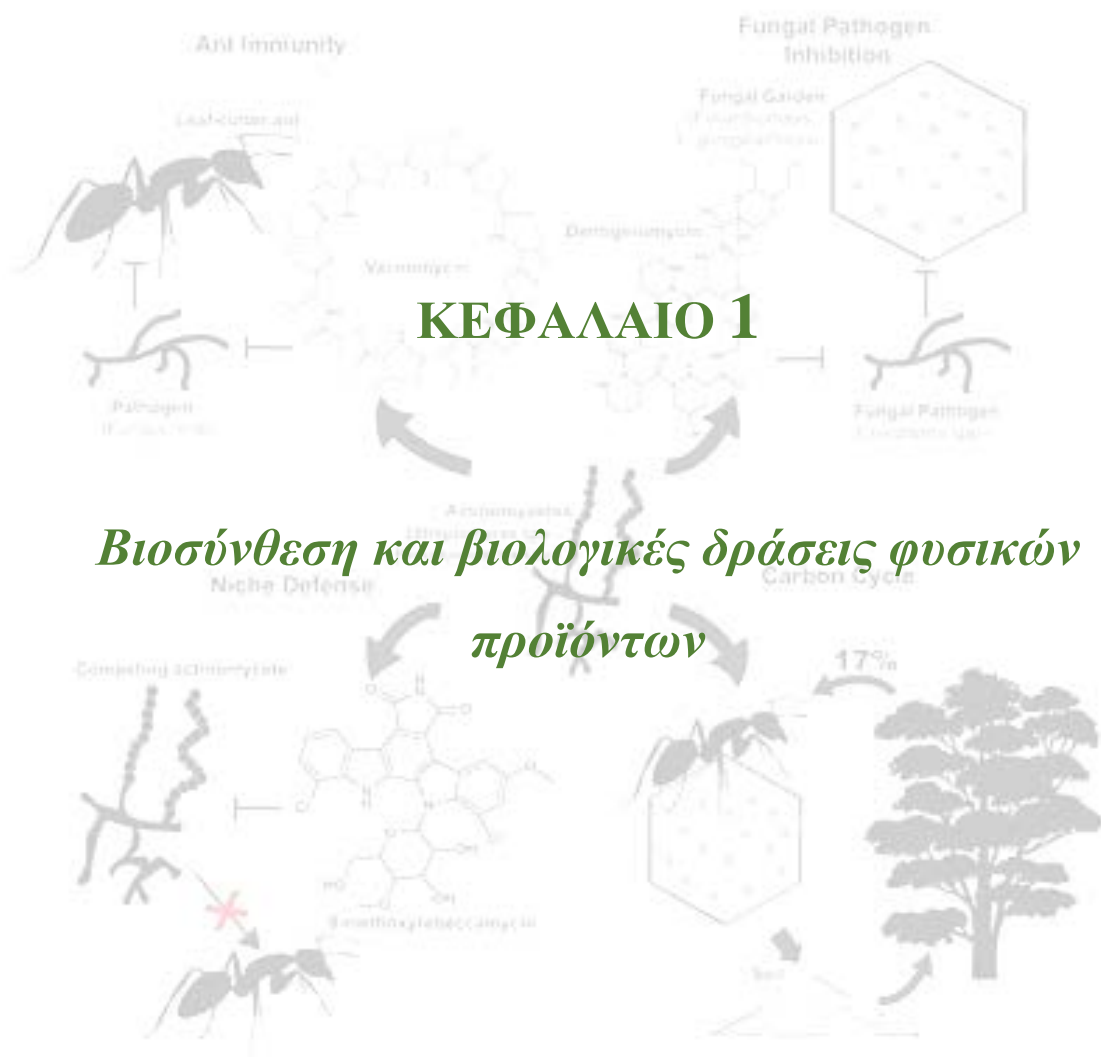
Εικόνα 6.11. Χρωματογραφήματα της 4'-DHA-ναρινγενίνης μαζί με τα δύο κυριότερα παραγόμενα ιόντα και το πιο άφθονο από τα δύο. 222

Εικόνα 6.12. Χημική σταθερότητα της 4'-DHA-ναρινγενίνης σε θερμικά μετουσιωμένο πλάσμα. 223

Εικόνα 6.13. **A)** Η επίδραση της ναρινγενίνης, της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης, του συζεύγματος 4'-DHA-ναρινγενίνης και του DHA (όλες οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM) στη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP, AA ή TRAP-6 σε PRP. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD. *P<0,005, **P<0,005 και #P<0,05 σε σύγκριση με την αντίστοιχη επίδραση του DHA. **B)** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων που απεικονίζουν την ανασταλτική επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του συζεύγματος 4'-DHA-ναρινγενίνης έναντι της επαγόμενης από ADP συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε PRP. 225

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Πηγές φυσικών προϊόντων.	4
Πίνακας 3.1. Χαρακτηριστικά διαφόρων τεχνικών ιοντισμού.	63
Πίνακας 3.2. Γενική σύγκριση αναλυτών μάζας και των ιδιοτήτων τους.	72
Πίνακας 3.3. Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας.	77
Πίνακας 4.1. Παράγωγα της τάξης των γλυκοσιδών και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.	100
Πίνακας 4.2. Παράγωγα της τάξης των φλαβονοειδών και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.	111
Πίνακας 4.3. Ενώσεις της τάξεως των τερπενίων και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.	121
Πίνακας 4.4. Παράγωγα της τάξεως των σαπωνινών και κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.	127
Πίνακας 4.5. Παράγωγα της τάξεως των αλκαλοειδών και κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.	134
Πίνακας 4.6. Αταξινόμητες φυτοχημικές ενώσεις και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.	137
Πίνακας 5.1. Σύνοψη των πιο κοινών πολυφαινολικών ενώσεων στα διάφορα μέρη του καρπού του χαρουπιού.	161
Πίνακας 5.2. Τα χημικά συστατικά του χαρουπιού και η βιολογική τους αξιολόγηση.	169
Πίνακας 5.3. Αντιπροσωπευτικές εφαρμογές του LBG ως φορέας φαρμάκου σε φαρμακευτικά σκευάσματα.	181
Πίνακας 6.1. Τελικές συγκεντρώσεις πρότυπων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς για κάθε ένωση	208



1.1. Φυσικά προϊόντα: Προέλευση και δομή

Η ατομική θεωρία του Δημόκριτου τον 5ο αιώνα π.Χ. αποτέλεσε την απαρχή της σύγχρονης Χημείας. Αυτή η φιλοσοφική προσέγγιση για την εξήγηση του τρόπου λειτουργίας της φύσης χωρίς πειραματικές αποδείξεις ισχύει ακόμη και σήμερα και δηλώνει ότι ο εκπληκτικός πλούτος της φύσης συνίσταται από άτομα και μόρια τα οποία η φύση συνδυάζει με τον δικό της τρόπο για να δημιουργήσει μοριακές δομές και ολόκληρα βιολογικά συστήματα. Παραδείγματα αυτών είναι τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και οι δευτερογενείς μεταβολίτες, ορισμένες κατηγορίες θαυματουργών μορίων που η φύση συνθέτει με εξαιρετική ευκολία και τα χρησιμοποιεί με απόλυτη ακρίβεια για τη δημιουργία και την ανάπτυξη όλων των ζωντανών συστημάτων.

Ο όρος "βιοδραστικό μόριο" είναι μια κοινή έκφραση που αναφέρεται σε δευτερογενείς μεταβολίτες ή στα συνθετικά τους ανάλογα, τα οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να έχουν ευεργετική ή επιβλαβή επίδραση στις διαδικασίες της ζωής. Σημαντικά βιοδραστικά μόρια τα οποία παρουσιάζουν φαρμακολογική ή βιολογική δράση προέρχονται από φυσικές πηγές και μέσω χημικής σύνθεσης.

Τα φυσικά προϊόντα (NPs) ορίζονται ως χημικές ενώσεις ή ουσίες που παράγονται από έναν ζωντανό οργανισμό ή βρίσκονται στη φύση και συνήθως παρουσιάζουν φαρμακολογική ή βιολογική δράση [1]. Μια τέτοια ουσία μπορεί να ταξινομηθεί ως NP ακόμη και αν μπορεί να παρασκευαστεί εξολοκλήρου με χημικό τρόπο [2]. Τα φυσικά προϊόντα παράγονται από έμβια συστήματα, όπως για παράδειγμα φυτικοί ιστοί, θαλάσσιοι οργανισμοί ή μικροοργανισμοί, ενώ τα ακατέργαστα εκχυλίσματά τους περιέχουν συνήθως χημικές ενώσεις που διαφέρουν δομικά ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους [3,4]

Πίνακας 1.1.

Πίνακας 1.1. Πηγές φυσικών προϊόντων.

Πηγές Φυσικών Προϊόντων		
ΦΥΤΙΚΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ	ΖΩΙΚΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ	ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΖΩΙΚΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 500.000 - 750.000 ✓ 10 % έχουν μελετηθεί ως προς την χημική σύστασή τους 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ανώτεροι οργανισμοί ✓ Μικροοργανισμοί 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Μεγάλη ποικιλία φυσικών προϊόντων με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των NPs που τα καθιστά ενώσεις μεγάλης σημασίας, που αξίζει να μελετηθούν, είναι το γεγονός ότι πολλές από αυτές χαρακτηρίζονται ως "προνομιούχες δομές". Ο ορισμός της IUPAC για τις "προνομιούχες δομές" αναφέρει ότι πρόκειται για δομές που αποτελούνται από ένα ημιάκαμπτο ικρίωμα το οποίο είναι σε θέση να δέχεται πολλαπλούς υδρόφοβους υποκαταστάτες [5].

Τα φυτά παράγουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων, που αναφέρονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες, με τους περισσότερους από αυτούς να μην εμπλέκονται άμεσα στην ανάπτυξή τους. Αντίθετα, οι πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως οι φυτοστερόλες, τα ακυλολιπίδια, τα νουκλεοτίδια, τα αμινοξέα και τα οργανικά οξέα, βρίσκονται παντού στη φύση και επιτελούν μεταβολικούς ρόλους που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξή τους [6].

Διάφορα συστατικά φυτικής προέλευσης έχουν χρησιμοποιηθεί ως κύριες πηγές φαρμάκων και ένα μεγάλο ποσοστό (30 - 40 %) των φαρμάκων που διατίθενται στη σύγχρονη ιατρική προέρχεται άμεσα ή έμμεσα από φυσικές πηγές. Τα φυσικά προϊόντα διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλομορφίας τους στη φύση, γεγονός που επιτρέπει τον εντοπισμό μορίων ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων. Επιπλέον, παρέχουν τα βιοχημικά και μοριακά εργαλεία που απαιτούνται για την αποσαφήνιση των πολύπλοκων κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών δράσης που εμπλέκονται στις περισσότερες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται παγκοσμίως αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση των φυτοφαρμακευτικών προϊόντων στην Συμπληρωματική ή Εναλλακτική Ιατρική, για την πρόληψη και τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Πιστεύεται ότι περίπου το 80 % του

παγκόσμιου πληθυσμού χρησιμοποιεί τα φυτά ως κύρια πηγή φαρμακευτικών σκευασμάτων. Είναι ενδεικτικό ότι κατά την τριετία 2005 - 2007 εγκρίθηκαν 13 φαρμακευτικά σκευάσματα στα οποία η δραστική ουσία είναι φυσικής προέλευσης, ενώ περισσότερες από 100 ουσίες διερευνώνται παγκοσμίως και έχουν μπει στο στόχαστρο των ερευνητών για τις πιθανές θεραπευτικές τους ιδιότητες [7]. Το γεγονός αυτό, οδήγησε τα τελευταία 20 χρόνια σε ένα εντυπωσιακό πλήθος (123) διαδικτυακών πόρων ανοικτής πρόσβασης ή/ και εμπορικών, με διαφορετικό πεδίο εφαρμογής για τις δομές και τα χαρακτηριστικά των NPs. Στο **Παράρτημα Α** γίνεται αναφορά στους διαθέσιμους διαδικτυακούς πόρους φυσικών προϊόντων και δίδονται πληροφορίες σχετικά με την προέλευση, τη διαθεσιμότητα και χαρακτηριστικά των φυσικών προϊόντων.

Τα φυσικά προϊόντα θεωρούνταν αρχικά μόρια-στόχοι, δηλαδή είχαν θεραπευτική χρήση, αλλά πρόσφατα μελετήθηκαν μέθοδοι για την παραγωγή συνθετικών μορίων με βάση πρότυπα NPs. Τα φυσικά αυτά προϊόντα μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τη συνθετική και φαρμακευτική χημεία στο πλαίσιο της ανάπτυξης σύγχρονων φαρμάκων για τη θεραπεία πλήθους ασθενειών του σύγχρονου κόσμου.

1.2. Κατηγορίες φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης

Με βάση τη βιοσυνθετική τους προέλευση, τα φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις ακόλουθες κύριες ομάδες [2,8]:

- ✓ τερπενοειδή,
- ✓ αλκαλοειδή,
- ✓ φαινυλοπροπανοειδή και,
- ✓ φαινολικές ενώσεις.

Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινολικές ενώσεις, θεωρούνται από τα σημαντικότερα NPs και από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενώσεις παγκοσμίως. Λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες της ναρινγενίνης, μιας φλαβανόνης που ανήκει στην ομάδα των φλαβονοειδών, η οποία αποτέλεσε και πρόδρομη ένωση για την ανάπτυξη αναλόγων με ενισχυμένη βιολογική δράση όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 6**, στις ακόλουθες ενότητες δίνεται έμφαση στη δομή, την προέλευση, τη βιοσύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες της γενικής κατηγορίας των φλαβονοειδών, καθώς και της ναρινγενίνης. Στο **Παράρτημα Α** δίνονται πληροφορίες

σχετικά και με άλλες κατηγορίες φυτικών φυσικών προϊόντων όπως είναι τα τερπενοειδή, τα αλκαλοειδή και τα φαινυλοπροπανοειδή.

1.2.1. Φλαβονοειδή

1.2.1.1. Εισαγωγή

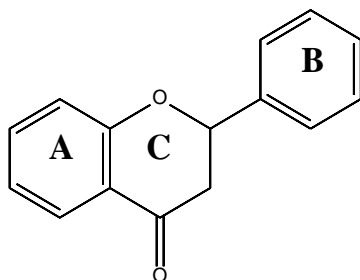
Τα φλαβονοειδή είναι μια κατηγορία φυσικών πολυφαινόλικών ενώσεων, η οποία σήμερα αριθμεί περισσότερες από 9000 δομές που απαντώνται ευρέως στο φυτικό βασίλειο [9,10]. Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί φλαβονοειδή στους λειχήνες και στο ζωικό βασίλειο, εκτός από ορισμένα φλαβονοειδή που βρέθηκαν στα φτερά μιας πεταλούδας. Δεν έχει επίσης επιβεβαιωθεί η παρουσία τους στα φύκη και στους μύκητες, αν και υπάρχει μια αναφορά για ένα φλαβονοειδές που βρέθηκε στα φύκη του γένους *Nitella* και ένα άλλο που βρέθηκε στον μύκητα *Aspergillus candidus*. Στα φυτά απαντώνται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε με τη μορφή γλυκοζιτών. Οι γλυκοζίτες είναι Ο-γλυκοζίτες και ένα μικρό ποσοστό είναι C-γλυκοζίτες [10].

Λαμβάνοντας υπόψη τα μέσα προστασίας και επικοινωνίας που απέκτησαν τα φυτά κατά την διάρκεια της εξέλιξής τους, τα φλαβονοειδή αποτελούν μια από τις σημαντικότερες χημικές κατηγορίες φυσικών προϊόντων [11]. Η βιολογική σημασία των φλαβονοειδών είναι τεράστια, όχι μόνο για το ίδιο το φυτικό βασίλειο, αλλά και για τον άνθρωπο και τα ζώα. Υπάρχει μια τάση που κερδίζει συνεχώς έδαφος και υποστηρίζει ότι τα φλαβονοειδή, σε συνδυασμό με μια ισορροπημένη και υγιεινή διατροφή, είναι υπεύθυνα για την αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Μια τέτοια διατροφή αποτελείται από υψηλό ποσοστό φρούτων και λαχανικών, καθώς και ροφήματα φυτικής προέλευσης, κυρίως τσάι και χυμούς, καθιστώντας την πλούσια σε φλαβονοειδή και άλλες πολυφαινόλες [11,12]. Αυτό το διατροφικό φαινόμενο αναφέρεται συχνά στο κόκκινο κρασί και είναι ευρέως γνωστό ως "γαλλικό παράδοξο". Το "γαλλικό παράδοξο" προέρχεται από την παρατήρηση ότι παρόλο που οι Γάλλοι καταναλώνουν 2 έως 3 φορές περισσότερα κορεσμένα λιπαρά και έχουν υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης και αρτηριακής πίεσης, έχουν 2.5 φορές μικρότερο κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον ιρλανδικής καταγωγής γιατρό Samuel Black το 1819. Ο όρος "γαλλικό παράδοξο" επινοήθηκε από τον Δρ Serge Renaud, επιστήμονα από το Πανεπιστήμιο του Μπορντό της Γαλλίας το 1992 [13].

Τα φλαβονοειδή γενικά απαντώνται στα φυτά ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα και συμβάλλουν στις λαμπρές αποχρώσεις του μπλε, του κόκκινου, του κίτρινου και του πορτοκαλί στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς. Εκτός από διάφορα λαχανικά και φρούτα, τα φλαβονοειδή βρίσκονται σε σπόρους, ξηρούς καρπούς, δημητριακά, μπαχαρικά και διάφορα φαρμακευτικά φυτά, καθώς και σε ποτά όπως το κρασί (ιδίως το κόκκινο κρασί), το τσάι και σε χαμηλότερα επίπεδα στην μύρα [12].

1.2.1.2. Δομή και κατάταξη των φλαβονοειδών

Τα μόρια των φλαβονοειδών αποτελούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα και περιέχουν δύο αρωματικούς δακτυλίους με έξι άτομα C (δακτύλιοι A και B, αντίστοιχα) που αποτελούν ένα δομικό σκελετό C6-C3-C6. Η χημική δομή των φλαβονοειδών συνίσταται από δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B με έναν ενδιάμεσο ετεροκυκλικό βενζοπυρανικό δακτύλιο (δακτύλιος C), όπως φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 1.1**).



Εικόνα 1.1. Γενική δομή των φλαβονοειδών.

Όλα τα φλαβονοειδή έχουν την ίδια βιοσυνθετική προέλευση και επομένως τον ίδιο βασικό σκελετό. Προέρχονται από τη συγχώνευση δύο άλλων συνθετικών οδών, του σικιμικού και του μηλονικού οξέος. Έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 8000 διαφορετικά φυσικά φλαβονοειδή [14] και ο κατάλογος αυξάνεται συνεχώς.

Τα φλαβονοειδή, ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του βενζοπυρανικού δακτυλίου τους, χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

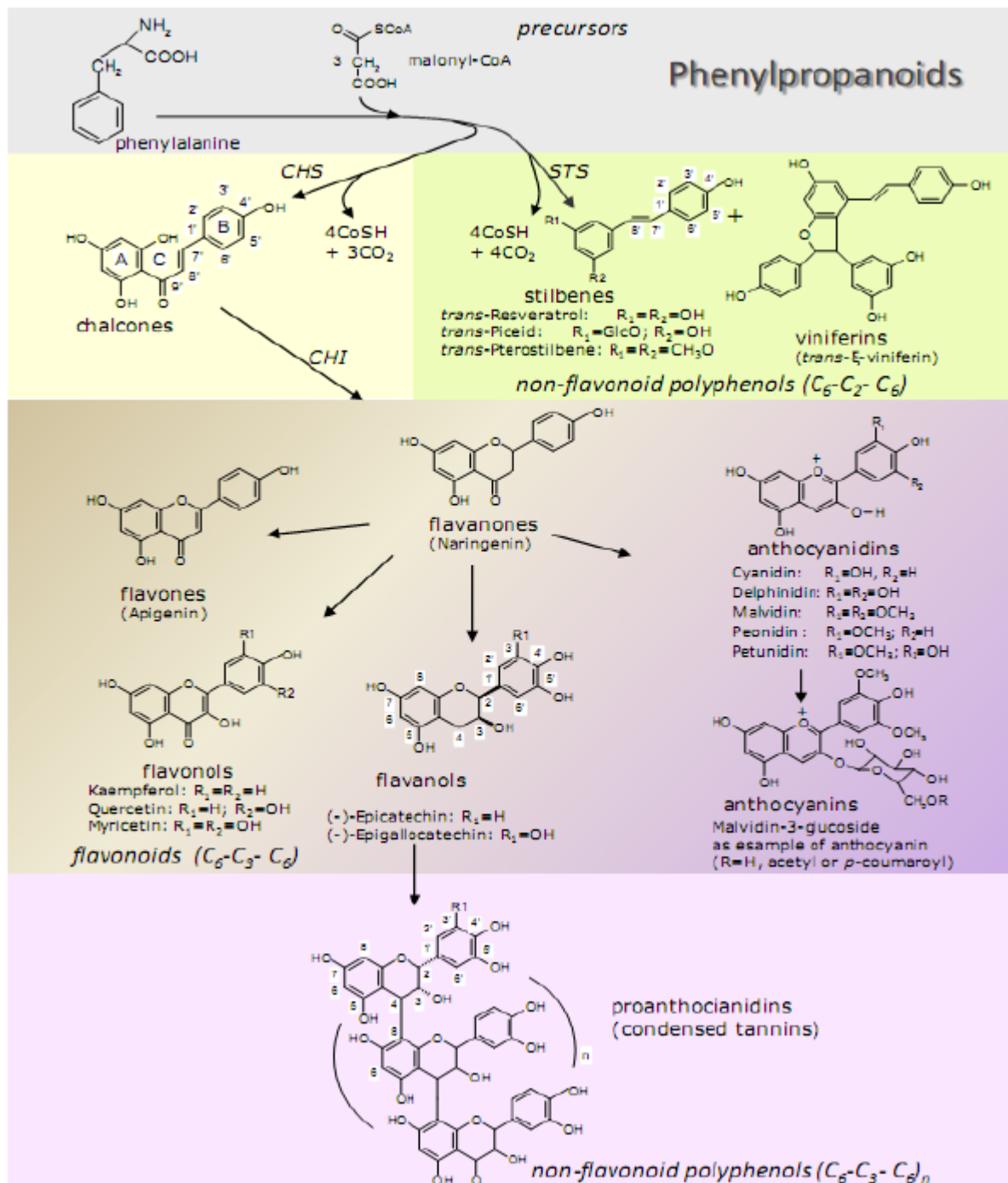
- ✓ παράγωγα 2-φαινυλοβενζοπυριλίου: ανθοκυανίνες,
- ✓ παράγωγα της 2-φαινυλοχρωμόνης: φλαβόνες, φλαβονόλες, και τα διμερή τους, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, ισοφλαβανόλες, ξανθόνες,

- ✓ παράγωγα της 2-φαιτυλοχρωμανόνης: φλαβάνες, φλαβάν-3-όλες, φλαβάν-3,4-διόλες, χαλκόνες, διυδροχαλκόνες, κατεχίνες,
- ✓ παράγωγα βενζυλιδενοκουμαρόνης: αουρόνες.

1.2.1.3. Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

Υπάρχει ένας τεράστιος όγκος γενετικών, χημικών, βιοχημικών και μοριακών πληροφοριών από πολλές ερευνητικές μελέτες που έχουν καθορίσει τη δευτερογενή μεταβολική βιοσυνθετική οδό των φλαβονοειδών στα φυτά. Όλα τα φλαβονοειδή μοιράζονται ένα κοινό βιοσυνθετικό μονοπάτι, αν και υπάρχει μια μορφή εξειδίκευσης, καθώς τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι διαφέρουν ως προς την κατανομή των υποστρωμάτων και την εκλεκτικότητα σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά είδη [15]. Τα φλαβονοειδή συντίθενται μέσω της φαιτυλοπροπανοειδούς οδού, με κύριες πρόδρομες ουσίες τη φαιτυλαλανίνη και το μαλονύλο-CoA (**Εικόνα 1.2**). Η βιοσυνθετική οδός των φλαβονοειδών αποτελεί μέρος της ευρύτερης οδού των φαιτυλοπροπανοειδών, από την οποία παράγονται πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνίνες, οι λιγνάνες και τα στιλβένια. Κάθε παράγωγο μιας αντίδρασης μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για ένα ή περισσότερα από τα επόμενα στάδια της βιοσυνθετικής οδού. Επίσης, το προϊόν κάθε ενζυμικής δράσης κατά τη διάρκεια της πορείας μπορεί να διαδραματίσει το ρόλο ενός πρόδρομου μορίου για μια διαφορετική αντίδραση, ανάλογα με τις φυσιολογικές συνθήκες που επικρατούν στο φυτό εκείνη τη στιγμή. Όλα τα φλαβονοειδή προέρχονται από δομές χαλκόνης. Παρόλο που η κεντρική βιοσυνθετική οδός των φλαβονοειδών είναι συντηρημένη στα φυτά ανάλογα με το είδος, μια ομάδα ενζύμων, όπως οι ισομεράσες, οι αναγωγάσες, οι υδροξυλάσες και ορισμένες διοξυγενάσες που εξαρτώνται από $Fe^{2+}/2$ -οξογλουταρικό, τροποποιούν τον βασικό σκελετό και οδηγούν σε διαφορετικές υποκατηγορίες. Επιπλέον, οι τρανσφεράσες τροποποιούν τον σκελετό των φλαβονοειδών με σάκχαρα, μεθυλομάδες και ακυλομάδες, ρυθμίζοντας τη φυσιολογική τους δραστηριότητα και μεταβάλλοντας τη διαλυτότητα, τη δραστικότητα και την αλληλεπίδρασή τους με κυτταρικούς στόχους [16,17].

Ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που είναι ικανοί να επάγουν τη βιοσύνθεση φλαβονοειδών είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η μυκητολογική μόλυνση, η αλληλεπίδραση με μικροοργανισμούς, ο τραυματισμός κ.λπ. [18]. Οι διάφορες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών (**Εικόνα 1.3**) περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.



Εικόνα 1.2. Η οδός των φαινυλοπροπανοειδών οδηγεί σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδείς πολυφαινόλες (στιλβένια και προανθοκυανιδίνες). Το παράγωγο της φαινυλαλανίνης συμπυκνώνεται με 3 μόρια του μηλονυλο-συνενζύμου A (CoA) από τη συνθάση της χαλκόνης (CHS) προς σχηματισμό χαλκόνης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ναρινγενίνη, πρόδρομη ουσία των φλαβονοειδών, από την ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Εναλλακτικά, το ένζυμο συνθάση στιλβενών (STS) παράγει στιλβένια από

τις ίδιες πρόδρομες ουσίες. Οι ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των στυλβενίων διαθέτουν σκελετό με βάση τη δομή της trans-ρεσβερατρόλης. Οι προανθοκυανιδίνες είναι ολιγομερή ή πολυμερή παράγωγα φλαβονόλης που προκύπτουν από μονομερείς μονάδες κατεχίνης [19].

1.2.1.3.1. Ανθοκυανίνες και Ανθοκυανιδίνες

Πολλά φρούτα, όπως τα μούρα, τα λαχανικά, τα πέταλα των φυτών και διάφορες ποικιλίες δημητριακών, όπως το μαύρο ρύζι, έχουν μια σειρά χρωμάτων, όπως μπλε, μοβ, κόκκινο κ.λπ., τα οποία οφείλονται στην παρουσία μιας ομάδας χρωστικών που ονομάζονται ανθοκυανίνες. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται σε όλους τους ιστούς των ανώτερων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των καρπών, των φύλλων, των ανθών και των ριζών [20]. Οι ανθοκυανίνες θεωρούνται ως οι γλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών (πολυϋδρόξυ και πολυμεθόξυ παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου). Βασίζονται δομικά στο φλαβυλοκατιόν και αποτελούνται από μια ανθοκυανιδίνη συνδεδεμένη με ένα ή περισσότερα τμήματα σακχάρου.

Οι ανθοκυανιδίνες εμφανίζονται σε πολλές γλυκοζυλιωμένες μορφές, αλλά αυτή στη θέση C-3 (3-O-γλυκοζίτες της ανθοκυανιδίνης) θεωρείται ότι είναι η βασική θέση για τη βιοσύνθεση των ανθοκυανινών. Είναι επίσης δυνατό να προστεθούν περισσότερα σάκχαρα στις θέσεις C-5 και C-7 και να τροποποιηθούν οι γλυκοζίτες μέσω ακυλίωσης και συμπλοκοποίησης με μη κυανικά φλαβονοειδή και μεταλλικά ιόντα [21,22]. Οι ανθοκυανίνες διαθέτουν μια σειρά από φαρμακευτικές ιδιότητες κατά της φλεγμονής, των νευρολογικών ασθενειών, του καρκίνου, του διαβήτη, των βακτηριακών λοιμώξεων, της ινοκυστικής νόσου κ.λπ. [23].

1.2.1.3.2. Φλαβανόνες

Δύο δομικά χαρακτηριστικά των φλαβανόνων που τις διακρίνουν από άλλα φλαβονοειδή είναι η απουσία διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων C-2 και C-3 και η παρουσία χειρικού κέντρου στο C-2. Αν και οι φλαβανόνες είναι από τα λιγότερο άφθονα φλαβονοειδή στη φύση, πολλές από αυτές παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων. Η βουτίνη, για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα κατά ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, οι

ηπατικές παθήσεις και ο διαβήτης. Η ναρινγενίνη και η εσπερετίνη βρίσκονται στα εσπεριδοειδή και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντιπολλαπλασιαστική δράση. Η ναρινγενίνη είναι μία από τις πιο κοινές φλαβανόνες και το πρώτο κυκλοποιημένο φλαβονοειδές που συντίθεται από τη βιοσυνθετική οδό [24].

1.2.1.3.3. Φλαβόνες και Φλαβονόλες

Αν και βιοσυνθετικά παράγονται χωριστά, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες μπορούν να τοποθετηθούν στην ίδια κατηγορία λόγω της χημικής τους συγγένειας. Οι φλαβόνες έχουν υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B, αλλά στερούνται οξυγόνου στον δακτύλιο C-3. Δύο πολύ κοινές φλαβόνες η λουτεολίνη και η απιγενίνη παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιαγγειογενετική κ.λπ. δράση. Η λουτεολίνη θεωρείται αποτελεσματική στη βελτίωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της εγκεφαλικής ισχαιμίας [24].

Οι φλαβονόλες, επίσης γνωστές ως 3-υδροξυφλαβόνες, χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας ομάδας υδροξυλίου στη θέση 3 του δακτυλίου C, καθώς και από την παρουσία ενός διπλού δεσμού μεταξύ των C-2 και C-3. Βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στα φύλλα των ανώτερων φυτών και μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί 450 διαφορετικά είδη φλαβονολών στα ανώτερα φυτά, με την κερκετίνη και την κεμφερόλη να είναι οι πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις [12,25].

1.2.1.3.4. Ισοφλαβονοειδή

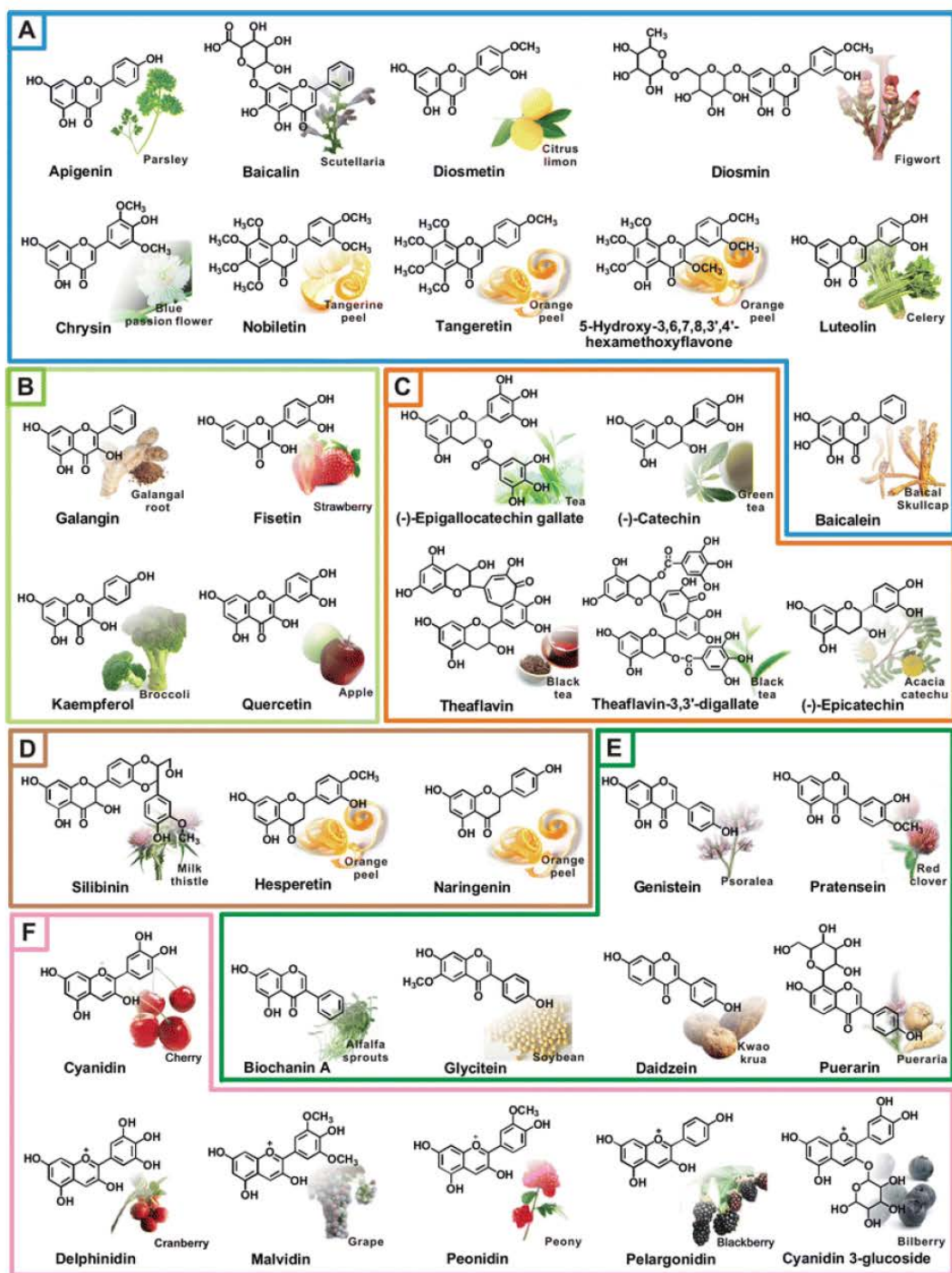
Πρόκειται για μια ειδική κατηγορία φλαβονοειδών, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία του σκελετού της φαινυλοχρωμάνης στη θέση C-3 του δακτυλίου B. Στην κατηγορία αυτή, οι ισοφλαβόνες και οι ισοφλαβανόνες είναι οι πιο αξιοσημείωτες. Οι ισοφλαβόνες παρουσιάζουν τον ίδιο βαθμό οξείδωσης στον ετεροκυκλικό δακτύλιο με τις φλαβόνες, αλλά πιο σύνθετους υποκαταστάτες στους άλλους δύο. Οι ισοφλαβανόνες έχουν τον ίδιο βαθμό συγγένειας με τις ισοφλαβόνες όπως οι φλαβανόνες με τις φλαβόνες. Αυτή τη φορά το χειρικό κέντρο των ισοφλαβονών βρίσκεται στον C-3 [26].

1.2.1.3.5. Νεοφλαβονοειδή

Τα νεοφλαβονοειδή είναι η ομάδα των παραγώγων των φλαβονοειδών όπου η αρυλική ομάδα συνδέεται στον C-4, σε αντίθεση με τον C-2 στα φλαβονοειδή και τον C-3 στα ισοφλαβονοειδή. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί ευρέως στα νεοφλαβονοειδή είναι οι υποκαταστάτες C -πρενυλίου στον δακτύλιο A [24].

1.2.1.3.6. Δευτερεύοντα φλαβονοειδή

Αυτή η κατηγορία φλαβονοειδών περιλαμβάνει τις χαλκόνες, τις διυδροχαλκόνες, τις ουρόνες και τις ουρονόλες. Από ιστορική άποψη, οι χαλκόνες και οι ουρόνες είναι κυρίως γνωστές ως οι κίτρινες έως πορτοκαλί χρωστικές των λουλουδιών, σε ορισμένα είδη *Coreopsis* και σε άλλα γένη της οικογένειας *Asteraceae*. Η κατανομή αυτών των φλαβονοειδών δεν περιορίζεται στα άνθη, αλλά έχουν επίσης παρατηρηθεί σε πολλούς φυτικούς ιστούς [24].

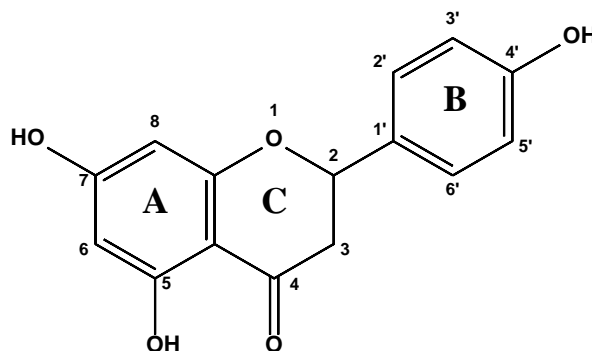


Εικόνα 1.3. Αντιπροσωπευτικά φλαβονοειδή από κάθε υποομάδα και οι φυσικές τους πηγές (A) φλαβόνες, (B) φλαβονόλες, (C) φλαβανόλες, (D) φλαβανόνες, (E) ισοφλαβόνες, (F) ανθοκυανιδίνες [27].

1.3. Ναρινγενίνη

1.3.1. Δομική χημεία της ναρινγενίνης

Η ναρινγενίνη είναι μέλος της υποκατηγορίας 4 των υδροξυφλαβανονών, η οποία αποτελείται από έναν σκελετό 15 ατόμων άνθρακα διατεταγμένων σε τρεις δομές δακτυλίου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.4**.



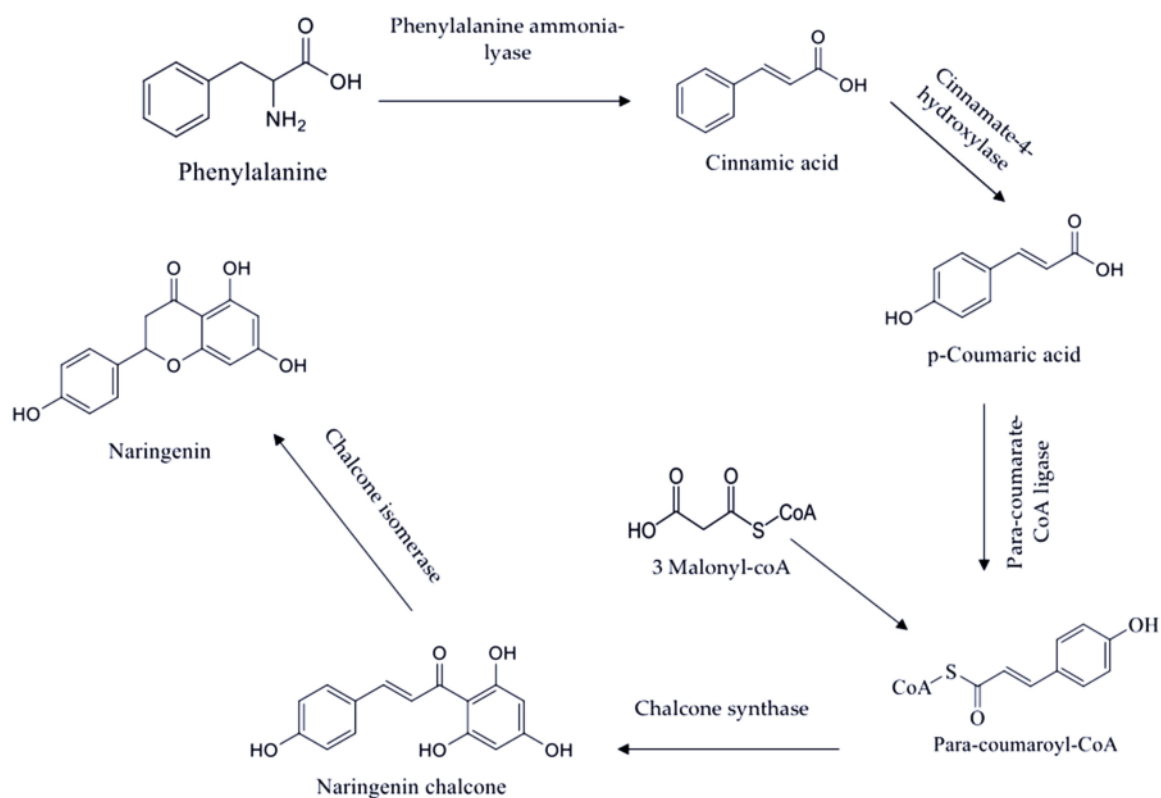
Εικόνα 1.4. Χημική δομή ναρινγενίνης.

Η συστηματική ονομασία κατά IUPAC της ναρινγενίνης είναι (S)-5,7-δihydroxy-2-(4-υδροξυφαινυλ)χρωμαν-4-όνη και ο μοριακός της τύπος είναι $C_{15}H_{12}O_5$. Η ναρινγενίνη είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη με σημείο τήξης $345\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, η οποία είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό και διαλυτή σε όλους τους οργανικούς διαλύτες. Ο δακτύλιος C συνδέεται με τον δακτύλιο B με δεσμό μεταξύ των ατόμων C2 και C1', ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι ο δακτύλιος C στερείται του διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα 2 και 3, ο οποίος απαντάται στις φλαβόνες και τις φλαβονόλες.

Στη ναρινγενίνη παρατηρείται η σκελετική δομή μιας τυπικής φλαβανόνης με τρεις ομάδες -OH στις θέσεις άνθρακα 4', 5 και 7. Υπάρχει επίσης μια καρβονυλική ομάδα στη θέση άνθρακα 4. Βρίσκεται σε δύο στερεοϊσομερείς μορφές, γνωστές ως 5,7,4'-τριυδροξυφλαβανόνη, με το άτομο C2 στο οποίο αποδίδεται η βιοδραστικότητα της να λειτουργεί ως κέντρο ασυμμετρίας. Η ναρινγενίνη που απομονώνεται από φυτά, βρίσκεται υπό τη μορφή (2S)-φλαβανόνων [28] λόγω της στερεοεξειδίκευσης της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύει τη μετατροπή των χαλκονών σε φλαβανόνες [29,30].

1.3.2. Βιοσύνθεση ναρινγενίνης και οργανική σύνθεση

Γενικά, στα φυτά, η ναρινγενίνη και οι παράγωγες φλαβονοειδείς ενώσεις της συντίθενται μέσω της οδού των φαινυλοπροπανοειδών ως δευτερογενείς μεταβολίτες, αν και μια πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι μπορεί επίσης να παραχθεί από τον προκαρυωτικό μικροοργανισμό *Streptomyces clavuligerus* [31]. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.5**, η οδός για τον σχηματισμό της ναρινγενίνης ξεκινά με τη βιοσύνθεση της φαινυλαλανίνης, ακολουθούμενη από τη συμπύκνωση του κουμαροϋλο-συνενζύμου Α προς σχηματισμό πολυκετοοξέος το οποίο ισομερίζεται σε ναρινγενίνη [32].



Εικόνα 1.5. Βιοσύνθεση της ναρινγενίνης [33].

Η ναρινγενίνη για ερευνητική ή εμπορική χρήση απομονώνεται συνήθως από εσπεριδοειδή και άλλες φυσικές πηγές μετά από εκχύλιση και καθαρισμό. Η μεθοδολογία απομόνωσης θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ανεπαρκής, καθώς παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως χαμηλή απόδοση, υψηλό κόστος και χρονοβόρα επεξεργασία, καθώς και ότι η διαθεσιμότητα της εξαρτάται από την περιοχή και την εποχή.

Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί διάφορες μεθοδολογίες για τη σύνθεση της ναρινγενίνης, όπως:

- Μετατροπή της 3,5-διμεθοξυφαινόλης σε 2-υδροξυ-4,6-διμεθοξυ-ακετοφαινόνη, ακολουθούμενη από συμπύκνωση με ανισαλδεΐδη προς παραγωγή 2'-υδροξυ-4,4',6'-τριμεθοξυχαλκόνης. Στη συνέχεια, αυτή η χαλκόνη κυκλοποιείται και απομεθυλιώνεται με υδατικό διάλυμα HCl και υδροχλωρική πυριδίνη προς σχηματισμό ναρινγενίνης (συνολική απόδοση 45 %).
- Η συμπύκνωση της 2-υδροξυ-4,6-διμεθοξυ-ακετοφαινόνης με ανισαλδεΐδη οδηγεί στην παραγωγή της 4',5,7-τριμεθοξυφλαβανόνης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ναρινγενίνη με απόδοση 60 % [34,35].

Αυτές οι συνθετικές προσεγγίσεις είναι προβληματικές λόγω του υψηλού κόστους, της χρήσης τοξικών χημικών ουσιών και των πολύπλοκων αλυσιδωτών αντιδράσεων και μεθόδων καθαρισμού. Ως εκ τούτου, η ανάγκη για την παραγωγή ναρινγενίνης και άλλων φλαβονοειδών μέσω ενός μικροβιακού στελέχους που θα εξαλείψει τα μειονεκτήματα της απομόνωσής τους από φυσικές πηγές και της οργανικής σύνθεσής τους στο εργαστήριο, έρχεται στην επιφάνεια [16]. Η ετερόλογη βιοσύνθεση της ναρινγενίνης έχει επιτευχθεί μέσω της λειτουργικής ανασύστασης της πολύπλοκης βιοσυνθετικής οδού σε επιλεγμένους μικροβιακούς ξενιστές, όπως ο *S. cerevisiae* και η *E. coli* [36-38].

1.3.3. Πηγές της ναρινγενίνης

Η ναρινγενίνη είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένη στα εσπεριδοειδή όπως τα γκρέιπφρουτ (115 - 384 mg L⁻¹), το ξινό πορτοκάλι (>100 mg L⁻¹), τα βύσσινα, τις ντομάτες (0.16 – 0.68 mg 100 g⁻¹) και την ελληνική ρίγανη [39]. Ποσότητες βρίσκονται επίσης στο περγαμόντο, το χαρούπι, το κακάο, τη μέντα και τα φασόλια [40]. Παρόλο που η κύρια πηγή φλαβονοειδών για τον άνθρωπο είναι η διαιτητική πρόσληψη των εσπεριδοειδών, αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωσή τους ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο και την ποικιλία του καρπού, την εποχή συγκομιδής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσης, π.χ. *Citrus aurantium* (19.7 μg mL⁻¹), *Citrus reticulata* (3383 μg mL⁻¹), *Citrus clementina* (8.0 μg mL⁻¹), *Citrus bergamia* (22.3 μg mL⁻¹), *Citrus paradisi* (230 μg mL⁻¹) [41].

Η ναρινγενίνη, η οποία αρχικά απομονώθηκε από σπόρους σέλινου και φύλλα γκρέιπφρουτ, βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στους στερεούς ιστούς, ενώ ο χυμός περιέχει επίσης μεγάλο αριθμό φλαβονών. Η φλούδα της ντομάτας περιέχει ναρινγενίνη-χαλκόνη, η οποία μετατρέπεται σε ναρινγενίνη κατά τη διαδικασία παρασκευής κέτσαπ [42]. Η ναρινγενίνη βρίσκεται ως "ναρινγίνη", μια ανενεργή μορφή και μετατρέπεται σε "ναρινγενίνη" από τα εντερικά βακτήρια [43].

Η κατανομή της ναρινγενίνης στα διάφορα μέρη του καρπού εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των βιοσυνθετικών ενζύμων. Για παράδειγμα, στη φλούδα του *Solanum lycopersicum*, τόσο η έκφραση των γονιδίων σύνθεσης της χαλκόνης όσο και της φλαβονόνης 3-υδροξυλάσης είναι υψηλότερη από το ισομερές της χαλκόνης, υποδεικνύοντας τη συσσώρευση μεγάλης ποσότητας ναρινγενίνης [44].

1.3.4. Βιοδιαθεσιμότητα, ασφάλεια και τοξικότητα της ναρινγενίνης

Η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο βαθμό στον οποίο μια ουσία ή ένα φάρμακο καθίσταται πλήρως διαθέσιμο στον προβλεπόμενο βιολογικό προορισμό. Με μεγαλύτερη ακρίβεια, η βιοδιαθεσιμότητα είναι ένα μέτρο του ρυθμού και του κλάσματος της αρχικής δόσης μιας ουσίας που φθάνει επιτυχώς είτε στην περιοχή δράσης είτε στα σωματικά υγρά από την οποία οι προβλεπόμενοι στόχοι του φαρμάκου έχουν ανεμπόδιστη πρόσβαση [45,46]. Μια ενδοφλεβίως χορηγούμενη δραστική ένωση ή φάρμακο που παραδίδεται απευθείας στη συστηματική κυκλοφορία αποδίδει βιοδιαθεσιμότητα 100 %. Η βιοδιαθεσιμότητα (F) μιας ουσίας που χορηγείται μέσω άλλων οδών χορήγησης μπορεί να προσδιοριστεί από τη μάζα του φαρμάκου που παραδίδεται στο πλάσμα διαιρούμενη με τη συνολική μάζα του χορηγούμενου φαρμάκου (Εξίσωση 1.1):

$$F = \frac{\text{μάζα φαρμάκου που φτάνει στο πλάσμα}}{\text{συνολική μάζα χορηγούμενου φαρμάκου}} \quad (1.1)$$

Η βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών υποομάδων και ενώσεων, γεγονός που οφείλεται κυρίως στις διαφορές στις χημικές τους ιδιότητες, όπως η πολικότητα κ.λπ. Τα τελευταία χρόνια, η βελτιστοποίηση και η ανάπτυξη έγκυρων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων επέτρεψαν την ακριβή εκτίμηση της ανάλυσης της βιοδιαθεσιμότητας διαφόρων φλαβονώνων και της ναρινγενίνης.

Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τους Fuhr και Kummert [47], παρατηρήθηκε ανάκτηση της ναρινγενίνης από 5 έως 59 % στα ούρα έξι ατόμων, ενώ σε άλλες μελέτες, η συγκέντρωση στα ούρα κυμαινόταν από 14 έως 15 % [48] και 1 έως 6 % [28] μετά από εφάπαξ λήψη κατά μέσο όρο 500 mg ναρινγενίνης σε χυμό ή ως συμπλήρωμα διατροφής. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η νεφρική κάθαρση της ναρινγενίνης εξαρτάται από τη δόση [28]. Πάραυτα, η χορήγηση ναρινγενίνης μετά από ολονύκτια νηστεία είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά χαμηλότερη διαθεσιμότητα της ναρινγενίνης στο πλάσμα, σε επίπεδο που δεν μπορούσε να ανιχνευθεί με τις διαθέσιμες αναλυτικές μεθόδους.

Η βιοδιαθεσιμότητα ποικίλλει επίσης ανάλογα με φυσιολογικούς παράγοντες όπως το σωματικό βάρος, η σύσταση του σώματος, η γαστρική κινητικότητα κ.λπ. και μοριακούς παράγοντες όπως τα ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία βιομετασχηματισμού. Στη μελέτη που διεξήχθη από τον Erlund και τους συνεργάτες του [49], στην οποία χορηγήθηκαν χυμοί γκρέιπφρουτ και πορτοκαλιού, η ναρινγενίνη παρουσίασε καλή βιοδιαθεσιμότητα αλλά μεγάλη ατομική διακύμανση, με συγκέντρωση στο πλάσμα $0.6 \pm 0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ και $6.0 \pm 5.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ μετά από 24 ώρες λήψης χυμού πορτοκαλιού και γκρέιπφρουτ, αντίστοιχα. Ο Felgines και οι συνεργάτες του [50] μελέτησαν τη βιοδιαθεσιμότητα της ναρινγενίνης και των γλυκοζιτών της σε αρουραίους μετά από σίτιση, όπου κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι φλαβανόνες απορροφώνται αποτελεσματικά και η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι αλληλένδετη με το αντίστοιχο γλυκοζιτικό παράγωγο.

Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η θερμική και μηχανική επεξεργασία φαινολικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένης της ναρινγενίνης, μπορεί να είναι χρήσιμη για τη μεταφορά αυτών των δυνητικά βιοδραστικών ενώσεων στη βιομηχανία τροφίμων [51]. Όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα των μεταβολιτών της ναρινγενίνης, ο Kay και οι συνεργάτες του [52] ανέφεραν ότι ο 7-Ο γλυκοζίτης της ναρινγενίνης απορροφάται ταχύτερα και οι μεταβολίτες απεκκρίνονται στα ούρα σε επταπλάσιες συγκεντρώσεις από τους μεταβολίτες που προέρχονται από τον 7-Ο ρουτινοζίτη της ναρινγενίνης.

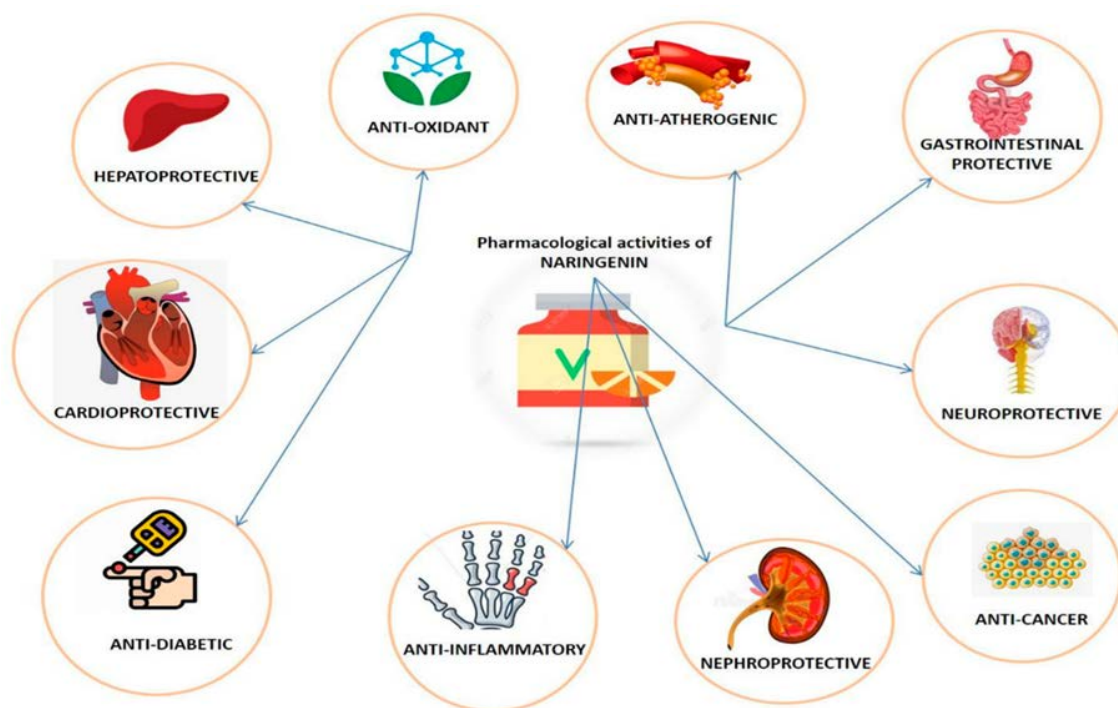
Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι πολυφαινόλες όπως η ναρινγενίνη, εάν δεν απορροφηθούν, φθάνουν στο παχύ έντερο όπου μετατρέπονται μέσω της μικροχλωρίδας του εντέρου σε μικρότερες πολυφαινόλες όπως το 7-Ο-γλυκουρονίδιο της ναρινγενίνης και το 4'-γλυκουρονίδιο της ναρινγενίνης, οι οποίες απορροφώνται καλύτερα και παραμένουν στην κυκλοφορία από 72 έως 96 ώρες [53,54]. Αυτοί οι μεταβολίτες που μπορούν να ταυτοποιηθούν με υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS)

χρησιμοποιώντας το κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές φαρμακολογικές ιδιότητες σε προκλινικά μοντέλα [55].

Όσον αφορά την ασφάλεια της ναρινγενίνης, έχει αποδειχθεί ότι η ναρινγενίνη δρα μέσω μηχανισμών που επάγονται από τους υποδοχείς οιστρογόνων και έχει αντιοιστρογονική δράση. Ο Ruh και οι συνεργάτες του, [56] μελέτησαν την αντιοιστρογονική δράση της ναρινγενίνης σε διάφορες δόσεις (15, 20, 30 και 40 mg/ποντίκι για 3 ημέρες) και παρατήρησαν ότι η υψηλότερη δόση των 40 mg ναρινγενίνης ήταν τοξική για ορισμένα από τα ζώα, ενώ δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Μια άλλη μελέτη των Galati και O'Brien [85] αναφέρει ότι τα φλαβονοειδή που έχουν φαινολικό δακτύλιο τύπου B, όπως η ναρινγενίνη, σε κάποια συγκέντρωση μπορεί να οξειδωθούν από υπεροξειδάσες ή H₂O₂ για να σχηματίσουν ρίζες φαινοξυλίου, οι οποίες με τη σειρά τους καταλύουν τη συν-οξείδωση της GSH/NADH και παράγουν δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η ναρινγενίνη παρουσιάζει προ-οξειδωτική δράση, καθώς αναστέλλει τη δράση του ενζύμου CYP3A4 εντός 30 λεπτών και παρεμβαίνει στον ανθρώπινο μεταβολισμό ορισμένων φαρμάκων, όπως οι αναστολείς διαύλων ασβεστίου (όπως η φελοδιπίνη, η νιτρενδιπίνη, η νισολδιπίνη, η βεραπαμίλη κ.λπ.), εάν χορηγηθεί μαζί με χυμό γκρέιπφρουτ [57].

1.3.5. Βιολογικές δράσεις και θεραπευτικές εφαρμογές της ναρινγενίνης

Τα αυξανόμενα στοιχεία από μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* έχουν ενισχύσει διάφορες φαρμακολογικές ιδιότητες της ναρινγενίνης, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, ανοσοτροποποιητικών, αντιφλεγμονωδών, νεφροπροστατευτικών, ηπατοπροστατευτικών, νευροπροστατευτικών, αντιδιαβητικών, αντικαρκινικών και αντι-αθηροσκληρωτικών ιδιοτήτων (Εικόνα 1.6). Οι σημαντικότερες θεραπευτικές ιδιότητες της ναρινγενίνης θα συζητηθούν λεπτομερέστερα στις επόμενες ενότητες.



Εικόνα 1.6. Θεραπευτικές ιδιότητες της ναρινγενίνης [58].

1.3.5.1. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Η αντιοξειδωτική δράση της ναρινγενίνης αποδίδεται στις ομάδες υδροξυλίου (OH) στη δομή της και έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από τον γλυκοζίτη της, τη ναρινγίνη. Αυτές οι ομάδες υδροξυλίου παρουσιάζουν υψηλή αντιδραστικότητα έναντι των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των δραστικών ειδών αζώτου (RNS) [59,60]. Η ναρινγενίνη απομακρύνει αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπει την οξειδωτική βλάβη του DNA που προκαλείται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [61-63]. Αναστέλλει αποτελεσματικά το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης, δρα ως χηλικός παράγοντας για τα ενεργά ιόντα μετάλλων και προστατεύει τα λιπίδια από οξειδωτική βλάβη με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, δεν παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) [60,61,64]. Διαπιστώθηκε ότι η από του στόματος χορήγηση 50 mg kg⁻¹ ανά ημέρα ναρινγενίνης σε διαβητικούς αρουραίους με STZ μειώνει τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Αυξάνει επίσης τις ενζυμικές δραστηριότητες των αντι-οξειδωτικών στο πάγκρεας και μειώνει τα επίπεδα MDA. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα της τρανσαμινάσης της αλανίνης στον ορό, της

ασπαρτικής τρανσαμινάσης και της γαλακτικής αφυδρογονάσης σε διαβητικούς αρουραίους και συνεπώς εμφανίζει προστατευτική δράση στον παγκρεατικό ιστό των διαβητικών αρουραίων [65].

1.3.5.2. Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, η ναρινγενίνη παρουσιάζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β (NF-κΒ) [66] που διεγείρει την έκφραση πολλών σημαντικών φλεγμονωδών πρωτεϊνών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), κ.λπ. [59]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από *in vitro* και *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι η ναρινγενίνη καταστέλλει την έκφραση διαφόρων φλεγμονωδών δεικτών, όπως ο υποδοχέας 4 τύπου Toll (TLR4), ο TNF-α, η IL-1β, η IL-6, η iNOS και η COX-2 και την ενεργοποίηση της AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK), η οποία σχετίζεται με την αναστολή πολλαπλών προφλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών [67,68].

Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη χρησιμοποιώντας μακροφάγα μολυσμένα με *Chlamydia trachomatis*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόκληση είτε οξείας τραχηλίτιδας, είτε φλεγμονώδους πυελικής λοίμωξης είτε ασυμπτωματικής χρόνιας διαταραχής, αποδείχθηκε ότι η ναρινγενίνη ασκεί αντιφλεγμονώδη δράση μέσω της αναστολής της ρύθμισης των κυτταροκινών (TNF-α, IL-1β, IL-1α, IL-6, IL-10, IL-12p70) και των χημειοκινών (CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL5 και CXCL10) [69,70]. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η ναρινγενίνη αναστέλλει τον επαγόμενο από φλεγμονή θάνατο νευρικών κυττάρων αναστέλλοντας την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και την έκφραση του iNOS που επάγεται από LPS/IFN-γ σε γλοιακά κύτταρα [71,72].

Διαπιστώθηκε επίσης ότι η ναρινγενίνη παρουσίασε δραστηριότητα έναντι ανθρώπινων επιδερμικών κερατινοκυττάρων (HaCaT) που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τριχλωροαιθυλένιο (TCE), έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο βιομηχανικό διαλύτη που επηρεάζει την ηπατική λειτουργία. Το TCE έχει ενοχοποιηθεί για την αύξηση της ενδοκυτταρικής παραγωγής Ca^{2+} που προκαλεί την παραγωγή ελεύθερων ριζών και τον κατακερματισμό του DNA. Η ναρινγενίνη αντιστρέφει αποτελεσματικά όλες τις κυτταροτοξικές επιδράσεις του TCE [73].

1.3.5.3. Ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες

Οι ηπατοπροστατευτικές επιδράσεις της ναρινγενίνης έχουν τεκμηριωθεί και έχει παρατηρηθεί ότι βελτιώνουν διάφορους δείκτες που χαρακτηρίζουν την ηπατική λειτουργία, όπως η ασπαρτική τρανσαμινάση, η τρανσαμινάση της αλανίνης, η χολερυθρίνη και τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης. Η από του στόματος καθημερινή χορήγηση ναρινγενίνης σε δόση 20 mg kg⁻¹ και 50 mg kg⁻¹ για 4 εβδομάδες βρέθηκε αποτελεσματική κατά της ηπατικής βλάβης που προκαλείται από τη διμεθυλνιτροζαμίνη (DMN), με μείωση της συσσώρευσης κολλαγόνου στο ήπαρ που προκαλείται από την DMN, παρέχοντας έτσι προστασία κατά της ηπατικής ίνωσης [59,74].

Η ναρινγενίνη βρέθηκε επίσης να είναι αποτελεσματική κατά της ηπατοτοξικότητας που προκαλείται από στρεπτοζοτοκίνη σε αρουραίους, οδηγώντας έτσι σε μείωση της ηπατοπάθειας που σχετίζεται με τον διαβήτη [75,76]. Η ενθυλάκωση της ναρινγενίνης σε νανοσωματίδια είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της διαλυτότητας και του ρυθμού απελευθέρωσης της. Το σκεύασμα αυτό επέδειξε επίσης πιο ισχυρά ηπατοπροστατευτικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τη ναρινγενίνη μόνη της, με σημαντικές αντι-αποπτωτικές δράσεις (μέσω της ενεργοποίησης των κασπάσης-3 και -9) [77].

1.3.5.4. Αντικαρκινικές ιδιότητες

Η ναρινγενίνη έδειξε κυτταροτοξική δράση σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως MCF-7 (καρκίνος του μαστού), MDA-MB-231 (καρκίνος του μαστού), KATO III (καρκίνος του στομάχου), MKN-7 (καρκίνος του στομάχου), HepG2 (καρκίνος του ήπατος), Hep3B (καρκίνος του ήπατος), Hela/Hela-TG (καρκίνος του τραχήλου της μήτρας), PK-1 (καρκίνος του παγκρέατος) και Caco-2 (καρκίνος του παχέος εντέρου). Επιπλέον, ήταν ιδιαίτερα κυτταροτοξική σε λευχαιμικά κύτταρα όπως τα NALM-6, HL-60, Jurkat και U937 και βρέθηκε ότι επάγει την απόπτωση με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο σε αυτές τις κυτταρικές σειρές [78]. Αναστέλλει την επαγόμενη από ινσουλίνη πρόσληψη γλυκόζης σε καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 με αποτέλεσμα τη διακοπή της ανάπτυξης και την αναστολή του πολλαπλασιασμού λόγω της αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI3K και της μειωμένης μετατόπισης του GLUT4 [79]. Παρατηρήθηκε 25 % αναστολή της πρόσληψης γλυκόζης με τη χορήγηση περίπου 10 uM ναρινγενίνης.

Η ναρινγενίνη μειώνει τον κίνδυνο μεταλλάξεων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές διεγείροντας την επιδιόρθωση της αποκοπής βάσεων του DNA. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, η έκθεση σε 10 - 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ναρινγενίνης για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης mRNA τριών σημαντικών ενζύμων επιδιόρθωσης της αποκοπής βάσεων του DNA, δηλαδή της απουρινικής/απυριμιδικής ενδονουκλεάσης, της DNA πολυμεράσης βήτα (POLB) και της 8-οξογουανίνη-DNA γλυκοζυλάσης 1 [80]. Η από του στόματος χορήγηση ναρινγενίνης περιορίζει επίσης τον κίνδυνο μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού μέσω της διαμόρφωσης της ανοσίας του ξενιστή, αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό των T κυττάρων που εκφράζουν IFN- γ και IL-2. Αυτό αποδεικνύει την αποτελεσματικότητά της ως χειρουργικό επικουρικό εργαλείο σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [81].

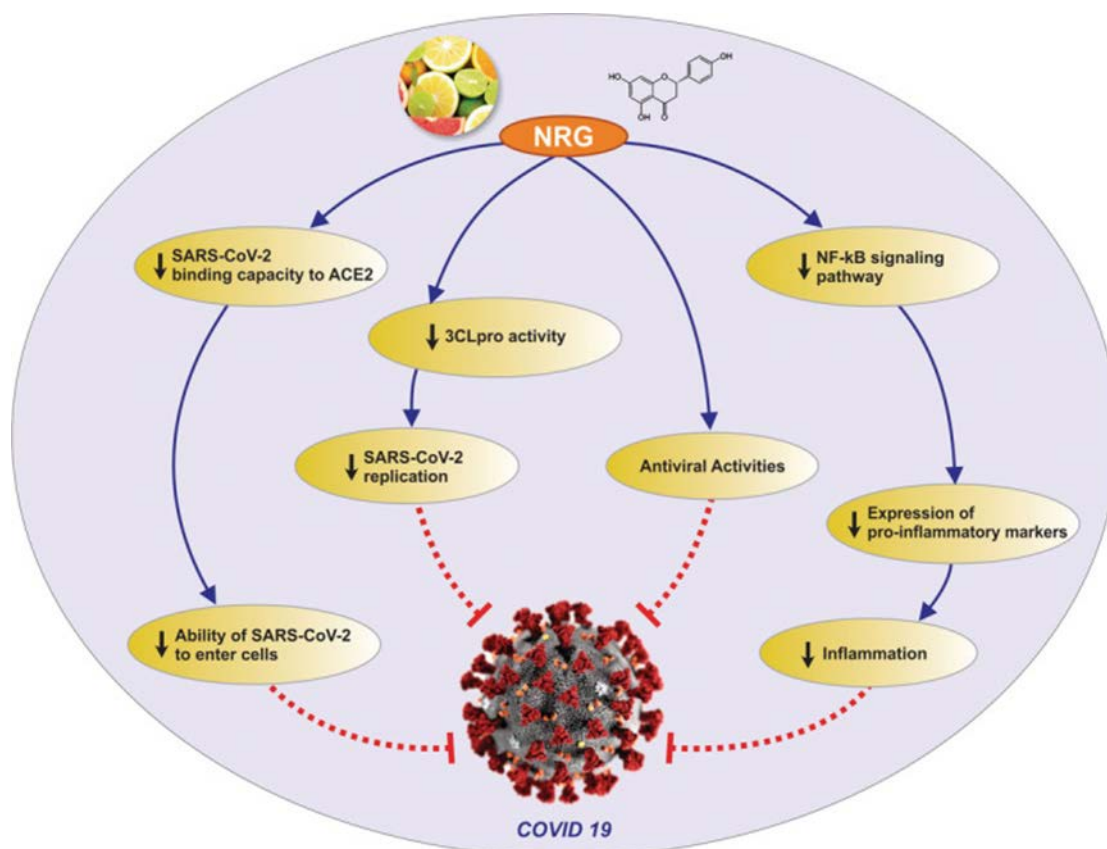
1.3.5.5. Αντι-ϊικές ιδιότητες

Η ναρινγενίνη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αντι-ϊική δράση με IC_{50} 52.64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ έναντι του στελέχους του ιού του δάγκειου πυρετού (DENV-2) σε κάθε στάδιο της ιογενούς μόλυνσης κατά τη διάρκεια *in vitro* μελετών σε κυτταρική σειρά Vero [82]. Η ναρινγενίνη, λόγω της αποτελεσματικής δράσης της έναντι των ελεύθερων ριζών, έχει προταθεί ως θεραπευτικό συμπλήρωμα των αναστολέων νουκλεοσιδικής-αντιστρεπτικής μεταγραφάσης (NRTIs) για την αντι-ρετροϊκή θεραπεία (cARVs), με στόχο τον περιορισμό της μιτοχονδριακής τοξικότητας αυτών των φαρμάκων [83]. Μελέτες πρόσδεσης *in silico* με διάφορα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένης της ναρινγενίνης, έδειξαν αναστολή της θέσης νευραμινιδάσης στους ιούς γρίπης τύπου A [84].

Στα τέλη του 2019, ένας νέος κορονοϊός που μοιάζει με γρίπη και ονομάζεται COVID-19 (Coronavirus disease 2019) αναγνωρίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Πολλές θεραπευτικές προσεγγίσεις επικεντρώνονται σε αντι-ϊικούς παράγοντες που οδηγούν σε μείωση των φλεγμονωδών αντιδράσεων και περιορισμό των συμπτωμάτων, με τα φλαβονοειδή να έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω των διαφόρων βιολογικών ιδιοτήτων τους. Μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι ορισμένα φλαβονοειδή όπως η ναρινγενίνη, η καμφερόλη, η κερκετίνη και η απιγενίνη δρουν ως πιθανοί αναστολείς της κύριας πρωτεάσης του SARS-CoV-2 [85].

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή διαφόρων τύπων ιών και, ως εκ τούτου, θεωρούνται δυνητικοί φαρμακολογικοί

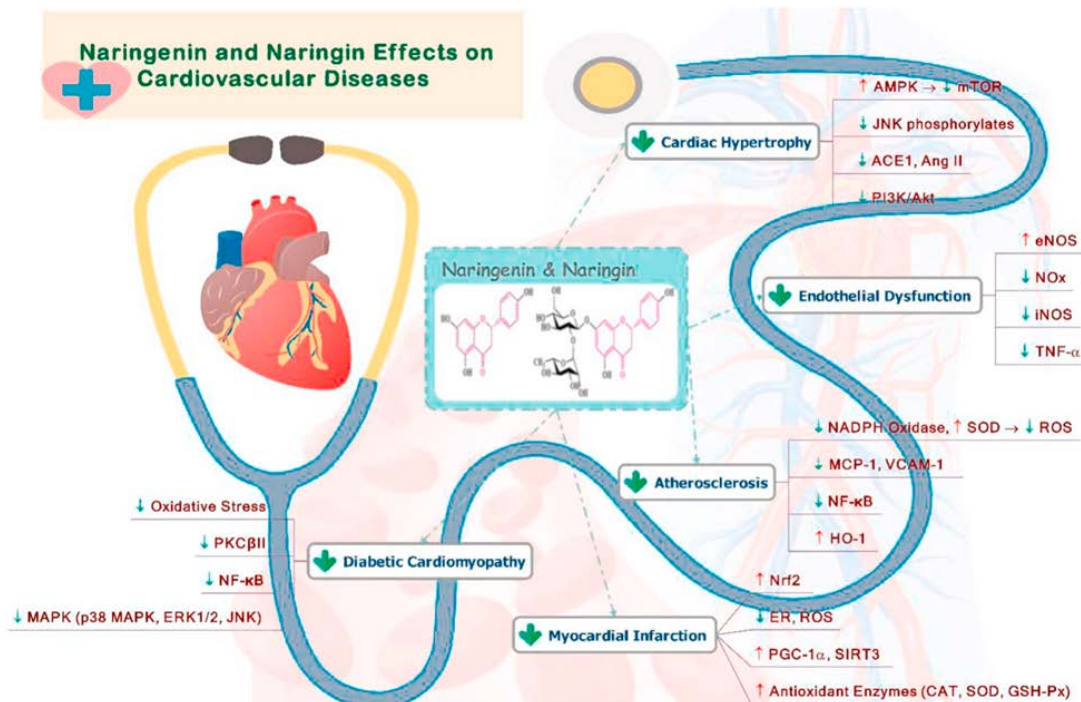
στόχοι για την πρόληψη της αντιγραφής του SARS-CoV-2 [86,87]. Ως εκ τούτου, ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η ναρινγενίνη θα μπορούσε να ασκήσει θεραπευτικά αποτελέσματα κατά του COVID-19 είναι μέσω της αναστολής της κύριας πρωτεΐδας του, της 3CLpro, και της αναστολής της ρύθμισης του υποδοχέα ACE2. Μια σύνοψη των πιθανών μηχανισμών για τις προστατευτικές επιδράσεις της ναρινγενίνης έναντι του COVID-19 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.7**. Ωστόσο, οι ευεργετικές επιδράσεις της ναρινγενίνης μέσω της εξασθένησης των φλεγμονωδών αποκρίσεων πρέπει ακόμη να επιβεβαιωθούν σε κλινικές δοκιμές.



Εικόνα 1.7. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της ναρινγενίνης έναντι του COVID-19. ACE2, μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2; NRG, ναρινγενίνη; NF-κB, πυρηνικός παράγοντας kappa B; 3CLpro, Πρωτεάση προσομοιάζουσα την 3-χυμοθρυψίνη; SARS, Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο [88].

1.3.5.6. Καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες

Τα φλαβονοειδή, όπως η ναρινγενίνη, είναι σημαντικά φυσικά φυτοχημικά για τη θεραπεία ή την πρόληψη διαφόρων διαταραχών, όπως οι καρδιακές παθήσεις (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8. Καρδιαγγειακές δράσεις και μοριακοί στόχοι της ναρινγενίνης [89].

Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες έχουν καταδείξει τις θετικές επιδράσεις της ναρινγενίνης στην αναστολή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης. Σε μια μελέτη που διεξήχθη σε κουνέλια για 8 εβδομάδες, στα ζώα χορηγήθηκε διαίτα με 1 % χοληστερόλη ή διαίτα με 1 % χοληστερόλη που περιείχε είτε 0.1 % είτε 0.05 % ναρινγενίνη και επιβεβαιώθηκε η ισχυρή αντι-αθηρογόνος δράση της, η οποία σχετίζεται κυρίως με τη μειωμένη ηπατική δραστηριότητα του ακυλο-συνένζυμου A: ακυλοτρανσφεράσης της χοληστερόλης, την υπο-ρύθμιση των γονιδίων της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων-1 (MCP-1) και του μορίου προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων-1 (VCAM-1). Σε κουνέλια που τρέφονταν με διαίτα υψηλής χοληστερόλης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θεραπεία με ναρινγενίνη μείωσε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MCP-1 και VCAM-1 στο τμήμα της αορτής και ανέστειλε τον σχηματισμό αορτικών λιπιδών ραβδώσεων [90].

Πολλοί ερευνητές έχουν διερευνήσει την επίδραση της ναρινγενίνης κατά της καρδιακής ανεπάρκειας σε διάφορα ζωικά μοντέλα. Σε μοντέλα *in vivo* και *in vitro*, ο Park και οι συνεργάτες του, αξιολόγησαν τις επιδράσεις της θεραπείας με ναρινγενίνη στην καρδιακή υπερτροφία που προκαλείται από φρουκτόζη και μελέτησαν τους μηχανισμούς δράσης, όπου διαπιστώθηκε ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η παραγωγή ROS στο μυοκάρδιο καταστέλλονται από τη ναρινγενίνη σε καρδιομυοκύτταρα που εκτίθενται σε φρουκτόζη μέσω του μονοπατιού AMPK/mTOR [91]. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι ο τραυματισμός από ισχαιμία/επαναιμάτωση (I/R) επηρεάζει αρνητικά την καρδιαγγειακή λειτουργία και επάγει την απόπτωση των κυττάρων. Η θεραπεία με ναρινγενίνη παρείχε προστασία έναντι του τραυματισμού I/R διεγείροντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση και διατηρώντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού AMPK-SIRT3 [92].

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι απαιτούνται ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές για την πλήρη αξιολόγηση του θεραπευτικού δυναμικού της ναρινγενίνης, η οποία μπορεί να είναι επωφελής για την περαιτέρω έρευνα και το σχεδιασμό αναλόγων ως νέων θεραπευτικών επιλογών για τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Το τελευταίο αποτέλεσε το αντικείμενο του **Κεφαλαίου 6**, όπου αναπτύχθηκαν συζεύγματα της ναρινγενίνης με σκοπό την περαιτέρω ενίσχυση των αντιαιμοπεταλιακών της ιδιοτήτων.

1.4. Σκοπός διδακτορικής διατριβής

Συνολικά, η ναρινγενίνη είναι ένα δυνητικό μόριο με εκτεταμένα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Αποτελεί πρωταρχικό υποψήφιο για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων λόγω της χαμηλής τοξικότητάς της με πολυάριθμες μελέτες να αναδεικνύουν τις αντιοξειδωτικές, αντιοιστρογονικές, αντι-υικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες της ναρινγενίνης.

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν τη βιολογική δραστηριότητα ενός φυτοχημικού προϊόντος είναι η βιοδιαθεσιμότητά του, όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 1.3.4**. Στο **Κεφάλαιο 3** επιχειρείται μια εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα για τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας και του φαρμακοκινητικού προφίλ των σημαντικότερων ομάδων φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένης της ναρινγενίνης, με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS).

Στο **Κεφάλαιο 2** γίνεται μια αναφορά στις σημαντικότερες τεχνικές για την απομόνωση φυτοχημικών ενώσεων από φυσικές πηγές αλλά και στο σημαντικό κομμάτι της προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων πριν την εισαγωγή τους σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινόλων είναι ένα δύσκολο έργο. Η LC-MS είναι πιθανώς η καταλληλότερη τεχνική, δεδομένου ότι παρέχονται χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και ταυτόχρονα μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες για τις δομές πιο περίπλοκων ενώσεων. Στο **Κεφάλαιο 4**, δίδονται περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την αρχή λειτουργίας των φασματομέτρων μάζας και τις τεράστιες δυνατότητες τους. Επίσης, παρουσιάζονται οι παλαιότερες, οι τρέχουσες και οι μελλοντικές προοπτικές σχετικά με την φασματομετρία μάζας με έμφαση στις δυνατότητές της τεχνικής αυτής για την ανάλυση φυσικών προϊόντων.

Λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν διάφορες πρωτεΐνες, οι πολυφαινόλες έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ως εκ τούτου, μέχρι σήμερα πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν εστιάσει και χρηματοδοτούνται προκειμένου να χαρακτηριστεί η περιεκτικότητα σε φαινόλες σε διάφορα φυτά, λαχανικά και φρούτα. Ένα τέτοιο φυτό είναι το χαρούπι (*Ceratonia Siliqua L.*) και τα προϊόντα του, τα οποία έχουν προσελκύσει πρόσφατα μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της σύστασής του σε πολυφαινόλες. Προτείνονται ως πιθανά τρόφιμα ή φαρμακευτικά

συμπληρώματα για ασθένειες που σχετίζονται με τον καρκίνο, τον διαβήτη, το γαστρικό βλεννογόνο και τα χρόνια γαστρικά έλκη. Στο **Κεφάλαιο 5** παρουσιάζονται αναλυτικά το χαρούπι και οι ιδιότητές του, δεδομένου ότι η ναρινγενίνη συναντάται στο χαρούπι ως ένα ποσοστό. Το χαρούπι είναι ένα φυσικό προϊόν που έχει προσελκύσει την προσοχή της ερευνητικής κοινότητας όχι μόνο λόγω των οφελών του στην ανθρώπινη υγεία αλλά και λόγω της σημασίας του για την οικονομία και το περιβάλλον.

Τα φυτοχημικά, όπως η ναρινγενίνη, μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μια μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών, στοχεύοντας όχι μόνο στην ενίσχυση της βιολογικής τους δραστηριότητας αλλά και στη διευκρίνιση του τρόπου με τον οποίο η δομή σχετίζεται με τη βιολογική λειτουργία. Το πλεονέκτημα αυτό, σε συνδυασμό με τις απλές συνθετικές μεθοδολογίες που οδηγούν στη σύνθεσή τους, καθιστά τις πολυφαινόλες ελκυστικές ενώσεις-στόχους στην οργανική και φαρμακευτική χημεία. Στο **Κεφάλαιο 6** περιγράφονται τροποποιήσεις στο μόριο της ναρινγενίνης με σκοπό την ενίσχυση της βιολογικής της δράσης και πιο συγκεκριμένα την περαιτέρω βελτίωση της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης.

1.5. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Cutler, S.J., & Cutler, H.G. (Eds.). *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals* (1st ed.) (1999). CRC Press.
- [2] Zhang J., Skinner M.A., «Cytoprotective Activity of Flavonoids in Relation to Their Chemical Structures and Physicochemical Properties in "Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects And Dietary Sources"», ed. Raymond B. Keller, Nova Science Publishers, Inc., New York (2009): 53-96.
- [3] Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2008;13(19-20):894-901.
- [4] Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 2016;79(3):629-61.
- [5] Koch MA, Schuffenhauer A, Scheck M, Wetzel S, Casaulta M, Odermatt A, et al. Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(48):17272-7.
- [6] The biosynthesis of secondary metabolites. In: Hanson JR, editor. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. 17: The Royal Society of Chemistry; 2003. p. 105-30.
- [7] Ganesan A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12(3):306-17.
- [8] Joshee N, Dhekney S, Parajuli P. *Medicinal Plants: from Farm to Pharmacy*. 2019. Springer.
- [9] McClure, J.W., Harborne, J.B., Mabry, T.J. and Mabry, H. (1975) *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London, 970.
- [10] Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(3):586-621.
- [11] Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(7):827-8.
- [12] Valant-Vetschera, KM, Wollenweber, E. Flavones and Flavonols. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Andersen, O, Markham, KM (Eds). CRC-Taylor & Francis, Boca Raton, (2006) 617–748.
- [13] Simini B. Serge Renaud: from French paradox to Cretan miracle. *Lancet*. 2000;355(9197):48.

- [14] de Groot H, Rauhen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998;12(3):249-55.
- [15] Austin MB, Noel JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*. 2003;20(1):79-110.
- [16] Falcone Ferreyra ML, Rius S, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*. 2012;3.
- [17] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*. 2001;126(2):485-93.
- [18] Vvedenskaya I, Vorsa N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. *Plant Science*. 2004;167:1043–1054.
- [19] Iriti M, Faoro F. Ancient plant diseases in Roman Age. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica*. 2008;43:15-21.
- [20] Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr Res*. 2017;61(1):1361779.
- [21] Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009;113(4):859-71.
- [22] Seeram NP, Momin RA, Nair MG, Bourquin LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*. 2001;8(5):362-9.
- [23] Seeram NP. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):627-9.
- [24] Zhao G, Qin GW, Wang J, Chu WJ, Guo LH. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Neurochem Int*. 2010;56(1):168-76.
- [25] Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(4):298-344.
- [26] Adams SM, Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM. Soy isoflavones genistein and daidzein exert anti-apoptotic actions via a selective ER-mediated mechanism in neurons following HIV-1 Tat(1-86) exposure. *PLoS One*. 2012;7(5):e37540.

- [27] Pan M-H, Lai C-S, Ho C-T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food & Function*. 2010;1(1):15-31.
- [28] Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(2):235-42.
- [29] Quideau S. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006;45(41):6786-7
- [30] Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*: Springer US; 2013.
- [31] Ganesan V, Li Z, Wang X, Zhang H. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2017;2(3):236-42.
- [32] Álvarez-Álvarez R, Botas A, Albillos SM, Rumbero A, Martín JF, Liras P. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microbial Cell Factories*. 2015;14(1):178.
- [33] Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, et al. The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(1).
- [34] Karim N, Jia Z, Zheng X, Cui S, Chen W. A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;79:35-54.
- [35] Wang Q, Yang J, Zhang X-m, Zhou L, Liao X-l, Yang B. Practical Synthesis of Naringenin. *Journal of Chemical Research*. 2015;39(8):455-7.
- [36] Koopman F, Beekwilder J, Crimi B, van Houwelingen A, Hall RD, Bosch D, et al. De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*. 2012;11(1):155.
- [37] Santos CN, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab Eng*. 2011;13(4):392-400.
- [38] Pandey RP, Parajuli P, Koffas MAG, Sohng JK. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnol Adv*. 2016;34(5):634-62.

- [39] Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huélamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventos RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*. 2014;154:299-307.
- [40] Yang Z, Kuboyama T, Tohda C. A Systematic Strategy for Discovering a Therapeutic Drug for Alzheimer's Disease and Its Target Molecule. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8.
- [41] Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. *Advances in Nutrition*. 2014;5(4):404-17.
- [42] Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004;24(10):851-74.
- [43] Shakeel S, Rehman MU, Tabassum N, Amin U, Mir MUR. Effect of Naringenin (A naturally occurring flavanone) Against Pilocarpine-induced Status Epilepticus and Oxidative Stress in Mice. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(Suppl 1):S154-s60.
- [44] Iijima Y, Nakamura Y, Ogata Y, Tanaka Ki, Sakurai N, Suda K, et al. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J*. 2008;54(5):949-62.
- [45] Currie GM. Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. *J Nucl Med Technol*. 2018 Sep;46(3):221-230. [PubMed] Herkenne C, Alberti I, Naik A, Kalia YN, Mathy FX, Prétat V, Guy RH. *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm Res*. 2008 Jan;25(1):87-103.
- [46] Chow SC. Bioavailability and Bioequivalence in Drug Development. *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*. 2014;6(4):304-312.
- [47] Fuhr U, Kummert AL. The fate of naringin in humans: A key to grapefruit juice-drug interactions? *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1995;58(4):365-73.
- [48] YS, Reidenberg MM. A method for measuring naringenin in biological fluids and its disposition from grapefruit juice by man. *Pharmacology*. 1998;56(6):314-7.
- [49] Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice. *The Journal of Nutrition*. 2001;131(2):235-41.

- [50] Felgines C, Texier O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Régerat F, et al. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(6):G1148-54.
- [51] Martínez-Huélamo M, Tulipani S, Estruch R, Escribano E, Illán M, Corella D, et al. The tomato sauce making process affects the bioaccessibility and bioavailability of tomato phenolics: A pharmacokinetic study. *Food Chemistry*. 2015;173:864-72.
- [52] Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A. Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2017;8(1):155-80.
- [53] González-Sarrías A, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;69:281-8.
- [54] González-Sarrías A, Núñez-Sánchez MÁ, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(4):752-8.
- [55] Williamson G, Kay CD, Crozier A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(5):1054-112.
- [56] Ruh MF, Zacharewski T, Connor K, Howell J, Chen I, Safe S. Naringenin: A weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochemical Pharmacology*. 1995;50(9):1485-93.
- [57] Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(3):287-303.
- [58] Arafah A, Rehman MU, Mir TM, Wali AF, Ali R, Qamar W, et al. Multi-Therapeutic Potential of Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavone): Experimental Evidence and Mechanisms. *Plants*. 2020;9(12):1784.
- [59] Hernández-Aquino E, Muriel P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. *World J Gastroenterol*. 2018;24(16):1679-707.
- [60] Zaidun NH, Thent ZC, Latiff AA. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life Sci*. 2018;208:111-22.

- [61] Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, Ortega N, Perez-Mateos M, Muñiz P. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric*. 2010;90(7):1238-44.
- [62] Da Pozzo E, De Leo M, Faraone I, Milella L, Cavallini C, Piragine E, et al. Antioxidant and Antisenescence Effects of Bergamot Juice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9395804.
- [63] Rashmi R, Bojan Magesh S, Mohanram Ramkumar K, Suryanarayanan S, Venkata SubbaRao M. Antioxidant Potential of Naringenin Helps to Protect Liver Tissue from Streptozotocin-Induced Damage. *Rep Biochem Mol Biol*. 2018;7(1):76-84.
- [64] Sharma M, Akhtar N, Sambhav K, Shete G, Bansal AK, Sharma SS. Emerging potential of citrus flavanones as an antioxidant in diabetes and its complications. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(2):187-95.
- [65] Annadurai T, Muralidharan AR, Joseph T, Hsu MJ, Thomas PA, Geraldine P. Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012;68(3):307-18.
- [66] Jayaraman J, Jesudoss VA, Menon VP, Namasivayam N. Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury. *Toxicol Mech Methods*. 2012;22(7):568-76.
- [67] Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, et al. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*. 2010;61(4):672-85/
- [68] Zobeiri M, Belwal T, Parvizi F, Naseri R, Farzaei MH, Nabavi SF, et al. Naringenin and its Nano-formulations for Fatty Liver: Cellular Modes of Action and Clinical Perspective. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(3):196-205.
- [69] Yilma AN, Singh SR, Morici L, Dennis VA. Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for *Chlamydia trachomatis* inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:102457.
- [70] Coelho RC, Hermsdorff HH, Bressan J. Anti-inflammatory properties of orange juice: possible favorable molecular and metabolic effects. *Plant Foods Hum Nutr*. 2013;68(1):1-10.

- [71] Vafeiadou K, Vauzour D, Lee HY, Rodriguez-Mateos A, Williams RJ, Spencer JP. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophys*. 2009;484(1):100-9.
- [72] Rani N, Bharti S, Krishnamurthy B, Bhatia J, Sharma C, Kamal MA, et al. Pharmacological Properties and Therapeutic Potential of Naringenin: A Citrus Flavonoid of Pharmaceutical Promise. *Curr Pharm Des*. 2016;22(28):4341-59.
- [73] Ali F, Khan AQ, Khan R, Sultana S. Trichloroethylene-mediated cytotoxicity in human epidermal keratinocytes is mediated by the rapid accumulation of intracellular calcium: Interception by naringenin. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(2):147-61.
- [74] Lee MH, Yoon S, Moon JO. The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(1):72-6.
- [75] Kapoor R, Kakkar P. Naringenin accords hepatoprotection from streptozotocin induced diabetes *in vivo* by modulating mitochondrial dysfunction and apoptotic signaling cascade. *Toxicol Rep*. 2014;1:569-81.
- [76] Mulvihill EE, Assini JM, Sutherland BG, DiMattia AS, Khami M, Koppes JB, et al. Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):742-8.
- [77] Yen FL, Wu TH, Lin LT, Cham TM, Lin CC. Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure. *Pharm Res*. 2009;26(4):893-902.
- [78] Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, et al. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(3):527-30.
- [79] Harmon AW, Patel YM. Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;85(2):103-10.
- [80] Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seeram NP, Xu A, et al. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2006;17(2):89-95.
- [81] Qin L, Jin L, Lu L, Lu X, Zhang C, Zhang F, et al. Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model. *Protein Cell*. 2011;2(6):507-16.

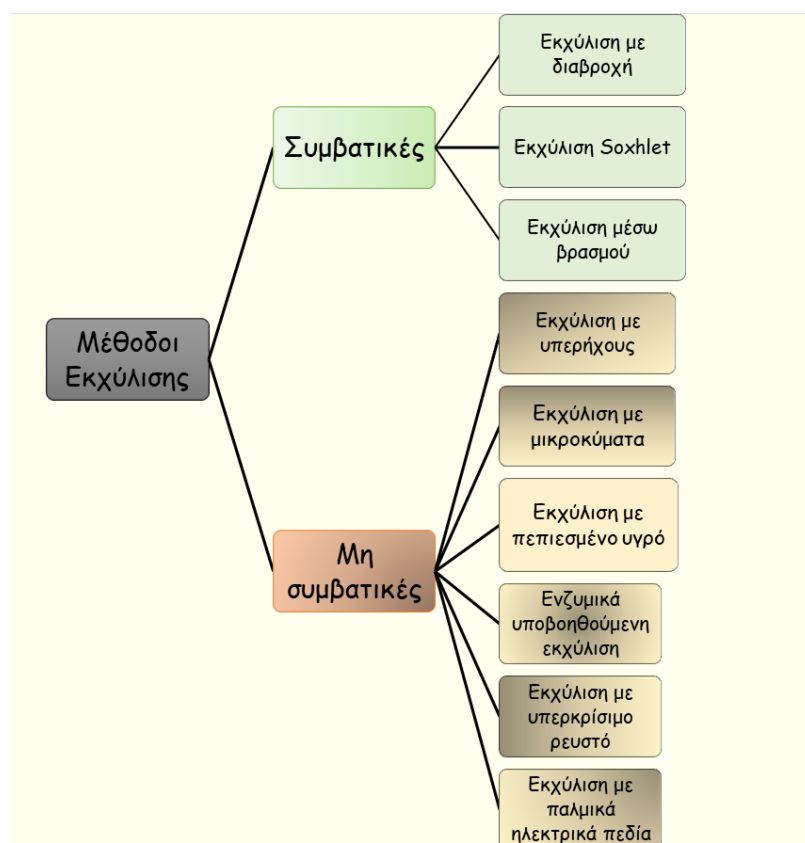
- [82] Zandi K, Teoh B-T, Sam S-S, Wong P-F, Mustafa MR, AbuBakar S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12(1):214.
- [83] Lutu MR, Nzuzi S, Mofu Mato PE, Govender K, Gumede LM, Kumalo SI, et al. DNA polymerase- γ hypothesis in nucleoside reverse transcriptase-induced mitochondrial toxicity revisited: A potentially protective role for citrus fruit-derived naringenin? *Eur J Pharmacol*. 2019;852:159-66.
- [84] Sadati, S. M., Gheibi, N., Ranjbar, S., Hashemzadeh, M. S. (2019). Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Biomedical Reports*, 10(1), 33–38.
- [85] Khaerunnisa, S.; Kurniawan, H.; Awaluddin, R.; Suhartati, S.; Soetjipto, S. Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (Mpro) From Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study. *Preprints 2020*, 2020030226.
- [86] Chang K-O, Kim Y, Lovell S, Rathnayake AD, Groutas WC. Antiviral Drug Discovery: Norovirus Proteases and Development of Inhibitors. *Viruses*. 2019;11(2):197.
- [87] Liu X, Wang X-J. Potential inhibitors against 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines. *J Genet Genomics*. 2020;47(2):119-21.
- [88] Tutunchi H, Naeini F, Ostadrahimi A, Hosseinzadeh-Attar MJ. Naringenin, a flavanone with antiviral and anti-inflammatory effects: A promising treatment strategy against COVID-19. *Phytother Res*. 2020;34(12):3137-47.
- [89] Heidary Moghaddam R, Samimi Z, Moradi SZ, Little PJ, Xu S, Farzaei MH. Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. *European Journal of Pharmacology*. 2020;887:173535.
- [90] Lee C-H, Jeong T-S, Choi Y-K, Hyun B-H, Oh G-T, Kim E-H, et al. Anti-Atherogenic Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, Associated with Hepatic ACAT and Aortic VCAM-1 and MCP-1 in High Cholesterol-Fed Rabbits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;284(3):681-8.
- [91] Park JH, Ku HJ, Kim JK, Park J-W, Lee JH. Amelioration of High Fructose-Induced Cardiac Hypertrophy by Naringin. *Scientific Reports*. 2018;8(1):9464.
- [92] Yu L-M, Dong X, Xue X-D, Zhang J, Li Z, Wu H-J, et al. Naringenin improves mitochondrial function and reduces cardiac damage following ischemia-reperfusion injury: the role of the AMPK-SIRT3 signaling pathway. *Food & Function*. 2019;10(5



2.1. Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων

Με την πάροδο των ετών, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι στρατηγικών εξαγωγής φυσικών προϊόντων, λαμβάνοντας υπόψη ιδιότητες όπως η φύση της μήτρας της πηγής, η σχετική διαλυτότητα, η δομή και οι χημικές ιδιότητες τόσο της βιοδραστικής ένωσης όσο και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, καθώς και την επίδραση της θερμοκρασίας, της πίεσης, του pH κ.λπ. στο χρόνο, την απόδοση και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης [1]. Η επιτυχία και η αποτελεσματικότητα κάθε μεθόδου καθορίζεται από τον κατάλληλο συνδυασμό των παραμέτρων αυτών και για το σκοπό αυτό εφαρμόζονται ειδικές στρατηγικές βελτιστοποίησης των διεργασιών εκχύλισης [2]. Η ποικιλομορφία των πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και των μικροβίων στη φύση και οι αναρίθμητες εφαρμογές τους σε διάφορους τομείς καθιστούν αναγκαία τη χρήση μιας τεράστιας σειράς μεθόδων εκχύλισης, βελτιστοποιημένων ανάλογα με τις ιδιότητές τους [3].

Η εκχύλιση είναι η διαδικασία απόκτησης μιας ένωσης ενδιαφέροντος από μια ακατέργαστη πηγή. Ταξινομείται σε γενικές γραμμές σε δύο τύπους: i) στη συμβατική και ii) τη μη συμβατική. Οι συμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν: α) την εκχύλιση με διαβροχή (decoction), β) την εκχύλιση μέσω βρασμού (maceration) και γ) την εκχύλιση Soxhlet. Οι περισσότερες μονάδες εκχύλισης βιομηχανικής κλίμακας βασίζονται σε διαλύτες (κυρίως εξάνιο), οι περισσότεροι από τους οποίους είναι προϊόντα της πετροχημικής βιομηχανίας. Η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και η μαζική χρήση αυτών των διαλυτών έχουν δυσμενείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις [4]. Οι μη συμβατικές μέθοδοι επικεντρώνονται συνεπώς στη χρήση διαφόρων φυσικών ή ενζυμικών μέσων για την ενίσχυση της εκχύλισης (υπέρηχοι, πίεση, παλμικά ηλεκτρικά πεδία, μικροκύματα, κ.λπ.), ενώ χρησιμοποιούν μικρότερες ποσότητες διαλυτών ή εξειδικευμένων "πράσινων" διαλυτών (υπερκρίσιμα ρευστά, βαθιά ευτηκτικά μείγματα, κ.λπ.) [5]. Στην **Εικόνα 2.1** παρουσιάζονται η ταξινόμηση των 2 κυριότερων μεθόδων εκχύλισης μαζί με συγκεκριμένα παραδείγματα τεχνικών εκχύλισης σε κάθε κατηγορία. Στο **Παράρτημα Β** δίνονται περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις κατηγορίες των συμβατικών και μη συμβατικών τεχνικών εκχύλισης.



Εικόνα 2.1. Κατηγοριοποίηση των κυριότερων μεθόδων εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων [6].

2.2. Προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων για ανάλυση με την μέθοδο LC-MS

Η βιοανάλυση είναι ένας κλάδος της αναλυτικής χημείας για τον προσδιορισμό των ξеноβιοτικών (χημικά συντιθέμενα ή φυσικά εκχυλισμένα υποψήφια φάρμακα και γενετικά παραγόμενα βιολογικά μόρια ή/και οι μεταβολίτες τους ή μετα-μεταφραστικά τροποποιημένα προϊόντα) και βιοτικά (μακρομόρια όπως πρωτεΐνες και DNA, μικρομοριακά ενδογενείς μεταβολίτες) σε βιολογικά συστήματα. Η βιοανάλυση εστιάζει στη βιομηχανία της ανθρώπινης υγείας με σκοπό την παροχή μιας ποσοτικής μέτρησης του δραστικού φαρμάκου ή/και του μεταβολίτη(-ών) ή/και βιοδεικτών για την ακριβή αξιολόγηση της φαρμακοκινητικής, της τοξικοκινητικής, της βιοϊσοδυναμίας, της βιοδιαθεσιμότητας και της φαρμακοκινητικής / φαρμακοδυναμικής, για την υποστήριξη της ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων φαρμάκων, καθώς και για την παρακολούθηση φαρμάκων μετά την έγκρισή τους [7].

Πολλές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιοανάλυση, συμπεριλαμβανομένης της υγρής χρωματογραφίας με υπεριώδη/φθορισμό ανίχνευσης (LC-UV/FL), της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS), και της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Μεταξύ αυτών των τεχνικών, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) αποτελεί την πιο διαδεδομένη και αξιόπιστη μέθοδο λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της εξειδίκευσης της. Στη βιοανάλυση με LC-MS, μια υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) ή υπερ-υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία υψηλής (UHPLC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό του(των) αναλύτη(ων) ενδιαφέροντος από άλλα ανεπιθύμητα συστατικά της μήτρας σε εκχυλίσματα δειγμάτων, με βάση τις ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του(των) αναλύτη(-ων) ενδιαφέροντος και της αναλυτικής στήλης της υγρής χρωματογραφίας. Το έκλουσμα από την LC εισάγεται στη συνέχεια σε φασματόμετρο μάζας για μοριακή ανάλυση που επιτυγχάνεται με διαχωρισμό μέσω της τεχνικής παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (SRM/MRM). Στην τεχνική SRM ή MRM, το(α) συγκεκριμένο(α) πρόδρομο(α) ιόν(τα) της αναλυτή που μας ενδιαφέρει επιλέγεται για επαγόμενη διάσπαση μέσω σύγκρουσης (Collision Induced Dissociation, CID) για τη δημιουργία ιόντων θραυσμάτων που είναι επίσης ειδικά για τον(τους) αναλύτη(-ες) ενδιαφέροντος, και συνήθως τα πιο άφθονα ιόντα που προκύπτουν από τη θραυσματοποίηση επιλέγονται για ανίχνευση με MS. Με την ειδικότητα και την ευαισθησία που παρέχει τόσο ο διαχωρισμός με LC όσο και η τεχνική της MRM του συστήματος MS, η LC-MS/MS έχει γίνει ένα από τα πλέον κατάλληλα εργαλεία για την ποσοτική βιοανάλυση [7].

Η κοινή μήτρα που υποβάλλεται σε βιοανάλυση με LC-MS, περιλαμβάνει διάφορα σωματικά υγρά (π.χ. πλάσμα, ορός, ολικό αίμα, σάλιο, δάκρυα και ούρα) καθώς και όργανα με ιστούς (π.χ. νεφρά, ήπαρ, πνεύμονες, δέρμα και εγκεφαλικό ιστό). Γενικά, αυτά τα βιολογικά δείγματα περιέχουν άφθονα ενδογενή συστατικά όπως άλατα, μικρά μόρια, πρωτεΐνες και λιπίδια, ή εξωγενή συστατικά όπως συστατικά από διάφορα σκευάσματα. Αντίθετα, ο(οι) αναλυτής(-ές) που μας ενδιαφέρει(-ουν) είναι συχνά σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, συνήθως σε επίπεδα συγκέντρωσης ng mL^{-1} και ακόμη και σε επίπεδα pg mL^{-1} για πολύ δραστικά μόρια. Η παρουσία άφθονων (συνήθως σε εύρος συγκέντρωσης από $\mu\text{g mL}^{-1}$ έως mg mL^{-1}) ενδογενών ή εξωγενών συστατικών στη βιολογική μήτρα, επιδεινώνει την ποσοτικοποίηση του/των αναλυτή(ών) ενδιαφέροντος, μιας και βρίσκονται σε πολύ

χαμηλή συγκέντρωση αποτελώντας μια πρόκληση για τους βιοαναλυτικούς επιστήμονες στον κομμάτι της ανάπτυξης και επικύρωσης μιας αξιόπιστης βιοαναλυτικής LC-MS μεθόδου [7].

Προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής ευαισθησία, επιλεκτικότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου LC-MS για τη μέτρηση του(ων) αναλύτη(-ών) ενδιαφέροντος σε βιολογικά δείγματα, η προκατεργασία του δείγματος, επίσης γνωστή ως καθαρισμός του δείγματος, αποτελεί ένα απαραίτητο και σημαντικό βήμα. Η προκατεργασία ενός δείγματος στην βιοανάλυση για ανάλυση μέσω LC-MS, θεωρείται μια προ-αναλυτική διαχωριστική διαδικασία που περιλαμβάνει την επιλεκτική απομόνωση του(των) αναλύτη(-ων) ενδιαφέροντος από τη μήτρα, την ελαχιστοποίηση ή την εξάλειψη των ενδογενών ή εξωγενών συστατικών της μήτρας στα εκχυλισμένα δείγματα και, εάν είναι απαραίτητο, εμπλουτισμός του(των) αναλύτη(-ων) για να διασφαλιστεί η απαραίτητη ευαισθησία της μεθόδου ανάλυσης. Μια ιδανική μέθοδος προκατεργασίας δείγματος θα πρέπει να είναι σε θέση να μειώσει την επίδραση της μήτρας σε ένα ελάχιστο επίπεδο διατηρώντας παράλληλα μια συνεπή ανάκτηση του διαλύτη (π.χ. 80 %). Επιπλέον λόγοι που κρίνεται απαραίτητη η προκατεργασία ενός δείγματος είναι:

- ✓ η σταθεροποίηση του αναλύτη για αποφυγή τυχόν αποσύνθεσης του από τη δράση ενζύμων,
- ✓ η απομάκρυνση ενώσεων που μπορούν να επηρεάσουν την εύρυθμη λειτουργία του συστήματος LC-MS (φράξιμο σωληνώσεων, στήλης, φίλτρων κτλ.),
- ✓ απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών που ενδέχεται να προκαλούν ισχυρό σήμα υποβάθρου ή καταστολή του σήματος του αναλύτη,
- ✓ απομάκρυνση ενώσεων που μπορεί να επηρεάσουν την ευαισθησία τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του αναλύτη, την επαναληψιμότητα και γενικά την αξιοπιστία της ανάλυσης [8].

Ωστόσο, λόγω των πολλών παραγόντων που επηρεάζουν την απομάκρυνση των συστατικών της μήτρας και την ανάκτηση του αναλύτη, η ανάπτυξη μιας βέλτιστης διαδικασίας προκατεργασίας δείγματος μπορεί να είναι δύσκολη και χρονοβόρα, γεγονός που την καθιστά ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία στην ανάπτυξη μιας αξιόπιστης βιοαναλυτικής μεθόδου LC-MS [7].

Στις επόμενες ενότητες, περιγράφονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές επεξεργασίας δειγμάτων στη βιοανάλυση με LC-MS, όπως είναι: i) **η κατακρήμνιση πρωτεϊνών** (Protein Precipitation, PP), ii) **η εκχύλιση υγρού-υγρού** (Liquid Liquid Extraction, LLE) iii) και **η εκχύλιση στερεάς φάσης** (Solid Phase Extraction, SPE). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που προέρχονται από αυτές τις τρεις βασικές τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων, όπως επίσης και αναδυόμενες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούν προηγμένες τεχνικές για πιο επιλεκτική ή/και αποτελεσματική εκχύλιση του αναλύτη ενδιαφέροντος. Μερικές από αυτές είναι η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid-phase microextraction, LPME), μια παραλλαγή της LLE, με τη χρησιμοποίηση μόνο λίγων μικρόλιτρων οργανικού διαλύτη και η πιο πρόσφατη μέθοδος LLE υποβοηθούμενης με εξαλάτωση (Salting-out Assisted Liquid/Liquid Extraction, SALLE) [9,10].

2.2.1. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Μια κοινή βιολογική μήτρα, όπως το αίμα, το πλάσμα, ή ο ορός περιέχει περίπου 8 % (w/w) πρωτεΐνες. Η άμεση έγχυση αυτών των δειγμάτων σε ένα σύστημα LC-MS δεν αποτελεί γενικά καλή πρακτική για βιοανάλυση με LC-MS. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες σε αυτά τα δείγματα θα μπορούσαν να καθιζάνουν εύκολα ως αποτέλεσμα της επαφής τους με οργανικούς διαλύτες και/ή ρυθμιστικά μέσα στην κινητή φάση. Ως αποτέλεσμα της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών στην LC, η απόδοση της στήλης θα επιδεινωθεί ταχέως (φράξιμο στήλης, αύξηση πίεσης κτλ.), εκτός εάν η πλειονότητα των πρωτεϊνών στα δείγματα απομακρυνθεί [7].

Η PP είναι μια απλή, γρήγορη και άμεση τεχνική για την προκατεργασία δειγμάτων στη βιοανάλυση με χρήση LC-MS. Σε αυτή τη διαδικασία, ένα μικρός όγκος αίματος, πλάσματος, ορού, ομογενοποιημένου ιστού, ή άλλων υδατικών μητρών αναμιγνύεται με ένα ορισμένο όγκο μέσου κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Όταν οι πρωτεΐνες στο δείγμα μήτρα/διάλυμα έρχονται σε επαφή με το μέσο κατακρήμνισης, η διαμόρφωση των πρωτεϊνών μεταβάλλεται λόγω της αλληλεπίδρασης αυτής, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση και την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα των αλλαγών διαμόρφωσης των πρωτεϊνών, ο(οι) αναλύτης(-ες) ενδιαφέροντος που είναι συνδεδεμένος(-ες) με αυτές απελευθερώνονται και παραμένουν στο διάλυμα. Κατά τη φυγοκέντρωση ή/και τη διήθηση, οι κατακρημνισμένες πρωτεΐνες διαχωρίζονται από το υπερκείμενο που περιέχει τον ή τους αναλύτες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο είτε εγχέεται απευθείας στο LC-MS

σύστημα είτε εξατμίζεται και ανασυστάται με ορισμένο όγκο διαλύτη συμβατό με την LC-MS μέθοδο [11].

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για τη PP είναι σχετικά απλός. Περιλαμβάνει χαμηλού κόστους σωληνάρια για φυγοκέντρηση και μια φυγόκεντρο. Εάν η ανάπτυξη μεθόδου και/ή η βελτιστοποίηση είναι απαραίτητη, είναι σχετικά απλή λόγω της απλής φύσης της τεχνικής. Εν συντομία, η βελτιστοποίηση μιας μεθόδου PP περιλαμβάνει την επιλογή του μέσου κατακρήμνισης και της ποσότητας του μαζί με τη φυγοκέντρηση και/ή διήθηση. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της PP είναι η υψηλή ανάκτησή του αναλύτη ενδιαφέροντος σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, π.χ. LLE και SPE. Δεδομένου ότι μόνο οι πρωτεΐνες απομακρύνονται υποθετικά από τη μήτρα, οι αναλύτες με μικρό μέγεθος παραμένουν στο διάλυμα και αυτό αποδίδει μια θεωρητική ανάκτηση 100 %. Αυτό το πλεονέκτημα της PP την έχει καταστήσει πολύ δημοφιλή τεχνική στη βιοαναλυτική κοινότητα [7].

Τα κοινά μέσα κατακρήμνισης πρωτεϊνών περιλαμβάνουν: i) οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με νερό, ii) οξέα, iii) ιόντα μετάλλων, ή iv) άλατα. Μεταξύ αυτών, οι αναμίξιμοι με το νερό οργανικοί διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη, η αιθανόλη και η ακετόνη καθώς και τα οξέα όπως το τριχλωροοξικό και το υπερχλωρικό οξύ είναι τα πιο συνηθισμένα. Στην πρώτη περίπτωση η δράση των οργανικών διαλυτών έγκειται στη μείωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών και την καθίζηση τους στο διάλυμα ενώ στην περίπτωση των οξέων ο σχηματισμός αδιάλυτων αλάτων με την κατιοντική μορφή των πρωτεϊνών σε χαμηλές τιμές pH [11,12].

2.2.2. Εκχύλιση υγρού-υγρού

Η LLE είναι μια άλλη κοινή τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιοανάλυση με LC-MS. Η μέθοδος περιλαμβάνει την εκχύλιση του(των) αναλύτη(-ων) ενδιαφέροντος ή ανεπιθύμητων συστατικών της μήτρας, από μια υγρή φάση (π.χ. βιολογικά δείγματα) σε μια άλλη μη αναμίξιμη υγρή φάση (π.χ. οργανικός διαλύτης), με αποτέλεσμα τον καθαρισμό του δείγματος. Η κατανομή επηρεάζεται από το pH της υδατικής φάσης, την επιλογή του οργανικού διαλύτη και από το λόγο των όγκων της οργανικής προς την υδατική φάση.

Στην LLE, βιολογικά δείγματα (πλάσμα, ορός, ολικό αίμα, και ούρα ή ομογενοποιημένος ιστός) συνήθως αναμιγνύονται με πρόσθετα (ρυθμιστικό διάλυμα, οξέα ή βάσεις) για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική εκχύλιση των μορίων-στόχων. Αυτό

ακολουθείται από την προσθήκη του διαλύματος εργασίας του εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, IS) που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό και ενός οργανικού διαλύτη (διαλύτης εκχύλισης), ο οποίος είναι μη αναμίξιμος με νερό. Στη συνέχεια, το μείγμα των δύο μη αναμίξιμων φάσεων ανακινείται ή αναμιγνύεται με vortex για ορισμένο χρονικό διάστημα για να αναμιχθεί το δείγμα και ο οργανικός διαλύτης, κατά τη διάρκεια της οποίας τα μόρια-στόχοι μεταφέρονται από την υδατική φάση στην οργανική φάση ή αντίστροφα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό των φάσεων. Μετά την φυγοκέντρηση, η φάση που περιέχει τα μόρια-στόχους μπορεί να συλλεχθεί για περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση, όπως για παράδειγμα εξάτμιση και ανασύσταση σε άλλο διαλύτη [13].

Η δυνατότητα της εκχύλισης υγρού-υγρού συμβάλλει στη μεγαλύτερη αναπαραγωγιμότητα και πιστότητα της ανάλυσης μιας και δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα σε σχέση με τις άλλες τεχνικές εκχύλισης ενώ η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει την κάνει ιδιαίτερα εφαρμόσιμη σε ένα μεγάλο εύρος φαρμακευτικών ουσιών [11,14].

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η μεγάλη ποσότητα οργανικού διαλύτη που απαιτείται καθώς και η μειωμένη ευαισθησία όταν χρησιμοποιείται μικρός όγκος δείγματος και διαλύτη [15].

2.2.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια ισχυρή τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων που χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες για την εκλεκτική εκχύλιση αναλυτών σε ιχνοποσότητες, σε μεγάλο εύρος βιολογικών δειγμάτων. Ο μηχανισμός της SPE είναι παρόμοιος με αυτόν της υγρής χρωματογραφίας, ο οποίος βασίζεται στη συγγένεια ή την αλληλεπίδραση μεταξύ διαλυμένων ουσιών (αναλύτης ενδιαφέροντος) που βρίσκονται διαλυμένα σε ένα υγρό δείγμα (κινητή φάση) και των υλικών ενός στερεού υποστρώματος (στερεά φάση).

Λόγω διαφορών στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα διάφορα συστατικά του υγρού δείγματος έχουν διαφορετική συγγένεια ή αλληλεπίδραση με τα υλικά της στερεάς φάσης της συσκευής SPE. Τα στάδια που λαμβάνουν χώρα είναι τα εξής:

- ✓ εξισορρόπηση στήλης πληρωμένης με κατάλληλο υλικό,
- ✓ φόρτωση δείγματος μετά από κατάλληλη επεξεργασία (αραίωση, ρύθμιση του pH και/ή προσθήκη του IS),

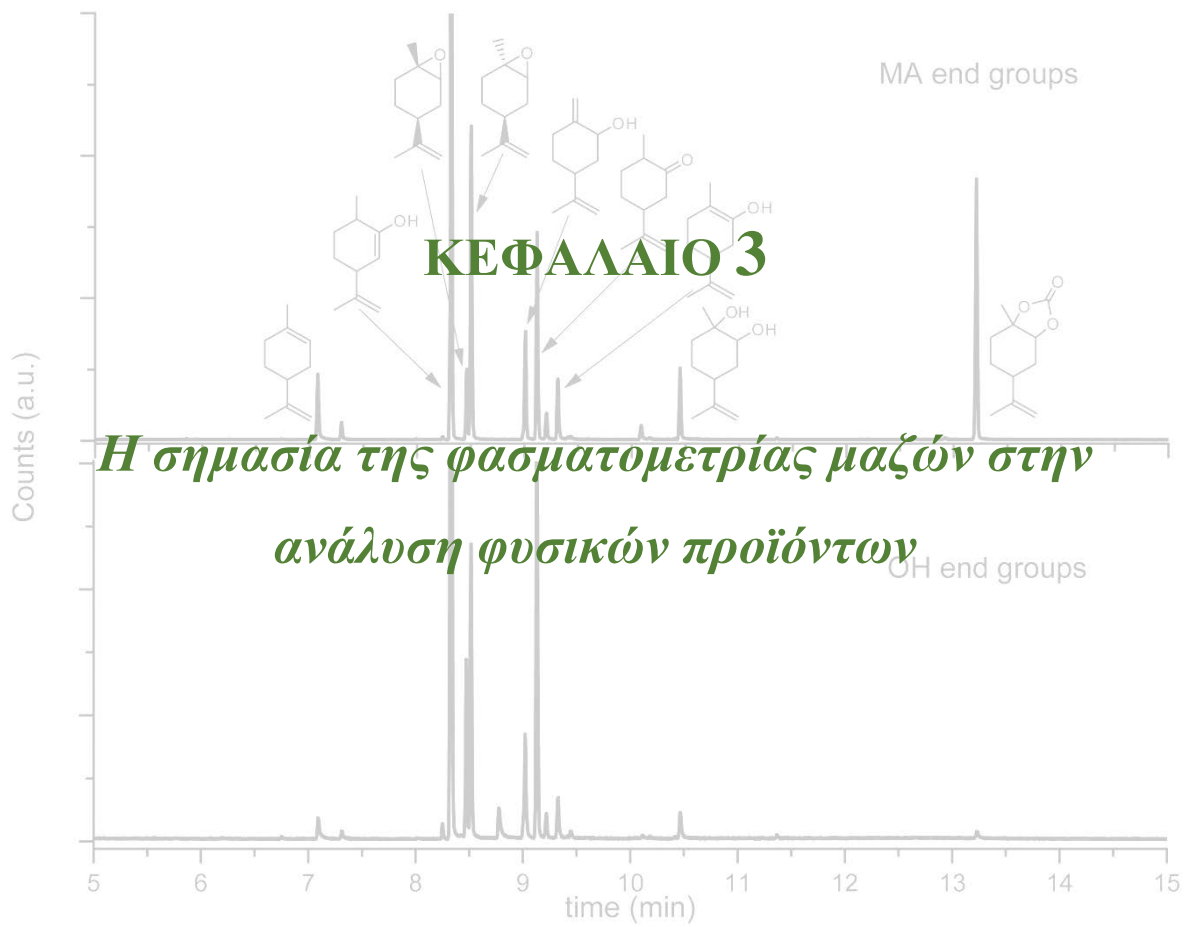
- ✓ ο αναλύτης ενδιαφέροντος συγκρατείται αλληλοεπιδρώντας με το υλικό της στερεάς φάσης μέσω διαφορετικών μηχανισμών αλληλεπιδράσεων,
- ✓ τα συστατικά της μήτρας είτε διέρχονται απευθείας από τη στήλη κατά τη διάρκεια φόρτωσης της ή εκπλένονται κατά το στάδια πλύσης της στήλης με κατάλληλο διαλύτη,
- ✓ ο(οι) αναλύτης(-ες) ενδιαφέροντος εκκλούνται στη συνέχεια από τη στήλη με κατάλληλο διαλύτη έκλουσης,
- ✓ το συλλεχθέν εκλουόμενο διάλυμα είτε υποβάλλεται απευθείας σε ανάλυση LC-MS είτε υποβάλλεται σε διαδικασία ξήρανσης για την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη,
- ✓ ανασύσταση με κατάλληλο διαλύτη πριν από την ανάλυση LC-MS [13,16].

Με την SPE, ορισμένα ζητήματα που σχετίζονται με την PP ή/και την LLE μπορούν να αποφευχθούν ή να ελαχιστοποιηθούν. Τα ζητήματα αυτά περιλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται σε i) φαινόμενα επίδρασης της μήτρας στην PP και ii) φτωχή ανάκτηση λόγω ατελούς διαχωρισμού φάσεων στην LLE. Επίσης δεν απαιτείται η χρήση ιδιαίτερα χαμηλών τιμών pH, καθιστώντας την κατάλληλη για ευαίσθητα σε χαμηλό pH φάρμακα, ενώ το ποσοστό ανάκτησης μπορεί να είναι μεγαλύτερο του 95 %. [11,17].

2.3. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):426-36.
- [2] Catarino MD, Silva AMS, Mateus N, Cardoso SM. Optimization of Phlorotannins Extraction from *Fucus vesiculosus* and Evaluation of Their Potential to Prevent Metabolic Disorders. *Marine Drugs*. 2019;17(3):162.
- [3] Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018;13(1):20.
- [4] Pal CBT, Jadeja GC. Microwave-assisted extraction for recovery of polyphenolic antioxidants from ripe mango (*Mangifera indica* L.) peel using lactic acid/sodium acetate deep eutectic mixtures. *Food Science and Technology International*. 2020;26(1):78-92.
- [5] Anticono M, Blesa J, Frigola A, Esteve MJ. High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods. *Foods*. 2020;9(6):811.
- [6] Pai S, Hebbar A, Selvaraj S. A critical look at challenges and future scopes of bioactive compounds and their incorporations in the food, energy, and pharmaceutical sector. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29:1-24.
- [7] Unger S, Li W, Flarakos J, Tse FLS. Roles of LC-MS Bioanalysis in Drug Discovery, Development, and Therapeutic Drug Monitoring. *Handbook of LC-MS Bioanalysis* 2013. p. 1-13.
- [8] McDowall RD. Sample preparation for biomedical analysis. *J Chromatogr*. 1989 Aug 11;492:3-58.
- [9] Jäntti SE, Tammimäki A, Raattamaa H, Piepponen P, Kostianen R, Ketola RA. Determination of steroids and their intact glucuronide conjugates in mouse brain by capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2010 Apr 15;82(8):3168-75.
- [10] Zhang J, Rodila R, Gage E, Hautman M, Fan L, King LL, Wu H, El-Shourbagy TA. High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2010 Feb 28;661(2):167-72.

- [11] Moidoveanu SC, David V. Chapter 3 - Overview on Sample Preparation for Chromatography. In: Moidoveanu SC, David V, editors. *Journal of Chromatography Library*. 65: Elsevier; 2002. p. 137-63.
- [12] Jemal M. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr*. 2000 Oct;14(6):422-9.
- [13] Liu G, Aubry A-F. Best Practices in Biological Sample Preparation for LC-MS Bioanalysis. *Handbook of LC-MS Bioanalysis* 2013. p. 165-84.
- [14] *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* Edited by Somenath Mitra (New Jersey Institute of Technology). From the series *Chemical Analysis, Volume 162*. Edited by J. D. Winefordner. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2003. xx + 458 pp. \$89.95. ISBN 0-471-32845-6. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(5):1585-.
- [15] Kousoulos C, Tsatsou G, Apostolou C, Dotsikas Y, Loukas YL. Development of a high-throughput method for the determination of itraconazole and its hydroxy metabolite in human plasma, employing automated liquid-liquid extraction based on 96-well format plates and LC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006;384(1)
- [16] Li P, Bartlett MG. A review of sample preparation methods for quantitation of small-molecule analytes in brain tissue by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical Methods*. 2014;6(16):6183-207.
- [17] Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(4):232-44



3.1. Εισαγωγή

Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για φυσικά προϊόντα με πιθανά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία ενισχύει την ανάγκη για πιο αποτελεσματικές και εξελιγμένες αναλυτικές μεθόδους. Η αρχή της μεθόδου, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους θα πρέπει να γίνονται κατανοητά προκειμένου να επιλέγονται οι καταλληλότερες αναλυτικές μέθοδοι, καθώς και να γίνεται προσεκτική βελτιστοποίηση των παραμέτρων που επηρεάζουν περισσότερο τα τελικά αποτελέσματα. Αυτό ισχύει τόσο για τις τεχνικές εκχύλισης όσο και για τις ενόργανες τεχνικές [1]. Παράλληλα, είναι εξαιρετικά σημαντικό να καθοριστούν τυποποιημένες και ολοκληρωμένες αναλυτικές προσεγγίσεις για την απομόνωση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυσικών προϊόντων και για τον σκοπό αυτό έχουν ήδη προταθεί διαγράμματα ροής για τη συστηματική μελέτη των φυσικών προϊόντων, τα οποία περιλαμβάνουν όλα τα στάδια από τη συλλογή των δειγμάτων έως τη βιομηχανοποίηση [2].

Επί του παρόντος, η φασματομετρία μάζας και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι οι πιο ολοκληρωμένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές σε εκπαιδευτικά και ερευνητικά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο για τη μελέτη και την ανακάλυψη οργανικών μορίων. Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα των φυσικών προϊόντων, καθώς διαθέτει υψηλή ευαισθησία και παρέχει λεπτομερείς δομικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο αυτού του είδους των ουσιών. Η πολυπλοκότητα της σύνθεσης των φυσικών εκχυλισμάτων (μείγμα ουσιών διαφορετικής φύσης), οδήγησε στην ανάπτυξη μηχανισμών για τη σύζευξη της φασματομετρίας μάζας με χρωματογραφικές τεχνικές διαφόρων ειδών, όπως η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC) ή η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC), ώστε να είναι δυνατή η ταχεία και αδιαμφισβήτητη ανάλυση πολλών συστατικών [3].

Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS ή HPLC-MS) επιτρέπει την ανίχνευση μεταβολιτών με ευρύ φάσμα χημικών χαρακτηριστικών, μοριακών μαζών και συγκεντρώσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα [4]. Τα εκχυλίσματα από οποιοδήποτε βιολογικό υλικό κλασματοποιούνται πρώτα χρωματογραφικά σε μια στατική φάση κατάλληλη για τη συγκράτηση των μορίων-στόχων. Γενικά, χρησιμοποιούνται στήλες αντίστροφης φάσης (π.χ. C-18) και στην κινητή φάση (βαθμιαία έκλυση ή ισοκρατική) χρησιμοποιείται συχνά ένας οργανικός διαλύτης όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο. Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούν συχνά έναν

ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), έναν ανιχνευτή διόδων (DAD) ή έναν ανιχνευτή φθορισμού (FLD), ανάλογα με τις ιδιότητες των μορίων [1,4]. Στη συνέχεια, το εκλουστικό υγρό μεταφέρεται απευθείας στην πηγή ιοντισμού για τον προσδιορισμό των μοριακών ιόντων. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα μεθόδων χρωματογραφικού διαχωρισμού και παραμετροποίησης του MS. Για τη βελτίωση του χρωματογραφικού διαχωρισμού και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC), καθώς η αναλυτική στήλη χρησιμοποιεί χαμηλό μέγεθος σωματιδίων (<2μm) και μπορεί να υποβληθεί σε υψηλότερη πίεση (έως 15-18.000 psi) σε σύγκριση με τις συμβατικές χρωματογραφικές μεθόδους [1].

Το κύριο πλεονέκτημα της εξέλιξης της φασματομετρίας μάζας στον τομέα των φυσικών προϊόντων είναι η μείωση των σταδίων προετοιμασίας του δείγματος, η οποία επιτρέπει την εξοικονόμηση χρόνου και δείγματος, καθώς και την ταχύτερη και αμεσότερη παρακολούθηση των φυσικών προϊόντων από βιολογικά δείγματα με τη χρήση ήπιων μεθόδων ιοντισμού. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων αλγορίθμων για την επεξεργασία δεδομένων MS οδήγησε στη δημιουργία τυποποιημένων διαδικασιών εργασίας για την ευκολότερη και ταχύτερη απεικόνιση των φυσικών προϊόντων, οδηγώντας σε σημαντική αύξηση της ανακάλυψης νέων φυσικών προϊόντων τα τελευταία χρόνια.

Σε αυτό το κεφάλαιο αναδεικνύεται πώς η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS) έχει συμβάλει στον ποιοτικό έλεγχο των φυσικών προϊόντων, καθώς και στην ανακάλυψη νέων μεταβολιτών βιοτεχνολογικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Οι μελλοντικές προοπτικές για την ανάλυση των φυσικών προϊόντων περιλαμβάνουν επίσης τη χρήση πιο αυτοματοποιημένων και εξελιγμένων τεχνικών για τη μείωση τόσο του χρόνου ανάλυσης όσο και της ποσότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται καθώς και για την αύξηση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας. Στην παρούσα διατριβή, και πιο συγκεκριμένα στο **Κεφάλαιο 6**, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS), οπότε περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με αυτή την τεχνική παρουσιάζονται στα πρώτα μέρη του **Κεφαλαίου 3**.

3.2. Υγρή χρωματογραφία

Από ιστορική άποψη, η χρωματογραφία είναι ίσως η μόνη αναλυτική τεχνική που αναπτύχθηκε στις αρχές του περασμένου αιώνα (από τον Ρώσο βοτανολόγο M. Tswett το

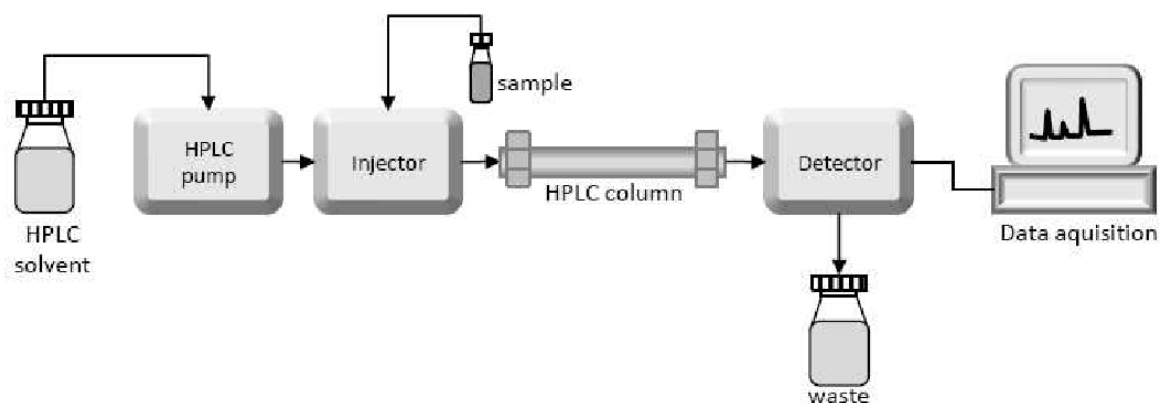
1903) και η οποία χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα σε ένα τόσο ευρύ πεδίο ερευνητικών εφαρμογών. Βασίζεται στη διαδικασία διαχωρισμού που επιτυγχάνεται, λόγω της διαφορετικής αλληλεπίδρασης των ενώσεων ενός μείγματος, με δύο αμιγείς φάσεις (μια στατική και μια κινητή φάση) [5].

Η τεχνική της χρωματογραφίας ταξινομείται σε αέρια, υγρή και υπερκρίσιμων ρευστών, ανάλογα με τη φυσική κατάσταση της κινητής φάσης (αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η υγρή χρωματογραφία (LC). Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) (**Εικόνα 3.1**) αποτελείται από:

- **Την κινητή φάση** που είναι συνήθως ένας συνδυασμός νερού αναμεμιγμένου με έναν οργανικό διαλύτη, όπως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη.
- **Την αντλία** που παρέχει συνεχή και επαναλαμβανόμενη ροή της κινητής φάσης υπό συνθήκες υψηλής πίεσης.
- **Τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος** που είναι το τμήμα μέσω του οποίου το δείγμα εισάγεται στο χρωματογραφικό σύστημα. Ο όγκος του δείγματος που εγχέεται στην αναλυτική στήλη εξαρτάται από τον όγκο του βρόχου που προσαρμόζεται στη βαλβίδα. Ο απλούστερος και ευρύτερα χρησιμοποιούμενος τύπος βαλβίδας είναι αυτός των έξι εισόδων και των δύο δρόμων.
- **Τη χρωματογραφική στήλη** που είναι το κύριο μέρος ενός χρωματογραφικού συστήματος. Το μεγαλύτερο ποσοστό των χρωματογραφικών διαχωρισμών πραγματοποιείται σε στήλες αντίστροφης φάσης, λιγότερο σε στήλες αποκλεισμού μοριακού μεγέθους και στήλες ιοντοανταλλαγής και μόνο ένα μικρό ποσοστό σε στήλες κανονικής φάσης. Τα πληρωτικά υλικά στήλης μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση και την πυκνότητα πρόσδεσής τους καθώς επίσης από φυσικά μεγέθη όπως το σχήμα, το μέγεθος των σωματιδίων και η διάμετρος [5].
- **Τον ανιχνευτή** που χωρίζεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν η ανίχνευση βασίζεται σε μια φυσικοχημική ιδιότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών (ανιχνευτής ιδιοτήτων διαλύματος) ή στη φυσική ιδιότητα της κινητής φάσης (ιδιότητα όγκου). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους κοινούς ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), τους φθορομετρικούς και ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές κ.λπ., ενώ η

δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους ανιχνευτές δείκτη διάθλασης και διηλεκτρικής σταθεράς.

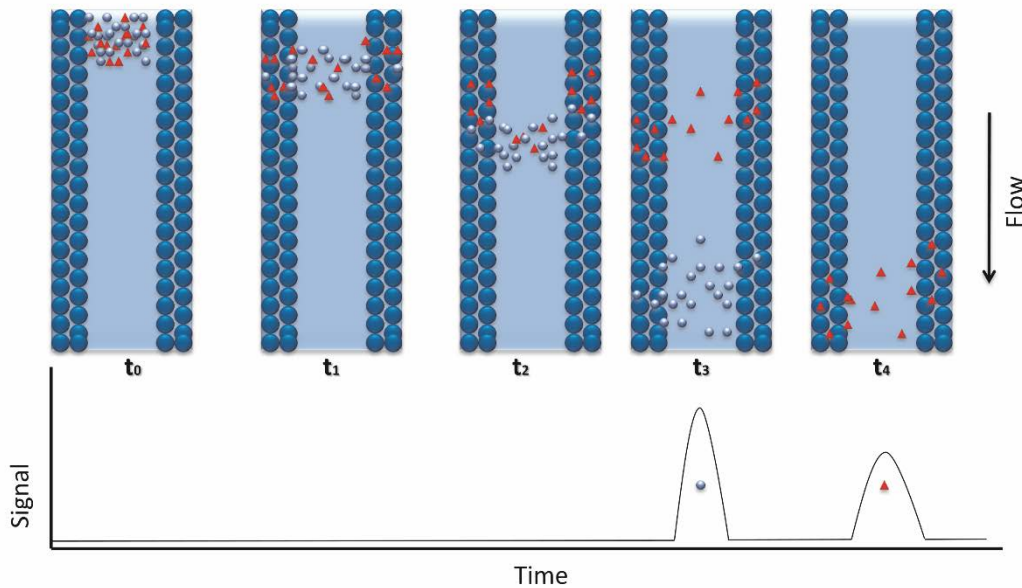
- Το σύστημα συλλογής και καταγραφής των αποτελεσμάτων, που είναι τις περισσότερες φορές ένας Η/Υ.



Εικόνα 3.1. Τυπικό HPLC σύστημα [6].

Η κινητή φάση (μετά την απαέρωση για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων) αντλείται μέσω αντλίας υψηλής πίεσης στην αναλυτική στήλη του χρωματογραφικού συστήματος μέσω της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος και στη συνέχεια διέρχεται μέσω της κυψέλης ροής στα απόβλητα. Το δείγμα εισάγεται αρχικά με μικροσύριγγα ή αυτόματο δειγματολήπτη στον βρόχο της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος και στη συνέχεια στη ροή της κινητής φάσης με αλλαγή της θέσης της βαλβίδας.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται στη χρωματογραφική στήλη. Οι ενώσεις διέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους λόγω του διαφορετικού βαθμού συγγένειας με την κινητή και τη σταθερή φάση (**Εικόνα 3.2**). Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία κυμαίνεται ενδεικτικά από 0.1 έως 5 mL min⁻¹ και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε ένα μεγάλο εύρος πιέσεων.



Εικόνα 3.2. Διαχωρισμός δύο ενώσεων βάσει διαφορετικού βαθμού συγγένειας με την κινητή και τη στατική φάση (προσαρμοσμένο σχήμα από εγχειρίδιο λειτουργίας φασματομέτρου μάζας της Bruker Daltonics).

Η αντλία παρέχει σταθερά υψηλή πίεση και μπορεί να προγραμματιστεί ώστε να μεταβάλλει τη σύνθεση της κινητής φάσης και τον ρυθμό ροής του δείγματος. Η έκλυση είναι είτε ισοκρατική, όπου η σύνθεση της κινητής φάσης δεν επηρεάζεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμιδωτή, όπου η σύνθεση της κινητής φάσης μεταβάλλεται για την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού.

Με την ισοκρατική έκλυση, όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά, είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ ταυτόχρονα, τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται έντονα από τη στήλη εκλύονται πολύ αργά, με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους.

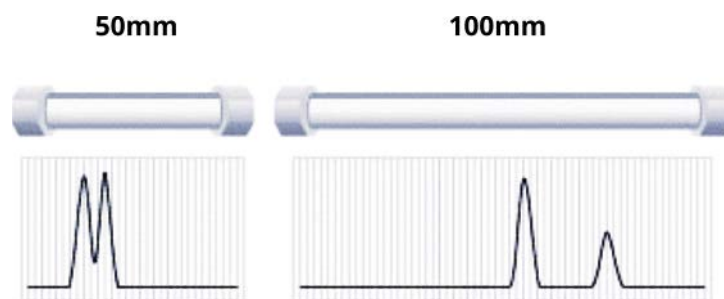
Με τη βαθμιαία έκλυση, ένας ασθενής διαλύτης αναμιγνύεται με έναν ισχυρό διαλύτη σε αναλογίες που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με το ποσοστό του ισχυρού διαλύτη να αυξάνεται συνεχώς. Έτσι, οι ενώσεις που έχουν μικρό χρόνο κατακράτησης στη στήλη διαχωρίζονται στην αρχή και, με την αύξηση της ισχύος του διαλύτη, οι ενώσεις που κατακρατούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εκλύονται αργότερα. Η βαθμιαία έκλυση μπορεί να επιτευχθεί με ένα σύστημα πολλαπλών διαλυτών και μια αντλία. Η ροή

κάθε διαλύτη αναμιγνύονται στον αναμικτήρα με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή ιοντική ισχύς.

Η κινητή φάση είναι ένα μείγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών που μπορούν να περιλαμβάνουν και ρυθμιστικά διαλύματα. Οι παράμετροι για την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι κατά κύριο λόγο η πολικότητα και η εκλεκτικότητά τους. Η επιλογή της κινητής φάσης βασίζεται στην πολικότητα με τέτοιο τρόπο ώστε να διαφέρει από εκείνη της στατικής φάσης και επομένως να επιτυγχάνεται επαρκής διαχωρισμός στα συστατικά του αναλυόμενου δείγματος.

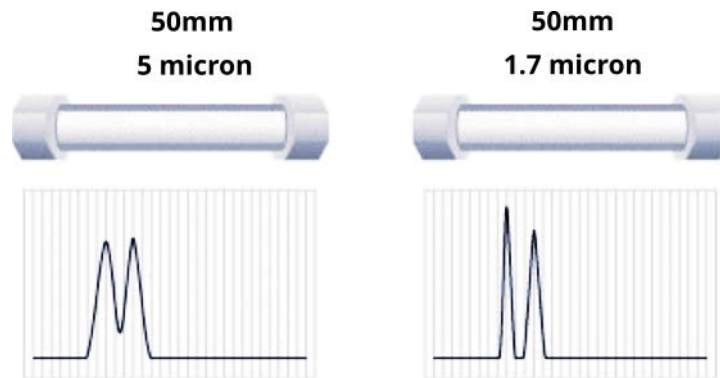
Η χρωματογραφική στήλη περιέχει το πληρωτικό υλικό (στατική φάση), που θα χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των προς ανάλυση ενώσεων. Το βασικό κριτήριο σχεδιασμού μιας στήλης είναι η δυνατότητα υψηλών πιέσεων, η χημική αδράνεια των υλικών της ώστε να μην επηρεάζεται ο διαχωρισμός των ενώσεων και η αυξημένη αντοχή της. Συνήθη υλικά κατασκευής είναι τα πολυμερή πλαστικά (PEEK), ο ανοξείδωτος χάλυβας, το γυαλί κτλ. Η συνολική απόδοση της στήλης βασίζεται σε δύο κύριους παράγοντες: τις μηχανικές και τις χημικές ιδιότητες.

Το μήκος της στήλης και το μέγεθος του υλικού πλήρωσης καθορίζουν τις μηχανικές ιδιότητες μιας στήλης. Για ένα δεδομένο μέγεθος σωματιδίων, καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μεγαλύτερα μήκη στήλης (**Εικόνα 3.3**) όπου βέβαια σε αυτή την περίπτωση έχουμε πιο αργούς χρόνους έκλουσης με μεγαλύτερη κατανάλωση διαλύτη και υψηλότερη πίεση.



Εικόνα 3.3. Μήκος στήλης και μηχανική ικανότητα διαχωρισμού (ίδιο μέγεθος σωματιδίων) [7].

Ένα μικρότερο μέγεθος σωματιδίων πληρωτικού υλικού, για δεδομένο μήκος στήλης, θα οδηγήσει σε καλύτερο διαχωρισμό με μοναδικό μειονέκτημα την αύξηση της πίεσης (**Εικόνα 3.4**).



Εικόνα 3.4. Μέγεθος σωματιδίων και μηχανική ικανότητα διαχωρισμού (ίδιο μήκος στήλης) [7].

Επομένως η επιλογή της κινητής φάσης και του πληρωτικού υλικού της στήλης καθορίζει το διαχωρισμό των προς ανάλυση αναλυτών. Υπάρχει πλήθος συνδυασμών που μπορούν να εφαρμοστούν, για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός δύο συγκεκριμένων ενώσεων ωστόσο υπάρχουν δύο βασικές χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, i) η υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης και ii) η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

- **Η υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης**, περιλαμβάνει μια πολική στατική φάση και μια υδρόφοβη κινητή φάση. Οι πολικές ενώσεις έλκονται από τη στατική φάση και επιβραδύνονται ενώ οι μη πολικές ενώσεις έλκονται από την κινητή φάση και κινούνται ταχύτερα.
- **Η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης**, περιλαμβάνει μια υδρόφοβη στατική φάση και μια πολική κινητή φάση. Σε αυτή την περίπτωση, οι υδρόφοβες ενώσεις που πρόκειται να αναλυθούν έλκονται από τη μη πολική στατική φάση και επιβραδύνονται ενώ αντίθετα, οι πολικές ενώσεις του δείγματος έλκονται από την κινητή φάση και κινούνται ταχύτερα [8,9].

Μια δεύτερη ταξινόμηση της υγρής χρωματογραφίας βασίζεται στον μηχανισμό διαχωρισμού [9]. Έτσι, ταξινομείται σε:

- Χρωματογραφία κατανομής
- Χρωματογραφία συγγένειας
- Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

- Χρωματογραφία προσρόφησης
- Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
- Χρωματογραφία ζεύγους ιόντων

Στο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής (**Κεφάλαιο 6**) εφαρμόστηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), η οποία κατατάσσεται στη χρωματογραφία κατανομής. Σήμερα στο μεγαλύτερο ποσοστό των χρωματογραφικών αναλύσεων χρησιμοποιείται η RP-HPLC. Οι περισσότερες μέθοδοι χρησιμοποιούν ένα μείγμα νερού και ενός οργανικού διαλύτη για να εξασφαλιστεί η σωστή αλληλεπίδραση των ενώσεων του δείγματος με τη στατική φάση.

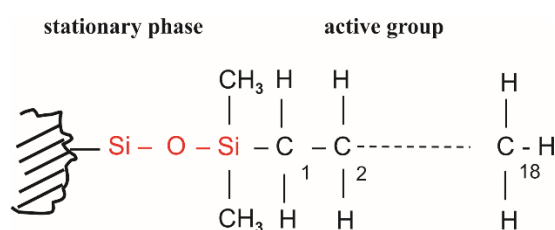
3.2.1. Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης ανήκει στην κατηγορία της χρωματογραφίας κατανομής. Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην τεχνική αυτή καθορίζεται βασικά από την κατανομή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης, όπως αυτές εξελίσσονται κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης. Εάν, για παράδειγμα, οι έλξεις μεταξύ των μορίων της ένωσης και της κινητής φάσης είναι μεγαλύτερες από εκείνες με τη στατική φάση, τότε τα μόρια της ένωσης κινούνται ταχύτερα και εκλούνται από τη στήλη σε λιγότερο χρόνο. Επομένως ο βαθμός υδροφοβικότητας της ένωσης και η σύνθεση της κινητής φάσης καθορίζουν την κατανομή των μορίων μεταξύ των δύο φάσεων [10,11].

Στην RP-HPLC, οι στατικές φάσεις βασίζονται σε τροποποιημένο SiO₂ (**Εικόνα 3.5**) ή σε συμπολυμερή στυρενίου-διβινυλοβενζολίου. Οι στατικές φάσεις που αποτελούνται από μία μόνο γραμμική αλειφατική αλυσίδα χρησιμοποιούνται συχνότερα στην RP-HPLC. Οι κυρίαρχοι παράγοντες για τον καθορισμό της υδροφοβικότητας αυτών των σταθερών φάσεων είναι το μήκος της αλυσίδας (συνολικός αριθμός ατόμων άνθρακα) και η πυκνότητα των δεσμών. Οι αλκυλικές στατικές φάσεις χαρακτηρίζονται με C_n, όπου n είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα της αλκυλικής αλυσίδας. Η απλούστερη περίπτωση είναι n = 1 (φάση με μεθυλοδεσμούς, C₁). Καθώς η αλκυλική αλυσίδα αυξάνεται, (C₂, C₈, C₁₈, C₃₀), αυξάνεται τόσο η σταθερότητα των δεσμών όσο και η συγκράτηση των υδρόφοβων διαλυτών ουσιών. Το πιο δημοφιλές υλικό είναι το C₁₈, ακολουθούμενο από το C₈ και ο λόγος για αυτό είναι

η σχετικά υψηλή οργανική περιεκτικότητα που επιτρέπει την αλληλεπίδραση των διαλυμένων ουσιών με τη στατική φάση και η μεγαλύτερη σταθερότητα τόσο σε όξινο ή βασικό pH σε σύγκριση με τις στατικές φάσεις με μικρότερη αλκυλική αλυσίδα.

Οι κινητές φάσεις είναι συνήθως μίγματα νερού ή υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων με οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, τετραϋδροφουράνιο, αιθανόλη κ.λπ. Η επιλογή του σύνθεσης της κινητής φάσης, συμπεριλαμβανομένων των διαλυτών, του ρυθμιστικού διαλύτη και άλλων πρόσθετων, καθορίζει το βαθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και της στατικής φάσης



Εικόνα 3.5. Στατική φάση στήλης με βάση το SiO₂ και αλυσίδες άνθρακα (C₁₈).

Η RP-HPLC μπορεί να εφαρμοστεί για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση ενώσεων με πολικό και μη πολικό χαρακτήρα. Λαμβάνοντας υπόψη, ότι η συντριπτική πλειονότητα των χημικών ενώσεων που έχουν βιολογική δράση εμπίπτουν σε αυτή την ευρεία κατηγορία, είναι εύκολο να κατανοήσει κανείς γιατί η RP-HPLC έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων και την έχει καταστήσει το κύριο αναλυτικό-διαχωριστικό εργαλείο στη σύγχρονη βιοφαρμακευτική ανάλυση.

3.3. Φασματομετρία μαζών

3.3.1. Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική που βασίζεται στο σχηματισμό και την ανίχνευση ιόντων τα οποία προσδιορίζονται και ταυτοποιούνται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για ποιοτική ανάλυση, για τη διερεύνηση και αποσαφήνιση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών ενώσεων, καθώς και για τον ακριβή προσδιορισμό του μοριακού βάρους ενώσεων. Παρουσιάζει επίσης ένα ευρύ φάσμα πλεονεκτημάτων, όπως είναι η

εξαιρετική ευαισθησία, εξειδίκευση και εκλεκτικότητα, η υψηλή ανάλυση και η εφαρμογή της σε ένα ευρύ φάσμα μαζών σε συνδυασμό με την επίτευξη πολύ μικρών χρόνων ανάλυσης και τη δυνατότητα συνδυασμού της με άλλες αναλυτικές μεθόδους, όπως η υγρή χρωματογραφία, η αέρια χρωματογραφία, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση. Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα αντισταθμίζουν το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης του εξοπλισμού, το οποίο παρουσιάζεται ως το μοναδικό μειονέκτημα [12].

Ορισμένες από τις σημαντικότερες εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας είναι η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός φαρμάκων, φυσικών προϊόντων και διαγνωστικών δεικτών [13,14]. Επιπλέον, όσον αφορά τον συνεχώς εξελισσόμενο τομέα της πρωτεομικής, η τεχνική συμβάλλει ενεργά στην κατανόηση της βιολογικής διαδικασίας και της λειτουργίας των πρωτεϊνών τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθολογικές συνθήκες με απώτερο στόχο την ανάπτυξη επεμβατικών διαδικασιών και την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών [15]. Τα τελευταία χρόνια, ο τομέας της εγκληματολογικής και κλινικής τοξικολογίας με την ανάλυση ουσιών σε πολύπλοκες μήτρες και υποστρώματα, όπως τοξικές βιομηχανικές ενώσεις, ενώσεις που χρησιμοποιούνται για στρατιωτικό εξοπλισμό, παράνομα ναρκωτικά και παρασκευάσματα, εκρηκτικά, τρόφιμα, μελάνι, δακτυλικά αποτυπώματα, δέρμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις, ο ιοντισμός των δειγμάτων πραγματοποιείται εκτός του φασματόμετρου μάζας υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες πίεσης [16-20].

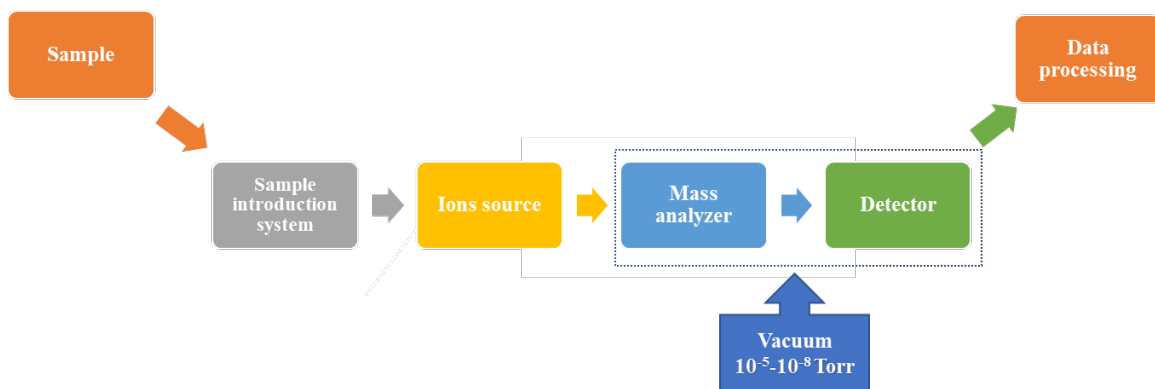
3.3.2. Οργανολογία

Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα κύρια διακριτά μέρη:

- το σύστημα εισαγωγής δειγμάτων,
- την πηγή ιοντισμού,
- τον αναλυτή μάζας και
- τον ανιχνευτή.

Εκτός από αυτά τα μέρη [20,21], περιλαμβάνονται επίσης συστήματα για την παραγωγή υψηλού κενού για τη διατήρηση χαμηλής πίεσης, καθώς και συστήματα για την καταγραφή και την παρουσίαση των φασμάτων, όπως καταγραφείς και παλμογράφοι (Εικόνα 3.6). Επιπλέον, τα σύγχρονα φασματόμετρα μάζας συνδέονται με ηλεκτρονικό υπολογιστή για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους και η εγκατάσταση κατάλληλου

σύγχρονου λογισμικού επιτρέπει την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία των φασμάτων και των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται. Επί της αρχής λειτουργίας, τα αναλυόμενα ουδέτερα μόρια σε αέρια φάση ιονίζονται έτσι ώστε να μπορούν να διαχωριστούν από τα ηλεκτρικά ή/και μαγνητικά πεδία του αναλυτή σύμφωνα με το λόγο της μάζας (m) ως προς το φορτίο τους (z) (m/z). Τα ιόντα στη συνέχεια ανιχνεύονται και καταγράφονται ως φάσμα μάζας, με γραφική παράσταση της αφθονίας των ιόντων ως προς το λόγο m/z των επιμέρους ιόντων.



Εικόνα 3.6. Διάταξη των βασικών δομικών στοιχείων ενός φασματομέτρου μάζας.

3.3.3. Σύστημα Εισαγωγής Δειγμάτων

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στην πηγή ιοντισμού, υπό συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια κατάσταση. Δύο είναι οι κυριότεροι τρόποι εισαγωγής του δείγματος στο φασματομέτρο μάζας: **i)** η απευθείας εισαγωγή στο φασματομέτρο και **ii)** η εισαγωγή μέσω συνδυασμένης τεχνικής. Η επιλογή εξαρτάται τόσο από την πτητικότητα και τη φύση της ουσίας όσο και από το μητρικό υλικό [22,23].

Η απλούστερη μέθοδος εισαγωγής δείγματος είναι η απευθείας είσοδος μέσω τριχοειδούς βαλβίδας. Το δείγμα βρίσκεται είτε στην αέρια φάση είτε πρόκειται για υγρό χαμηλής ή και μηδενικής τάσης ατμών, επομένως αυτός ο τρόπος εισαγωγής βρίσκει εφαρμογή μόνο σε ορισμένα δείγματα.

Πριν από την ανάλυση, το δείγμα πρέπει να εξατμιστεί και να ιοντιστεί, ανάλογα με τη φύση του δείγματος και τη διαδικασία ιοντισμού που χρησιμοποιείται. Τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν μέσω MS σε στερεή, υγρή ή αέρια μορφή και, επιπλέον, μπορεί να

αποτελούν μείγμα συστατικών. Στην περίπτωση των μιγμάτων, ο διαχωρισμός είναι συνήθως απαραίτητος για την ταυτοποίηση ή τον ποσοτικό προσδιορισμό, επειδή η ταυτόχρονη παρουσία δύο ή περισσότερων συστατικών στην πηγή ιοντισμού θα έχει ως αποτέλεσμα ένα επικαλυπτόμενο ή μικτό φάσμα. Συνεπώς, τα μείγματα διαχωρίζονται συχνά με αέρια χρωματογραφία (GC) ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) ή με χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού (SFC) ή υγρή χρωματογραφία (LC) και τα εκλούμενα διαχωριζόμενα συστατικά μεταβιβάζονται απευθείας στο MS. Αυτές οι προσεγγίσεις είναι γνωστές ως GC-MS, CE-MS, SFC-MS και LC-MS, αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις αυτές, η εισαγωγή του δείγματος στη χρωματογραφική συσκευή συνήθως γίνεται με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη.

3.3.4. Τεχνικές Ιοντισμού

Εντός της πηγής ιοντισμού, ο ιοντισμός της αναλυόμενης ουσίας επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, είτε σε θετικό ή σε αρνητικό ιοντισμό. Οι πηγές ιοντισμού, επομένως και οι εφαρμοζόμενες τεχνικές ιοντισμού είναι πολλές. Η επιλογή της κατάλληλης πηγής εξαρτάται: **i)** από τον ενόργανο εξοπλισμό που χρησιμοποιείται, **ii)** από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των προς ανάλυση ενώσεων και **iii)** από την επιδιωκόμενη μεταφορά ενέργειας στα μόρια αυτών. Με βάση την τελευταία κατηγορία, οι τεχνικές ιοντισμού μπορούν να ταξινομηθούν σε «μαλακές» όπου ο ιοντισμός επιτυγχάνεται σε ήπιες συνθήκες με μερική ή χωρίς θραυσματοποίηση των προς ανάλυση ενώσεων και σε «σκληρές» τεχνικές όπου η εκπομπή υψηλής ενέργειας από την πηγή ιοντισμού προκαλεί ρήξη δεσμών και θραυσματοποίηση των ενώσεων, με αποτέλεσμα την παραγωγή ιόντων θραυσματοποίησης.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τον **Ιοντισμό ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)**. Η δεύτερη κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει τις περισσότερες τεχνικές, χωρίζεται στις ακόλουθες κύριες κατηγορίες:

- **Χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, CI)**,
- **Ιοντισμός εκρόφησης (Desorption Ionization, DI)**, που περιλαμβάνει:
 - τον ιοντισμό βομβαρδισμού με ταχέως κινούμενα σωματίδια (Fast Atom Bombardment, FAB),
 - τον ιοντισμό με εκρόφηση υποβοηθούμενος από το μητρικό υλικό (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI),

- και τον ιοντισμό δευτερογενών ιόντων (Secondary Ion MS, SIMS).
- **Τεχνικές ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης** (Atmospheric Pressure Ionization, API) που περιλαμβάνουν:
 - τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray, ESI),
 - το χημικό ιοντισμό σε ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)
 - και το φωτοϊοντισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI).

Πλήθος παραλλαγών τεχνικών ιοντισμού έχουν αναπτυχθεί σε κάθε κατηγορία με κάποιες από αυτές να χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα [19,21,24,25]. Η τελευταία κατηγορία (API) είναι η λιγότερο καταστροφική τεχνική σε σύγκριση με τις υπόλοιπες, και η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική στους ποσοτικούς προσδιορισμούς (**Πίνακας 3.1**). Στην παρούσα εργασία (**Κεφάλαιο 6**) εφαρμόστηκε ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI), τεχνική που θα συζητηθεί λεπτομερώς στην **Ενότητα 3.3.4.1**.

Πίνακας 3.1. Χαρακτηριστικά διαφόρων τεχνικών ιοντισμού [26].

Τεχνική	Παραδείγματα	Κατάσταση αναλύτη	Εύρος μάζας	Άλλα χαρακτηριστικά
Ιοντισμός ηλεκτρονίων (EI)	Πρόσκρουση ηλεκτρονίων	Αέρια φάση	< 1 kDa	Μη πολικές, κάποιες πολικές Χρήσιμη για μικρά οργανικά μόρια συχνά σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία
Χημικός ιοντισμός (CI)	Χημικός ιοντισμός	Αέρια φάση	< 1 kDa	Χρήσιμη για μη πολικά μόρια και κάποια πολικά
Ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (API)	ESI APCI APPI	Υγρή φάση	< 200 kDa	Ο πιο ήπιος ιοντισμός Πολλαπλάσια φορτισμένα ιόντα Χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία Ιοντισμός μεγάλων βιομορίων (π.χ. πρωτεΐνες)
Ιοντισμός εκρόφησης (DI)	FAB, MALDI SIMS	Στερεή φάση	< 500 kDa	Πολικές οργανικές, πρωτεΐνες, οργανομεταλλικές, πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή Εφαρμόζεται στην ανάλυση επιφανειών και στην απεικονιστική φασματομετρίας μάζας

3.3.4.1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

3.3.4.1.1. Εισαγωγή

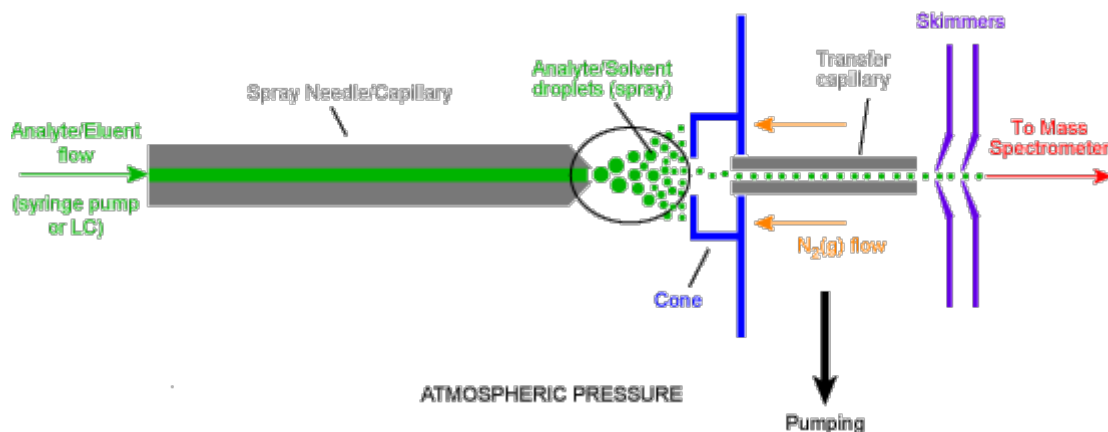
Η παραγωγή και μεταφορά ιόντων που υπάρχουν σε ένα διάλυμα στην αέρια φάση αποτελεί τη βασική αρχή του ESI. Το 1968 ο Dole εισήγαγε την ιδέα του ηλεκτροψεκασμού για το σχηματισμό ιόντων στην αέρια φάση και το 1984 ήταν ο Fenn που συνέδεσε τον ηλεκτροψεκασμό με τη φασματομετρία μάζας αποδεικνύοντας ότι πολλαπλά φορτισμένα ιόντα που λαμβάνονταν από πρωτεΐνες, επέτρεπαν τον προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους με όργανα των οποίων το εύρος μαζών περιορίζονταν μέχρι τα 2000 Da.

Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής βασίζεται στο ότι η υπό ανάλυση ένωση μετατρέπεται, παρουσία ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, σε αεροζόλ αποτελούμενο από φορτισμένα σταγονίδια. Τα φορτισμένα σταγονίδια κατά την εξάτμιση του διαλύτη συρρικνώνονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση φορτίου στην επιφάνειά τους. Όταν οι δυνάμεις συνοχής που συγκρατούν το σταγονίδιο ξεπεραστούν από την απωστική δύναμη μεταξύ ιόντων με το ίδιο φορτίο, τα ιόντα μεταφέρονται στην αέρια φάση και συγκεντρώνονται στον αναλυτή μέσω μιας σειράς διαχωριστικών κατόπτρων (**Εικόνα 3.7**).

Το ESI είναι μια πολύ ήπια τεχνική ιοντισμού με την οποία παράγονται φορτισμένα ιόντα. Η τεχνική αυτή καθιστά δυνατή την ανάλυση πολικών μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, μη πτητικών και θερμικά ασταθών μορίων, καθώς και ενώσεων βιολογικής σημασίας, όπως οι πρωτεΐνες. Λόγω της φύσης της, η εφαρμογή της στον τομέα της βιολογίας, της βιοχημείας και της βιοϊατρικής είναι ιδιαίτερα σημαντική. Χρησιμοποιείται σε έρευνες σχετικά με τη δομή μεγάλων πολικών βιομορίων (πρωτεΐνες, DNA) και διαφόρων μη ομοιοπολικών συμπλόκων (πρωτεΐνης-μετάλλου, πρωτεΐνης-προσδέματος, κυκλοδεξτρινών-μορίων κ.λπ.). Επιτρέπει επίσης την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμακευτικών μορίων και των μεταβολιτών τους [27].

Όταν συνδυάζεται το ESI με τη φασματομετρία μάζας, ορισμένα μειονεκτήματα περιλαμβάνουν την ευαισθησία του στην παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, μη πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων και παρεμβολές από το μητρικό υλικό. Λόγω του γεγονότος ότι με αυτή την τεχνική ο ρυθμός θραυσματοποίησης των αναλυτών είναι πολύ μικρός, στην περίπτωση μελετών αποσαφήνισης της δομής, απαιτείται η παράλληλη φασματομετρία μαζών όπου επιτυγχάνεται θραυσματοποίηση των αναλυτών. Ορισμένα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν τη συμβατότητά της με την RP-HPLC, καθώς ο αναλύτης βρίσκεται σε μορφή διαλύματος καθώς και με τεχνικές μικροαναλυτικού διαχωρισμού.

Επιπλέον, ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων επιτρέπει τον υπολογισμό των μοριακών βαρών βιομορίων με μεγάλους λόγους m/z .



Εικόνα 3.7. Σχηματική απεικόνιση ESI πηγής [28].

Ένα τυπικό φάσμα ESI απεικονίζει μια κατανομή μοριακών ιόντων σε σχέση με διαφορετικούς αριθμούς φορτίου. Τα πολλαπλά φορτισμένα ιόντα που παρατηρούνται στα φάσματα μάζας σχηματίζονται συνήθως από την προσθήκη κατιόντων (συνήθως H^+ , Na^+ , K^+ και NH_4^+ , στο θετικό ESI) ή ανιόντων ($HCOO^-$, CH_3COO^- , στο αρνητικό ESI), ή από μόνιμα φορτισμένα σωματίδια). Ενώσεις προσθήκης μπορούν επίσης να σχηματιστούν μεταξύ των ανιόντων του διαλύματος και ουδέτερων αναλυτών [29,30].

3.3.4.1.2. Μηχανισμός του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

Για την παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση από ιόντα ηλεκτρολύτη σε διάλυμα, λαμβάνουν χώρα τρία στάδια: **i)** η παραγωγή φορτισμένων σταγονιδίων στο τριχοειδές (ηλεκτροφορητικός μηχανισμός), **ii)** η σμίκρυνση των φορτισμένων σταγονιδίων με την εξάτμιση του διαλύτη και **iii)** η παραγωγή ιόντων αερίου φάσης. Τα στάδια αυτά λαμβάνουν χώρα σε περιοχή ατμοσφαιρικής πίεσης της πηγής ιοντισμού.

❖ Ηλεκτροφορητικός μηχανισμός

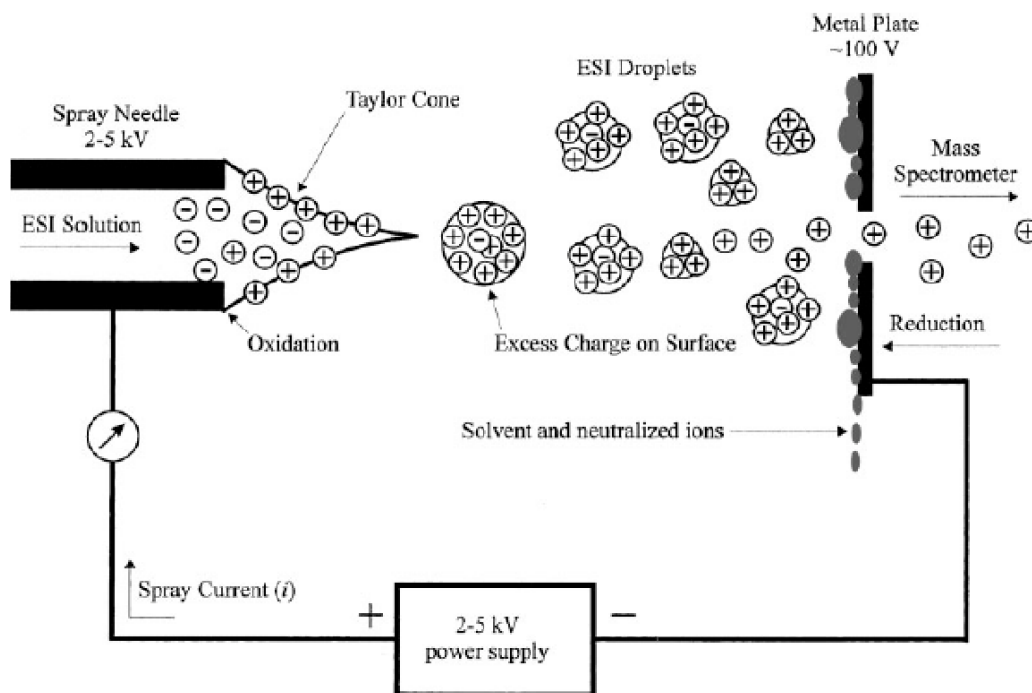
Μια τυπική πηγή ESI αποτελείται από ένα σύστημα δύο ηλεκτροδίων: ένα μεταλλικό τριχοειδές, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με το διάλυμα των ουσιών που πρόκειται να προσδιοριστούν και ένα δεύτερο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, το οποίο είναι η οπή (κώνος) δειγματοληψίας, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.8**. Ένα διάλυμα που περιέχει τις υπό εξέταση

ενώσεις σε ιοντισμένη μορφή (θετικό ή αρνητικό φορτίο) έστω και σε ένα μικρό ποσοστό, εισάγεται στην πηγή είτε μέσω σύριγγας είτε ως έκλουσμα που εξέρχεται από την υγρή χρωματογραφία. Το διάλυμα περνάει μέσα από το τριχοειδές ηλεκτροψεκασμού και ψεκάζεται με κατεύθυνση προς το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Η διαφορά δυναμικού του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3 και 6 kV.

Ιόντα με την ίδια πολικότητα με αυτή του δυναμικού που εφαρμόζεται στο τριχοειδές, υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την επιφάνεια του υγρού και εξέρχονται από αυτό, ενώ τα ιόντα αντίθετης πολικότητας κινούνται προς τα τοιχώματα του τριχοειδούς, ένα φαινόμενο που ονομάζεται ηλεκτροφορητικός μηχανισμός. Το ηλεκτρικό πεδίο που ωθεί τα ιόντα με την ίδια πολικότητα με αυτό αντισταθμίζεται από την επιφανειακή τάση του υγρού. Στην έξοδο του τριχοειδούς σχηματίζεται ένας κώνος υγρού, γνωστός ως κώνος Taylor, σε υψηλές τιμές ηλεκτρικού πεδίου.

Η διάμετρος των σχηματιζόμενων σταγονιδίων καθώς και η ταχύτητα με την οποία διαχωρίζονται τα φορτία μεταξύ τους εξαρτάται από αρκετές παραμέτρους, όπως είναι το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, η ταχύτητα ροής του διαλύματος καθώς και η διάμετρος του τριχοειδούς [31-33].

Στο πλαίσιο που επιβάλει ο νόμος διατήρησης του φορτίου, λαμβάνουν χώρα τόσο αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του ηλεκτροδίου και του διαλύματος (οξειδωση των διαλυτών και των αναλυτών) όσο και αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, σηματοδοτώντας έτσι την ολοκλήρωση ενός ηλεκτρικού κύκλου. Επομένως, το ESI με τη βοήθεια της ηλεκτρόλυσης διατηρεί την ισορροπία φορτίου και επιτρέπει τη συνεχή παραγωγή φορτισμένων σταγονιδίων [34].



Εικόνα 3.8. Ο ηλεκτροφορητικός μηχανισμός του ESI (θετικός ιοντισμός) [35].

❖ Συρρίκνωση των φορτισμένων σταγονιδίων μέσω εξάτμισης διαλύτη

Κατά την διάχυση των φορτισμένων σταγονιδίων διαμέσου του τριχοειδούς, συνήθως με την βοήθεια θέρμανσης, επέρχεται εξάτμιση του διαλύτη η οποία συνεπάγεται και την μείωση της διαμέτρου αυτών. Όταν το μέγεθος του φορτίου είναι τέτοιο ώστε να υπερβεί την επιφανειακή τάση που το κρατάει σε συνοχή (όριο σταθερότητας Rayleigh) επέρχεται η Κουλομπική έκρηξη (Coulombic explosion) (Εικόνα 3.8). Η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ακανόνιστη διάσπαση δεδομένου ότι από τη διάσπαση αυτή τα σωματίδια που παράγονται δεν είναι του ίδιου μεγέθους [32-34].

Τα παραγόμενα μικρότερα φορτισμένα σταγονίδια ίδιας πολικότητας, με τη μορφή αερολύματος, κυρίως λόγω δυναμικού και δευτερευόντως λόγω βαθμιδώσεων της πίεσης, κατευθύνονται προς το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Τα σταγονίδια αυτά υπόκεινται στην ίδια διαδικασία αρκετές φορές με αποτέλεσμα την περαιτέρω σμίκρυνση τους, συνεπικουρούμενη από την αποδιαλύτωση τους.

❖ Σχηματισμός ιόντων αερίου φάσης

Δύο μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την σχηματισμό ιόντων αερίου φάσης από τα πολύ μικρά και ιδιαίτερα φορτισμένα σταγονίδια. Ο πρώτος μηχανισμός

(Charged Residue Model, CRM) προτάθηκε από τον Dole, ο οποίος ενδιαφερόταν για ενώσεις υψηλής μοριακής μάζας, και προβλέπει ότι όταν σχηματίζονται πολύ μικρά σταγονίδια, μερικά από αυτά τα σταγονίδια θα περιέχουν ένα μόριο αναλύτη καθώς και ιοντικά φορτία στην επιφάνεια τους. Η εξάτμιση του διαλύτη από ένα τέτοιο σταγονίδιο θα οδηγήσει σε ιόν του αναλύτη σε αέρια φάση, του οποίου το φορτίο προέρχεται από τα φορτία στην επιφάνεια της αποδιαλυτωμένου σταγονιδίου. Ο δεύτερος μηχανισμός (Ion Evaporation Model, IEM), που διατυπώθηκε από τους Iribarne και Thomson, προβλέπει ότι άμεση εκπομπή ιόντων από τα σταγονίδια θα συμβεί όταν οι ακτίνες των σταγονιδίων συρρικνωθούν σε ακτίνες μικρότερες από 10 nm. Η εξάτμιση ιόντων με αφαίρεση του φορτίου τους, αντικαθιστά τη διάσπαση Coulomb. Η δημιουργία πολλαπλώς φορτισμένων σε αέρια φάση ιόντων αποτελεί μια προέκταση του μοντέλου αυτού [34, 36-37]. Αν και δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως ποιος από τους δύο μηχανισμούς είναι πιο ακριβής, εντούτοις κάθε μηχανισμός μπορεί να εφαρμοσθεί σε διαφορετικές συνθήκες.

3.3.4.1.3. Οργανολογικά χαρακτηριστικά της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

Τα κύρια χαρακτηριστικά μιας πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό είναι:

- **το μεταλλικό τριχοειδές,**
- **η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου,**
- **ο κώνος δειγματοληψίας,**
- **η οπή μέσα από την οποία διέρχονται τα ιόντα κατευθυνόμενα προς την περιοχή κενού,**
- **η απόσταση του τριχοειδούς και του κώνου δειγματοληψίας.**

Δεδομένου ότι παλαιότερα αυτή η τεχνική ιοντισμού περιορίζονταν σε πολύ μικρές ροές (3-20 $\mu\text{L min}^{-1}$), πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω προσπάθειες τροποποιήσεων που ως στόχο είχαν πέραν της αύξησης της αντοχής, την χρήση υψηλών ταχυτήτων ροής μέχρι και 2 mL min^{-1} χωρίς αντίστοιχη μείωση της ευαισθησίας [32] Στο **Παράρτημα Γ** γίνεται μια εκτενής αναφορά σχετικά με πολυάριθμες προσπάθειες που έλαβαν χώρα προς την κατεύθυνση αυτή.

3.3.4.1.4. Παράμετροι που επηρεάζουν την λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού

Η λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες εκ των οποίων η γεωμετρία της πηγής και η σύσταση του διαλύματος που περιέχει τον αναλύτη του ενδιαφέροντος ασκούν την μεγαλύτερη επίδραση. Στο **Παράρτημα Γ** συνοψίζονται οι παράμετροι και η επίδραση τους στην αποτελεσματικότητα του ιοντισμού του αναλύτη και στην βελτιστοποίηση του σήματος.

3.3.5. Αναλυτές μαζών

Η κύρια λειτουργία των αναλυτών μάζας είναι ο διαχωρισμός των ιόντων που παράγονται στην πηγή ιοντισμού. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση διαφορετικές τιμές των λόγων m/z και είναι απαραίτητος ώστε το μετρούμενο ρεύμα ιόντων στον ανιχνευτή ιόντων να αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο λόγο m/z . Σε ένα φασματομέτρο μάζας τα ιόντα μπορούν να διαχωριστούν είτε με μαγνητικά ή ηλεκτρικά πεδία είτε με τη μέτρηση του χρόνου που χρειάζεται ένα ιόν για να διανύσει μια ορισμένη απόσταση. Συνοπτικά, τα κύρια ποιοτικά χαρακτηριστικά ενός αναλυτή μάζας είναι τα εξής:

- ✓ η διαχωριστική ικανότητα (Resolution),
- ✓ η ακρίβεια μάζας (Mass accuracy),
- ✓ το εύρος μαζών,
- ✓ το γραμμικό δυναμικό εύρος,
- ✓ η ταχύτητα σάρωσης,
- ✓ η απόδοση εκπομπής [21].

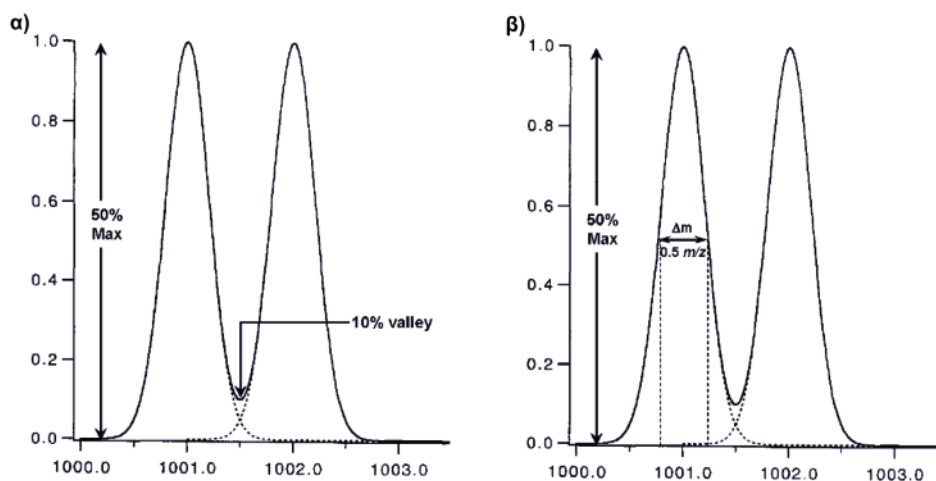
Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται σε συνεχείς που περιλαμβάνουν τους τετραπολικούς γραμμικούς αναλυτές και τους αναλυτές μαγνητικής εκτροπής και τους παλμικούς που περιλαμβάνουν τους αναλυτές χρόνου πτήσης, κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντος με μετασχηματισμό κατά Fourier και τις τετραπολικές παγίδες ιόντων. Οι ιδιότητες των συνεχών αναλυτών συμβαδίζουν με αυτές των μονοχρωματόρων που χρησιμοποιούνται στα φασματομέτρα οπτικών τεχνικών όπου η ανίχνευση συγκεκριμένων ιόντων, συμβάλλει σε μειωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο S/N (Signal to Noise). Αντιθέτως οι παλμικοί αναλυτές μαζών συλλέγουν ένα ολόκληρο φάσμα μαζών από ένα παλμό ιόντων με αποτέλεσμα να παρέχουν μεγαλύτερο S/N [8].

Η διαχωριστική ικανότητα εξαρτάται από τον τύπο του αναλυτή μάζας του οργάνου, και αποτελεί το σημαντικότερο ποιοτικό χαρακτηριστικό ενός φασματομέτρου μάζας. Η διαχωριστική ικανότητα (R) ορίζεται από την **Εξίσωση 3.1**.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (3.1)$$

όπου: m είναι η μάζα της πρώτης κορυφής και,
 Δm η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών.

Ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται ότι επιτυγχάνεται, όταν δύο περίπου ισοϋψείς κορυφές επικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 10 % του ύψους των κορυφών (**Εικόνα 3.9α**). Στην περίπτωση που δεν υπάρχει γειτονική κορυφή με παρόμοια ένταση για να συγκριθεί και, ως εκ τούτου, να καθοριστεί η επικάλυψη, τότε το πλήρες πλάτος στο μισό μέγιστο (full width at half maximum, FWHM) της κορυφής ενδιαφέροντος χρησιμοποιείται ως Δm (**Εικόνα 3.9β**).



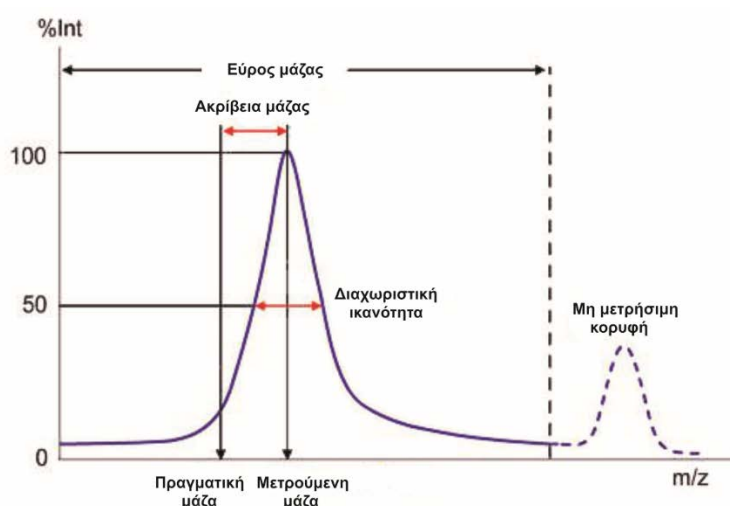
Εικόνα 3.9. α) 10 % επικάλυψη διαδοχικών κορυφών για τον ορισμό της διαχωριστικής ικανότητας, **β)** διαχωριστική ικανότητα με βάση το πλήρες πλάτος στο μισό μέγιστο της κορυφής ενδιαφέροντος [38].

Τα φασματομέτρα μαζών διακρίνονται σε φασματομέτρα χαμηλής ($R=10^2 - 10^3$) και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ($R=10^4 - 10^6$). Στην πρώτη περίπτωση τα ιόντα

διακρίνονται με βάση την ονομαστική μάζα (nominal mass), που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς τη μοριακή μάζα ενώ αντιθέτως τα φασματομέτρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας διαχωρίζουν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα, αλλά με διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας (exact mass), που διαφέρουν στο τρίτο ή και στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο.

Η ακρίβεια μάζας ορίζεται ως ο λόγος της διαφοράς δύο μαζών m_1 και m_2 ως προς τη m_1 ($(m_2 - m_1)/m_1$) και εκφράζεται σε μονάδες χιλιοστομάζας (mmu) ή σε μέρη στο εκατομμύριο (ppm).

Τα όρια των τιμών m/z στα οποία ο αναλυτής μάζας μπορεί να μετρήσει ιόντα ονομάζεται εύρος μαζών ενώ ταχύτητα σάρωσης είναι ο ρυθμός με τον οποίο ο αναλυτής μετράει σε ένα συγκεκριμένο εύρος μαζών (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Χαρακτηριστικά επίδοσης αναλυτή μάζας.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας (Πίνακας 3.2), οι οποίοι παρατίθενται παρακάτω [19] ενώ στο Παράρτημα Γ γίνεται μια εκτενής αναφορά για κάθε τύπο αναλυτή:

- **Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole)**, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Κεφάλαιο 6) και περιγράφεται λεπτομερώς στην *Ενότητα 3.3.5.3*,
- **Αναλυτής Παγίδας Ιόντων (Ion Trap, IT)**,
- **Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)**,
- **Αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR)**,

- Αναλυτές μαγνητικής εκτροπής (απλής ή διπλής εστίασης) (Magnetic Focusing Sector),
- Υβριδικοί αναλυτές (Hybrid analyzers).

Πίνακας 3.2. Γενική σύγκριση αναλυτών μάζας και των ιδιοτήτων τους [26].

Αναλυτής	Q	IT	TOF	FT-ICR	Magnetic sector
Ταχύτητα σάρωσης (Hz)	2 - 10	2 - 10	10 - 100	1	0.1
Ακρίβεια μάζας (ppm)	< 100	< 100	< 5	< 1	< 3
Εύρος μάζας (m/z)	< 4000	< 6000	< 10000	< 10000	< 8000
Διαχωριστική ικανότητα	2000	4000	15000	100000	30000
Δίδυμη φασματομετρία (MS/MS)	MS ²	MS ^{n*}	MS	MS ^{n*}	MS ²
Παρατηρήσεις	Χαμηλό κόστος, Εναλλαγή θετικού/αρνητικού ιοντισμού	Χαμηλό κόστος, Εναλλαγή θετικού/αρνητικού ιοντισμού	Καλή ακρίβεια και διαχωριστική ικανότητα	Υψηλή ακρίβεια και διαχωριστική ικανότητα, Υψηλό κόστος	Υψηλή ακρίβεια Χαμηλή ταχύτητα σάρωσης

*Το n μπορεί να φτάσει την τιμή 12

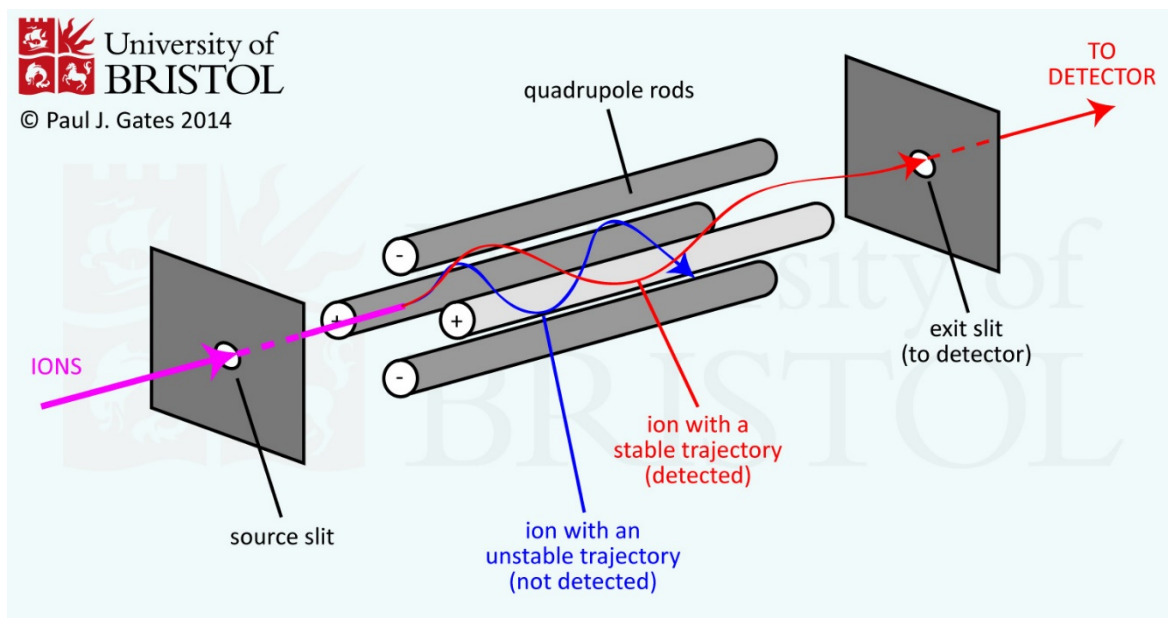
3.3.5.1. Τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole, Q)

Οι τετραπολικοί αναλυτές είναι οι πιο διαδεδομένοι αναλυτές μαζών γιατί παρουσιάζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα όπως:

- ✓ χαμηλό κόστος,
- ✓ ταχύτερη σάρωση (< 100 ms),
- ✓ δυνατότητα συνδυασμών σε υβριδικά όργανα και
- ✓ αμεσότερη συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές.

Ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί ανάλογα με τα οπτικά φίλτρα επιτρέποντας σε ιόντα μίας μόνο τιμής m/z να περάσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται. Για το λόγο αυτό ο τετραπολικός αναλυτής αποκαλείται συχνά και φίλτρο μαζών. Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελείται από

τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους με κυκλική ή υπερβολική διατομή. Οι ράβδοι αυτές είναι τοποθετημένες συμμετρικά ανά ζεύγη ως προς τη διερχόμενη δέσμη ιόντων και διαγωνίως συνδεδεμένες ηλεκτρικά μεταξύ τους (Εικόνα 3.11). Μια πηγή τάσης παρέχει μια συνεχή (direct current, DC) και μια εναλλασσόμενη υψίσυχνη, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (radio-frequency, RF), συνιστώσα σε κάθε ζεύγος ράβδων [20,24]. Υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα επιταχύνονται από την πηγή ιοντισμού εντός του τετραπολικού αναλυτή. Για συγκεκριμένη τιμή των δυναμικών αυτών, ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z ακολουθούν μια σταθερή τροχιά διαμέσου των ράβδων και φθάνουν στον ανιχνευτή.



Εικόνα 3.11. Σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή μαζών [39].

Πιο συγκεκριμένα, για συγκεκριμένα δυναμικά RF και DC, ιόντα που δεν έχουν το επιθυμητό m/z απορρίπτονται αποκτώντας μεγαλύτερο ρυθμό επιτάχυνσης, με αποτέλεσμα να προσκρούουν στα ηλεκτρόδια και να αποφορτίζονται. Το δυναμικό DC συνδυαζόμενο με το RF δυναμικό δρουν ως φίλτρο για την απόρριψη των ιόντων με μεγάλο m/z . Το δυναμικό των δύο ζευγών ηλεκτροδίων δίνεται από την **Εξίσωση 3.2**.

$$V(t) = \pm (U + V\cos(\omega t)) \quad (3.2)$$

όπου, U σταθερό δυναμικό DC και,

$V\cos(\omega t)$ είναι το εφαρμοζόμενο δυναμικό RF με ένταση V και συχνότητα ω .

Τα δυναμικά του εναλλασσόμενου και συνεχούς ρεύματος αυξάνονται από τιμή 0 έως μια μέγιστη τιμή, με το λόγο των δύο να είναι περίπου στο 6. Επομένως το δυναμικό μεταβάλλεται από 0 έως τα ± 250 V περίπου για το συνεχές ρεύμα και από 0 έως ± 1500 V για το εναλλασσόμενο. Η σάρωση των δυναμικών επηρεάζει την κίνηση των ιόντων με τέτοιο τρόπο, ούτως ώστε να κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο. Η διαχωριστική ικανότητα των τετραπολικών αναλυτών φτάνει τις 3.000, ενώ έχουν δυνατότητα ανάλυσης ιόντων με m/z έως τις 3.000 το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο, για ιοντισμό πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων με ηλεκτροψεκασμό.

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα των τετραπολικών αναλυτών περιλαμβάνουν:

- ✓ ανθεκτικότητα σε συνθήκες υψηλού κενού ($\sim 10^{-5}$ Torr),
- ✓ συνδυασμός με ESI,
- ✓ μεγάλη ταχύτητα σάρωσης,
- ✓ κατάλληλοι για ποσοτικό προσδιορισμό αναλυτών και
- ✓ σχετικά χαμηλό κόστος.

Στον αντίποδα, βασικά μειονεκτήματα των τετραπολικών αναλυτών αποτελούν:

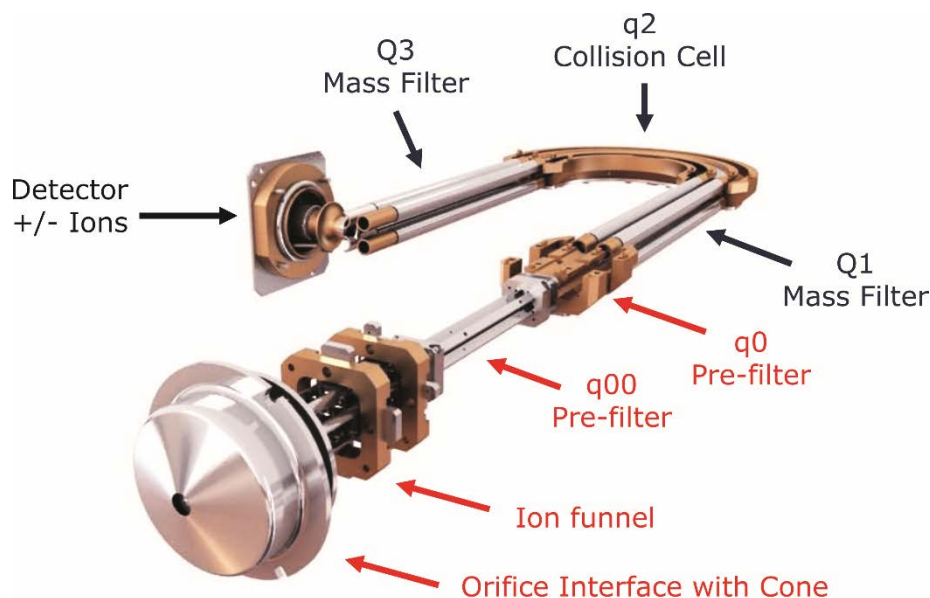
- ✓ η χαμηλή διαχωριστική τους ικανότητα (< 4000),
- ✓ η σχετικά μικρή μέγιστη τιμή του λόγου m/z,
- ✓ η μειωμένη συμβατότητα τους με τις παλμικές τεχνικές ιοντισμού.

Τα τετραπολικά φασματόμετρα μαζών μπορούν να συνδυαστούν είτε με GC είτε με LC ενώ προσφέρονται για χρησιμοποίησή τους σε σειρά με στόχο μελέτες εύρεσης και ταυτοποίησης νέων φαρμάκων μέσω της θραυσματοποίησης. Ο πιο δημοφιλής συνδυασμός αποτελεί το τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μαζών (QqQ) που περιλαμβάνει διαδοχική σύνδεση τριών τετραπολικών αναλυτών και αυτός ο τύπος οργάνου χρησιμοποιήθηκε επίσης στην παρούσα διατριβή (**Κεφάλαιο 6**) και περιγράφεται λεπτομερώς στην **Ενότητα 3.3.5.1.1**. [21,24].

3.3.5.1.1. Δίδυμη φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

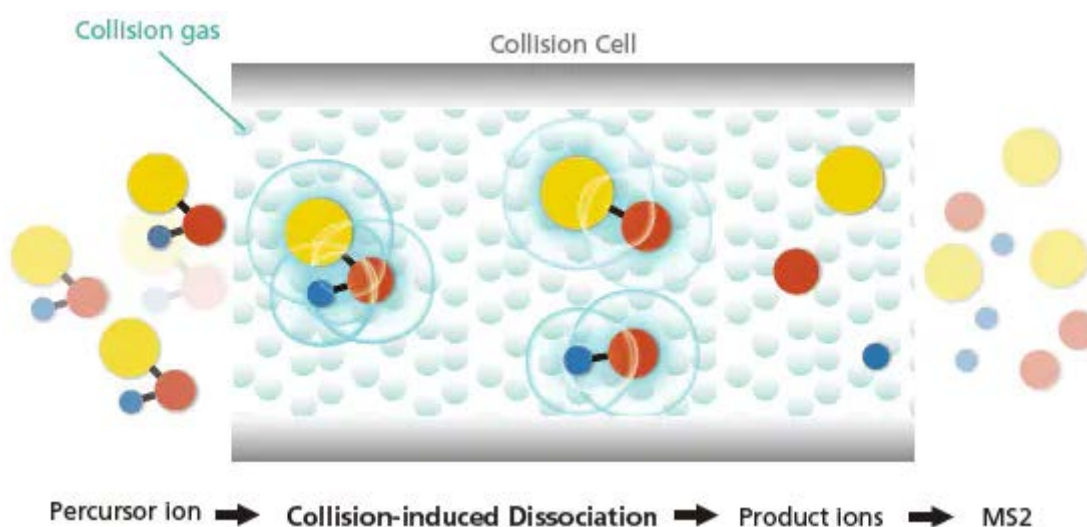
Στις τεχνικές ιοντισμού ESI ή MALDI, το φάσμα μαζών περιέχει συνήθως το ιοντισμένο μητρικό μόριο με πολύ μικρό ποσοστό θραυσματοποίησης σε αντίθεση με άλλες τεχνικές ιοντισμού, όπως EI όπου στο φάσμα μαζών περιέχονται αρκετά θυγατρικά ιόντα, με αποτέλεσμα οι πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά μιας ένωσης να είναι περιορισμένες. Έτσι, στις περιπτώσεις αυτές λαμβάνει χώρα επαγόμενη θραυσματοποίηση μέσω της τεχνικής της δίδυμης φασματομετρίας μαζών.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.12**, η δίδυμη φασματομετρία στην απλούστερη εκδοχή της έχει τη δομή του τριπλού τετραπόλου (QqQ) το οποίο είναι το πλέον συχνό χρησιμοποιούμενο σύστημα δίδυμης φασματομετρίας μαζών. Όσον αφορά τον τρόπο λειτουργίας του τριπλού τετραπολικού αναλυτή ακολουθείται η εξής πορεία: αρχικά το πρώτο τετράπολο συλλέγει ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z χαρακτηριστικά για ένα δεδομένο αναλύτη (πρόδρομη ένωση, precursor ion), τα οποία περνούν μέσα από το δεύτερο τετράπολο, μια ενδιάμεση περιοχή όπου ενεργοποιούνται καταλλήλως και θραυσματοποιούνται, ώστε τελικά τα θραυσματοποιημένα ιόντα της πρόδρομης ένωσης να οδηγούνται στο τρίτο τετράπολο [8].



Εικόνα 3.12. Φασματομετρία μάζας με διάταξη τριπλού τετραπόλου (QqQ) (Εικόνα προσαρμοσμένη από το εγχειρίδιο λειτουργίας του Enoq Elite ER TQ της Bruker Daltonics).

Η πιο κοινή μέθοδος θραυσματοποίησης είναι η επαγόμενη διάσπαση μέσω σύγκρουσης (Collision Induced Dissociation, CID) που καλείται ορισμένες φορές και αποσύνθεση ενεργοποιούμενη μέσω σύγκρουσης (Collisionally Activated Decomposition, CAD). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από την είσοδο του πρόδρομου ιόντος στο χώρο σύγκρουσης όπου πραγματοποιούνται επαναλαμβανόμενες συγκρούσεις με το αέριο σύγκρουσης, το οποίο είναι ένα ενεργοποιημένο αδρανές αέριο, όπως Ar, He, N₂, CO₂, προς σχηματισμό των θυγατρικών ιόντων. Το βέλτιστο ποσοστό θραυσματοποίησης είναι εφικτό μέσω ελέγχου των δυναμικών και της πυκνότητας των αερίων στο θάλαμο σύγκρουσης. Στην **Εικόνα 3.13** παρουσιάζεται ο ενδιάμεσος χώρος θραυσματοποίησης ο οποίος συνίσταται από το δεύτερο τετράπολο και ονομάζεται κυψελίδα σύγκρουσης (collision cell). Στο δεύτερο φασματόμετρο μαζών (τρίτο τετράπολο) πραγματοποιείται διαχωρισμός των θραυσμάτων με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο. Στο προκύπτον φάσμα δεν περιλαμβάνονται το χημικό περιβάλλον και άλλα πολύπλοκα μόρια, παρά μόνο τα παραγόμενα ιόντα της επιλεγμένης πρόδρομης ένωσης.



Εικόνα 3.13. Απεικόνιση της επαγόμενης διάσπαση μέσω σύγκρουσης στην κυψελίδα σύγκρουσης σε δίδυμη φασματομετρία μαζών [40].

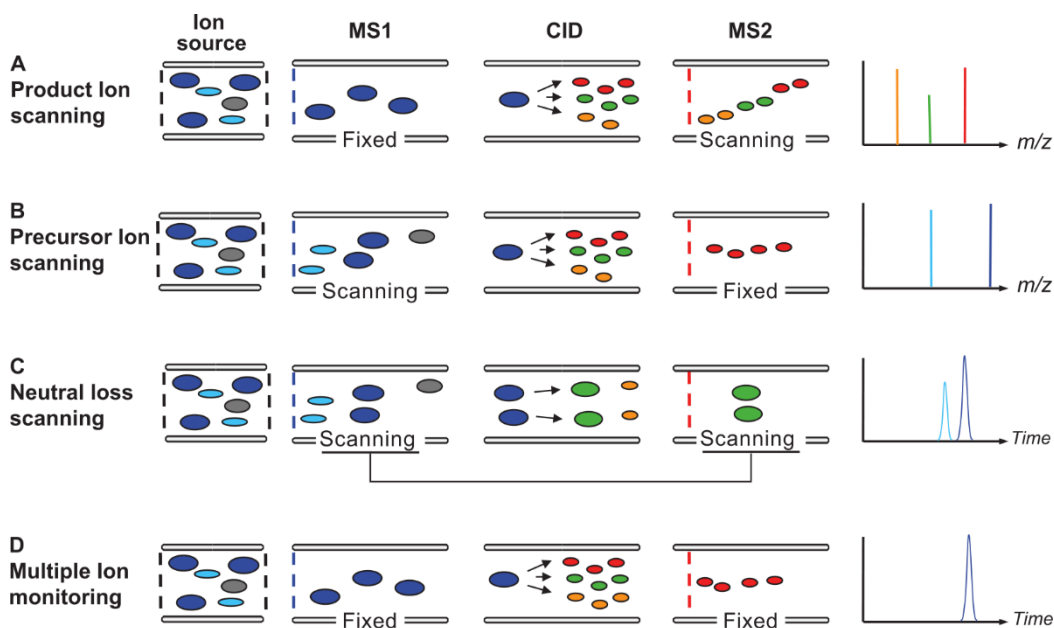
Ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις, η δίδυμη φασματομετρία μαζών προσφέρει τη δυνατότητα εκτέλεσης μιας σειράς διαφορετικών πειραμάτων. Η **Εικόνα 3.14** παρουσιάζει τα πειράματα που μπορούν να λάβουν χώρα ενώ στον **Πίνακα 3.3** συνοψίζονται οι κύριες αναλυτικές τεχνικές για απλή και δίδυμη φασματομετρία μάζας.

Πίνακας 3.3. Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας.

Λειτουργία σάρωσης	MS ₁	MS ₂ (κυψελίδα σύγκρουσης)	MS ₃
Πλήρης σάρωση (FS)	Σάρωση	Διέλευση όλων των ιόντων	Διέλευση όλων των ιόντων
Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring, SIM)	Επιλεγμένο m/z	Διέλευση όλων των ιόντων	Διέλευση όλων των ιόντων
Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product scan)	Επιλεγμένο m/z	Θραυσματοποίηση ιόντων	Σάρωση
Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor scan)	Σάρωση	Θραυσματοποίηση ιόντων	Επιλεγμένο m/z
Απώλεια ουδέτερου μορίου	Σάρωση	Θραυσματοποίηση ιόντων	Σάρωση
Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (SRM/MRM)	Επιλεγμένο m/z	Θραυσματοποίηση ιόντων	Επιλεγμένο m/z

- ❖ **Πλήρης Σάρωση (Full Scan, FS).** Στην τεχνική της πλήρους σάρωσης λαμβάνεται το συνολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για σταθερό χρόνο. Η πλήρης σάρωση βοηθά στον προσδιορισμό της δομής/ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης με τον προσδιορισμό του μοριακού της βάρους ή τη σύγκρισή της με πρότυπα φάσματα. Με την αύξηση του χρόνου σάρωσης αυξάνεται η ευαισθησία της μέτρησης καθώς αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή. Η αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται με τη μείωση του εύρους σάρωσης ή την αύξηση του χρόνου σάρωσης.
- ❖ **Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM).** Εάν η ανάλυση αποσκοπεί στη μέτρηση ενώσεων με γνωστά φάσματα, χρησιμοποιείται η τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων. Για ένα δεδομένο συστατικό, επιλέγονται ορισμένα χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματος του και ο αναλυτής μετακινείται από τη μία μάζα στην άλλη, μετρώντας μόνο αυτά τα ιόντα. Η τεχνική αυτή προσφέρει υψηλή ευαισθησία, αλλά ελλοχεύει κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, καθώς κάθε ένωση που δίνει το συγκεκριμένο ιόν μπορεί να συνπροσδιοριστεί.

- ❖ **Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product Ion Scan).** Στην περίπτωση αυτή, το πρόδρομο ιόν επιλέγεται στο MS₁ και θραυσματοποιείται στην κυψελίδα σύγκρουσης (MS₂), όπου αλληλοεπιδρά με το αέριο σύγκρουσης. Τα θραύσματα κατευθύνονται στο MS₃, όπου διαχωρίζονται με βάση τον λόγο m/z, λαμβάνοντας με αυτό τον τρόπο το φάσμα μάζας των παραγόμενων ιόντων. Σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές δίδυμης φασματομετρίας, χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα.
- ❖ **Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan).** Λαμβάνεται ολόκληρο το φάσμα μάζας σε ένα επιλεγμένο εύρος σάρωσης στο MS₁. Ακολουθεί θραυσματοποίηση των ιόντων στην κυψελίδα σύγκρουσης (MS₂). Τα παραγόμενα ιόντα διαβιβάζονται στο MS₃ όπου επιλέγεται για σάρωση ένα συγκεκριμένο ιόν με λόγο m/z. Η τεχνική αυτή επιλέγεται για μελέτες σχετικές με τη δομή και τη θραυσματοποίηση μιας ένωσης.
- ❖ **Απώλεια ουδέτερου μορίου (Neutral Loss Scan).** Σε αυτή την περίπτωση, το MS₁ σαρώνεται όπως στη δεύτερη περίπτωση, ακολουθεί θραυσματοποίηση και το MS₃ σαρώνεται για την παραγωγή φάσματος πρόδρομων ιόντων τα οποία υπόκεινται σε απώλεια ενός ουδέτερου μορίου. Η τεχνική αυτή παρέχει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν παραγόμενα ιόντα, τα οποία προέρχονται από μια κατηγορία ενώσεων, με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά.
- ❖ **Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (Multiple / Single Reaction Monitoring, SRM / MRM).** Στην τεχνική αυτή παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση (SRM) ή ομάδα αντιδράσεων (MRM). Πιο συγκεκριμένα επιτυγχάνεται γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα αφού παρακολουθείται συγκεκριμένος αριθμός μητρικών / θυγατρικών ιόντων. Το υπόβαθρο θορύβου είναι πολύ χαμηλό μιας και οποιαδήποτε παρεμποδίζουσα ουσία θα πρέπει να σχηματίσει όχι μόνο ένα μητρικό ιόν του ίδιου λόγου m/z με την ουσία στόχο, αλλά θα πρέπει να διασπαστεί και να σχηματίσει και τα ίδια θυγατρικά ιόντα. Επομένως ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερη ανιχνευσιμότητα, αυξάνοντας σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου. Ο συγκεκριμένος τύπος σάρωσης καθιστά τη δίδυμη φασματομετρία μάζας την πιο εκλεκτική και ευαίσθητη τεχνική για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων [24,29].



Εικόνα 3.14. **A)** Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product Ion scanning), **B)** Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion scanning), **C)** Απώλεια ουδέτερου μορίου (Neutral Loss scanning), **D)** Παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (Single/Multiple Reaction Monitoring) [42].

3.3.6. Ανιχνευτές ιόντων

Ο ρόλος του ανιχνευτή είναι να παράγει ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού και του φορτίου των ιόντων που προσπίπτουν σε αυτόν. Με βάση το είδος του πειράματος αλλά και τη διάταξη του οργάνου επιλέγεται και ο αντίστοιχος ανιχνευτής. Δύο είναι οι κυριότερες κατηγορίες ανιχνευτών: **i)** αυτοί που επιτρέπουν την άμεση μέτρηση φορτίου (φαρανταϊκό κύπελλο) και **ii)** αυτοί που ενισχύουν την ένταση του σήματος (ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής, φωτοπολλαπλασιαστής) [23].

3.3.7. Σύστημα κενού

Η λειτουργία των φασματόμετρων μαζών στηρίζεται στη συνεχή λειτουργία συστήματος παραγωγής υψηλού κενού στην περιοχή 10^{-5} - 10^{-8} Torr. Η παραμικρή διαρροή ατμοσφαιρικού αέρα π.χ. στην πηγή ιόντων, θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής ιόντων των προς ανάλυση δειγμάτων. Στα περισσότερα φασματόμετρα μαζών το κενό επιτυγχάνεται με συνδυασμό αντλιών. Η πίεση μειώνεται αρχικά με περιστροφικές αντλίες και στη συνέχεια ενεργοποιούνται αντλίες διάχυσης ελαίου. Στα σύγχρονα

φασματομέτρα μαζών χρησιμοποιούνται στροβιλομοριακές αντλίες, που λειτουργούν χωρίς υγρά [20].

3.3.8. Σύστημα Η/Υ

Οι ηλεκτρονικοί υπολογιστές έχουν σημαντική επίδραση στην φασματομετρία μάζας και πιο συγκεκριμένα: **i)** στην αυτοματοποίηση δύσκολων υπολογισμών για τη διευκόλυνση της ερμηνείας των φασμάτων, **ii)** στη συλλογή δεδομένων και **iii)** τον έλεγχο των οργάνων και την ερμηνεία των δεδομένων. Επιπροσθέτως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τα εξής:

- ✓ Ταυτοποίηση των ιοντικών θραυσμάτων από την ακριβή τιμή m/z ,
- ✓ Βαθμονόμηση του φασματομέτρου,
- ✓ Επίλυση συστημάτων πολλών εξισώσεων που η επίλυσή τους απαιτείται για την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων ενώσεων,
- ✓ Σύγκριση φάσματος μαζών με υπάρχον αρχείο φασμάτων και για ταυτοποίηση ένωσης ή μίγματος ενώσεων,
- ✓ Έλεγχος για τυχόν επιμολύνσεις και αυτόματη απομάκρυνση των κορυφών τους από τα προκύπτον φάσμα.

3.4. Φασματομετρία μάζας φυσικών προϊόντων: παρελθόν, παρόν και μελλοντικές προοπτικές

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη πολλών προϊόντων και φαρμάκων που προέρχονται από φυσικά προϊόντα οδήγησε πολλές ερευνητικές ομάδες σε όλο τον κόσμο να στοχεύσουν σε βιοδραστικά μόρια από φυτά, βακτήρια, μύκητες και άλλες φυσικές πηγές. Η κλασική προσέγγιση που ακολουθείται προς αυτή την κατεύθυνση είναι ο έλεγχος της βιολογικής δραστηριότητας σε ακατέργαστα εκχυλίσματα, η απομόνωση και η ταυτοποίηση της βιοδραστικής ή των βιοδραστικών ενώσεων [43-45].

Προς αυτή την κατεύθυνση, όλοι οι επιστήμονες φυσικών προϊόντων (NP) χρησιμοποιούν τη φασματομετρία μάζας στην καθημερινή ερευνητική τους ρουτίνα ως σημαντικό μέρος της διαδικασίας ανακάλυψης νέων βιοδραστικών ενώσεων. Περιστασιακά, όταν άλλες μέθοδοι όπως ο 1D και 2D NMR [46-47], οι ακτίνες X [48], το UV-Vis [49-50] και οι μελέτες αποικοδόμησης έχουν αποτύχει στις μελέτες αποσαφήνισης

της δομής, η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για να συνδράμει προς αυτή την κατεύθυνση. Οι επιστήμονες δεν έχουν αξιοποιήσει πλήρως τις δυνατότητες της φασματομετρίας μαζών για την ανακάλυψη νέων NPs, αλλά είναι σαφές ότι όταν χρησιμοποιείται κατάλληλα, η MS μπορεί να αποδειχθεί πιο χρήσιμη τεχνική από τον NMR για τον αρχικό χαρακτηρισμό των NPs. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της MS είναι η χαμηλή απαίτηση σε ποσότητες δείγματος, επομένως η δυνατότητα απόκτησης όσο το δυνατόν περισσότερων δομικών πληροφοριών θα ήταν ιδιαίτερα σημαντική.

Η χρήση της φασματομετρίας μάζας στη μελέτη των φυσικών προϊόντων καθιερώθηκε κατά τα έτη 1960-1980. Η εξέλιξη αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική για την περαιτέρω βελτίωση της φασματομετρίας μάζας ως αναλυτικής τεχνικής, δεδομένης της τεράστιας ποικιλομορφίας των χημικών ιδιοτήτων των φυσικών προϊόντων. Τα αλκαλοειδή αποτέλεσαν πεδίο δοκιμών λόγω της δομικής τους ποικιλομορφίας και των σχετικά υψηλών συγκεντρώσεών τους σε φυσικές πηγές. Επιπλέον, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική του ιοντισμού ηλεκτρονίων, ο ιοντισμός των ενώσεων αυτών σε κατιόντα $[M^+]$ οδήγησε σε χαρακτηριστικά δομικά φάσματα μάζας με χαμηλή ανάλυση. Η έλευση των φασματομέτρων μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HR-MS), αρχικά χρησιμοποιώντας φασματομέτρα μάζας μαγνητικής εκτροπής και αργότερα χρησιμοποιώντας FT-ICR και TOF, επέτρεψε ακριβείς μετρήσεις μάζας και τον προσδιορισμό της μοριακής δομής πολλών φυσικών προϊόντων. Η ανάπτυξη ηπιότερων μεθόδων ιοντισμού, όπως η εκρόφηση πεδίου (FD) και ο CI [51], βελτίωσε την εκλεκτικότητα της τεχνικής ακόμη και σε πολύπλοκα δείγματα, δεδομένου ότι η υψηλή συγγένεια πρωτονίων των αλκαλοειδών σε σχέση με άλλα συστατικά με φτωχότερο ιοντισμό είχε ως αποτέλεσμα άφθονα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$. Αρχικά, η επιλογή των ιόντων, η θραυσματοποίηση τους (CID) και η ταυτοποίηση τους σε ένα δεύτερο στάδιο ανάλυσης μάζας, δηλαδή σε ένα πείραμα MS/MS, ήταν η αρχή και θεμελίωση της άμεσης ανάλυσης πολύπλοκων μιγμάτων φυσικών προϊόντων με MS [52].

Η ελεγχόμενη παραγωγή θραυσμάτων από επιλεγμένα ιόντα, εισήγαγε την δίδυμη φασματομετρία μάζας και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε αναλυτές μαγνητικής εκτροπής. Τα όργανα αυτά διέθεταν ένα μαγνητικό και ένα ηλεκτρικό πεδίο που απέρριπταν τη σκέδαση των ιόντων λόγω ταχύτητας και έδιναν φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης. Οι αναλυτές μαγνητικής εκτροπής είναι φτωχοί αναλυτές μάζας και σύντομα εισήχθησαν τετραπολικοί αναλυτές μάζας, οι οποίοι είναι πιο κατάλληλοι για πειράματα MS/MS [53].

Τα τερπενοειδή συγκαταλέγονται στις κατηγορίες φυσικών προϊόντων που μπορούν να διαχωριστούν με GC. Η αέρια χρωματογραφία ήταν ο πρώτος τύπος χρωματογραφίας που συνδυάστηκε με απευθείας ανάλυση MS, γεγονός που επέτρεψε τη διεξαγωγή προηγμένων πειραμάτων για την ανάλυση φυσικών προϊόντων που μπορούν να διαχωριστούν με αέρια χρωματογραφία, όπως τα τερπενοειδή. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αυτά τα πειράματα ο αναλυτής μάζας ρυθμίστηκε ώστε να παρακολουθεί μόνο ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z (Single Ion Monitoring, SIM), αυξάνοντας έτσι σημαντικά την ευαισθησία ανίχνευσης συγκεκριμένων ενώσεων που εκλύονται με GC. Παράλληλα, όταν απαιτείται πρόσθετη εξειδίκευση, είναι δυνατή η παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (SRM / MRM) μέσω του αναλυτή μάζας [53,54]. Η επέκταση των συνδυασμών χρωματογραφικών τεχνικών και φασματομετρίας μάζας και στην υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας, επηρέασε σημαντικά τον τομέα της έρευνας φυσικών προϊόντων.

Ο ιοντισμός ανθεκτικών ενώσεων, όπως μια μεγάλη ποικιλία φυσικών προϊόντων και τα περισσότερα βιολογικά μόρια, που δεν είναι επαρκώς πτητικά ή θερμικά σταθερά, αποτελεί σημαντική πρόκληση για την ανάπτυξη μεθόδων MS. Η ανάπτυξη και η χρήση μεθόδων ιοντισμού με εκρόφηση (DI), όπως η εκρόφηση πεδίου (FD) [55], η φασματομετρία μάζας δευτερογενών ιόντων (SIMS) [56] και η εκρόφηση με λέιζερ, έδωσαν λύση σε αυτό το πρόβλημα με την άμεση παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση από θερμικά ευαίσθητα και μη πτητικά στερεά. Για να αποφευχθεί η άμεση αλληλεπίδραση των μορίων του αναλύτη με την πηγή ενέργειας στις μεθόδους ιοντισμού με εκρόφηση, χρησιμοποιείται μια μήτρα, όπως ο ιοντισμός με εκρόφηση υποβοηθούμενος από το μητρικό υλικό (MALDI) [57]. Η τεχνική MALDI επέτρεψε την εκρόφηση και τον ιοντισμό μεγάλων μορίων (> 2k Da), όπου η σύζευξη με όργανα TOF έδωσε όριο μάζας προς φορτίο που υπερβαίνει τα 10k Th (Thomson, μονάδα m/z)

Κατά την ίδια περίοδο 1968-1988, σημειώθηκε σημαντική ανάπτυξη των μεθόδων ιοντισμού με ψεκασμό, αρχικά με τη σύζευξη της LC με πηγές ιόντων με θερμικό ψεκασμό [58] και στη συνέχεια με την εξαιρετικά επιτυχημένη μέθοδο ESI [59]. Η μέθοδος ESI επέτρεψε την εύκολη παραγωγή πολικών, μη πτητικών ιοντικών ενώσεων από διαλύματα, συμπεριλαμβανομένων εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων, Τόσο η τεχνική MALDI όσο και ο ESI έχουν εφαρμοστεί ευρέως σε φυσικά προϊόντα τις τελευταίες δεκαετίες με μεγάλη επιτυχία και αποτελούν πλέον τις κυρίαρχες τεχνικές ιοντισμού.

Τα τελευταία δέκα χρόνια, η ανάπτυξη των πηγών ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος, έδωσε τη δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων στο ελεύθερο περιβάλλον εκτός του φασματομέτρου μάζας [60,61]. Επιπλέον, επιτεύχθηκε σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη διαχωριστική ικανότητα και την ακρίβεια της μάζας με όργανα ικανά για ανάλυση άνω των 24 εκατομμυρίων και ακρίβεια μάζας σε ppb [62], ενώ η πρόσβαση σε εξοπλισμό υψηλής ανάλυσης (40k >) με ακρίβεια μικρότερη του 1 ppm είναι πλέον πιο εφικτή [63,64].

Στις **Παράρτημα Γ** παρουσιάζονται οι παλαιότερες, οι τρέχουσες και οι μελλοντικές δυνατότητες της φασματομετρίας μάζας με έμφαση στη δυνατότητα της για την ανάλυση φυσικών προϊόντων. Καλύπτονται επίσης οι πρόσφατες τεχνικές φασματομετρίας μάζας απεικόνισης σε συνδυασμό με ιοντισμό περιβάλλοντος για τη χωρική χαρτογράφηση των NPs σε βιολογικά δείγματα. Τέλος, περιγράφονται τα φορητά φασματομέτρα μάζας και ιδίως ο συνδυασμός τους με ιοντισμό περιβάλλοντος που έχει επιφέρει σημαντικό αντίκτυπο στην έρευνα των φυσικών προϊόντων.

3.5. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη μεθοδολογία και τα όργανα καθιέρωσαν τη φασματομετρία μάζας ως απαραίτητο και αξιόπιστο εργαλείο για τη γρήγορη και απλή ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των NPs. Ίσως το κυριότερο σημείο προόδου στην εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας στον τομέα των NPs είναι η εξάλειψη των σταδίων προετοιμασίας του δείγματος με τη χρήση μεθόδων ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος, ενώ παράλληλα επιτρέπει τον ιοντισμό πολύπλοκων υλικών, συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων φυτικών συστατικών, σε ανοικτό περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξοικονόμηση χρόνου και ποσότητας δείγματος, καθώς είναι δυνατή η απευθείας διαλογή NPs από βιολογικά δείγματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη νέων αλγορίθμων για την επεξεργασία δεδομένων MS τα επόμενα χρόνια θα μειώσει τον χρόνο ανάλυσης τους, συμβάλλοντας έτσι σημαντικά στην ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων.

Ένα μεγάλο μέρος του ερευνητικού πεδίου που αφορά τη βελτίωση και την αναβάθμιση των φασματομέτρων μάζας, προσανατολίζεται στην ανάπτυξη απλούστερων, εύχρηστων οργάνων που θα απευθύνονται σε ένα ευρύτερο σύνολο επιστημόνων. Στο μέλλον, η καθιέρωση μικροσκοπικών οργάνων φασματομετρίας μάζας, θα καταστήσει δυνατή την εκτέλεση φασματομετρίας μάζας στον πάγκο, ενώ η σύζευξή τους με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος θα οδηγήσει σε επιτόπια ανίχνευση και ταυτοποίηση φυσικών

προϊόντων στις πηγές τους. Έτσι, θα είναι εφικτό να εκτελούν ουσιαστικά στιγμιαία φασματομετρική ανάλυση μάζας σε πολύπλοκα υλικά, οδηγώντας σε ένα σημαντικά διευρυμένο φάσμα εφαρμογών στον τομέα των NPs.

Η αλληλένδετη σχέση μεταξύ της φασματομετρίας μαζών και των φυσικών προϊόντων, τόσο στο παρελθόν όσο και στο παρόν, θα συνεχιστεί σίγουρα και στο μέλλον. Επομένως, είναι εύκολο να καταλάβει κανείς ότι το μέλλον τόσο για τα NPs όσο και για τη φασματομετρία μάζας είναι λαμπρό. Η αυτοματοποίηση της ροής εργασίας με τη συμβολή της τεχνολογίας της πληροφορικής, η πρόοδος στα όργανα και η επέκταση των συνεργασιών θα εξοικονομήσουν χρόνο και χρήμα στους ερευνητές και θα μειώσουν την ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για την πλήρη διαλεύκανση της δομής σε ποσότητες κάτω του μικρογραμμαρίου, καθιστώντας τη φασματομετρία μάζας μια τεχνική ρουτίνας για την ανάλυση των NPs.

3.6. Βιβλιογραφικές αναφορές

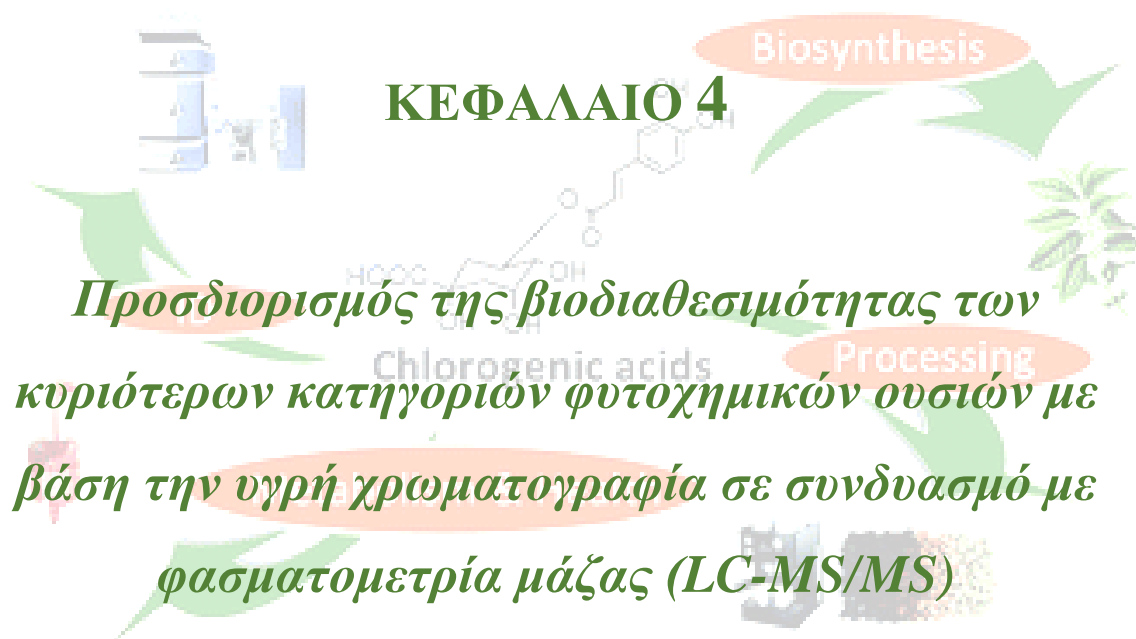
- [1] Silva AS, Nabavi SM. Chapter 27 - Future perspectives in natural products analysis. In: Sanches Silva A, Nabavi SF, Saeedi M, Nabavi SM, editors. *Recent Advances in Natural Products Analysis*: Elsevier; 2020;825-33.
- [2] Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):426-36.
- [3] Noriega, P., Gortaire, G., Osorio, E. *Mass Spectrometry and Its Importance for the Analysis and Discovery of Active Molecules in Natural Products*. In: El-Shemy, H., editor. *Natural Drugs from Plants [Working Title] [Internet]*. London: IntechOpen; 2021.
- [4] Callahan DL, Elliott CE. A workflow from untargeted LC-MS profiling to targeted natural product isolation. *Methods Mol Biol*. 2013;1055:57-70.
- [5] Marvin C. McMaster, *LC/MS: A Practical User's Guide*, August 2005.
- [6] Czaplicki, S. . *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*. In: Martin, D. F., Martin, B. B. , editors. *Column Chromatography [Internet]*. London: IntechOpen; 2013.
- [7] https://www.waters.com/waters/it_IT/HPLC-Column-Hardware/nav.htm?locale=142&cid=10049068.
- [8] McLuckey SA, Wells JM. Mass analysis at the advent of the 21st century. *Chem Rev*. 2001;101(2):571-606.
- [9] Dorsey JG. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(26):9220-.
- [10] Chatfield D. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. Robert E. Ardrey. Huddersfield, UK: Wiley, 2003.
- [11] Raymond P. W. Scott, *Techniques and Practice of Chromatography*, Marcel Dekker Inc. New York, 1995.
- [12] Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
- [13] Espada A, Molina-Martin M, Dage J, Kuo MS. Application of LC/MS and related techniques to high-throughput drug discovery. *Drug Discov Today*. 2008;13(9-10):417-23.
- [14] Andrews CL, Vouros P, Harsch A. Analysis of DNA adducts using high-performance separation techniques coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1999;856(1-2):515-526.

- [15] Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrom Rev.* 1999;18(3-4):187-279.
- [16] Ifa DR, Jackson AU, Paglia G, Cooks RG. Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2009;394(8):1995-2008.
- [17] Maurer HH. Mass spectrometric approaches in impaired driving toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393(1):97-107.
- [18] Marquet P, Lachâtre G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;733(1-2):93-118.
- [19] Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today.* 2005;10(20):1357-67.
- [20] Χατζηωάννου Θ.Π., Κουπάρης Μ.Α., *Ενόργανη Ανάλυση*, 1997, ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- [21] Van Bramer S.E., *An Introduction to Mass Spectrometry*, 1997, (<http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>).
- [22] Johnstone R.A.W., Rose M.E., *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*, Cambridge University Press, New York, 1996.
- [23] Burlingame AL, Boyd RK, Gaskell SJ. *Mass Spectrometry. Analytical Chemistry.* 1996;68(12):599-652.
- [24] Ardrey B., *Liquid Chromatography Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley & Sons, Chichester, 2003.
- [25] Thompson RQ. *Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition* (Worsfold, Paul; Tonshend, Alan; Poole, Colin). *Journal of Chemical Education.* 2005;82(9):1313.
- [26] Pól J, Strohal M, Havlíček V, Volný M. Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. *Histochem Cell Biol.* 2010 Nov;134(5):423-43.
- [27] Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J.* 2001;355(Pt 3):545-61.
- [28] <https://www.bristol.ac.uk/chemistry/facilities/nerc-lsmsf/techniques/hplcms/>
- [29] Dooley KC. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clin Biochem.* 2003;36(6):471-81.
- [30] Blades AT, Ikonomidou MG, Kebarle P. Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Analytical Chemistry.* 1991;63(19):2109-14.

- [31] Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000;35(8):939-52.
- [32] Gaskell SJ. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry.* 1997;32(7):677-88.
- [33] Wilm MS, Mann M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1994;136(2):167-80.
- [34] Kebarle P, Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry.* 1993;65(22):972A-86A.
- [35] Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry.* 2012;2012:282574.
- [36] Fenn JB. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 1993;4(7):524-35.
- [37] Manisali I, Chen D, Schneider B. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: Past, present, and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2006;25:243-56.
- [38] Jakubowski N, Prohaska T, Rottmann L, Vanhaecke F. Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry Part I. Tutorial: Fundamentals and instrumentation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* 2011;26(4):693-726.
- [39] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>
- [40] https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/core_principles.html
- [41] Cole R.B., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, 1997, Wiley, New York.
- [42] Burinsky DJ. Chapter 11 Mass spectrometry. In: Ahuja S, Jespersen N, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry.* 47: Elsevier; 2006:319-96.
- [43] Wolf D, Siems K. Burning the Hay to Find the Needle – Data Mining Strategies in Natural Product Dereplication. *CHIMIA.* 2007;61(6):339.

- [44] Espindola LS, Dusi RG, Demarque DP, Braz-Filho R, Yan P, Bokesch HR, et al. Cytotoxic Triterpenes from *Salacia crassifolia* and Metabolite Profiling of Celastraceae Species. *Molecules*. 2018;23(6):1494.
- [45] Demarque D, Sabóia JF, Fabri J, Carollo C. Allelopathic activity of *Matricaria chamomilla* essential oil in bioautography test. *Allelopathy Journal*. 2012;29:171-6.
- [46] Robinette SL, Brüschweiler R, Schroeder FC, Edison AS. NMR in Metabolomics and Natural Products Research: Two Sides of the Same Coin. *Accounts of Chemical Research*. 2012;45(2):288-97.
- [47] Forseth RR, Schroeder FC. NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Curr Opin Chem Biol*. 2011;15(1):38-47.
- [48] Inokuma Y, Yoshioka S, Ariyoshi J, Arai T, Hitora Y, Takada K, et al. X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. *Nature*. 2013;495(7442):461-6.
- [49] Klitgaard A, Iversen A, Andersen MR, Larsen TO, Frisvad JC, Nielsen KF. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014;406(7):1933-43.
- [50] Nielsen KF, Månsson M, Rank C, Frisvad JC, Larsen TO. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J Nat Prod*. 2011;74(11):2338-48.
- [51] Munson MSB, Field FH. Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society*. 1966;88(12):2621-30.
- [52] Kruger TL, Cooks RG, McLaughlin JL, Ranieri RL. Identification of alkaloids in crude extracts by mass-analyzed ion kinetic energy spectrometry. *The Journal of Organic Chemistry*. 1977;42(25):4161-2.
- [53] Yost RA, Enke CG. Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation. *Analytical Chemistry*. 1979;51(12):1251-64.
- [54] Wolf-Yadlin A, Hautaniemi S, Lauffenburger DA, White FM. Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(14):5860-5.
- [55] Bekey HD. 1 - THEORY OF FIELD IONIZATION (FI) AND FIELD DESORPTION (FD). In: Bekey HD, editor. *Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry*; Pergamon; 1977. p. 1-25.

- [56] Herzog RFK, Viehböck FP. Ion Source for Mass Spectrography. *Physical Review*. 1949;76(6):855-6.
- [57] Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1987;78:53-68.
- [58] Blakley CR, Vestal ML. Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1983;55(4):750-4.
- [59] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
- [60] Monge ME, Harris GA, Dwivedi P, Fernández FM. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. *Chem Rev*. 2013;113(4):2269-308.
- [61] Ding X, Duan Y. Plasma-based ambient mass spectrometry techniques: The current status and future prospective. *Mass Spectrometry Reviews*. 2015;34(4):449-73.
- [62] Nikolaev EN, Boldin IA, Jertz R, Baykut G. Initial experimental characterization of a new ultra-high resolution FTICR cell with dynamic harmonization. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011;22(7):1125-33.
- [63] Junot C, Fenaille F, Colsch B, Bécher F. High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. *Mass Spectrom Rev*. 2014;33(6):471-500.
- [64] Di Girolamo F, Lante I, Muraca M, Putignani L. The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Curr Org Chem*. 2013;17(23):2891-905.



4.1. Εισαγωγή

Έχει αναφερθεί ότι τα φυσικά προϊόντα εμφανίζουν αξιοσημείωτες βιολογικές δραστηριότητες στοχεύοντας μόρια που σχετίζονται με ασθένειες. Αυτό το ενισχυμένο θεραπευτικό δυναμικό που παρουσιάζουν έχει οδηγήσει στη χρήση τους ως ανθρώπινα θεραπευτικά μέσα, παρέχοντας μια ανεξάντλητη πηγή μικρών μορίων για την ανακάλυψη φαρμάκων. Φυσικά προϊόντα με ή χωρίς τροποποίηση ή ακόμη και νέα φάρμακα που έχουν σχεδιαστεί μετά από χρήση φυτοχημικών φαρμακοφόρων έχουν εγκριθεί από τον FDA και είναι αξιοσημείωτο ότι αποτέλεσαν το 34 % των νέων φαρμακευτικών καταχωρήσεων μεταξύ 1981 και 2010 [1]. Τα ιδιαίτερα ελκυστικά χαρακτηριστικά τους οφείλονται στο γεγονός ότι τα φυσικά προϊόντα έχουν εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να αλληλεπιδρούν με πολυάριθμους στόχους και έτσι να είναι σε θέση να διαμορφώνουν μια ποικιλία μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα τελευταία 20 χρόνια η δημοτικότητά τους έχει μειωθεί, κυρίως λόγω της έλλειψης αναλυτικών τεχνικών με ευαισθησία και εκλεκτικότητα [2]. Ωστόσο, η τεχνολογική πρόοδος οδήγησε στην ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων υψηλής απόδοσης για ταχεία διαλογή και στη βελτίωση παλαιών τεχνικών, όπως η LC-MS [2]. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μια σημαντική ροπή των ερευνητών προς τα φυτοχημικά στα τρόφιμα και τα πιθανά οφέλη τους για τους καταναλωτές [3].

Οι φυτοχημικές ενώσεις έχουν ευρέως μελετηθεί για τις ευεργετικές τους ιδιότητες, αλλά κυρίως *in vitro*. Δυστυχώς, οι *in vivo* και κλινικές μελέτες σε πρώιμο στάδιο έδειξαν ότι η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι πολύ χαμηλή και κατά συνέπεια, μειώνεται η βιοαποτελεσματικότητά τους. Εδώ, παρουσιάζονται ορισμένες από τις κυριότερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων (φλαβονοειδή, γλυκοζίτες, τερπένια, αλκαλοειδή και σαπωνίνες), οι οποίες, αν και παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις *in vitro*, η χαμηλή απορρόφησή τους παραμένει εμπόδιο σε *in vivo* μοντέλα και ανθρώπους [4]. Για παράδειγμα, η κερκετίνη, μια καλώς μελετημένη φλαβονόλη, όταν χορηγείται σε ανθρώπους, μπορεί να ανιχνευθεί μόνο σε συζευγμένες μορφές (οξεικό,θειϊκό, γλυκουρονικό οξύ) και έτσι χάνει την αποτελεσματικότητά της, καθώς οι συζευγμένες μορφές έχουν χαμηλότερη βιοδραστηριότητα [5].

Η βιοδιαθεσιμότητα είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για τον προσδιορισμό του δυναμικού ενός φυτοχημικού, καθώς μπορούμε να εκτιμήσουμε ποιο κλάσμα της υπό μελέτη αναλυόμενης ουσίας ή των ενεργών μεταβολιτών της φτάνει στη θέση στόχο [6]. Η φαρμακοκινητική σχετίζεται με τη μελέτη της οδού που ακολουθεί μια ουσία όταν

χορηγείται σε ανθρώπους ή ζώα. Η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η αποβολή ουσίας είναι βασικοί παράγοντες που εξετάζονται για την αναλυόμενη ουσία του ενδιαφέροντος, ενώ οι βασικές παράμετροι που μπορούν να περιγράψουν σε επαρκή βαθμό ένα φαρμακοκινητικό προφίλ είναι οι C_{max} , T_{max} , AUC και $t_{1/2}$ [7]. Η C_{max} είναι η υψηλότερη συγκέντρωση ενός φαρμάκου μετά τη χορήγηση μιας δόσης και πριν από τη χορήγηση μιας δεύτερης δόσης, η T_{max} αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει το φάρμακο στη μέγιστη συγκέντρωση (C_{max}) και $t_{1/2}$ ο χρόνος για να φτάσει το φάρμακο στο μισό της αρχικής του συγκέντρωσης. Η AUC (Area Under Curve, περιοχή κάτω από την καμπύλη) αναφέρεται στην περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου. Επομένως, απαιτείται διεξοδική διερεύνηση για την κατανόηση των μηχανισμών του μεταβολισμού, της απορρόφησης και της αποτελεσματικότητας των φυσικών προϊόντων, καθώς και για την υπέρβαση αυτών των εμποδίων μέσω της τροποποίησης των σκελετών τους ή της ανάπτυξης κατάλληλων σκευασμάτων και σωματιδίων μεταφοράς φυτοχημικών ουσιών [8-10]. Από αυτή την άποψη, είναι πολύ σημαντικό να καθιερωθούν πρωτόκολλα και μέθοδοι για την πλήρη ταυτοποίηση και αξιολόγηση των βιοδραστικών ενώσεων, ώστε να διασαφηνιστεί η ανεκμετάλλευτη αποτελεσματικότητά τους και η ασφάλειά τους για την ανθρώπινη υγεία. Συνεπώς, αυτό είναι ένα δύσκολο έργο τόσο για την ακαδημαϊκή κοινότητα όσο και για τη βιομηχανία, ιδίως λόγω των πολύπλοκων μητρών και της τεράστιας ποικιλίας των φυτικών εκχυλισμάτων που απαιτούν επιτακτικά εξελιγμένες μεθόδους για την εξερεύνησή τους. Επιπλέον, στη φαρμακευτική βιομηχανία ο προσδιορισμός των μεταβολιτών οι οποίοι απαντώνται σε ίχνη απαιτεί όργανα τελευταίας τεχνολογίας που προσφέρουν το πλεονέκτημα της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας [11,12].

Οι επιστήμονες, εκμεταλλευόμενοι τις τεχνολογικές εξελίξεις των τελευταίων δεκαετιών, έχουν στο οπλοστάσιό τους ένα ευρύ φάσμα αναλυτικών μεθόδων για τους ερευνητικούς τους στόχους. Μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας. Οι δύο άξονες στους οποίους κινείται η τεχνική αυτή είναι ο διαχωρισμός και η ανίχνευση. Η RP-HPLC είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη φυτοχημική ανάλυση, ενώ η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλών επιδόσεων (UHPLC) προσφέρει ένα ευρύτερο φάσμα επιλογών ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης [13]. Όσον αφορά την ανίχνευση, η δίδυμη φασματομετρία μάζας (MS/MS), προσφέρει το πλεονέκτημα της ταυτοποίησης γνωστών και άγνωστων δομών με πολύ υψηλή ευαισθησία και πολύ μικρή ποσότητα δείγματος [14].

Η MS/MS σε συνδυασμό με την UHPLC αποτελεί ένα ευέλικτο εργαλείο που συνοδεύεται από αυξημένη απόδοση, γεγονός που καθιστά την τεχνική αυτή το βέλτιστο εργαλείο για την ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων, φυτοχημικών ουσιών και των κύριων μεταβολιτών τους [15]. Στο παρόν, αναφέρονται οι τελευταίες εξελίξεις που έχουν συσσωρευτεί σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των κύριων κατηγοριών φυτοχημικών ουσιών (φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, τερπένια, γλυκοζίτες και σαπωνίνες), με τη χρήση LC-MS/MS.

4.2. Φαρμακοκινητική και ποσοτική ανάλυση των διαφόρων τάξεων φυτοχημικών

4.2.1. Γλυκοσίδες

Οι γλυκοσίδες ταξινομούνται ανάλογα με την παρουσία σακχάρου, τον τύπο του γλυκοζιτικού δεσμού και την αγλυκόνη. Ανάλογα με την ομάδα της γλυκόζης, ονομάζονται γλυκοζίτες ή φρουκτοζίτες εάν η ομάδα της γλυκόζης είναι φρουκτόζη ή γλυκόζη, αντίστοιχα. Ανάλογα με τον τύπο του γλυκοζιτικού δεσμού χωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες, C-, O-, N- και S- προσκόλληση. Οι γλυκοσίδες ταξινομούνται, ανάλογα με το χημικό προφίλ της ομάδας της αγλυκόνης, σε διάφορες κατηγορίες, όπως ιριδοειδείς γλυκοζίτες, κυανογενείς γλυκοζίτες κ.λπ. Ωστόσο, η βιολογική τους δραστηριότητα ή το φαρμακοκινητικό τους προφίλ δεν μοιάζουν πάντα με αυτά της αγλυκόνης τους. Αυτή η διαφοροποιημένη βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να οφείλεται σε μεταβολή του χωροχρονικού μεταβολισμού τους. Η πλειονότητά τους υδρολύεται στο στομάχι και στο έντερο, αλλά ορισμένοι από αυτούς υδρολύονται αργότερα, στο παχύ έντερο [16]. Κατά συνέπεια, καθίσταται αναγκαία η εκτενής μελέτη της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Η LC-MS/MS χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων, καθώς η εκλεκτικότητα και η ακρίβειά της επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση τόσο των γλυκοσιδών όσο και των αντίστοιχων αγλυκόνων τους. Στην **Εικόνα 4.1**, απεικονίζονται οι δομές των διαφόρων γλυκοσιδών που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία. Επιπλέον, στον **Πίνακα 4.1** αναφέρονται οι κύριες παράμετροι βιοδιαθεσιμότητας των διαφόρων ενώσεων, όπως προσδιορίστηκαν από φαρμακοκινητικές μελέτες με βάση την LC-MS/MS. Οι αναφερόμενες τιμές είναι τα C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, AUC και LLOQ.

Η βεργενίνη είναι ένας γλυκοζίτης του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος που ποσοτικοποιήθηκε μαζί με το εσωτερικό του πρότυπο (IS), στο ανθρώπινο πλάσμα με τη

χρήση LC-MS/MS σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI (-) υπό παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος/ιόντων (MRM) [17]. Η μετάβαση για τη βεργενίνη ήταν m/z 326.9 \rightarrow 312.3 και η μέθοδος αποδείχθηκε γραμμική στο εύρος συγκεντρώσεων 3 - 1000 ng mL⁻¹ με LLOQ στα 3 ng mL⁻¹. Εξετάζοντας τον **Πίνακα 4.1**, παρατηρούμε ότι η βεργενίνη απορροφήθηκε μάλλον γρήγορα με T_{max} στις 2 ώρες, αλλά η τιμή $t_{1/2}$ στις 3.7 ώρες δείχνει ότι ο ρυθμός αποβολής ήταν αργός.

Η αμυγδαλίνη είναι ένας γλυκοζίτης και πιο συγκεκριμένα ένας κυανογενής γλυκοζίτης (περιέχει μια ομάδα κυανίου), ο οποίος προσδιορίστηκε με τη χρήση LC-MS/MS, σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις. Πρώτον, η αμυγδαλίνη προσδιορίστηκε μόνη της (με τη χρήση γενιποσίδης ως IS) χρησιμοποιώντας MRM σε ESI (-) με μετάβαση στο m/z 457.2 \rightarrow 279.1 [18]. Η μέθοδος παρουσίασε καλή γραμμικότητα εντός των συγκεντρώσεων 10 - 2000 ng mL⁻¹ και το LLOQ βρέθηκε να είναι 10 ng mL⁻¹. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.1**, η αμυγδαλίνη απορροφήθηκε γρήγορα με T_{max} σε 1.5 h, ενώ η τιμή $t_{1/2}$ σε 8.45 h δείχνει ότι ο ρυθμός αποβολής ήταν αρκετά αργός. Σε μια άλλη περίπτωση, η αμυγδαλίνη προσδιορίστηκε ταυτόχρονα με την παιωνιφλορίνη [19]. Σύμφωνα με την ανάλυση αυτή, ο προσδιορισμός έγινε με χρήση MRM και ESI (+) με τη μετάβαση για την αμυγδαλίνη στο m/z 475.2 \rightarrow 163.1. Το κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού βρέθηκε να είναι 0.6 ng mL⁻¹, ενώ η γραμμικότητα ήταν ικανοποιητική στο εύρος 0.6 - 2000 ng mL⁻¹. Κατά την ενδοφλέβια (IV) χορήγηση (**Πίνακας 4.1**), η αμυγδαλίνη παρουσίασε τον ίδιο ρυθμό αποβολής ($t_{1/2}$) με την παιωνιφλορίνη, ενώ η C_{max} για την παιωνιφλορίνη ήταν υψηλότερη από την αμυγδαλίνη, υποδηλώνοντας καλύτερη απορρόφηση.

Η αυκουβίνη και το γενιποσιδικό οξύ ανήκουν στην ομάδα των ιριδοειδών γλυκοζιτών (περιέχουν μια ιριδοειδή ομάδα) [20,21]. Και οι δύο προσδιορίστηκαν με τη χρήση MRM, αλλά ο ESI για την αυκουβίνη ήταν θετικός και για το γενιποσιδικό οξύ αρνητικός. Σύμφωνα με τις αναλύσεις, η μετάβαση για την αυκουβίνη και το γενιποσιδικό οξύ ήταν m/z 364 \rightarrow 149 και 373.3 \rightarrow 211.1, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις προσδιορίστηκε το κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού για κάθε αναλύτη, όπου για την αυκουβίνη ήταν 10 ng mL⁻¹, ενώ για το γενιποσιδικό οξύ 5 ng mL⁻¹. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, επιτεύχθηκε καλή γραμμικότητα στο εύρος των συγκεντρώσεων 10 - 30000 ng mL⁻¹ για την αυκουβίνη και 10 - 4000 ng mL⁻¹ για το γενιποσιδικό οξύ. Παρά το γεγονός ότι το γενιποσιδικό οξύ χορηγήθηκε σε μικρότερη δόση από την αυκουβίνη, σύμφωνα με

τις αναφορές, η C_{\max} και για τα δύο κυμάνθηκε περίπου στο ίδιο εύρος (**Πίνακας 4.1**). Παρόλα αυτά, ο ρυθμός αποβολής της αυκουβίνης ήταν βραδύτερος από αυτόν του γενιποσιδικού οξέος, παρόλο που παρουσίασαν σχεδόν την ίδια T_{\max} σε περίπου 1 ώρα.

Οι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες είναι μια άλλη κατηγορία γλυκοζιτών (το φλαβονοειδές είναι η αγλυκόνη). Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος προσδιορισμός της τυφανοσιδης και της ισοραμενίνη-3-O-νεοεσπεριδοσιδης που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία γλυκοζιτών [22]. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε MRM σε ESI (-), ενώ οι μεταβάσεις τους ήταν m/z 769.17 \rightarrow 314.11 και 623.19 \rightarrow 314.12, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, το LLOQ βρέθηκε να είναι 0.506 ng mL⁻¹ για την τυφανοσιδή και 0.502 ng mL⁻¹ για την ισοραμενίνη-3-O-νεοεσπεριδοσιδή. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική στις συγκεντρώσεις 10 - 4000 ng mL⁻¹, ενώ και οι δύο ενώσεις έφθασαν γρήγορα στη C_{\max} τους, όπως φαίνεται από τις τιμές T_{\max} τους (**Πίνακας 4.1**), αλλά η C_{\max} για την ισοραμενίνη-3-O-νεοεσπεριδοσιδή ήταν περίπου 6 φορές μεγαλύτερη από την C_{\max} της τυφανοσιδης, με τον ρυθμό αποβολής ($t_{1/2}$) να είναι σχεδόν ο ίδιος και αρκετά γρήγορος. Η ικαρίνη και η ναρινγίνη, προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα με την οσθολίνη μέσω MRM και ESI (+) [23]. Οι μεταβάσεις για τις ενώσεις αυτές ήταν m/z 513.3 \rightarrow 366.8 για την ικαρίνη, 579.3 \rightarrow 150.9 για τη ναρινγίνη, m/z 245.1 \rightarrow 189.0 για την οσθολίνη και οι περιοχές γραμμικότητας ήταν 1.06 - 424 ng mL⁻¹, 2.10 - 525 ng mL⁻¹ και 1.05 - 1050 ng mL⁻¹, αντίστοιχα. Εξετάζοντας τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους, είναι σαφές ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων. Η οσθολίνη παρουσίασε τη μεγαλύτερη C_{\max} μεταξύ των τριών ενώσεων (**Πίνακας 4.1**) και τον βραδύτερο ρυθμό αποβολής ($t_{1/2}$), ενώ η τιμή της T_{\max} σε περίπου 0.47 ώρες υποδηλώνει γρήγορη απορρόφηση. Η πουεραρίνη, ένας άλλος φλαβονοειδής γλυκοζίτης, ποσοτικοποιήθηκε μαζί με τη γλιβενκλαμίδα και εξετάστηκε η φαρμακοκινητική τους αλληλεπίδραση [24]. Εφαρμόζοντας ESI (+), η μετάβαση για την πουεραρίνη ήταν m/z 417 \rightarrow 297 και m/z 494 \rightarrow 369 για τη γλιβενκλαμίδα. Το εύρος γραμμικότητας ορίστηκε στα 18.6 - 3720 ng mL⁻¹ για την πουεραρίνη και στα 4.28 - 856 ng mL⁻¹ για τη γλιβενκλαμίδα, δίνοντας LLOQ στα 18.6 ng mL⁻¹ για την πουεραρίνη και στα 4.28 ng mL⁻¹ για τη γλιβενκλαμίδα. Σύμφωνα με την ανάλυση, όταν το βότανο και το φάρμακο συγχωρηγούνται υπήρχε αμοιβαία επίδραση στο φαρμακοκινητικό τους προφίλ. Όπως βλέπουμε στον **Πίνακα 4.1**, υπάρχει σημαντική διαφορά στη C_{\max} , πιθανώς λόγω των διαφορετικών χορηγούμενων δόσεων για τη γλιβενκλαμίδα και την πουεραρίνη, καθώς η πρώτη είχε χορηγούμενη δοσολογία 10 mg kg⁻¹

¹ ενώ η δεύτερη 400 mg kg^{-1} . Επιπλέον, η πουεραρίνη έχει πολύ γρήγορο χρόνο απορρόφησης με T_{\max} στις 0.56 h, αλλά ταχύτερο ρυθμό αποβολής ($t_{1/2}$ στις 4.19 h) σε σύγκριση με τη γλιβενκλαμίδα ($t_{1/2}$ στις 13.23 h).

Η παιωνιφλορίνη και η αλβιφλορίνη ανήκουν σε μια άλλη κατηγορία γλυκοζιτών, γνωστή ως γλυκοζίτες μονοτερπενίων, οι οποίοι ποσοτικοποιήθηκαν επίσης με τη χρήση LC-MS/MS [25]. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε MRM υπό ESI (+). Οι μεταβάσεις για τους εν λόγω αναλύτες ήταν m/z 481.02 \rightarrow 197.08 για την αλβιφλορίνη και 497.88 \rightarrow 178.90 για την παιωνιφλορίνη. Το LLOQ για αυτές τις ενώσεις βρέθηκε να είναι 5 ng mL^{-1} , ενώ οι καμπύλες βαθμονόμησης έδειξαν καλή γραμμικότητα στο εύρος 5 - 600 ng mL^{-1} . Κρίνοντας από τα φαρμακοκινητικά τους προφίλ (**Πίνακας 4.1**), υπήρξε σημαντική διαφορά στη C_{\max} κατά τη διάρκεια της από του στόματος χορήγησης ZMYL και RPA ενός βοτάνου, στην παιωνιφλορίνη και την αλβιφλορίνη. Είναι προφανές από τα φαρμακοκινητικά δεδομένα ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα ήταν υψηλότερες όταν χορηγήθηκε το βότανο RPA. Επιπλέον, ο ρυθμός αποβολής ήταν βραδύτερος και στους δύο αναλύτες σε σύγκριση με την από του στόματος χορήγηση ZMYL.

Η σβερτιανολίνη είναι μια ένωση που ανήκει στην κατηγορία των γλυκοζιτών των ξανθονών και η μετάβαση της προσδιορίστηκε σε m/z 435.1 \rightarrow 272.0. Σύμφωνα με τις αναφορές, η καμπύλη βαθμονόμησης επέδειξε καλή γραμμικότητα στο εύρος 0.5 - 500 ng mL^{-1} , ενώ το LLOQ ήταν 0.5 ng mL^{-1} . Λαμβάνοντας υπόψη τα φαρμακοκινητικά δεδομένα, η σβερτιανολίνη είχε όχι μόνο γρήγορη απορρόφηση με T_{\max} σε $0.15 \pm 0.08 \text{ h}$, αλλά και γρήγορο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ σε $0.38 \pm 0.21 \text{ h}$.

Οι πικροσίδες I, II και III, που προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα, ανήκουν στη γενική ομάδα των γλυκοζιτών [27] και αξιολογήθηκαν με τη χρήση MRM σε ESI (-). Η μέθοδος έδειξε ικανοποιητική γραμμικότητα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.5 - 500 ng mL^{-1} για τις πικροσίδες I, II, III. Οι μεταβάσεις, για τις πικροσίδες I, II και III ήταν m/z 419.2 \rightarrow 198.5, 511.0 \rightarrow 234.9 και 537.3 \rightarrow 261.0, αντίστοιχα. Όπως βλέπουμε από τον **Πίνακα 4.1**, οι τρεις πικροσίδες είχαν πολύ γρήγορο ρυθμό αποβολής ($t_{1/2}$) με την πικροσίδη I να αποβάλλεται ταχύτερα από τις άλλες δύο. Επίσης, η πικροσίδη II παρουσίασε την υψηλότερη $AUC_{0-\infty}$. Με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης, είναι προφανές ότι αυτές οι πικροσίδες χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα ως αποτέλεσμα του γρήγορου ρυθμού αποβολής τους και της χαμηλής συσσώρευσής τους στο πλάσμα των αρουραίων.

Τέλος, η γενιποσίδη και η σβερτιαμαρίνη ποσοτικοποιήθηκαν επίσης, ταυτόχρονα, με τη χρήση LC-MS/MS. Το LLOQ βρέθηκε και για τους δύο αναλύτες στο 1 ng mL^{-1} και η μέθοδος παρουσίασε καλή γραμμικότητα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων $10 - 500 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη γενιποσίδη και $5 - 250 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη σβερτιαμαρίνη. Με μια πιο προσεκτική ματιά στον **Πίνακα 4.1**, μπορούμε να δούμε ότι η γενιποσίδη φθάνει γρηγορότερα στη C_{\max} και έχει βραδύτερο ρυθμό αποβολής ($t_{1/2}$) σε σύγκριση με τη σβερτιαμαρίνη. Όπως αναφέρεται, η περιεκτικότητα της γενιποσίδης στην LDXGT είναι υψηλότερη από τη σβερτιαμαρίνη, οπότε αυτό μπορεί να εξηγήσει τη σημαντική διαφορά τους στη τιμή της C_{\max} [28].

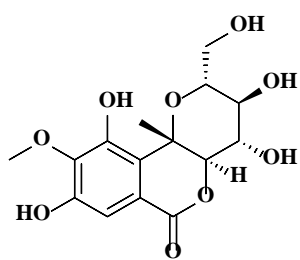
Πίνακας 4.1. Παράγωγα της τάξης των γλυκοσιδών και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ	ΜΗΤΡΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ / ΠΛΑΣΜΑ	C _{max} (ng mL ⁻¹)	AUC _{t-∞} (ng h mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
βεργενίνη [17]	βεργενίνη	p.o./ ανθρώπινο	66.6 ± 22.1	-	2.0 ± 0.9	3.7 ± 2.4	3
αμυγδαλίνη [18]	αμυγδαλίνη	p.o. / αρουραίου	1,702.52 ± 108.06	18,355.29 ± 648.35	1.50 ± 0.08	8.45 ± 0.14	10
ακουβίνη [20]	ακουβίνη	p.o. / αρουραίου	4016 ± 2394	11,305 ± 4627	1.08 ± 0.5	7.38 ± 2.9	10
ισοραμενίνη-3-O-νεοεσπεριδοσίδη [22]	εκχύλισμα από <i>Pollen Typhae</i>	p.o. / αρουραίου	3.24 ± 1.08 17.51 ± 2.48	7.20 ± 1.20 36.48 ± 11.74	0.26 ± 0.13 0.29 ± 0.10	2.3 ± 0.8 2.6 ± 0.6	0.506 0.502
πικροσίδη-I, II και III [27]	πικροσίδη I, II, III	i.v. / αρουραίου	-	249.995 ± 105.646 1466.869 ± 92.582 845.345 ± 460.286	-	0.36 ± 0.20 0.94 ± 0.23 0.74 ± 0.25	-
γέντιοπικροσίδη γενιποσίδη βαικαλίνη σβερτιαμαρίνη [28]	LDXGT (Long-Dan-Xie-Gan-Tang) ιατρικό σκεύασμα από 10 φυτικά εκχυλίσματα βοτάνων	p.o. / αρουραίου	5767 ± 412 1164 ± 144 2008 ± 265 13.0 ± 0.5	-	1 ± 0.11 0.91 ± 0.21 0.26 ± 0.15 1.62 ± 0.24	2.11 ± 0.132 82.8 ± 0.46 5.23 ± 0.94 3.13 ± 0.46	10 10 5 5
ικαρίνη ναρινγίνη οσθόλη [23]	Gushudan ιατρικό σκεύασμα	p.o. / αρουραίου	236 ± 96 (male) 178 ± 50 (female) 257 ± 103 (male) 260 ± 91 (female) 618 ± 342 (male) 643 ± 253 (female)	230 ± 123 (male) 218 ± 89 (female) 205 ± 56 (male) 202 ± 61 (female) 1067 ± 547 (male) 1266 ± 731 (female)	0.21 ± 0.06 (male) 0.21 ± 0.06 (female) 0.19 ± 0.07 (male) 0.23 ± 0.05 (female) 0.62 ± 0.14 (male) 0.46 ± 0.19 (female)	0.77 ± 0.20 (male) 0.85 ± 0.13 (female) 0.24 (male) 2.87 ± 1.41 (female) 4.66 ± 0.60 (male) 4.76 ± 1.52 (female)	1.06 2.10 1.05

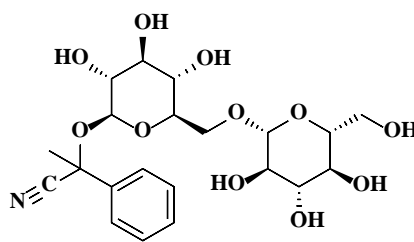
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

γλιβενκλαμίδη πουεραρίνη [24]	εκχύλισμα γλιβενκλαμίδης από <i>P. lobata</i>	p.o. / αρουραίου	251.0 ± 43.2 2003 ± 522	2766 ± 779 6822 ± 1116	2.42 ± 0.38 0.56 ± 0.14	13.23 ± 2.41 4.19 ± 0.72	4.28 18.6
αμυγδαλίνη παιωνιφλορίνη [19]	HTLPI (Huoxue- Tongluo λαιοφιλοποιημέ νη σκόνη)	i.v. / ανθρώπινο	692.4 ± 173.4 919.1 ± 253.0	-	-	2.4 ± 0.1 2.4 ± 0.1	0.6 0.6
γενιποσιδικό οξύ [21]	γενιποσιδικό οξύ	p.o. / αρουραίου	3542.27 ± 267.27	11,173.90 ± 964.23	1.00 ± 0.00	1.51 ± 0.07	5
παιωνιφλορίνη αλβιφλορίνη [25]	Zengmian Yiliu (ZMYL) φόρμουλα και Radix Paeoniae Alba (RPA)	p.o. / αρουραίου	93.4 ± 110.00 (RPA) 50.47 ± 28.76 (ZMYL) 306.43 ± 123.65 (RPA) 91.73 ± 48.34 (ZMYL)	263.43 ± 94.46 (RPA) 273.52 ± 117.87 (ZMYL) 406.82 ± 155.35 (RPA) 191.56 ± 112.33 (ZMYL)	0.26 ± 0.25 (RPA) 0.19 ± 0.09 (ZMYL) 0.72 ± 1.35 (RPA) 0.19 ± 0.09 (ZMYL)	61.64 ± 36.59 (RPA) 27.73 ± 13.92 (ZMYL) 25.78 ± 39.13 (RPA) 19.68 ± 17.83 (ZMYL)	5
σβερτιανολίνη [26]	εκχύλισμα από <i>Swertia mussotii</i>	p.o. / αρουραίου	135.2 ± 72.3	159.90 ± 60.32	0.15 ± 0.08	0.38 ± 0.21	0.5

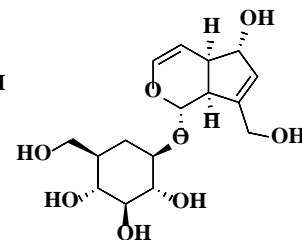
μήτρα: προέλευση της ένωσης; χορήγηση: τύπος χορήγησης; πλάσμα: τύπος πλάσματος που αναλύεται; AUCt-∞: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου; C_{max}: μέγιστη συγκέντρωση φαρμάκου; T_{max}: χρόνος επίτευξης της C_{max}; t_{1/2}: ο χρόνος που απαιτείται για να φθάσει το φάρμακο στο ήμισυ της αρχικής του συγκέντρωσης; p.o.: από του στόματος; i.v.: ενδοφλέβια χορήγηση.



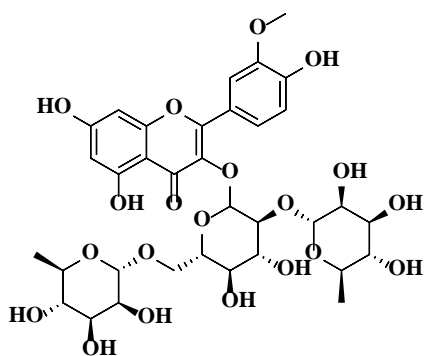
bergenin



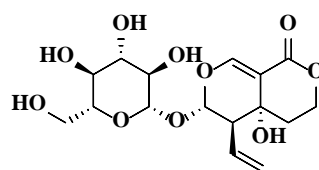
amygdalin



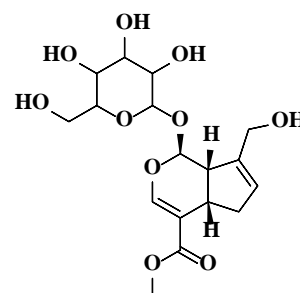
aucubin



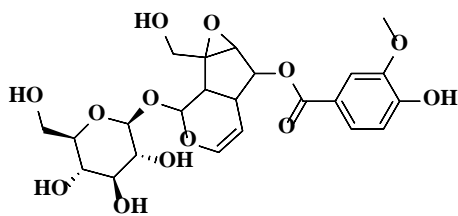
typhaneoside



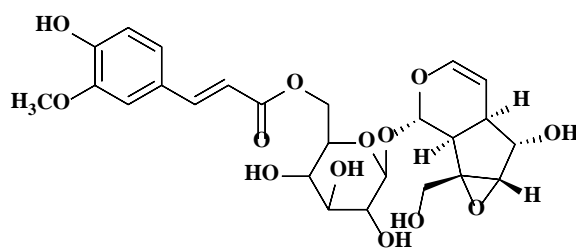
swertiamarin



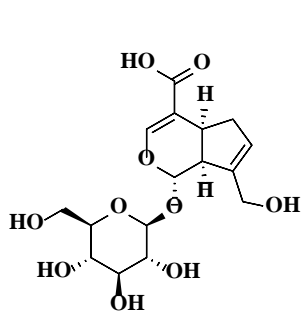
geniposide



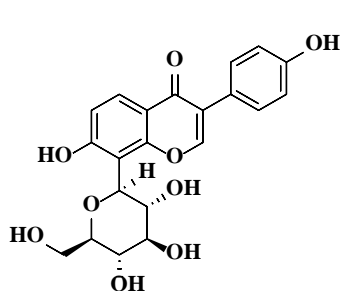
picroside II



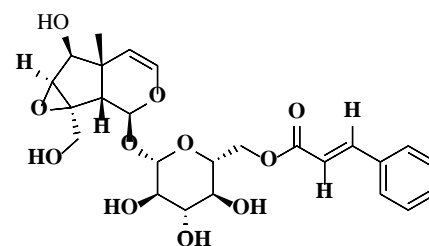
picroside III



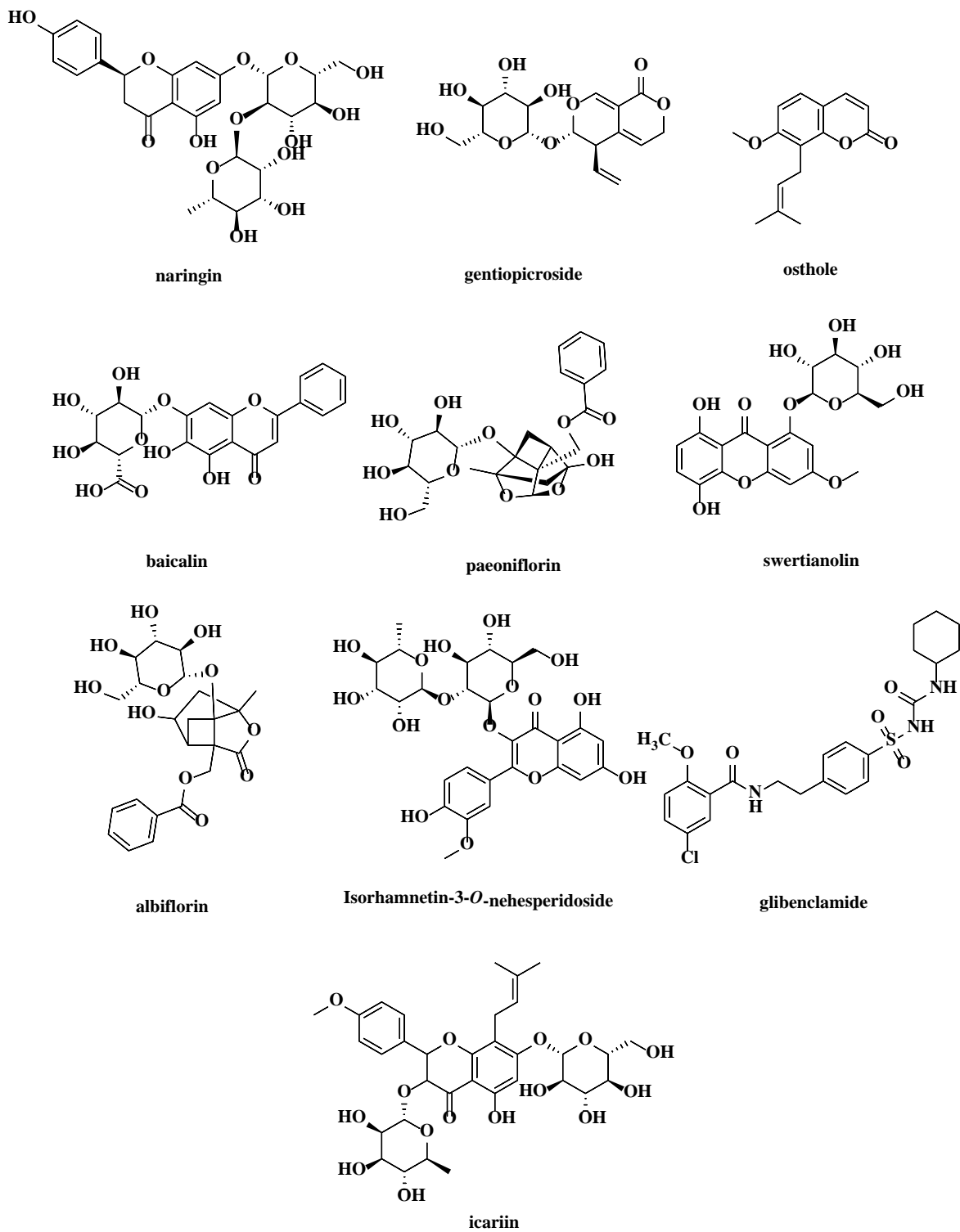
geniposidic acid



puerarin



picroside I



Εικόνα 4.1. Χημικές δομές διάφορων γλυκοσιδών.

4.2.2. Φλαβονοειδή

Το όνομά τους προέρχεται από τη λατινική λέξη *flavus* που σημαίνει κίτρινο (στη φύση εμφανίζονται κίτρινα). Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην οικογένεια των μεταβολιτών, οι οποίοι μπορούν να βρεθούν σε ορισμένα φυτά ή μύκητες. Αν και τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν ποικίλες και ισχυρές βιολογικές ιδιότητες *in vitro*, από αντι-καρκινικές, αντι-φλεγμονώδεις, αντι-οξειδωτικές κ.λπ., η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά τους μετριάξει την *in vivo* αποτελεσματικότητά τους [29-31]. Η χαμηλή απορρόφησή τους και ο μεταβολισμός τους σε ενώσεις με χαμηλότερη βιοδραστικότητα καθιστούν αναγκαία μια βαθύτερη διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους [32]. Η **Εικόνα 4.2** απεικονίζει τις δομές των διαφόρων φλαβονοειδών που αναλύονται σε αυτή την ενότητα, ενώ οι παράμετροι βιοδιαθεσιμότητας τους αναφέρονται στον **Πίνακα 4.2**.

Η πλειονότητα των μελετών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών σε *in vivo* μοντέλα έχουν βασιστεί σε LC-MS/MS. Τα χάπια Longhu Rendan που επιδεικνύουν αντι-οξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές επιδράσεις συνίστανται από διάφορες ενώσεις με τέσσερις από αυτές να είναι φλαβονοειδή (λικιριτίνη, ισολικιριτίνη, λικιριτιγενίνη, ισολικιριτιγενίνη). Μια μέθοδος LC-MS/MS χρησιμοποιήθηκε για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση οκτώ από τις ενώσεις αυτές [33]. Οι μεταβάσεις για τα τέσσερα φλαβονοειδή ήταν m/z 417.1 \rightarrow 255.2 για τη λικιριτίνη και την ισολικιριτίνη και 255.0 \rightarrow 119.2 για τη λικιριτιγενίνη και την ισολικιριτιγενίνη. Εφαρμόστηκε εναλλασσόμενη λειτουργία ESI (εναλλαγή μεταξύ θετικού και αρνητικού) και MRM. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η ακρίβεια εντός και μεταξύ των ημερών ήταν 92.3 - 104 % για τους τρεις αναλύτες, ενώ η ακρίβεια εντός και μεταξύ των ημερών, ως RSD, ήταν 1.7 - 11.6 %. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, οι τιμές της ακρίβειας και της πιστότητας ήταν εντός των ορίων αποδοχής. Η μέθοδος έδειξε πολύ καλή γραμμικότητα με $r^2 > 0.9948$. Επιπλέον, για τη λικιριτίνη και την ισολικιριτίνη η καμπύλη ήταν γραμμική στο εύρος 0.5 - 200 ng mL⁻¹, ενώ για τη λικιριτιγενίνη και την ισολικιριτιγενίνη στο εύρος 0.25 - 100 ng mL⁻¹. Για τους τέσσερις αυτούς αναλύτες το LLOQ βρέθηκε να είναι 0.5 ng mL⁻¹ για τη λικιριτίνη και την ισολικιριτίνη και 0.25 ng mL⁻¹ για τη λικιριτιγενίνη και την ισολικιριτιγενίνη. Κρίνοντας από τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους (**Πίνακας 4.2**), είναι προφανές ότι η ισολικιριτιγενίνη είχε τον ταχύτερο χρόνο απορρόφησης με T_{max} στις 0.1 h ακολουθούμενη από την λικιριτιγενίνη με 0.2 h. Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός αποβολής για τη λικιριτιγενίνη ήταν βραδύτερος σε σύγκριση με τους άλλους, με t_{1/2} στις 6.8 h, ενώ η

λικιριτίνη και η ισολικιριτιγενίνη αποβάλλονταν ταχύτερα. Η υψηλότερη συγκέντρωση στο πλάσμα αουραιών παρατηρήθηκε για τη λικιριτίνη με C_{\max} στα 98 ng mL⁻¹, αντισταθμίζοντας τον υψηλό ρυθμό αποβολής $t_{1/2}$ στις 1.9 h [33]. Οι ενώσεις αυτές προσδιορίστηκαν σε άλλη δοκιμασία, χρησιμοποιώντας ESI (-) και MRM [34]. Σύμφωνα με την αναφορά, το LLOQ για τους εν λόγω αναλύτες βρέθηκε κάτω από 1 ng mL⁻¹ (0.17, 2.28, 0.23, 0.02 ug mL⁻¹ για την λικιριτίνη, την ισολικιριτίνη, την λικιριτιγενίνη και την ισολικιριτιγενίνη αντίστοιχα). Εξετάζοντας το φαρμακοκινητικό προφίλ κάθε αναλύτη (Πίνακας 4.2), η ισολικιριτίνη παρουσίασε την υψηλότερη από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα με C_{\max} στα 10160 ng mL⁻¹, ενώ η ισολικιριτιγενίνη είχε μόνο 280 ng mL⁻¹. Η λικιριτιγενίνη, παρά τη μέτρια βιοδιαθεσιμότητά της, παρουσίασε τον υψηλότερο ρυθμό απορρόφησης και τη χαμηλότερη αποβολή σύμφωνα με τις τιμές T_{\max} και $t_{1/2}$.

Η λιναρίνη ποσοτικοποιήθηκε ταυτόχρονα με τη ναρινγενίνη και τη φορμονονετίνη μετά τη χορήγηση του χαπιού Bushen Guchi, επίσης με LC-MS/MS. Στην συγκεκριμένη εργασία, η λιναρίνη προσδιορίστηκε με τη χρήση MRM και η μετάβαση ήταν m/z 591.2 → 283.2, με ESI (-). Όσον αφορά την ακρίβεια, εκφρασμένη ως σφάλμα (bias), ήταν πάνω από -11.25 %, καθιστώντας τη μέθοδο ακριβή (bias < 15 %). Η ακρίβεια (εντός και μεταξύ των ημερών) ήταν επίσης εντός των ορίων αποδοχής, με τιμές RSD (%) που κυμαίνονταν από 1.52 – 9.56 %. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2, οι τρεις αναλύτες απορροφήθηκαν γρήγορα με $T_{\max} \leq 1$ h, αλλά η φορμονονετίνη επέδειξε τον πιο αργό ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 12.18 h [35]. Αποδεκτές ήταν, επίσης, οι τιμές της ακρίβειας και της πιστότητας, όταν η λιναρίνη ποσοτικοποιήθηκε στο πλάσμα αουραιού με την ίδια μέθοδο και με τη χρήση βαρφαρίνης ως IS. Σύμφωνα με την εν λόγω εργασία, χρησιμοποιήθηκε ESI (+) και η μετάβαση της λιναρίνης ήταν m/z 593.2 → 285.2. Το κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού βρέθηκε να είναι 1 ng mL⁻¹. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική σε εύρος 1 - 1000 ng mL⁻¹. Στην περίπτωση αυτή, η λιναρίνη παρουσίασε πολύ γρήγορο ρυθμό απορρόφησης με T_{\max} στις 0.375 h, αλλά και πολύ γρήγορο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 0.72 h [36]. Μετά τη χορήγηση από του στόματος δόσης (0,5 mg kg⁻¹) πινοστροβίνης σε αουραιούς, η πινοστροβίνη προσδιορίστηκε με LC-MS/MS με την ισολικιριτιγενίνη να χρησιμοποιείται ως IS [37]. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, η ακρίβεια και η πιστότητα εντός και μεταξύ των ημερών, ως RSD, ήταν 93.2 – 104.3 % και 3.2 – 5.3 %, αντίστοιχα, στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (10, 100, 500 ng mL⁻¹). Η μέθοδος ήταν γραμμική εντός 10 - 1000 ng mL⁻¹ και το LLOQ για τον εν λόγω αναλύτη βρέθηκε να είναι 10 ng mL⁻¹. Όσον αφορά

το φαρμακοκινητικό της προφίλ, η πινοστροβίνη παρουσίασε μάλλον αργό ρυθμό απορρόφησης με T_{max} στις 4 ώρες και αργό ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 4.3 ώρες. Η 2''-Ο-γαλοϋλοϋπερίνη και υπεροσίδη, συστατικά του εκχυλίσματος *Pyrolacalliantha*, προσδιορίστηκαν με MRM σε λειτουργία ESI (-) [38]. Οι μεταβάσεις για αυτούς τους αναλύτες ήταν m/z 615.1 \rightarrow 301.0 για την 2''-Ο-γαλοϋλοϋπερίνη και m/z 463.1 \rightarrow 300.1 για την υπεροσίδη. Σύμφωνα με την ανάλυση, το LLOQ και για τις δύο ήταν 2 ng mL⁻¹ ενώ τα φαρμακοκινητικά τους προφίλ επέδειξαν μάλλον γρήγορο ρυθμό αποβολής μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.

Οι φλαβονόλες και οι φλαβανόλες είναι δύο άλλες κατηγορίες φλαβονοειδών. Οι φλαβονόλες διαφέρουν από τα φλαβονοειδή ως προς τη δομή τους, καθώς οι φλαβονόλες έχουν μια φαινολική ομάδα -OH. Χρησιμοποιώντας LC-MS/MS, προσδιορίστηκε ένας αριθμός φλαβονολών και φλαβανόλων, όπως η (-)-επιαφζελεχίνη, η αβικουλαρίνη, η ισοραμνετίνη-3-Ο-νεοεσπεριδοσίδη και η τυφανεοσίδη (3-Ο-γλυκοζίτες φλαβονολών) [22,39,40]. Η (-) - επιαφζελεχίνη βρέθηκε να έχει LLOQ στα 12.5 ng mL⁻¹, ενώ το εύρος συγκεντρώσεων 50 - 6000 ng mL⁻¹, αποδείχθηκε γραμμικό για τη μέθοδο αυτή. Επιπλέον, για την αβικουλαρίνη, την ισοραμνετίνη-3-Ο-νεοεσπεριδοσίδη και την τυφανεοσίδη, η μέθοδος έδειξε καλή γραμμικότητα στο εύρος 10 - 3000 ng mL⁻¹, 0.5 - 100 ng mL⁻¹ και 0.5 - 101 ng mL⁻¹, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε MRM, ενώ οι μεταβάσεις ήταν m/z 275 \rightarrow 139 για την επιαφζελεχίνη, 434.1 \rightarrow 301.3 για την αβικουλαρίνη, 623.19 \rightarrow 314.12 για την ισοραμνετίνη-3-Ο-νεοεσπεριδοσίδη και 769.17 \rightarrow 314.11 για την τυφανεοσίδη. Μια κύρια διαφορά που παρατηρείται στο φαρμακοκινητικό προφίλ της επιαφζελεχίνης, συγκρίνοντας τους δύο τύπους χορήγησης (IV και IP) είναι η C_{max} . Κατά τη διάρκεια της ενδοφλέβιας χορήγησης, η επιαφζελεχίνη εγχύθηκε απευθείας στο αίμα χωρίς κανένα φραγμό σε σύγκριση με την IP, οπότε η C_{max} ήταν μεγαλύτερη σε αυτή την περίπτωση. Η μέγιστη συγκέντρωση στην IP έγχυση παρατηρήθηκε μετά από 0.25 ώρες υποδεικνύοντας γρήγορο ρυθμό απορρόφησης, ενώ ο ρυθμός αποβολής ήταν αρκετά γρήγορος και για τους δύο τύπους χορήγησης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα φαρμακοκινητικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η χορήγηση IP είχε σχεδόν το ίδιο αποτέλεσμα με την ενδοφλέβια χορήγηση και επομένως θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω σε μελέτες *in vivo*. Όσον αφορά την αβικουλαρίνη, το φαρμακοκινητικό της προφίλ επικυρώθηκε σε αρουραίους, εφαρμόζοντας ενδοφλέβια έγχυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν γρήγορο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 0.75 ώρες με C_{max} που κυμαίνεται στα 2323 ng mL⁻¹ από αρχική δόση 5 mg kg⁻¹

αβικουλαρίνης. Τέλος, η ισοραμνετίνη-3-O-νεοεσπεριδοσίδη και η τυφανεοσίδη παρουσίασαν ταχεία απορρόφηση με T_{max} στις 0.3 ώρες, αλλά ο ρυθμός αποβολής ήταν επίσης αρκετά γρήγορος με $t_{1/2}$ στις 2.6 ώρες για την πρώτη και 2.3 ώρες για τη δεύτερη. Οι φλαβανόλες, η κατεχίνη και η επικατεχίνη, που προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα με τις άλλες ενώσεις του χαπιού Longhu Rendan προσδιορίστηκαν με τη χρήση εναλλασσόμενου τρόπου ESI, με τη μετάβασή τους στο m/z 289.1 \rightarrow 109.3 και για τις δύο [33]. Το LLOQ ήταν 1 ng mL⁻¹ και η μέθοδος έδειξε καλή γραμμικότητα στο εύρος 5 - 2000 ng mL⁻¹ και για τους δύο αναλύτες. Και οι δύο φλαβανόλες απορροφήθηκαν γρήγορα με T_{max} 0.4 h για την επικατεχίνη και 0.3 h για την κατεχίνη, αλλά παρουσίασαν βραδύτερο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 2.7 h και 3.3 h, αντίστοιχα. Η επικατεχίνη σε άλλη έκθεση, προσδιορίστηκε επίσης ποσοτικά ταυτόχρονα με τρεις άλλες φλαβανόλες, την επικατεχίνη-3-O-γαλλική, την επιγαλλοκατεχίνη και την επιγαλλοκατεχίνη-3-O-γαλλική [41]. Σύμφωνα με τις πληροφορίες που αναφέρονται στην ανάλυση, η μέθοδος παρουσίασε ικανοποιητική γραμμικότητα πάνω από το εύρος 10 - 5000 ng mL⁻¹, ενώ το LLOQ προσδιορίστηκε στα 10 ng mL⁻¹ για όλες τις ενώσεις. Χρησιμοποιήθηκε ESI (-) και παρακολούθηση προεπιλεγμένου ιόντος (SRM). Όλες οι κατεχίνες επέδειξαν γρήγορο ρυθμό απορρόφησης με T_{max} που κυμαίνεται από 0.6 - 0.8 ώρες μετά την ενδογαστρική χορήγηση, με την επιγαλλοκατεχίνη να παρουσιάζει τον βραδύτερο ρυθμό αποβολής.

Οι φλαβόνες και οι φλαβανόνες είναι επίσης δύο υποκατηγορίες των φλαβονοειδών. Για τις φλαβόνες και τις φλαβανόνες υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές για μελέτες με την χρήση LC-MS/MS. Η πινοσεμπρίνη, η ισοβιτεξίνη καθώς και η ναρινγενίνη (η οποία μελετήθηκε ταυτόχρονα με τη λιναρίνη και τη φορμονονετίνη) προσδιορίστηκαν σε ESI (-) με χρήση MRM [35,42,43]. Οι μεταβάσεις που παρατηρήθηκαν ήταν m/z 255.0 \rightarrow 213.1 για την πινοσεμπρίνη, 271.0 \rightarrow 150.9 για τη ναρινγενίνη και 431.0 \rightarrow 311.0 για την ισοβιτεξίνη. Ο προσδιορισμός όλων αυτών των αναλυτών έδειξε καλή γραμμικότητα (για την πινοσεμπρίνη εντός 1 - 400 ng mL⁻¹, για τη ναρινγενίνη εντός 1.07 - 502.5 ng mL⁻¹ και για την ισοβιτεξίνη εντός 0.01 - 2.5 ng mL⁻¹). Τα LLOQ προσδιορίστηκαν για την πινοσεμπρίνη και τη ναρινγενίνη σε 1 και 1.07 ng mL⁻¹, αντίστοιχα, ενώ για την ισοβιτεξίνη ήταν 0.5 ng mL⁻¹). Η πινοσεμπρίνη παρουσίασε πολύ γρήγορη απορρόφηση με T_{max} στις 0.46 h και γρήγορο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 0.79 h. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.2**, οι τρεις αναλύτες απορροφήθηκαν γρήγορα με $T_{max} \leq 1$ h, με την φορμονονετίνη να παρουσιάζει τον πιο αργό ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 12.18 h. Από την άλλη πλευρά, οι

αναλύτες ακεσετίνη, σκουτελαρίνη, 5,7-διμεθοξυφλαβόνη και νεβαντενσίνη προσδιορίστηκαν με τη χρήση MRM σε λειτουργία ESI (+) [44-47]. Οι μεταβάσεις τους ήταν m/z 285.3 \rightarrow 242.2, 463.2 \rightarrow 287.1, 283 \rightarrow 239 και 345.1 \rightarrow 315.3, αντίστοιχα. Το LLOQ ήταν 1 ng mL⁻¹ για την ακεσετίνη, 10 ng mL⁻¹ για τη σκουτελαρίνη, 2 ng mL⁻¹ για την 5,7-διμεθοξυφλαβόνη και 0.1 ng mL⁻¹ για τη νεβαντενσίνη. Οι καμπύλες βαθμονόμησης για αυτές τις ενώσεις ήταν γραμμικές για τις συγκεντρώσεις 1 - 1600 ng mL⁻¹, 10 - 5000 ng mL⁻¹, 2 - 1000 ng mL⁻¹ και 0.1 - 300 ng mL⁻¹, αντίστοιχα. Η ακεσετίνη, μετά την ενδοφλέβια χορήγηση δόσης 5 mg kg⁻¹ σε αρουραίους, έφθασε σε μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα στα 1134 ng mL⁻¹, αλλά η συγκέντρωση μειώθηκε πολύ γρήγορα με $t_{1/2}$ σε 1.48 h. Όπως αναφέρεται στην μελέτη αυτή, η ταχεία αποβολή της στο πλάσμα μπορεί να εξηγηθεί από την κατανομή της ακεσετίνης σε διάφορους ιστούς. Η σκουτελαρίνη παρουσίασε μέτριο ρυθμό απορρόφησης με T_{max} στις 4.67 h και μάλλον αργό ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 6.81 h. Η 5,7-διμεθοξυφλαβόνη η οποία χορηγήθηκε από το στόμα σε δόση 10 mg kg⁻¹, έφθασε σε συγκέντρωση C_{max} στο πλάσμα στα 879 ng mL⁻¹ και παρουσίασε μακρύ χρόνο ημιζωής αποβολής με $t_{1/2}$ στις 11.5 h. Η νεβαντενσίνη, παρά την αρχική από του στόματος δόση των 50 mg kg⁻¹, έφθασε σε μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα στα 58.4 ng mL⁻¹ με T_{max} που κυμαίνεται στις 4.8 h, υποδεικνύοντας μάλλον αργό ρυθμό απορρόφησης. Επίσης, η κουραρινόνη και η βαϊκαλίνη προσδιορίστηκαν ποσοτικά με LC-MS/MS, αλλά στην περίπτωση της κουραρινόνης χρησιμοποιήθηκε εναλλαγή του ESI και η μετάβαση ήταν m/z 437.0 \rightarrow 301.2, ενώ για τη βαϊκαλίνη που προσδιορίστηκε ταυτόχρονα με την γεντιοπικροσίδη, τη γενιποσίδη και τη σβερτιαμαρίνη, 447.00 \rightarrow 271.05. Στο εύρος 20 - 2000 ng mL⁻¹ για την κουραρινόνη και 10 - 500 ng mL⁻¹ για τη βαϊκαλίνη, η μέθοδος παρουσίασε καλή γραμμικότητα [28,48]. Η κουραρινόνη χορηγήθηκε ενδοφλεβίως σε δόση 10 mg kg⁻¹, εμφανίζοντας C_{max} στα 1668.01 ng mL⁻¹, αλλά παρουσίασε επίσης πολύ γρήγορο χρόνο ημιζωής αποβολής με $t_{1/2}$ στις 1.81 h. Η βαϊκαλίνη, από την άλλη πλευρά, είχε πολύ αργό ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 5.23 h, αλλά ο ρυθμός απορρόφησης ήταν γρήγορος με T_{max} περίπου στις 0.26 h.

Οι ισοφλαβόνες και οι ομοϊσοφλαβόνες είναι δύο άλλες υποκατηγορίες των φλαβονοειδών. Για τον προσδιορισμό της πουεραρίνης ταυτόχρονα με τη δαϊδζεΐνη, τη φορμονονετίνη, την πρωτοσαπανίνη Β και τη βραζιλινίνη, χρησιμοποιήθηκε MRM με ESI (-) [35,49,50]. Η μέθοδος έδειξε καλή γραμμικότητα σε όλες τις περιπτώσεις με LLOQ που ήταν στα 1.04 ng mL⁻¹ για τη φορμονονετίνη και 0.2 ng mL⁻¹ για την πουεραρίνη και τη

δαϊδζεΐνη. Για αυτούς τους αναλύτες, η μέθοδος παρουσίασε ικανοποιητική γραμμικότητα στο εύρος 0.2 - 100 ng mL⁻¹ για την πουεραρίνη και τη δαϊδζεΐνη, αλλά για τη φορμονονετίνη το εύρος ήταν υψηλότερο σε 1.04 - 487.5 ng mL⁻¹. Η πουεραρίνη και η δαϊδζεΐνη απορροφήθηκαν γρήγορα με T_{max} σε 1.18 h και 1.41 h αντίστοιχα, ενώ παρουσίασαν ενδιάμεσο ρυθμό αποβολής (Πίνακας 4.2). Η φορμονονετίνη παρουσίασε παρόμοιο φαρμακοκινητικό προφίλ όπως η πουεραρίνη με ταχεία απορρόφηση T_{max} σε 1 h και πολύ αργό ρυθμό αποβολής (t_{1/2} σε 12 h). Οι μεταβάσεις MRM για την πρωτοσαπανίνη B ήταν m/z 303.0 → 230.8, ενώ για τη βραζιλίνη 285.1 → 162.9. Η μέθοδος ήταν γραμμική στο εύρος 3 - 3000 ng mL⁻¹ και για τους δύο αναλύτες και LLOQ στα 3 ng mL⁻¹. Η πρωτοσαπανίνη B, σύμφωνα με τους συγγραφείς, παρουσίασε πολύ γρήγορο ρυθμό απορρόφησης με T_{max} στις 0.3 ώρες και μάλλον γρήγορο χρόνο ημιζωής αποβολής στις 2.49 ώρες, όταν χορηγήθηκε από το στόμα σε αρουραίους. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τη βραζιλίνη με γρήγορο ρυθμό απορρόφησης και αποβολής. Η νομπιλετίνη ποσοτικοποιήθηκε επίσης με την ίδια μέθοδο, αλλά σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε θετικός τρόπος ιοντισμού και η μετάβασή της ήταν m/z 403.2 → 373.0 με LLOQ 0.05 ng mL⁻¹. Το εύρος συγκέντρωσης στο οποίο η μέθοδος παρείχε καλή γραμμικότητα ήταν 0.05-51.98 ng mL⁻¹ [51]. Στον Πίνακα 4.2, παρουσιάζεται το φαρμακοκινητικό προφίλ της νομπιλετίνης. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της δια του στόματος και ενδοφλέβιας χορήγησης σε αρουραίους, όπου κατά την ενδοφλέβια χορήγηση η νομπιλετίνη παρουσίασε ταχύ ρυθμό αποβολής με t_{1/2} σε 1.5 ώρα. Αντίθετα, η από του στόματος χορήγηση παρουσίασε βραδύτερο ρυθμό αποβολής με t_{1/2} περίπου στις 4.7 h. Χρησιμοποιήθηκε εναλλαγή ESI στην περίπτωση του ταυτόχρονου προσδιορισμού των τριών ισοφλαβονών ονονίνης, φορμονονετίνης και βιοχανίνης A, όπου οι μεταβάσεις βρέθηκαν ως m/z 431.3 → 269.1, 267.1 → 252.2 και 283.2 → 268.2 αντίστοιχα. Σε αυτή την εργασία αναφέρθηκε ότι το γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων ήταν 1.6 - 320, 1.0 - 200 και 0.9 - 180 ng mL⁻¹ για την ονονίνη, τη φορμονονετίνη και τη βιοχανίνη A, αντίστοιχα [52]. Όπως βλέπουμε στον Πίνακα 4.2, η ταχύτερη C_{max} στο πλάσμα κατά την ενδογαστρική χορήγηση επιτεύχθηκε από τη βιοχανίνη A με T_{max} στις 0.89 h, ακολουθούμενη από τη φορμονονετίνη στις 1.33 h και την ονονίνη στις 1.92 h. Οι τρεις αναλύτες παρουσίασαν σχετικά μέτριο ρυθμό αποβολής με τη βιοχανίνη A να αποβάλλεται ταχύτερα. Η υπεροσίδη είναι ο 3-O-γαλακτοζίτης της κερκετίνης, που ανήκει στα φλαβονοειδή και προσδιορίστηκε στο πλάσμα του σκύλου

beagle με LC-MS/MS σε MRM υπό ESI (+) με τη μετάβαση για την υπεροσίδη στο m/z 464.4 \rightarrow 463.4 [53]. Η μέθοδος έδειξε ικανοποιητική γραμμικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων 10 - 5000 ng mL⁻¹ για την υπεροσίδη, ενώ το κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού για την υπεροσίδη ήταν 10 ng mL⁻¹. Η υπεροσίδη κατά την από του στόματος χορήγηση παρουσίασε T_{max} στις 2.17 h, υποδεικνύοντας μέτριο ρυθμό απορρόφησης (**Πίνακας 4.2**).

Πίνακας 4.2. Παράγωγα της τάξης των φλαβονοειδών και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ	ΜΗΤΡΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ / ΠΛΑΣΜΑ	C _{max} (ng mL ⁻¹)	AUC _{t-∞} (ng h mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
κατεχίνη	χάπια Longhu Rendan	i.g. / αρουραίου	43.7 ± 50.1	84.2 ± 56.9	0.3 ± 0.2	3.3 ± 0.4	1
επικατεχίνη			103.1 ± 69.5	214.9 ± 56.8	0.4 ± 0.2	2.7 ± 1.0	
λικιριτίνη			98.8 ± 83.2	102.7 ± 29.9	0.3 ± 0.2	1.9 ± 0.5	
ισολικιριτίνη			13.0 ± 8.0	13.3 ± 6.5	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.4	
λικιριτιγενίνη			3.9 ± 2.3	35.3 ± 14.1	0.2 ± 0.2	6.8 ± 3.2	
ισολικιριτιγενίνη			2.5 ± 1.4	19.7 ± 8.8	0.1 ± 0.0	3.6 ± 2.7	
πιπερίνη			45.9 ± 19.3	227.8 ± 70.8	0.4 ± 0.1	5.3 ± 0.6	
γλυκυρρητινικό οξύ [33]			1236.7 ± 511.3	25710 ± 13393	12.0 ± 0.0	6.7 ± 4.5	
πινοσεμπρίνη [42]	pinocembrin σκόνη σκευάσματος διαλυμένη σε 100 mL φυσιολογικού ορού	i.v. / ανθρώπινο	277.0 ± 58.7	172.3 ± 25.6	0.46 ± 0.06	0.79 ± 0.23	1
επικατεχίνη	εκχύλισμα green tea (Sunphenon BG3)	i.v. και i.g. / αρουραίου		1470 ± 170 (i.v.)		0.9 ± 0.2 (i.v.)	10
επικατεχίνη-3-ο-γαλλική			755 ± 191 (i.g.)	1573 ± 217 (i.g.)	0.8 ± 0.1 (i.g.)	2.2 ± 0.4 (i.g.)	
επιγαλλοκατεχίνη			120 ± 32 (i.g.)	1450 ± 390 (i.v.)	0.6 ± 0.1 (i.g.)	1.5 ± 0.3 (i.v.)	
επιγαλλοκατεχίνη			1400 ± 404 (i.g.)	107 ± 37 (i.g.)	0.8 ± 0.1 (i.g.)	0.7 ± 0.2 (i.g.)	
-3-ο-γαλλική [41]			1217 ± 408 (i.g.)	3940 ± 1200 (i.v.)	0.7 ± 0.1 (i.g.)	1.3 ± 0.2 (i.v.)	
				13000 ± 2320 (i.v.)		4.4 ± 0.1 (i.g.)	
επιαφζελεχίνη [39]	epiafzelechin ενέσιμο διάλυμα <i>Chrysanthemi indici flos</i> (linarin), <i>Drynariae rhizome</i> (formononetin),	i.v. και i.p. / αρουραίου	10.6x10 ³ (i.v.) 6.0x10 ³ (i.p.)	2280 (i.v.) 2498.33 (i.p.)	0.25 (i.p.)	0.65 (i.v.) 1.68 (i.p)	12.5
λιναρίνη	p.o. / αρουραίου		154.35	563.60	0.5	4.78	0,64
ναρινγενίνη			65.50	277.91	0.5	5.35	1,07
φορμονονετίνη [35]			56.85	404,79	1	12.18	1,04

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

	<i>Spatholobi caulis</i> (ναρινγενίνης) συστατικά του Bushen Guchi Pill						
ακεσετίνη [44]	διάλυμα της ακεσετίνης	i.v. / αρουραίου	1334.9 ± 211.6	1120.5 ± 146.6	-	1.48 ± 0.53	1
αβικουλαρίνη [40]	διάλυμα αβικουλαρίνης	i.v. / αρουραίου	2323.8 ± 423.7	2860.1 ± 168.3	-	0.75 ± 0.09	10
πουεραρίνη και ο μεταβολίτης της δαϊτζεϊνή [49]	σκόνη εκχύλισματος Gegen	p.o. / ανθρώπινο	11.07 2.10	85.90 13.63	1.18 1.41	4.48 3.37	0.2
σκουτελαρίνη τετραυδρο- παλμιτίνη [45]	Deng-yan κόκκοι αποτελούμενοι από <i>Herba Erigerontis</i> Breviscari (σκουτελαρίνη) και <i>Rhizoma Corydalis</i> Yanhusuo (τετραυδρο- παλμιτίνη)	p.o. / αρουραίου	1172.91 ± 144.45 3068.56 ± 146.82	15048.67 ± 1248.50 24197.28 ± 2117.86	4.67 ± 1.03 0.58 ± 0.13	6.81 ± 0.99 7.93 ± 0.77	10
κουραρινόνη [48]	διάλυμα κουραρινόνης	i.v. / αρουραίου	1668.01 ± 101.04	1595.30 ± 102.38	-	1.81 ± 1.29	20
τυφανεοσίδη ισοραμετίνη-3- O- νεοεσπερίδοσίδη [22]	εκχύλισμα από <i>Pollen Typhae</i>	p.o. / αρουραίου	3.2 ± 1.1 17.5 ± 2.5	7.2 ± 1.2 36.5 ± 11.7	0.3 ± 0.1 0.3 ± 0.1	2.3 ± 0.8 2.6 ± 0.6	0.506 0.502
γεντιοπικροσίδη γενιποσίδη βαϊκαλίνη σβερτιαμαρίνη [28]	LDXGT (Long- Dan-Xie-Gan- Tang) συνταγή που περιέχει 10 φυτικά φαρμακευτικά	p.o. / αρουραίου	5767 ± 412 1164 ± 144 2008 ± 265 13.0 ± 0.5	23616 ± 1396.66 5033.33 ± 430 12550 ± 1436.66 41.66 ± 1.66	1 ± 0.11 0.916 ± 0.21 0.263 ± 0.15 1.625 ± 0.24	2.12 ± 0.12 2.8 ± 0.45 5.23 ± 0.98 3.13 ± 0.46	10 (βαϊκαλίνη)

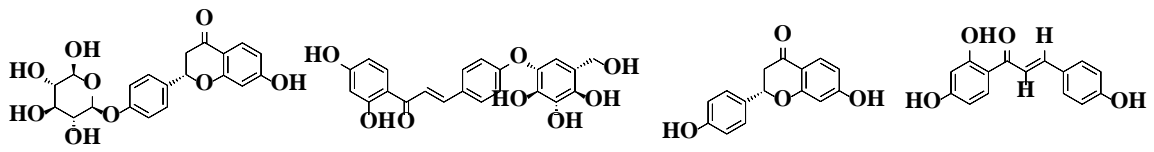
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

	εκχυλίσματα από φυτά						
ισοβιτεξίνη [43]	εκχυλίσματα από φύλλα των <i>Santalum album L.</i> , <i>Herba Desmodii Styracifolii</i> και <i>Swertia pseudochinensis</i>	i.v. / αρουραίου	-	11389.84 ± 5053.69	-	1.05 ± 0.325	0.5
5,7-διμεθοξυφλαβόνη [46]	5,7-dimethoxyflavone	p.o. / αρουραίου	879	449	-	11.5	2
λιναρίνη [36]	εκχύλισμα από το φυτό <i>Flos chrysanthemum indicum</i>	i.m. / αρουραίου	48.0 ± 18.7	51.3 ± 25.5	0.375 ± 0.1	0.720 ± 0.6	1
υπεροσίδη 2''-Ο-γαλοϋλοϋπερίνη [38]	εκχύλισμα από το φυτό <i>P. calliantha</i>	i.v. / αρουραίου	6095.22 ± 992.35 5863.01 ± 772.85	1874.62 ± 174.12 2048.57 ± 278.52	-	1.209 ± 0.571 0.918 ± 0.147	2 2
πρωτοσαπανίνη Β βραζιλινίνη [50]	εκχύλισμα από το φυτό <i>Sappan Lignum</i>	p.o. / αρουραίου	239.2 ± 57.9 1820 ± 257	518.8 ± 98.2 1796 ± 385	0.3067 ± 0.23 0.3337 ± 0.13	2.49 ± 0.54 2.21 ± 0.84	-
νομπιλετίνη [51]	διάλυμα νομπιλετίνης	p.o. και i.v. / αρουραίου	489 ± 64.7 (p.o.)	887 ± 111 (p.o.) 495 ± 125 (i.v.)	0.25 ± 0.00 (p.o.)	1.51 ± 0.61 (i.v.) 4.75 ± 0.57 (p.o.)	0.05
λικιριτίνη ισολικιριτίνη λικιριτιγενίνη ισολικιριτιγενίνη [34]	<i>Glycyrrhiza flavones</i>	p.o. / αρουραίου	2690 ± 40 10160 ± 20 2830 ± 20 280 ± 10	16970 ± 430 69200 ± 5240 14830 ± 110 2100 ± 90	2.02 ± 0.23 1.97 ± 0.20 0.48 ± 0.02 1.93 ± 0.36	2.27 ± 0.53 2.38 ± 0.80 4.26 ± 0.16 3.04 ± 0.22	170 2280 230 20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ονονίνη	εκχύλισμα από το		36.9 ± 7.48	301 ± 107	1.92 ± 0.59	6.75 ± 2.26	1.6
φορμονονετίνη	φυτό <i>Trifolium</i>	i.g. / αρουραίου	94.0 ± 22.9	568 ± 203	1.33 ± 0.41	5.50 ± 1.58	1.0
βιοχανίνη Α [52]	<i>pratense</i>		102 ± 17.9	414 ± 163	0.89 ± 0.42	4.07 ± 1.36	0.9
νεβαντεσίνη [47]	νεβαντεσίνη	p.o. / αρουραίου	58.4 ± 10.3	494.0 ± 93.4	6.5 ± 1.6	4.8 ± 1.3	0,1
πινοσεμπρίνη [37]	πινοσεμπρίνη	p.o. / αρουραίου	615.35 ± 32.89	-	4 ± 0.18	4.34 ± 0.24	10
υπεροσίδη [53]	εκχύλισμα από το φυτό <i>hypericum</i> <i>perforatum</i>	p.o. / αρουραίου	4063.87 ± 360.91	29215.12 ± 1355.75	2.17 ± 0.41	-	10

μήτρα: προέλευση της ένωσης; χορήγηση: τύπος χορήγησης του φαρμάκου; πλάσμα: τύπος πλάσματος που αναλύεται; AUCt-∞: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου; Cmax: μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου; Tmax: χρόνος επίτευξης της Cmax; t½: ο χρόνος για να φθάσει το φάρμακο στο ήμισυ της αρχικής του συγκέντρωσης; p.o.: χορήγηση από το στόμα; i.v.: ενδοφλέβια χορήγηση; i.g.: ενδογαστρική χορήγηση; i.m.: ενδομυϊκή χορήγηση; i.p.: ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση.

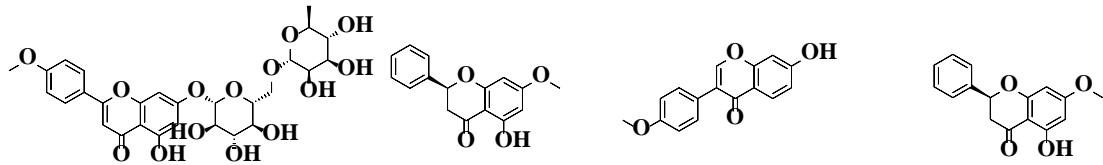


liquiritin

isoliquiritin

liquiritigenin

isoliquiritigenin

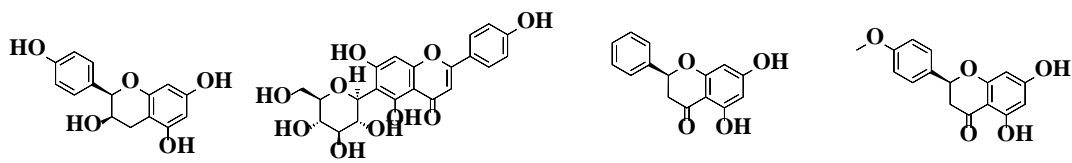


linarin

naringenin

formononetin

pinostrobin

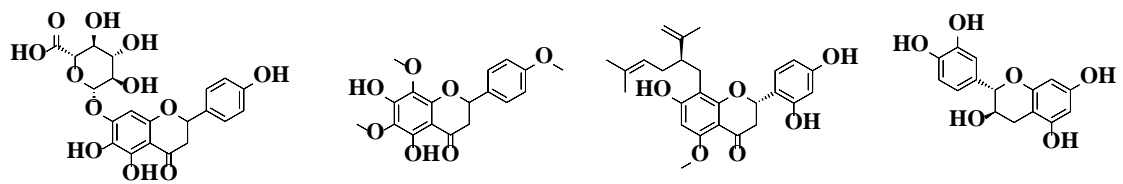


(-)-epiafzelechin

isovitexin

pinocembrin

acacetin

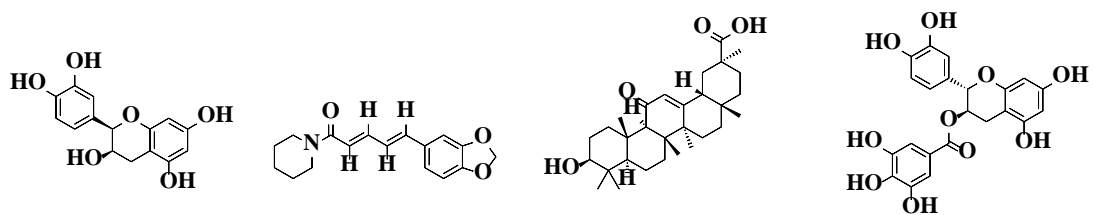


scutellarin

nevodensin

kurarinone

(-)-catechin

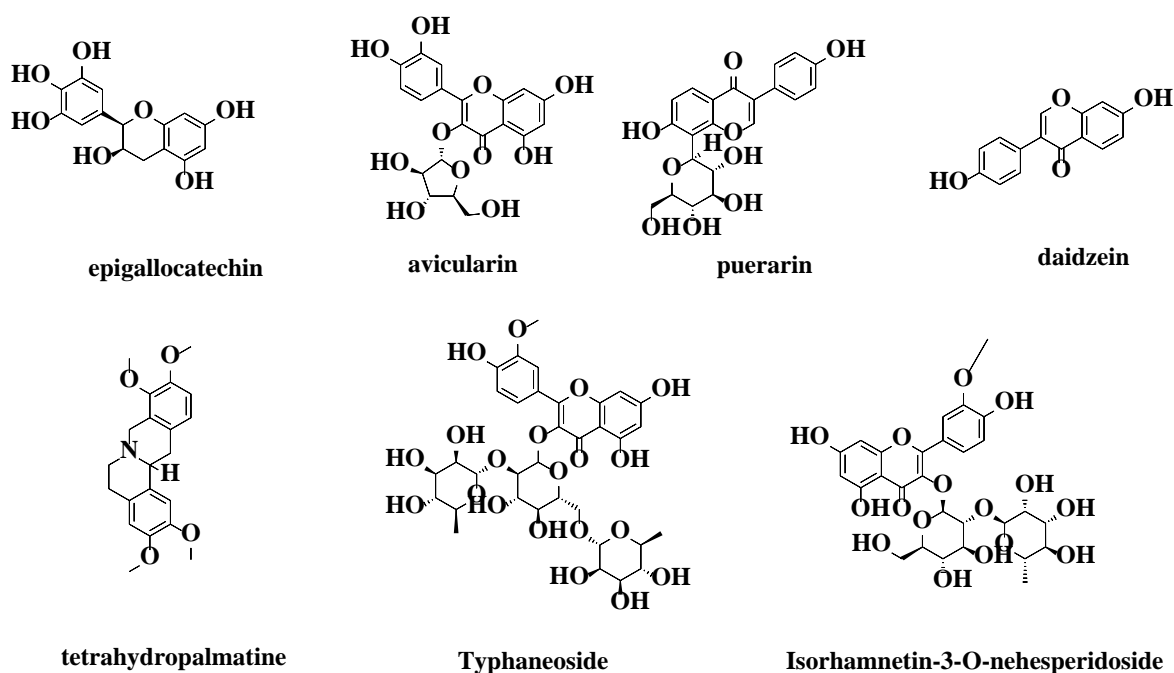


epicatechin

piperine

glycyrrhetic acid

epicatechin-3-O-gallate



Εικόνα 4.2. Χημικές δομές διάφορων φλαβονοειδών.

4.2.3. Τερπένια

Τα τερπένια είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων με συγκεκριμένη δομή, οι οποίες βρίσκονται σε πολλά φυτά. Χαρακτηρίζονται από πολύ έντονη οσμή, με αποτέλεσμα να λειτουργούν σαν "προστάτες" για τα φυτά στα οποία ανήκουν, εμποδίζοντας τα ζώα να τα καταναλώσουν. Τα διτερπένια, τα τριτερπένια και τα σесκιτερπένια είναι κατηγορίες της κύριας ομάδας των τερπενίων. Λόγω του γεγονότος ότι τα τερπένια είναι τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων, βρίσκουν πολλές εφαρμογές, όπως στη βιομηχανία αρωμάτων αλλά και στην ιατρική. Ορισμένες από τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες περιλαμβάνουν αντι-καρκινικές, αντι-οξειδωτικές, αντι-μικροβιακές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις [54-57]. Η Εικόνα 4.3 απεικονίζει τις δομές των διαφόρων τερπενίων που αναλύονται σε αυτή την ενότητα, ενώ οι παράμετροι βιοδιαθεσιμότητας τους αναφέρονται στον Πίνακα 4.3.

Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες στις οποίες τα τερπένια έχουν ποσοτικοποιηθεί με τη χρήση LC-MS/MS και πιο συγκεκριμένα τα διτερπένια και τα τριτερπένια. Το ψευδολαρικό οξύ, η λελαμίνη και η τζολκινολίδη Β είναι τρία διτερπένια που προσδιορίστηκαν με LC-MS/MS [58-60]. Η μέθοδος έδειξε αποδεκτές τιμές ακρίβειας και πιστότητας για τα τρία διτερπένια, καθώς ήταν κάτω από το όριο του $\pm 15\%$. Το LLOQ

προσδιορίστηκε ως 0.86 ng mL^{-1} για το ψευδολαρικό οξύ, 10 ng mL^{-1} για τη λελαμίνη και 6.50 ng mL^{-1} για την τζολκινολίδη B. Η μέθοδος για τους τρεις αυτούς αναλύτες παρουσίασε καλή γραμμικότητα σε εύρος συγκεντρώσεων $0.86 - 288 \text{ ng mL}^{-1}$ για το ψευδολαρικό οξύ, $10 - 3000 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη λελαμίνη και $6.5 - 2600 \text{ ng mL}^{-1}$ για την τζολκινολίδη B. Το ψευδολαρικό οξύ και η λελαμίνη προσδιορίστηκαν με τη χρήση MRM, ενώ για την τζολκινολίδη B χρησιμοποιήθηκε SRM. Χρησιμοποιήθηκε ESI (-) για το ψευδολαρικό οξύ και ESI (+) για τη λελαμίνη και την τζολκινολίδη B, με τις κύριες μεταβάσεις τους να είναι $m/z 431.4 \rightarrow 327.4$ για το ψευδολαρικό οξύ, $286.4 \rightarrow 173.2$ για τη λελαμίνη και $331.2 \rightarrow 165.1$ για τη τζολκινολίδη B. Το ψευδολαρικό οξύ αποβλήθηκε ταχύτερα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα με $t_{1/2}$ στις 0.27 h όταν χορηγήθηκε δόση 2 mg kg^{-1} . Από την άλλη πλευρά, η λελαμίνη επέδειξε τον βραδύτερο ρυθμό αποβολής, με τιμή $t_{1/2}$ στις 5.7 h . Όσον αφορά τον ρυθμό απορρόφησης, δεν υπήρχαν διαθέσιμες τιμές T_{\max} για την τζολκινολίδη B και το ψευδολαρικό οξύ B, αλλά όσον αφορά τη λελαμίνη, απορροφήθηκε ταχύτερα υπό ενδοφλέβια χορήγηση από ό,τι με χορήγηση από το στόματος.

Ορισμένα τριτερπένια που επίσης ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο αυτή είναι το ασιατικό οξύ και η πριστιμερίνη [61,62]. Το ασιατικό οξύ προσδιορίστηκε με τη χρήση SRM με ESI (-). Η μέθοδος έδειξε πολύ καλή γραμμικότητα ($r^2 = 0.9994$) και το LLOQ για το ασιατικό οξύ ήταν 51.25 ng mL^{-1} . Όσον αφορά την πριστιμερίνη, προσδιορίστηκε με χρήση MRM με ESI (+). Η μετάβαση αυτής της ένωσης ήταν $m/z 465.3 \rightarrow 201.1$. Η γραμμικότητα βρέθηκε πολύ καλή στο εύρος $1 - 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ και το LLOQ εκτιμήθηκε σε 1 ng mL^{-1} . Και για τους δύο αναλύτες οι τιμές ακρίβειας και πιστότητας της μεθόδου ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ($< 15 \%$). Αξιολογώντας τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3**, το ασιατικό οξύ παρουσίασε την ταχύτερη απορρόφηση όταν χορηγήθηκε ενδοφλεβίως με T_{\max} στις 0.038 h . Η πριστιμερίνη είχε τον βραδύτερο ρυθμό απορρόφησης με την τιμή T_{\max} στις 2 h . Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός αποβολής ήταν επίσης ταχύτερος για το ασιατικό οξύ από την πριστιμερίνη και συγκεκριμένα $t_{1/2}$ στις 0.35 h (ενδοφλέβια) και 0.64 h (ενδογαστρική) ενώ η $t_{1/2}$ για την πριστιμερίνη ήταν 1.46 h όταν χορηγήθηκε ενδοφλεβίως και 1.84 h όταν χορηγήθηκε από το στόμα.

Τα σεσκιτερπένια, όπως η ευπαλινολίδη A και B, μια κατηγορία τερπενίων, ποσοτικοποιήθηκαν με LC-MS/MS μαζί με την υπεροσίδη [63]. Σύμφωνα με την εργασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε MRM με ESI (+). Οι μεταβάσεις που καταγράφηκαν ήταν $m/z 480.2 \rightarrow 181.1$, $480.2 \rightarrow 181.1$ και $463.2 \rightarrow 300.1$ για την ευπαλινολίδη A, B και την υπεροσίδη,

αντίστοιχα. Επιτεύχθηκε ικανοποιητική γραμμικότητα εντός του εύρους $1.28 - 640 \text{ ng mL}^{-1}$ για την ευπαλινολίδη Α, $1.98 - 990 \text{ ng mL}^{-1}$ για την ευπαλινολίδη Β και $2 - 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ για την υπεροσίδη, ενώ το LLOQ ήταν $1.28, 1.98$ και 2 ng mL^{-1} , αντίστοιχα. Εξετάζοντας τα φαρμακοκινητικά τους προφίλ στον **Πίνακα 4.3**, και οι τρεις αναλύτες παρουσίασαν ταχεία απορρόφηση στο πλάσμα με $T_{\max} \leq 2 \text{ h}$. Η υπεροσίδη παρουσίασε την υψηλότερη C_{\max} από τους τρεις αναλυτές, σε κάθε επίπεδο δόσης που εξετάστηκαν.

Τα τερπενοειδή είναι μια άλλη κατηγορία τερπενίων που απαντώνται επίσης με την ονομασία ισοπρένια. Η φυτολακκαγενίνη, η ανδρογραφολίδη, η δεϋδροανδρογραφολίδη, η νεοανδρογραφολίδη, η τενοιοφολίνη και η διλομπαλίδη είναι ορισμένα τερπενοειδή που μελετήθηκαν με LC-MS/MS [64-67]. Εκτός από τη διλομπαλίδη, το οποίο εξετάστηκε με SRM, όλες οι άλλες ενώσεις προσδιορίστηκαν με τη χρήση MRM. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, η φυτολακκαγενίνη και η διλομπαλίδη ανιχνεύθηκαν με ESI (+) με μεταβάσεις m/z $533.2 \rightarrow 515.3$ για τη φυτολακκαγενίνη και $325 \rightarrow 163$ για τη διλομπαλίδη. Από την άλλη πλευρά, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανδρογραφολίδης, της δεϋδροανδρογραφολίδης, της νεοανδρογραφολίδης και της τενοιοφολίνης χρησιμοποιήθηκε ESI (-). Για την ανδρογραφολίδη, τη δεϋδροανδρογραφολίδη και τη νεοανδρογραφολίδη οι μεταβάσεις ήταν m/z $348.8 \rightarrow 286.9$, $330.9 \rightarrow 107.9$ και $479.1 \rightarrow 160.8$, αντίστοιχα. Επίσης, η μετάβαση για την τενοιοφολίνη ήταν m/z $679.4 \rightarrow 455.4$. Όλες οι εφαρμογές της μεθόδου LC-MS/MS στα τερπενοειδή έδειξαν όχι μόνο αποδεκτές τιμές ακρίβειας και πιστότητας, αλλά και καλή γραμμικότητα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το εύρος ήταν $20 - 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη φυτολακκαγενίνη. Για τους τρεις αναλυτές που προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα, το εύρος ήταν $0.5 - 250 \text{ ng mL}^{-1}$ για την ανδρογραφολίδη, $1 - 500 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη δεϋδροανδρογραφολίδη και $2 - 100 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη νεοανδρογραφολίδη. Για τη διλομπαλίδη, η μέθοδος ήταν γραμμική για συγκέντρωση $5.0 - 5000 \text{ ng mL}^{-1}$. Το LLOQ για τη φυτολακκαγενίνη ήταν 20 ng mL^{-1} , για την ανδρογραφολίδη, τη δεϋδροανδρογραφολίδη, τη νεοανδρογραφολίδη, $0.50, 1, 0.20 \text{ ng mL}^{-1}$ αντίστοιχα, ενώ για την τενοιοφολίνη 0.5 ng mL^{-1} και για τη διλομπαλίδη 5 ng mL^{-1} . Σύμφωνα με τα δεδομένα του **Πίνακα 4.3** η διλομπαλίδη είχε την ταχύτερη απορρόφηση σε αντίθεση με τις άλλες σύνθετες ουσίες με την τιμή T_{\max} στις 0.46 ώρες όταν χορηγήθηκε δόση 28 mg kg^{-1} , σχεδόν παρόμοια με την τενοιοφολίνη. Η ανδρογραφολίδη, από την άλλη πλευρά, παρουσίασε βραδύτερη απορρόφηση σε αντίθεση με τις άλλες ενώσεις, όπως φαίνεται από την τιμή T_{\max} στις 1.30 h . Στην παρούσα εργασία, η δεϋδροανδρογραφολίδη και η νεοανδρογραφολίδη

που προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα με την ανδρογραφολίδη παρουσίασαν λίγο ταχύτερη απορρόφηση με T_{max} στις 1.30 h και 1.15 h, αντίστοιχα. Η διλομπαλίδη είχε όχι μόνο την ταχύτερη απορρόφηση, αλλά και τον ταχύτερο ρυθμό αποβολής με τιμή $t_{1/2}$ στις 0.83 h, αλλά αυτή τη φορά σε δόση 7 mg kg^{-1} . Μεταξύ αυτών των ενώσεων, η δεϋδροανδρογραφολίδη είχε βραδύτερο ρυθμό αποβολής, με τιμή $t_{1/2}$ στις 3.13 h.

Τα τριτερπενοειδή είναι άλλη μια υποκατηγορία τερπενίων τα οποία ονομάζονται και λειτουργικά τριτερπένια. Η 3, 29-διβενζοϋλοραρουνιτριόλη είναι ένα τριτερπενοειδές που ποσοτικοποιήθηκε με LC-MS/MS [68]. Προσδιορίστηκε με τη χρήση SRM και η μετάβαση για αυτόν τον αναλύτη ήταν m/z 684.7 \rightarrow 527.7. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η 3, 29-διβενζοϋλο-ραρουνιτριόλη παρουσίασε LLOQ στα 0.125 ng mL^{-1} , ενώ η καμπύλη βαθμονόμησης επέδειξε ικανοποιητική γραμμικότητα εντός του εύρους $0.125 - 50 \text{ ng mL}^{-1}$. Η 3, 29-διβενζοϋλο-ραρουνιτριόλη, παρουσίασε τον βραδύτερο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 4.8 h και μέγιστη συγκέντρωση στις 1.39 h. Η κοστουνολίδη και η δεϋδροκοστουσλακτόνη είναι δύο τερπενοειδή που ανήκουν στην κατηγορία των σεσκιτερπενικών λακτονών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη χρήση MRM σε ESI (+) με μεταβάσεις m/z 233 \rightarrow 187 για την κοστουνολίδη και 231 \rightarrow 185 για τη δεϋδροκοστουσλακτόνη. Οι καμπύλες βαθμονόμησης βρέθηκαν γραμμικές στο εύρος συγκεντρώσεων $0.7 - 769.7 \text{ ng mL}^{-1}$ για την κοστουνολίδη και $0.9 - 956 \text{ ng mL}^{-1}$ για τη δεϋδροκοστουσλακτόνη. Τα φαρμακοκινητικά τους προφίλ έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά μετά από του στόματος χορήγηση των δύο αναλυτών (Πίνακας 4.3) με T_{max} στις 10 h για την κοστουνολίδη και 12 h για την δεϋδροκοστουσλακτόνη. Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός αποβολής ήταν επίσης παρόμοιος με $t_{1/2}$ στις 5.5 h και 4.3 h αντίστοιχα [69].

Οι βακκενολίδες είναι μια κατηγορία σεσκιτερπενίων με χαρακτηριστική και αρκετά σπάνια δομή. Η βακκενολίδη D ποσοτικοποιήθηκε στο πλάσμα αρουραίου με τη χρήση LC-MS/MS [70]. Το εύρος βαθμονόμησης ήταν γραμμικό στο εύρος $1 - 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ με LLOQ που καθορίστηκε σε 1 ng mL^{-1} στο πλάσμα. Για τα πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε MRM υπό ESI (+) με μετάβαση της βακκενολίδης D στο m/z 426.2 \rightarrow 231.3. Επιπλέον, η βακκενολίδη D με την από του στόματος χορήγηση, παρουσίασε πολύ υψηλό ρυθμό απορρόφησης με T_{max} στις 0.25 h και πολύ αργό ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 11.8 h. Το γλυκυρρητινικό οξύ, ένα τριτερπένιο, προσδιορίστηκε ως παράγωγο του χαπιού Longhu Rendan, μαζί με άλλα συστατικά [33]. Ποσοτικοποιήθηκε με LC-MS/MS σε λειτουργία SRM και ESI (+) με κύρια μετάβαση στο m/z 471.3 \rightarrow 189.2. Το LLOQ ήταν

0.5 ng mL⁻¹ και η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική στο εύρος 0.5 - 200 ng mL⁻¹. Μετά την ενδογαστρική χορήγηση χαπιού Longhu Rendan σε δόση 0.92 g kg⁻¹, το γλυκυρρητινικό οξύ είχε πολύ αργό ρυθμό απορρόφησης με T_{max} στις 12 ώρες και αρκετά αργό ρυθμό αποβολής με t_{1/2} στις 6.7 h. Η λιμονίνη, ένα παράγωγο τριτερπενίου της ομάδας των λιμονοειδών, προσδιορίστηκε επίσης με LC-MS/MS στα ανθρώπινα ούρα [71]. Η μετάβαση για τη λιμονίνη ήταν m/z 471.3 → 161.2 και ανιχνεύθηκε με MRM χρησιμοποιώντας ESI (+). Η ανάλυση ήταν γραμμική στο εύρος συγκεντρώσεων 0.0783 - 10 ng mL⁻¹ σε ανθρώπινα ούρα και το LLOQ ήταν 0.0783 ng mL⁻¹. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η λιμονίνη ήταν ανιχνεύσιμη στα ούρα έως και 36 ώρες..

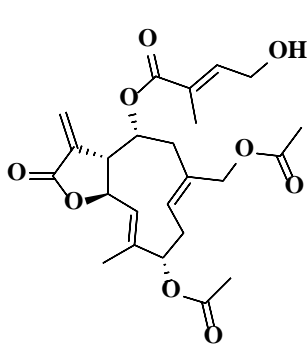
Πίνακας 4.3. Ενώσεις της τάξεως των τερπενίων και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ	ΜΗΤΡΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ / ΠΛΑΣΜΑ	C _{max} (ng mL ⁻¹)	AUC _{t-∞} (ng h mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
μπεργκενίνη [17]	μπεργκενίνη	p.o. και i.v. / αρουραίου	394.2 (p.o.) 1.176 (i.v.)	0.766 (p.o.) 0.482 (i.v.)	0.5 (p.o.) 0.038 (i.v.)	0.348 (i.v.) 0.642 (i.g.)	51.25
φυτολακκαγενίνη [66]	διάλυμα φυτολακκαγενίνης	i.v. / αρουραίου	-	5999 ± 3373	-	1.4 ± 0.9	20
πριστιμερίνη [61]	πριστιμερίνη	p.o. και i.v. / αρουραίου	(243.66 ± 20.18) x10 ³ (i.v.) (46.8 ± 3.94) x10 ³ (p.o.)	1063.04 ± 199.99 (i.v.) 302.11 ± 47.70 (p.o.)	2.0 ± 0.32 (p.o.)	1.46 ± 0.35 (i.v.) 1.84 ± 0.42 (p.o.)	1
ανδρογραφολίδη (AP)	εκχύλισμα από <i>Andrographis paniculata</i>	p.o. / σκόλου	209.40 ± 64.4	525.29 ± 196.39	1.30 ± 0.57	2.08 ± 0.99	0.50
δεϋδρογραφολίδη (DP)			7.68 ± 2.32	27.92 ± 8.49	1.15 ± 0.49	3.13 ± 1.19	1.00
νεοανδρογραφολίδη (NP) [67]			43.94 ± 9.62	79.35 ± 18.55	1.05 ± 0.72	1.07 ± 0.38	0.20
Ψευδολαρικό οξύ B [58]	ψευδολαρικό οξύ	i.v./ αρουραίου	22.8 ± 5.2 41.5 ± 5.3 75 ± 10.5 (σε 2, 4, 8 mg/kg)	8.07 ± 1.90 16.32 ± 2.82 31.65 ± 5.22 (σε 2, 4, 8 mg/kg)	-	0.27 ± 0.09 0.5 ± 0.23 0.46 ± 0.09 (σε 2.0, 4.0, 8.0 mg/kg)	0.86
τενουϊφολίνη [64]	καθαρή τενουϊφολίνη	p.o. και i.v. / αρουραίου	12.55 ± 3.43 (p.o.)	22.06 ± 7.33 (p.o.) 2487.46 ± 652.87 (i.v.)	0.46 ± 0.40 (p.o.)	1.80 ± 0.39 (p.o.) 1.41 ± 0.54 (i.v.)	0.5
διλιμπαλίδη [65]	εκχύλισμα από φύλλα <i>Ginkgo biloba</i>	i.g. / αρουραίου	2324 ± 250 4061 ± 469 5753 ± 1100 (σε 7, 14, 28 mg/kg)	(4.57 ± 0.63) x10 ³ (9.41 ± 0.97) x10 ³ (12.75 ± 2.15) x10 ³ (σε 7, 14, 28 mg/kg)	0.55 ± 0.28 0.76 ± 0.25 0.46 ± 0.16 (σε 7, 14, 28 mg/kg)	0.83 ± 0.1 1.03 ± 0.23 1.17 ± 0.4 (σε 7, 14, 28 mg/kg)	5.0
λελαμίνη [60]	λελαμίνη διαλυμένη σε αλατόνερο	p.o. και i.v. / αρουραίου	(2.2 ± 0.5) x10 ³ (i.v.) 0.57 x10 ³ (p.o.)	23.33 ± 3.33 (i.v.) 83.33 ± 8.33 (p.o.)	0.083 (i.v.) 4.7 ± 0.9 (p.o.)	1.2 ± 0.1 (i.v.) 5.7 ± 0.8 (p.o.)	10
τζολκινόλιδη B [59]	εκχύλισμα <i>Euphorbia fischeriana</i>	i.v. / αρουραίου	739.5 ± 78.9 2158.4 ± 158.8 6591.7 ± 721.1	819.2 ± 253.0 2136.3 ± 316.7 6562.4 ± 1153.9	-	3.30 ± 1.90 2.71 ± 0.95 3.83 ± 2.32 (at	6.50

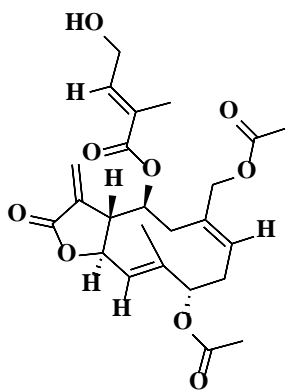
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

			(at 1.09, 3.27, 9.81 mg/kg)	(at 1.09, 3.27,9.81 mg/kg)		1.09, 3.27, 9.81 mg/kg)	
κοστουνολίδη (Co)	εκχύλισμα (<i>Radix Aucklandiae</i>)	p.o. / αρουραίου	19.84	5.147	10.46	5.54 ± 0.81	0.7
δεϋδροκοστουσουλα κτόνη (De) [69]			493.00	131.408	12.39	4.32 ± 0.71	0.9
βακκενολίδη D [70]	βακκενολίδη D	p.o. και i.v. / αρουραίου	191 ± 63 (i.v.) 10.1 ± 9.8 (p.o.)	309 ± 102 (i.v.) 98.3 ± 20.2 (p.o.)	0.083 (i.v.) 0.25 (p.o.)	8.79 ± 0.63 (i.v.) 11.8 ± 1.9 (p.o.)	1
ευπαλινολίδη A ευπαλινολίδη B υπεροσίδη [63]	εκχύλισμα από <i>Eupatorium lindleyanum</i>	i.g. / αρουραίου	23180 ± 7100 59990 ± 8960 144730 ± 35900 67580 ± 16890 166050 ± 55300 371250 ± 63910 103190 ± 21670 275690 ± 31130 689600 ± 80880 (σε 100, 250, 625 mg/kg)	88090 ± 46000 229180 ± 90990 671500 ± 185320 297500 ± 155960 729550 ± 118240 1978890 ± 901170 289190 ± 65650 970750 ± 212270 2248980 ± 230700 (σε 100, 250, 625 mg/kg)	1.27 ± 0.68 1.13 ± 0.51 1.80 ± 0.84 1.23 ± 0.72 1.43 ± 1.05 1.00 ± 0.620 1.67 ± 0.20 1.03 ± 0.58 0.57 ± 0.09 (σε 100, 250, 625 mg/kg)	2.39 ± 1.31 2.03 ± 0.43 4.01 ± 3.00 7.28 ± 4.89 2.97 ± 1.29 4.84 ± 0.38 1.44 ± 0.52 2.03 ± 0.43 2.14 ± 0.60 (σε 100,250, 625 mg/kg)	1.28 1.98 2.00
3,29-διβενζουλ ραρουνιτριόλη [68]	3,29-διβενζουλ- ραρουνιτριόλη	i.g. / αρουραίου	3.85 ± 0.60	24800 ± 12370	1.39 ± 0.68	4.81 ± 1.62	0.12
λιμονίνη [71]	κάψουλες λιμονίνης	p.o. / ανθρώπινο	-	-	-	-	0.078
γλυκυρρητινικό οξύ [33]	χάπια Longhu Rendan	i.g. / αρουραίου	1236.7 ± 511.3	25710 ± 13393	12.0 ± 0.0	6.7 ± 4.5	1

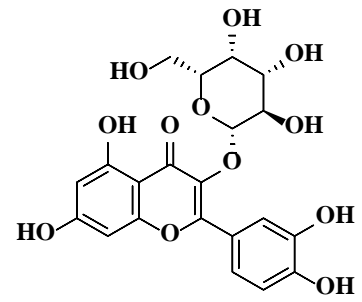
μήτρα: προέλευση της ένωσης; χορήγηση: τύπος χορήγησης του φαρμάκου; πλάσμα: τύπος του πλάσματος που αναλύεται; AUC_{t-∞}: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου; C_{max}: μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου; T_{max}: χρόνος επίτευξης της C_{max}; t_{1/2}: ο χρόνος για να φθάσει το φάρμακο στο ήμισυ της αρχικής του συγκέντρωσης; p.o.: χορήγηση από το στόμα; i.v.: ενδοφλέβια χορήγηση; i.g.: ενδογαστρική χορήγηση.



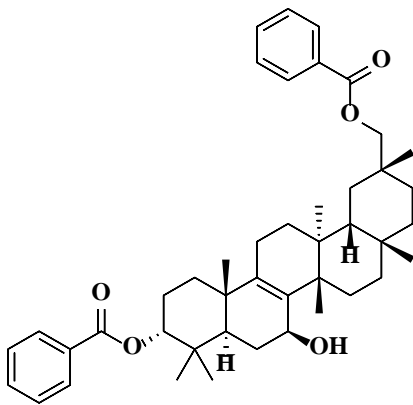
eupalinolide A



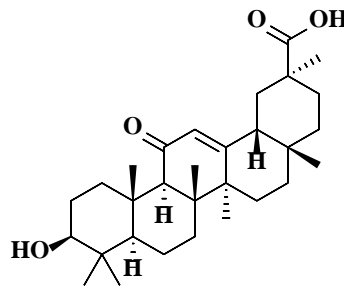
eupalinolide B



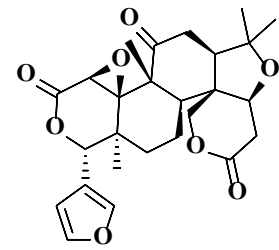
hyperoside



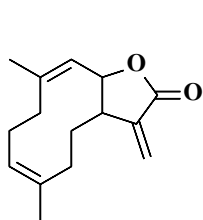
3,29-Dibenzoyl rarounitriol



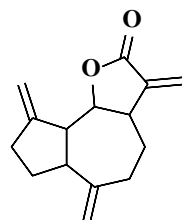
glycyrrhetic acid



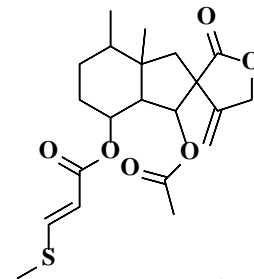
limonin



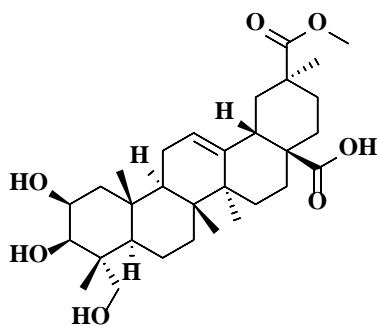
costunolide



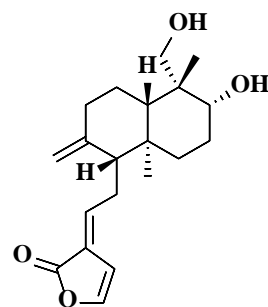
dehydrocostuslactone



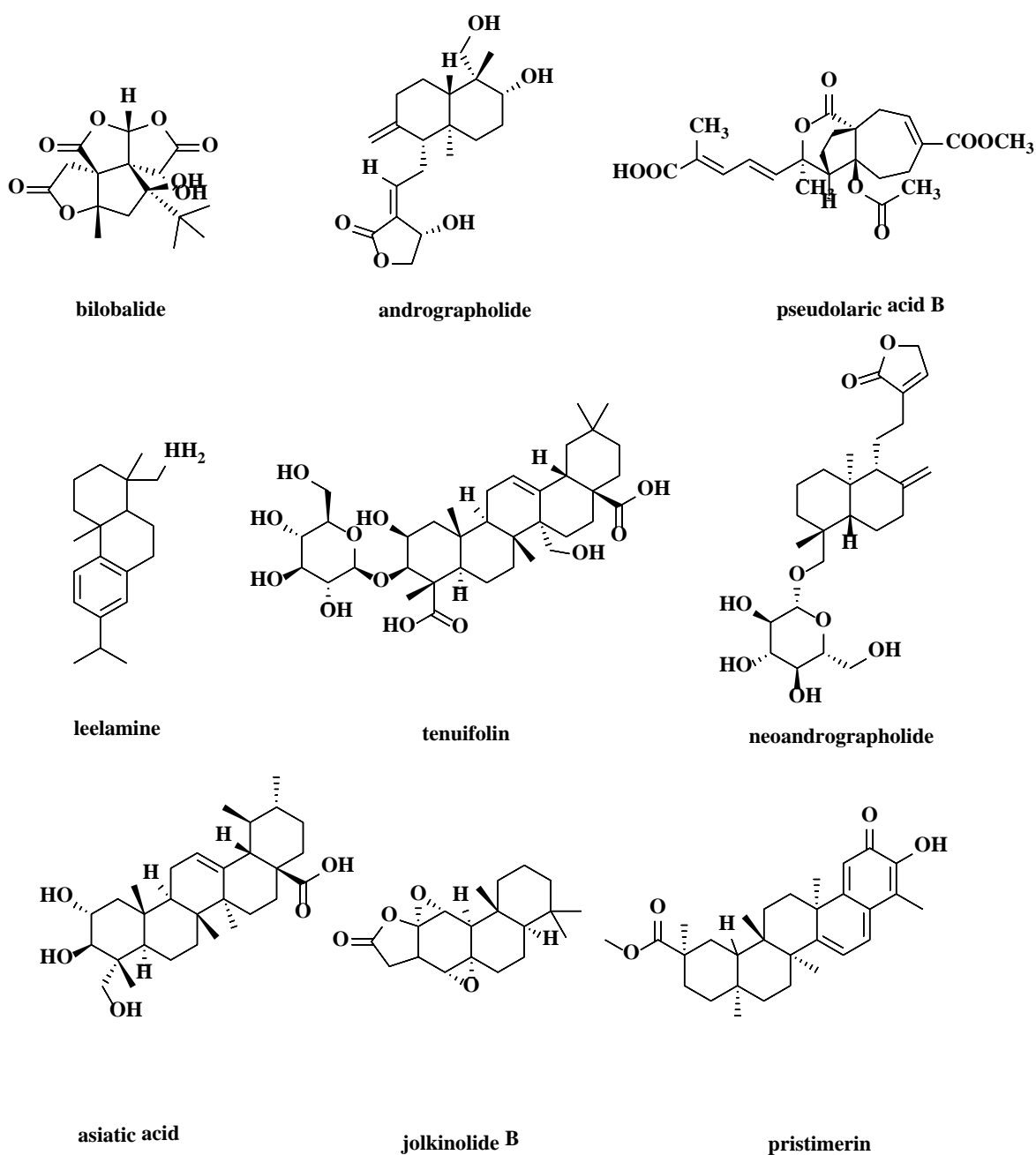
bakkenolide D



phytolaccagenin



dehydroandrographolide



Εικόνα 4.3. Χημικές δομές διάφορων τερπενίων.

4.2.4. Σαπωνίνες

Οι σαπωνίνες βρίσκονται σε πολλά είδη φυτών. Ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοζιτών και πιο συγκεκριμένα είναι αμφίφιλοι γλυκοζίτες. Έχουν ευρύ φάσμα χρήσεων, όπως στην ιατρική ως ενισχυτικά στα εμβόλια, αυξάνοντας την κυτταροτοξικότητα των ανοσοτοξινών ή άλλων τοξινών, που χρησιμοποιούνται ως στόχοι κατά των καρκινικών

κυττάρων στον άνθρωπο [72]. Οι αντι-μυκητιασικές, αντι-μικροβιακές, αντι-φλεγμονώδεις, αντι-παρασιτικές και αντι-καρκινικές δραστηριότητες τους, τις καθιστούν δυνητικούς υποψήφιους για την ανάπτυξη φαρμάκων. Στην **Εικόνα 4.4** παρουσιάζονται οι δομές των διαφόρων σαπωνινών που αναλύονται σε αυτή την ενότητα, ενώ οι παράμετροι βιοδιαθεσιμότητας αναφέρονται στον **Πίνακα 4.4**. Η τιμοσαπωνίνη B-II και A-III, οι αραλιασαπωνίνες V και VI και η καπιλιποσίδη B και C είναι ορισμένες σαπωνίνες που προσδιορίστηκαν με LC-MS/MS [73-75]. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε MRM σε ESI (-). Οι μεταβάσεις για τις ενώσεις αυτές ήταν m/z 919.0 \rightarrow 757.5 για την τιμοσαπωνίνη B-II, 739.7 \rightarrow 577.8 για την τιμοσαπωνίνη A-III, 1103.2 \rightarrow 941.2 για την αραλία-σαπωνίνη V, 1119.2 \rightarrow 957.0 για την αραλία-σαπωνίνη VI, 1175.6 \rightarrow 1043.7 για την καλλιποσίδη B και 1161.8 \rightarrow 1029.5 για την καλλιποσίδη C. Το LLOQ βρέθηκε να είναι 3, 0.3, 5.70 και 6.15 ng mL⁻¹ για τις τιμοσαπωνίνες B-II και A-III και τις αραλία-σαπωνίνες V και VI, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις σχετικές δημοσιεύσεις, για τις τιμοσαπωνίνες B-II και A-III η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική εντός εύρους συγκεντρώσεων 3 - 3000 ng mL⁻¹ για την τιμοσαπωνίνη B-II, 0.3 - 3000 ng mL⁻¹ για την τιμοσαπωνίνη A-III, 5.70 - 190 ng mL⁻¹ για την αραλία-σαπωνίνη V και 6.15 - 205 ng mL⁻¹ για την αραλία-σαπωνίνη VI. Επιπλέον, για τις καπιλιποσίδες B και C, η μέθοδος ήταν γραμμική για συγκεντρώσεις 10 - 5000 ng mL⁻¹ και για τους δύο αναλύτες. Η τιμοσαπωνίνη A-III απορροφήθηκε ταχύτερα από τις άλλες ενώσεις, με T_{max} στις 6.60 h όταν χορηγήθηκαν εκχυλίσματα από το *Rhizoma Anemarrhenae* σε δόση 0.59 mg kg⁻¹. Από την άλλη πλευρά, η πιο αργή απορρόφηση παρουσιάστηκε για την αραλία-σαπωνίνη VI (0.88 h) όταν χορηγήθηκαν εκχυλίσματα από φύλλα του φυτού *Aralia elata*. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα φαρμακοκινητικής σχετικά με την απορρόφηση της καπιλιποσίδης B και της καπιλιποσίδης C. Αντίθετα, όσον αφορά τον ρυθμό αποβολής αυτών των ενώσεων, η καπιλιποσίδη B αποβλήθηκε ταχύτερα από το πλάσμα με τιμή t_{1/2} στις 2.38 h, ακολουθώντας η τιμοσαπωνίνη B-II με t_{1/2} στις 2.45 h. Η τιμοσαπωνίνη A-III και η καπιλιποσίδη B παρουσίασαν βραδύτερη αποβολή, ενώ η σαπωνίνη VI της *Aralia elata* είχε τον βραδύτερο ρυθμό αποβολής με τιμή t_{1/2} στις 7.45 h (**Πίνακας 4.4**). Η σαπωνίνη D της *Pulsatilla* είναι επίσης μια σαπωνίνη που προσδιορίστηκε με την ίδια μέθοδο [76]. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε MRM με ESI (-). Η μετάβαση για τη σαπωνίνη D της *Pulsatilla* ήταν m/z 911.6 \rightarrow 603.4. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική εντός των συγκεντρώσεων 2.0 - 2000 ng mL⁻¹, ενώ το κατώτερο όριο ποσοτικού προσδιορισμού ήταν

2 ng mL⁻¹. Μια άλλη σαπωνίνη που ποσοτικοποιήθηκε με LC-MS/MS ήταν η πλατυκοδίνη D [77]. Η πλατυκοδίνη D προσδιορίστηκε με χρήση MRM σε ESI (-) και η μετάβαση για αυτόν τον αναλύτη ήταν m/z 1223.6 → 469.2. Η μέθοδος έδειξε καλή γραμμικότητα στις συγκεντρώσεις 5 - 2000 ng mL⁻¹ με το LLOQ στα 5 ng mL⁻¹. SRM χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της εσκουλεντοσίδη A [78]. Η μετάβαση για αυτόν τον αναλύτη ήταν m/z 849.3 → 805.3 με ESI (+). Το LLOQ βρέθηκε να είναι 5 ng mL⁻¹ ενώ η καμπύλη βαθμονόμησης παρουσίασε ικανοποιητική γραμμικότητα σε εύρος συγκέντρωσης 5 - 500 ng mL⁻¹. Αντιθέτως, η σαπωνίνη D της *Pulsatilla* όχι μόνο απορροφήθηκε ταχύτερα, αλλά αποβλήθηκε και βραδύτερα από την πλατυκοδίνη D με τις τιμές των T_{max} και t_{1/2} στις 0.08 h και 12.65 h, αντίστοιχα. Ωστόσο, η πλατυκοδίνη D είχε βραδύτερη απορρόφηση και ταχύτερο ρυθμό αποβολής από τη σαπωνίνη D της *Pulsatilla*. Επιπλέον, η εσκουλεντοσίδη A δεν επιδεικνύει μόνο ενδιάμεσο ρυθμό απορρόφησης, μεταξύ της σαπωνίνης D της *Pulsatilla* και της πλατυκοδίνης D, αλλά και ενδιάμεσο ρυθμό αποβολής με τιμή t_{1/2} στις 3.3 h, ενώ η τιμή T_{max} ήταν στις 4.7 h (Πίνακας 4.4).

Οι στεροειδείς σαπωνίνες ανήκουν στα φυτικά στεροειδή και μπορούν να βρεθούν σε μια ποικιλία φυτών. Η πρωτοδιοσκίνη είναι μια στεροειδής σαπωνίνη που προσδιορίστηκε επίσης μέσω LC-MS/MS [79]. Η μετάβαση για αυτόν τον αναλύτη ήταν m/z 888.1 → 1050.2, με χρήση MRM υπό ESI (+), ενώ το LLOQ ήταν 0.132 ng mL⁻¹. Η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν ικανοποιητική εντός του εύρους συγκέντρωσης 0.132 - 800 ng mL⁻¹. Η πρωτοδιοσκίνη είχε επίσης σχετικά αργό ρυθμό απορρόφησης και αποβολής (Πίνακας 4.4). Σε μια άλλη εργασία, η αστραγαλοσίδη III ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση MRM με ESI (+). Η μετάβαση σύμφωνα με την εργασία, ήταν m/z 807.4 → 335.3 [80]. Επιπλέον, η μέθοδος παρουσίασε ικανοποιητική γραμμικότητα σε ένα εύρος συγκέντρωσης 5 - 5000 ng mL⁻¹, ενώ το LLOQ της αστραγαλοσίδη III ήταν 5 ng mL⁻¹. Η φαρμακοκινητική μελέτη παρουσίασε μάλλον γρήγορο ρυθμό απορρόφησης και αποβολής (Πίνακας 4.4), με τους συγγραφείς να αναφέρουν χαμηλή απορρόφηση και υψηλό μεταβολισμό *in vivo* για την αστραγαλοσίδη III.

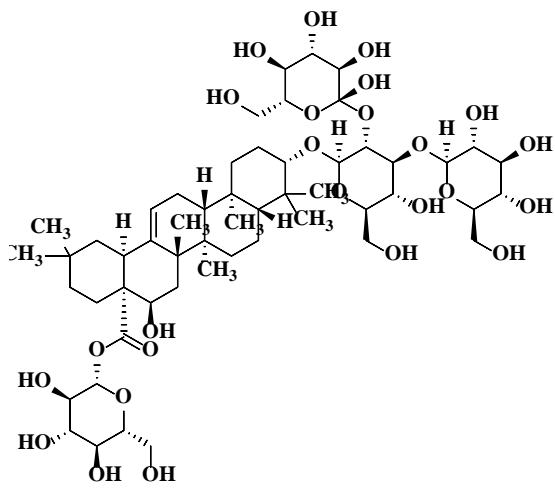
Πίνακας 4.4. Παράγωγα της τάξεως των σαπωνινών και κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ	ΜΗΤΡΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ / ΠΛΑΣΜΑ	C _{max} (ng mL ⁻¹)	AUC _{t-∞} (ng h mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
τιμοσαπωνίνη Β-ΙΙ τιμοσαπωνίνη Α-ΙΙΙ [73]	εκχύλισμα από <i>Rhizoma Anemarrhenae</i>	i.g. / αρουραίου	511.4 ± 556.7 433.9 ± 310.5 2182 ± 1417 (σε 150, 300, 600 mg/kg)	1092 ± 780 1010 ± 520 4267 ± 2204 (σε 150, 300, 600 mg/kg)	1.04 ± 1.18 2.38 ± 1.28 1.92 ± 0.80 (σε 150, 300, 600 mg/kg)	4.12 ± 3.11 5.47 ± 3.60 2.45 ± 1.32 (σε 150, 300, 600 mg/kg)	3 0.3
αραλία-σαπωνίνη V αραλία-σαπωνίνη VI [74]	εκχύλισμα από φύλλα <i>Aralia elata</i>	p.o. / αρουραίου	161.8 ± 20.19 188.55 ± 35.35	1156.9 ± 286.6 1306.74 ± 160.24	1.08 ± 0.19 0.88 ± 0.13	7.33 ± 2.59 7.45 ± 0.61	5.70 6.15
πλατυκωδίνη D [77]	πλατυκωδίνη εκχύλισμα από <i>Platycodi Radix</i>	p.o. και i.v. / αρουραίου	408.41 ± 234.04 (p.o.) 1644.36 ± 282.63 (i.v.)	1 841.10 ± 716.69 (p.o.) 1 910.08 ± 384.44 (i.v.)	0.92 ± 1.10 (p.o.)	5.71 ± 4.55 (p.o.) 11.24 ± 4.46 (i.v.)	5
καπιλιποσίδη Β καπιλιποσίδη C [75]	εκχύλισμα από το φυτό <i>Lysimachia capillipes hemsl</i>	i.v. / αρουραίου	-	1323.33 ± 423.33 8250 ± 2100 57300 ± 12333.33 (σε 0.500, 1.50, 5.00 mg/kg) 72.3 ± 25.2 477 ± 11.4 2651 ± 461 (σε 0.500, 1.50, 5.00 mg/kg)	-	2.38 ± 0.8, 5.85 ± 1.87, 8 ± 2.13 (σε 0.500, 1.50, 5.00 mg/kg) 2.41 ± 1.02, 5.48 ± 2.13, 7.07 ± 1.41 (σε 0.500, 1.50, 5.00 mg/kg)	-
σαπωνίνη D [76]	εκχύλισμα από <i>pulsatilla</i>	p.o. και i.v. / αρουραίου	179.6 ± 35.4 (p.o.) 2458.7 ± 380.3 (i.v.)	61.05 ± 14.83 (p.o.)	0.333 ± 0.225 (p.o.) 0.083 ± 0 (i.v.)	12.65 ± 1.09 (p.o.) 2.01 ± 0.82 (i.v.)	2

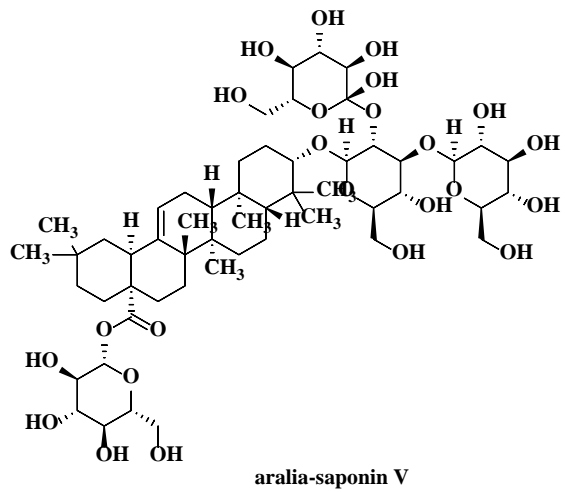
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

εσκουλεντοσίδη Α [78]	εκχύλισμα από <i>phytolacca esculenta</i>	p.o. / σκύλου	281.4 ± 35.2	388.2 ± 51.6	179.48 ± 30.63 (i.v.)	3.7 ± 0.8	5.3 ± 1.0	4.7	3.5 ± 0.5	5
			1005 ± 187 (σε 2.5, 5, 10 mg/kg)	6941 ± 792 (σε 2.5, 5, 10 mg/kg)	3085 ± 226 4557 ± 340 6941 ± 792 (σε 2.5, 5, 10 mg/kg)	± 1.0 (σε 2.5, 5, 10 mg/kg)	3.3 ± 0.4 3.6 ± 0.5 (σε 2.5, 5, 10 mg/kg)			
πρωτοδιοσκίνη [79]	πρωτοδιοσκίνη	p.o. / αρουραίου	16.14 ± 0.45	29.74 ± 0.85	4480.08 ± 924.9	10.43 ± 2.15	11.47 ± 2.13			0.13
			50.62 ± 1.44 (σε 50, 100, 200 mg/kg)	14043.1 ± 2899.2 (σε 50, 100, 200 mg/kg)	8251.6 ± 1703.6 14043.1 ± 2899.2 (σε 50, 100, 200 mg/kg)	10.87 ± 1.43 11.25 ± 3.15 (σε 50, 100, 200 mg/kg)	12.13 ± 1.13 11.97 ± 3.05 (σε 50, 100, 200 mg/kg)			
αστραγαλοσίδη ΙΙΙ [80]	AST ΙΙΙ	p.o. και i.v. / αρουραίου	189 ± 75.4		714 ± 115	1.67 ± 0.58	2.13 ± 0.11			5

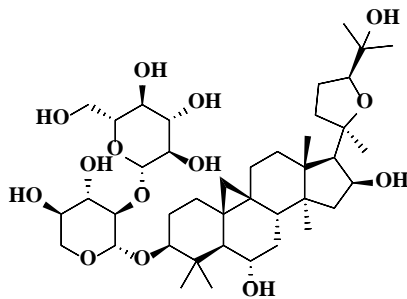
μήτρα: προέλευση της ένωσης; χορήγηση: τύπος χορήγησης του φαρμάκου; πλάσμα: τύπος του πλάσματος που αναλύεται; AUC_{t-∞}: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου; C_{max}: μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου; T_{max}: χρόνος επίτευξης της C_{max}; t_{1/2}: ο χρόνος για να φθάσει το φάρμακο στο ήμισυ της αρχικής του συγκέντρωσης; p.o.: χορήγηση από το στόμα; i.v.: ενδοφλέβια χορήγηση; i.g.: ενδογαστρική χορήγηση.



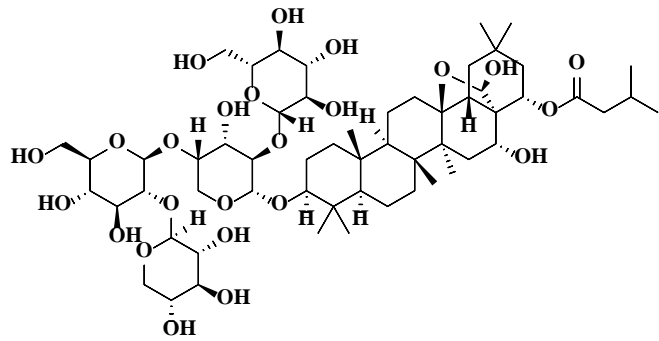
aralia-saponin VI



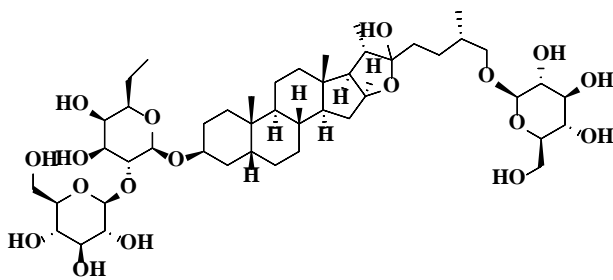
aralia-saponin V



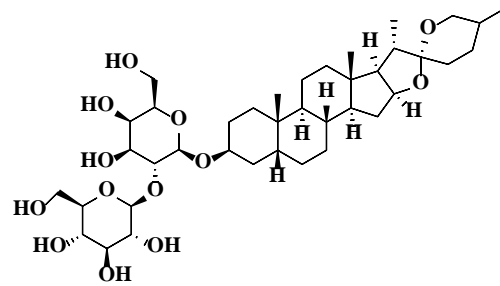
astragaloside III



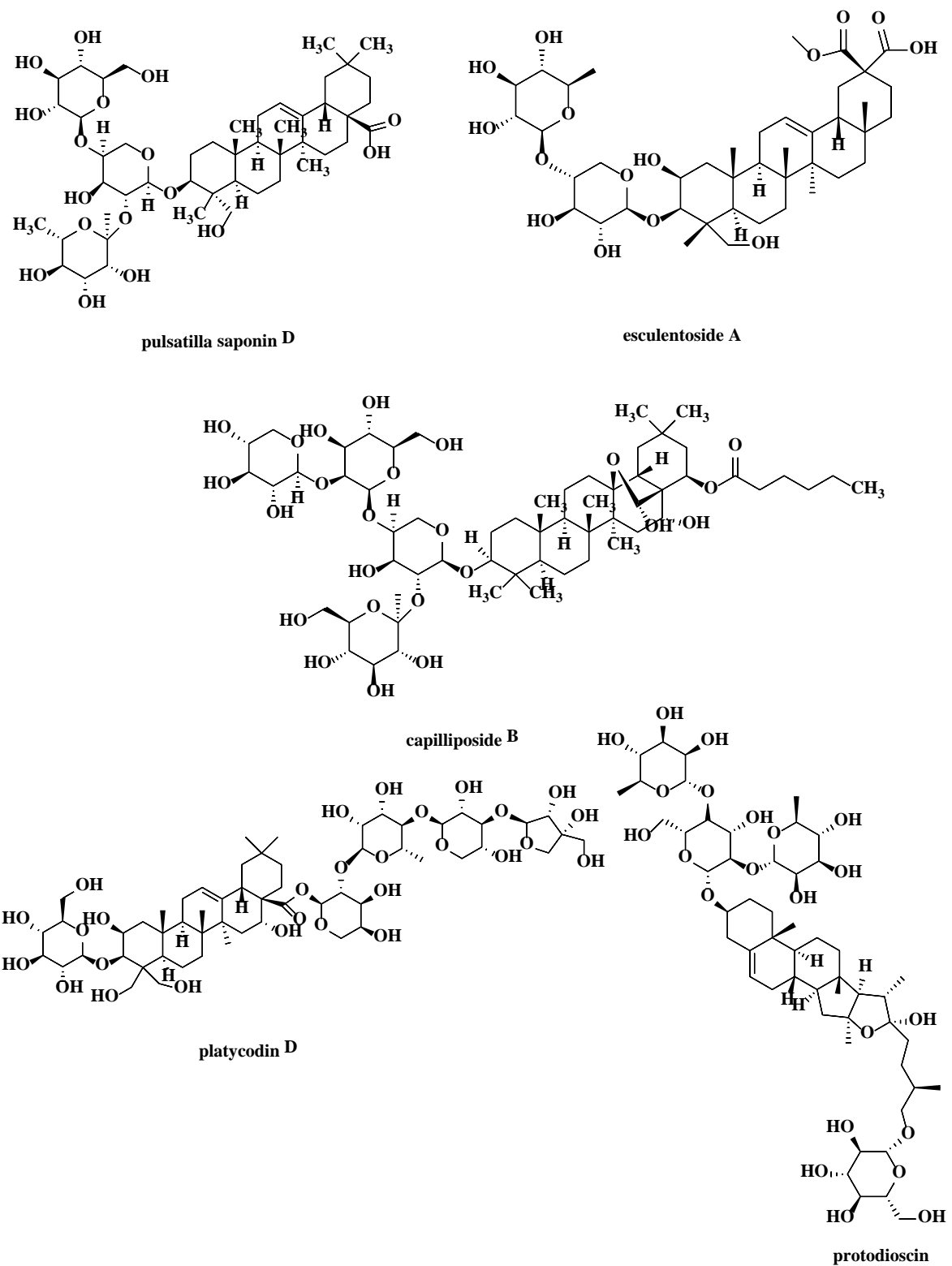
capilliposide C



timosaponin B-II



timosaponin A-II



Εικόνα 4.4. Χημική δομή διάφορων σαπωνινών.

4.2.5. Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων, που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς και διαθέτουν μεγάλο αριθμό φαρμακολογικών δραστηριοτήτων, όπως αντικαρκινικές, αναλγητικές, αντι-βακτηριακές κ.λπ. [81,82]. Στην **Εικόνα 4.5** παρουσιάζονται οι δομές των διαφόρων αλκαλοειδών που αναλύονται στην παρούσα ενότητα, ενώ οι παράμετροι βιοδιαθεσιμότητας τους αναφέρονται στον **Πίνακα 4.5**.

Η λυκορίνη και η γαλανθαμίνη είναι δύο αλκαλοειδή που προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα με τη χρήση LC-MS/MS [83]. Σύμφωνα με την έκθεση, χρησιμοποιήθηκε SRM με ESI (+), ενώ η διφαινυδραμίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Στην εργασία αυτή, αναφέρθηκε ότι οι μεταβάσεις αυτών των δύο ενώσεων ήταν m/z 288.2 \rightarrow 147.1 για τη λυκορίνη και 288.2 \rightarrow 213.2 για τη γαλανθαμίνη. Το LLOQ βρέθηκε να είναι 3.00 ng mL⁻¹ και για τους δύο αναλύτες και η μέθοδος έδειξε ικανοποιητική γραμμικότητα εντός εύρους συγκέντρωσης 3.0 - 1000 ng mL⁻¹ και για τις δύο ενώσεις. Σύμφωνα με τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.5**, η γαλανθαμίνη παρουσίασε ταχύτερη απορρόφηση με τιμή T_{max} στις 2.83 ώρες, ενώ η λυκορίνη είχε βραδύτερη απορρόφηση. Η λυκορίνη έφθασε στο μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης στις 2.83 h αλλά αποβλήθηκε ταχύτερα από το πλάσμα με τιμή t_{1/2} στις 5.72 h. Όσον αφορά τη γαλανθαμίνη, παρουσίασε βραδύτερο ρυθμό αποβολής με t_{1/2} στις 7.23 h, ωστόσο η μέγιστη συγκέντρωση ήταν χαμηλότερη (116.88 ng mL⁻¹) σε σύγκριση με τη λυκορίνη (20547 ng mL⁻¹). Η λυκορίνη αξιολογήθηκε και σε άλλη μελέτη, χρησιμοποιώντας δεξτροφάνη ως εσωτερικό πρότυπο, με SRM σε ESI (+) με την ίδια μετάβαση όπως προηγουμένως [84]. Στην περίπτωση αυτή, το LLOQ για τη λυκορίνη ήταν 1 ng mL⁻¹, ενώ η μέθοδος ήταν γραμμική εντός συγκέντρωσης 1 - 1000 ng mL⁻¹. Στην παρούσα εργασία, η λυκορίνη απορροφήθηκε σχετικά γρήγορα με την τιμή T_{max} να είναι περίπου 0.25 h. Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός αποβολής της λυκορίνης ήταν κατά μέσο όρο 2.49 h, υποδεικνύοντας επίσης γρήγορη αποβολή, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση ήταν περίπου 3653.12 ng mL⁻¹ (**Πίνακας 4.5**).

Η τετραϋδροπαλματίνη, η οποία ποσοτικοποιήθηκε ταυτόχρονα με τη σκουτελλαρίνη (φλαβόνη) και η τετραϋδροκοριδαλίνη είναι επίσης δύο ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των αλκαλοειδών και ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση LC-MS/MS. Σύμφωνα με τις αναλύσεις, η μετάβαση για την τετραϋδροπαλματίνη ήταν m/z 356.1 \rightarrow 192.1, ενώ για την τετραϋδροκοριδαλίνη 366 \rightarrow 351. Όσον αφορά τις συνθήκες MS, χρησιμοποιήθηκε MRM

με ESI (+). Το LLOQ για την τετραϋδροπαλματίνη ήταν 10 ng mL^{-1} ενώ για την τετραϋδροκοριδαλίνη ήταν 1.25 ng mL^{-1} και 0.625 ng mL^{-1} για προσδιορισμό στη χολή και στα ούρα, αντίστοιχα. Η μέθοδος έδειξε καλή γραμμικότητα σε εύρος συγκέντρωσης 10 - 5000 ng mL^{-1} για την τετραϋδροπαλματίνη και 0.625-250 ng mL^{-1} για την τετραϋδροκοριδαλίνη. Η τετραϋδροπαλματίνη παρουσίασε ταχύτερη απορρόφηση σε σύγκριση με τις άλλες δύο ενώσεις με T_{\max} στις 0.58 h, ενώ η σκουτελλαρίνη είχε την πιο αργή απορρόφηση που φαίνεται από την τιμή T_{\max} στις 4.67 h (**Πίνακας 4.5**). Η ένωση που αποβλήθηκε ταχύτερα σε σχέση με τις άλλες δύο ήταν η σκουτελλαρίνη, γεγονός που υποδεικνύεται από την τιμή $t_{1/2}$ στις 6.81 h. Οι άλλες δύο ενώσεις, η τετραϋδροπαλματίνη και η τετραϋδροκοριδαλίνη, παρουσίασαν ανάλογο χρόνο αποβολής στις 7.93 h. Η τετραϋδροπαλματίνη παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση με C_{\max} στα $3068.56 \text{ ng mL}^{-1}$, ακολουθώντας η σκουτελλαρίνη με C_{\max} στα $1172.91 \text{ ng mL}^{-1}$ [39,72]. Η μπουλεϊακονιτίνη Α είναι επίσης ένα αλκαλοειδές που ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο LC-MS/MS [85]. Η μπουλεϊακονιτίνη Α προσδιορίστηκε με MRM σε ESI (+). Στην συγκεκριμένη μελέτη, η μπουλεϊακονιτίνη Α είχε μετάβαση στα $644.4 \rightarrow 584.3$, ενώ το LLOQ για την ένωση αυτή ήταν 0.02 ng mL^{-1} . Η καμπύλη βαθμονόμησης έδειξε καλή γραμμικότητα εντός του εύρους συγκέντρωσης 0.02 - 20 ng mL^{-1} . Όσον αφορά τα φαρμακοκινητικά δεδομένα, η μπουλεϊακονιτίνη Α, όταν χορηγήθηκαν $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ από το στόμα σε αρουραίους, παρουσίασε ταχεία απορρόφηση με C_{\max} στα 2.61 ng mL^{-1} αλλά και πολύ γρήγορο ρυθμό αποβολής με $t_{1/2}$ στις 1.56 h. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, οι τιμές ακρίβειας και πιστότητας ήταν εντός των ορίων αποδοχής (< 15 %), γεγονός που δείχνει ότι η μέθοδος ήταν ακριβής.

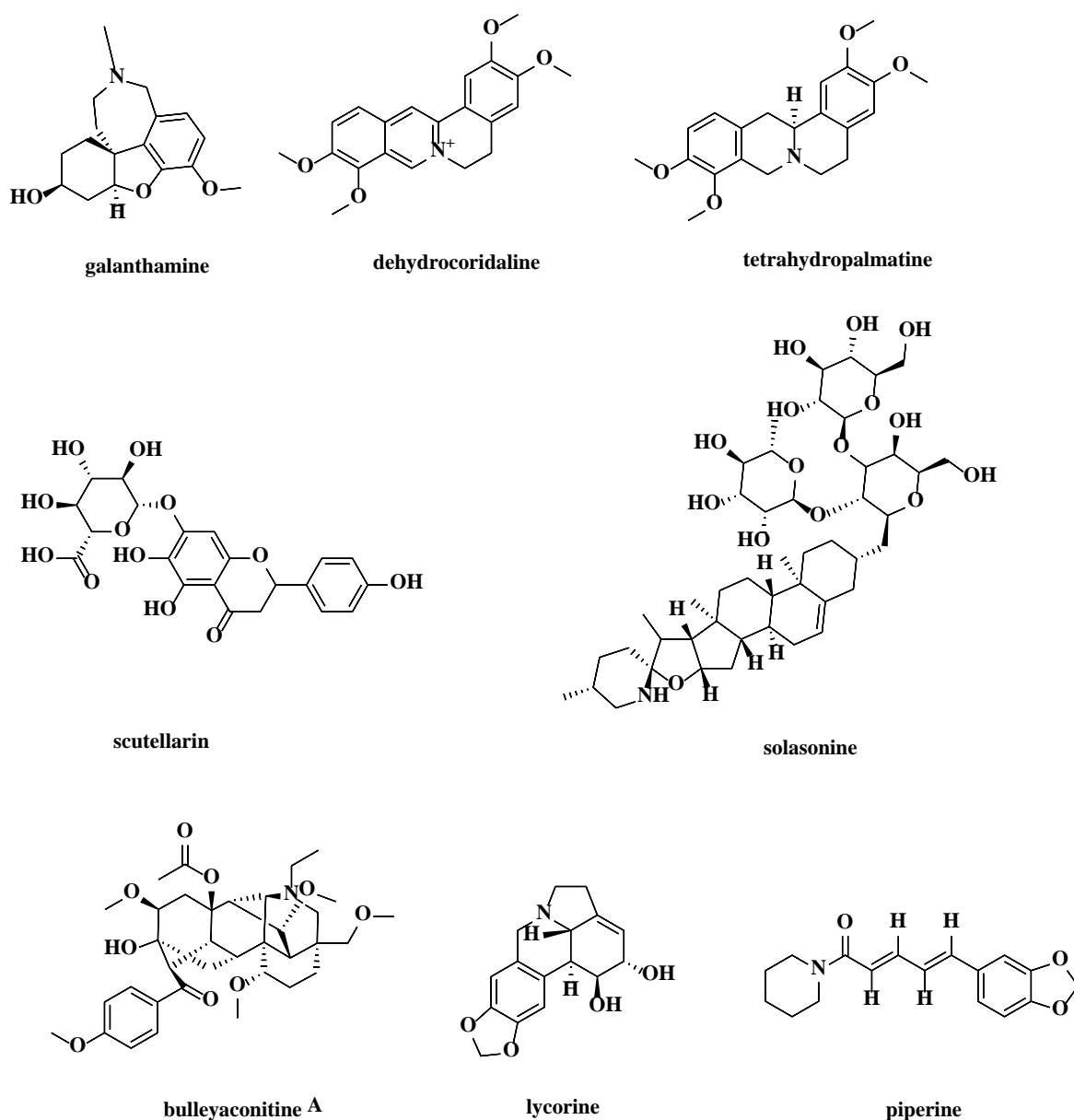
Η δεϋδροκοριδαλίνη προσδιορίστηκε ποσοτικά με LC-MS/MS μετά την ταυτόχρονη χορήγηση δεϋδροκοριδαλίνης και εκχυλίσματος *Corydalis yanhusuo* [86]. Η μέθοδος ήταν γραμμική σε ένα εύρος συγκέντρωσης 0.625 - 250 ng mL^{-1} και το LLOQ για αυτόν τον αναλύτη προσδιορίστηκε στα $0,625 \text{ ng mL}^{-1}$. Η MRM πραγματοποιήθηκε σε ESI (+). Εξετάζοντας τον **Πίνακα 4.5**, βλέπουμε ότι η δεϋδροκοριδαλίνη παρουσίασε πολύ γρήγορο ρυθμό απορρόφησης με T_{\max} στις 1 h, ενώ ο χρόνος για να φτάσει ο αναλύτης στο μισό της αρχικής του συγκέντρωσης ήταν περίπου 7.93 h, υποδεικνύοντας πολύ αργό ρυθμό αποβολής. Σε μια άλλη ανάλυση, η σολασονίνη προσδιορίστηκε επίσης με χρήση MRM σε ESI (+) [87]. Η μετάβαση για τη σολασονίνη ήταν $m/z 884.3 \rightarrow m/z 85.1$, ενώ η μέθοδος έδειξε πολύ καλή γραμμικότητα σε εύρος συγκέντρωσης 0.1 - 500 ng mL^{-1} , με LLOQ στα

0.5 ng mL⁻¹. Κρίνοντας από τα φαρμακοκινητικά αποτελέσματα, η σολασονίνη, κατά την από του στόματος χορήγηση, παρουσίασε υψηλό ρυθμό απορρόφησης με T_{max} στις 0.7 h και σχετικά αργό ρυθμό αποβολής με t_{1/2} στις 3.5 h. Η πιπερίνη, ένα αλκαλοειδές που βρίσκεται στο μαύρο πιπέρι, προσδιορίστηκε ποσοτικά στο χάπι Longhu Rendan, μαζί με άλλες ενώσεις, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως [33]. MRM χρησιμοποιήθηκε με ESI (+) με κύρια μετάβαση της πιπερίνης στο m/z 286.1 → 201.2. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική στο εύρος συγκέντρωσης 0.025 - 10 ng mL⁻¹ με LLOQ στα 0.025 ng mL⁻¹. Όσον αφορά το φαρμακοκινητικό της προφίλ (**Πίνακας 4.5**), η πιπερίνη απορροφήθηκε γρήγορα (T_{max}= 1 h) και αποβλήθηκε ελαφρώς πιο αργά σε σύγκριση με την αποβολή των άλλων ενώσεων του χαπιού Longhu Rendan (t_{1/2} περίπου 5 h).

Πίνακας 4.5. Παράγωγα της τάξεως των αλκαλοειδών και κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ	ΜΗΤΡΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ / ΠΛΑΣΜΑ	C _{max} (ng mL ⁻¹)	AUC _{t-∞} (ng h mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
λυκορίνη γαλανθαμίνη [83]	εκχύλισμα από <i>Lycoris radiata</i>	p.o. / αρουραίου	205.47 ± 24.47 116.88 ± 27.27	2185.03 ± 235.43 896.60 ± 123.04	2.83 ± 0.41 1.37 ± 0.98	5.72 ± 1.00 7.23 ± 3.20	3
σκουτελλαρίνη τετραϋδροπαλματίνη [45]	εκχύλισμα από <i>Herba Erigerontis Breviscapi</i> (σκουτελλαρίνη) και <i>Rhizoma Corydalis Yanhusuo</i> (τετραϋδροπαλματίνη)	p.o. / αρουραίου	1172.91 ± 144.45 3068.56 ± 146.82	15048.67 ± 1248.50 24197.28 ± 2117.86	4.67 ± 1.03 0.58 ± 0.13	6.81 ± 0.99 7.93 ± 0.77	10
λυκορίνη [84]	λυκορίνη	i.p. / αρουραίου	1340720 ± 123550 3498920 ± 326030 6119730 ± 879730 (σε 5, 10, 20 mg/kg)	2075850 ± 347780 6083590 ± 637280 12901460 ± 3997430 (σε 5, 10, 20 mg/kg)	0.25 0.22 ± 0.05 0.25 (σε 5, 10, 20 mg/kg)	1.44 ± 0.57 3.15 ± 1.48 2.89 ± 0.63 (σε 5, 10, 20 mg/kg)	1
δεϋδροκορυδαλίνη [86]	εκχύλισμα από <i>Corydalis yanhusuo</i>	p.o. / αρουραίου	9.40 ± 4.18	59.08 ± 11.53	1.00 ± 0.00	7.93 ± 1.34	1.25 (σάλιο) 0.625 (ούρα)
σολασονίνη [87]	σολασονίνη	p.o. και i.v. / αρουραίου	172.3 ± 87.1 (p.o) 2777.5 ± 1227.7 (i.v)	688100 ± 413910 (p.o) 4118900 ± 717800 (i.v)	0.7 ± 0.3 (p.o) 0.1 (i.v)	3.5 ± 1.8 (p.o) 1.4 ± 0.2 (i.v)	0.5
μουλεϊακονιτίνη A [85]	μουλεϊακονιτίνη A	p.o. / αρουραίου	2.61 ± 1.78	3.61 ± 0.86	-	1.56 ± 0.49	0.02
πιπερίνη [33]	Χάπια Longhu Rendan	i.g. / αρουραίου	45.9 ± 19.3	227.8 ± 70.8	0.4 ± 0.1	5.3 ± 0.6	1

μήτρα: προέλευση της ένωσης; χορήγηση: τύπος χορήγησης του φαρμάκου; πλάσμα: τύπος του πλάσματος που αναλύεται; AUC_{t-∞}: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου; C_{max}: μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου; T_{max}: χρόνος επίτευξης της C_{max}; t_{1/2}: ο χρόνος για να φθάσει το φάρμακο στο ήμισυ της αρχικής του συγκέντρωσης; p.o.: χορήγηση από το στόμα; i.v.: ενδοφλέβια χορήγηση; i.g.: ενδογαστρική χορήγηση.



Εικόνα 4.5. Χημική δομή διάφορων αλκαλοειδών.

4.2.6. Άλλες κατηγορίες φυτοχημικών

Σε αυτή την ομάδα ενώσεων ανήκουν συστατικά που δεν μπορούν να ταξινομηθούν στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην **Εικόνα 4.6** παρατίθενται οι δομές των ενώσεων που αναφέρονται σε αυτή την κατηγορία, ενώ οι παράμετροι βιοδιαθεσιμότητας τους παρατίθενται στον **Πίνακα 4.6**.

Η κεφαλομαννίνη, είναι μία από τις σημαντικότερες ταξάνες, και η ανίχνευσή της πραγματοποιήθηκε με LC-MS/MS με MRM σε ESI (+) με κύρια μετάβαση m/z 832.8 →

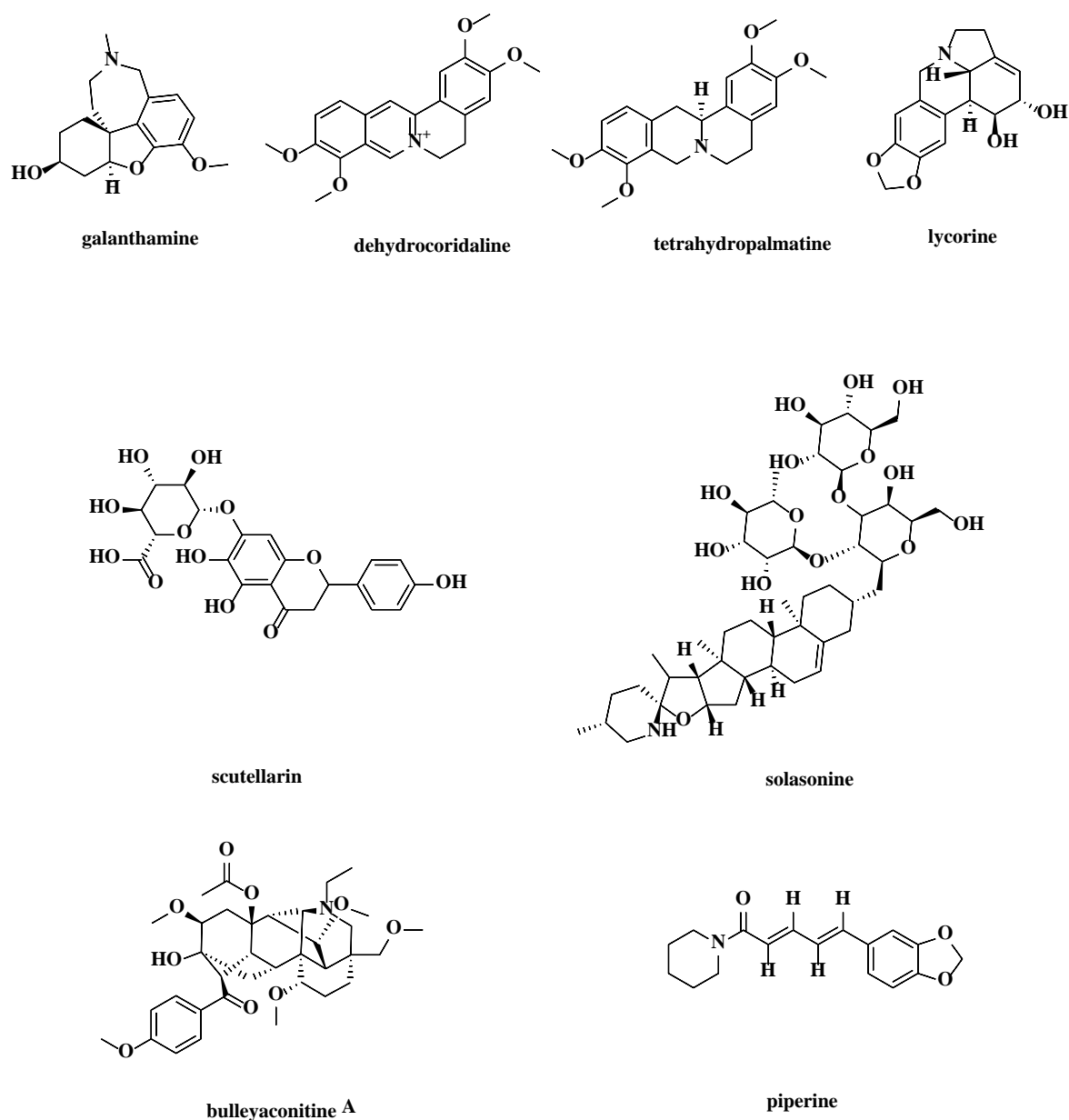
264.1 [88]. Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε ήταν γραμμική σε εύρος συγκέντρωσης 10 - 2000 ng mL⁻¹ με LLOQ στα 10 ng mL⁻¹. Η κεφαλομαννίνη, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση 5 mg kg⁻¹, έφθασε σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα, με μέγιστη συγκέντρωση που κυμάνθηκε στα 7853 ng mL⁻¹. Παρά την υψηλή αυτή συγκέντρωση, ο ρυθμός αποβολής ήταν σχετικά γρήγορος με t_{1/2} σε 1.38 h (Πίνακας 4.6). Αυτή η γρήγορη αποβολή στο πλάσμα θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ταχεία κατανομή του αναλύτη σε άλλους ιστούς, όπως αναφέρει η συγκεκριμένη μελέτη. Το 3,3'-Δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ-4'-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο, το 3,3'-δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ 4'-Ο-β-D-ξυλοπυρανοσίδιο και το 3,3-δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ είναι τρεις σημαντικές ελλαγιταννίνες που προσδιορίστηκαν από εκχύλισμα της ρίζας του *Euphorbiae pekinensis* χρησιμοποιώντας LC-MS/MS [89]. Για τις τρεις αυτές ενώσεις MRM χρησιμοποιήθηκε σε ESI (+) και οι μεταβάσεις τους ήταν m/z 491 → 328.1, 461.3 → 328.1 και 329.1 → 314.1 αντίστοιχα. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική με το εύρος συγκέντρωσης για το 3,3'-Δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ-4'-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο σε 1 - 1000 ng mL⁻¹, 1.5 - 1500 ng mL⁻¹ για το 3,3'-Δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ 4'-Ο-β-D-ξυλοπυρανοσίδιο και 5 - 5000 ng mL⁻¹ για το 3,3-δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ. Μετά την από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος σε δόση 9 g kg⁻¹, τα επίπεδα συγκέντρωσης των ενώσεων στο πλάσμα έφτασαν πολύ γρήγορα στη μέγιστη συγκέντρωσή τους, με T_{max} περίπου 0.3 h για όλες. Το 3,3-δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ είχε τον πιο αργό ρυθμό αποβολής, ενώ το 3,3'-δι-Ο-μεθυλοελλαγικό οξύ 4'-Ο-β-D-ξυλοπυρανοσίδιο είχε τον ταχύτερο.

Η τζινσενοσίδιο Rc (GRc), η οποία ανήκει στις τζινσενοσίδες, είναι κύριο συστατικό του *Ginseng*, ένα γνωστό φαρμακευτικό βότανο, η οποία προσδιορίστηκε στο πλάσμα αρουραίων και υποβλήθηκε σε φαρμακοκινητική μελέτη [90]. Χρησιμοποιήθηκε SRM σε ESI (+) με κύρια μετάβαση m/z 1101.6 → 789.3. Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική στο εύρος συγκέντρωσης 5 - 5000 ng mL⁻¹ με LLOQ στα 5 ng mL⁻¹. Η GRc, έφτασε στη μέγιστη συγκέντρωσή της περίπου 1 h μετά την από του στόματος χορήγηση και είχε εξαιρετικά αργό ρυθμό αποβολής με t_{1/2} στις 23.6 ώρες (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.6. Αταξινόμητες φυτοχημικές ενώσεις και οι κύριες παράμετροι που εξετάστηκαν.

ΠΑΡΑΓΩΓΟ	ΜΗΤΡΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ / ΠΛΑΣΜΑ	C _{max} (ng mL ⁻¹)	AUC _{t-∞} (ng h mL ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)	LLOQ (ng mL ⁻¹)
κεφαλομαννίνη [88]	κεφαλομαννίνη	i.v. / αρουραίου	7853.4 ± 2826.3	8469.3 ± 1988.9	-	1.38 ± 0.11	10
3,3 -δι-Ο-μεθυλ ελαγικό οξύ-4 -Ο-β- D-γλυκοπυρανοσίδη 3,3 -δι-Ο-μεθυλ- ελαγικό οξύ-4 -Ο-β- D-ξυλοπυρανοσίδη 3,3 -δι-Ο-μεθυλ ελαγικό οξύ [89]	εκχύλισμα από τη ρίζα του <i>Euphorbiae</i> <i>pekinensis</i>	i.g. / αρουραίου	233.0 ± 122.4	1371 ± 743	0.292 ± 0.045	5.65 ± 1.5	1
			30.7 ± 215	2149 ± 1019	0.278 ± 0.068	4.84 ± 2.0	1.5
			1750.7 ± 769	8525 ± 2843	0.264 ± 0.034	5.81 ± 0.93	5
Τζινσενοσίδη Rc [90]	τζινσενοσίδη Rc	p.o. και i.v. / αρουραίου	701.4 ± 292.4 (p.o)	862,997.1 ± 19,811.2 (i.v) 14,990.1 ± 4288.7 (p.o)	1.10 ± 0.55 (p.o)	22.0 ± 1.9 (i.v) 23.6 ± 0.6 (p.o)	5

μήτρα: προέλευση της ένωσης; χορήγηση: τύπος χορήγησης του φαρμάκου; πλάσμα: τύπος του πλάσματος που αναλύεται; AUC_{t-∞}: περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου; C_{max}: μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου; T_{max}: χρόνος επίτευξης της C_{max}; t_{1/2}: ο χρόνος για να φθάσει το φάρμακο στο ήμισυ της αρχικής του συγκέντρωσης; p.o.: χορήγηση από το στόμα; i.v.: ενδοφλέβια χορήγηση; i.g.: ενδογαστρική χορήγηση.



Εικόνα 4.6. Χημική δομή αταξινόμητων φυτοχημικών ουσιών.

4.3. Συμπεράσματα

Τα φυσικά προϊόντα, και ιδίως τα φυτοχημικά, αν και παραδοσιακά έχουν αποτελέσει βάση για πολυάριθμα φάρμακα, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν εξαιρεθεί σε μεγάλο βαθμό από το πεδίο της ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων, εν μέρει λόγω της μειωμένης *in vivo* αποτελεσματικότητάς τους. Στο παρόν κεφάλαιο, συγκεντρώθηκαν οι πρόσφατες γνώσεις, κατά την τελευταία πενταετία, που σχετίζονται με κρίσιμες παραμέτρους βιοδιαθεσιμότητας διαφόρων φυτοχημικών ουσιών. Αυτό κατέστη εφικτό

μόνο χάρη στις τεχνικές εξελίξεις πάνω στις τεχνικές LC-MS/MS που προσφέρουν την απαιτούμενη ευαισθησία και εξειδίκευση για τις εν λόγω αναλύσεις. Ο συνεχής αγώνας για τη βελτίωση των υφιστάμενων αναλυτικών οργάνων και η καθιέρωση καινοτόμων διαδικασιών για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φυτοχημικών ουσιών σε βιολογικά δείγματα θα προωθήσει περαιτέρω τις γνώσεις σχετικά με τον μηχανισμό δράσης τους. Είναι προφανές ότι, παρόλο που ορισμένες κατηγορίες φυτοχημικών ουσιών παρουσιάζουν φτωχό προφίλ βιοδιαθεσιμότητας, οι εξελίξεις στη σύνθεση φυτοχημικών ουσιών με τη χρήση καλιξαρενίων, κυκλοδεξτρινών ή νανοσωματιδίων θα μπορούσαν να είναι κρίσιμες για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους και την αξιοποίηση του θεραπευτικού τους δυναμικού. Προς αυτή την κατεύθυνση, οι εξελίξεις στην τεχνική LC-MS/MS θα μπορούσαν να βοηθήσουν περαιτέρω στην πλήρη αξιοποίηση των ευεργετικών ιδιοτήτων των φυτοχημικών ουσιών στην ανθρώπινη υγεία.

4.4. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 311–335.
- [2] A.L. Harvey, R. Edrada-Ebel, R.J. Quinn, The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 111–129.
- [3] C.J. Dillard, J.B. German, Phytochemicals: nutraceuticals and human health, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1744–1756.
- [4] P.C. Hollman, M.B. Katan, Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man, *Biomed. Pharm.* 51 (1997) 305–310.
- [5] G. Williamson, C. Manach, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 243S–255S.
- [6] B. Holst, G. Williamson, A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds, *Nat. Prod. Rep.* 21 (2004) 425–447.
- [7] R. Urso, P. Blardi, G. Giorgi, A short introduction to pharmacokinetics, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 6 (2002) 33–44.
- [8] L. Biasutto, M. Zoratti, Prodrugs of quercetin and resveratrol: a strategy under development, *Curr. Drug Metab.* 15 (2014) 77–95.
- [9] S. Swaminathan, R. Cavalli, F. Trotta, Cyclodextrin-based nanosponges: a versatile platform for cancer nanotherapeutics development, *Wiley interdisciplinary reviews, Nanomed. Nanobiotechnol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.1384>.
- [10] K. Gulec, M. Demirel, Characterization and antioxidant activity of quercetin/Methyl- β -Cyclodextrin complexes, *Curr. Drug Deliv.* (2015).
- [11] A. Marston, K. Hostettmann, Natural product analysis over the last decades, *Planta Med.* 75 (2009) 672–682.
- [12] M.J. Gray, D. Chang, Y. Zhang, J. Liu, A. Bensoussan, Development of liquid chromatography/mass spectrometry methods for the quantitative analysis of herbal medicine in biological fluids: a review, *Biomed. Chromatogr: BMC* 24(2010) 91–103.
- [13] C.W.H. G. Stecher, W.M. Stöggel, W., Guggenbichler, R. Bakry, G.K. Bonn, High performance separation technologies and spectroscopic tools for plant extract characterization in phytomics, <http://dx.doi.org/10.1081/JLC-200053046>(2002).
- [14] D. Steinmann, M. Ganzera, Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 744–757.

- [15] R. Nicoli, S. Martel, S. Rudaz, J.L. Wolfender, J.L. Veuthey, P.A. Carrupt, D. Guillarme, Advances in LC platforms for drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 5 (2010) 475–489.
- [16] V. Kren, L. Martinkova, Glycosides in medicine: the role of glycosidic residue in biological activity, *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 1303–1328.
- [17] W. Yu, Y. Wang, Y. Zhang, D. Zhang, J. Lan, Z. Liu, J. Gu, J.P. Fawcett, Quantitation of bergenin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877(2009) 33–36.
- [18] X.B. Li, C.H. Liu, R. Zhang, X.T. Huang, Y.Y. Li, L. Han, M.L. Xu, S.Q. Mi, N.S. Wang, Determination and pharmacokinetics of amygdalin in rats by LC-MS-MS, *J. Chromatogr. Sci.* 52 (2014) 476–481.
- [19] X. Li, F. Shi, P. Gu, L. Liu, H. He, L. Ding, A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of amygdalin and paeoniflorin in human plasma and its application, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 92 (2014) 160–164.
- [20] W. Xu, Z. Deng, H. Guo, P. Ling, A rapid and sensitive determination of aucubinin rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic application, *Biomed. Chromatogr: BMC* 26 (2012)1066–1070.
- [21] X. Zheng, X.T. Huang, N. Li, Y.Y. Li, S.Q. Mi, N.S. Wang, C.H. Liu, Determination of geniposidic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to *in vivo* pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 887–888 (2012) 138–142.
- [22] S. Cao, B. Ni, L. Feng, X. Yin, H. Dou, J. Fu, L. Lin, J. Ni, Simultaneous determination of typhaneoside and isorhamnetin-3-O-neohesperidoside in rats after oral administration of pollen typhae extract by UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 866–871.
- [23] Y. Lu, N. Li, Y. Deng, L. Zhao, X. Guo, F. Li, Z. Xiong, Simultaneous determination of icariin naringin and osthole in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application for pharmacokinetic study after oral administration of Gushudan capsules, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 993–994(2015) 75–80.
- [24] N. Li, Y. Deng, D. Wang, Y. Qiao, F. Li, Determination of glibenclamide and puerarin in rat plasma by UPLC-MS/MS: application to their pharmacokinetic interaction study, *Talanta* 104 (2013) 109–115.

- [25] C. Gong, H. Yang, H. Wei, C. Qi, C.H. Wang, Pharmacokinetic comparisons by UPLC-MS/MS of isomer paeoniflorin and albiflorin after oral administration decoctions of single-herb *Radix Paeoniae Alba* and *Zengmian Yiliu* prescription to rats, *Biomed. Chromatogr: BMC* 29 (2015) 416–424.
- [26] J. He, C. Tian, H. Ouyang, T.A. Adalakun, B. Yu, Y. Chang, G. Pan, L. Jiang, X. Gao, Determination of swertianolin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr: BMC* 28 (2014) 1418–1422.
- [27] J. Zhu, B. Xue, B. Ma, Q. Zhang, M. Liu, L. Liu, D. Yao, H. Qi, Y. Wang, H. Ying, Z.Wu, A pre-clinical pharmacokinetic study in rats of three naturally occurring iridoid glycosides Picroside-I, II and III, using a validated simultaneous HPLC-MS/MS assay, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 993–994(2015) 47–59.
- [28] C.M. Lu, L.C. Lin, T.H. Tsai, Determination and pharmacokinetic study of gentiopicroside, geniposide, baicalin, and swertiamarin in Chinese herbal formulae after oral administration in rats by LC-MS/MS, *Molecules* 19 (2014)21560–21578.
- [29] M. Serafini, I. Peluso, A. Raguzzini, Flavonoids as anti-inflammatory agents, *Proc. Nutr. Soc.* 69 (2010) 273–278.
- [30] M.K. Chahar, N. Sharma, M.P. Dobhal, Y.C. Joshi, Flavonoids A versatile source of anticancer drugs, *Pharmacogn. Rev.* 5 (2011) 1–12.
- [31] A. Braca, C. Sortino, M. Politi, I. Morelli, J. Mendez, Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniae* flora, *J. Ethnopharmacol.* 79 (2002) 379–381.
- [32] S.H. Thilakarathna, H.P. Rupasinghe, Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement, *Nutrients* 5 (2013) 3367–3387.
- [33] T. Wang, L. Ding, H. Jin, R. Shi, Y. Li, J. Wu, Y. Li, L. Zhu, Y. Ma, Simultaneous quantification of catechin, epicatechin, liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, piperine, and glycyrrhetic acid in rat plasma by HPLC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study of Longhu Rendan pills, *Biomed. Chromatogr: BMC* (2015), <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.3662>.
- [34] Y.P. Wu, X.S. Meng, Y.R. Bao, S. Wang, Pharmacokinetic study of four flavones of *Glycyrrhiza* in rat plasma using HPLC-MS, *J. Ethnopharmacol.* 148 (2013)266–270.
- [35] P. Guo, L. Dong, W. Yan, J. Wei, C. Wang, Z. Zhang, Simultaneous determination of linarin, naringenin and formononetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a

pharmacokinetic study after oral administration of Bushen Guchi Pill, *Biomed. Chromatogr: BMC* 29 (2015) 246–253.

[36] C. Yan, H. Liu, L. Lin, Rapid LC-MS/MS determination and pharmacokinetic application of linarin in rat plasma, *Biomed. Chromatogr: BMC* 27 (2013) 186–190.

[37] X. Hua, Y.J. Fu, Y.G. Zu, L. Zhang, W. Wang, M. Luo, Determination of pinostrobin in rat plasma by LC-MS/MS: application to pharmacokinetics, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 841–845.

[38] D. Zhou, Y. Jin, F. Yao, Z. Duan, Q. Wang, J. Liu, Validated LC-MS/MS method for the simultaneous determination of hyperoside and 2-O-galloylhyperin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study in rats, *Biomed. Chromatogr: BMC* 28 (2014) 1057–1063.

[39] K.C. Wong, M.C. Law, M.S. Wong, T.H. Chan, Development of a UPLC-MS/MS bioanalytical method for the pharmacokinetic study of (–)-epiafzelechin aflavan-3-ol with osteoprotective activity, in C57BL/6J mice, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 967 (2014) 162–167.

[40] W.M. Zhang, R.F. Li, M. Sun, D.M. Hu, J.F. Qiu, Y.H. Yan, UPLC-MS/MS method for determination of avicularin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 965(2014) 107–111.

[41] Shingen Misakaa, Keisuke Kawabea, Satomi Onouea, José Pablo Werbac, J.K.Monica Girolic, Hiroshi Watanabed and Shizuo Yamadaa, Development of rapid and simultaneous quantitative method for green tea catechins on the bioanalytical study using UPLC/ESI–MS, <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.2740>(2012).

[42] B. Yan, G. Cao, T. Sun, X. Zhao, X. Hu, J. Yan, Y. Peng, A. Shi, Y. Li, W. Xue, M. Li, K. Li, Y. Liu, Determination of pinocembrin in human plasma by solid-phase extraction and LC/MS/MS: application to pharmacokinetic studies, *Biomed. Chromatogr: BMC* 28 (2014) 1601–1606.

[43] Y. Li, Y. Zhang, T. Yang, H. Li, J. Guo, Q. Zhao, J. Xie, Pharmacokinetics and tissue distribution study of Isovitexin in rats by HPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 991 (2015) 13–20.

[44] L.H. Fan, X. Li, D.Y. Chen, N. Zhang, Y. Wang, Y. Shan, Y. Hu, R.A. Xu, J. Jin, R.S.Ge, Determination of acacetin in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a

- pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 986–987 (2015) 18–22.
- [45] X. Zhang, J. Guan, H. Zhu, T. Niu, Simultaneous determination of scutellarin and tetrahydropalmatine of Deng-yan granule in rat plasma by UFLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 971 (2014) 126–132.
- [46] D. Bei, G. An, Quantification of 5,7-dimethoxyflavone in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and its application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 978–979 (2015) 11–17.
- [47] H. Liu, C. Yan, C. Li, L. Lin, LC-MS/MS determination of nevadensin in rat plasma and its application in pharmacokinetic studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74 (2013) 56–61.
- [48] W.M. Zhang, R.F. Li, J.F. Qiu, Z.Y. Zhang, H.B. Wang, L. Bian, J.H. Lei, Determination of kurarinone in rat plasma by UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 986–987 (2015) 31–34.
- [49] H.R. Jung, S.J. Kim, S.H. Ham, J.H. Cho, Y.B. Lee, H.Y. Cho, Simultaneous determination of puerarin and its active metabolite in human plasma by UPLC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 971 (2014) 64–71.
- [50] X.Z. Tong, H. Zhu, Y. Shi, H.T. Xu, B. Wang, J.H. Zhao, An LC/MS/MS method for simultaneous quantitation of two homoisoflavones: protosappanin B and brazilin with hypoglycemic activity in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and streptozotocin-treated rats, *J. Ethnopharmacol.* 148 (2013) 682–690.
- [51] A. Kumar, V.C. Devaraj, K.C. Giri, S. Giri, S. Rajagopal, R. Mullangi, Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for the determination of nobiletin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr: BMC* 26 (2012) 1464–1471.
- [52] R. Zhang, S. Wang, M. Lu, Z. Zhang, X. Tian, D. Lv, Simultaneous determination and pharmacokinetic study of three isoflavones from *Trifolium pratense* extract in rat plasma by LC-MS/MS, *Biomed. Chromatogr: BMC* 29 (2015) 210–219.
- [53] X. Yin, Z. Li, Y. Zhai, H. Zhang, L. Lin, P. Yang, S. Cao, J. Zhang, J. Qi, J. Tian, J. Fu, C. Qu, J. Ni, Development and validation of a highly sensitive LC-ESI-MS/MS method

for the determination of hyperoside in beagle dog plasma: application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr: BMC* 27 (2013) 807–811.

[54] R. Paduch, M. Kandefer-Szerszen, M. Trytek, J. Fiedurek, Terpenes: substances useful in human healthcare, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 55 (2007)315–327.

[55] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils—a review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475.

[56] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 223–253.

[57] E. Gonzalez-Burgos, M.P. Gomez-Serranillos, Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012)5319–5341.

[58] H. Wang, Y. Wang, X. Feng, J. Suo, N. Zhang, Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of pseudolaric acid B from the root bark of *Pseudolarix kaempferi* in rat plasma: application to a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108 (2015) 56–60.

[59] Y. Li, X.L. Liu, Z.G. Cai, S.X. Zhang, LC-ESI–MS/MS analysis and pharmacokinetics of jolkinolide B a potential antitumor active component isolated from *Euphorbia fischeriana*, in rat plasma, *Biomed. Chromatogr: BMC*28 (2014) 193–196.

[60] M. Song, D. Lee, T. Lee, S. Lee, Determination of leelamine in mouse plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 931 (2013) 170–173.

[61] C. Dong, C. Xu, H. Liu, S. Xu, Y. Gao, J. Peng, Absorption and metabolism characteristics of pristimerin as determined by a sensitive and reliable LC-MS/MS method, *Fitoterapia* 106 (2015) 62–67.

[62] Y. Yuan, H. Zhang, F. Sun, S. Sun, Z. Zhu, Y. Chai, Biopharmaceutical and pharmacokinetic characterization of asiatic acid in *Centella asiatica* as determined by a sensitive and robust HPLC-MS method, *J. Ethnopharmacol.*163 (2015) 31–38.

[63] J. Zhang, F. Zhao, X. Yu, X. Lu, G. Zheng, Pharmacokinetics of eupalinolide A and eupalinolide B and hyperoside from *Eupatorium lindleyanum* in rats by LC/MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 995–996 (2015)1–7.

[64] B. Ma, X. Li, J. Li, Q. Zhang, Y. Liu, X. Yang, J. Sun, D. Yao, L. Liu, X. Liu, H. Ying, Quantitative analysis of tenuifolin concentrations in rat plasma and tissue using LCMS/MS:

application to pharmacokinetic and tissue distribution study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 191–200.

[65] J. Wang, J. Ouyang, Y. Liu, X. Jia, S. You, X. He, X. Di, Development of a sensitive LC-MS/MS method for the determination of bilobalide in rat plasma with special consideration of ex vivo bilobalide stability: application to a preclinical pharmacokinetic study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95 (2014) 238–244.

[66] F. Wei, R.S. Singh, M. Fueth, S. Swarts, P. Okunieff, H. Derendorf, Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the determination of phytolaccagenin in rat plasma and application to a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 82–88.

[67] F.F. Xu, S.J. Fu, S.P. Gu, Z.M. Wang, Z.Z. Wang, X. He, W. Xiao, Simultaneous determination of andrographolide, dehydroandrographolide and neoandrographolide in dog plasma by LC-MS/MS and its application to a dog pharmacokinetic study of *Andrographis paniculata* tablet, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 990 (2015) 125–131.

[68] C. Zhao, N. Zhang, B. Chen, Y. Song, N. Zhu, L. Zhao, C. Liu, X. Meng, A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of 3,29-dibenzoyl rarounitriol in rat plasma: application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr: BMC* 29 (2015) 1229–1234.

[69] J. Zhang, X. Hu, W. Gao, Z. Qu, H. Guo, Z. Liu, C. Liu, Pharmacokinetic study oncostunolide and dehydrocostuslactone after oral administration of traditional medicine *Aucklandia lappa* Decne. by LC/MS/MS, *J. Ethnopharmacol.* 151(2014) 191–197.

[70] D. Dai, L. Pei, L. Tang, F. Chen, X. Chen, LC-MS/MS determination of bakkenolide D in rats plasma and its application in pharmacokinetic studies, *Biomed. Chromatogr: BMC* 27 (2013) 1200–1207.

[71] S. Liu, J. Zhang, L. Zhou, B. Yu, C. Li, Z. Liu, W. Ju, Quantification of limonin in human urine using solid-phase extraction by LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 907 (2012) 163–167.

[72] I. Podolak, A. Galanty, D. Sobolewska, Saponins as cytotoxic agents: a review, *Phytochem. Rev: Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 9 (2010) 425–474.

[73] Y. Feng, B. Chen, A. Lin, Y. Liu, Simultaneous determination of timosaponin B-II and A-III in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 965 (2014) 119–126.

[74] Z. Wang, Q. Wu, Y. Meng, Y. Sun, Q. Wang, C. Yang, Q. Wang, B. Yang, H. Kuang, Determination and pharmacokinetic study of two triterpenoid saponins in rat plasma after

oral administration of the extract of *Aralia elata* leaves by UHPLC-ESI-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 985(2015) 164–171.

[75] Z. Cheng, L. Zhang, Y. Zhang, G. Chen, H. Jiang, Simultaneous determination of capilliposide B and capilliposide C in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a PK study, *Bioanalysis* 6 (2014) 935–945.

[76] H. Ouyang, Y. Guo, M. He, J. Zhang, X. Huang, X. Zhou, H. Jiang, Y. Feng, S. Yang, A rapid and sensitive LC-MS/MS method for the determination of Pulsatillasaponin D in rat plasma and its application in a rat pharmacokinetic and bioavailability study, *Biomed. Chromatogr: BMC* 29 (2015) 373–378.

[77] Q. Zhan, F. Zhang, S.H. Gao, F. Cai, B. Jiang, L.N. Sun, W.S. Chen, An HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of platycodin D in rat plasma and its application to the pharmacokinetics of Platycodi Radix extract, *Chin. J. Nat. Med.* 12 (2014) 154–160.

[78] X. Guan, H. Chang, F. Sun, X. Chen, W. Zhang, G. Fan, Determination of esculentoside A in dog plasma by LC-MS/MS method: application to pre-clinical pharmacokinetics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72 (2013) 261–266.

[79] X. Zhang, Z. Guo, J. Li, Y. Ito, W. Sun, A new quantitation method of protodioscin by HPLC-ESI-MS/MS in rat plasma and its application to the pharmacokinetic study, *Steroids* 106 (2016) 62–69.

[80] Y. Zhai, P. Li, M. Wang, M. Gong, F. Qiu, Determination of astragaloside III in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a rat pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr: BMC* 30(2016) 105–110.

[81] S. Hyuga, M. Hyuga, N. Oshima, T. Maruyama, H. Kamakura, T. Yamashita, M. Yoshimura, Y. Amakura, T. Hakamatsuka, H. Odaguchi, Y. Goda, T. Hanawa, Ephedrine alkaloids-free Ephedra Herb extract: a safer alternative to ephedra with comparable analgesic, anticancer, and anti-influenza activities, *J. Nat. Med.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-016-0979-z>.

[82] D. Mabhiza, T. Chitemerere, S. Mukanganyama, Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. Med. Chem.* 2016(2016) 6304163.

[83] X. Zhou, Y.B. Liu, S. Huang, Y. Liu, An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of lycorine and galanthamine in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of *Lycoris radiata* extract in rats, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.*

Med. Sci. = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wenban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban 34 (2014) 861–868.

[84] X. Liu, Y. Hong, Q. He, K. Huang, Rapid and sensitive HPLC-MS/MS method for quantitative determination of lycorine from the plasma of rats, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 974 (2015) 96–100.

[85] Q. Wang, B. Tan, Y. Gong, G. Ji, Y. Zhang, P. Yang, W. Li, T. Shen, Determination of bulleyaconitine A in plasma by a sensitive LC-MS/MS method and its application to an oral pharmacokinetic study in rats, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 202–206.

[86] Q.Y. Li, K.T. Li, H. Sun, W. Jin, J.W. Shi, Y. Shi, LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of dehydrocorydaline in rat plasma after oral administration of dehydrocorydaline and *Corydalis yanhusuo* extract, *Molecules* 19 (2014) 16312–16326.

[87] Y. Chen, S. Zhang, D. Chen, M. Zhou, J. Zheng, Z. Xiang, An UPLC-MS/MS method for determination of solasonine in rat plasma and its application of a pharmacokinetic and bioavailability study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 985 (2015) 1–5.

[88] X.S. Wang, J.C. Sun, R.N. Yang, J. Ren, S. Liang, M. Sun, Y.F. Wang, S.G. Gao, Determination of cephalomannine in rat plasma by gradient elution UPLC-MS/MS method, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 963(2014) 70–74.

[89] P. Hou, Y. Zeng, B. Ma, X. Wang, Z. Liu, L. Li, K. Qu, K. Bi, X. Chen, A fast, sensitive, and high-throughput method for the simultaneous quantitation of three ellagitannins from *Euphorbiae pekinensis Radix* in rat plasma by ultra-HPLC-MS/MS, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2544–2551.

[90] Y. Chu, H.C. Zhang, S.M. Li, J.M. Wang, X.Y. Wang, W. Li, L.L. Zhang, X.H. Ma, S.P. Zhou, Y.H. Zhu, C.X. Liu, Determination of ginsenoside Rc in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 919–920 (2013) 75–78.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

*Λειτουργικά συστατικά του χαρουπιού: Συνδέοντας
το χημικό και βιολογικό χώρο*

5.1. Εισαγωγή

Η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua* L.) ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae* και καλλιεργείται ευρέως στην περιοχή της Μεσογείου, όπου θεωρείται σημαντικό συστατικό της βλάστησης τόσο για οικονομικούς όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους [1]. Η παγκόσμια παραγωγή εκτιμάται σε περίπου 160.000 τόνους/έτος, από περίπου 80.000 εκτάρια με πολύ μεταβλητές αποδόσεις ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή και την καλλιεργητική πρακτική [2]. Ο καρπός του χαρουπιού είναι ένας ανεξάρτητος λοβός, επιμηκυμένος, συμπιεσμένος, ίσιος ή καμπυλωτός, πυκνωμένος στα ράμματα, με μήκος 10 - 30 cm, πλάτος 1.5 - 3.5 cm και πάχος περίπου 1 cm με αμβλύ ή υποξεία κορυφή. Οι λοβοί είναι καφέ χρώματος με ρυτιδωμένη επιφάνεια και αποκτούν δερματοειδής όψη όταν ωριμάσουν. Ο πολτός του λοβού περιλαμβάνει ένα εξωτερικό δερματοειδές στρώμα (περικάρπιο) και μία μαλακότερη εσωτερική περιοχή (μεσοκάρπιο). Οι σπόροι εμφανίζονται στον λοβό εγκάρσια, χωρισμένοι από το μεσοκάρπιο [3].

Ο καρπός του χαρουπιού (λοβός) περιέχει δύο μεγάλα τμήματα (μέρη): τον πολτό (90%) και τους σπόρους (10%). Η χημική σύνθεση του πολτού εξαρτάται από την ποικιλία, την προέλευση και τον χρόνο συγκομιδής. Ο πολτός του χαρουπιού έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (κυρίως σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) σε ποσοστό (48 %-56 %). Επιπλέον, περιέχει περίπου 18 % κυτταρίνη και ημικυτταρίνη. Οι ώριμοι λοβοί χαρουπιού περιέχουν επίσης μεγάλη ποσότητα συμπυκνωμένων τανινών (16 % -20 % επί του ξηρού βάρους) [4].

Οι σπόροι του χαρουπιού συνήθως χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κόμμεως χαρουπιού (Locust Bean Gum, LBG). Το κόμμι προέρχεται από το ενδοσπέρμιο του σπόρου και χημικώς χαρακτηρίζεται ως γαλακτομαννάνη. Προστίθεται ως πυκνωτικό, σταθεροποιητικό ή αρωματικό στα τρόφιμα. Εκτός από τη βιομηχανία τροφίμων, το LBG χρησιμοποιείται ευρέως για φαρμακευτικούς σκοπούς καθώς και ως ανασταλτικός παράγοντας γαστρεντερικών παθήσεων [5-8]. Επιπλέον, το LBG χρησιμοποιείται μόνο του ως φορέας για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων ή σε συνδυασμό με άλλα μόρια-φορείς [9-16].

Πρόσφατα, οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην αξιοποίηση των λοβών χαρουπιού, καθώς αποτελούν εξαιρετική πηγή βιοδραστικών ενώσεων, όπως διαιτητικές ίνες, πολυφαινόλες και κυκλιτόλες, ενώ περιέχουν χαμηλές ποσότητες λίπους. Επιπλέον, οι λοβοί χαρουπιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο του κακάο αφού δεν περιέχουν

καφεΐνη και θεοβρωμίνη. Ολόκληρο το μη επεξεργασμένο φρούτο ή τα παραπροϊόντα του, όπως το φύτρο, το εκχύλισμα του λοβού, οι λοβοί χωρίς τους σπόρους και η φλούδα του σπόρου, έχουν επίσης αποτελέσει αντικείμενο έρευνας από τεχνολόγους τροφίμων. Διαφορετικά μέρη φρούτων χαρουπιού έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστατικά τροφίμων σε προϊόντα αρτοποιίας και ζαχαροπλαστικής [17,18], καθώς και σε ζυμούμενα και μη ζυμαρικά, λόγω των ιδιοτήτων τους που προάγουν την υγεία [19-21]. Επιπλέον, οι ερευνητές προσπάθησαν να παρασκευάσουν ροφήματα και αφεψήματα με βάση το χαρούπι [22,23]. Οι λοβοί χαρουπιού συνιστούν ένα ιδανικό υπόστρωμα, μέσω χρήσης της βιοτεχνολογίας, για την παραγωγή διαφόρων συστατικών τροφίμων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή κιτρικού οξέος [24], γαλακτικού οξέος [25], μαννιτόλης [26], ηλεκτρικού οξέος [27] και αιθανόλης [28].

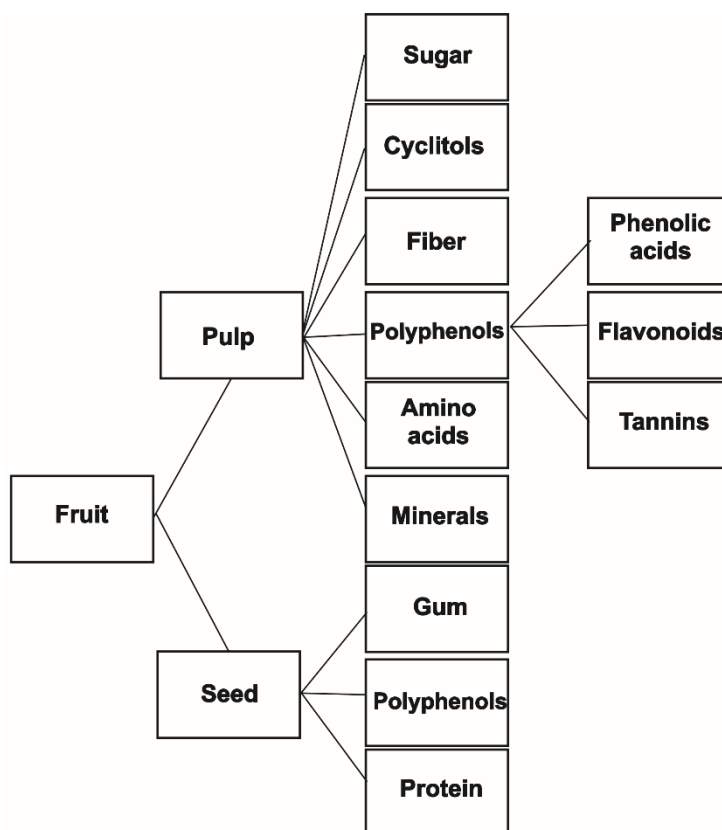
Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει σημαντικά ευρήματα σχετικά με τη βιοδραστικότητα των συστατικών του πολτού χαρουπιού. Οι φυτικές ίνες, οι κυκλιτόλες, οι πολυφαινόλες και οι τανίνες έχουν προσελκύσει κυρίως την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας. Αυτές οι ομάδες βιοδραστικών ενώσεων έχουν συνδεθεί με τις προαγωγικές για την υγεία επιδράσεις του χαρουπιού σε διάφορους θεραπευτικούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων αγωγών κατά του καρκίνου, του διαβήτη, της διάρροιας, της υπερλιπιδαιμίας κτλ. [29-34]. Αυτά τα ευρήματα έχουν καταστήσει το χαρούπι ένα εξαιρετικό συστατικό για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων και φυτικών συμπληρωμάτων. Η αξιοποίηση αυτών των βιοδραστικών συστατικών γίνεται ακόμα πιο ελκυστική, αν λάβουμε υπόψη ότι συνήθως απορρίπτονται ως απόβλητα, καθώς κυρίως το LBG και τα απλά σάκχαρα χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων.

Στον παρόν κεφάλαιο, αναδεικνύονται οι ευεργετικές επιδράσεις του καρπού του χαρουπιού. Σε μια προσπάθεια κριτικής παρουσίασης και αξιολόγησης των επιδράσεων του στην υγεία, παρουσιάζεται η θρεπτική και βιοδραστική σύνθεση του, ακολουθούμενη από τις επιδράσεις του στην ανθρώπινη υγεία. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί επίσης στις κλινικές δοκιμές και στα σκευάσματα φαρμάκων με βάση το χαρούπι.

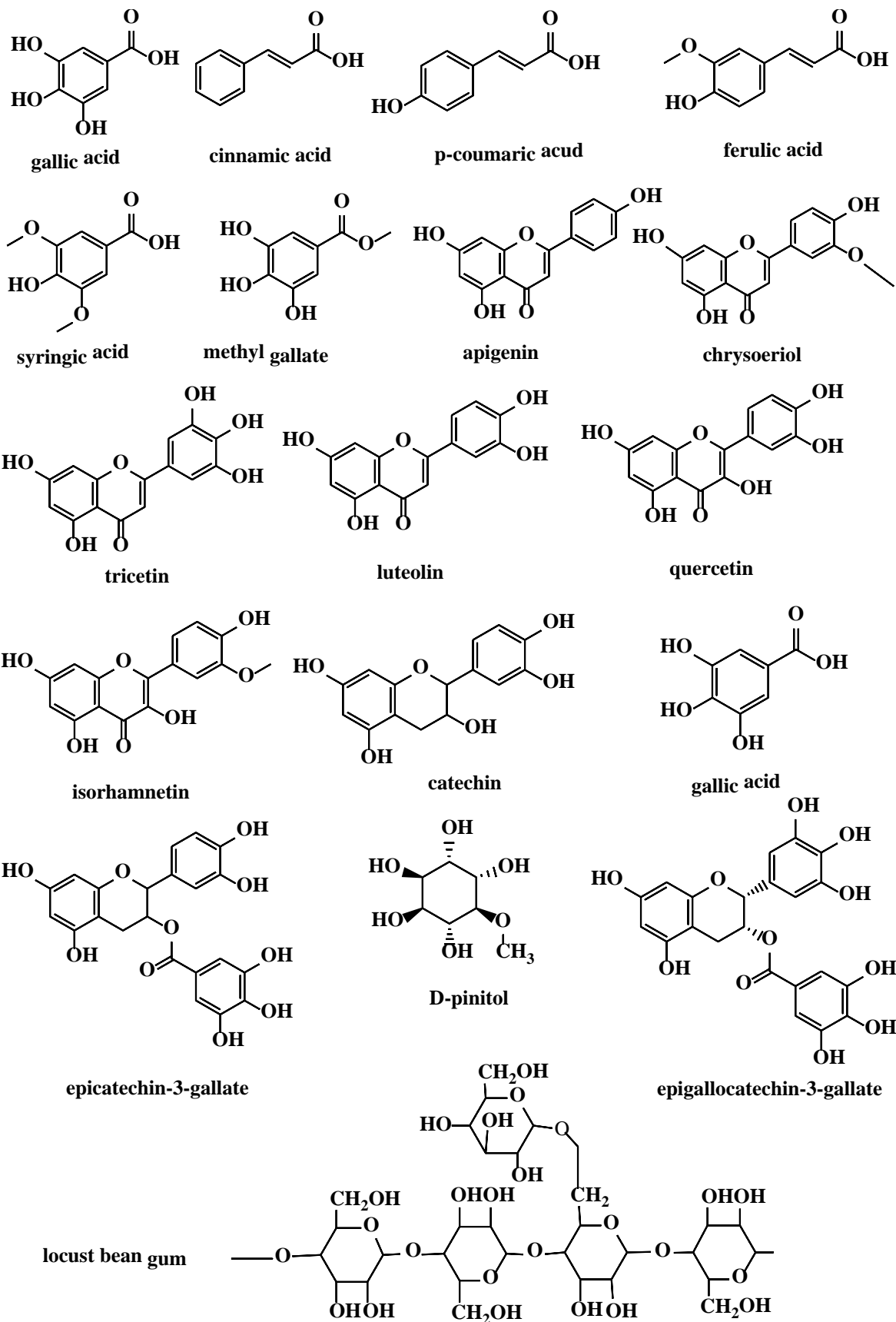
5.2. Λειτουργικά χημικά συστατικά χαρουπιού

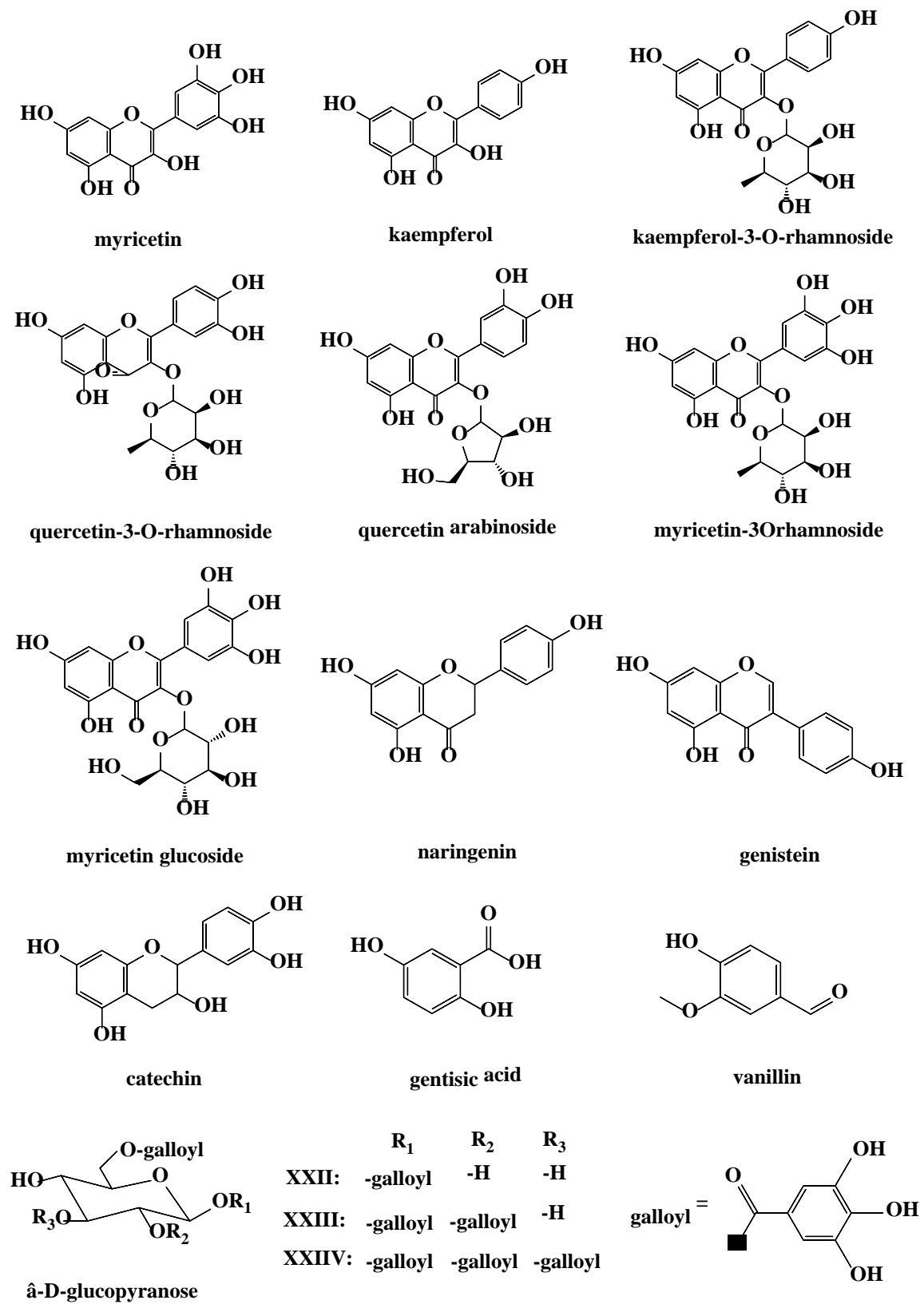
Ο καρπός του χαρουπιού είναι ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών, με την παρουσία σακχάρων και ινών να είναι χαρακτηριστικά για αυτά τα φρούτα, ακολουθούμενα από μια μεγάλη ποικιλία πολυφαινολών. Πολλά ανόργανα άλατα

και αμινοξέα υπάρχουν επίσης στο χαρούπι. Η **Εικόνα 5.1** συνοψίζει τα κύρια συστατικά του πολτού και του σπόρου του χαρουπιού ενώ στην **Εικόνα 5.2** παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές δομές βιοδραστικών συστατικών στον καρπό του χαρουπιού. Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα χημικά συστατικά του χαρουπιού με βιοδραστικότητα ή/και οικονομική σημασία.



Εικόνα 5.1. Κύρια χημικά συστατικά στον πολτό και τους σπόρους του χαρουπιού με θρεπτική αξία και ιδιότητες που προάγουν την υγεία.

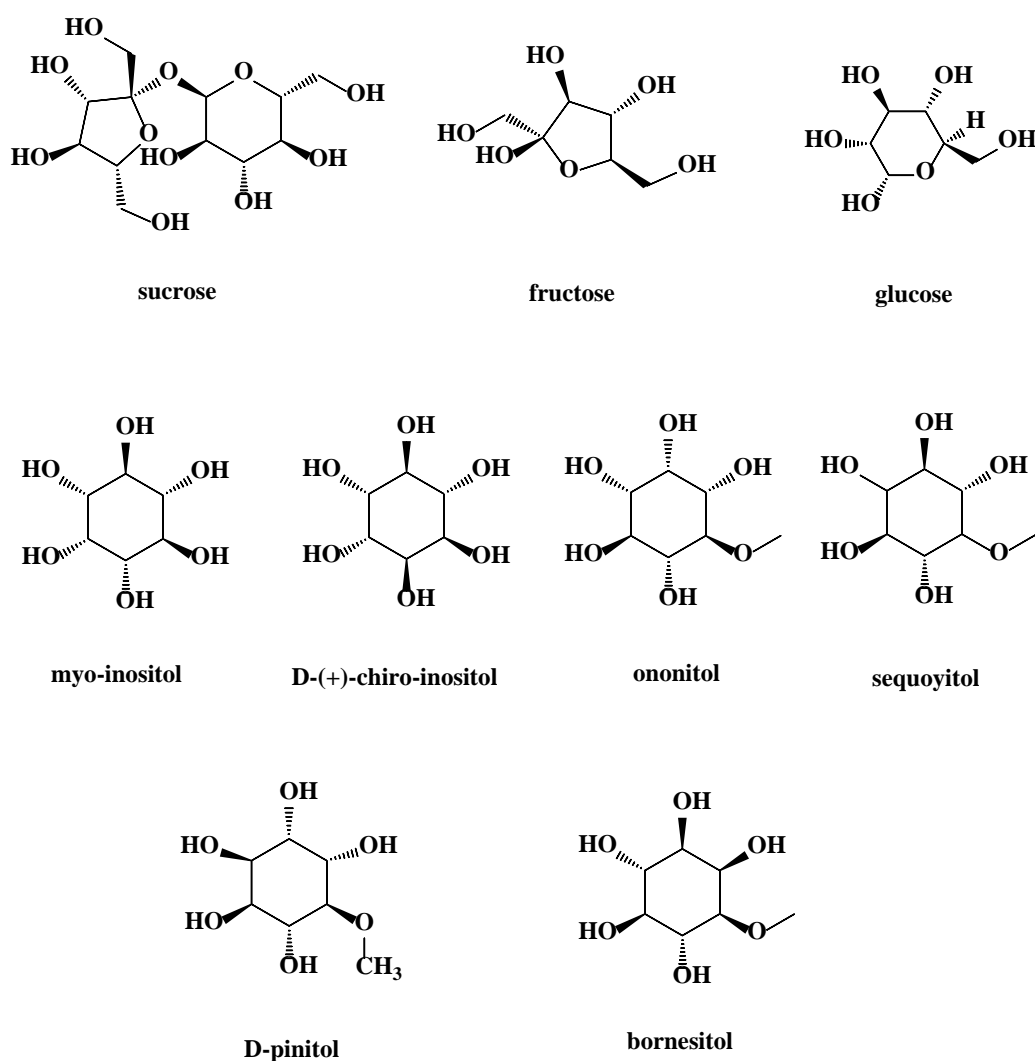




Εικόνα 5.2. Δομές των σημαντικότερων βιοδραστικών συστατικών στον καρπό του χαρουπιού.

5.2.1. Σάκχαρα

Ο καρπός του χαρουπιού είναι γνωστός για την υψηλή περιεκτικότητά του σε σάκχαρα που είναι υπεύθυνα για τη θρεπτική αξία των σπόρων του χαρουπιού (**Εικόνα 5.3**). Προηγούμενες μελέτες ανέφεραν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα ανάμεσα στις διάφορες ποικιλίες κυμαινόταν μεταξύ 40 - 55 g 100 g⁻¹ d.m. [3,35,36]. Γενικά, οι καλλιεργούμενες ποικιλίες χαρουπιού έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα από τις άγριες [35]. Όσον αφορά τη σύσταση των σακχάρων, η σακχαρόζη είναι ο κύριος υδατάνθρακας στο χαρούπι και η συγκέντρωσή του μπορεί να φτάσει έως και τα 52 g 100 g⁻¹ d.m. [3,35]. Φρουκτόζη και γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 1.8 - 12.5 g 100 g⁻¹ d.m. και 1.8 - 10.2 g 100 g⁻¹ d.m. αντίστοιχα, υπάρχουν επίσης στο χαρούπι [35,36]. Τα σάκχαρα του χαρουπιού συνήθως εξάγονται για την παραγωγή φυσικού σιροπιού χαρουπιού. Επιπλέον, έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, μια καινοτόμος διαδικασία για την ανάκτηση τους προκειμένου να παραχθεί σιρόπι χαρουπιού [37].

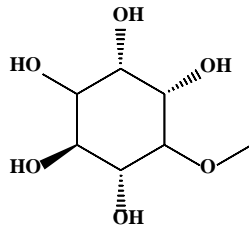


Εικόνα 5.3. Χημικές δομές των σημαντικότερων σακχάρων στο χαρούπι.

5.2.2. Κυκλιτόλες

Όπως απ' όλα τα όσπρια, ένα σύνολο κυκλιτολών με πολλαπλά οφέλη για την υγεία έχουν χαρακτηριστεί από το χαρούπι [38]. Η κύρια κυκλιτόλη είναι η D-πινιτόλη (3-Ο-μεθυλ-D-χειρο-ινοσιτόλη) και η συγκέντρωσή της ποικίλει από 1.0 - 8.5 g 100 g⁻¹ d.m. (**Εικόνα 5.4**). Η συγκέντρωσή της D-πινιτόλης επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντολογικούς παράγοντες, με τη μέση περιεκτικότητα σε D-πινιτόλη των καλλιεργειών άγριου χαρουπιού να είναι υψηλότερη από τη μέση περιεκτικότητα του καλλιεργούμενου [35]. Η παρουσία της D-πινιτόλης είναι πολύ σημαντική καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της νοθείας χαρουπιού από κακάο [39]. Επιπλέον, το χαρούπι μπορεί να θεωρηθεί ως μια εξαιρετική πηγή D-πινιτόλης και η διαδικασία απομόνωσης της

έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας [40]. Πρόσφατα, έχουν προταθεί μεθοδολογίες απομόνωσης της D-πινιτόλης από το χαρούπι με εκχύλιση με υπερήχους και εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό [23,41]. Τέλος, η μυο-ινοσιτόλη, η D-(+)-χειρο-ινοσιτόλη, η ονονιτόλη (4-O-μεθυλ-μυο-ινοσιτόλη), η σεκουγιτόλη (5-O-μεθυλ-μυο-ινοσιτόλη) και η βορνεσιτόλη (1-O-μεθυλ-μυο-ινοσιτόλη) έχουν εντοπιστεί μόνο σε ίχνη [39].



Εικόνα 5.4. Η χημική δομή της D-πινιτόλης.

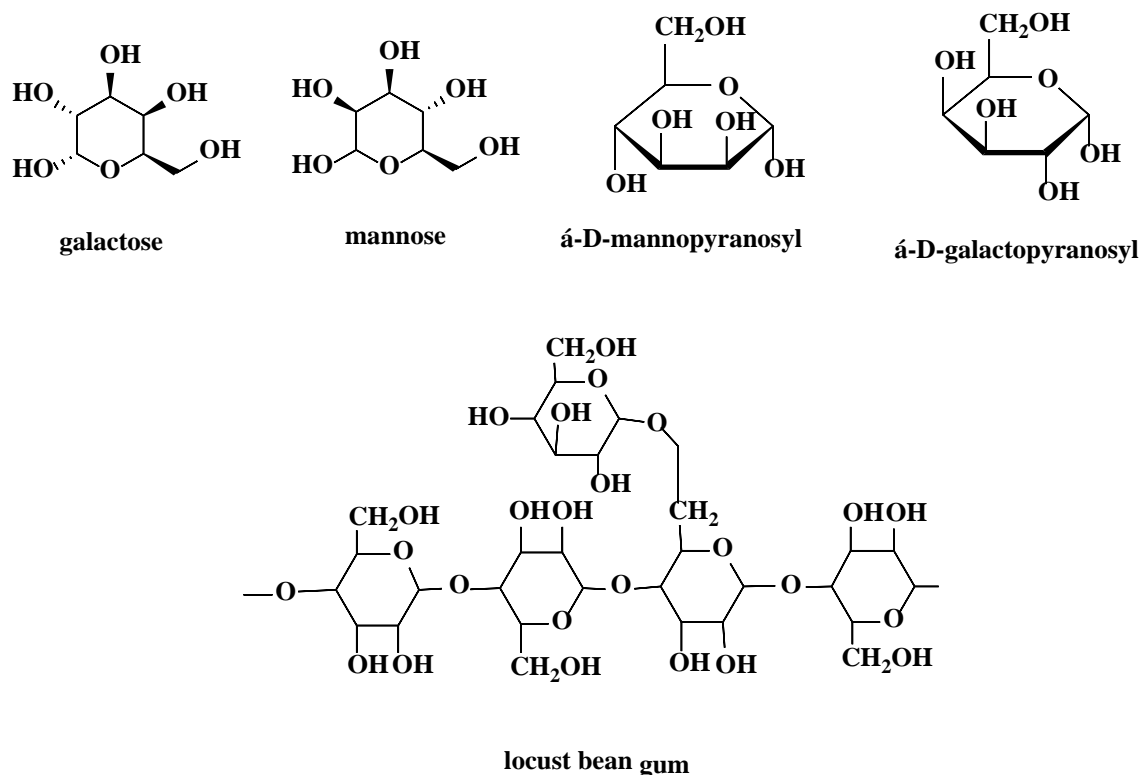
5.2.3. Διαιτητικές ίνες

Οι διαιτητικές ίνες είναι μια ετερογενής ομάδα ουσιών, που συνήθως υποδιαιρούνται σε διαλυτές και αδιάλυτες ίνες. Οι ίνες του χαρουπιού παράγονται με υδατική εκχύλιση του πολτού του χαρουπιού ώστε να αφαιρεθεί η πλειοψηφία των διαλυτών υδατανθράκων. Η συνολική περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες κυμαίνεται συνήθως από 30 % - 40 % του πολτού [41]. Έχει ήδη κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μέθοδος παρασκευής φυσικών ινών χαρουπιού [42]. Το αδιάλυτο κλάσμα διαιτητικών ινών αποτελείται από κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, λιγνίνη και αδιάλυτες πολυφαινόλες και η ελάχιστη περιεκτικότητα του υπερβαίνει το 70 % των ινών χαρουπιού. Επιπλέον το υψηλό ποσοστό πολυφαινολών που υπάρχουν στις ίνες χαρουπιού το διαφοροποιεί από άλλες πηγές διαιτητικών ινών. Γενικά, οι ίνες χαρουπιού θεωρούνται ως επί το πλείστο αδιάλυτες και πρακτικά μη ζυμώσιμες φυτικές ίνες [43]. Αντιθέτως, η ποσότητα των διαλυτών διαιτητικών ινών είναι σημαντικά χαμηλότερη (10 g 100 g⁻¹ χαρουπιού) και περιέχει απλούς υδατάνθρακες, όπως αναπτύχθηκε διεξοδικά στην προηγούμενη ενότητα. Τέλος, οι ίνες χαρουπιού έχουν μεγάλη επίδραση στη ρεολογία της ζύμης όταν χρησιμοποιείται ως συστατικό σε προϊόντα αρτοποιίας [44,45].

5.2.4. Κόμμι χαρουπιού (LBG)

Το LBG είναι μια λευκή έως κρεμώδης λευκή σκόνη που λαμβάνεται από το ενδοσπέρμιο των σπόρων του λοβού της χαρουπιάς. Περιλαμβάνει έναν πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους που αποτελείται από γαλακτομαννάνη και η συγκέντρωση του μπορεί να φτάσει έως και το 85 % του σπόρου του χαρουπιού. Η γαλακτόζη και η μαννόζη είναι τα δύο συστατικά του LBG (Εικόνα 5.5). Συγκεκριμένα, η γαλακτομαννάνη του σπόρου του χαρουπιού αποτελείται από μια γραμμική αλυσίδα (1→4) συνδεδεμένων μονάδων α-D-μαννοπυρανοσυλίου με (1→6) συνδεδεμένα κατάλοιπα α-D-γαλακτοπυρανοζυλίου ως πλευρικές αλυσίδες. Η αναλογία γαλακτόζης προς μαννόζης στο LBG έχει υπολογιστεί μεταξύ 1:3.1 - 1:3.9 και η περιεκτικότητα σε μαννόζη και γαλακτόζη 77 %–78 % και 21 %–23 %, αντίστοιχα. Η κατανομή των καταλοίπων D-γαλακτοζυλίου ή πλευρικών αλυσίδων κατά μήκος του σκελετού της μαννόζης μπορεί να είναι τυχαία, κατά κατηγορία (block wise) και με σειρά. Το μοριακό βάρος και η δομή των γαλακτομαννανών έχουν μεγάλη σημασία, καθώς επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις λειτουργικές ιδιότητες του LBG [46,47], ενώ έχουν μελετηθεί εκτενώς η διαλυτότητα, η ρεολογία, το ιξώδες, ο ρυθμός ενυδάτωσης, ο σχηματισμός συνεργιστικής γέλης και η προσρόφηση νερού [48].

Τέλος, πολλά διπλώματα ευρεσιτεχνίας περιγράφουν τη χρήση του LBG σε προϊόντα διατροφής όπως ζελέ, βρεφικές τροφές κ.λπ. [49,50]. Το LBG αξιοποιείται επίσης για την ανάπτυξη νέων παραγώγων για τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων [51].



Εικόνα 5.5. Οι χημικές δομές των συστατικών του LBG στο χαρούπι.

5.2.5. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες συνιστούν μία από τις πιο κοινές και διαδεδομένες ομάδες ουσιών στα φυτά. Αρκετές χιλιάδες φυτικές πολυφαινόλες είναι γνωστές, οι οποίες περιλαμβάνουν μεγάλη ποικιλία μορίων που αποτελούνται από έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με μεταβλητούς βαθμούς υδροξυλίωσης, μεθοξυλίωσης και γλυκοξυλίωσης [52]. Οι κύριες κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στον καρπό του χαρουπιού είναι τα φαινολικά οξέα, οι γαλλοταννίνες και τα флаβονοειδή. Η συγκέντρωση πολυφαινολών στο χαρούπι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από γενετικές, περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και από μεθόδους εκχύλισης και κυμαίνεται μεταξύ 45 και 5376 mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος ανά 100 g [53-55]. Στους καρπούς του χαρουπιού, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται ως ελεύθερες, ως δεσμευμένες ή ως διαλυτές συζευγμένες μορφές, με τον Dubravka και τους συνεργάτες του, να αναφέρουν ότι η πλειοψηφία των πολυφαινολικών ενώσεων του χαρουπιού συνδέονται ομοιοπολικά με τις διαιτητικές ίνες [56]. Επιπλέον, το φύτρο και ο σπόρος του χαρουπιού είναι πλούσιες πηγές πολυφαινολικών ενώσεων [1]. Η σύσταση σε πολυφαινολικές ενώσεις των διαφόρων τμημάτων του

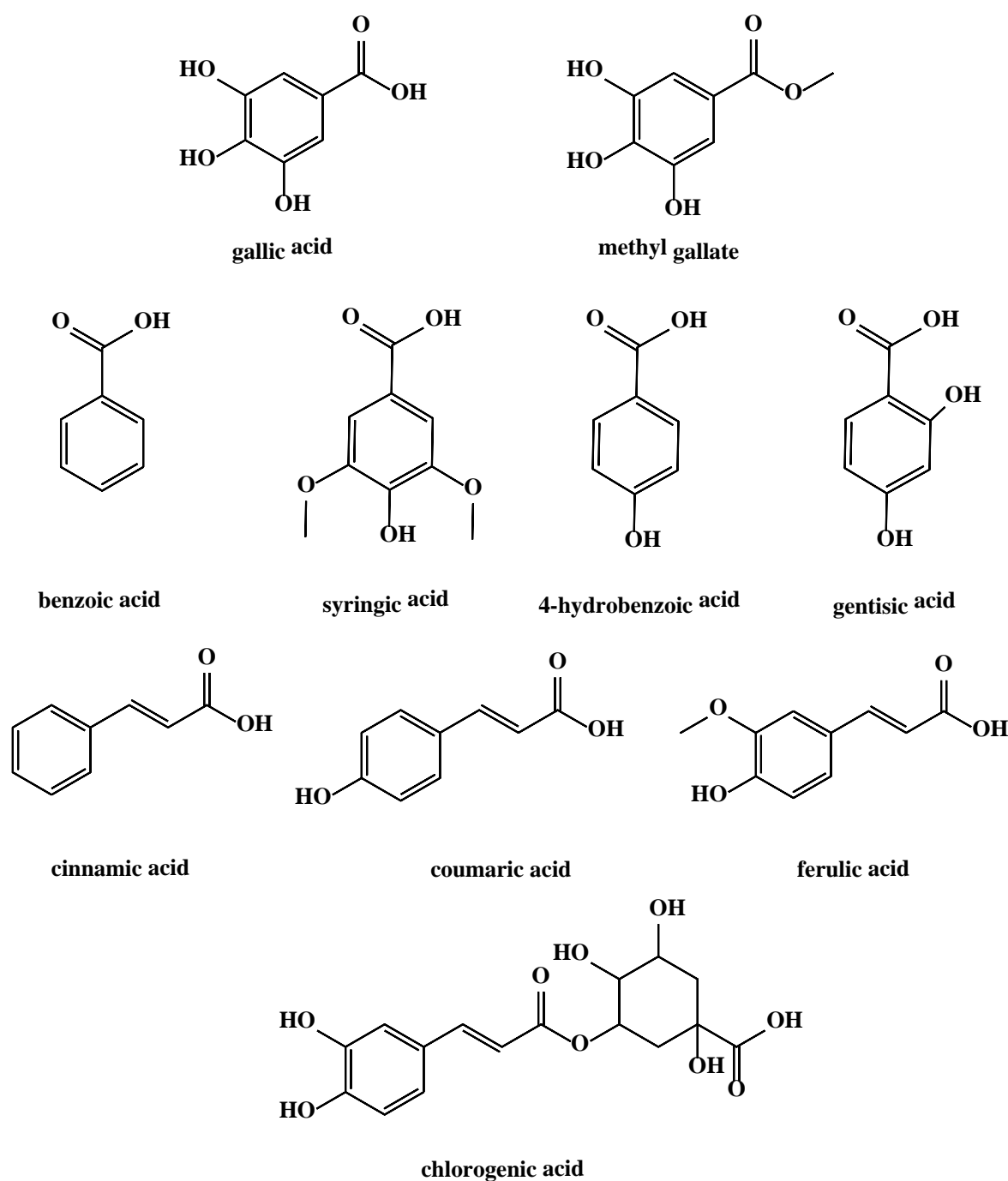
χαρουπιού παρουσιάζεται στον **Πίνακα 5.1**. Δεδομένου ότι οι πολυφαινόλες χαρουπιού έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, έχουν προταθεί πολλές μέθοδοι εκχύλισης για την ανάκτηση πολυφαινολών από το χαρούπι [55,57,58]. Επιπλέον, έχει κατοχυρωθεί δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την εξαγωγή και τον καθαρισμό πολυφαινολικών ενώσεων [59].

Πίνακας 5.1. Σύνοψη των πιο κοινών πολυφαινολικών ενώσεων στα διάφορα μέρη του καρπού του χαρουπιού.

Πολυφαινόλες	Μέρος/Τμήμα χαρουπιού	Αναφορά
Φαινολικά οξέα		
4-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ	Πολτός	57
Καφεϊκό οξύ	Πολτός	57
Χλωρογενικό οξύ	Σπόρος	60
Κιναμωμικό οξύ	Ύνες, πολτός	57, 61
π-κουμαρικό οξύ	Ύνες, πολτός	57, 61
Φερουλικό οξύ	Ύνες, πολτός, σπόρος	57, 60, 61
Γαλλικό οξύ	Πολτός, ίνες, σπόρος	53, 60, 62
Γεντισικό οξύ	Σπόρος	60
Συριγγικό οξύ	Πολτός, σπόρος	57, 60
Φλαβονοειδή		
(επι)γαλλοκατεχίνη	Ύνες	53
(επι)γαλλοκατεχίνη γαλλική	Ύνες	53
Απιγενίνη	Ύνες, πολτός	57, 61
Κατεχίνη	Πολτός, σπόρος	53, 60, 62
Χρυσοεριοόλη	Ύνες, πολτός	57, 61
Εριοδικτυόλη	Πολτός	57
Γενιστεΐνη	Πολτός	57
Ισορχαμνετίνη	Ύνες, πολτός	57, 61
Καϊμπερόλη	Ύνες, πολτός	53, 57, 61
Καϊμπερόλο-ραμνοσίδη	Ύνες	61
Καϊμπερόλο-δεσοξυ-εξοσίδη	Πολτός	53
Λουτεολίνη	Ύνες, πολτός	57, 61
Μυρικετίνη	Σπόρος	60
Μυρικετίνιο-3-Ο-ραμνοσίδη και -δεσοξυ-εξοσίδη	Ύνες	61
Μυρικετίνιο-3-Ο-εξοσίδη	Ύνες, πολτός	53, 57, 61
Ναρινγενίνη	Ύνες, πολτός	57, 61
Κερκετίνη	Ύνες, σπόρος	60, 61
Κερκετίνιο-3-Ο-αραβινοσίδη	Ύνες	61
Κερκετίνιο-όξυ και δεσοξυ-εξοσίδη	Ύνες, πολτός	53
Κερκετίνιο-3-Ο-ραμνοσίδη	Πολτός	57

Τρικετίνη 3', 5' διμεθυλαιθέρας	Ύνες, πολτός	57, 61
Ταννίνες		
(επι)γαλλοκατεχίνη + 4 μονάδες γαλλικού οξέος	Ύνες	53
Εξόζη + 2 ή 3 ή 4 ή 5 μονάδες γαλλικού οξέος	Ύνες	53, 61
Πεντόζες + 2 μονάδες γαλλικού οξέος	Ύνες	53
Διμερή και τριμερή προδελφινιδίνης	Ύνες	53

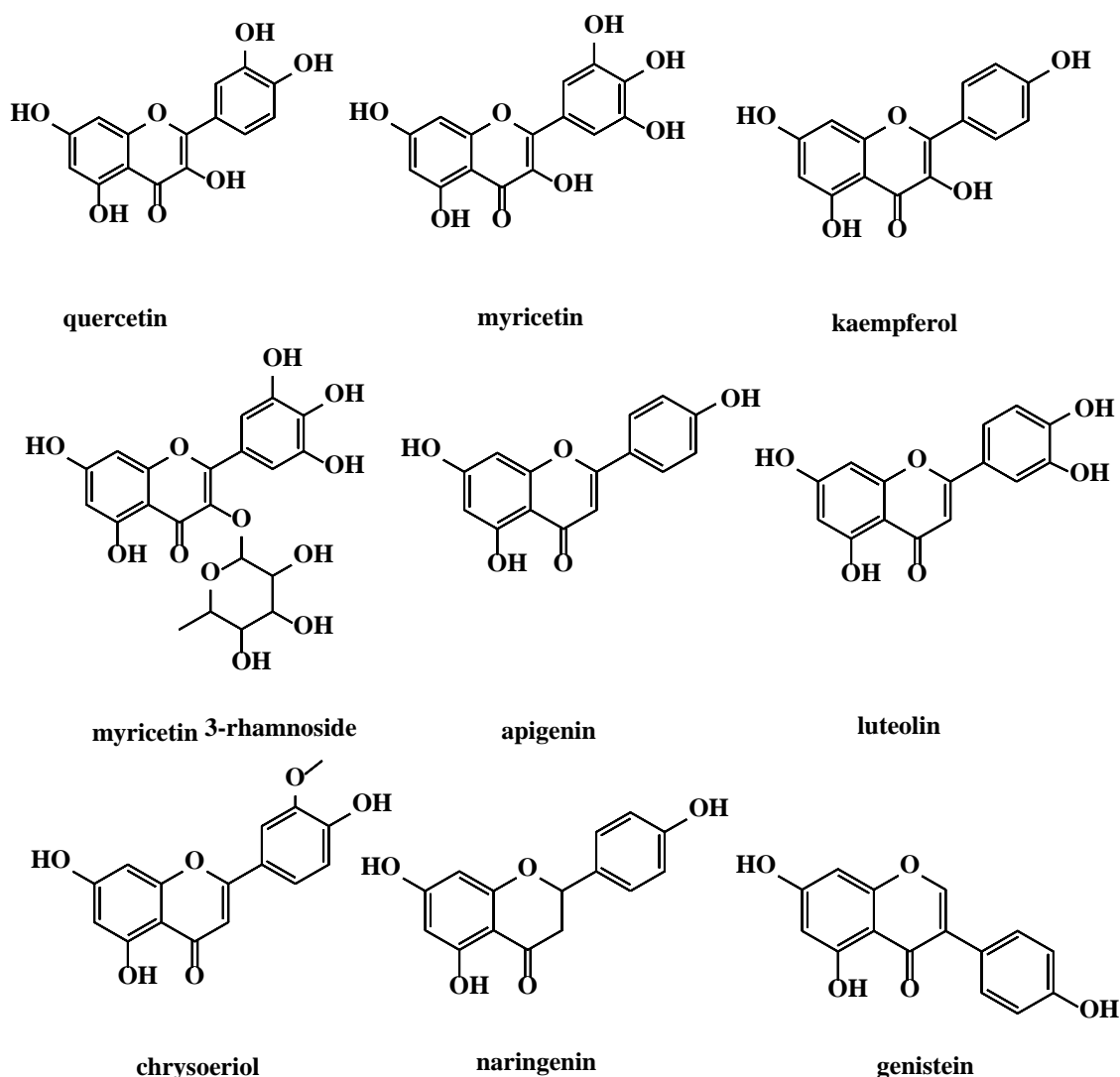
Τα φαινολικά συστατικά, υποδιαιρούμενα σε βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, είναι η πιο άφθονη κατηγορία πολυφαινολών στον καρπό του χαρουπιού (**Εικόνα 5.6**). Πράγματι, το γαλλικό οξύ και τα παράγωγα του, όπως ο μεθυλεστερας γαλλικού οξέος, συνιστούν την πλειοψηφία των φαινολικών οξέων [53,61]. Ο καρπός του χαρουπιού είναι μία από τις πλουσιότερες πηγές γαλλικού οξέος καθώς η περιεκτικότητά του έχει εκτιμηθεί μεταξύ 23.7 mg 100 g⁻¹ και 164.7 mg 100 g⁻¹ [53,61,63]. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων «Phenol-Explorer», μόνο το κάστανο και το γαρύφαλλο είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε γαλλικό οξύ από το χαρούπι. Το συριγγικό οξύ, το 4-υδροβενζοϊκό οξύ και το γεντισικό οξύ είναι επίσης βενζοϊκά οξέα που βρίσκονται στον καρπό του χαρουπιού [53,57,62]. Η συγκέντρωση των κινναμωμικών οξέων στο χαρούπι είναι σχετικά χαμηλή. Κινναμωμικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ και χλωρογενικό οξύ έχουν ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα καρπών χαρουπιού [57,62,64].



Εικόνα 5.6. Χημικές δομές φαινολικών οξέων στο χαρούπι.

Τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύουν την πιο ευρεία ομάδα των πολυφαινολικών, αποτελούμενα από 15 άτομα άνθρακα με δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) στο μόριο τους που συνδέονται μέσω μιας αλυσίδας τριών ανθράκων συνήθως με την μορφή ετεροκυκλικού δακτυλίου C. (**Εικόνα 5.7**). Με βάση την κατάσταση οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου, τα φλαβονοειδή υποδιαιρούνται περαιτέρω σε ανθοκυανίνες,

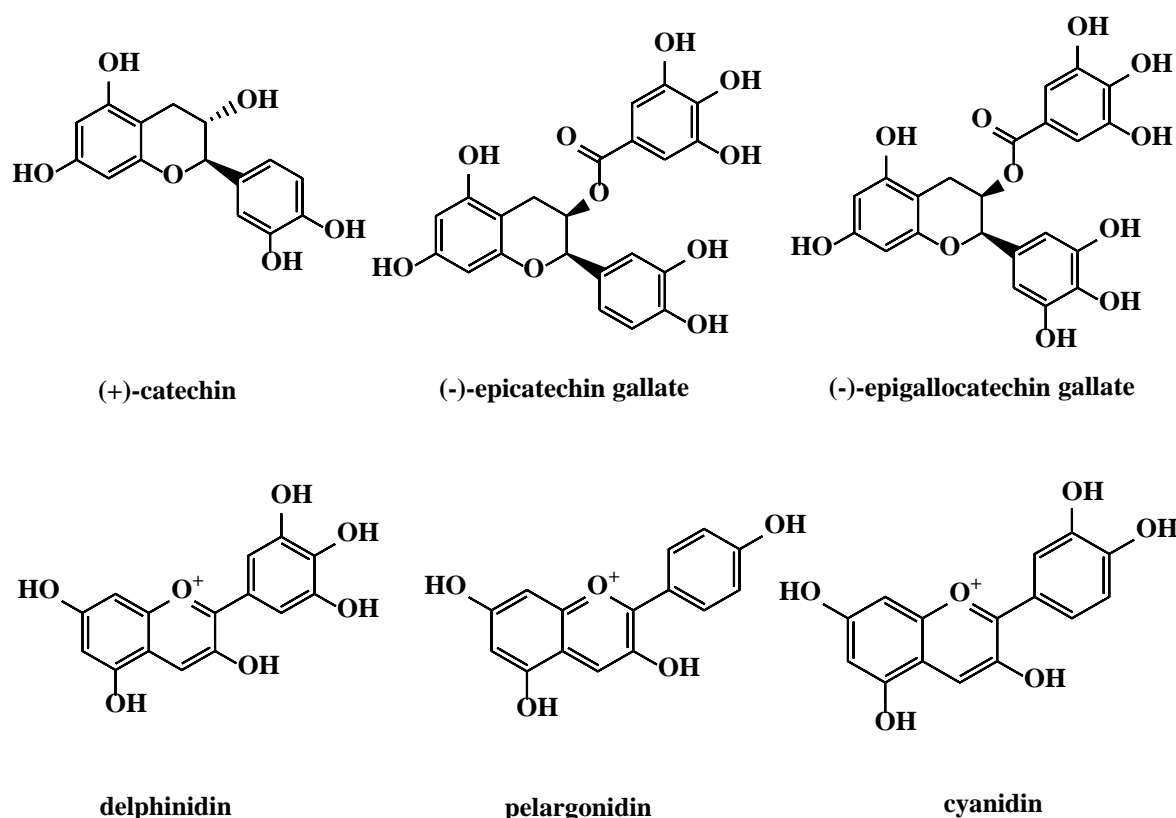
φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες και ισοφλαβονοειδή. Ο καρπός του χαρουπιού είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε φλαβονόλες όπως η κερκετίνη, η μυρικετίνη, η καμπφερόλη και τα γλυκοσιδικά παράγωγα τους. Η κερκετίνη και η μυρικετίνη-ραμνοσίδη είναι συνήθως τα πιο άφθονα φλαβονοειδή στο χαρούπι, ενώ σημαντική είναι και η παρουσία φλαβονών (απιγενίνη, λουτεολίνη και χρυσοερίολη), φλαβανονών (ναρινγενίνη) και ισοφλαβονών (γενιστεΐνη) [53,61,64].



Εικόνα 5.7. Χημικές δομές φλαβονοειδών στο χαρούπι.

Οι τανίνες αποτελούν την πιο χαρακτηριστική ομάδα πολυφαινόλων στο χαρούπι και συμβάλλουν στη στυφότητα του. Στον χυμό χαρουπιού, η συγκέντρωση τανινών είναι

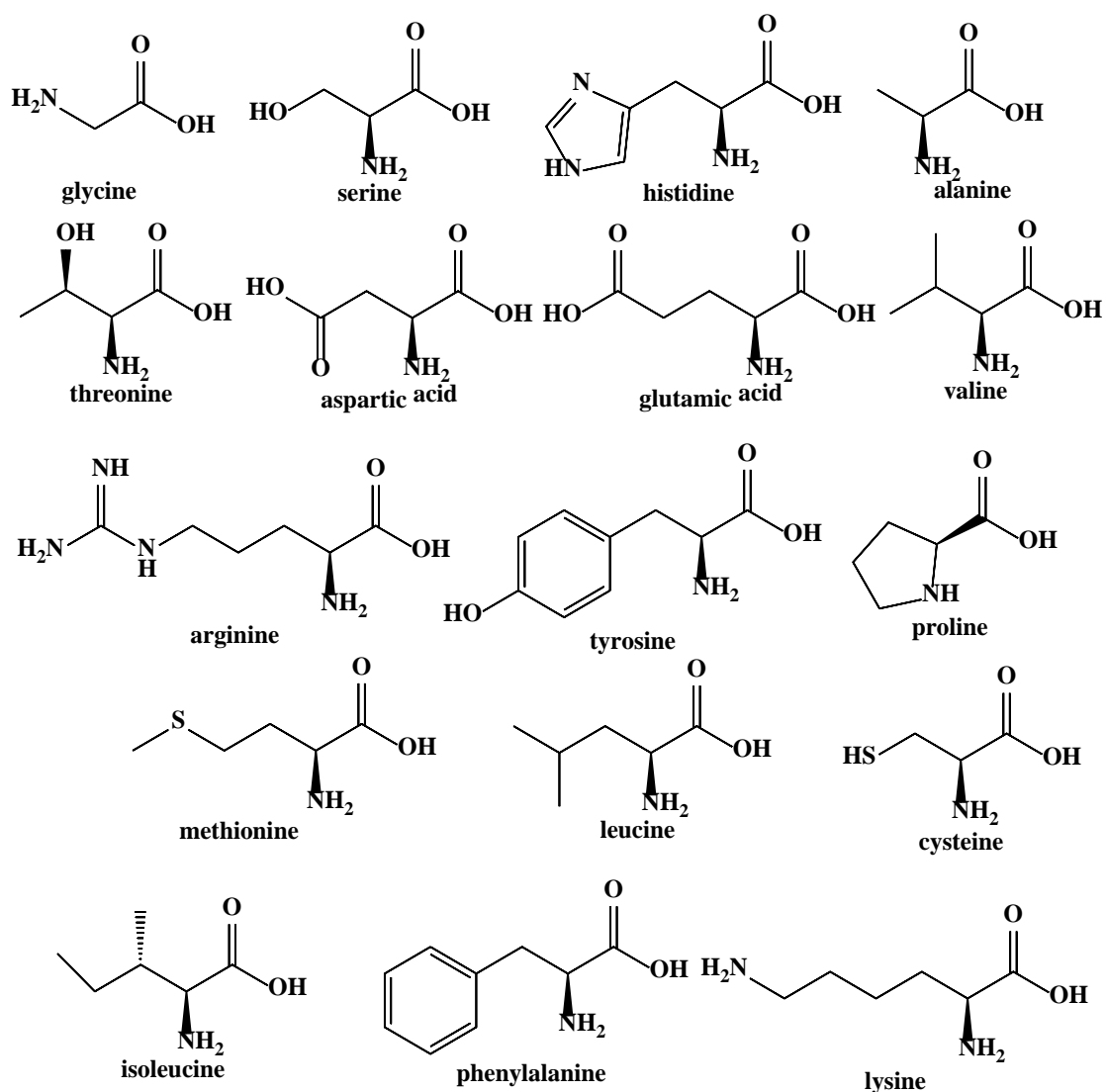
δεκαπλάσια από αυτή του σταφυλιού και μειώνεται με την πρόοδο της ωρίμανσης του καρπού [65]. Οι τανίνες ταξινομούνται σε υδρολυμένες και συμπυκνωμένες (ή μη υδρολυμένες). Γενικά, οι υδρολυμένες τανίνες θεωρούνται ως πολλαπλοί εστέρες γαλλικού ή ελλαγικού οξέος με γλυκόζη και προϊόντα των οξειδωτικών τους αντιδράσεων και είναι γνωστές ως γαλλοϋλοτανίνες και ελλαγιτανίνες, αντίστοιχα [52]. Από την άλλη πλευρά, οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι μη υδρολυμένες oligομερείς και πολυμερείς προανθοκυανιδίνες [66]. Ο Avallone και οι συνεργάτες του ανέφεραν την παρουσία υδρολυμένων και συμπυκνωμένων τανινών σε διάφορα μέρη του καρπού του χαρουπιού [67]. Συγκεκριμένα, οι λοβοί χαρουπιού περιέχουν μια μέση τιμή 2.75 mg συμπυκνωμένων τανινών g⁻¹ και 0.95 mg υδρολυμένων τανινών g⁻¹. Το φύτρο περιλαμβάνει υψηλότερη συγκέντρωση τανινών (16.2 mg συμπυκνωμένων τανινών g⁻¹ και 2.98 mg υδρολυμένων τανινών g⁻¹), ενώ η συγκέντρωσή τους στους σπόρους χαρουπιού υπάρχει σε ίχνη. Από χημικής πλευράς, οι τανίνες του χαρουπιού είναι κυρίως συμπυκνωμένες τανίνες (προανθοκυανιδίνες), που αποτελούνται από ομάδες φλαβάνης-3-ολ και τους γαλλοϋλ-εστέρες τους, γαλλικό οξύ, (+)-κατεχίνη, (-) -επικατεχίνη γαλλικού οξέος, (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού οξέος, δελφινιδίνη, πελαργονιδίνη και κυανιδίνη [53,61] **(Εικόνα 5.8)**.



Εικόνα 5.8. Χημικές δομές των τανινών.

5.2.6. Αμινοξέα

Η περιεκτικότητα σε αμινοξέα των καρπών χαρουπιού αποτελείται από ένα μείγμα 17 καταλοίπων (ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, σερίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, αργινίνη, θρεονίνη, αλανίνη, τυροσίνη, βαλίνη, προλίνη, μεθειονίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, κυστεΐνη, φαινυλαλανίνη και λυσίνη) (Εικόνα 5.9) [36,68]. Το ασπαρτικό οξύ, η ασπαραγίνη, η αλανίνη, το γλουταμινικό οξύ, η λευκίνη και η βαλίνη μαζί αποτελούν περίπου το 57 % της συνολικής περιεκτικότητας των λοβών σε αμινοξέα [63]. Γενικά, το χαρούπι μπορεί να θεωρηθεί ως καλή πηγή αμινοξέων σύμφωνα με τα πρότυπα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για τις πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει και τα επτά απαραίτητα αμινοξέα (θρεονίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, φαινυλαλανίνη και λυσίνη) σε συγκεντρώσεις που πληρούν τα πρότυπα του ΠΟΥ [68].



Εικόνα 5.9. Χημικές δομές αμινοξέων που περιέχονται στο χαρούπι.

5.2.7. Μέταλλα

Το χαρούπι είναι μια εξαιρετική πηγή καλίου και ασβεστίου. Η περιεκτικότητα σε κάλιο κυμαίνεται μεταξύ 970 mg 100 g⁻¹ d.m. και 1120 mg 100 g⁻¹ d.m., ενώ η συγκέντρωση ασβεστίου φτάνει τα 300 mg 100 g⁻¹ d.m. [36,63,68,69]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το αγελαδινό γάλα περιέχει κατά μέσο όρο 1200 mg ασβέστιο ανά λίτρο, μια μερίδα χαρουπιού περιέχει σχεδόν ισοδύναμη συγκέντρωση ασβεστίου με ένα φλιτζάνι γάλα [70]. Μακροστοιχεία όπως ο φώσφορος και το μαγνήσιο έχουν βρεθεί επίσης στον καρπό του χαρουπιού σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ο καρπός του χαρουπιού περιέχει επίσης πολλά μικροστοιχεία, συμπεριλαμβανομένου του σιδήρου, του χαλκού, του ψευδαργύρου, του

μαγγανίου, του νικελίου, του βαρίου, του κοβαλτίου κ.λπ. Τέλος, οι σπόροι του περιέχουν γενικά υψηλότερα ποσοστά μακρο- και μικρο- στοιχείων από τους λοβούς [36,63,68,69].

5.3. Ευεργετικές ιδιότητες του χαρουπιού στην ανθρώπινη υγεία

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποκαλύψει αρκετές φυσιολογικές αποκρίσεις του χαρουπιού και των προϊόντων του που μπορεί να σχετίζονται με την προαγωγή της ανθρώπινης υγείας και την πρόληψη ή θεραπεία ορισμένων χρόνιων ασθενειών. Παρακάτω κατηγοριοποιούνται τα οφέλη του χαρουπιού για την υγεία, στον καρκίνο, τον διαβήτη, τη διάρροια και την υπερλιπιδαιμία. Δίδεται επίσης έμφαση στις κλινικές δοκιμές στις οποίες έχει υποβληθεί η χαρουπιά. Ο Πίνακας 5.2 επισημαίνει τα χημικά συστατικά του χαρουπιού και τη σχετική αξιολόγηση των επιδράσεων τους στην ανθρώπινη υγεία.

Πίνακας 5.2. Τα χημικά συστατικά του χαρουπιού και η βιολογική τους αξιολόγηση.

Ομάδα χημικών συστατικών/ Μεμονωμένες ουσίες	Βιολογική αξιολόγηση των συστατικών/ Ασθένεια	Μέρη χαρουπιού	Αναφορά
LBG / γαλακτομαννάνη	Γαστρεντερική επιδράση	Ενδοσπέρμιο σπόρου	5–8
D-Πινιτόλη	Αντι-διαβητική δράση	Πολτός	29, 71
Διαλυτές και αδιάλυτες ίνες πολυφαινόλες / γαλλικό οξύ, γαλλοτανίνες, γλυκοζίτες φλαβονολών	Γλυκαιμικός έλεγχος, ενίσχυση μεταβολισμού των λιπιδίων, μείωση ολικής και LDL χοληστερόλης	Πολτός	30, 31
Αδιάλυτες ίνες πολυφαινόλες / τανίνες, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη	Μεταβολισμό χοληστερόλης, οξείδωση των λιπιδίων, μείωση της μεταγευματικής ακυλιωμένης γκρελίνης	Ίνες	72, 73
Πολυφαινόλες / γαλλικό οξύ, κατεχίνη, μυρικετίνη ραμνοσίδη, γλυκοσίδιο εριοδικτυόλης, γλυκοσίδιο κερκετίνης, ραμνοσίδη κερκετίνης	Αντι-καρκινική δράση	Ίνες	32
Πολυφαινόλες - αλκαλοειδή / (+)-κατεχίνη, γεντισικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κατεχόλη, φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, μυρικετίνη, μεθυλογαλλικό οξύ, κερκετίνη, ρουτίνη, συριγγικό οξύ, θεοφυλλίνη, βανιλίνη	Κυτταροτοξική δράση	Εκχυλίσματα αλεύρων φύτρων (σπόροι)	31
Ίνες	Διατροφική αξιοποίηση, Επαγωγή λιποαιμίας	Ίνες	33
Ίνες	Αντι-υπερλιπιδαιμική δράση	Ίνες	31, 74
Τανίνες - πολυφαινόλες	Αντι-διαρροϊκή δράση	Λοβός (καρπός)	34
Τανίνες - πηκτίνη	Αντι-διαρροϊκή δράση	Χυμός χαρουπιού	75

5.3.1. Αντι-πολλαπλασιαστική και αποπτωτική δραστηριότητα έναντι καρκινικών κυττάρων

Το χαρούπι είναι πλούσιο σε φυτοχημικές ενώσεις που όπως φαίνεται στη βιβλιογραφία έχουν αντι-καρκινική, αντι-πολλαπλασιαστική και προ-αποπτωτική δράση. Για παράδειγμα, η κερκετίνη, μια πολυφαινόλη που έχει μελετηθεί ευρέως, προάγει την απόπτωση στα T-λευχαιμικά κύτταρα στοχεύοντας άμεσα την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL [76]. Επιπλέον, η κερκετίνη μείωσε το μέγεθος του όγκου και ανέστειλε την αγγειογένεση σε μοντέλα καρκίνου του παγκρέατος και καρκίνου του μαστού, υποδεικνύοντας ότι είναι επίσης αποτελεσματική στο μικροπεριβάλλον του όγκου [77,78]. Το γαλλικό οξύ, ένα φαινολικό οξύ που υπάρχει στους καρπούς του χαρουπιού, μείωσε την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος όγκων ξενομοσχεύματος MNNG/HOS σε ποντίκια. Όταν εφαρμόστηκε στις κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος MNNG/HOS και U-2OS, προκάλεσε απόπτωση και αναστολή του πολλαπλασιασμού, ενώ η πρωτεΐνη p-38 βρέθηκε να ρυθμίζεται υπερβολικά, η JNK να ρυθμίζεται ελάχιστα και να ενεργοποιείται η ERK1/2 [79]. Τέλος, η δελφινιδίνη, από την ομάδα των ανθοκυανιδινών, βρέθηκε ότι επηρεάζει πολλούς ρυθμιστές της έκφρασης των πρωτεϊνών NF-κB και ανέστειλε την ανάπτυξη όγκου σε PC3 μοντέλα ποντικών [80]. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι το χαρούπι θα μπορούσε να λειτουργήσει ως χημειοπροληπτικός παράγοντας. Επιπλέον, μασώμενα δισκία και μπάρες φρούτων πλούσιες σε φυτικές ίνες χαρουπιού έχουν κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ως χημειοπροληπτικοί παράγοντες [81].

Τα υδατικά εκχυλίσματα των λοβών χαρουπιού έχουν αξιολογηθεί για την αντι-πολλαπλασιαστική τους δράση κατά του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [82]. Οι συγγραφείς της μελέτης διερεύνησαν τη μείωση του πολλαπλασιασμού της T1 κυτταρικής σειράς ποντικού που προκαλείται από τα δύο εκχυλίσματα μέσω της δοκιμασίας βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) και εκτίμησαν την μισή μέγιστη τιμή της ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀), η οποία βρέθηκε να είναι μεταξύ 0.2-0.4 mg mL⁻¹. Επιπλέον, μετά από 24 ώρες επεξεργασίας των T1 κυττάρων με τα εκχυλίσματα, παρατήρησαν κατακερματισμό του DNA (fragmentation) και ενεργοποίηση της πορείας της κασπάσης 3, υποδεικνύοντας ότι ορισμένα συστατικά του χαρουπιού μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης των εκχυλισμάτων λοβού

έδειξε τρία κύρια συστατικά: γαλλικό οξύ, (-) επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλικό και (-) επικατεχίνη-3-γαλλικό.

Η υψηλή παρουσία γαλλικού οξέος στο εκχύλισμα χαρουπιού έχει επισημανθεί από τον Kleow και τους συνεργάτες του. [32,83,84]. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι η αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου HT29 και LT97 μπορεί να συμβεί λόγω της υψηλής ύπαρξης γαλλικού οξέος στη μη συζευγμένη μορφή του [32]. Το εκχύλισμα ιών χαρουπιού ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HT29 και LT97 εμποδίζοντας τη σύνθεση DNA, αλλά όταν το γαλλικό οξύ εφαρμόστηκε μόνο του στις κυτταρικές σειρές, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα [32]. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν η αντι-πολλαπλασιαστική δραστηριότητα του εκχυλίσματος χαρουπιού οφείλεται σε κάποιο άλλο συστατικό ή είναι αποτέλεσμα συνεργιστικής δράσης διαφόρων συστατικών.

Ο Custodio και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν τη δραστηριότητα των μεθανολικών εκχυλισμάτων από φύτρα χαρουπιού, από διαφορετικά γένη (φύλα) και ποικιλίες, σε καρκινικά κύτταρα HeLa του τραχήλου της μήτρας. Η θεοφυλλίνη, ένα ευρέως γνωστό αλκαλοειδές, βρέθηκε ότι είναι το κύριο συστατικό των εκχυλισμάτων. Δοκιμάζοντας τα εκχυλίσματα σε κύτταρα HeLa μέσω χρωματομετρικής δοκιμής WST-1, ο πολλαπλασιασμός τους μειώθηκε με τιμές IC_{50} που κυμαίνονταν μεταξύ 2.7-10.3 mg mL⁻¹ και αποδόθηκε στην ύπαρξη φαινολικών ενώσεων και θεοφυλλίνης.

Η διαφορετική αντι-πολλαπλασιαστική δράση κάθε εκχυλίσματος αποκαλύπτει την εξάρτησή του από τη φυτοχημική σύνθεση. Οι συγγραφείς προσέγγισαν εκ νέου την ίδια υπόθεση δοκιμάζοντας τις αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις του πολτού χαρουπιού σε κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 καρκίνου του μαστού και σε κυτταρικές σειρές HeLa [62]. Η μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων έγινε μέσω απόπτωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι τα εκχυλίσματα είχαν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση και χρόνο επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Όσον αφορά τη βιοδραστική σύσταση, η κατεχίνη και το γαλλικό οξύ ήταν τα κύρια φυτοχημικά στα μεθανολικά εκχυλίσματα. Το φύλο και η καλλιέργεια των δέντρων φάνηκε και πάλι ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυτοχημική σύσταση. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα που προέρχονταν από ερμαφρόδιτα δέντρα εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων και συνεπώς υψηλότερη αντι-πολλαπλασιαστική δράση.

Συνολικά, τα πολικά εκχυλίσματα των λοβών χαρουπιού αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων. Η επαγωγή της απόπτωσης φαίνεται να είναι ο κυρίαρχος τρόπος δράσης για τα εκχυλίσματα χαρουπιού. Αν και το γαλλικό οξύ είναι το πιο άφθονο φυτοχημικό στο πολικό εκχύλισμα, η κυτταροτοξική του δράση είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα χαρουπιού. Η αντι-πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων χαρουπιού θα μπορούσε να συσχετιστεί με συνεργιστικές επιδράσεις μεταξύ διαφορετικών συστατικών. Διαφορετικά φύλα και ποικιλίες χαρουπιού επηρεάζουν το φυτοχημικό προφίλ και επομένως την αντι-πολλαπλασιαστική δραστηριότητα. Τέλος, πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες προκειμένου να διευκρινιστεί σε ποιο είδος καρκίνου είναι πιο αποτελεσματικό και να αποσαφηνιστούν οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων δρα στο κυτταρικό μικροπεριβάλλον. Ένας αποφασιστικός παράγοντας για το χημειοπροφυλακτικό του δυναμικό θα μπορούσε να είναι τα *in vivo* πειράματα.

5.3.2. Αντι-διαβητική δράση

Η αντι-διαβητική επίδραση των φυτικών σκευασμάτων που περιέχουν χαρούπι και άλλα φυσικά προϊόντα έχει αξιολογηθεί. Αυτά τα παρασκευάσματα είχαν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη όταν χρησιμοποιήθηκαν ως συμπληρώματα διατροφής σε άτομα με διαβήτη [85]. Η διατροφή με κόμμι χαρουπιού αποδείχθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αρουραίου [86]. Επιπλέον, ο Dos Santos και οι συνεργάτες του, υπολόγισαν τον γλυκαιμικό δείκτη του χαρουπιού σε 40.6 ± 0.05 μέσω ενζυμικής υδρόλυσης *in vitro* [87]. Η παρουσία της D-πινιτόλης σε προϊόντα χαρουπιού μπορεί να είναι υπεύθυνη για τις αντι-διαβητικές επιδράσεις καθώς ρυθμίζει το επίπεδο σακχάρου στο αίμα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη [71]. Το σιρόπι χαρουπιού θεωρείται πλούσια πηγή D-πινιτόλης καθώς 10 g από αυτό είναι αρκετά, σε σύγκριση με την τυπική δόση (10 mg D-πινιτόλης / kg σωματικού βάρους), για να μειώσουν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα σε άτομα με διαβήτη τύπου II [33]. Ο Bates και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η D-πινιτόλη θα μπορούσε να επιδείξει παρόμοια δράση με την ινσουλίνη και συνεπώς να βελτιώσει τον γλυκαιμικό έλεγχο, δοκιμάζοντας την αποτελεσματικότητά της σε ζωικά μοντέλα με διαβήτη [29]. Οι συγγραφείς παρουσίασαν επίσης ότι η D-πινιτόλη προκάλεσε υψηλότερη απορρόφηση της γλυκόζης στη μυϊκή κυτταρική σειρά L6,

υποδηλώνοντας την επίπτωση της στη μεταβολική οδό της γλυκόζης στους μυς παρά στη μεγαλύτερη παραγωγή ή την ενίσχυση της δράσης της ινσουλίνης.

5.3.3. Αντι-διαρροϊκή δράση

Το χαρούπι και τα κλάσματά (παράγωγά) του συνιστώνται για τη θεραπεία των συμπτωμάτων της διάρροιας. Προηγούμενη μελέτη ανέφερε ότι ένα διάλυμα χαρουπιού 2 % μπορεί να εμποδίσει την αιμοσυγκόλληση και την προσκόλληση του *E. coli* σε απομονωμένα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Η παρεμπόδιση της προσκόλλησης των βακτηρίων που απομονώνονται από το ανώτερο λεπτό έντερο των παιδιών θα μπορούσε να εξηγήσει την αποτελεσματικότητα του προτεινόμενου κλάσματος χαρουπιού [34]. Όσον αφορά τη βιοδραστική σύνθεση, ο Loeb και οι συνεργάτες του διερεύνησε την αποτελεσματικότητα των τανινών του χαρουπιού στη θεραπεία της οξείας διάρροιας [88]. Το κλάσμα αυτό συνίσταται από 40 % τανίνες ή 21.2 % πολυφαινόλες και 26.4 % διαιτητικές ίνες. Δεν είναι η πρώτη φορά που οι τανίνες θεωρούνται υπεύθυνες για την αντι-διαρροϊκή δράση. Ο Liu και οι συνεργάτες του απέδειξαν μέσω διάφορων τεχνικών *in vivo* και *in vitro* ότι το εκχύλισμα τανίνης του λαχανικού ραβέντι υπο-ρυθμίζει την οδό PKA/p-CREB (καταστολή) και κατά συνέπεια την έκφραση των Aquaporins 2 και 3 που ελέγχουν τη μεταφορά νερού μέσα στα κύτταρα [89]. Ο Wursch (1991) επίσης κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ένα διαιτητικό προϊόν με αντι-διαρροϊκή δράση, όπου ο σωματιδιακός λοβός χαρουπιού περιέχει τουλάχιστον 20 % κατά βάρος, με βάση την ξηρή ουσία, αδιάλυτες στο νερό τανίνες [90].

5.3.4. Αντι-υπερλιπιδαιμική δράση

Υψηλά επίπεδα λιπιδίων ή λιποπρωτεϊνών στο αίμα μπορεί να οδηγήσουν σε αθηροσκλήρωση και κατ' επέκταση σε καρδιακές και αγγειακές παθήσεις. Συνεπώς, συμπληρώματα που μειώνουν τα επίπεδα λιπιδίων και της χοληστερόλης στο αίμα είναι απαραίτητα για την εξισορρόπηση μιας, υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, δίαιτας. Έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ένα σκεύασμα μείωσης της χοληστερόλης που εμπεριέχει τουλάχιστον μία διαιτητική ίνα από την ομάδα που προέρχεται από τη σάρκα των καρπών χαρουπιού [91]. Επιπλέον, οι ίνες χαρουπιού σε συνδυασμό με τα n-3 λιπαρά οξέα είναι τα κύρια συστατικά ενός πατενταρισμένου τροφίμου με θετική επίδραση στην καρδιαγγειακή υγεία [92].

Η επίδραση των συστατικών του χαρουπιού στην υπερλιπιδαιμία έχει μελετηθεί διεξοδικά σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα. Το LBG αποδείχθηκε ότι μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης και λιπιδίων στο ήπαρ αρουραίων που έλαβαν δίαιτα υψηλής χοληστερόλης κατά 10 % [93]. Ωστόσο, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, το LBG δεν επέδειξε σημαντική επίδραση στα επίπεδα χοληστερόλης και τριακυλογλυκερόλης σε αρουραίους με διαβήτη [94].

Οι μελέτες σχετικά με τους καρπούς του χαρουπιού είναι λιγότερο αντιφατικές. Όταν η σκόνη χαρουπιού χορηγήθηκε σε αρουραίους Sprague-Dawley μαζί με υπερλιπιδαιμική δίαιτα, η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια μειώθηκαν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο [95]. Οι συγγραφείς σημείωσαν επίσης ότι το ιστοπαθολογικό προφίλ της καρδιάς και των νεφρών του ζώου παρέμεινε φυσιολογικό σε εκείνα που κατανάλωναν τη σκόνη χαρουπιού, ενώ οι αρουραίοι που ακολούθησαν αποκλειστικά την υπερλιπιδαιμική δίαιτα παρουσίασαν σοβαρές ανωμαλίες. Η σκόνη χαρουπιού θα μπορούσε να είναι πιθανός υποψήφιος σε δίαιτα για παχύσαρκα και υπέρβαρα άτομα. Ο Valero-Munoz και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι οι ίνες του λοβού του χαρουπιού καταστέλλουν φυσιολογικά γεγονότα που οδηγούν σε αθηροσκλήρωση σε κουνέλια με δυσλιπιδαιμία [96]. Παρατήρησαν ότι η έκφραση των SIRT1 και PGC-1 α πρωτεϊνών με βασικό ρόλο στο αγγειακό και μεταβολικό σύστημα, ενισχύθηκε, προτείνοντας έναν νέο μηχανισμό δράσης των συστατικών του χαρουπιού.

5.4. Χαρούπι και Κλινικές Δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές που σχετίζονται με το χαρούπι φαίνεται να χρησιμοποιούν μείγματα που περιέχουν συστατικά χαρουπιού μαζί με άλλες ουσίες [97-100]. Οι δοκιμές που αναφέρονται αποκλειστικά σε συστατικά του χαρουπιού συνδέονται κυρίως με τη βρεφική παλινδρόμηση, την υπερχοληστερολαιμία και τη διάρροια. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στον περιορισμένο αριθμό μελετών που αφορούν άλλες ασθένειες, όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης. Τα αποτελέσματα της θεραπείας για καταστάσεις όπως η υπερχοληστερολαιμία και η διάρροια μπορούν να διακριθούν πιο εύκολα και οι ενδείξεις για ισχυρή βιολογική δράση μπορούν να επιβεβαιωθούν σε μικρότερο χρονικό διάστημα.

5.4.1. Βρεφική Παλινδρόμηση

Ο Vandenplas και οι συνεργάτες του δοκίμασαν και συνέκριναν την αποτελεσματικότητα δύο σκευασμάτων κατά της παλινδρόμησης (ARF) για τη θεραπεία της παλινδρόμησης των βρεφών [7]. Τόσο το ARF-1 όσο και το ARF-2 περιείχαν LBG και πραγματοποιήθηκε μια διπλή τυφλή διασταυρούμενη δοκιμή για ένα μήνα σε δύο ομάδες βρεφών. Ο συνολικός αριθμός των βρεφών ήταν 115 με μέση ηλικία τις 9.1 εβδομάδες και για τις δύο ομάδες και παρόμοιες ανθρωπομετρικές παραμέτρους. Το ARF-2 ήταν στατιστικά πιο αποτελεσματικό από το ARF-1 με τον μέσο αριθμό επεισοδίων παλινδρόμησης να μειώνεται από 8.25 σε 2.32 για το ARF-1 και σε 1.89 για το ARF-2. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε για τη μέση βαθμολογία του όγκου παλινδρόμησης με το ARF-2 να παρουσιάζει ισχυρότερη δράση. Τόσο το ARF-1 όσο και το ARF-2 έδειξαν αποτελεσματικότητα στη μείωση του όγκου και του αριθμού των παλινδρομήσεων στα βρέφη, προσφέροντας ένα ευρύτερο φάσμα θεραπευτικών επιλογών.

Ο Miyazawa και οι συνεργάτες του εξέτασαν τα αποτελέσματα της χορήγησης δύο σκευασμάτων με βάση το γάλα, που περιέχουν LBG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε βρέφη με επεισόδια παλινδρόμησης [6]. Σε αυτή τη μελέτη, εξετάστηκαν 39 βρέφη με περισσότερα από τρία επεισόδια παλινδρόμησης την ημέρα. Η επίδραση στη γαστρική κένωση μετά την χορήγηση των δύο σκευασμάτων με βάση το γάλα, αξιολογήθηκε μετά τη σίτιση σε ορισμένα χρονικά σημεία. Η πρώτη φόρμουλα περιείχε LBG σε αναλογία $0.35 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ (HL-350), ενώ η δεύτερη $0.45 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ (HL-450). Αντίθετα, η κανονική φόρμουλα (HL-00) ήταν απαλλαγμένη από LBG. Η αξιολόγηση της επίδρασής τους στα επεισόδια παλινδρόμησης δοκιμάστηκε σε 27 βρέφη με επεισόδια στα οποία ανατέθηκε τυχαία να λάβουν τα παρασκευάσματα μαζί με HL-00 για μία εβδομάδα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επεισόδια παλινδρόμησης ήταν σημαντικά χαμηλότερα για βρέφη που τρέφονταν με HL-350 ή HL-450 παρά με HL-00. Η σύγκριση των δύο σκευασμάτων έδειξε ότι το HL-450 παρουσίασε βραδύτερο ρυθμό γαστρικής εκκένωσης σε βρέφη με γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση.

Ο Miyazawa και οι συνεργάτες του σε προηγούμενες μελέτες εξέτασαν τα αποτελέσματα δύο σκευασμάτων με βάση το γάλα που περιέχει LBG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε βρέφη με επεισόδια παλινδρόμησης [5]. Η φόρμουλα HL-350 έδειξε πολλά υποσχόμενες δυνατότητες μειώνοντας τα επεισόδια παλινδρόμησης σε βρέφη τεσσάρων μηνών με παλινδρόμηση. Σε αυτή τη μελέτη, οι ερευνητές εξέτασαν την επίδραση

του HL-350 σε βρέφη κάτω των δύο μηνών. Για το σκοπό αυτό, 20 βρέφη με περισσότερα από τρία επεισόδια παλινδρόμησης την ημέρα υποβλήθηκαν σε μια μελέτη δύο εβδομάδων. Τα βρέφη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και η πρώτη ομάδα τράφηκε με HL-350 την πρώτη εβδομάδα και γάλα ελέγχου (HL-00) τη δεύτερη. Την αντίστροφη σειρά ακολούθησε η δεύτερη ομάδα.

Σημαντική μείωση του αριθμού των επεισοδίων παλινδρόμησης παρατηρήθηκε σε βρέφη κατά την εβδομάδα που τρέφονταν με HL-350 σε σύγκριση με την εβδομάδα όπου λάμβαναν γάλα ελέγχου. Επιπλέον, το HL-350 δεν επηρέασε την καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης. Το LBG χορηγήθηκε με επιτυχία για τη θεραπεία της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης σε βρέφη [8]. Είκοσι τελειόμηνα βρέφη με καταγωγή από την Ταϊλάνδη με μέση ηλικία 13.4 ± 7 εβδομάδων υποβλήθηκαν για το σκοπό αυτό σε μια μελέτη τεσσάρων εβδομάδων. Η κλινική δοκιμή έδειξε ότι η προσθήκη LBG στη φόρμουλα γάλακτος βελτιώνει τα κλινικά συμπτώματα των βρεφών που παλινδρομούν, αλλά δεν επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογία της γαστρικής κένωσης.

5.4.2. Υπερχοληστεραιμία

Σε μια άλλη μελέτη, ο Ruiz-Roso και οι συνεργάτες του εξέτασαν την ευεργετική επίδραση ενός συμπτωκωμένου εκχυλίσματος πολυφαινόλων από χαρούπι, με υψηλή αναλογία πολυφαινόλων, στα λιπίδια του ανθρώπινου ορού [74]. Σε αυτή τη διπλή τυφλή κλινική μελέτη, 88 εθελοντές με υπερχοληστερολαιμία ($200 - 299 \text{ mg dL}^{-1}$) χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, που κατανάλωναν εικονικό φάρμακο ή φυτικές ίνες με αδιάλυτες πολυφαινόλες δύο φορές την ημέρα για τέσσερις εβδομάδες. Τα τριγλυκερίδια, η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) αξιολογήθηκαν στην αρχή και μετά από τέσσερις εβδομάδες. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η ολική χοληστερόλη, η LDL χοληστερόλη, η αναλογία LDL: HDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια μειώθηκαν κατά $17.8 \% \pm 6.1$, $22.5 \% \pm 8.9$, $26.2 \% \pm 14.3$ και $16.3 \% \pm 23.4$ αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, η ομάδα εικονικού φαρμάκου δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στο λιπιδικό της προφίλ. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, τα ευεργετικά αποτελέσματα στο προφίλ των λιπιδίων του ανθρώπου μπορούν να φανούν με την κατανάλωση φυτικών ινών πλούσιων σε αδιάλυτες πολυφαινόλες και αυτό μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της υπερλιπιδαιμίας.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του LBG σε οικεία υπερχοληστερολαιμία, οι Zavoral και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν δύο ομάδες, οι οποίες περιλάμβαναν ενήλικες και παιδιά [101]. Από τα άτομα αυτά, 18 παρουσίασαν οικογενή υπερχοληστερολαιμία και 10 ήταν φυσιολογικά. Το LBG χορηγήθηκε μέσω της κατανάλωσης τροφής στην ομάδα A, ενώ η ομάδα B κατανάλωσε φαγητό χωρίς αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η HDL ήταν αυξημένη και στις δύο ομάδες, αλλά η LDL και η ολική χοληστερόλη μειώθηκαν σε παιδιά με οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Τα επίπεδα χοληστερόλης και της LDL μειώθηκαν περισσότερο στα άτομα με οικογενή υπερχοληστερολαιμία και, γενικά το LBG επέδειξε μεγαλύτερη επίδραση στους ασθενείς ενήλικες παρά στα παιδιά. Ωστόσο, αυτή η δοκιμή χρησιμοποίησε μικρό αριθμό υποκειμένων και τα συμπεράσματα πρέπει να επικυρωθούν περαιτέρω.

Μια άλλη μελέτη που επικεντρώνεται στα οφέλη του πολτού χαρουπιού στη χοληστερόλη του ορού υπερχοληστερολαιμικών ασθενών, διεξήχθη από τον Zunft και τους συνεργάτες του [31]. Συνολικά 58 εθελοντές με υπερχοληστερολαιμία κλήθηκαν να συμμετάσχουν σε μια διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο κλινική μελέτη, προκειμένου να διερευνηθεί εάν η υψηλή συγκέντρωση αδιάλυτων ινών που περιέχονται στον πολτό χαρουπιών έχει ευεργετική επίδραση στη χοληστερόλη του ορού. Η ολική, η LDL και η HDL χοληστερόλη μαζί με τα τριγλυκερίδια εξετάστηκαν στην αρχή της μελέτης και μετά την 4η και 6η εβδομάδα για κάθε συμμετέχοντα. Το ημερήσιο μεσημεριανό πρόγραμμα περιείχε ψωμί και μια μπάρα φρούτων μαζί ή χωρίς με 15 g/ημέρα παρασκευάσματος χαρουπόπολτου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η LDL χοληστερόλη μειώθηκε κατά 10.5 % ± 2.2 όπως και το επίπεδο των τριγλυκεριδίων στις γυναίκες κατά 11.3 % ± 4.5. Επιπλέον, η αναλογία LDL:HDL χοληστερόλης μειώθηκε κατά 7.9 % ± 2.2 στην ομάδα που ελάμβανε χαρούπι σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι γυναίκες παρουσίασαν καλύτερο λιπιδαιμικό προφίλ στο τέλος των έξι εβδομάδων από εκείνες των ανδρών.

5.4.3. Διάρροια

Σύγκριση δύο διαφορετικών θεραπειών της οξείας διάρροιας, η μία που περιλάμβανε χυμό χαρουπιού (CBJ) σε συνδυασμό με πόσιμο διάλυμα επανυδάτωσης (ORS) και η άλλη μόνο ORS, διεξήχθη από τους Aksit και τους συνεργάτες του σε 80 παιδιά που εισήχθησαν στο νοσοκομείο με οξεία διάρροια και αφυδάτωση [75]. Τα παιδιά χωρίστηκαν τυχαία για

να λάβουν θεραπεία με ORS, σύμφωνα με τις οδηγίες του ΠΟΥ, και έναν συνδυασμό CBJ και ORS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διάρκεια της διάρροιας μειώθηκε κατά 45 % στα παιδιά που λάμβαναν ORS και CBJ μαζί, μειώνοντας επίσης την απαίτηση για ORS κατά 38 % σε σύγκριση με τα παιδιά που έλαβαν μόνο ORS. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το CBJ θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία της παιδικής διάρροιας.

Σε μια άλλη μελέτη, το αδιάλυτο στο νερό κλάσμα χαρουπιού, χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στη θεραπεία της διάρροιας σε βρέφη ηλικίας 3 έως 21 μηνών [88]. Η κατανάλωση του κλάσματος χαρουπιού βελτίωσε τις κινήσεις του εντέρου, τη θερμοκρασία του σώματος και το σωματικό βάρος μετά από 24 - 48 h. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η αποτελεσματικότητα του κλάσματος του χαρουπιού συνδέθηκε με τη βακτηριοκτόνο δράση του έναντι του εντεροπαθογόνου *E. coli* και τον ροταϊό. Η επίδραση του αδιάλυτου κλάσματος χαρουπιού, προσδιορίστηκε επίσης σε ταξιδιώτες με διάρροια, μέσω μιας διπλά τυφλής, τυχαιοποιημένη από υπολογιστή, ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο μελέτης 755 εθελοντών [102]. Η διάρκεια της μελέτης ήταν 48 h και τα αποτελέσματα έδειξαν θετική επίδραση για το κλάσμα χαρουπιού, αλλά δεν ήταν αποτελεσματική στη θεραπεία των συμπτωμάτων της διάρροιας των ταξιδιωτών.

5.5. Πολυφαινόλες χαρουπιού και βιοδιαθεσιμότητα

Το χαρούπι είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες με τα φαινολικά οξέα, τις γαλλοταννίνες και τα φλαβονοειδή να είναι τα πιο διαδεδομένα [103]. Αν και οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων *in vitro*, η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα τους μειώνει την αποτελεσματικότητά τους *in vivo* [104,105]. Παρά το γεγονός ότι είναι τα πιο κοινά στη διατροφή του ανθρώπου, η δραστηριότητά τους δεν είναι πάντα παράλληλη με την αφθονία τους, είτε λόγω κακής απορρόφησης είτε λόγω ταχείας αποβολής [106]. Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα της τάξης του 10 % (δοκιμασίες σε ζώα) με εύρος να κυμαίνεται από 2 % - 20 %. Η εύρεση ενός τρόπου ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι υψίστης σημασίας, καθώς θα απαιτούνταν ένα μεγάλο δείγμα πληθυσμού για τις κλινικές δοκιμές, προκειμένου να αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους και ως εκ τούτου αυτές οι δοκιμές δεν θα ήταν εφικτές [107].

Η πρώτη προσέγγιση θα πρέπει να είναι η μελέτη της βιοδιαθεσιμότητας και του φαρμακοκινητικού τους προφίλ, αφού αυτοί είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση τους, μια παράμετρος που δεν εξετάζεται διεξοδικά στις περισσότερες περιπτώσεις. Πολλά δυνητικά θεραπευτικά φυτοχημικά παρουσιάζουν ισχυρό προφίλ *in vitro*, αλλά μειωμένο *in vivo*, ως αποτέλεσμα των χαμηλών ADME ιδιοτήτων τους (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion - Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός και Απέκκριση) και της περιορισμένης κυτταρικής διαπερατότητας. Οι βασικές παράμετροι που μπορούν να περιγράψουν σε επαρκή βαθμό ένα φαρμακοκινητικό προφίλ είναι τα C_{max} , T_{max} , AUC και $t_{1/2}$ [108]. Η χαμηλή απορρόφηση και ο εντατικός (γρήγορος) μεταβολισμός των ενώσεων με χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα απαιτούν μια πιο εις βάθος διερεύνηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους [109]. Ένας μεγάλος αριθμός πολυφαινολών όπως η (*)-επιαφζελεχίνη, η αβικουλαρίνη και η ισοραμνετίνη-3-O-νεοεσπεριδοσίδη (φλαβονολ 3-O-γλυκοσίδες) έχουν προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους LC-MS/MS [110-112]. Η πλειονότητα αυτών των μελετών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών σε μοντέλα *in vivo* έχει βασιστεί σε πλατφόρμες LC-MS/MS, ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση [105,113].

Η αξιολόγηση της σταθερότητάς τους στο πλάσμα ανθρώπινου αίματος, με νέες φαρμακοκινητικές μεθόδους, θα πρέπει να είναι η βάση πάνω στην οποία οι επιστήμονες θα πρέπει να βασιστούν προκειμένου να ξεπεράσουν το εμπόδιο της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας. Περαιτέρω μελέτη μορίων με πολλά υποσχόμενα *in vitro* αποτελέσματα, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε πειράματα *in vivo*, καθώς το χάσμα μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων είναι μερικές φορές αγεφύρωτο.

5.6. Το LBG ως φορέας για την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων

Εκτός από τα άμεσα οφέλη της για την ανθρώπινη υγεία, το LBG κατέχει έναν ξεχωριστό ρόλο στον τομέα του σχεδιασμού φαρμακευτικών μορίων ως μόριο-φορέας. Ο πολυσακχαρίτης γαλακτομαννάνη αποτελείται από μονομερή γαλακτόζης και μαννόζης σε αναλογία 1:4 και λόγω των πολυμερικών ιδιοτήτων του, μπορεί να σχηματίσει σωματίδια από μόνος του ή συνεργατικά με άλλα πολυμερή (Πίνακας 5.3) [114]. Επιπλέον, το LBG έχει επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες και άλλα πλεονεκτήματα, όπως: i) ότι είναι από τη φύση της βιοσυμβατή, βιοαπορροφήσιμη και βιοαποικοδομήσιμη, ii) είναι μη τερατογόνο

και μη μεταλλαξιγόνο πρόσθετο τροφίμων, iii) έχει αποδεκτή διάρκεια ζωής στο ράφι και iv) τα προϊόντα αποικοδόμησής της αποβάλλονται εύκολα [115].

Ένα πιθανό πολυμερές σωματίδιο πρέπει να πληροί ορισμένα κρίσιμα κριτήρια για μια επιτυχή, ελεγχόμενη μεταφορά. Τα πιο σημαντικά είναι: i) η αποτελεσματικότητα φόρτωσης του φαρμάκου, ii) η αργή απελευθέρωση του φαρμάκου, iii) η ικανότητα διείσδυσης και υπέρβασης των βιολογικών φραγμών iv) και η στοχευμένη παράδοση στον ιστό ενδιαφέροντος [116]. Ο Dionisio και οι συνεργάτες του απεικόνισαν λεπτομερώς τις εφαρμογές του LBG στην μεταφορά φαρμάκων [117]. Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται, νεότερα αποτελέσματα σχετικά με τα σκευάσματα που περιλαμβάνουν LBG αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με άλλα πολυμερή. Οι Maiti και οι συνεργάτες του συνέθεσαν σφαιρίδια από ένα καρβοξυμεθυλικό παράγωγο του LBG και τα φόρτωσαν με γλιπιζίδη, ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [9].

Το φάρμακο φορτώθηκε αποτελεσματικά στα σφαιρίδια σε ένα εύρος 93.35 %-94.80 % και βρέθηκε να είναι αρκετά σταθερό. Όταν το σύμπλοκο χορηγήθηκε σε αρουραίους, προκάλεσε υπογλυκαιμία που διατηρήθηκε για 1 - 9 h. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην αργή και ελεγχόμενη απελευθέρωση της γλιπιζίδης από τα σφαιρίδια. Έχει επίσης αναφερθεί ότι και για ένα άλλο σκεύασμα με Ζιπρασιδόνη HCl, ένα αντιψυχωσικό φάρμακο, το LBG αποδείχθηκε ότι παρέχει υψηλή πλωσιμότητα όταν τα δισκία αραιώθηκαν σε γαστρικό υγρό [10]. Οι Panghal και οι συνεργάτες του κατάφεραν να αυξήσουν τη διαλυτότητα της ατορβαστατίνης φορτώνοντας την σε τροποποιημένο κόμμα χαρουπιού (MLBG), με αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου σε αρουραίους [11].

Πίνακας 5.3. Αντιπροσωπευτικές εφαρμογές του LBG ως φορέας φαρμάκου σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Φορέας μεταφοράς	Ρόλος του Φορέα μεταφοράς	Ενεργή ουσία	Αναφορά
Καρβοξυμεθυλικό παράγωγο της LBG	Ελεγχόμενη αποδέσμευση	Γλιπιζίδη	9
LBG	Ελεγχόμενη αποδέσμευση	Ζιπρασιδόνη HCl	10
Τροποποιημένη LBG (μέσω θέρμανσης)	Αυξημένη διαλυτότητα	Ατορβαστατίνη	11
Πολυμερικό δίκτυο διεισδυτικών σφαιριδίων της LBG και πολυ(βινυλική αλκοόλη)	Από του στόματος ελεγχόμενη αποδέσμευση	Βουφλομεδίλη HCl	13
LBG και μείγματα χιτοζάνης	Βλεννοσυγκολλητικό συστατικό σε δισκία	Προπρανολόλη HCl	14
Αλγινικό Ca ²⁺ – LBG μικροσφαιρίδια	Παρατεταμένη απελευθέρωση	Ασεκλοφενάκη	15
LBG νιοσώματα ενσωματωμένα σε πηκτή	Προετοιμασία κυψελιδικών συστημάτων	Γλυκυρριζινικό μονοαμμώνιο	16

Σε άλλες εργασίες αναπτύχθηκαν μείγματα LBG με άλλα πολυμερή για μεγαλύτερη λειτουργικότητα. Το φυσικό κόμμι μπορεί να παρουσιάζει ορισμένα ελαττώματα, όπως απορυθμισμένη διόγκωση και γρήγορη απελευθέρωση του φαρμάκου [12]. Έτσι, οι Kaity και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ένα διεισδυτικό δίκτυο πολυμερών μικροσφαιριδίων (IPNs) από LBG και πολύ-βινυλική αλκοόλη (PVA) σε διαφορετικές αναλογίες, διασυνδεδεμένα μέσω γλουταραλδεϋδης [12]. Διαπιστώθηκε ότι η αναλογία LBG:PVA επηρεάζει τον βαθμό απελευθέρωσης. Σε επόμενη δημοσίευση, οι Kaity και οι συνεργάτες του φόρτωσαν στα μικροσφαιρίδια LBG-PVA ένα αγγειοδιασταλτικό φάρμακο με την ονομασία υδροχλωρική βουφλομεδίλη και έλεγξαν τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους του [13]. Τα IPNs βελτίωσαν τη διαθεσιμότητα της υδροχλωρικής βουφλομεδίνης, καθώς η T_{max} διπλασιάστηκε. Ωστόσο, δεν επέδειξε ικανοποιητική βιοαποικοδομησιμότητα λόγω της υψηλότερης ποσότητας PVA στα μικροσφαιρίδια. Άλλες μελέτες, αναφέρονται στο σχηματισμό σωματιδίων μεταφορέων με χρήση του LBG σε συνδυασμό με άλλους πολυσακχαρίτες όπως χιτοζάνη, αλγίνη και κόμμι ξανθάνης [14-16]. Αρκετές πατέντες κατέδειξαν επίσης τις μεγάλες δυνατότητες του LBG και των παραγώγων της ως φορέα για

την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων. Για παράδειγμα, το LBG χρησιμοποιείται ως μέσο πύκνωσης για την παραγωγή φαρμακευτικού φορέα αφρού [118] και ως συνεκτικό σύνθετο σε φορέα ελεγχόμενης απελευθέρωσης για εισπνοή [119].

Συμπερασματικά, το κύριο ενδιαφέρον έχει στραφεί κυρίως στη χρήση του LBG σε συνδυασμό με άλλα πολυμερή, διότι η συνέργεια τους συμβάλλει στην εξισορρόπηση των μειονεκτημάτων του άλλου. Η αναλογία των πολυμερών παίζει κρίσιμο ρόλο στον βαθμό εγκλωβισμού του φαρμάκου, καθώς και στη σταθερότητα και τον ρυθμό απελευθέρωσής του. Όσον αφορά τα προαναφερθέντα ελπιδοφόρα αποτελέσματα, πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα ώστε να βελτιωθεί η ικανότητα χορήγησής τους.

5.7. Οικονομικός αντίκτυπος

Η καλλιέργεια του χαρουπιού έχει μεγάλη σημασία για περιβαλλοντικούς και οικονομικούς λόγους. Όσον αφορά το περιβάλλον, η χαρουπιά θεωρείται βασική καλλιέργεια για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση των αγροτικών εκτάσεων υψηλής φυσικής αξίας (ΥΦΑ). Ο καρπός χαρουπιού χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή LBG από το ενδοσπέρμιο για τη βιομηχανία τροφίμων και πιο συγκεκριμένα για την παραγωγή σιροπιού χαρουπιού με την εξαγωγή μόνο υδατοδιαλυτών σακχάρων, καθώς και εναλλακτικά ως ζωοτροφή.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ευεργετικές επιδράσεις του χαρουπιού στην υγεία, μόνο η εκμετάλλευση του καρπού του χαρουπιού από τη φαρμακευτική βιομηχανία θα μπορούσε να προσφέρει βιωσιμότητα στην καλλιέργεια. Οι ίνες και οι πολυφαινόλες που προέρχονται από το χαρούπι δεν χρησιμοποιούνται επί του παρόντος, παρόλο που φαρμακολογικές μελέτες τις έχουν συνδέσει με σημαντικές ιδιότητες που προάγουν την υγεία. Έτσι, τα συστατικά αυτά μπορούν να αποτελέσουν συστατικά νέων λειτουργικών τροφίμων, συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμάκων φυτικής προέλευσης. Επιπλέον, απαιτείται έρευνα για την αξιοποίηση του LBG ως φορέα φαρμάκων και της D-πινιτόλης ως φαρμακευτικού παρασκευάσματος για τη θεραπεία του διαβήτη. Συνολικά, η εκμετάλλευση αυτών των φαρμακευτικών εφαρμογών αναμένεται να παράγει προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας που προέρχονται από τους καρπούς χαρουπιού.

5.8. Συλλογή δεδομένων

Η έρευνα περιλάμβανε ενδελεχή αναζήτηση της δημοσιευμένης βιβλιογραφίας προκειμένου να συλλεχθεί σημαντικός όγκος πληροφοριών σχετικά με το χαρούπι και τις ιδιότητές του. Οι κύριες λέξεις-κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χαρούπι, σύνθεση, πολτός, κροκέτα (kibble), σπόρος, υγεία, βιολογική δραστηριότητα, καρκίνος, φαινόλες, κόμμι χαρουπιού, πινιτόλη, αμινοξέα, σάκχαρα, φυτικές ίνες, μέταλλα, καρκίνος, διαβήτης, υπερλιπιδαιμία, κλινικές δοκιμές. Οι βάσεις δεδομένων που αναζητήθηκαν ήταν οι Scopus, Pubmed και Web of Science.

5.9. Μελλοντικές κατευθύνσεις - Συμπεράσματα

Η ερευνητική κοινότητα, καθώς και οι βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων, έχουν επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην πλήρη αξιοποίηση των φυσικών προϊόντων, ιδίως των φυτοχημικών, για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών στόχων με πολλά υποσχόμενες προοπτικές, καθώς και για τον εμπλουτισμό διαφόρων τροφίμων με φυσικές ουσίες υψηλής βιολογικής αξίας. Μετά από ενδελεχή εξέταση της βιβλιογραφίας, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα των φυσικών προϊόντων με την ενσωμάτωσή τους σε νέες μεθόδους και πρωτόκολλα για την ανακάλυψη φαρμάκων και την ανάπτυξη τροφίμων και ότι ο χειρισμός τους έχει αναμφίβολα τεράστιες δυνατότητες.

Το χαρούπι είναι ένα φυσικό προϊόν που έχει προσελκύσει την προσοχή της ερευνητικής κοινότητας όχι μόνο λόγω των πλεονεκτημάτων του για την ανθρώπινη υγεία, αλλά και λόγω της σημασίας του για την οικονομία και το περιβάλλον. Συνολικά, ο καρπός του χαρουπιού περιέχει πολλά συστατικά φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Πράγματι, η κόμμι χαρουπιού έχει προσελκύσει κυρίως το επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και για παιδιατρικούς σκοπούς. Επιπλέον, ο καρπός χαρουπιού αποτελεί εξαιρετική πηγή D-πινιτόλης και ινών, και για την ανάκτησή τους από τον καρπό χαρουπιού έχουν ήδη καταχωριστεί ορισμένα διπλώματα ευρεσιτεχνίας. Το χαρούπι περιέχει επίσης ένα σύνολο πολυφαινολών, με το γαλλικό οξύ και τα παράγωγά του, καθώς και τις συμπυκνωμένες τανίνες να είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές φαινολικές ενώσεις στους καρπούς χαρουπιού. Η παρουσία ορισμένων μετάλλων και αμινοξέων είναι επίσης σημαντική για την ανθρώπινη υγεία, οπότε η ενσωμάτωσή του σε μια καθημερινή διατροφή μπορεί να συμβάλει στη μείωση

περιστατικών όπως οι καρδιακές παθήσεις, οι πεπτικές διαταραχές και ο διαβήτης στον άνθρωπο.

Όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία, το χαρουπόδεντρο και τα παράγωγά του σχετίζονται με την πρόληψη και τη θεραπεία μιας μεγάλης ποικιλίας ασθενειών, όπως ο διαβήτης, η υπερλιπιδαιμία, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Πολυάριθμες κλινικές δοκιμές έχουν διεξαχθεί από ερευνητές προκειμένου να διερευνηθούν οι ακριβείς επιδράσεις του καρπού του χαρουπιού στον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά, αν και θα πρέπει να καταβληθούν πολύ μεγαλύτερες προσπάθειες σε κλινικές μελέτες για να φωτιστούν τα συστατικά και ο μοριακός μηχανισμός πίσω από τις δράσεις του καρπού χαρουπιού στον ανθρώπινο οργανισμό.

Για την καλύτερη αξιοποίηση των φυσικών προϊόντων, απαιτούνται νέα εργαλεία για την έρευνα της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Απαιτούνται νέες προσεγγίσεις που θα ενισχύσουν το βιολογικό τους προφίλ, όπως η τροποποίηση του χαρουπιού όσον αφορά την ενθυλάκωση με καλιζαρένια και κυκλοδεξτρίνες και άλλους φορείς μεταφοράς, καθώς και η περαιτέρω αξιολόγηση της βιοδιαθεσιμότητας και του προφίλ σταθερότητας στο πλάσμα. Ειδικά τα καλιζαρένια διαθέτουν δομικά χαρακτηριστικά που θεωρούνται δυνητικοί φορείς φαρμάκων (Drug Delivery Systems, DDS) λόγω των απεριόριστων χημικών τροποποιήσεων τους και της εκλεκτικής δημιουργίας συμπλόκων με βιομόρια [120-122]. Τα φυτοχημικά συστατικά του καρπού του χαρουπιού θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητικό υποψήφιο για σκευάσματα με καλιζαρένια και κυκλοδεξτρίνες ως αποτέλεσμα της εκτεταμένης χρήσης τους ως φορείς χορήγησης φαρμάκων [9,11,117].

Αναπόσπαστο μέρος αυτής της επιστημονικής έρευνας είναι τα υπερσύγχρονα όργανα LC-MS/MS που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Η εκτεταμένη χρήση τους για τον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων σε εξαιρετικά πολύπλοκες μήτρες τα καθιστά το απόλυτο εργαλείο στον τομέα των φαρμακοκινητικών μελετών [113]. Μια τέτοια ολιστική προσέγγιση θα μπορούσε να διαμορφώσει τη βάση για την καλύτερη αξιοποίηση των φυσικών προϊόντων στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, για την παραγωγή αποτελεσματικών φαρμάκων και τροποποιημένων τροφίμων και για την αντιμετώπιση απειλητικών για τη ζωή ασθενειών.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχει σημειωθεί μεγάλη ανάπτυξη σε διάφορους τομείς των βιοεπιστημών χάρη στην ανάπτυξη ομικών τεχνολογιών υψηλής απόδοσης (omics). Οι

τεχνολογίες omics υψηλής απόδοσης βασίζονται σε σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους και επιτρέπουν μεγάλο αριθμό μετρήσεων σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι καρποί χαρουπιού είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο μείγμα βιοδραστικών ενώσεων και θρεπτικών συστατικών, η χρήση κατάλληλων τεχνολογιών omics θα προωθήσει την έρευνα σχετικά με τις ιδιότητες που προάγουν την υγεία των καρπών χαρουπιού και των υποπροϊόντων του. Η μεταβολομική, η διατροφική και η φυτοχημική αποτελούν ενδιαφέρουσες προσεγγίσεις για το θέμα αυτό.

Η μεταβολομική μπορεί δυνητικά να παρέχει μια ουσιαστικά αμερόληπτη, ολοκληρωμένη ποιοτική και ποσοτική επισκόπηση των μεταβολιτών που υπάρχουν στους καρπούς χαρουπιού, καθώς οι τρέχουσες μελέτες επικεντρώνονται σε μια ομάδα βιοδραστικών ενώσεων, π.χ. πολυφαινόλες, γαλακτομαννάνες κ.λπ. Οι ομικές τεχνολογίες διατροφής (foodomics) και φυτοχημικών(phytochemomics) είναι σε θέση να δημιουργήσουν συνδέσεις μεταξύ των συστατικών των τροφίμων, των τροφίμων, της διατροφής, της υγείας και των ασθενειών. Αυτές οι προσεγγίσεις θα είναι χρήσιμες για τη συσχέτιση της κατανάλωσης χαρουπιού ή συστατικών χαρουπιού με συγκεκριμένες ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία, δεδομένου ότι μπορεί να διαπιστωθεί μια σχέση αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ φυτοχημικών ουσιών και ιδιοτήτων που προάγουν την υγεία. Επιπλέον, θα διευκολύνουν τη μελέτη της επίδρασης της αποθήκευσης και της επεξεργασίας του χαρουπιού στη βιοδραστικότητά του. Αναμένεται επίσης να είναι χρήσιμες για τη βελτιστοποίηση της διαμόρφωσης καινοτόμων λειτουργικών τροφίμων, φαρμακευτικών σκευασμάτων και συμπληρωμάτων διατροφής.

5.10. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Durazzo, A., Turfani, V.; Narducci, V.; Azzini, E.; Maiani, G.; Carcea, M. Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours. *Food Chem.* 2014, 153, 109–113.
- [2] FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Final 2012 Data. Available online: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx#ancor> (accessed on 12 July 2016).
- [3] Battle, I.; Tous, J. Carob Tree: *Ceratonia Siliqua* L.—Promoting the Conservation And Use of Underutilized and Neglected Crops. 17; Bioversity International: Rome, Italy, 1997; p. 91.
- [4] Wursch, P.; Delvedovo, S.; Rosset, J.; Smiley, M. The tannin granules from ripe carob pod. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1984, 17, 351–354.
- [5] Miyazawa, R.; Tomomasa, T.; Kaneko, H.; Arakawa, H.; Morikawa, A. Effect of formula thickened with reduced concentration of locust bean gum on gastroesophageal reflux. *Acta Paediatr.* 2007, 96, 910–914.
- [6] Miyazawa, R.; Tomomasa, T.; Kaneko, H.; Morikawa, A. Effect of formula thickened with locust bean gum on gastric emptying in infants. *J. Paediatr. Child. Health* 2006, 42, 808–812.
- [7] Vandenplas, Y.; Leluyer, B.; Cazaubiel, M.; Housez, B.; Bocquet, A. Double-blind comparative trial with 2 antiregurgitation formulae. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2013, 57, 389–393.
- [8] Vivatvakin, B.; Buachum, V. Effect of carob bean on gastric emptying time in thai infants. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2003, 12, 193–197.
- [9] Maiti, S.; Dey, P.; Banik, A.; Sa, B.; Ray, S.; Kaity, S. Tailoring of locust bean gum and development of hydrogel beads for controlled oral delivery of glipizide. *Drug. Deliv.* 2010, 17, 288–300.
- [10] Aj, R.; Hn, Y.; Sb, S. Natural gums as sustained release carriers: Development of gastroretentive drug delivery system of ziprasidone hcl. *DARU J.* 2012, 20, 58.
- [11] Panghal, D.; Nagpal, M.; Thakur, G.S.; Arora, S. Dissolution improvement of atorvastatin calcium using modified locust bean gum by the solid dispersion technique. *Sci. Pharm.* 2014, 82, 177–191.

- [12] Kaity, S.; Isaac, J.; Ghosh, A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly (vinyl alcohol) for controlled release drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 2013, 94, 456–467.
- [13] Kaity, S.; Ghosh, A. Comparative bio-safety and *in vivo* evaluation of native or modified locust bean gum-PVA IPN microspheres. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 72, 883–893.
- [14] Vijayaraghavan, C.; Vasanthakumar, S.; Ramakrishnan, A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of locust bean gum and chitosan combination as a carrier for buccal drug delivery. *Pharmazie* 2008, 63, 342–347.
- [15] Jana, S.; Gandhi, A.; Sheet, S.; Sen, K.K. Metal ion-induced alginate-locust bean gum ipn microspheres for sustained oral delivery of aceclofenac. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 72, 47–53.
- [16] Coviello, T.; Trotta, A.M.; Marianecchi, C.; Carafa, M.; di Marzio, L.; Rinaldi, F.; di Meo, C.; Alhaique, F.; Matricardi, P. Gel-embedded niosomes: Preparation, characterization and release studies of a new system for topical drug delivery. *Colloids Surf. B* 2015, 125, 291–299.
- [17] Tsatsaragkou, K.; Yiannopoulos, S.; Kontogiorgi, A.; Poulli, E.; Krokida, M.; Mandala, I. Effect of carob flour addition on the rheological properties of gluten-free breads. *Food Bioprocess. Technol.* 2014, 7, 868–876.
- [18] Šebečić, B.; Dragojević, I.V.; Vitali, D.; Hećimović, M.; Dragičević, I. Raw materials in fibre enriched biscuits production as source of total phenols. *Poljopr. Znanst. Smotra* 2007, 72, 265–270.
- [19] Seczyk, L.; Swieca, M.; Gawlik-Dziki, U. Effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta. *Food Chem.* 2016, 194, 637–642.
- [20] Lar, A.C.; Erol, N.; Elgun, M.S. Effect of carob flour substitution on chemical and functional properties of tarhana. *J. Food Process. Preserv.* 2013, 37, 670–675.
- [21] Martin-Diana, A.B.; Izquierdo, N.; Albertos, I.; Sanchez, M.S.; Herrero, A.; Sanz, M.A.; Rico, D. Valorization of carob's germ and seed peel as natural antioxidant ingredients in gluten-free crackers. *J. Food Process. Preserv.* 2016.
- [22] Srour, N.; Daroub, H.; Toufeili, I.; Olabi, A. Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatments and assessing their effect on quality characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 2016, 96, 3047–3057.

- [23] Custodio, L.; Patarra, J.; Albericio, F.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.; Romano, A. *In vitro* antioxidant and inhibitory activity of water decoctions of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) on cholinesterases, α -amylase and α -glucosidase. *Nat. Prod. Res.* 2015, 29, 2155–2159.
- [24] Pramod, T.; Lingappa, K. Immobilization of *aspergillus niger* in polyurethane foam for citric acid production from carob pod extract. *Am. J. Food Technol.* 2008, 3, 252–256.
- [25] Turhan, I.; Bialka, K.L.; Demirci, A.; Karhan, M. Enhanced lactic acid production from carob extract by *lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnol.* 2010, 24, 364–374.
- [26] Carvalheiro, F.; Moniz, P.; Duarte, L.C.; Esteves, M.P.; Gírio, F.M. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 38, 221–227.
- [27] Carvalho, M.; Roca, C.; Reis, M.A. Improving succinic acid production by *actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods. *Bioresour. Technol.* 2016, 218, 491–497.
- [28] Ercan, Y.; Irfan, T.; Mustafa, K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresour. Technol.* 2013, 135, 365–371.
- [29] Bates, S.H.; Jones, R.B.; Bailey, C.J. Insulin-like effect of pinitol. *Br. J. Pharmacol.* 2000, 130, 1944–1948.
- [30] Gruendel, S.; Otto, B.; Garcia, A.L.; Wagner, K.; Mueller, C.; Weickert, M.O.; Heldwein, W.; Koebnick, C. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans. *Br. J. Nutr.* 2007, 98, 101–105.
- [31] Zunft, H.J.; Luder, W.; Harde, A.; Haber, B.; Graubaum, H.J.; Koebnick, C.; Grunwald, J. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *Eur. J. Nutr.* 2003, 42, 235–242.
- [32] Klenow, S.; Gleib, M.; Haber, B.; Owen, R.; Pool-Zobel, B.L. Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human ht29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 1389–1397.
- [33] Perez-Olleros, L.; Garcia-Cuevas, M.; Ruiz-Roso, B.; Requejo, A. Comparative study of natural carob fibre and psyllium husk in rats. Influence on some aspects of nutritional utilisation and lipidaemia. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 173–178.

- [34] Guggenbichler, J.P. Adherence of enterobacteria in infantile diarrhea and its prevention. *Infection* 1983, 11, 239–242.
- [35] Turhan, I. Relationship between sugar profile and D-pinitol content of pods of wild and cultivated types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Int. J. Food Prop.* 2013, 17, 363–370.
- [36] Sigge, G.O.; Lipumbua, L.; Britza, T.J. Proximate composition of carob cultivars growing in south africa. *S. Afr. J. Plant Soil* 2011, 28, 17–22.
- [37] Diaz, C.S. Syrup of Natural Carob Sugars and a Process for Its Production. U.S. Patent 5,624,500 A, 29 April 1997.
- [38] Livesey, G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutr. Res. Rev.* 2003, 16, 163–191.
- [39] Baumgartner, S.; Gennerritzmann, R.; Haas, J.; Amado, R.; Neukom, H. Isolation and identification of cyclitols in carob pods (*Ceratonia-siliqua* L.). *J. Agric. Food Chem.* 1986, 34, 827–829.
- [40] Camero, B.M.; Merino, C.S. Method of Obtaining Pinitol from Carob Extracts. U.S. Patent 6699511 B2, 2 March 2004.
- [41] Haber, B. Carob fibre benefits and applications. *Cereal Foods World* 2002, 47, 365–369.
- [42] Marco, A.M.R.; De Mora, B.R.C.; Diaz, C.S. Method of Making Natural Carob Fibre. U.S. Patent 5,609,905 A, 11 March 1997.
- [43] Nasar-Abbas, S.M.; E-Huma, Z.; Vu, T.-H.; Khan, M.K.; Esbenshade, H.; Jayasena, V. Carob kibble: A bioactive-rich food ingredient. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, 15, 63–72.
- [44] Nawrocka, A.; Miś, A.; Szymańska-Chargot, M. Characteristics of relationships between structure of gluten proteins and dough rheology—Influence of dietary fibres studied by FT-Raman spectroscopy. *Food Biophys.* 2016, 11, 81–90.
- [45] Miś, A.; Dziki, D. Extensograph curve profile model used for characterising the impact of dietary fibre on wheat dough. *J. Cereal Sci.* 2013, 57, 471–479.
- [46] Rizzo, V.; Tomaselli, F.; Gentile, A.; La Malfa, S.; Maccarone, E. Rheological properties and sugar composition of locust bean gum from different carob varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7925–7930.

- [47] Lazaridou, A.; Biliaderis, C.G. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *J. Cereal Sci.* 2007, 46, 101–118.
- [48] Barak, S.; Mudgil, D. Locust bean gum: Processing, properties and food applications—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014, 66, 74–80.
- [49] Bergmann, W.; Reichel, M. Producing a Locust Bean Gum Comprising Food Product, Preferably a Powdered Baby Food, Comprises Heating a Liquid Foodstuff Mixture and Spray Drying the Mixture. German Patent DE102,011,106,409A, 26 July 2012.
- [50] Aoki, K.K.; Sasaki, J.; Shiotani, T. Jelly Foods Containing Agar, Xanthan and Locust Bean Gum. Europe Patent EP1,074,183 A2, 7 February 2001.
- [51] Yan, C.; Given, P.S.; Huvar, G.; Mallepally, R.R.; McHugh, M.A. Method of Loading Flavor into an Aerogel and Flavor Impregnated Aerogel Based on Food Grade Materials. U.S. Patent 20,160,058,045 A1, 3 March 2016.
- [52] Manganaris, G.A.; Goulas, V.; Vicente, A.R.; Terry, L.A. Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. *J. Sci Food Agric.* 2014, 94, 825–833.
- [53] Papagiannopoulos, M.; Wollseifen, H.R.; Mellenthin, A.; Haber, B.; Galensa, R. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSN. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3784–3791.
- [54] Makris, D.P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N.K. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J. Food Comp. Anal.* 2007, 20, 125–132.
- [55] Cavdarova, M.; Makris, D.P. Extraction kinetics of phenolics from carob (*Ceratonia siliqua* L.) kibbles using environmentally benign solvents. *Waste Biomass Valoriz.* 2014, 5, 773–779.
- [56] Novotni, D.; Curic, D.; Bituh, M.; Colic Baric, I.; Skevin, D.; Cukelj, N. Glycemic index and phenolics of partially-baked frozen bread with sourdough. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2011, 62, 26–33.
- [57] Roseiro, L.B.; Duarte, L.C.; Oliveira, D.L.; Roque, R.; Bernardo-Gil, M.G.; Martins, A.I.; Sepulveda, C.; Almeida, J.; Meireles, M.; Girio, F.M.; et al. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Ind. Crops. Prod.* 2013, 47, 132–138.

- [58] Almanasrah, M.; Roseiro, L.B.; Bogel-Lukasik, R.; Carvalheiro, F.; Brazinha, C.; Crespo, J.; Kallioinen, M.; Mänttari, M.; Duarte, L.C. Selective recovery of phenolic compounds and carbohydrates from carob kibbles using water-based extraction. *Ind. Crop. Prod.* 2015, 70, 443–450.
- [59] Baraldi, M. Extract of *Ceratonia Siliqua* Leaves and Pods Containing Polyphenols with Antioxidant and Antitumor Activities. U.S. Patent 20,040,265,404 A1, 30 December 2004.
- [60] Custodio, L.; Escapa, A.L.; Fernandes, E.; Fajardo, A.; Aligue, R.; Albericio, F.; Neng, N.; Nogueira, J.M.F.; Romano, A. Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant. Food. Hum. Nutr.* 2011, 66, 78–84.
- [61] Owen, R.W.; Haubner, R.; Hull, W.E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H.; Haber, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* 2003, 41, 1727–1738.
- [62] Custodio, L.; Fernandes, E.; Escapa, A.L.; Fajardo, A.; Aligue, R.; Albericio, F.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.; Romano, A. Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulp are strongly influenced by gender and cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 7005–7012.
- [63] Ayaz, F.A.; Torun, H.; Ayaz, S.; Correia, P.J.; Alaiz, M.; Sanz, C.; Gruz, J.; Strnad, M. Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *J. Food Qual.* 2007, 30, 1040–1055.
- [64] Ortega, N.; Macia, A.; Romero, M.P.; Trullols, E.; Morello, J.R.; Angles, N.; Motilva, M.J. Rapid determination of phenolic compounds and alkaloids of carob flour by improved liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 7239–7244.
- [65] Rababah, T.M.; Ereifej, K.I.; Esoh, R.B.; Al-u'datt, M.H.; Alrababah, M.A.; Yang, W. Antioxidant activities, total phenolics and hplc analyses of the phenolic compounds of extracts from common mediterranean plants. *Nat. Prod. Rep.* 2011, 25, 596–605.
- [66] Khanbabae, K.; van Ree, T. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18, 641–649.

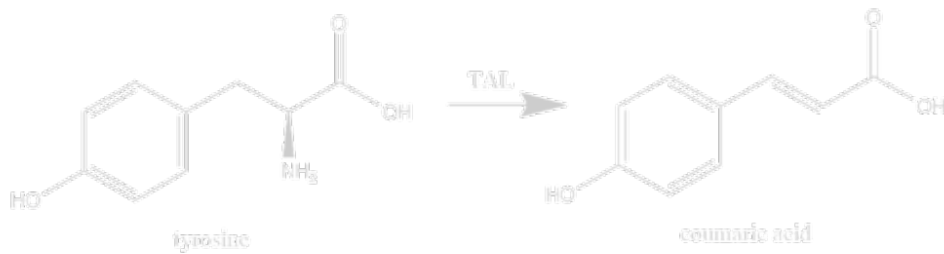
- [67] Avallone, R.; Plessi, M.; Baraldi, M.; Monzani, A. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Comp. Anal.* 1997, 10, 166–172.
- [68] Ayaz, F.A.; Torun, H.; Glew, R.H.; Bak, Z.D.; Chuang, L.T.; Presley, J.M.; Andrews, R. Nutrient content of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) flour prepared commercially and domestically. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2009, 64, 286–292.
- [69] Oziyci, H.R.; Tetik, N.; Turhan, I.; Yatmaz, E.; Ucgun, K.; Akgul, H.; Gubbuk, H.; Karhan, M. Mineral composition of pods and seeds of wild and grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruits. *Sci. Hortic.* 2014, 167, 149–152. [
- [70] Singh, G.; Arora, S.; Sharma, G.S.; Sangwan, R.B. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2007, 40, 625–631.
- [71] Tetik, N.; Yuksel, E. Ultrasound-assisted extraction of D-pinitol from carob pods using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 2014, 21, 860–865.
- [72] Wursch, P. Influence of tannin-rich carob pod fibers on the cholesterol metabolism in the rat. *J. Nutr.* 1979, 109, 685–692.
- [73] Gruendel, S.; Garcia, A.L.; Otto, B.; Mueller, C.; Steiniger, J.; Weickert, M.O.; Speth, M.; Katz, N.; Koebnick, C. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibres and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *J. Nutr.* 2006, 136, 1533–1538.
- [74] Ruiz-Roso, B.; Quintela, J.C.; de la Fuente, E.; Haya, J.; Perez-Olleros, L. Insoluble carob fibres rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Food Hum. Nutr.* 2010, 65, 50–56.
- [75] Aksit, S.; Caglayan, S.; Cukan, R.; Yaprak, I. Carob bean juice: A powerful adjunct to oral rehydration solution treatment in diarrhoea. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 1998, 12, 176–181.
- [76] Primikyri, A.; Chatziathanasiadou, M.V.; Karali, E.; Kostaras, E.; Mantzaris, M.D.; Hatzimichael, E.; Shin, J.S.; Chi, S.W.; Briasoulis, E.; Kolettas, E.; et al. Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity. *ACS Chem. Biol.* 2014, 9, 2737–2741.
- [77] Angst, E.; Park, J.L.; Moro, A.; Lu, Q.Y.; Lu, X.; Li, G.; King, J.; Chen, M.; Reber, H.A.; Go, V.L.; et al. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Pancreas* 2013, 42, 223–229.

- [78] Zhao, X.; Wang, Q.; Yang, S.; Chen, C.; Li, X.; Liu, J.; Zou, Z.; Cai, D. Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 2016, 781, 60–68.
- [79] Liang, C.Z.; Zhang, X.; Li, H.; Tao, Y.Q.; Tao, L.J.; Yang, Z.R.; Zhou, X.P.; Shi, Z.L.; Tao, H.M. Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2012, 27, 701–710.
- [80] Hafeez, B.B.; Siddiqui, I.A.; Asim, M.; Malik, A.; Afaq, F.; Adhami, V.M.; Saleem, M.; Din, M.; Mukhtar, H. A dietary anthocyanidin delphinidin induces apoptosis of human prostate cancer pc3 cells *in vitro* and *in vivo*: Involvement of nuclear factor- κ B signaling. *Cancer Res.* 2008, 68, 8564–8572.
- [81] Haber, B.D. Carob Product Based Antiinflammatory or Chemopreventative Agent. Europe Patent EP1,366,673 A3, 10 December 2003.
- [82] Corsi, L.; Avallone, R.; Cosenza, F.; Farina, F.; Baraldi, C.; Baraldi, M. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. On mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* 2002, 73, 674–684.
- [83] Klenow, S.; Jahns, F.; Pool-Zobel, B.L.; Glei, M. Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells? *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 2999–3004.
- [84] Klenow, S.; Glei, M. New insight into the influence of carob extract and gallic acid on hemin induced modulation of HT29 cell growth parameters. *Toxicol. In vitro* 2009, 23, 1055–1061.
- [85] Son, D.; Lee, J.W.; Lee, P.; Bae, K.H. Glycemic index of insu 100® herbal preparation containing koreanred ginseng, carob, mulberry, and banaba. *J. Ginseng Res.* 2010, 34, 89–92.
- [86] Forestieri, A.M.; Galati, E.M.; Trovato, A.; Tumino, G. Effects of guar and carob gums on glucose, insulin and cholesterol plasma levels in the rat. *Phytother. Res.* 1989, 3, 1–4.
- [87] Milek Dos Santos, L.; Tomzack Tulio, L.; Fuganti Campos, L.; Ramos Dorneles, M.; Carneiro Hecke Kruger, C. Glycemic response to carob (*Ceratonia siliqua* L.) in healthy subjects and with the *in vitro* hydrolysis index. *Nutr. Hosp.* 2015, 31, 482–487.
- [88] Loeb, H.; Vandenplas, Y.; Wursch, P.; Guesry, P. Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1989, 8, 480–485.

- [89] Liu, C.; Zheng, Y.; Xu, W.; Wang, H.; Lin, N. Rhubarb tannins extract inhibits the expression of aquaporins 2 and 3 in magnesium sulphate-induced diarrhoea model. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 619465.
- [90] Wursch, P. Treatment of Diarrhoea with Compositions Derived from Carob Pod. U.S. Patent 5,043,160 A, 27 August 1991.
- [91] Haber, B.; Ter, M.H.U.; Hausmanns, S. Cholesterol-Reducing Agent Made of Dietary Fibre and Cholesterol-Reducing Substances. WO2,004,009,093 A1, 29 January 2004.
- [92] Haber, B.; Kiy, T.; Hausmanns, S.; Ruesing, M. Dietary Foodstuff for Positively Influencing Cardiovascular Health. U.S. Patent 20,060,110,476 A1, 25 May 2006.
- [93] Ershoff, B.H.; Wells, A.F. Effects of gum guar, locust bean gum and carrageenan on liver cholesterol of cholesterolfed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962, 110, 580–582.
- [94] Yamamoto, Y.; Sogawa, I.; Nishina, A.; Saeki, S.; Ichikawa, N.; Iibata, S. Improved hypolipidemic effects of xanthan gum-galactomannan mixtures in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, 2165–2171.
- [95] Hassanein, K.M.A.; Youssef, M.K.E.; Ali, H.M.; El-Manfaloty, M.M. The influence of carob powder on lipid profile and histopathology of some organs in rats. *Comp. Clin. Pathol.* 2015, 24, 1509–1513.
- [96] Valero-Munoz, M.; Martin-Fernandez, B.; Ballesteros, S.; Lahera, V.; de las Heras, N. Carob pod insoluble fibers exerts anti-atherosclerotic effects in rabbits through sirtuin-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *J. Nutr.* 2014, 144, 1378–1384.
- [97] Jensen, C.D.; Spiller, G.A.; Gates, J.E.; Miller, A.F.; Whittam, J.H. The effect of acacia gum and a water-soluble dietary fibre mixture on blood lipids in humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 1993, 12, 147–154.
- [98] Greally, P.; Hampton, F.J.; MacFadyen, U.M.; Simpson, H. Gaviscon and carobel compared with cisapride in gastro-oesophageal reflux. *Arch. Dis. Child.* 1992, 67, 618–621.
- [99] Haskell, W.L.; Spiller, G.A.; Jensen, C.D.; Ellis, B.K.; Gates, J.E. Role of water-soluble dietary fibre in the management of elevated plasma cholesterol in healthy subjects. *Am. J. Cardiol.* 1992, 69, 433–439.
- [100] Jensen, C.D.; Haskell, W.; Whittam, J.H. Long-term effects of water-soluble dietary fibre in the management of hypercholesterolemia in healthy men and women. *Am. J. Cardiol.* 1997, 79, 34–37.

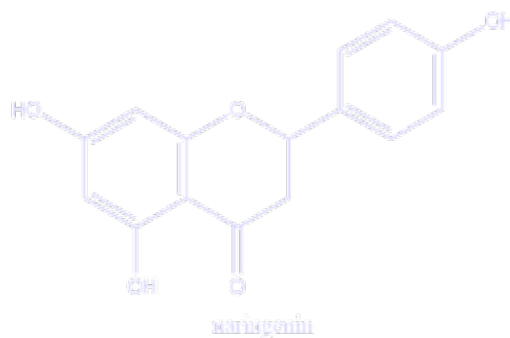
- [101] Zavoral, J.H.; Hannan, P.; Fields, D.J.; Hanson, M.N.; Frantz, I.D.; Kuba, K.; Elmer, P.; Jacobs, D.R., Jr. The hypolipidemic effect of locust bean gum food products in familial hypercholesterolemic adults and children. *Am. J. Clin. Nutr.* 1983, 38, 285–294.
- [102] Hostettler, M.; Steffen, R.; Tschopp, A. Efficacy and tolerance of insoluble carob fraction in the treatment of travellers' diarrhoea. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 1995, 13, 155–158.
- [103] Benchikh, Y.; Louaileche, H.; George, B.; Merlin, A. Changes in bioactive phytochemical content and *in vitro* antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) as influenced by fruit ripening. *Ind. Crops Prod.* 2014, 60, 298–303.
- [104] Chahar, M.K.; Sharma, N.; Dobhal, M.P.; Joshi, Y.C. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* 2011, 5, 1–12.
- [105] Serafini, M.; Peluso, I.; Raguzzini, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* 2010, 69, 273–278.
- [106] Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747.
- [107] Hu, M. Commentary: Bioavailability of flavonoids and polyphenols: Call to arms. *Mol. Pharm.* 2007, 4, 803–806.
- [108] Urso, R.; Blardi, P.; Giorgi, G. A short introduction to pharmacokinetics. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2002, 6, 33–44.
- [109] Lu, C.M.; Lin, L.C.; Tsai, T.H. Determination and pharmacokinetic study of gentiopicoside, geniposide, baicalin, and swertiamarin in chinese herbal formulae after oral administration in rats by LC-MS/MS. *Molecules.* 2014, 19, 21560–21578.
- [110] Cao, S.; Ni, B.; Feng, L.; Yin, X.; Dou, H.; Fu, J.; Lin, L.; Ni, J. Simultaneous determination of typhaneoside and Isorhamnetin-3-O-Neohesperidoside in rats after oral administration of pollen typhae extract by UPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. Sci.* 2015, 53, 866–871.
- [111] Wong, K.C.; Law, M.C.; Wong, M.S.; Chan, T.H. Development of a UPLC-MS/MS bioanalytical method for the pharmacokinetic study of (□)-epiafzelechin, a flavan-3-ol with osteoprotective activity, in C57BL/6J mice. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014, 967, 162–167.
- [112] Zhang, W.M.; Li, R.F.; Sun, M.; Hu, D.M.; Qiu, J.F.; Yan, Y.H. UPLC-MS/MS method for determination of avicularin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014, 965, 107–111.

- [113] Wu, H.F.; Guo, J.; Chen, S.L.; Liu, X.; Zhou, Y.; Zhang, X.P.; Xu, X.D. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed.* 2013, 72, 267–291.
- [114] Kaity, S.; Isaac, J.; Kumar, P.M.; Bose, A.; Wong, T.W.; Ghosh, A. Microwave assisted synthesis of acrylamide grafted locust bean gum and its application in drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 2013, 98, 1083–1094.
- [115] Prajapati, V.D.; Jani, G.K.; Moradiya, N.G.; Randeria, N.P.; Nagar, B.J. Locust bean gum: A versatile biopolymer. *Carbohydr. Polym.* 2013, 94, 814–821.
- [116] Siegel, R.A.; Rathbone, M.J. Overview of controlled release mechanisms. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*; Siepmannl, J., Siegel, R.A., Rathbone, M.J., Eds.; Springer: St. Paul, MN, USA, 2011; pp. 19–43.
- [117] Dionisio, M.; Grenha, A. Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2012, 4, 175–185.
- [118] Tamarkin, D.; Friedman, D.; Eini, M. Foam Carrier Containing Amphiphilic Copolymeric Gelling Agent. Patent WO2005,011,567 A3, 27 October 2005.
- [119] Baichwal, A.R.; Staniforth, J.N. Controlled Release Insufflation Carrier for Medicaments Comprising Xanthan Gum and Locust Bean Gum. Patent EP 0818991 B1, 4 January 2006.
- [120] Biasutto, L.; Zoratti, M. Prodrugs of quercetin and resveratrol: A strategy under development. *Curr. Drug Metab.* 2014, 15, 77–95.
- [121] Swaminathan, S.; Cavalli, R.; Trotta, F. Cyclodextrin-based nanosponges: A versatile platform for cancer nanotherapeutics development. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2016.
- [122] Gulec, K.; Demirel, M. Characterization and antioxidant activity of quercetin/methyl-β-cyclodextrin complexes. *Curr. Drug Deliv.* 2015, 13, 444–451.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Ανάπτυξη συζευγμάτων ναρινγενίνης με ενισχυμένο και τριπλό αντιαιμοπεταλιακό προφίλ. Σχεδιασμός, σύνθεση και in vitro αξιολόγηση σταθερότητας σε ανθρώπινο πλάσμα



6.1. Εισαγωγή

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), τα καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) παραμένουν η πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Μια από τις προτεινόμενες προσεγγίσεις που έχουν κερδίσει έδαφος τα τελευταία χρόνια για τη μείωση των επιπτώσεων της καρδιαγγειακής νόσου, είναι η υιοθέτηση ενός πιο υγιεινού τρόπου ζωής και η κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων μαζί με διατροφή βασιζόμενη σε συμπληρώματα [1].

Η αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία κατέχει σημαντικό ρόλο στις τρέχουσες μεθόδους αντιμετώπισης των CVD [2]. Η πρόσφατα χρησιμοποιούμενη, χορηγούμενη δια του στόματος αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία για την αντιμετώπιση των CVD συνίσταται από την ασπιρίνη (αναστολέας COX-1) σε συνδυασμό με τον ανταγωνιστή του P2Y12 υποδοχέα των αιμοπεταλίων, την κλοπιδογρέλη και την πρασουγρέλη ή τικαγρελόρη (διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία) [2]. Ωστόσο, η διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία σχετίζεται με αιμορραγικές επιπλοκές, ενώ ένα ποσοστό των ασθενών δεν ανταποκρίνεται επαρκώς (αντοχή στο φάρμακο) στην ασπιρίνη ή / και στην κλοπιδογρέλη [2,3]. Επιπλέον, παρά τη χορήγηση της διπλής αντιαιμοπεταλιακής θεραπείας, ο καρδιαγγειακός κίνδυνος παραμένει σχετικά υψηλός, με τους ασθενείς να παρουσιάζουν συχνά υποτροπή και να εκδηλώνουν θρομβωτικό ισχαιμικό επεισόδιο [2,3]. Μια από τις τελευταίες προσεγγίσεις για την δευτερογενή πρόληψη των αθηροθρομβωτικών επεισοδίων είναι η ταυτόχρονη χορήγηση τριών αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων: ασπιρίνης, ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα P2Y12 και ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα-1 (PAR-1) ενεργοποιημένου από πρωτεάση (voraparaxar). Ωστόσο, αυτό το τριπλό αντιαιμοπεταλιακό σχήμα συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο μέτριας ή σοβαρής αιμορραγίας [4-6].

Έτσι, είναι ύψιστης σημασίας η αναβάθμιση των καθιερωμένων αντιαιμοπεταλιακών θεραπειών και ο εμπλουτισμός τους με νέα βιοδραστικά μόρια με πολυλειτουργικές ιδιότητες, σε μια προσπάθεια ώστε να αυξηθεί η αντιθρομβωτική τους αποτελεσματικότητα και να μειωθούν οι επιπλοκές (αιμορραγία). Πρόσφατα, αποδείξαμε την αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα ενός εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, του οποίου συγκεκριμένα συστατικά ανέστειλαν σημαντικά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που επάγεται μέσω των υποδοχέων P2Y12 και PAR-1 [7]. Η θεραπευτική δράση των φυσικών προϊόντων, ιδίως αυτών που προέρχονται από φυτά, καταδεικνύεται από το γεγονός ότι πολλά κοινώς χρησιμοποιούμενα φάρμακα προέρχονται άμεσα ή έμμεσα από τα φυτά. Εκτός από την

άμεση χρήση τους ως φυτικά φάρμακα, τα φυσικά προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημικά μοντέλα για τον σχεδιασμό, την σύνθεση και την ημι-σύνθεση νέων ουσιών για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών [8,9].

Τα φλαβονοειδή, μια διακριτή κατηγορία φυσικών προϊόντων, δεν συσχετίζονται μόνο με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου όταν ευρίσκονται σε υψηλά επίπεδα σε διαιτητικές πηγές [10,11], αλλά παρουσιάζουν επίσης σημαντικές αντισυσσωρευτικές δραστηριότητες [12-14]. Παρά τις άφθονες ευεργετικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, η εφαρμογή τους στην ιατρική είναι περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς τους, καθώς οι πολυάριθμες φαινολικές ομάδες τους παρεμποδίζουν την μεταφορά τους μέσω της λιπόφιλης κυτταρικής μεμβράνης [15,16]. Η ναρινγενίνη, μια ευρέως μελετημένη φλαβανόνη, διαθέτει ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Αυτές οι ιδιότητες περιλαμβάνουν αναστολή ενζύμων, αντι-φλεγμονώδη, αντι-οξειδωτική και αντι-καρκινική δραστηριότητα [17-20]. Για να αποδειχτεί η πολλαπλή φαρμακευτική δράση της ναρινγενίνης, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για να διαπιστωθεί εάν αυτό το φλαβονοειδές έχει κάποια επίδραση έναντι των καρδιολογικών ασθενειών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης του Zhang και των συνεργατών του, η ναρινγενίνη έχει την ικανότητα να δρα έναντι της καρδιακής υπερτροφίας που προκαλείται από υπερφόρτωση, ενισχύοντας την καρδιακή λειτουργία [21]. Εντούτοις, η ναρινγενίνη χαρακτηρίζεται από μικρή αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα σε σύγκριση με άλλα φλαβονοειδή [22,23].

Έχει αποδειχθεί ότι ο σχηματισμός προφαρμάκου, όπως η προστασία της OH-ομάδας των φαινολικών ομάδων, αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστικότητα τους καθώς και την αντοχή τους στον ηπατικό μεταβολισμό [24]. Ωστόσο, οι πολυάριθμες βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών αποδίδονται στην φαινολική OH-ομάδα τους και έτσι η πλήρης προστασία τους δεν μπορεί να λειτουργήσει ως επιλογή. Αρκετές μελέτες, οι οποίες παρουσιάζουν την συσχέτιση μεταξύ της χαρακτηριστικής δομής των φλαβονοειδών και της δραστηριότητά τους, έχουν δείξει ότι οι ομάδες υδροξυλίου στο C5 και το C7 του δακτυλίου A και η 4-οξο λειτουργία του δακτυλίου C διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο [25,26]. Επιπλέον, λειτουργικές ομάδες φλαβονοειδών που συσχετίζονται με αντιαιμοπεταλιακή δράση, περιλαμβάνουν τον μη υδροξυλιωμένο δακτύλιο B και τον δακτύλιο C [23], και συνεπώς τροποποίηση στις OH ομάδες του δακτυλίου B θα μπορούσε να επάγει σημαντική ενίσχυση των αντιαιμοπεταλιακών δράσεων των φλαβονοειδών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση ενός νέου υβριδίου ναρινγενίνης που να έχει την ικανότητα ισχυρής αναστολής της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Για το σκοπό αυτό εφαρμόσαμε την τοποεκλεκτική ακετυλίωση μέσω βιοκατάλυσης, δεδομένου ότι τα ένζυμα είναι γνωστά για την υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα και τοποεκλεκτικότητα τους [27]. Επιλέξαμε την λιπάση B από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB), έναν εξαιρετικό βιοκαταλύτη που χρησιμοποιείται συχνά για την ακετυλίωση διαφόρων φυσικών παραγώγων, λόγω της ικανότητάς του να «δέχεται» ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, την καλή καταλυτική δραστηριότητα και την υψηλή τοποεκλεκτικότητα του [28-31]. Επίσης, προχωρήσαμε στην χημική σύνθεση ενός υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης. Το DHA επελέγη ορθολογικά επειδή είναι μια μακράς αλυσίδας ωμέγα-3 [(η-3)] πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (PUFA), συμπεριλαμβανομένου του εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA), που φαίνεται ότι εμφανίζει ισχυρές ευεργετικές επιδράσεις έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η λήψη συμπληρωμάτων PUFA συσχετίζεται με βελτιωμένη καρδιαγγειακή λειτουργία εξαιτίας των αντιφλεγμονωδών τους ιδιοτήτων, μειωμένο κίνδυνο περιφερικής αρτηριακής νόσου και μείζονος στεφανιαίων επεισοδίων και επίσης συνχορηγούνται σε θεραπείες αντιπηκτικής αγωγής, σε περιπτώσεις ανοχής στην ασπιρίνη ή υποαντιδραστικότητας της κλοπιδογρέλης [32-34]. Παρά το γεγονός ότι ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι αυτές οι επιδράσεις έχουν αποδοθεί στην ικανότητα των PUFA να ανταγωνίζονται για τις ίδιες μεταβολικές οδούς με το αραχιδονικό οξύ (AA), οι μηχανισμοί της καρδιοπροστατευτικής τους δράσης είναι πολυπαραγοντικοί και παραμένουν ασαφείς [35]. Αξιολόγηση της σταθερότητας των νεοσυντιθέμενων αναλόγων σε ανθρώπινο πλάσμα πραγματοποιήθηκε μέσω UHPLC-MS/MS.

6.2. Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1. Χημικά και Αντιδραστήρια

Το ροσμαρινικό οξύ και η ναρινγενίνη αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich, η λιπάση B από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* ακινητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη (Novozyme 435), ελήφθη από την Novo Nordisk A / S. Το cis-4,7,10,13,16,19- DHA αγοράστηκε από την Carbosynth. Το μυρμηγκικό οξύ (98 % LC-MS βαθμού) αγοράστηκε από την Fluka. Μεθανόλη και απιονισμένο νερό LC-MS βαθμού, καθώς και μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο, ακετονιτρίλιο HPLC βαθμού και τριφθοροοξικό οξύ (βαθμού

καθαρότητας σύνθεσης πεπτιδίων) αγοράστηκαν από την Fisher Scientific. Τα αντιδραστήρια N, N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο (DCC) και διμεθυλαμινοπυριδίνη (DMAP) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Fisher Scientific.

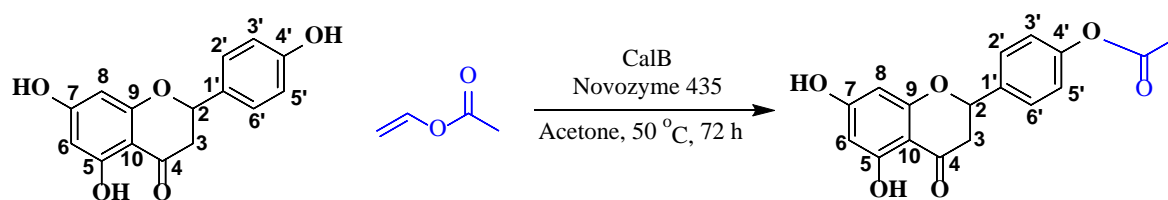
Η TLC διεξήχθη επί πλακών πυριτικής πηκτής (UV254) της Alfa Aesar. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) βαθμού καθαρότητας LC-MS, αγοράστηκε από την Thermo Scientific, ενώ το DMSO-d₆ (99.8 %) από την Euriso-top. Τα πειράματα NMR διεξήχθησαν σε φασματόμετρο Bruker Avance 400 MHz εξοπλισμένο με μια μονάδα z-gradient (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Φίλτρα μεμβράνης με μέγεθος πόρων 0.2 μm και διάμετρο 4 mm αγοράστηκαν από την εταιρεία Phenomenex. Αέριο αργό υψηλής καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε ως αέριο σύγκρουσης (collision gas).

Η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) ελήφθη από την Chrono-Log Corp (Havertown, PA, USA), το AA αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA και το πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης (TRAP-6) από την Bachem, Bubendorf, Switzerland. Για τις μελέτες σταθερότητας χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο πλάσμα, απουσίας φαρμάκων, από υγιείς δότες, το οποίο ήταν μια ευγενική προσφορά από το Κέντρο Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

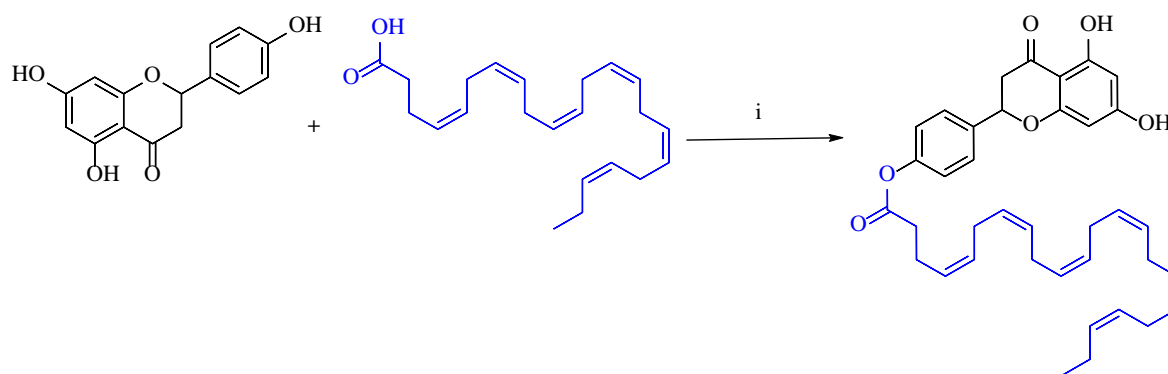
6.2.2. Σύνθεση εναντιοεκλεκτικών συζευγμάτων ναρινγενίνης

Η σύνθεση της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης παρασκευάστηκε σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται στην **Εικόνα 6.1** [17]. Για τη σύνθεση της 4'-DHA-ναρινγενίνης, ναρινγενίνη (9.54 mg / 0.04 mmol) προστέθηκε σε διάλυμα DHA (11.6 μL / 0.03 mmol) σε 2 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Μετά από 5 λεπτά, διάλυμα N, N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιου DCC (9.8 mg, 0.04 mmol) και καταλυτική ποσότητα 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) προστέθηκαν στάγδην σε 2 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου και η αντίδραση συνεχίστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.

Η TLC (CH₂Cl₂ / CH₃OH, 9.5 / 0.5 v/v) εμφάνισε το σχηματισμό μιας νέας κηλίδας. Ο διαλύτης εξατμίστηκε και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με HPLC (H₂O / MeCN) δίδοντας 13.1 mg (65.9 %) ενός ανοικτοκίτρινου στερεού (**Εικόνα 6.2**).



Εικόνα 6.1. Χημική σύνθεση του υβριδίου της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης.



Εικόνα 6.2. Χημική σύνθεση του υβριδίου της 4'-DHA-ναρινγενίνης. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (i) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 2 h.

6.2.3. *In silico* μελέτες της ναρινγενίνης και των παραγώγων / συζευγμάτων της: Ανάλυση κύριων συνιστωσών και υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης σε τρεις υποδοχείς που εμπλέκονται στη θρόμβωση

6.2.3.1. Μέθοδος ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA)

Αντιπροσωπευτικά αντιθρομβωτικά φάρμακα που δρουν ως ανταγωνιστές του υποδοχέα P2Y₁₂ (τικλοπιδίνη, τικαγρελόρη, καγκρελόρ, πρασουγρέλη, κλοπιδογρέλη), αναστολείς της γλυκοπρωτεΐνης IIb / IIIa (επιφιμπατίδη, ριτοφιβάνη), αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης (διπυριδαμόλη, σιλοσταζόλη), ανταγωνιστές PAR-1 (voraparaxar, atoraparaxar) και αναστολείς COX-1 (τριφλουζάλη, ακετυλοσαλικυλικό οξύ) επιλέχθηκαν για υπολογισμούς ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA). Όλες οι ενώσεις μαζί με τη ναρινγενίνη, την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη και το υβρίδιο της 4'-DHA-ναρινγενίνης σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Maestro v.10.5 [36] και στη συνέχεια

ελαχιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το LigPrep 3.4 [37] και εφαρμόζοντας πεδίο δύναμης OPLS3 [38]. Οι τοπολογικές παράμετροι που προβλέπουν την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME) των ενώσεων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το QikProp 4.4 [39]. Οι επιλεγμένες ιδιότητες για την ανάλυση αυτή ήταν: το μοριακό βάρος (MW), δότες δεσμού υδρογόνου (HBD), δέκτες δεσμών υδρογόνου (HBA), προβλεπόμενος συντελεστής κατανομής οκτανόλης / νερού (logP0 / w), προβλεπόμενη διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα (logS), πολική επιφάνεια (PSA) και η συνολική επιφάνεια προσβάσιμη στο διαλύτη χωρισμένη σε υδρόφοβες (FOSA) και υδρόφιλες περιοχές (FISA). Εκτελέστηκαν τρεις διαφορετικές αναλύσεις κύριων συνιστωσών. Στην πρώτη ανάλυση PCA χρησιμοποιήθηκαν 13 φάρμακα και η ναρινγενίνη. Στη δεύτερη ανάλυση οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα 13 φάρμακα, τη ναρινγενίνη και την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη και η τρίτη ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των 13 φαρμάκων, της ναρινγενίνης και του υβριδίου της 4'-DHA-ναρινγενίνης. Η PCA ανάλυση διεξήχθη με τη χρήση του λογισμικού Canvas 2.4 [40,41].

6.2.3.2. Υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης

Η ανάλυση των διαμορφώσεων για τη ναρινγενίνη και τα παράγωγά της πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ConfGen [42]. Οι δομές των υποδοχέων PAR-1 (PDB ID 3VW7) [43], P2Y₁₂ (PDB ID 4PY0) [44] και του COX-1 (PDB ID 3KK6) [45] διαμορφώθηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο Protein Preparation Wizard [46] του λογισμικού Schrodinger Suite 2015.2. Οι τρεις αυτές ενώσεις αγκυροβολήθηκαν στις θέσεις πρόσδεσης των υποδοχέων χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Glide 6.7 [47] και τον αλγόριθμο Glide XP [48].

6.2.4. Πειράματα LC-MS/MS

6.2.4.1. Συνθήκες λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών για την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη

Η υγρή χρωματογραφία διεξήχθη με χρήση ενός συστήματος UHPLC Bruker Advance UHPLC (Bruker, Germany). Ως εσωτερικό πρότυπο (internal control, IS) χρησιμοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο προστίθεται πριν το στάδιο της εκχύλισης

και συμβάλει ως διορθωτικός παράγοντας στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ο φούρνος της στήλης ρυθμίστηκε στους 40 °C. Για τον διαχωρισμό του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε μια στήλη Kinetex C18 (100 mm x 2.1 mm, 2.6 μm), με προστήλη 2.1 mm, της εταιρείας Phenomenex. Οι κινητές φάσεις αποτελούνταν από διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0.1 % (A) και MeOH (B). Πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλουση με σταθερό ρυθμό ροής 250 μL min⁻¹ ως ακολούθως: η αρχική φάση (B) με συγκέντρωση 15 %, αυξήθηκε σε 95 % μέσα σε 2.5 min, στη συνέχεια διατηρήθηκε σταθερή για 2 min και μειώθηκε στο 15 % μέχρι το τέλος της μεθόδου. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 6 min και ο χρόνος κατακράτησης (RT) της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης, της ναρινγενίνης και του ροσμαρινικού οξέος ήταν 3.3, 3.1 και 2.7 min, αντίστοιχα. Ο όγκος έγχυσης ρυθμίστηκε στα 5 μL.

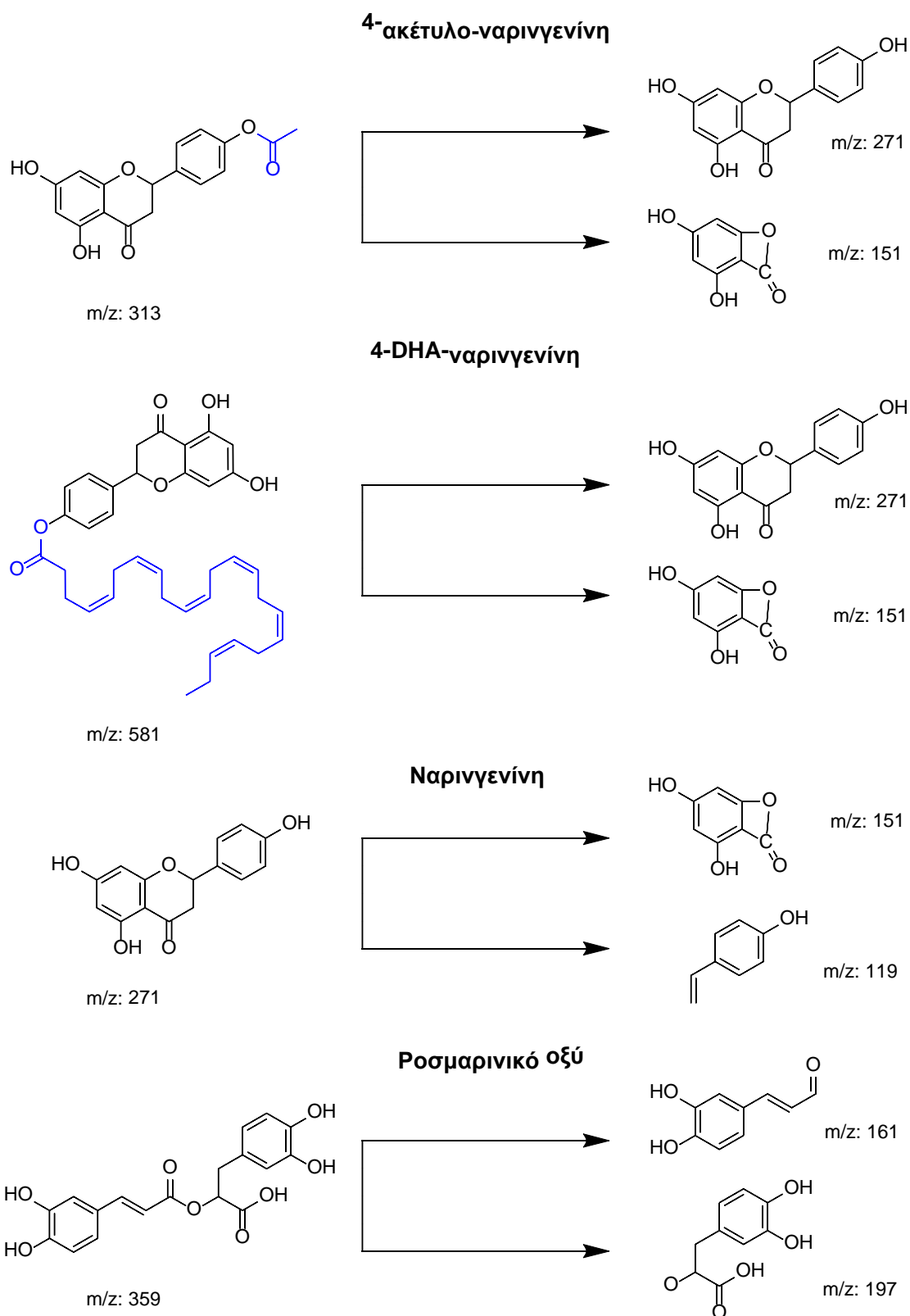
Για την ανίχνευση των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπλού Bruker EVOQ Elite ER, σε λειτουργία ηλεκτροψεκασμού αρνητικού ιοντισμού (ESI-) με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων (MRM). Για την ανίχνευση της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης και ναρινγενίνης, η τάση ψεκασμού (-) ρυθμίστηκε στα 4000 V, η ροή του αερίου αποδιαλύτωσης στις 50 μονάδες, η θερμοκρασία του αερίου αποδιαλύτωσης στους 350 °C, η ροή του αερίου του κώνου στις 20 μονάδες, η θερμοκρασία του κώνου στους 200 °C και η ροή του αερίου εκνέφωσης στις 40 μονάδες. Χρησιμοποιώντας το εργαλείο MRM Builder, το οποίο παρέχεται από το λογισμικό MS Workstation της εταιρείας Bruker, οι βέλτιστες MRM θραυσματοποιήσεις που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό ήταν οι m/z 313 → 270.9 and 313 → 151 για την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη, 271 → 151 and 271 → 119.1 για τη ναρινγενίνη και 359 → 161.0 και 359 → 197.0 για το ροσμαρινικό οξύ (**Εικόνα 6.3**). Η επεξεργασία και η αξιολόγηση των δεδομένων στο σύνολο τους πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού MSWS 8.2 της εταιρείας Bruker.

6.2.4.2. Συνθήκες λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών για το υβρίδιο της 4'- DHA-ναρινγενίνης

Για το υβρίδιο της 4'- DHA-ναρινγενίνης χρησιμοποιήθηκε η ίδια οργανολογία, συμπεριλαμβανομένου της ίδιας στήλης και κινητής φάσης για τον διαχωρισμό του δείγματος καθώς και το ίδιο εσωτερικό πρότυπο. Στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε βαθμιδωτή έκλουση με μια σταθερή ροή 300 μL min⁻¹ και συγκέντρωση αρχικής φάσης (B)

5 %, σταδιακή αύξηση έως 95 % μέσα σε 2.5 min, σταθερή για 2 min και μείωση σε 5 % μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Ο χρόνος ανάλυσης ήταν 6 min και ο χρόνος κατακράτησης του υβριδίου της 4'-DHA-ναρινγενίνης ήταν 5 min. Τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν αμέσως για την ανίχνευση της απελευθερωμένης ναρινγενίνης μετά την υδρόλυση του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης από υδρολάσες του πλάσματος. Οι χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στην **Παράγραφο 6.2.4.1**.

Το φασματόμετρο μάζας ήταν σε λειτουργία ηλεκτροψεκασμού αρνητικού ιοντισμού (ESI-) χρησιμοποιώντας MRM και λειτουργικές συνθήκες όπως αυτές περιγράφονται στην **Παράγραφο 6.2.4.1**. Οι βέλτιστες MRM θραυσματοποιήσεις που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό ήταν m/z 581.5 \rightarrow 271, 581.5 \rightarrow 151.1 για το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης, 271 \rightarrow 151, 271 \rightarrow 119.1 για τη ναρινγενίνη και 359 \rightarrow 161.0, 359 \rightarrow 197.0 για το ροσμαρινικό οξύ (**Εικόνα 6.3**). Η επεξεργασία και η αξιολόγηση των δεδομένων στο σύνολο τους πραγματοποιήθηκε εκ νέου μέσω του λογισμικού MSWS 8.2.



Εικόνα 6.3. Οι βέλτιστες θραυσματοποιήσεις μέσω MRM για τα δύο ανάλογα, τη ναρινγενίνη και το ροσμαρινικό οξύ (IS).

6.2.4.3. Μελέτη σταθερότητας των υβριδίων της ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος

Για την ποσοτικοποίηση των νεοσυντιθέμενων αναλόγων καθώς και της ναρινγενίνης σε πλάσμα αίματος, κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς με τη χρήση εσωτερικού προτύπου. Η χάραξη τους πραγματοποιήθηκε με βάση το λόγο του εμβαδού της κάθε ένωσης προς το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου, όπως προκύπτουν από τα χρωματογραφήματα, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της κάθε ένωσης. Τα πρότυπα δείγματα καμπύλης αναφοράς παρασκευάζονται με εμβολιασμό λευκού ανθρώπινου πλάσματος (μη περιέχον τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο) με κατάλληλες ποσότητες διαλυμάτων που περιέχουν την κάθε ένωση, ώστε να προκύψουν τα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης (Πίνακας 6.1). Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τριπλέτες δειγμάτων.

Πίνακας 6.1. Τελικές συγκεντρώσεις πρότυπων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς για κάθε ένωση

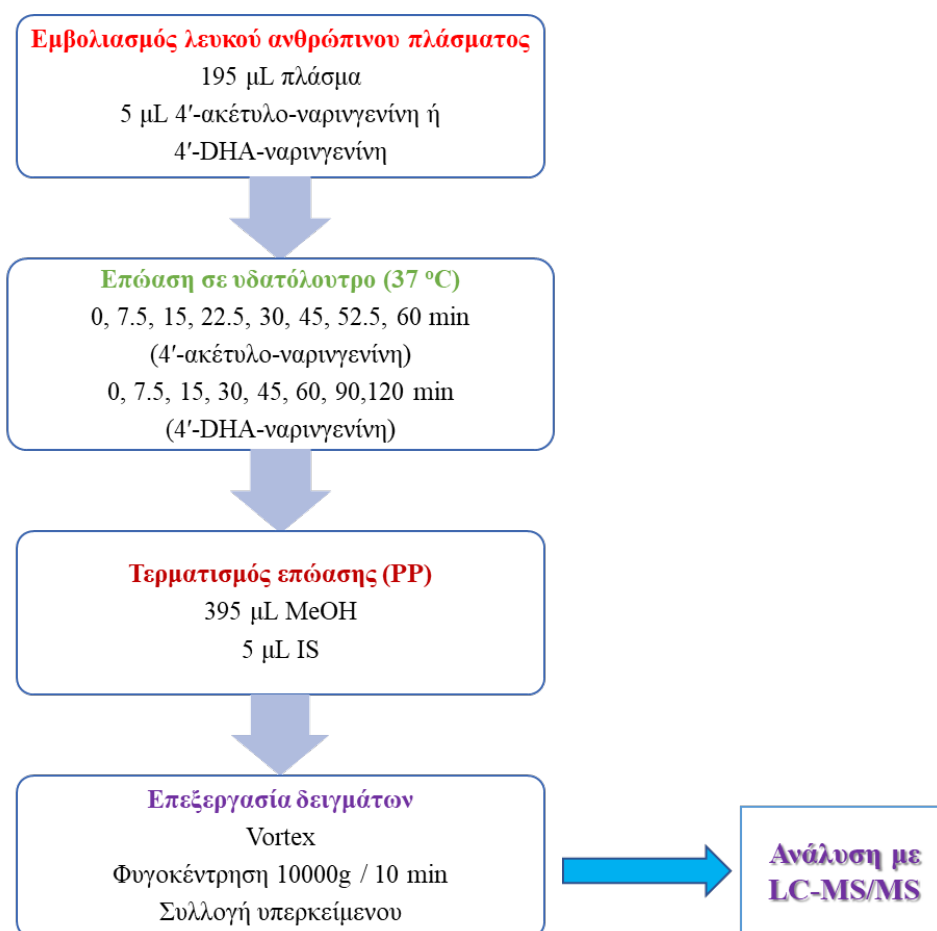
	Ναρινγενίνη (μM)	4'-ακέτυλο- ναρινγενίνη (μM)	4'-DHA-ναρινγενίνη (μM)
Επίπεδο συγκέντρωσης 1	0.5	0.5	0.1
Επίπεδο συγκέντρωσης 2	0.8	0.6	0.25
Επίπεδο συγκέντρωσης 3	1	0.8	0.5
Επίπεδο συγκέντρωσης 4	1.4	1	0.8
Επίπεδο συγκέντρωσης 5	1.5	1.5	1
Επίπεδο συγκέντρωσης 6	-	-	1.5
Επίπεδο συγκέντρωσης 7	-	-	2

Για την προετοιμασία των δειγμάτων καμπύλης αναφοράς έγινε εμβολιασμός λευκού ανθρώπινου πλάσματος με συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των διαλυμάτων του εκάστοτε αναλύτη. Σε 195 μL λευκού ανθρώπινου πλάσματος (η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 7.4 με HCl) προστίθενται 5 μL του εκάστοτε αναλύτη. Στη συνέχεια ακολουθεί κατακρήμνιση πρωτεϊνών με την προσθήκη 395 μL MeOH μαζί με 5 μL του εσωτερικού προτύπου (ροσμαρινικό οξύ). Τα δείγματα αναδεύονται

και φυγοκεντρώνονται σε 10.000 g για 10 min. Στη συνέχεια, γίνεται συλλογή του υπερκείμενου, φιλτράρισμα και μεταφορά σε φιαλίδια για ανάλυση με LC-MS/MS.

Η εξέταση της σταθερότητας των ενώσεων στο ανθρώπινο πλάσμα, πραγματοποιήθηκε σε πρωτόκολλο βασισμένο σε εργασία του Di και των συνεργατών του [49]. Η 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη διαλυτοποιήθηκε σε DMSO σε τελική συγκέντρωση 80 μM, ενώ το υβρίδιο της 4'-DHA-ναρινγενίνης σε τελική συγκέντρωση 40 μM. Το ροσμαρινικό οξύ αραιώθηκε με MeOH σε τελική συγκέντρωση 40 μM και χρησιμοποιήθηκε ως IS. 5 μL από το ακετυλιωμένο ανάλογο επώαστηκε με 195 μL ανθρώπινου πλάσματος (η τιμή pH ρυθμίστηκε στο 7.4) για 0, 7.5, 15, 22.5, 30, 45, 52.5 και 60 min στους 37 °C. Για τον τερματισμό των αντιδράσεων, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 395 μL MeOH μαζί με IS (5 μL). Τα δείγματα αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000 g για 10 min. Στη συνέχεια, παραλήφθηκε το υπερκείμενο, φιλτραρίστηκε και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια για ανάλυση. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης, αλλά τα χρονικά σημεία επώασης ήταν 0, 7.5, 15, 30, 45, 60, 90 και 120 min (**Εικόνα 6.4**). Κάθε δείγμα παρασκευάστηκε εις τριπλούν και σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση της μέσης συγκέντρωσης έναντι του χρόνου για τις δύο ενώσεις και την ναρινγενίνη.

Για να εκτιμηθεί η χημική υδρόλυση της 4'-DHA-ναρινγενίνης, πραγματοποιήθηκε ο ίδιος προσδιορισμός χρησιμοποιώντας ανθρώπινο πλάσμα το οποίο πρώτα επώαστηκε στους 52 °C για 24 h, έτσι ώστε να εξαλειφθεί η δραστηριότητα των υδρολασών του πλάσματος. Εν συνεχεία, σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση της % αρχικής συγκέντρωσης του ανάλογου έναντι του χρόνου.



Εικόνα 6.4. Πορεία προκατεργασίας δειγμάτων για αξιολόγηση σταθερότητας σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος μέσω LC-MS/MS.

6.2.5. Μελέτες της δράσης της ναρινγενίνης και των συζευγμάτων της έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Η αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα της ναρινγενίνης, της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης, του DHA, καθώς και του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης μελετήθηκε σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) με συσσωρευομετρία οπτικής διαπερατότητας (LTA), όπως έχει ήδη περιγραφεί [7,50,51]. Εν συντομία, το PRP παρασκευάστηκε από δείγματα αίματος κατεργασμένα με κιτρικό που λαμβάνονται από το περιφερικό φλεβικό αίμα υγιών εθελοντών και ο αριθμός των αιμοπεταλίων προσαρμόστηκε σε $2.5 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ με ομόλογο, χαμηλό σε αιμοπετάλια, πλάσμα αίματος (PPP) [7,50,51]. Το PRP στη συνέχεια προεπώαστηκε για 1 min με διάφορες συγκεντρώσεις από κάθε μία από τις ενώσεις, όλες διαλυμένες σε DMSO, πριν την έναρξη του συνυπολογισμού. Η τελική συγκέντρωση

DMSO σε κάθε προσδιορισμό ήταν <0.5 % (v/v). Στα πειράματα ελέγχου, το PRP επώαστηκε με την κάθε ένωση για 5 min προκειμένου να αξιολογηθεί εάν η ένωση αυτή συνιστά η ίδια ενεργοποιητή αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από ADP (10 μM), AA (500 μM) και TRAP-6 (10 μM) προσδιορίστηκε σε 0.5 mL PRP, στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση σε 1200 rpm, σε ένα Chronolog Lumi-Aggregometer (model 700 4- channel) εξοπλισμένο με το πακέτο λογισμικού AggroLink. Η μέγιστη συσσωμάτωση, που επιτυγχάνεται εντός 4 min μετά την προσθήκη κάθε αγωνιστή, προσδιορίστηκε και εκφράστηκε ως % ποσοστό μετάδοσης φωτός βαθμονομημένο για κάθε δείγμα (μέγιστο ποσοστό συσσωμάτωσης, MPA). Η αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων (IPA) που προκαλείται από κάθε ένωση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{IPA (\%)} = \frac{\text{MPA αιμοπεταλίων σε DMSO} - \text{MPA παρουσία κάθε παραγώγου}}{\text{MPA αιμοπεταλίων σε DMSO}} \times 100$$

Η ανασταλτική αποτελεσματικότητα κάθε ένωσης που δοκιμάστηκε, εκφράστηκε επίσης ως τιμή IC₅₀ (συγκέντρωση που προκαλεί 50 % αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων). Όλες οι μελέτες συσσωμάτωσης διεξήχθησαν εντός 3 h μετά την αιμοληψία.

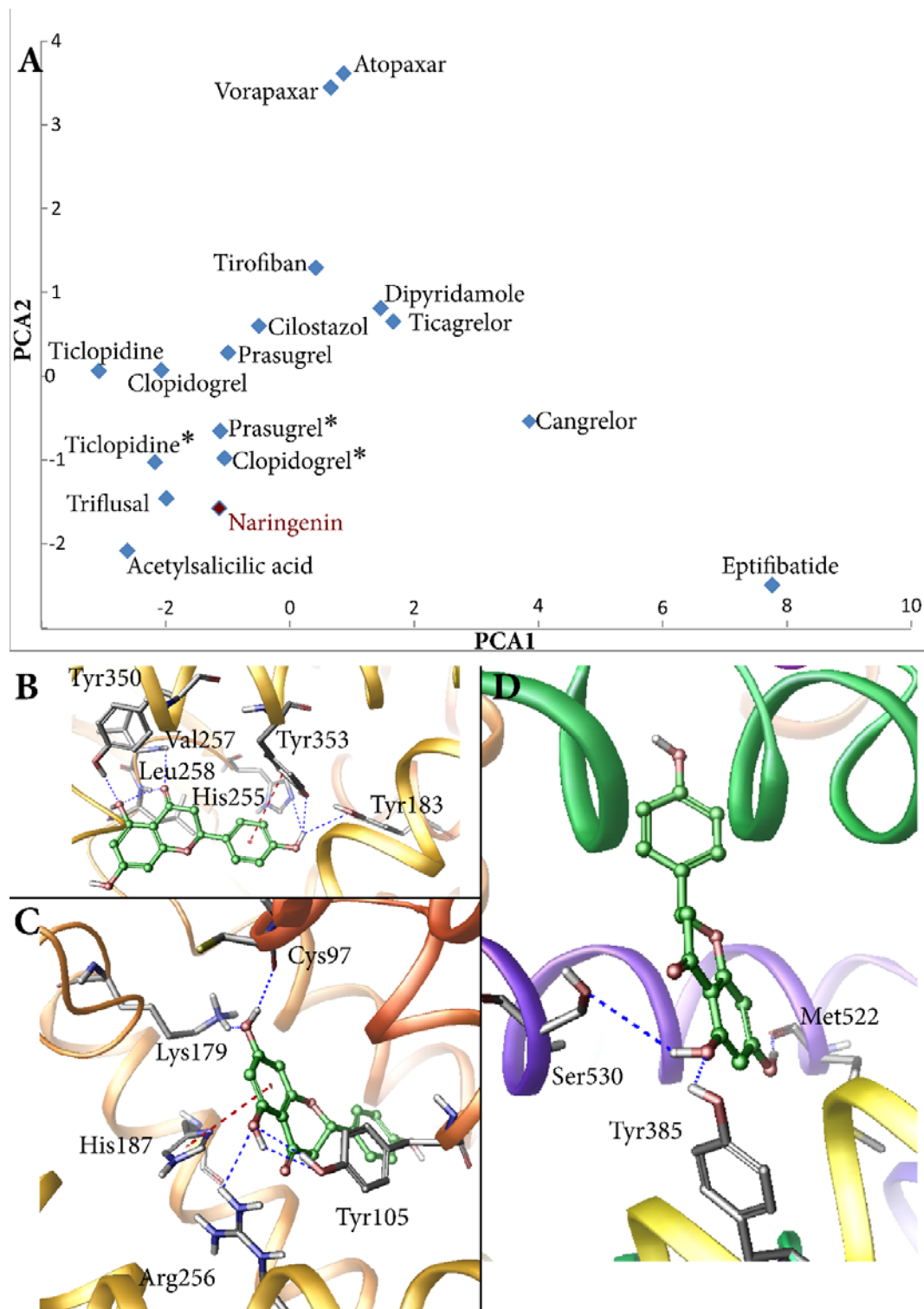
6.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.3.1. *In silico* ανάλυση της αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας της ναρινγενίνης

Προκειμένου να διερευνηθεί μια δυνητική αλληλοεπικάλυψη στο βιολογικώς σχετικό χημικό χώρο μεταξύ της ναρινγενίνης και των εγκεκριμένων αντιθρομβωτικών φαρμάκων, δημιουργήθηκαν χάρτες του χημικού χώρου από χώρους βασισμένους στις ιδιότητες τους και απεικονίστηκαν με ανάλυση κύριων συνιστωσών [7,51]. Ο χημικός χώρος βάσει των ιδιοτήτων των 13 εγκεκριμένων αντιθρομβωτικών φαρμάκων υποδεικνύει διαφορετικό τρόπο δράσης αφού παρατηρήθηκαν αναστολείς COX-1, ανταγωνιστές P2Y₁₂ του υποδοχέα ADP και ανταγωνιστές PAR-1. Ο χώρος αυτός περιγράφηκε με 8 υπολογισμένες φυσικοχημικές και δομικές παραμέτρους όπως το μέγεθος, η πολωσιμότητα, η πολικότητα, η ευκαμψία/ ευελιξία και η ικανότητα δέσμευσης υδρογόνου. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών χρησιμοποιήθηκε για να επανασχεδιάσει τα δεδομένα σε ένα διδιάστατο χώρο (**Εικόνα 6.5A**). Οι δύο ορθογώνιοι/ κάθετοι άξονες (χωρίς μονάδες)

αντιπροσωπεύουν γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών 8 παραμέτρων. Με σκοπό να αναλύσουμε καλύτερα την ομοιότητα της ναρινγενίνης με τα άλλα φάρμακα του χημικού χώρου που ορίζεται στην ανάλυση PCA, οι ενεργοί μεταβολίτες των αντιαιμοπεταλιακών ενώσεων πρασουγρέλη, τικλοπιδίνη και κλοπιδογρέλη συμπεριλήφθησαν επίσης στην ανάλυση. Το πρώτο ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι ότι οι ενεργοί μεταβολίτες της πρασουγρέλης, της τικλοπιδίνης και της κλοπιδογρέλης βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις από τα αντίστοιχα φαρμακευτικά προφάρμακα αυτών. Η ναρινγενίνη βρίσκεται στην ίδια θέση με τους ενεργούς μεταβολίτες των ανταγωνιστών P2Y₁₂, καθώς επίσης με τους αναστολείς COX-1 τριφλουζάλη και ακετυλοσαλικυλικό οξύ. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η ναρινγενίνη μπορεί να δράσει ως αναστολέα της COX-1 και ως ανταγωνιστής του P2Y₁₂.

Για να αξιολογήσουμε περαιτέρω την υπόθεση αυτή, πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης της ναρινγενίνης στις θέσεις πρόσδεσης των PAR-1, P2Y₁₂ και COX-1. Η θέση πρόσδεσης της ναρινγενίνης στον υποδοχέα PAR-1 φαίνεται στην **Εικόνα 6.5B**. Το φυσικό αυτό προϊόν αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Tyr183, Val257, Leu258, Tyr350, Tyr353 καθώς και π-π αλληλεπιδράσεις με την His255. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι πολύ παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται με το voraparaxar [43]. Το Glide XP Gscore των αλληλεπιδράσεων είναι -9.5 kcal mol⁻¹, τιμή που υποδεικνύει μέτρια συγγένεια πρόσδεσης. Η ναρινγενίνη δεσμεύεται στον ίδιο χώρο με το ADP εντός του υποδοχέα P2Y₁₂. Αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Cys97, Lys179, Arg256, Tyr105 και π-π αλληλεπιδράσεις με την His187 (**Εικόνα 6.5C**). Η βαθμολογία πρόσδεσης είναι -8.3 kcal mol⁻¹. Τέλος, η ναρινγενίνη δεσμεύεται στην ίδια θέση όπως το celecoxib στην ενεργό περιοχή του COX-1 αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser530, Tyr385 και Met522 (**Εικόνα 6.5D**) με βαθμολογία πρόσδεσης -9.3 kcal mol⁻¹. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ναρινγενίνη εμφανίζει ευνοϊκή πρόσδεση και στους τρεις υποδοχείς που εμπλέκονται στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και είναι οι κύριοι στόχοι των σημερινών αντιαιμοπεταλιακών θεραπειών. Ως εκ τούτου, η ναρινγενίνη μπορεί να λειτουργήσει ως πρότυπο μόριο για να υποστηρίξει παράγωγα που βασίζονται σε φυσικά προϊόντα για τριπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία που στοχεύουν ταυτόχρονα τους PAR-1, P2Y₁₂ και COX-1.



Εικόνα 6.5. Α) PCA των αντιθρομβωτικών φαρμάκων (μπλε διαμάντι) και της ναρινγενίνης (κόκκινο διαμάντι). Οι πιο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης της ναρινγενίνης στις κρυσταλλικές δομές των: Β) PAR-1 C) P2Y₁₂ υποδοχέα και D) COX-1. Με αστέρι υποδηλώνεται ο ενεργός μεταβολίτης του σχετικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.

6.3.2. *In vitro* μελέτες της ναρινγενίνης σε ανθρώπινα αιμοπετάλια

Η ναρινγενίνη παρουσίασε μικρή αντιαμοπεταλιακή δραστηριότητα *in vitro* τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια [14,23,52,53]. Παρακινούμενοι από τα *in silico* ευρήματα ότι η ναρινγενίνη εμφανίζει αντιαμοπεταλιακή δράση, διεξήγαμε *in vitro* μελέτες της ναρινγενίνης σε ανθρώπινα αιμοπετάλια και της πιθανής αντιαμοπεταλιακής δραστηριότητάς της, προσδιορίζοντας την αναστολή της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων που επάγεται από την ADP, AA και TRAP-6. Η ναρινγενίνη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 200 έως 500 μM δεν αναστέλλει σημαντικά τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που επάγεται από όλους τους αγωνιστές, επιδεικνύοντας μόνο μια μη σημαντική ανασταλτική δράση <13 % σε συγκέντρωση από 500 μM (Εικόνα 6.13A). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αν και η ναρινγενίνη, σύμφωνα με τα *in silico* ευρήματα, θα μπορούσε να εμφανίσει αντιαμοπεταλιακή ικανότητα για τους PAR-1, COX-1 και P2Y₁₂, αυτή παρεμποδίζεται πιθανώς λόγω μη επιθυμητών φυσικοχημικών ιδιοτήτων, μη συμβατών με φυσιολογικούς, βιοχημικούς και χημικούς φραγμούς [54]. Έτσι, προχωρήσαμε στην τροποποίηση του σκελετού της ναρινγενίνης σε μια προσπάθεια εκμετάλλευσης του πλήρους θεραπευτικού δυναμικού της.

6.3.3. Ορθολογικός σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων της ναρινγενίνης

Η παρουσία ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου καθιστά τα φλαβονοειδή ευάλωτα στην οξείδωση, με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε κινόνες και πιθανώς και σε προ-οξειδωτικά. Επίσης τα φλαβονοειδή, δεν επιδεικνύουν μόνο φτωχή από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα, αλλά και μέτρια σταθερότητα, χαρακτηριστικό που αποδίδεται στην παρουσία ομάδων υδροξυλίου [24,55,56]. Με βάση τη βιβλιογραφία, η τροποποίηση του δακτυλίου B είναι σημαντική για την ενίσχυση της αντιαμοπεταλιακής δραστηριότητας των φλαβονοειδών [23], επομένως, εστίασαμε στην τροποποίηση της θέσης αυτής στη ναρινγενίνη για να ενισχύσουμε το βιολογικό της προφίλ. Σχεδιάσαμε αρχικά ένα απλό εκλεκτικό ανάλογο της ναρινγενίνης με την ακετυλομάδα στη θέση 4'. Η σχετική ένωση συντέθηκε μέσω εναντιο-εκλεκτικής ενζυμικής ακετυλίωσης, χρησιμοποιώντας το ένζυμο λιπάση B από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB) όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως [17].

Σχεδιάσαμε επίσης ένα υβρίδιο DHA - ναρινγενίνης, το 4'-DHA-ναρινγενίνη. Αυτό βασίστηκε στο γεγονός ότι το DHA έχει επιδείξει καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα συμπεριλαμβανομένων της αναστολής της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, τη βελτίωση του αρτηριακού ενδοθηλίου και την μείωση της αρτηριακής πίεσης [57]. Αυτές οι ευνοϊκές επιδράσεις έχουν αποδοθεί στο γεγονός ότι το DHA συναγωνίζεται για τις ίδιες μεταβολικές οδούς με το αραχιδονικό οξύ (AA), ένα ω-6 λιπαρό οξύ, που μεταβολίζεται μέσω των πορειών που περιλαμβάνουν την δράση της COX-1 και της λιποξυγενάσης [58-60]. Επίσης, είναι πιθανό το DHA να εισέρχεται στις ενδοθηλιακές μεμβράνες, αυξάνοντας τη ρευστότητα της μεμβράνης, την ενδογενή σύνθεση της και την απελευθέρωση του NO. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού και συνεπώς τη βελτίωση της αγγειακής λειτουργίας [61].

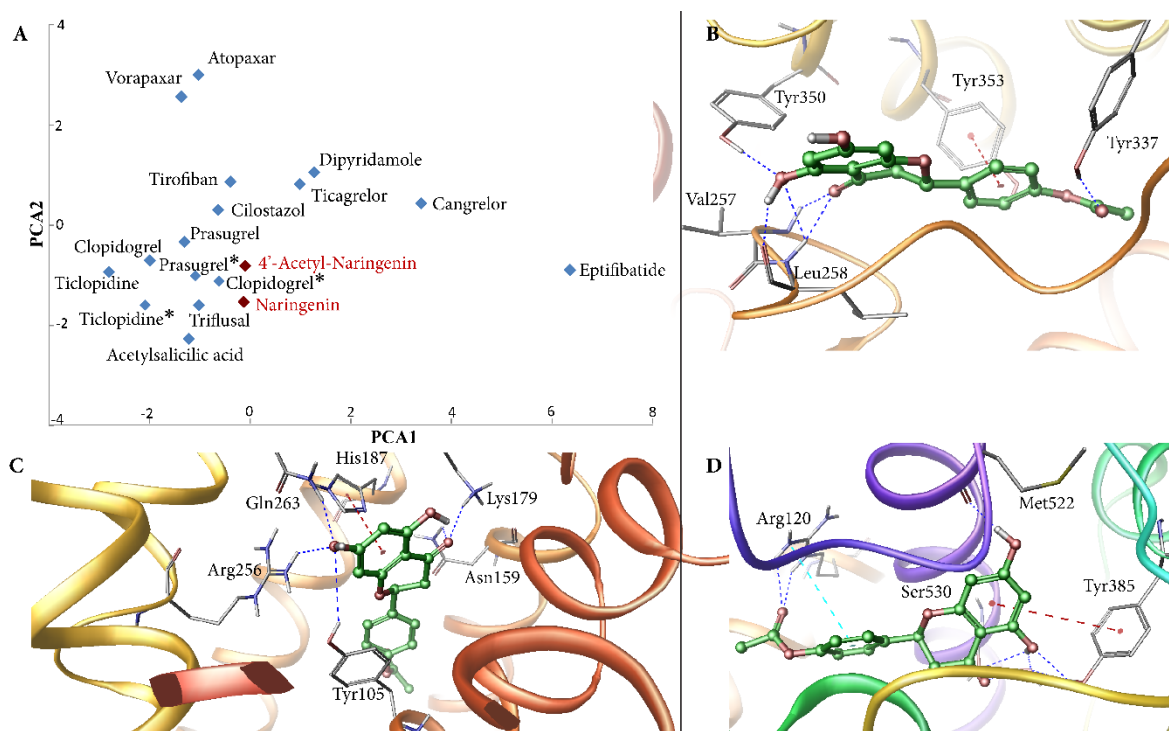
6.3.4. *In silico* ανάλυση των αναλόγων της ναρινγενίνης

Για να διερευνηθεί η θέση που καταλαμβάνουν στο χημικό χώρο που ορίζεται από διαφορετικά εγκεκριμένα αντιθρομβωτικά φάρμακα και τη μητρική ένωση ναρινγενίνη τα ανάλογα 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη και 4'-DHA-ναρινγενίνης, πραγματοποιήθηκε και πάλι ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA).

Το ακετυλιωμένο ανάλογο της ναρινγενίνης (4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη) ανευρίσκεται στον ίδιο χώρο με τη μητρική του ένωση (**Εικόνα 6.6A**). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης για την ένωση αυτή. Ο τρόπος και η θέση πρόσδεσης της ναρινγενίνης εντός του υποδοχέα PAR-1 απεικονίζεται στο **Εικόνα 6.6B**. Το ανάλογο αυτό αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Val257, Leu258, Tyr337, Tyr350 και Tyr353 όπως και η μητρική ένωση. Η βαθμολογία αξιολόγησης της πρόσδεσης (docking score) δεν υποδεικνύει ότι η 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη εμφανίζει καλύτερη συγγένεια από τη ναρινγενίνη.

Στη θέση πρόσδεσης του P2Y₁₂ η 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της Lys179, Arg256, Tyr105, Gln263, και Asn159 και π-π αλληλεπιδράσεις (π-αλληλοεπικάλυψη) με την His187 (**Εικόνα 6.6C**), αλληλεπιδράσεις που μοιάζουν στενά με αυτές που αναπτύσσει η μητρική ένωση. Τέλος, η 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Met522, Ser530 και Arg120

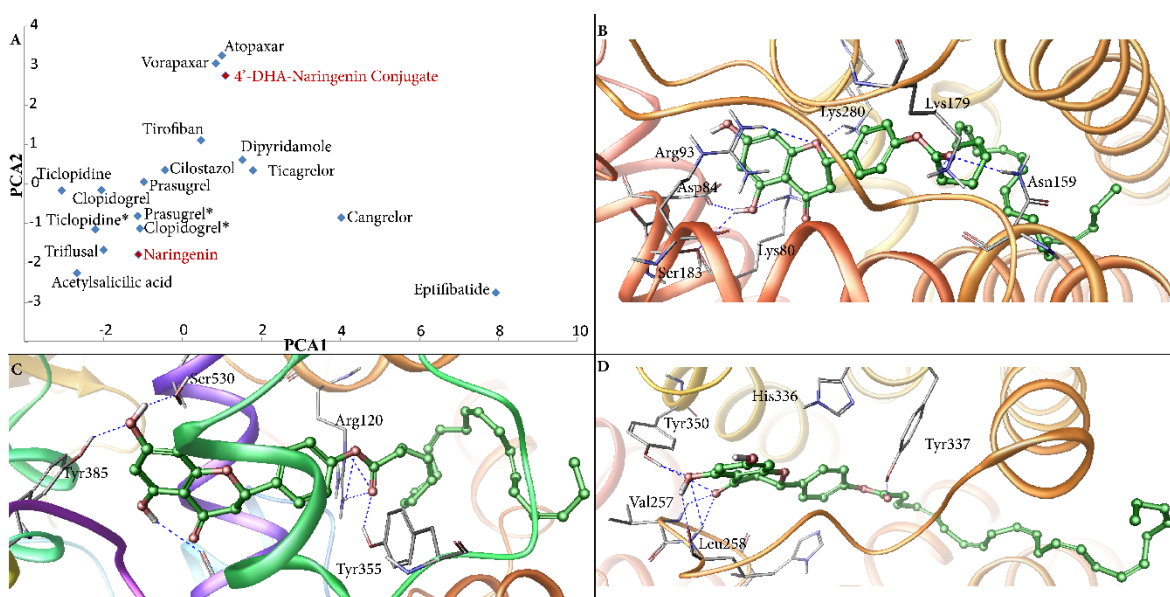
καθώς επίσης και π-π αλληλεπιδράσεις (π-αλληλοεπικάλυψη) με την Tyr385 (**Εικόνα 6.6D**), όπως η ναρινγενίνη.



Εικόνα 6.6. Α) PCA των αντιθρομβωτικών φαρμάκων (μπλε διαμάντι) και της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη (κόκκινο διαμάντι). Οι πιο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης στις κρυσταλλικές δομές των: Β) PAR-1, C) P2Y₁₂ υποδοχέα και D) COX-1. Με αστέρι υποδηλώνεται ο ενεργός μεταβολίτης του σχετικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.

Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών (PCA) πραγματοποιήθηκε επίσης με το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης (**Εικόνα 6.7A**). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το σύζευγμα βρίσκεται δίπλα στους δύο ανταγωνιστές PAR-1, το vorapaxar και το atopaxar. Αυτό υποδηλώνει ότι η νέα ένωση μπορεί να δράσει ως πρόσδεμα στοχεύοντας τον υποδοχέα PAR-1. Η υπολογισθείσα υδατική διαλυτότητα (logS) για την 4'-DHA-ναρινγενίνη προσδιορίστηκε υπολογιστικά χρησιμοποιώντας το QikProp και βρέθηκε να είναι -6.9 mol dm^{-3} . Η ίδια τιμή για το vorapaxar βρέθηκε να είναι -9.1 και για το atopaxar -7.2 . Όπως και προηγουμένως, οι υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν και στους τρεις υποδοχείς. Το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης συνδεόμενο στον υποδοχέα P2Y₁₂ αλληλεπιδρά με τα

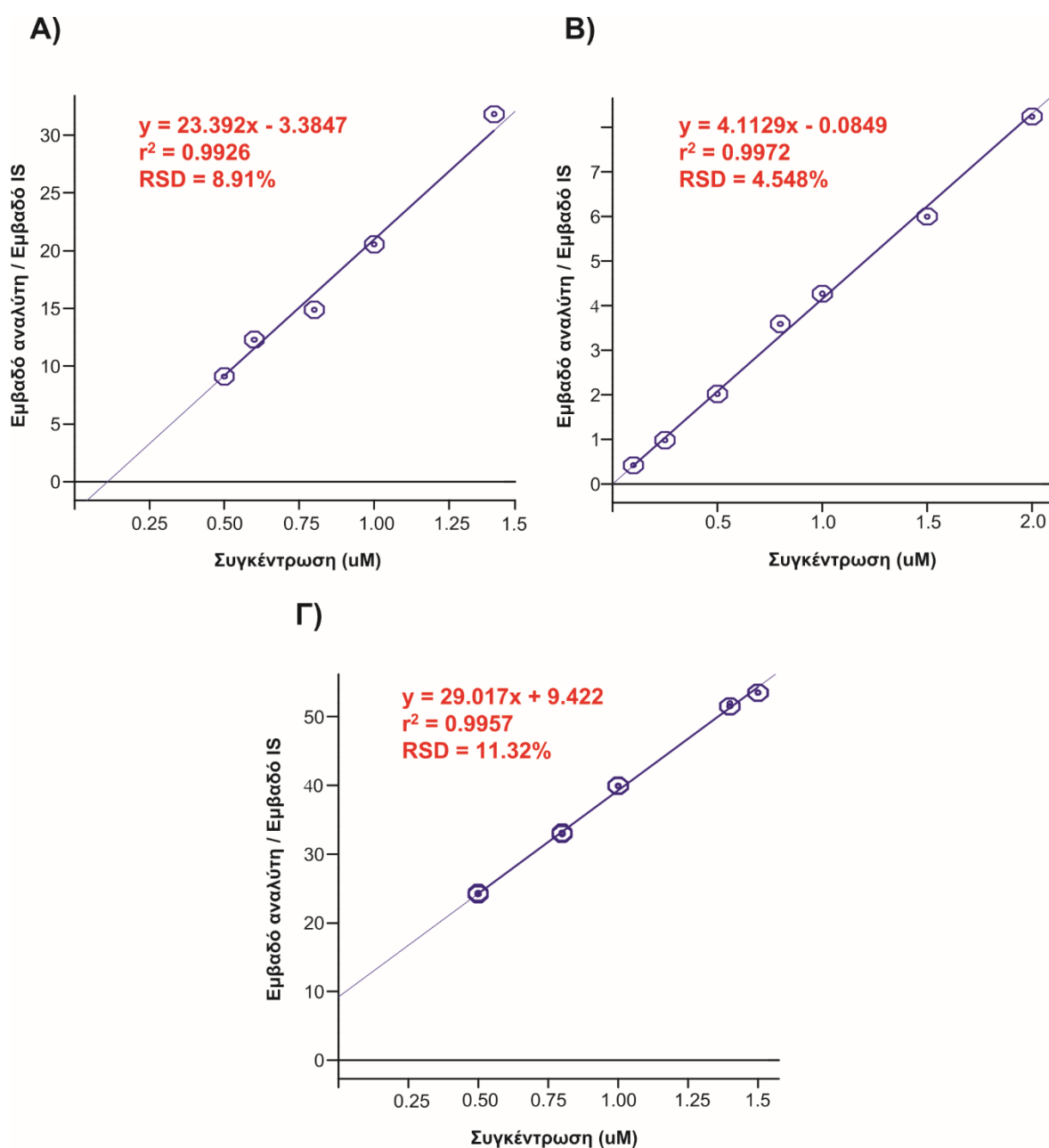
κατάλοιπα Arg93, Asp84, Ser183, Lys80, Lys280, Lys179 και Asn159 (**Εικόνα 6.7B**). Πιο συγκεκριμένα, το DHA κατευθύνεται προς την γειτονική περιοχή δέσμευσης προσδέματος, υποδηλώνοντας μια βελτίωση στο προφίλ αλληλεπίδρασης του υβριδίου σε σχέση με τη ναρινγενίνη. Στην περίπτωση της COX-1 το υβρίδιο αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Ser530, Tyr385, Tyr355 και Arg120 (**Εικόνα 6.7C**). Το τμήμα του DHA αναπτύσσει τις ίδιες αλληλεπιδράσεις όπως προβλεπόταν από τους Gaddipati και τους συνεργάτες του [62]. Η βαθμολογία πρόσδεσης για το υβρίδιο είναι $-14 \text{ kcal mol}^{-1}$, παρουσιάζοντας μια βελτίωση της τάξεως των 5 kcal mol^{-1} σε σύγκριση με τη ναρινγενίνη. Στην **Εικόνα 6.7D** απεικονίζεται το στιγμιότυπο της πιο ευνοούμενης πρόσδεσης του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης στον υποδοχέα PAR-1. Το παράγωγο αυτό αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Tyr350, Val257, Leu258, Tyr337 και His336. Η βαθμολογία πρόσδεσης στην περίπτωση αυτή είναι -15.8 , υποδεικνύοντας σημαντική βελτίωση σε σύγκριση με εκείνη της ναρινγενίνης στον ίδιο υποδοχέα ($-9.5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης υποδηλώνουν ότι η σύζευξη της ναρινγενίνης με το DHA όχι μόνο ενίσχυσε την αντιαιμοπεταλιακή της δραστηριότητα, αλλά ταυτόχρονα του επιτρέπει να λειτουργεί και στους δύο υποδοχείς PAR-1 και P2Y₁₂ καθώς και στην COX-1, δεδομένου ότι το προφίλ της αλληλεπίδρασης έχει ενισχυθεί και ευνοείται για τους τρεις αυτούς στόχους. Έτσι, το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης μπορεί να φέρει τριπλό αντιαιμοπεταλιακό προφίλ.



Εικόνα 6.7. A) PCA των αντιθρομβωτικών φαρμάκων (μπλε διαμάντι) και της 4'-DHA-ναρινγενίνης (κόκκινο διαμάντι). Οι πιο ευνοϊκές θέσεις πρόσδεσης της 4'-DHA-ναρινγενίνης στις κρυσταλλικές δομές των: B) PAR-1, C) P2Y₁₂ υποδοχέα και D) COX-1. Με αστέρι υποδηλώνεται ο ενεργός μεταβολίτης του σχετικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου.

6.3.5. Αξιολόγηση της σταθερότητας των αναλόγων ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα

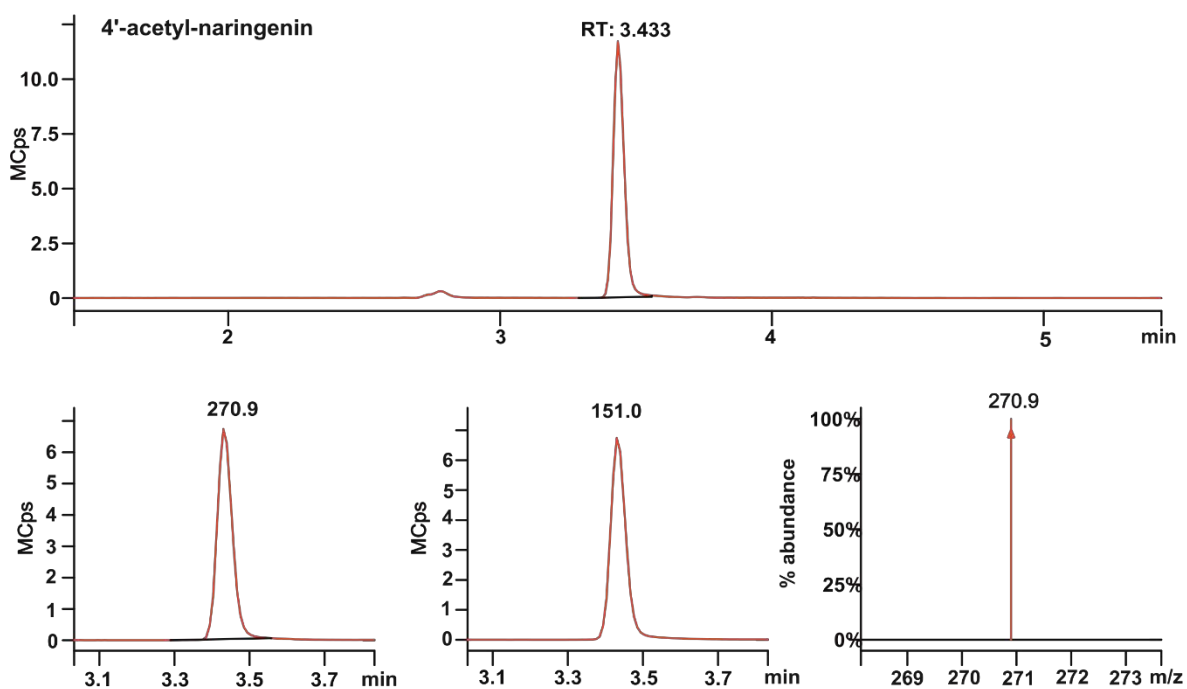
Προτού προχωρήσουμε σε αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των σχεδιασμένων και νεοσυντιθέμενων συζευγμάτων ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα θεωρήθηκε σημαντικό να προσδιοριστεί η σταθερότητα τους σε αυτό. Για να επιτευχθεί αυτό, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα HPLC-MS/MS και καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση τόσο των παραγώγων της ναρινγενίνης, όσο και για την παρακολούθηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της ναρινγενίνης που απελευθερώνεται από την διάσπαση των συζευγμάτων αυτών στο ανθρώπινο πλάσμα, κατά τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο (Εικόνα 6.8). Τέτοιες μεθοδολογίες έχουν μεγάλη σημασία για την ανάλυση των φυσικών προϊόντων και των κύριων μεταβολιτών τους σε πολύπλοκες μήτρες [63,64].



Εικόνα 6.8. Καμπύλες ποσοτικοποίησης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος του: **A)** 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη, **B)** του 4'-DHA-ναρινγενίνη και **Γ)** της ναρινγενίνης.

Αφού αναπτύχθηκαν τα πρωτόκολλα και οι καμπύλες ποσοτικοποίησης μέσω HPLC-MS/MS τόσο των δύο αναλόγων, αλλά και της παραγόμενης ναρινγενίνης παρασκευάστηκαν εις τριπλούν δείγματα πλάσματος που περιέχουν μόνο ένα από τα δύο ανάλογα για κάθε χρονική στιγμή. Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές για κάθε ανάλογο, με χρήση διαφορετικών στηλών HPLC καθώς και διάφορες αναλογίες των κινητών φάσεων,

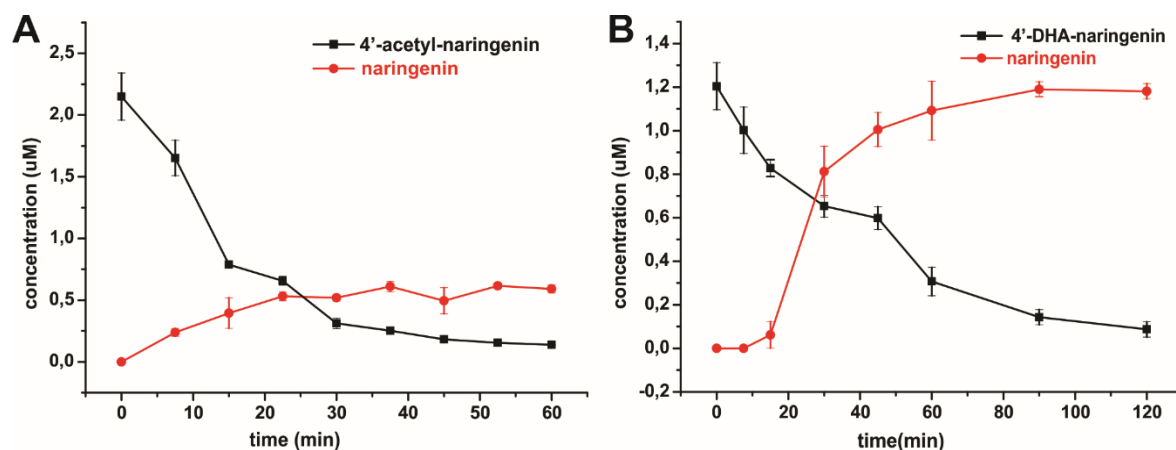
προκειμένου να επιτευχθούν ικανοποιητικές χρωματογραφικές κορυφές και μικροί χρόνοι ανάλυσης, για τον διαχωρισμό τους σε πολύπλοκα δείγματα όπως είναι το πλάσμα. Δεδομένου ότι τα στοχεύοντα ανάλογα είναι αρνητικά φορτισμένα, με βάση τη χημική τους δομή, επιλέχθηκε ESI (-) στο φασματόμετρο μάζας. Αξίζει να σημειωθεί, ότι πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές χρησιμοποιώντας MRM και επιλέγοντας το βέλτιστο πρόδρομο ιόν → ζεύγος ιόντων προϊόντος (θραυσματοποίηση), για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του κάθε αναλόγου. Χρησιμοποιώντας το MRM builder, ένα εργαλείο που περιλαμβάνεται στο λογισμικό του φασματόμετρου μάζας, κατά τη διάρκεια της απευθείας έγχυσης, οι κυριότερες θραυσματοποιήσεις ήταν: m/z 313 → 270.9 και 313 → 151 για την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη, 581.5 → 271, 581.5 → 151.1 για το συζυγές 4'-DHA-ναρινγενίνης, 271 → 151 και 271 → 119.1 για τη ναρινγενίνη και 359 → 197.0 για το ροσμαρινικό οξύ (IS). Η **Εικόνα 6.9**, απεικονίζει αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης όπου διαφαίνονται ο χρόνος κατακράτησης, οι θραυσματοποιήσεις καθώς και η % αφθονία του κυρίαρχου ιόντος του προϊόντος.



Εικόνα 6.9. Χρωματογραφήματα της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης μαζί με τα δύο κυριότερα παραγόμενα ιόντα και το πιο άφθονο από τα δύο.

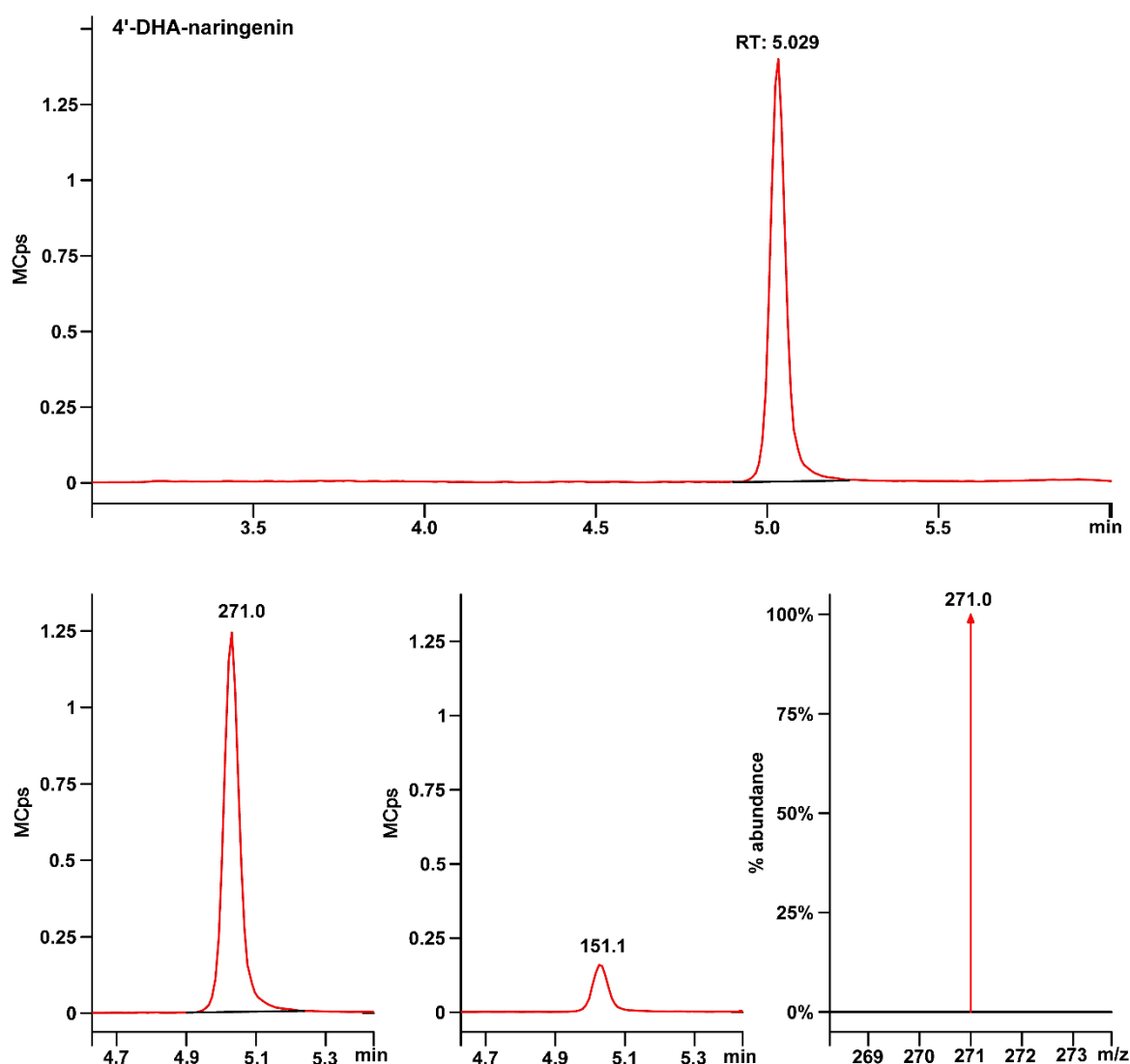
Ο ρυθμός αποικοδόμησης της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης, μετά από επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 0, 7.5, 15, 22.5, 37.5, 45, 52.5 και 60 min παρουσιάζονται στην

Εικόνα 6.10A μαζί με τον ρυθμό απελευθέρωσης της ναρινγενίνης . Είναι αξιοσημείωτο ότι το ακετυλιωμένο ανάλογο υδρολύεται αρκετά γρήγορα, όπου στα πρώτα 15 min επώασης, μόνο το 36.6 % παραμένει σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση σε χρόνο 0 min. Η περιορισμένη σταθερότητα αυτού του αναλόγου θα μπορούσε να υποδηλώσει μια φτωχή αντιαιμοπεταλιακή δράση παρόμοια με αυτή της μητρικής ένωσης (ναρινγενίνη).



Εικόνα 6.10. A) Προφίλ αποικοδόμησης της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης μετά από επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 60 min. **B)** Ρυθμός αποικοδόμησης του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης κατά την επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 120 min.

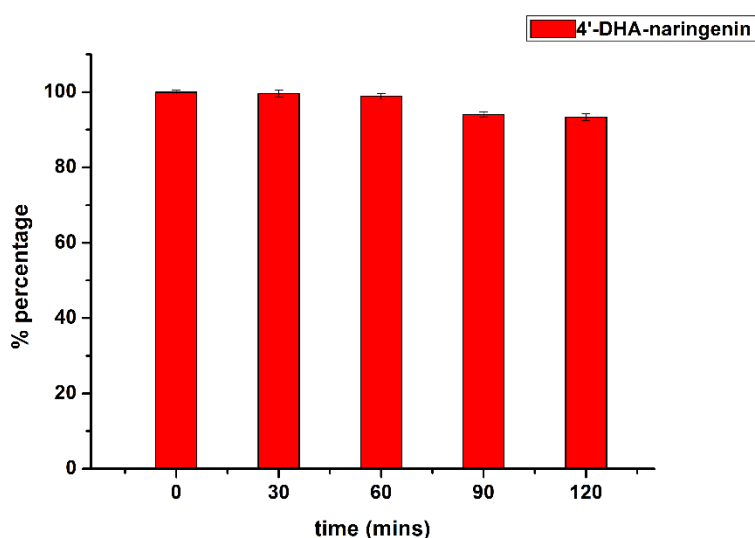
Στην **Εικόνα 6.11** αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνης απεικονίζονται μαζί με το χρόνο κατακράτησης, τις κύριες θραυσματοποιήσεις όπως επίσης και την % αφθονία του κυρίαρχου ιόντος του προϊόντος.



Εικόνα 6.11. Χρωματογραφήματα της 4'-DHA-ναρινγενίνης μαζί με τα δύο κυριότερα παραγόμενα ιόντα και το πιο άφθονο από τα δύο.

Ο ρυθμός αποικοδόμησης του υβριδίου DHA-ναρινγενίνης, μετά από επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 0, 7.5, 15, 30, 45, 60, 90 και 120 min παρουσιάζεται στην **Εικόνα 6.10B** μαζί με τον ρυθμό απελευθέρωσης της ναρινγενίνης. Το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης παρουσιάζει ένα πολύ πιο αργό ρυθμό αποικοδόμησης αφού σχεδόν μετά από 45 λεπτά το 50 % του αναλόγου εξακολουθεί να υφίσταται, σε σχέση με την αρχική του συγκέντρωση σε 0 min. Αντίθετα, μόνο το 8.4 % του αναλόγου 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη εξακολουθεί να υφίσταται στα 45 λεπτά. Η σύγκριση μεταξύ των δύο αυτών αναλόγων σαφώς καταδεικνύει ότι η 4'-DHA-ναρινγενίνη παρουσιάζει ένα προφίλ αυξημένης σταθερότητας κατά 7 φορές περισσότερο σε σχέση με την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη. Αυτή η

υψηλότερη παρατηρούμενη σταθερότητα για την 4'-DHA-ναρινγενίνη θα μπορούσε να συνεπάγεται καλύτερο προφίλ αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας σε σχέση με τη ναρινγενίνη και την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη. Επίσης, οι μελέτες χημικής σταθερότητας σε πλάσμα απαλλαγμένο από υδρολυτικά ένζυμα (θερμικά μετουσιωμένο πλάσμα) έδειξαν ένα σταθερό προφίλ για το ανάλογο 4'-DHA-ναρινγενίνη όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 6.12**.



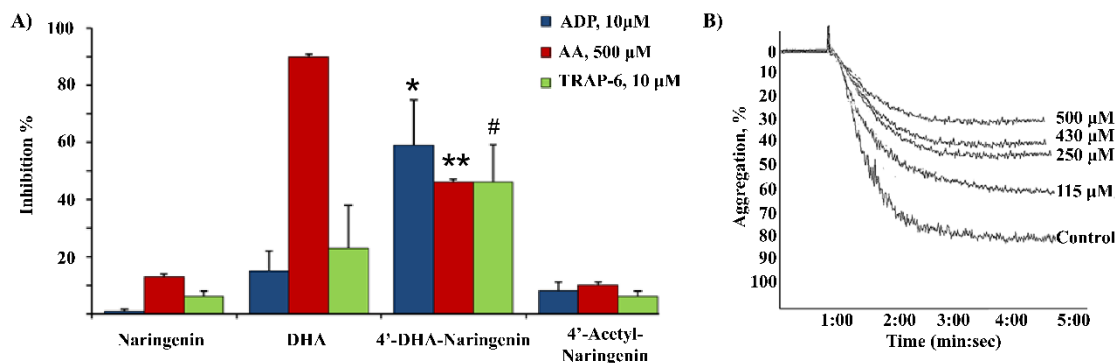
Εικόνα 6.12. Χημική σταθερότητα της 4'-DHA-ναρινγενίνης σε θερμικά μετουσιωμένο πλάσμα.

6.3.6. Αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα των αναλόγων ναρινγενίνης

Για να αξιολογήσουμε τα ευρήματα των *in silico* μελετών διερευνήσαμε το αντιαιμοπεταλιακό δυναμικό των δύο αναλόγων στην συσσώρευση αιμοπεταλίων που επάγεται μέσω της ενεργοποίησης των P2Y₁₂ και PAR-1 (χρησιμοποιώντας ADP και TRAP-6 ως αγωνιστές, αντίστοιχα) καθώς και μέσω της οδού COX-1, χρησιμοποιώντας το AA ως αγωνιστή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα πειράματα ελέγχου τόσο η 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη όσο και η 4'-DHA-ναρινγενίνη, σε μια δόση των 500 μM, δεν επέδειξαν καμία δραστηριότητα έναντι της συσσωματώσεως των αιμοπεταλίων όταν επωάζονται επί 5 min με PRP (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Το ανάλογο 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη δεν παρουσίασε σημαντική αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από όλους τους αγωνιστές, επιδεικνύοντας μια ανασταλτική δράση <12 % σε συγκέντρωση 500 μM (**Εικόνα 6.13A**). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με αυτά των πειραμάτων

σταθερότητας της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα όπου διαπιστώσαμε ότι αυτό το ανάλογο παρουσιάζει πολύ περιορισμένη σταθερότητα και πιθανότατα να παρουσιάσει και παρόμοιο προφίλ με τη ναρινγενίνη.

Σε αντίθεση με την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη, το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνη αναστέλλει σημαντικά τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων που επάγεται από όλους τους αγωνιστές με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση-δόση, επιδεικνύοντας τιμές IC_{50} 142.2 μM για το ADP, 208.0 μM για AA και 184.8 μM για το TRAP-6. Η μέγιστη ανασταλτική δράση του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνη έναντι όλων των αγωνιστών παρατηρήθηκε στα 500 μM (**Εικόνα 6.13A**). Στην **Εικόνα 6.13B** απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές καμπύλες της δοσοεξαρτώμενης ανασταλτικής επίδρασης του υβριδίου 4'-DHA-ναρινγενίνη έναντι της επαγόμενης από το ADP συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, η οποία ήταν πιο ισχυρή σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται από τους άλλους 2 αγωνιστές, όπως προκύπτει από τις τιμές IC_{50} . Τέλος, το DHA μείωσε αποτελεσματικά τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που επάγεται από το AA κατά τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση με μια τιμή IC_{50} 111.6 μM , και εμφανίζοντας την μέγιστη ανασταλτική δράση στα 500 μM (**Εικόνα 6.13A**). Η ανασταλτική δράση του DHA ως προς την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που επάγεται από τον TRAP-6 ήταν πολύ λιγότερο ισχυρή σε σύγκριση με τον αγωνιστή AA, ενώ το DHA δεν επηρέασε σημαντικά την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το ADP (**Εικόνα 6.13A**). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πειράματα ελέγχου, το DHA σε συγκέντρωση 500 μM δεν επέδειξε οποιαδήποτε δραστηριότητα συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων όταν επώαστηκε για 5 λεπτά με PRP (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). Είναι σημαντικό ότι η ανασταλτική δράση του DHA σε σύγκριση με εκείνη που παρατηρήθηκε για το υβρίδιο 4'-DHA-ναρινγενίνης, ήταν σημαντικά υψηλότερη προς την επαγόμενη από τον AA συσσωμάτωση αιμοπεταλίων ($P < 0,005$), αλλά χαμηλότερη ως προς τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τα ADP και TRAP-6 ($P < 0.005$ και $P < 0.05$, αντίστοιχα) (**Εικόνα 6.13A**). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα *in silico* ευρήματα και τα αποτελέσματα των πειραμάτων σταθερότητας.



Εικόνα 6.13. **A)** Η επίδραση της ναρινγενίνης, της 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνης, του συζεύγματος 4'-DHA-ναρινγενίνης και του DHA (όλες οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 500 μM) στη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP, AA ή TRAP-6 σε PRP. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± SD. *P<0.005, **P<0.005 και #P<0.05 σε σύγκριση με την αντίστοιχη επίδραση του DHA. **B)** Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης αιμοπεταλίων που απεικονίζουν την ανασταλτική επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων του συζεύγματος 4'-DHA-ναρινγενίνης έναντι της επαγόμενης από ADP συσσώρευσης αιμοπεταλίων σε PRP.

6.4. Συμπεράσματα

Οι *in silico* μελέτες που πραγματοποιήσαμε έδειξαν ότι η ναρινγενίνη μπορεί να λειτουργήσει ως πρόδρομη ένωση για τριπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία, στοχεύοντας ταυτόχρονα τις PAR-1, P2Y₁₂ και COX-1 πορείες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, η αντιαιμοπεταλιακή αξιολόγηση της ναρινγενίνης σε ανθρώπινα αιμοπετάλια, *in vitro*, επέδειξε φτωχή αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα στους εξεταζόμενους υποδοχείς και την COX-1. Για την ενίσχυση του προφίλ της αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας της ναρινγενίνης, συνθέσαμε δύο διαφορετικά ανάλογα, την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη και την 4'-DHA-ναρινγενίνη. Η σταθερότητα των δύο αναλόγων στο ανθρώπινο πλάσμα αξιολογήθηκε μέσω UHPLC-MS/MS, υποδεικνύοντας ότι η 4'-DHA-ναρινγενίνη έχει επαπλάσια υψηλότερη σταθερότητα σε σχέση με την 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη, η οποία αποικοδομήθηκε ταχέως. Η 4'-ακέτυλο-ναρινγενίνη δεν παρουσίασε μόνο χαμηλό προφίλ σταθερότητας στο πλάσμα, αλλά επίσης δεν παρουσίασε ενισχυμένη αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα σε σύγκριση με την ναρινγενίνη. Αντίθετα, το συζυγές 4'-DHA-ναρινγενίνης επέδειξε σημαντική ανασταλτική δράση και στις τρεις οδούς συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων

επαγόμενης από τους ADP, AA και TRAP-6. Αυτό ήταν ιδιαίτερα σημαντικό, διότι κατορθώσαμε να προσομοιώσουμε την ταυτόχρονη χορήγηση τριών αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων (φαρμάκων) σε ένα μόνο μόριο.

Το προφίλ της τριπλής αντιαιμοπεταλιακής δραστηριότητας του αναλόγου 4'-DHA-ναρινγενίνης θα μπορούσε να αποδοθεί στην συνεργατική επίδραση και των δύο συστατικών του υβριδίου, καθώς το DHA αναστέλλει την επαγόμενη από τον AA ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και η ίδια η ναρινγενίνη παρουσιάζει ελαφρά αντιαιμοπεταλιακή δραστηριότητα. Αν και η 4'-DHA-ναρινγενίνη παρουσιάζει χαμηλότερη ανασταλτική ικανότητα έναντι της προκαλούμενης από τον AA συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, σε σύγκριση με το DHA, παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερο ανασταλτικό αποτέλεσμα ως προς την προκαλούμενη από τους ADP- και TRAP-6 συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, γεγονός που δείχνει ότι το ανάλογο 4'-DHA-ναρινγενίνη παρουσιάζει ευνοϊκότερο, σε σύγκριση είτε με την ναρινγενίνη είτε με DHA, προφίλ τριπλής στόχευσης. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας πολλά υποσχόμενος αντιαιμοπεταλιακός και ως εκ τούτου αντιθρομβωτικός παράγοντας που θα χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη των αθηροθρομβωτικών επεισοδίων. Ωστόσο αυτή η υπόθεση θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω *in vivo* σε πειραματόζωα καθώς και σε κλινικές μελέτες φάσης 2.

6.5. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] B. Pagliaro, C. Santolamazza, F. Simonelli, S. Rubattu, Phytochemical compounds and protection from cardiovascular diseases: a state of the art, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015).
- [2] M.E. Tsoumani, A.D. Tselepis, Antiplatelet agents and anticoagulants: from pharmacology to clinical practice, *Curr. Pharm. Des.* (2017).
- [3] K.I. Kalantzi, M.E. Tsoumani, I.A. Goudevenos, A.D. Tselepis, Pharmacodynamic properties of antiplatelet agents: current knowledge and future perspectives, *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* 5 (2012) 319–336.
- [4] I.C. Moschonas, J.A. Goudevenos, A.D. Tselepis, Protease-activated receptor-1 antagonists in long-term antiplatelet therapy. Current state of evidence and future perspectives, *Int. J. Cardiol.* 185 (2015) 9–18.
- [5] D.A. Morrow, E. Braunwald, M.P. Bonaca, S.F. Ameriso, A.J. Dalby, M.P. Fish, K.A.A. Fox, L.J. Lipka, X. Liu, J.C. Nicolau, A.J.O. Ophuis, E. Paolasso, B.M. Scirica, J. Spinar, P. Theroux, S.D. Wiviott, J. Strony, S.A. Murphy, Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events, *New Engl. J. Med.* 366 (2012) 1404–1413.
- [6] M.P. Bonaca, B.M. Scirica, M.A. Creager, J. Olin, H. Bounameaux, M. Dellborg, J.M. Lamp, S.A. Murphy, E. Braunwald, D.A. Morrow, Vorapaxar in patients with peripheral artery disease: results from TRA2{degrees}P-TIMI 50, *Circulation* 127 (2013) 1522–1529 (1529e1521-1526).
- [7] V.G. Kontogianni, M.E. Tsoumani, T.F. Kellici, T. Mavromoustakos, I.P. Gerothanassis, A.D. Tselepis, A.G. Tzakos, Deconvoluting the dual antiplatelet activity of a plant extract, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 4511–4521.
- [8] S.M. Rates, Plants as source of drugs, *Toxicon* 39 (2001) 603–613.
- [9] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 629–661.
- [10] M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 2379–2383.

- [11] M.G. Hertog, E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, Dietary anti-oxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet* 342 (1993) 1007–1011.
- [12] M. Bijak, R. Ziewiecki, J. Saluk, M. Ponczek, I. Pawlaczyk, H. Krotkiewski, B. Wachowicz, P. Nowak, Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 2324–2337.
- [13] M. Bojic, Z. Debeljak, M. Tomicic, M. Medic-Saric, S. Tomic, Evaluation of anti-aggregatory activity of flavonoid aglycone series, *Nutr. J.* 10 (2011) 73.
- [14] L. Navarro-Nunez, J. Rivera, J.A. Guerrero, C. Martinez, V. Vicente, M.L. Lozano, Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR(1) and PAR(4) in platelets, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 1548–1556.
- [15] P.C.H. Hollman, Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids, *Pharm. Biol.* 42 (2004) 74–83.
- [16] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Remesy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 230S–242S.
- [17] E. Kyriakou, A. Primikyri, P. Charisiadis, M. Katsoura, I.P. Gerothanassis, H. Stamatis, A.G. Tzakos, Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 1739–1742.
- [18] M. Shulman, M. Cohen, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, H. Wang, J. Goldwasser, C.W. Lee-Parsons, O. Benny-Ratsaby, M.L. Yarmush, Y. Nahmias, Enhancement of naringenin bioavailability by complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (corrected), *PLoS One* 6 (2011) e18033.
- [19] A.N. Yilma, S.R. Singh, L. Morici, V.A. Dennis, Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for *Chlamydia trachomatis* inflammation, *Mediat. Inflamm.* 2013 (2013) 102457.
- [20] G. Pereira-Caro, C.M. Oliver, R. Weerakkody, T. Singh, M. Conlon, G. Borges, L. Sanguansri, T. Lockett, S.A. Roberts, A. Crozier, M.A. Augustin, Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 84 (2015) 206–214.

- [21] N. Zhang, Z. Yang, Y. Yuan, F. Li, Y. Liu, Z. Ma, H. Liao, Z. Bian, Y. Zhang, H. Zhou, W. Deng, M. Zhou, Q. Tang, Naringenin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy, *Exp. Ther. Med.* 10 (2015) 2206–2212.
- [22] S. Liu, C. Guo, Y. Guo, H. Yu, F. Greenaway, M.Z. Sun, Comparative binding affinities of flavonoid phytochemicals with bovine serum albumin, *Iran. J. Pharm. Res.: IJPR* 13 (2014) 1019–1028.
- [23] B. Wright, J.P. Spencer, J.A. Lovegrove, J.M. Gibbins, Flavonoid inhibitory pharmacodynamics on platelet function in physiological environments, *Food Funct.* 4 (2013) 1803–1810.
- [24] R. Bernini, F. Crisante, M.C. Ginnasi, A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC), *Molecules* 16 (2011) 1418–1425.
- [25] T. Nagao, F. Abe, J. Kinjo, H. Okabe, Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 875–879.
- [26] K. Katayama, K. Masuyama, S. Yoshioka, H. Hasegawa, J. Mitsuhashi, Y. Sugimoto, Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure-activity relationship, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 789–797.
- [27] K. Drauz, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, Wiley-VCH, 2012.
- [28] M.H. Katsoura, A.C. Polydera, P. Katapodis, F.N. Kolisis, H. Stamatis, Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids, *Process Biochem.* 42 (2007) 1326–1334.
- [29] M.H. Katsoura, A.C. Polydera, L. Tsironis, A.D. Tselepis, H. Stamatis, Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency, *J. Biotechnol.* 123 (2006) 491–503.
- [30] F. Mellou, D. Lazari, H. Skaltsa, A.D. Tselepis, F.N. Kolisis, H. Stamatis, Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity, *J. Biotechnol.* 116 (2005) 295–304.
- [31] D.E. Stevenson, R. Wibisono, D.J. Jensen, R.A. Stanley, J.M. Cooney, Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozym 435 (R)), *Enzym. Microb. Technol.* 39 (2006) 1236–1241.

- [32] D. Swanson, R. Block, S.A. Mousa, Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life, *Adv. Nutr.: Int. Rev. J.* 3 (2012) 1–7.
- [33] G. Gajos, P. Rostoff, A. Undas, W. Piwowarska, Effects of polyunsaturated omega-3 fatty acids on responsiveness to dual antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the OMEGA-PCI (OMEGA-3 fatty acids after pci to modify responsiveness to dual antiplatelet therapy) study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 55 (2010) 1671–1678.
- [34] R.C. Block, L. Kakinami, M. Jonovich, I. Antonetti, P. Lawrence, N. Meednu, P. CalderonArtero, S.A. Mousa, J.T. Brenna, S. Georas, The combination of EPA+DHA and low-dose aspirin ingestion reduces platelet function acutely whereas each alone may not in healthy humans, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 87 (2012) 143–151.
- [35] C. von Schacky, P.C. Weber, Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in humans, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 2446–2450.
- [36] Schrödinger Release 2015-2, Maestro, Version 10.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- [37] Schrödinger Release 2015-2, LigPrep, Version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- [38] W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11225–11236.
- [39] Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2, QikProp, Version 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- [40] J. Duan, S.L. Dixon, J.F. Lowrie, W. Sherman, Analysis and comparison of 2D fingerprints: insights into database screening performance using eight fingerprint methods, *J. Mol. Graph. Model.* 29 (2010) 157–170.
- [41] Schrödinger Release 2015-2, Canvas, Version 2.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- [42] K.S. Watts, P. Dalal, R.B. Murphy, W. Sherman, R.A. Friesner, J.C. Shelley, ConfGen: a conformational search method for efficient generation of bioactive conformers, *J. Chem. Inf. Model.* 50 (2010) 534–546.

- [43] C. Zhang, Y. Srinivasan, D.H. Arlow, J.J. Fung, D. Palmer, Y. Zheng, H.F. Green, A. Pandey, R.O. Dror, D.E. Shaw, W.I. Weis, S.R. Coughlin, B.K. Kobilka, High resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1, *Nature* 492 (2012) 387–392.
- [44] J. Zhang, K. Zhang, Z.G. Gao, S. Paoletta, D. Zhang, G.W. Han, T. Li, L. Ma, W. Zhang, C.E. Muller, H. Yang, H. Jiang, V. Cherezov, V. Katritch, K.A. Jacobson, R.C. Stevens, B. Wu, Q. Zhao, Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor, *Nature* 509 (2014) 119–122.
- [45] G. Rimon, R.S. Sidhu, D.A. Lauver, J.Y. Lee, N.P. Sharma, C. Yuan, R.A. Frieler, R.C. Trievel, B.R. Lucchesi, W.L. Smith, Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 28–33.
- [46] G.M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27 (2013) 221–234.
- [47] Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2, Glide, Version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- [48] R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6177–6196.
- [49] L. Di, E.H. Kerns, Y. Hong, H. Chen, Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery, *Int. J. Pharm.* 297 (2005) 110–119.
- [50] J.V. Mitsios, A.P. Tambaki, M. Abatzis, N. Biris, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, K. Soteriadou, J. Goudevenos, M. Elisaf, D. Tsoukatos, V. Tsikaris, A.D. Tselepis, Effect of synthetic peptides corresponding to residues 313–332 of the α IIb subunit on platelet activation and fibrinogen binding to α IIb β 3, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 855–862.
- [51] A.G. Tzakos, V.G. Kontogianni, M. Tsoumani, E. Kyriakou, J. Hwa, F.A. Rodrigues, A.D. Tselepis, Exploration of the antiplatelet activity profile of betulinic acid on human platelets, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 6977–6983.

- [52] G. Chunmei, L. Shuqing, G. Yimeng, Y. Yuling, L. Jintao, C. Xin, S. Ming-Zhong, Comparative function-structural analysis of antiplatelet and antiradical activities of flavonoid phytochemicals, *J. Anim. Plant Sci.* 24 (2014) 926–935.
- [53] C. Zaragoza, J. Monserrat, C. Mantecon, L. Villaescusa, F. Zaragoza, M. Alvarez- Mon, Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs, *Vasc. Pharmacol.* 87 (2016) 139–149.
- [54] T.F. Kellici, G. Liapakis, A.G. Tzakos, T. Mavromoustakos, Pharmaceutical compositions for antihypertensive treatments: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.* 25 (2015) 1305–1317.
- [55] S. Rubio, J. Quintana, J.L. Eiroa, J. Triana, F. Estevez, Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2105–2113.
- [56] K. Sakao, M. Fujii, D.X. Hou, Acetyl derivate of quercetin increases the sensitivity of human leukemia cells toward apoptosis, *Biofactors* 35 (2009) 399–405.
- [57] B.P. Ander, C.M. Dupasquier, M.A. Prociuk, G.N. Pierce, Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease, *Exp. Clin. Cardiol.* 8 (2003) 164–172.
- [58] H.C. Bucher, P. Hengstler, C. Schindler, G. Meier, N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Am. J. Med.* 112 (2002) 298–304.
- [59] R.N. Lemaitre, I.B. King, D. Mozaffarian, L.H. Kuller, R.P. Tracy, D.S. Siscovick, n-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 319–325.
- [60] R.C. Block, W.S. Harris, K.J. Reid, S.A. Sands, J.A. Spertus, EPA and DHA in blood cell membranes from acute coronary syndrome patients and controls, *Atherosclerosis* 197 (2008) 821–828.
- [61] T.A. Mori, G.F. Watts, V. Burke, E. Hilme, I.B. Puddey, L.J. Beilin, Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men, *Circulation* 102 (2000) 1264–1269.
- [62] R.S. Gaddipati, G.K. Raikundalia, M.L. Mathai, Dual and selective lipid inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenase: a molecular docking study, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 3389–3402.
- [63] E. Stylos, M.V. Chatziathanasiadou, A. Syriopoulou, A.G. Tzakos, Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based

bioavailability determination of the major classes of phytochemicals, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2016).

[64] H. Wu, J. Guo, S. Chen, X. Liu, Y. Zhou, X. Zhang, X. Xu, Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72 (2013) 267–291

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Α1. Κατηγορίες φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης

Α1.1. Τερπενοειδή

Τα τερπένια συνιστούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά, στην οποία ανήκουν περισσότερα από 40.000 διαφορετικά μόρια [1]. Από χημική άποψη, είναι μη-αποικοδομήσιμα λιπίδια, καθώς τα λιπαρά οξέα δεν παρεμβαίνουν στο σχηματισμό τους. Είναι επίσης γνωστά ως ισοπρενοειδή, αφού η βασική δομική μονάδα που συμμετέχει κατά τον σχηματισμό τους είναι το μόριο του ισοπρενίου [2]. Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενίων που περιέχουν, με την πιο απλή κατηγορία από όλες είναι τα ημιτερπένια με μία μόνο μονάδα ισοπρενίου και πέντε άνθρακες στη δομή τους. Το πιο γνωστό ημιτερπένιο είναι το ισοπρένιο, ένα πτητικό προϊόν που προκύπτει από φωτοσυνθετικά ενεργούς ιστούς. Με δύο μονάδες ισοπρενίου, τα τερπένια κατατάσσονται στα μονοτερπένια, με τρεις μονάδες στα σεσκιτερπένια, με τέσσερις στα διτερπένια, με έξι στα τριτερπένια, με οκτώ στα τετρατερπένια και με περισσότερες πάνω από 10 στα πολυτερπένια [3]. (Πίνακας Α1).

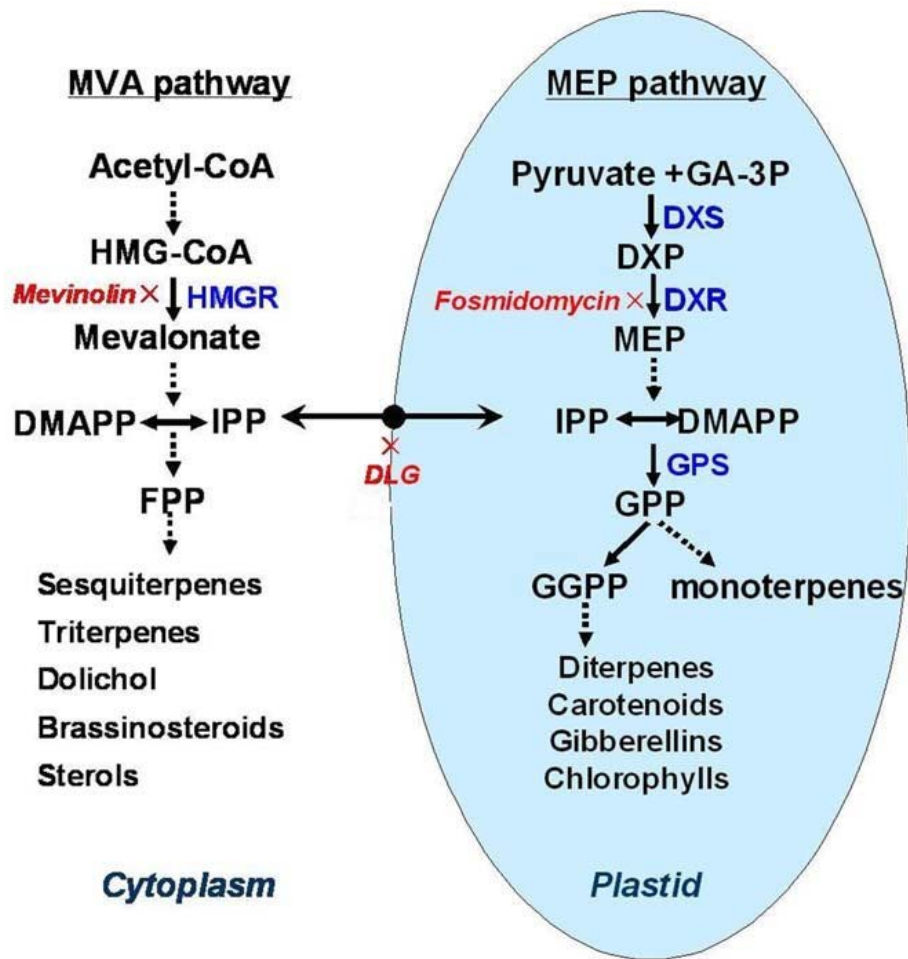
Πίνακας Α1. Κατηγορίες τερπενίων ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου [1].

Κατηγορία	Αριθμός μονάδων ισοπρενίου	Αριθμός ατόμων άνθρακα	Παραδείγματα	Χρήσεις	Πηγή απομόνωσης
Ημιτερπένια	1	5	ισοβαλεραμίδη	αντισπασμωδικό	<i>Valeriana povanii</i>
Μονοτερπένια	2	10	γερανιόλη	υλικό αρωμάτων	<i>Palmarose oil</i>
Σεσκιτερπένια	3	15	φαρνεσόλη	πηγή αρωμάτων	<i>Citrus aurantium</i>
Διτερπένια	4	20	βιταμίνη Ε	αντιοξειδωτικό	<i>Corylus avellana L.</i>
Τριτερπένια	6	30	σκουαλένιο	προστασία από UV	ελαιόλαδο
Τετρατερπένια	8	40	καροτένιο	αντιοξειδωτικό	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Πολυτερπένια	>9	>40	καοτσούκ	υλικό αποκατάστασης (ενδοδοντική)	<i>Palaquim gutta</i>

Πολλά φυτά περιέχουν τερπένια στα άνθη και τους καρπούς τους ως μείγματα πτητικών ενώσεων με συγκεκριμένες οσμές, όπως είναι το λεμόνι, η μέντα, ο ευκάλυπτος,

το τζίντζερ και ο βασιλικός [4]. Τα τερπένια επιτελούν διάφορες βιολογικές λειτουργίες και συμμετέχουν τόσο στον πρωτογενή μεταβολισμό όσο και στον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Στον κεντρικό μεταβολισμό είναι φωτοσυνθετικές χρωστικές (καροτένια), φορείς ηλεκτρονίων (ουβικινόνη και πλαστικινόνη), ρυθμιστές της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών (γιββεριλίνες, στρυγολακτόνες, βρασινοστεροειδή), αποτελούν μέρος των κυτταρικών μεμβρανών (φυτοστερόλες) και συμμετέχουν στην γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών [5]. Στον δευτερογενή μεταβολισμό συμμετέχουν ως μόρια άμυνας, τοξικές ενώσεις και ως μόρια αποτρεπτικά για τα έντομα. Σε ορισμένα φυτά είναι τα υπεύθυνα μόρια για την προσέλκυση επικονιαστών ή λειτουργούν ως διασκορπιστές [6-9].

Συντίθενται από πρωτογενείς μεταβολίτες διαμέσου δύο βιοσυνθετικών μονοπατιών: εκείνο του μεβαλονικού οξέος, ενεργό στο κυτταρόλυμα, στο οποίο τρία μόρια ακετυλο-CoA συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ που αντιδρά για να σχηματίσει διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) ή μέσω της οδού της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (MEP) που λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες και παράγει επίσης IPP₂₄ (Εικόνα Α1).



Εικόνα Α1. Οι μεταβολικές οδοί του μεβαλονικού οξέος (MVA) και της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (MEP) στη βιοσύνθεση των τερπενοειδών [18].

Απαντώνται σε περισσότερα από 2000 είδη φυτών, τόσο γυμνόσπερμα όσο και σε αγγειόσπερμα, από 60 οικογένειες, με τις πιο κοινές να είναι οι *Labiatae*, *Umbelliferae* και *Compositae*. Η παρουσία τους είναι χαρακτηριστική για τα αρωματικά φυτά (**Εικόνα Α2**) [11-13].

a)



b)



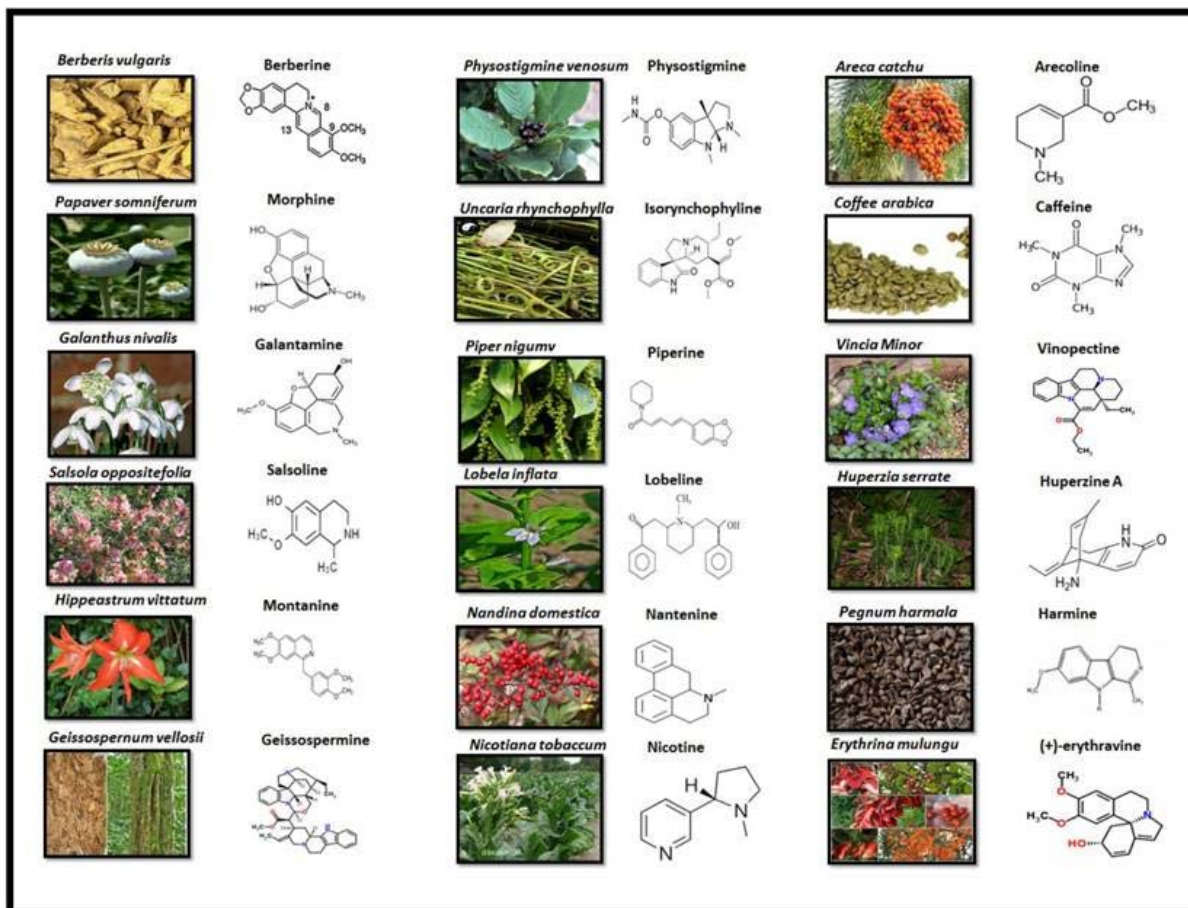
Εικόνα Α2. Παραδείγματα βοτάνων-πηγή αιθέριων ελαίων: **a)** Λεβάντα (*Lavandula hybrida super*), **b)** Ρίγανη (*Origanum hirtum*).

A1.2. Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή συνιστούν άλλη μια μεγάλη και ποικίλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που περιλαμβάνει μόρια τα οποία απομονώνονται κυρίως από αγγειώδη φυτά [14]. Τα φυτά γενικά παράγουν ένα πολύπλοκο μείγμα αλκαλοειδών, στο οποίο κυριαρχεί ένα σημαντικό συστατικό [14]. Ανάμεσα στους φυτικούς οργανισμούς η βιοσυνθετική προέλευση των αλκαλοειδών είναι κοινή, ακόμη και αν οι δομές τους είναι ελαφρώς διαφορετικές [14]. Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η συγκέντρωση των αλκαλοειδών ποικίλλει σημαντικά από το ένα τμήμα στο άλλο, του ίδιου φυτού, ενώ σε ορισμένα τμήματα του φυτού μπορεί να μην εντοπίζονται καθόλου [15]. Αλκαλοειδή εντοπίζονται επίσης σε μύκητες, βακτήρια και ζώα [16]. Κατά κύριο λόγο είναι τοξικές ενώσεις οι οποίες διαθέτουν ένα άτομο αζώτου στη δομή τους και συμμετέχουν σε κοινές αντιδράσεις καταβύθισης [17,18].

Δεδομένου ότι ακόμη δεν υπάρχει ενιαία ταξινόμηση των αλκαλοειδών, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα κριτήρια για την ταξινόμησή τους όπως: η βιοσυνθετική προέλευση, η παρουσία βασικού ετεροκυκλικού πυρήνα στη δομή, οι φαρμακολογικές ιδιότητες και η κατανομή σε οικογένειες φυτών [19]. Μεταξύ αυτών των κριτηρίων, η βιοσυνθετική προέλευση των αλκαλοειδών χρησιμοποιείται αρκετά συχνά και σύμφωνα με

το κριτήριο αυτό τα αλκαλοειδή ταξινομούνται ως “πραγματικά” αλκαλοειδή, πρωτοαλκαλοειδή και ψευδοαλκαλοειδή (Εικόνα Α3) [20].



Εικόνα Α3. Μια ποικιλία αλκαλοειδών φυτικής προέλευσης [21].

Τα “πραγματικά” αλκαλοειδή είναι αυτά που συμμορφώνονται αυστηρά με τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των αλκαλοειδών, με την πλειονότητα των αλκαλοειδών που απαντώνται στα φυτά να ανήκουν στην ομάδα αυτή. Περιέχουν ένα ενδοκυκλικό άζωτο, έχουν βασικό χαρακτήρα και είναι ενώσεις υψηλής αντιδραστικότητας, ακόμη και σε μικρές ποσότητες. Στα φυτά, μπορούν να βρεθούν σε ελεύθερη μορφή, αν και επικρατούν ως άλατα. Οι πρόδρομες ενώσεις των “πραγματικών” αλκαλοειδών είναι αμινοξέα (L-ορνιθίνη, L-λυσίνη, L-τυροσίνη, L-τρυπτοφάνη, L-ιστιδίνη και L-αργινίνη), ενώ ορισμένα «πραγματικά» αλκαλοειδή έχουν παραχθεί από το ανθρανιλικό και το νικοτινικό οξύ [20,22]. Τα πρωτοαλκαλοειδή αποτελούν την μικρότερη σε αριθμό κατηγορία. Σε αυτή την ομάδα, το άτομο αζώτου δεν αποτελεί μέρος του ετεροκυκλικού δακτυλίου και προέρχονται από την L-θυρεοειδή, την L-τρυπτοφάνη και την L-ορνιθίνη. Μπορούν να θεωρηθούν

επίσης αρωματικές αμίνες [18]. Τα ψευδοαλκαλοειδή περιέχουν ετεροκυκλικούς δακτυλίους με άζωτο, αλλά δεν προέρχονται από αμινοξέα. Σχηματίζονται με μεταγενέστερη ενσωμάτωση του αζώτου σε ενώσεις που αρχικά δεν περιείχαν αυτό το στοιχείο, με την ομάδα των τερπενικών αλκαλοειδών να ανήκουν σε αυτά [22].

Αν και η παρουσία αλκαλοειδών δεν είναι ζωτικής σημασίας για το φυτό, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν το ρόλο που διαδραματίζουν οι ουσίες αυτές στα λαχανικά. Όσον αφορά τις λειτουργίες που εκπληρώνουν, αρχικά θεωρούνταν απόβλητα του μεταβολισμού του αζώτου, ως αποθήκες αζώτου στο φυτό και αναφέρονταν ακόμη και ως ρυθμιστές της ανάπτυξης του φυτού. Σήμερα, είναι αποδεκτό ότι ο ρόλος που διαδραματίζουν είναι στην άμυνα του φυτού έναντι των εντόμων και των φυτοφάγων λόγω της τοξικότητας και της απωθητικής τους ικανότητας. Ενώ σε ορισμένα είδη φυτών τα αλκαλοειδή χρησιμεύουν για την προστασία του φυτού από θηρευτές ή μικροοργανισμούς (τοξικές ή απωθητικές ουσίες), άλλα φυτά τα χρησιμοποιούν για να ανταγωνίζονται άλλα είδη φυτών σε ένα δεδομένο ενδιαίτημα (αλληλοπαθητικές ουσίες) [23,24].

Τα αλκαλοειδή επιδεικνύουν αξιοσημείωτες φυσιολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες που ασκούνται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (**Πίνακας Α2**) και δύναται να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Ωστόσο, η παρατεταμένη χρήση οποιασδήποτε από τις ενώσεις αυτές, προκαλεί εθισμό στον άνθρωπο με σωματικές και ψυχικές εξαρτήσεις και αύξηση της ανοχής σε αυτές [20,23].

Πίνακας Α2. Αλκαλοειδή με σημαντικό βιολογικό ρόλο [1].

Κατηγορία	Όνομασία	Βιολογικές ιδιότητες	Οικογένεια φυτών
“Πραγματικά” αλκαλοειδή	Ατροπίνη	Αντιχολινεργικό φάρμακο	<i>Solanaceae</i>
	Νικοτίνη	Δηλητήριο το οποίο σε χαμηλές δόσεις δρα ως διεγερτικό	<i>Solanaceae</i>
	Μορφίνη	Ναρκοτικές και αναισθητικές ιδιότητες	<i>Papaveraceae</i>
Πρωτοαλκαλοειδή	Μεσκαλίνη	Παραισθησιογόνο	<i>Cactaceae</i>
	Χορδενίνη	Διεγείρει το ΚΝΣ	<i>Cactaceae</i>
	Εφεδρίνη	Διεγείρει το ΣΝΣ	<i>Ephedraceae</i>
Ψευδοαλκαλοειδή	Ακονιτίνη	Ισχυρό δηλητήριο	<i>Ranunculaceae</i>
	Θεοβρωμίνη	Διεγείρει το ΚΝΣ	<i>Malvaceae</i>
	Κωνεΐνη	Ισχυρό δηλητήριο	<i>Apiaceae</i> <i>Sarraceniaceae</i>

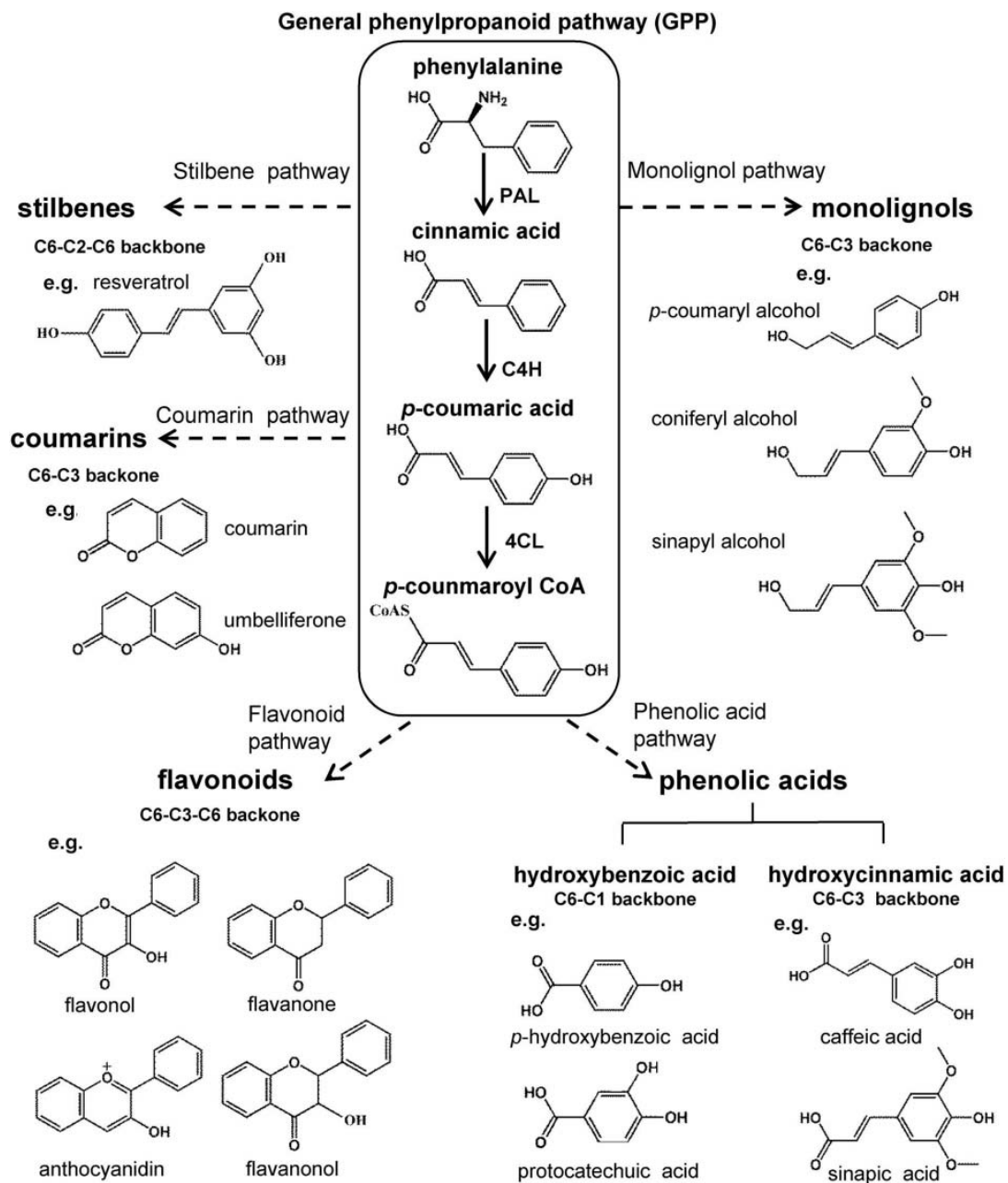
Μέχρι σήμερα, έχουν απομονωθεί περίπου 15.000 αλκαλοειδή από φυτά. Εάν λάβουμε υπόψη ότι έχει εξεταστεί λιγότερο από το 25 % των ανώτερων φυτικών ειδών του πλανήτη, είναι σαφές ότι υπάρχει ακόμη ευρύ πεδίο έρευνας. Λόγω της φαρμακολογικής και φαρμακευτικής τους σημασίας υπάρχει ένα εξαιρετικό κίνητρο για να συνεχιστεί η χημικό-βιολογική μελέτη των αλκαλοειδών δεδομένου ότι πρόκειται για μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών με έντονο θεραπευτικό ενδιαφέρον [24].

Α1.3. Φαινυλοπροπανοειδή – Φαινολικά παράγωγα

Τα φυτά προέρχονται από το υδάτινο περιβάλλον και η επιτυχής εξελικτική προσαρμογή τους στην ξηρά επιτεύχθηκε σε μεγάλο βαθμό με τη μαζική σύνθεση των φυτικών φαινολικών ενώσεων. Στο εκτιμώμενο 40 % του οργανικού άνθρακα που υπάρχει στη βίοςφαιρα, οι φαινολικές αυτές ενώσεις προέρχονται κυρίως από φαινυλοπροπανοειδή και συναφείς βιοχημικές οδούς, όπως αυτές που οδηγούν σε υδρολύσιμες τανίνες. Τα φυτικά φαινολικά παράγωγα ορίζονται γενικά ως αρωματικοί μεταβολίτες που διαθέτουν ή διέθεταν ως πρόδρομα μόρια μία ή περισσότερες όξινες υδροξυλομάδες συνδεδεμένες στον

αρωματικό φαινολικό δακτύλιο. Εδώ και χρόνια, οι ενώσεις αυτές αποτελούν αντικείμενο μελέτης και έχουν προβληματίσει ιδιαίτερα τους βιολόγους των φυτών ως προς τις ιδιότητες και τον τρόπο δράσης τους. Για παράδειγμα, όταν εκτίθενται στον αέρα, τα φυτικά φαινολικά παράγωγα οξειδώνονται εύκολα και μαυρίζουν, σχηματίζοντας προϊόντα που δίνουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ενζύμων. Τα καλλιεργούμενα φυτά μπορούν επίσης να απελευθερώσουν φαινολικά παράγωγα που αναστέλλουν την ανάπτυξη κάλου και την αναγέννηση βλαστών. Παράλληλα, παρατηρείται ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντική συμβολή στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την άμυνα των φυτών [25].

Ο κύκλος του σικιμικού οξέος οδηγεί στη σύνθεση φαινυλοπροπανοειδών (**Εικόνα Α4**). Αρχικά οδηγεί στην παραγωγή φαινυλαλανίνης (αρωματικό αμινοξύ) που διαμέσου του ενζύμου λυάση αμμωνίας φαινυλαλανίνης (PAL) δρα στο άζωτο του αμινοξέος και μετατρέπεται σε trans - κινναμωμικό οξύ. Αυτή η βιοχημική οδός οδηγεί στη βιοσύνθεση αλκαλοειδών, λιγνανών, φλαβονοειδών και κουμαρινών. Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι τα απλούστερα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Οι μετατροπές σε αυτό το μόριο περιλαμβάνουν την απώλεια οξυγόνου είτε από την πλευρική αλυσίδα είτε στη θέση διπλού δεσμού της ίδιας αλυσίδας. Η θέση του διπλού δεσμού καθορίζει τον σχηματισμό των δύο ισομερών της ανηθόλης και της οιστραγόλης [26,27].



Εικόνα Α4. Σχηματική απεικόνιση των βιοσυνθετικών οδών των φαινυλοπροπανοειδών και αντιπροσωπευτικών χημικών δομών τους. Η γενική οδός των φαινυλοπροπανοειδών (GPP), η οποία παρουσιάζεται εντός του πλαισίου, περιλαμβάνει τα τρία πρώτα βήματα. Οδηγεί στη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε *p*-κουμαρυλ-CoA και παράγει κοινές πρόδρομες ουσίες των φαινυλοπροπανοειδών, όπως τα φλαβονοειδή, οι μονολιγνόλες, τα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια και οι κουμαρίνες. Τα συμπαγή βέλη αντιπροσωπεύουν μεμονωμένα βιοσυνθετικά βήματα. Τα διακεκομμένα βέλη υποδηλώνουν πολλαπλά βήματα. Οι χημικές δομές της ρεσβερατρόλης, της κουμαρίνης, της συμπελιφερόνης, της φλαβονόλης, της

φλαβανόνης, της ανθοκυανιδίνης, της φλαβανονόλης, του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος, του πρωτοκατεχουϊκού οξέος, του καφεϊκού οξέος και του σιναπικού οξέος, της π-κουμαρυλικής αλκοόλης, της κονιφερυλ-αλκοόλης (coniferyl) και η σιναπυλ-αλκοόλης (sinaryl). PAL, λυάση αμμωνίας φαινυλαλανίνης; C4H, κινναμίδική 4-υδροξυλάση; 4CL, 4-κουμαροΐλ CoA λιγάση [28].

A2. Διαδικτυακοί πόροι φυσικών προϊόντων: Διαθεσιμότητα και χαρακτηριστικά

Τα φυσικά προϊόντα (NPs) έχουν βρεθεί στο επίκεντρο της προσοχής της επιστημονικής κοινότητας στις τελευταίες δεκαετίες και το ενδιαφέρον γύρω τους συνεχίζει να αυξάνεται ασταμάτητα. Παρόλο που υπάρχει ένα εντυπωσιακό πλήθος (123) διαδικτυακών πόρων ανοικτής πρόσβασης ή/ και εμπορικών, προς το παρόν όμως, δεν υπάρχει μια παγκοσμίως αποδεκτή κοινοτική βάση δεδομένων για τα NPs, όπου οι δομές και πληροφορίες σχετικά με τα φυσικά προϊόντα να μπορούν να υποβληθούν, να επεξεργαστούν και να αναζητηθούν από το ευρύ κοινό, όπως αντίστοιχα υπάρχει το UniProt [29] για τις πρωτεΐνες ή το NCBI Taxonomy [30] για την ταξινόμηση των ζωντανών οργανισμών.

Ενδεικτικές αναφορές σχετικά με βάσεις δεδομένων, συνόλων δεδομένων και συλλογών NPs σε όλες τις δημοσιεύσεις από το 2000 έως το 2019 και στο omicX, παρατίθενται στον **Πίνακα A3** [31]. Αναφέρονται διάφορα χαρακτηριστικά τους, όπως:

- ✓ εάν είναι ανοικτής πρόσβασης ή εμπορικές,
- ✓ εάν συντηρούνται και ενημερώνονται,
- ✓ τι είδους NPs περιέχουν και την προέλευσή τους,
- ✓ ο κατά προσέγγιση αριθμός των μοριακών δομών που περιέχουν,
- ✓ εάν απαιτείται εγγραφή για την πρόσβαση στα δεδομένα,
- ✓ εάν είναι διαθέσιμα εκτεταμένα μεταδεδομένα (γεωγραφική τοποθεσία στην οποία βρίσκεται ή απομονώθηκε, η εφαρμογή του στην παραδοσιακή ιατρική, ασθένειες που στοχεύει, κ.λπ.) και,
- ✓ αν η λήψη των μοριακών δομών για τοπική χρήση (όπως εικονική διαλογή) είναι εύκολη.

Όλα αυτά τα κριτήρια επιλέγονται για την αξιολόγηση της "FAIRness" (Findable, Accessible, Interoperable and Reusable) [32] των διαθέσιμων πόρων των NPs. Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 400.000 NPs έχουν συγκεντρωθεί στη COCONUT (COllection of Open Natural Prod-UcTs) τη μεγαλύτερη συλλογή ανοιχτής πρόσβασης που είναι διαθέσιμη στο Zenodo [33].

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που εντοπίζεται σήμερα είναι ότι υπάρχουν πάρα πολλές πηγές πληροφόρησης για NPs. Ένας μη έμπειρος ερευνητής στα NPs (ακόμα και ένας πιο έμπειρος) μπορεί να «χαθεί» μέσα σε αυτή την ποικιλία των πιθανών πηγών δεδομένων. Το επόμενο μεγάλο πρόβλημα είναι η πρόσβαση στα δεδομένα και η συντήρηση των βάσεων δεδομένων. Πράγματι, πολλές δημοσιεύσεις παραπέμπουν σε έναν δικτυακό τόπο που δεν συντηρείται πλέον. Αυτή είναι η περίπτωση της πλειοψηφίας των βάσεων δεδομένων που αφορούν τις τοξίνες των ζώων, αλλά και ορισμένων μικρών βάσεων δεδομένων παραδοσιακής ιατρικής ή ιατρικής μιας χώρας. Στον κατάλογο των πηγών NPs που παρουσιάζεται στον **Πίνακα Α3**, πάνω από το 20 % δεν συντηρείται πλέον ή η πρόσβαση είναι διακοπτόμενη. Σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις, οι πληροφορίες σχετικά με τις δομές των NPs είναι ακόμη ανακτήσιμες μέσω της βάσης δεδομένων ZINC, αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο για την περίπτωση των πιο σύγχρονων βάσεων δεδομένων, όπου η ZINC δεν αποθηκεύει μεταδεδομένα από αυτές τις συλλογές, παρά μόνο τις μοριακές δομές κωδικοποιημένες σε SMILES. Επίσης, η περιγραφή και η προέλευση των NPs (δηλαδή τα μεταδεδομένα), απουσιάζουν στις περισσότερες περιπτώσεις, με αποτέλεσμα να απαιτείται πολύ περισσότερη προσπάθεια και έρευνα για τον εντοπισμό της προέλευσής τους και της μεθοδολογίας ανάκτησής τους, σε περιπτώσεις όπου ο *in silico* έλεγχος αποκαλύπτει δυνητικά ενδιαφέρουσες ενώσεις.

Μόνο το 40 % των βάσεων δεδομένων NPs προσφέρουν εύκολη και μαζική λήψη μοριακών δομών για περαιτέρω αναλύσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλές από αυτές, η ποιότητα των μοριακών δομών μπορεί επίσης να απαιτεί πρόσθετη προσοχή διότι δεν υπάρχουν πρότυπα για τις βάσεις δεδομένων NPs για τον ορισμό της στερεοχημείας, της αρωματικότητας ή των ισοτόπων, γεγονός που οδηγεί σε μια ποικιλία πιθανών εκδοχών του ίδιου μορίου.

Αυτή η πολλαπλότητα των βάσεων δεδομένων προέρχεται επίσης από την πίεση των δημοσιεύσεων που ασκείται στους επιστήμονες, το διαβόητο "publish or perish". Σήμερα, η δημοσίευση ενός συνόλου δεδομένων ή μιας βάσης δεδομένων είναι μια σχετικά εύκολη

δημοσίευση δίνοντας τη δυνατότητα για μεγάλο αριθμό αναφορών. Ωστόσο, αυτή η τάση δημιουργεί πληθώρα βάσεων δεδομένων που δεν συντηρούνται πέραν του χρόνου δημοσίευσης (όπως η περίπτωση της VIETHERB [34] για παράδειγμα, η οποία δημοσιεύθηκε μόλις 1 έτος πριν από τη συγγραφή της παρούσας ανασκόπησης και ήδη δεν είναι προσβάσιμη πια), παρά τις απαιτήσεις των περιοδικών να παρέχουν προσβασιμότητα στα δημοσιευμένα σύνολα δεδομένων και τις βάσεις δεδομένων για πολλά χρόνια.

Πίνακας Α3. Κατάλογος των βάσεων δεδομένων NPs που αναφέρονται στην επιστημονική βιβλιογραφία από το 2000. Ο κατάλογος είναι ταξινομημένος με βάση την αλφαβητική σειρά των ονομάτων των βάσεων δεδομένων και περιέχει, όταν είναι διαθέσιμα, εκτεταμένα μεταδεδομένα [123].

Βάση δεδομένων	Τύπος NP	Αριθμός NPs με σωστή δομή	Αριθμός μοναδικών μορίων στο COCONUT	Ανοιχτή πρόσβαση	Απαιτεί Εγγραφή	Συντηρείται	Ενημερώνεται
3`DMET	γενικευμένος	18248	X	NAI	OXI	NAI	NAI
AfroCancer	φυτά, Αφρική	390	365	NAI	-	-	OXI
AfroDB	φυτά, Αφρική	954	874	NAI	OXI	OXI	OXI
AfroMalariaDB	φυτά, Αφρική	265	252	NAI	-	-	OXI
Afrotryp	φυτά, φαρμακευτικά, Αφρική	321	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	-	-	OXI
Alkamid database	φυτά, δομές	300	X	NAI	OXI	NAI	OXI
Ambinter-Greenpharma natural compound library (GPNCL)	βιομηχανικής φύσεως	> 150,000	X	OXI	NAI	NAI	NAI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

AnalytiCon Discovery MEGx	βακτήρια, φυτά, βιομηχανικής φύσεως	5147	4908	NAI	NAI	NAI	NAI
AntiBase	φαρμακευτικά	> 40,000	X	OXI	OXI	NAI	OXI
AntiMarin	θαλάσσια, φαρμακευτικά	> 60,000	X	OXI	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
ATBD (Animal Toxin Database)	τοξίνες	1000	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	ΑΓΝΩΣΤΟ
Ayurveda	Ασία	950	X	OXI	NAI	NAI	ΑΓΝΩΣΤΟ
Berdy's Bioactive Natural Products Database	γενικευμένος	X	X	OXI	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
BiGG	μεταβολίτες	7339	X	NAI	OXI	NAI	NAI
Binding DB	φαρμακευτικά	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
BIOFAQUIM	φυτά, μύκητες, Αμερική	420	400	NAI	OXI	NAI	NAI
BioPhytMol	φαρμακευτικά, φυτά, Ασία	633	X	NAI	OXI	NAI	NAI
BitterDB	τρόφιμα	654	631	NAI	OXI	NAI	NAI
BRENDA	μεταβολίτες	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
CamMedNP	φυτά, Αφρική	> 2500	X	NAI	OXI	-	OXI
Carotenoids Database	δομή	1174	991	NAI	OXI	NAI	NAI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

CAS registry/SciFinder	χημικά	> 300,000	X	OXI	NAI	NAI	NAI
CEMTDD - Chinese Ethnic Minority Traditional Drug Database	φυτά, Ασία	4060	X	NAI	OXI	NAI	OXI
CHDD (Chinese Traditional Medicinal Herbs database)	φυτά, Ασία	> 30,000	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
ChEBI	χημικά	15,736	14,621	NAI	OXI	NAI	NAI
Chem-TCM	φυτά, tm, Ασία	> 12,000	X	OXI	NAI	NAI	OXI
ChemBank	χημικά	X	X	NAI	OXI	OXI	OXI
ChEMBL	χημικά	1899	1581	NAI	OXI	NAI	NAI
ChemBridge diversity datasets	γενικευμένος, βιομηχανικής φύσεως	X	X	OXI	NAI	OXI	OXI
ChemDB	φυτά, Ασία	> 1000	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
ChemIDplus	φαρμακευτικά, τοξίνες	9042	X	NAI	OXI	NAI	NAI
ChemSpider	χημικά	9732	9029	NAI	OXI	NAI	NAI
CHMIS-C	φυτά, Ασία	> 8000	X	NAI	OXI	OXI	OXI
CMAUP	φυτά	47,645	20,873	NAI	OXI	NAI	OXI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

CNPD (Chinese Natural Products Database)	γενικευμένος	> 57,000	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
ConMedNP	φυτά, Αφρική	3118	2504	ΝΑΙ	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ
CSLS/NCI (Chemical Structure Lookup Service)	μεταβολίτες	X	X	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
Database of Indonesian Medicinal Plants	φυτά, Ασία	6776	X	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΟΧΙ
DESMSCI (Dragon Exploration System on Marine Sponge Compounds Interactions)	θαλάσσια	X	X	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ
DFC (Dictionary of Food COmpounds)	τρόφιμα	> 41,000	X	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
DMNP (Dictionary of Marine Natural Products)	θαλάσσια	> 30,000	X	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
DNP (Dictionary of Natural Products) by Chapman and Hall (also known as CHEMnetBase)	γενικευμένος	> 230,000	X	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
Drugbank NPs	φαρμακευτικά	2617	2617	ΝΑΙ	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ
eBasis	τρόφιμα		X	ΟΧΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ	ΝΑΙ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ETCM (Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine)	Ασία	7274	X	NAI	OXI	NAI	NAI
ETM-DB	φυτά, Αφρική	1795	1653	NAI	OXI	NAI	NAI
FoodB	τρόφιμα	24,215	22,223	NAI	OXI	NAI	NAI
GNPS	απεικόνιση	7619	6708	NAI	OXI	NAI	NAI
HIM (Herbal Ingredients <i>in-vivo</i> Metabolism database)	φαρμακευτικά, φυτά	1261	962	NAI	OXI	OXI	OXI
HIT (Herbal Ingredients Targets)	φαρμακευτικά, φυτά	524	472	NAI	OXI	OXI	OXI
HMDB	απεικόνιση	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
IMPPAT	φυτά, Ασία	9596	X	NAI	OXI	NAI	NAI
InflamNat	φαρμακευτικά	552	536	NAI	-	-	-
Indofine Chemical Company Inc. natural products	γενικευμένος, βιομηχανικής φύσεως	56	46	NAI	OXI	NAI	-
InPACdb	φαρμακευτικά, φυτά, Ασία	124	121	NAI	OXI	OXI	OXI
InterBioScreen Ltd (IBS)	γενικευμένος, βιομηχανικής φύσεως	68,350	67,292	NAI	NAI	NAI	NAI
iSMART	φυτά, Ασία	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

KEGG	μεταβολίτες	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
KNAPSAcK	φυτά	10,265	8887	NAI	OXI	NAI	NAI
Lichen Database	μύκητες	249	156	NAI	OXI	NAI	OXI
LOPAC1280 by Merck	φαρμακευτικά	1280	X	OXI	NAI	NAI	NAI
MAPS database	φυτά, Ασία	X	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
Marine Compound Database (MCDB)	θαλάσσια	182	X	NAI	OXI	OXI	OXI
Marine Natural Product Database (MNPDB)	θαλάσσια	6000	X	NAI	OXI	OXI	OXI
MarineLit	θαλάσσια	> 29,000	X	OXI	NAI	NAI	NAI
Massbank	απεικόνιση	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
MedPServer	φυτά, Ασία	1124	X	NAI	OXI	NAI	NAI
MetaCyc	μεταβολίτες	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
METLIN	απεικόνιση	X	X	NAI	NAI	NAI	NAI
Mitishamba database	φυτά, Αφρική	1102	1010	NAI	OXI	NAI	OXI
NADI	φυτά	3000	X	OXI	NAI	NAI	ΑΓΝΩΣΤΟ
NANPDB	φυτά, Αφρική	6832	3913	NAI	OXI	NAI	NAI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

NaprAlert	γενικευμένος	> 15,5000	X	OXI	NAI	NAI	NAI
NAPROC-13	απεικόνιση	> 18,000	X	NAI	OXI	NAI	NAI
NCI DTP data	φαρμακευτικά	418	404	NAI	OXI	NAI	OXI
NeMedPlant	φυτά, Ασία	100	X	NAI	OXI	NAI	OXI
NIST	χημικά	X	X	OXI	OXI	NAI	NAI
NMRDATA	απεικόνιση	X	X	ΑΓΝΩΣΤΟ	NAI	NAI	NAI
NMRShiftDB	απεικόνιση	1875	X	NAI	OXI	NAI	NAI
Novel Antibiotics database	φαρμακευτικά	5430	X	NAI	OXI	NAI	OXI
NPACT	φυτά, φαρμακευτικά	1573	1453	NAI	OXI	NAI	NAI
NPASS	φυτά, βακτήρια, μετάζωα, μύκητες	30,858	27,479	NAI	OXI	NAI	NAI
NPAtlas	βακτήρια, μύκητες	20,035	18,959	NAI	OXI	NAI	NAI
NPCARE	φυτά, θαλάσσια, βακτήρια, φαρμακευτικά	1370	1364	NAI	OXI	NAI	NAI
NPEdia	γενικευμένος	18,016	16,190	NAI	OXI	NAI	OXI
NPL (library)	φυτά, φαρμακευτικά	814	X	OXI	-	-	-
NuBBEDB	φυτά, έντομα, Αμερική	2215	2022	NAI	OXI	NAI	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Open-Source Malaria	φαρμακευτικά	842	X	NAI	OXI	NAI	NAI
p-ANAPL (Pan-African Natural Product Library)	φυτά, Αφρική	538	467	NAI	OXI	NA	-
PAMDB	μεταβολίτες, βακτήρια	X	X	NAI	OXI	NAI	NAI
Phenol-explorer	τρόφιμα	862	681	NAI	OXI	NAI	NA
Phytochemica	φυτά, Ασία	571	X	NAI	OXI	OXI	OXI
PhytoHub	τρόφιμα, φυτά	1200	X	NAI	OXI	NAI	NAI
Pi Chemicals System Natural Products	γενικευμένος, βιομηχανικής φύσεως φυτά,	405	X	NAI	OXI	NAI	NAI
Prestwick	βιομηχανικής φύσεως	320	X	OXI	NAI	NAI	NAI
ProCarDB	δομές, βακτήρια	304	X	NAI	OXI	NAI	OXI
PubChem	χημικά	3529	2835	NAI	OXI	NAI	NAI
REAXYS	χημικά	> 220,000	X	OXI	NAI	NAI	-
ReSpect	απεικόνιση	4767	711	NAI	OXI	NAI	OXI
SANCDDB	φυτά, Αφρική	623	592	NAI	OXI	NAI	NAI
Seaweed Metabolite Database (SWMD)	θαλάσσια	1110	423	NAI	OXI	NAI	OXI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Specs Natural Products	γενικευμένος, βιομηχανικής φύσεως	745	745	NAI	NAI	NAI	OXI
Spektraris NMR	απεικόνιση	248	242	NAI	OXI	NAI	OXI
StreptomeDB	βακτήρια	6415	3610	NAI	OXI	NAI	OXI
Super Natural II	γενικευμένος	320,670	235,436	NAI	OXI	NAI	OXI
Super Scent	Άλλα	2100	X	NAI	OXI	NAI	OXI
Super Sweet	φυτά, μεταβολίτες	15,000	X	NAI	OXI	NAI	OXI
TargetMol Natural Compound Library	γενικευμένος, βιομηχανικής φύσεως	1680	X	OXI	NAI	NAI	NAI
TC-MC	Ασία, φυτά	> 20,000	X	NAI	OXI	NAI	NAI
TCMDB@Taiwan	Ασία, φυτά	58,351	50,891	NAI	OXI	NAI	NAI
TCMID	Ασία, φυτά	12,549	10,572	NAI	OXI	NAI	OXI
TCMSP	Ασία, φυτά	29,384	X	NAI	OXI	OXI	OXI
TIM	Ασία, φυτά	1829	X	OXI	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
TIPdb	Ασία, φυτά, φαρμακευτικά	8656	7752	NAI	OXI	NAI	OXI
TMDB	φυτα, μεταβολίτες	1393	X	NAI	OXI	OXI	OXI

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

TPPT	φυτά, τοξίνες, Ευρώπη	1583	1486	NAI	OXI	NAI	OXI
TriForC	φυτά	266	X	NAI	OXI	NAI	OXI
UEFS	φυτά, Αμερική	503	481	NAI	OXI	OXI	OXI
UNPD (Universal Natural Products Database)	γενικευμένος	213,100	156,984	NAI	OXI	OXI	OXI
VIETHERB	φυτά, Ασία	10,887	X	NAI	ΑΓΝΩΣΤΟ	OXI	OXI
Yeast Metabolome Database	μεταβολίτες, απεικόνιση	16,042	X	NAI	OXI	NAI	NAI
YaTCM	Ασία, φυτά	47,696	X	NAI	OXI	NAI	NAI
ZINC natural products catalogue	γενικευμένος	85,198	673,36	NAI	OXI	NAI	NAI

A3. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Mera I, González Falconí DE, Morera V. Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Bionatura*. 2019;4:1000-9.
- [2] Vranová E, Coman D, Gruissem W. Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant*. 2012 Mar;5(2):318-33.
- [3] LAZAR T. Taiz, L. and Zeiger, E. *Plant physiology*. 3rd edn. Ann Bot. 2003 May;91(6):750–1.
- [4] Olivoto T, Nardino M, Carvalho I, Follmann D, Szareski V, Ferrari M, et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African journal of agricultural research*. 2017;12:71-84.
- [5] Loreto F, Dicke M, Schnitzler J-P, Turlings TCJ. Plant volatiles and the environment. *Plant, Cell & Environment*. 2014;37(8):1905-8.
- [6] Trapp S, Croteau R. DEFENSIVE RESIN BIOSYNTHESIS IN CONIFERS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001 Jun;52:689-724.
- [7] Veitch GE, Boyer A, Ley SV. The azadirachtin story. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47(49):9402-29.
- [8] Soriano IR, Riley IT, Potter MJ, Bowers WS. Phytoecdysteroids: A Novel Defense Against Plant-Parasitic Nematodes. *Journal of Chemical Ecology*. 2004;30(10):1885-99.
- [9] Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E, Krekling T. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist*. 2005;167(2):353-76.
- [10] Yang D, Du X, Liang X, Han R, Liang Z, Liu Y, Liu F, Zhao J. Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *PLoS One*. 2012;7(11):e46797..
- [11] Cox-Georgian D, Ramadoss N, Dona C, Basu C. *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*. Berlin, Germany: Springer International Publishing; 2019.
- [12] McMurry, J. E. *Organic chemistry with biological applications*. Belmont, Calif.: Brooks/Cole Cengage Learning. 2011.
- [13] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry 2nd Edition*. Oxford. 2012.
- [14] Le Quesne PW. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications* Edited by Margaret F. Roberts (University of London) and Michael Wink (University of

Heidelberg). Plenum Press, New York, NY. 1998. *Journal of Natural Products*. 1999;62(4):664-.

[15] Ng YP, Or TCT, Ip NY. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 2015;89:260-70.

[16] Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 2005;58(1):1-26.

[17] Matsuura HN, Fett-Neto AG. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. In: Gopalakrishnakone P, Carlini CR, Ligabue-Braun R, editors. *Plant Toxins*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 1-15.

[18] Babbar, N. (2015) An introduction to alkaloids and their application in pharmaceutical industry. *Pharma Innovation Journal*, 4: 74-75.

[19] Kumar, S. (2014) Alkaloidal drugs: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences & Technology* 4: 107-119.

[20] Aniszewski, T. (2007) *Alkaloids—Secrets of Life Alkaloids Chemistry, Biological Significance Application and Ecological Role*. 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.

[21] Hussain G, Rasul A, Anwar H, Aziz N, Razzaq A, Wei W, et al. Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Biological Sciences*. 2018;14(3):341-57.

[22] Pelletier, S. W. (1983) The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives*. Vol. One (Pelletier, S. W., ed.), pp. 1–31. New York: John Wiley & Sons.

[23] Kartsev VG. Natural Compounds In Drug Discovery. Biological Activity And New Trends In The Chemistry Of Isoquinoline Alkaloids. *Medicinal Chemistry Research*. 2004;13(6):325-36.

[24] Shakhnoz Azimova, Yunusov Marat. *Natural Compounds-Alkaloids*. Springer Science Business Media New York 2013

[25] Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J*. 2007;2(10):1214-34.

[26] Noel JP, Austin MB, Bomati EK. Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*. 2005;8(3):249-53.

[27] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant*. 2010;3(1):2-20.

- [28] Deng Y, Lu S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2017;36(4):257-90
- [29] UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(5):2699
- [30] Federhen S. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research*. 2011;40(D1):D136-D43.
- [31] Sorokina M, Steinbeck C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*. 2020;12(1):20.
- [32] Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IJ, Appleton G, Axton M, Baak A, et al. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific Data*. 2016;3(1):160018.
- [33] Maria Sorokina, & Christoph Steinbeck. (2021). COCONUT: the COLleCtion of Open NatUral producTs. (Version 6) [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5336447>.
- [34] Nguyen-Vo T-H, Le T, Pham D, Nguyen T, Le P, Nguyen A, et al. VIETHERB: A Database for Vietnamese Herbal Species. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2019;59(1):1-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Β1. Τεχνικές εκχύλισης φυσικών προϊόντων

Β1.1. Συμβατικοί μέθοδοι εκχύλισης

Β1.1.1. Εκχύλιση με διαβροχή

Η διαβροχή είναι μια μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται συνήθως για την εκχύλιση φαρμακευτικών φυτών. Τα στάδια της μεθόδου περιλαμβάνουν: τη σύνθλιψη της ακατέργαστης πηγής σε μικρά σωματίδια με σκοπό την αύξηση του εμβαδού της επιφάνειας του και ως εκ τούτου την αποτελεσματικότερη ανάμιξη με το διαλύτη και την τοποθέτηση της σε μια φιάλη. Εν συνεχεία τοποθετείται ποσότητα κατάλληλου διαλύτη ώστε να καλύψει τη θρυμματισμένη πρώτη ύλη και αφήνεται να παραμείνει για 3 ημέρες υπό συχνή ανάδευση έως ότου διαλυθεί η διαλυτή ύλη (**Εικόνα Β1**). Το μείγμα διηθείται και μεταγγίζεται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχύλισης [1]. Τελικά, το εκχύλισμα διαχωρίζεται με εξάτμιση σε υδατόλουτρο.

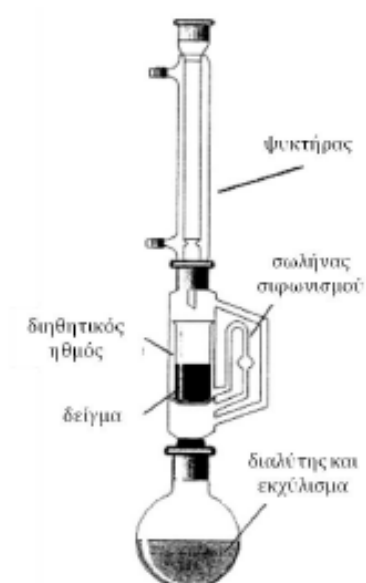


Εικόνα Β1. Φιάλες που περιέχουν εμβαπτισμένη την πρώτη ύλη προς εκχύλιση σε οργανικό διαλύτη.

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη κυρίως για θερμοευαίσθητα φυτικά εκχυλίσματα, καθώς δεν απαιτούνται αυξημένες θερμοκρασίες. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία εκχύλισης είναι χρονοβόρα και η απόδοση της μεθόδου χαμηλή [2].

B1.1.2. Εκχύλιση Soxhlet

Από το 1879, που ο Franz von Soxhlet ανέπτυξε ένα νέο σύστημα εκχύλισης (εκχυλιστήρας Soxhlet) μέχρι και σήμερα, η εκχύλιση Soxhlet θεωρείται ως η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική εκχύλισης ενώσεων, συνήθως λιπιδίων, από στερεές ή ημι-στερεές μήτρες [3]. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή το στερεό δείγμα τοποθετείται σε μία πορώδη ειδική φύσιγγα εκχύλισης από κυτταρίνη [4], η οποία τοποθετείται εντός ενός θαλάμου εκχύλισης για να συγκρατεί το δείγμα. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση θερμαίνεται σε μια φιάλη με στρογγυλό πυθμένα, η οποία μέσω ενός ψυκτήρα συνδέεται με το θάλαμο εκχύλισης, όπου γεμίζει σταδιακά με το συμπύκνωμα φρέσκου διαλύτη. Όταν ο διαλύτης υπερχειλίζει από τον εκχυλιστήρα, αναρροφάται από ένα σιφώνιο και ανακατευθύνεται μαζί με τις εκχυλισμένες ενώσεις πίσω στη φιάλη στην οποία γίνεται ο βρασμός (**Εικόνα Β2**). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου ολοκληρωθεί η εκχύλιση [5].



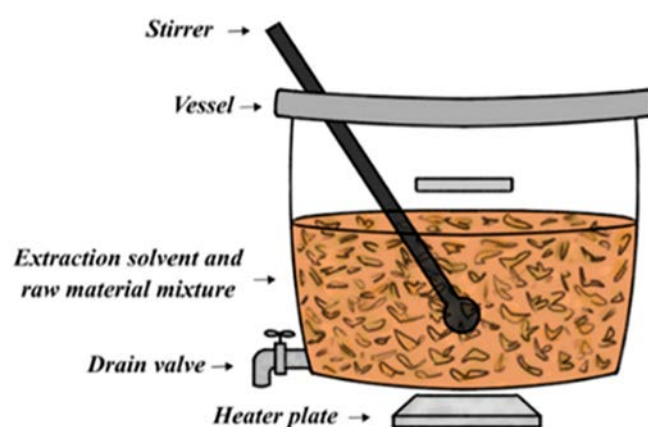
Εικόνα Β2. Συσκευή εκχύλισης Soxhlet.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς για τη σύγκριση και την ανάπτυξη νεότερων μεθόδων εκχύλισης. Είναι επίσης σχετικά εύκολο να αυτοματοποιηθεί, χωρίς να απαιτεί μεγάλη επίβλεψη [4]. Ωστόσο, οι εξαιρετικά μεγάλοι χρόνοι εξαγωγής (12

έως 24 ώρες), η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και προβλήματα στην επιλεκτικότητα και την αποδοτικότητα της, περιορίζουν το πεδίο εφαρμογής αυτής της τεχνικής [5-7].

B1.1.3. Εκχύλιση μέσω βρασμού

Η μέθοδος εκχύλισης μέσω βρασμού ή μέθοδος αφέψηματος είναι μια μέθοδος εκχύλισης θερμοσταθερών βιοδραστικών ενώσεων, τα οποία ανακτώνται με βρασμό σε νερό, ο οποίος είναι ο συνήθως χρησιμοποιούμενος διαλύτης (**Εικόνα Β3**) [8].



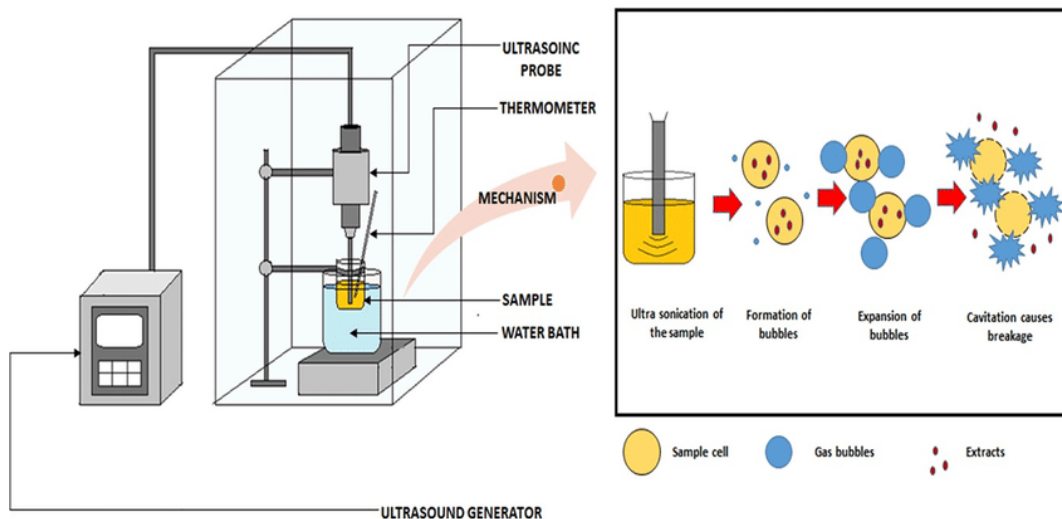
Εικόνα Β3. Εκχύλιση μέσω βρασμού

Χρησιμοποιείται ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική για την παραγωγή εκχυλισμάτων στη μορφή πόσιμων σκευασμάτων, που περιέχουν τα εκχυλίσματα διαφόρων φαρμακευτικών βοτάνων [9]. Οι συνήθεις πρώτες ύλες για εκχύλιση περιλαμβάνουν σκληρά στερεά, όπως οι ρίζες, ο φλοιός και οι σπόροι, τα οποία αλέθονται και θερμαίνονται με νερό σε ένα κλειστό δοχείο. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα ψύχεται και φιλτράρεται ώστε να διαχωριστεί από το αδιάλυτο υπόλειμμα [10]. Ένα αφέψημα χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτα σύντομους χρόνους εκχύλισης περίπου 5 έως 10 λεπτά. Ωστόσο, αυτό μπορεί να είναι μειονέκτημα εάν οι βιοδραστικές ενώσεις που πρέπει να εκχυλιστούν δεν είναι τόσο διαλυτές στο νερό ενώ απαιτείται και ένα μεγάλο εύρος αναλογιών διαλύτη προς στερεό [2].

B1.2. Μη συμβατικές προηγμένες μέθοδοι εκχύλισης

B1.2.1. Εκχύλιση με υπερήχους

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων εφαρμόζεται τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα και χαρακτηρίζεται ως μία πράσινη καινοτόμος τεχνολογία. Πραγματοποιείται με τη χρήση υπερηχητικών κυμάτων που προκαλούν το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης (cavitation), όπου παράγονται διαμήκη κύματα με την επαφή ενός υπερηχητικού κύματος με ένα υγρό μέσο. Με τον τρόπο αυτό, σχηματίζονται περιοχές όπου εναλλάσσονται κύματα συμπίεσης και αραιώσης, που επάγονται στα μόρια του μέσου. Η διαδικασία της διαστολής δημιουργεί φυσαλίδες, παράγει αρνητική πίεση και θέρμανση, καθώς διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα. Με την κατάρρευση των φυσαλίδων κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα, δημιουργούνται πίδακες και κύματα κρούσης εξαιτίας της υψηλής πίεσης και της θερμοκρασίας που κατευθύνονται προς τη στερεή επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση του διαλύτη στα κύτταρα και την αύξηση του ρυθμού της μεταφοράς μάζας [11]. Κατά την διαδικασία εκχύλισης με υπερήχους το δείγμα τοποθετείται εντός λουτρού υπερήχων που περιέχει οργανικό διαλύτη ή απεσταγμένο νερό (Εικόνα Β4). Η διάδοση των υπερήχων με ελάχιστη συχνότητα 16 kHz έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και εκτόνωσης, οδηγώντας τελικά σε διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών ουσιών [12].

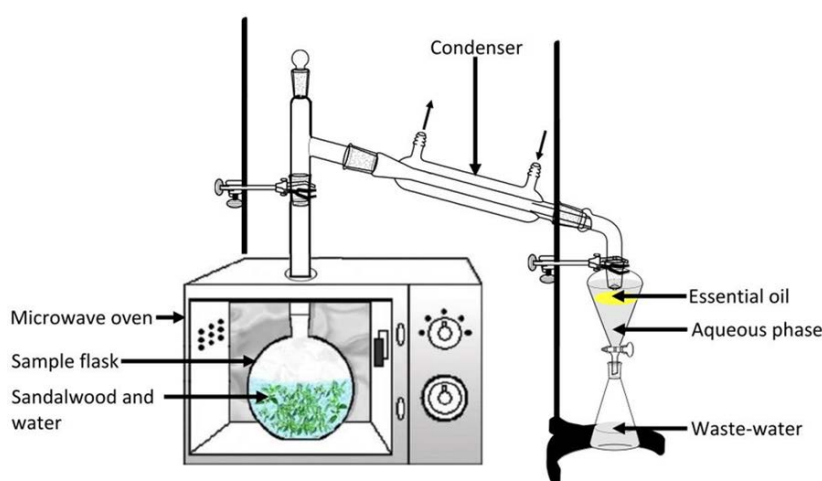


Εικόνα Β4. Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης με υπερήχους [13].

Η εκχύλιση με υπερήχους μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους διαλύτες όπως το νερό, η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας, αλλά θα πρέπει να πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία για να διατηρείται η ακεραιότητα των θερμοευαίσθητων ενώσεων [14]. Συνήθως, επιλέγονται διαλύτες με χαμηλό ιξώδες και ιδιαίτερη έμφαση θα πρέπει να δίδεται στην αναλογία διαλύτη/στερεού η οποία επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την απόδοση της εκχύλισης. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου εκχύλισης με υπερήχους σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης στερεού-υγρού είναι το χαμηλό κόστος εξοπλισμού και λειτουργίας και η λειτουργικότητα της για μεγάλο εύρος φυσικών συστατικών.

B1.2.2. Εκχύλιση με μικροκύματα

Πρόκειται για μια τεχνική που υποβοηθά την εκχύλιση με την εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με ένα εύρος συχνότητας από 300 MHz ως 300 GHz (μικροκυμάτων) στο δείγμα [15]. Η ενέργεια που σχετίζεται με αυτά τα μικροκύματα μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια και προκαλεί αλλαγές στη δομή των κυττάρων λόγω της παλινδρομικής αναστροφής των διπόλων και της ηλεκτροφόρησης των ιόντων του δείγματος, δύο φαινόμενα που σχετίζονται με την τεχνολογία μικροκυμάτων [16]. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα υφίστανται αύξηση της πίεσης, η οποία προκαλεί τελικά τη ρήξη τους, απελευθερώνοντας έτσι τις βιοδραστικές ενώσεις (**Εικόνα Β5**) [17].



Εικόνα Β5. Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής εκχύλισης με μικροκύματα [18].

Αυτή η τεχνική έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της εξαιρετικά μικρής απαίτησης σε ποσότητες διαλυτών και γρήγορους χρόνους εκχύλισης, καθώς και μεγαλύτερη αναπαραγωγιμότητα και έλεγχο των συνθηκών της διαδικασίας όπως η θερμοκρασία και η πίεση [19]. Οι αρχές που εμπλέκονται σε αυτή την τεχνική διευκολύνουν επίσης μια ομοιογενή κατανομή της θερμοκρασίας, η οποία συνεισφέρει στις υψηλότερες αποδόσεις και στην ευνοϊκή μεταφορά θερμότητας και μάζας από το δείγμα στον διαλύτη [17]. Αξίζει να σημειωθεί ότι παραλαμβάνονται καλύτερης ποιότητας προϊόντα και με χαμηλότερο κόστος, καθώς η ταχύτητα της διαλυτοποίησης εντός των φυτικών κυττάρων και των φυτικών ιστών είναι πολύ υψηλότερη, οπότε μειώνεται σημαντικά ο χρόνος επεξεργασίας και ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος αποσύνθεσης και οξείδωσης των πολύτιμων φυτικών συστατικών.

B1.2.3. Εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό

Η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό είναι μια ακόμη πράσινη τεχνική εκχύλισης για την εξαγωγή φυσικών προϊόντων, η οποία περιλαμβάνει τη χρήση διαλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλότερες από τα αντίστοιχα κρίσιμα σημεία τους για τη διατήρησή τους σε υγρή κατάσταση. Η διαδικασία αυτή εκμεταλλεύεται, την αυξημένη διαλυτότητα και ρυθμό μεταφορά μάζας μεταξύ του δείγματος και του διαλύτη, που επιτυγχάνονται σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις [20]. Αρχικά πραγματοποιείται διαβροχή του δείγματος από τον διαλύτη και διατήρηση στην επιθυμητή θερμοκρασία έως ότου επιτευχθεί η απαιτούμενη πίεση οπότε και ξεκινά η διαδικασία εκχύλισης. Η επιθυμητή ένωση εκροφάται από το δείγμα και απορροφάται από τον διαλύτη εκχύλισης. Η θερμοκρασία είναι η βασική παράμετρος της εκχύλισης με πεπιεσμένο υγρό και χρησιμοποιείται για την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του διαλύτη [21].

Υπάρχουν δύο τύποι διατάξεων που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό: η στατική και η δυναμική, καθώς και συνδυασμός των δύο. Το δυναμικό σύστημα περιλαμβάνει μια συνεχή άντληση μέρους του διαλύτη, με ρυθμό περίπου 0.5-2.5 mL min⁻¹, ενώ στη στατική μέθοδο ο εκχυλισμένος διαλύτης συλλέγεται κάθε 5-10 λεπτά [22]. Η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό επιμολυντικών ουσιών σε πολύπλοκες μήτρες, όπως τα τρόφιμα ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον εντοπισμό επίμονων οργανικών ρύπων [23].

Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μικρούς χρόνους εκχύλισης και μικρή κατανάλωση οργανικού διαλύτη σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, αλλά ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στην περίπτωση όπου εφαρμόζονται υψηλές θερμοκρασίες, καθώς υπάρχει κίνδυνος καταστροφής των θερμοευαίσθητων συστατικών.

B1.2.4. Ενζυμικά υποβοηθούμενη εκχύλιση

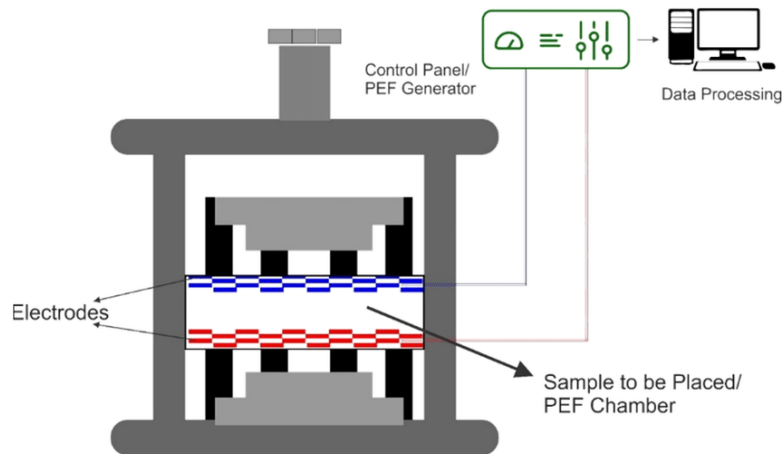
Η παρουσία πολυσακχαριτών κυτταρίνης, ημικυτταρίνης και λιγνίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κυτταρικό τοίχωμα, καθιστά δύσκολη την εφαρμογή των κλασσικών τεχνικών εκχύλισης με χρήση διαλυτών (μειωμένη απόδοση) γι' αυτό απαιτείται η χρήση μιας πιο εξειδικευμένης μεθόδου εκχύλισης όπως αυτή της ενζυμικά υποβοηθούμενης εκχύλισης [24]. Η εκχύλιση με τη βοήθεια ενζύμων που εμπλέκονται στην πέψη του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η κυτταρινάση, η πηκτινάση και η α-αμυλάση είναι χρήσιμη για την εκχύλιση φυτοχημικών ουσιών που σχετίζονται με αυτό [25]. Η μέθοδος αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα καθώς θεωρείται φιλική προς το περιβάλλον, απαιτεί χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας και εξοπλισμού σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, μειωμένη χρήση τοξικών διαλυτών και αποτελεσματική εκχύλιση των θερμικά ευαίσθητων και πτητικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως αρώματα, πρόσθετα γεύσης, χρωστικές ουσίες κ.λπ. [24].

Ωστόσο, τα ένζυμα έχουν μεγάλο κόστος για να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση μεγάλων ποσοτήτων ουσιών και τα παρασκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά δεν είναι ικανά να υδρολύσουν πλήρως το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Μεγάλη πρόκληση αποτελεί ο σχεδιασμός αποτελεσματικών τρόπων για την εφαρμογή τέτοιων διεργασιών σε βιομηχανική κλίμακα, καθώς τα ένζυμα συμπεριφέρονται διαφορετικά σε αντιδραστήρες μεγάλου όγκου [26].

B1.2.5. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Αυτή η τεχνική εκχύλισης λειτουργεί με βάση την αρχή της ηλεκτροπόρωσης (**Εικόνα Β6**). Αυτό συμβαίνει όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε παλμούς ηλεκτρικού πεδίου υψηλής έντασης που «φορτίζουν» την μεμβράνη των κυττάρων, δημιουργώντας τελικά πόρους λόγω αύξησης των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των συστατικών της μεμβράνης, συνήθως αφού το διαμεμβρανικό δυναμικό υπερβεί την τιμή του 1 V [27]. Τελικά η

επεξεργασία με την μέθοδο παλμικών ηλεκτρικών πεδίων προκαλεί απώλεια της λειτουργίας φραγμού των κυττάρων, διαρροή ενδοκυτταρικού περιεχομένου και απώλεια ζωτικότητας. Ο συνήθης εξοπλισμός αποτελείται από μια γεννήτρια υψηλής τάσης, ένα ψηφιακό παλμογράφο (για την παρακολούθηση της τάσης, του ρεύματος, της συχνότητας κ.λπ.) και έναν θάλαμο επεξεργασίας, όπου τοποθετείται το δείγμα [28].



Εικόνα Β6. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία [29].

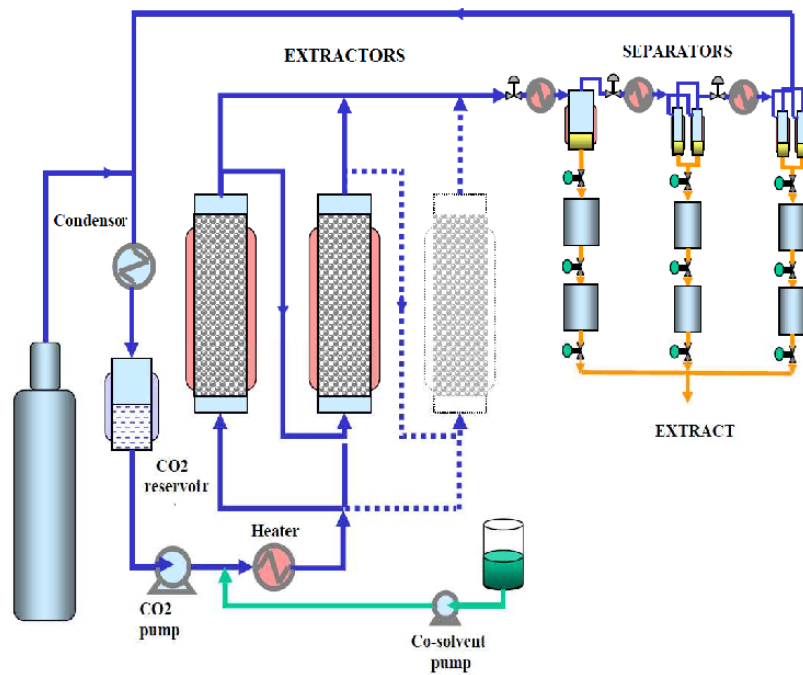
Η μέθοδος αυτή αποτελεί εναλλακτική λύση σε σχέση με άλλες τεχνικές, επειδή αυξάνει σε σημαντικό ποσοστό τη διαπερατότητα (και συνεπώς το ποσοστό εκχύλισης) χωρίς να δημιουργούνται κυτταρικά υπολείμματα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η καθαρότητα του προϊόντος [30]. Εκτός από την επεκτασιμότητα και την εκλεκτικότητά της, η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για την εκχύλιση ενώσεων από υγρή βιομάζα, καθώς εξαλείφει την ανάγκη ξήρανσης [31]. Η εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία επιτρέπει την έκθεση σε ηλεκτρικούς παλμούς χωρίς δραστική αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που αποτρέπει την διάσπαση των θερμικά ασταθών ενώσεων [32]. Ωστόσο, οι παράμετροι της διεργασίας, όπως η ένταση του πεδίου και ο αριθμός των παλμών εξαρτώνται κυρίως από τη σύνθεση του μέσου και της τάσης του να παράγει δυναμικό σε απόκριση στους παλμούς ηλεκτρικού πεδίου. Το υψηλό κόστος του εξοπλισμού περιορίζει την εκτεταμένη χρήση αυτής της τεχνολογίας.

B1.2.6. Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό είναι μια εξαιρετικά εξειδικευμένη μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικές, χημικές και βιομηχανίες τροφίμων, για την εξαγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών, πρόσθετων τροφίμων και αρωματικών ενώσεων, με τη χρήση του CO₂ ως κύριο διαλύτη. Η εκχύλιση εφαρμόζεται συνήθως σε μια στερεά πρώτη ύλη, αλλά μπορεί επίσης να προέρχεται και από υγρά. Οι θερμοευαίσθητες βιοδραστικές ενώσεις υφίστανται ελάχιστη αλλοίωση λόγω της χαμηλής κρίσιμης θερμοκρασία του CO₂ [33].

Οι βασικές συνθήκες του υπερκρίσιμου ρευστού όπως η θερμοκρασία και η πίεση μπορούν να μεταβάλουν σημαντικά την εκλεκτικότητα καθώς και τη διαλυτότητα [34]. Το υπερκρίσιμο CO₂ είναι ο πιο κοινός διαλύτης που χρησιμοποιείται για υπερκρίσιμη εκχύλιση, καθώς υπάρχει ως αέριο σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να διαχωριστεί εύκολα από το μείγμα εκχύλισης. Επιπλέον, έχει μέτρια κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση [35]. Ωστόσο, η χαμηλή πολικότητα του CO₂ το καθιστά ανεπιθύμητο για την εξαγωγή πολικών ενώσεων. Για να ξεπεραστεί αυτή η πρόκληση, NO₂ χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση για την εκχύλιση πολικών ενώσεων [36].

Μια διάταξη εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό περιλαμβάνει έναν συμπυκνωτή, ένα δοχείο εκχύλισης και διαχωριστές. Η πρώτη ύλη τοποθετείται δοχείο εκχύλισης, όπου ρυθμίζονται οι κατάλληλες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Με την άσκηση πίεσης από το ρευστό μέσω μιας αντλίας, το ρευστό και τα διαλυμένα συστατικά μεταφέρονται στους διαχωριστήρες, όπου συλλέγονται από το κάτω μέρος αυτών, ενώ το ρευστό ανακυκλοφορεί στο συμπυκνωτή ή απελευθερώνεται στο περιβάλλον (**Εικόνα Β7**) [37]. Μετά από έναν πλήρη γύρο, η νέα εκχύλιση ξεκινάει ανακυκλώνοντας το CO₂.



Εικόνα Β7. Εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα [38].

Η εκχύλιση με χρήση υπερκρίσιμου ρευστού έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους μεταξύ των οποίων είναι η επιλεκτικότητα, η ταχύτητα, η μειωμένη επιμόλυνση των προϊόντων και η ελάχιστη περιβαλλοντολογική επιβάρυνση. Το μεγάλο κόστος αποτελεί το σημαντικότερο μειονέκτημα της υπερκρίσιμης εκχύλισης [37].

B2. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Majekodunmi SO (2015) Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. *Merit Res J Med Sci* 3(11):521–527
- [2] Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018;13(1):20.
- [3] Talekar S, Patti AF, Singh R, Vijayraghavan R, Arora A. From waste to wealth: High recovery of nutraceuticals from pomegranate seed waste using a green extraction process. *Industrial Crops and Products*. 2018;112:790-802.
- [4] Raynie DE (2019) Looking at the past to understand the future: Soxhlet extraction. *LC GC N Am* 37(8):510–513.
- [5] Weggler BA, Gruber B, Teehan P, Jaramillo R, Dorman FL. Chapter 5 - Inlets and sampling. In: Snow NH, editor. *Separation Science and Technology*. 12: Academic Press; 2020. p. 141-203.
- [6] Mussatto SI. Chapter 11 - Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin. In: Preedy VR, editor. *Coffee in Health and Disease Prevention*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 93-106.
- [7] Wianowska D, Wiśniewski M. Simplified Procedure of Silymarin Extraction from *Silybum marianum* L. Gaertner. *Journal of Chromatographic Science*. 2014;53(2):366-72.
- [8] Hmidani A, Bouhlali EdT, Khouya T, Ramchoun M, Filali-zegzouti Y, Benlyas M, et al. Effect of extraction methods on antioxidant and anticoagulant activities of *Thymus atlanticus* aerial part. *Scientific African*. 2019;5:e00143.
- [9] Wang Y, Guo Q-L, Li R-F, Xu C-B, Zhu C-G, Shi J-G. Two folate-derived analogues from an aqueous decoction of *Uncaria rhynchophylla*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2019;17(12):928-34.
- [10] Perera PRD, Ekanayake S, Ranaweera KKDS. Antidiabetic Compounds in *Syzygium cumini* Decoction and Ready to Serve Herbal Drink. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;2017:1083589.
- [11] González M, Barrios S, Budelli E, Pérez N, Lema P, Heinzen H. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds in fresh and freeze-dried *Vitis vinifera* cv Tannat grape pomace. *Food and Bioproducts Processing*. 2020;124:378-86.

- [12] Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier A-S, Dangles O, Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 2010;119(2):851-8.
- [13] Patra A, Abdullah S, Pradhan RC. Application of artificial neural network-genetic algorithm and response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cashew apple bagasse. *Journal of Food Process Engineering*. 2021;44(10):e13828.
- [14] Roohinejad S, Nikmaram N, Brahim M, Koubaa M, Khelifa A, Greiner R. Chapter 16 - Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. In: Dominguez González H, González Muñoz MJ, editors. *Water Extraction of Bioactive Compounds*: Elsevier; 2017. p. 399-419.
- [15] Rehman MU, Abdullah, Khan F, Niaz K. Chapter 1 - Introduction to natural products analysis. In: Sanches Silva A, Nabavi SF, Saeedi M, Nabavi SM, editors. *Recent Advances in Natural Products Analysis*: Elsevier; 2020. p. 3-15.
- [16] Zghaibi N, Omar R, Mustapa Kamal SM, Awang Biak DR, Harun R. Microwave-Assisted Brine Extraction for Enhancement of the Quantity and Quality of Lipid Production from Microalgae *Nannochloropsis* sp. *Molecules*. 2019;24(19):3581.
- [17] Pinzon IAP, Razal RA, Mendoza RC, Carpio RB, Eusebio RCP. Parametric study on microwave-assisted extraction of runo (*Miscanthus sinensis* Andersson) dye and its application to paper and cotton fabric. *Biotechnology Reports*. 2020;28:e00556.
- [18] Kusuma HS, Mahfud M. Preliminary study: kinetics of oil extraction from sandalwood by microwave-assisted hydrodistillation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2016;128:012009.
- [19] Milani G, Curci F, Cavalluzzi MM, Crupi P, Pisano I, Lentini G, et al. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Bamboo Shoots of *Phyllostachys pubescens*. *Molecules*. 2020;25(1):215.
- [20] Zakaria SM, Mustapa Kamal SM, Harun MR, Omar R, Siajam SI. Extraction of phenolic compounds from *Chlorella* sp. microalgae using pressurized hot water: kinetics study. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022;12(6):2081-9.
- [21] Anticono M, Blesa J, Frigola A, Esteve MJ. High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods. *Foods*. 2020;9(6):811.

- [22] Vazquez-Roig P, Picó Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;71:55-64.
- [23] Ridgway K (2012) Sample preparation for food contaminant analysis. *LC GC Eur* 25(2):1–8.
- [24] Nadar SS, Rao P, Rathod VK. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*. 2018;108:309-30.
- [25] Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013;117(4):426-36.
- [26] Franco D, Munekata PES, Agregán R, Bermúdez R, López-Pedrouso M, Pateiro M, et al. Application of Pulsed Electric Fields for Obtaining Antioxidant Extracts from Fish Residues. *Antioxidants*. 2020;9(2):90.
- [27] Gorte O, Nazarova N, Papachristou I, Wüstner R, Leber K, Sylдатk C, Ochsenreither K, Frey W, Silve A. Pulsed Electric Field Treatment Promotes Lipid Extraction on Fresh Oleaginous Yeast *Saitozyma podzolica* DSM 27192. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Sep 11;8:575379.
- [28] Bozinou E, Karageorgou I, Batra G, G. Dourtoglou V, I. Lalas S. Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of *Moringa oleifera* Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques. *Beverages*. 2019;5(1):8.
- [29] Ranjha MMAN, Kanwal R, Shafique B, Arshad RN, Irfan S, Kieliszek M, et al. A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents. *Molecules*. 2021;26(16):4893.
- [30] Martínez JM, Delso C, Álvarez I, Raso J. Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020;19(2):530-52.
- [31] Carullo D, Pataro G, Donsì F, Ferrari G. Pulsed Electric Fields-Assisted Extraction of Valuable Compounds From *Arthrospira Platensis*: Effect of Pulse Polarity and Mild Heating. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Sep 4;8:551272.
- [32] Kokkali M, Martí-Quijal FJ, Taroncher M, Ruiz M-J, Kousoulaki K, Barba FJ. Improved Extraction Efficiency of Antioxidant Bioactive Compounds from *Tetraselmis*

chuii and *Phaedoactylum tricornutum* Using Pulsed Electric Fields. *Molecules*. 2020;25(17):3921.

[33] Uwineza PA, Waśkiewicz A. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules*. 2020;25(17):3847.

[34] Villanueva-Bermejo D, Calvo MV, Castro-Gómez P, Fornari T, Fontecha J. Production of omega 3-rich oils from underutilized chia seeds. Comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods. *Food Research International*. 2019;115:400-7.

[35] Al Jitan S, Alkhoori SA, Yousef LF. Chapter 13 - Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. In: Atta ur R, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. 58: Elsevier; 2018. p. 389-417.

[36] Capuzzo A, Maffei ME, Occhipinti A. Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules*. 2013;18(6):7194-238.

[37] Baysal T, Ersus S, Starmans DAJ. Supercritical CO₂ Extraction of β-Carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(11):5507-11.

[38] Srinivas D. Process Parameters Affecting the Supercritical Fluid Extraction- A Review. *International Journal of Agricultural Science and Research*. 2017;7:617-24.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Γ1. Οργανολογικά χαρακτηριστικά της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

Ανάμεσα στις πολυάριθμες προσπάθειες που έλαβαν χώρα προς την κατεύθυνση αυτή με εφαρμογή μεγάλων ταχυτήτων ροής, αξίζει να αναφέρουμε την εισαγωγή πηγής ιοντοψεκασμού με παρεμβολή μιας μεταλλικής γειωμένης πλάκας μεταξύ του τριχοειδούς ηλεκτροψεκασμού και του τριχοειδούς δειγματοληψίας, η οποία παρείχε προστασία έναντι των σταγονιδίων που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία ιοντισμού. Ένα ακόμα μεγάλο επίτευγμα που είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στο σήμα υποβάθρου, ήταν η εισαγωγή αέριου αζώτου έναντι του αέρα με ομοαξονική φορά με αυτή του διαλύματος προς ιοντισμό. Τέλος, είχαμε και την εισαγωγή του νανοψεκασμού όπου τα σχηματιζόμενα σταγονίδια έχουν διάμετρο της τάξης των nm αντί για μm , με χρήση εξαιρετικά μικρών ταχυτήτων ροής (nL min^{-1}).

- ❖ **Τριχοειδές.** Η τοποθέτηση του τριχοειδούς σε θέση παράλληλα μετατοπισμένη με την οπή εισόδου των ιόντων (off-axis position), έναντι της τοποθέτησης του σε προέκταση της θέσης αυτής (on-axis position), είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη σταθερότερου σήματος και την επίτευξη της μη μεταφοράς σταγονιδίων προς τον αναλυτή μαζών. Η πιθανότητα μεταφοράς σταγονιδίων προς το φασματόμετρο μειώνεται και με την τοποθέτηση του τριχοειδούς σε θέση διαγώνια προς την οπή εισόδου του δείγματος, μια τακτική που συναντάται ευρέως στα σύγχρονα όργανα μάζας [1,2].
- ❖ **Διαφορά δυναμικού.** Η πορεία των φορτισμένων σωματιδίων προς τον αναλυτή μαζών πραγματοποιείται διαμέσου μιας σειράς διαχωριστών ελαττωμένου δυναμικού, με την πλάκα προστασίας του αναλυτή μαζών να λειτουργεί ως αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Η εφαρμογή υψηλού δυναμικού στο τριχοειδές και γείωση του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου ή αντίστροφα ή εφαρμογή τάσης και στα δύο ώστε να επιτευχθεί διαφορά δυναμικού 2-5 kV, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρικού πεδίου. Πειραματικές παράμετροι όπως η κατάσταση φορτίου του αναλύτη, η ταχύτητα ροής του διαλύματος, η σύσταση του διαλύτη και η

απόσταση μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου μπορούν να επηρεάσουν την βέλτιστη διαφορά δυναμικού [2,3].

- ❖ **Αέριο εκνέφωσης (Nebulizer gas).** Όταν εφαρμόζονται ταχύτητες ροής μεγαλύτερες των 0.2 mL min^{-1} η χρήση αερίου εκνέφωσης συνεισφέρει στην σταθεροποίηση του ηλεκτροψεκασμού. Το αέριο εκνέφωσης διατηρεί τα σταγονίδια σε μια στενότερη δέσμη και τα κατευθύνει προς τον κώνο δειγματοληψίας, ενώ η χρήση του μειώνει την πιθανότητα εκφορτίσεων αφού δύναται να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου. Η χρήση αερίου αζώτου με ροή ομοαξονική με το διάλυμα στο τριχοειδές είναι ευρέως διαδεδομένη, με την τεχνική αυτή να είναι γνωστή ως ιοντοψεκασμός [4,5].
- ❖ **Μορφολογία αερολύματος.** Παράμετροι όπως είναι το δυναμικό του τριχοειδούς, η ταχύτητα ροής του υγρού, η διάμετρος του τριχοειδούς και η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη είναι ιδιαίτερα κρίσιμοι αφού επιδρούν στον τρόπο ψεκασμού. Ο αποτελεσματικός ιοντισμός του αναλύτη καθορίζεται από το μέγεθος των σταγονιδίων, με τα μικρά σταγονίδια τα οποία περιέχουν λιγότερο διαλύτη οδηγούν σε αποτελεσματικότερη αποδιαλύτωση και ιοντισμό. Παράλληλα, παρατηρείται μειωμένος θόρυβος υποβάθρου αφού η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών είναι επίσης μικρή, ενώ στα μικρά σταγονίδια οι μη επιφανειοδραστικοί αναλύτες έχουν περισσότερες πιθανότητες να μεταφερθούν στην αέριο φάση εξασφαλίζοντας έτσι το βέλτιστο σήμα [3].

Γ2. Παράμετροι που επηρεάζουν την λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού

- ❖ **Ταχύτητα ροής.** Μια γενική παραδοχή είναι ότι η αποτελεσματικότητα του ιοντισμού μειώνεται με την αύξηση της ταχύτητας ροής, γεγονός που έχει αρνητική επίδραση στην ευαισθησία της τεχνικής. Η χρήση ενός διαμοιραστή ροής που ρυθμίζει και επιτρέπει την είσοδο ενός μόνο μέρους της συνολικής ροής, έχοντας παράλληλα το πλεονέκτημα της μείωσης της επιμόλυνσης από μη πτητικά συστατικά, θα μπορούσε να προσφέρει λύση στο πρόβλημα αυτό. Μια εναλλακτική πρακτική είναι η εφαρμογή περιφερειακού ψεκασμού από το σημείο εισόδου των

ιόντων προς την περιοχή του κενού, όπου ουσιαστικά πραγματοποιείται πρόσκρουση των μεγάλων σταγονιδίων στα τοιχώματα της πλάκας προστασίας. Η τοποθέτηση του ψεκαστή ορθογωνικά ως προς τον κώνο δειγματοληψίας θα μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο επιμολύνσεων [1,2,4].

- ❖ **Ηλεκτρικές εκφορτίσεις.** Η μορφή του φάσματος μαζών επηρεάζεται δραστικά από τις ηλεκτρικές εκφορτίσεις οι οποίες προκαλούν ασταθές σήμα, υψηλό θόρυβο υποβάθρου και αυξημένη θραυσματοποίηση. Η εκφόρτιση μπορεί να αντιμετωπιστεί με εφαρμογή ροής γύρω από το τριχοειδές ενός αερίου όπως το οξυγόνο ή το SF₆ ή με προσθήκη ενός αλογονωμένου διαλύτη και να περιοριστεί με την μείωση του ηλεκτρικού πεδίου [1,2].
- ❖ **Σχηματισμός συσσωματωμάτων.** Είναι γνωστό ότι το μίγμα αερίων και ιόντων στην περιοχή του κενού, κατά την διαστολή του ψύχεται ταχέως, με αποτέλεσμα να παρατηρείται συμπύκνωση ουδέτερων πολικών μορίων, όπως το νερό και οι ατμοί του διαλύτη, με ιόντα του αναλύτη προς σχηματισμό συσσωματωμένων ιόντων. Προς αποφυγή της δημιουργίας των συσσωματωμένων αυτών ιόντων τα οποία έχουν μάζα αρκετά μεγαλύτερη από το εύρος των περισσοτέρων αναλυτών μάζας, θα πρέπει να παρεμποδίζεται η είσοδος των συμπυκνωμένων ουδέτερων μορίων. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με την αντίθετη δράση ενός ηλεκτρικού πεδίου και τη ροή ενός αερίου προστασίας, όπως είναι το άζωτο, το οποίο απαντάται ως ξηρό αέριο και δεδομένου ότι δεν έχει την ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με τα ιόντα του αναλύτη, δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός συσσωματωμάτων παρόλη την ισχυρή ψύξη κατά τη διαστολή. Μέρος της ροής του αερίου αζώτου κατευθύνεται στην πηγή απομακρύνοντας τα ουδέτερα μόρια, ενώ το άλλο μέρος κινείται αντίθετα και μεταφέρει τα ιόντα προς την περιοχή του κενού. Η χρήση αερίου προστασίας έχει πολλαπλά οφέλη καθώς μειώνεται ο κίνδυνος μόλυνσης και η απόφραξη της οπής εισαγωγής των ιόντων προς την περιοχή του κενού. Επιπλέον, ακόμα και εάν η πηγή θερμαίνεται, αποφεύγεται η συσσωμάτωση, καθώς η θερμοκρασία των αερίων και των ιόντων εξακολουθεί να παραμένει αρκετά υψηλή, ακόμα και μετά την ψύξη λόγω διαστολής [2,4].
- ❖ **pH.** Το φορτίο που φέρει ο αναλύτης (θετικό ή αρνητικό) μπορεί να μεταβληθεί μέσω πρωτονίωσης ή αποπρωτονίωσης με μεταβολή της τιμής pH του διαλύματος

αφού αλλάζει η ισορροπία οξέος-βάσης των αναλυτών. Επιπροσθέτως, προκαλείται αλλαγή στην τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνικών μορίων (μετουσίωση), όπως διαπιστώθηκε από την αύξηση των φορτισμένων κέντρων [2].

❖ **Διαλύτης.** Τα χαρακτηριστικά του ψεκασμού καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες του διαλύτη ο οποίος ασκεί διάφορες επιδράσεις, όπως για παράδειγμα διαφοροποιήσεις που αφορούν στο δυναμικό για το σχηματισμό του κώνου Taylor οι οποίες εξαρτώνται από την επιφανειακή τάση, στο ρεύμα που φέρει το αερόλυμα, στην ειδική αγωγιμότητα και στο μέγεθος των σταγονιδίων από το ιξώδες. Η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη είναι υψίστης σημασίας στον καθορισμό της κατανομής των φορτισμένων κέντρων για αναλύτες που διαθέτουν μόνιμα φορτισμένα κέντρα. Πιο συγκεκριμένα, διαλύτες με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά μπορούν να σταθεροποιήσουν καλύτερα τα σωματίδια με περισσότερα φορτία ευνοώντας έτσι το σχηματισμό πολλαπλώς φορτισμένων αερίων ιόντων, δεδομένου ότι έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν τις κατανομές φορτίου προς μεγαλύτερες τιμές. Επιπροσθέτως, η πολικότητα του διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς παρέχει σταθερότητα στο διαχωρισμό των φορτίων στο διάλυμα, διευκολύνοντας έτσι την ηλεκτροφορητική διαδικασία για το σχηματισμό των φορτισμένων σταγονιδίων στην έξοδο του τριχοειδούς. Τέλος, ο σχηματισμός σταγονιδίων που φέρουν περίσσεια είτε θετικού είτε αρνητικού φορτίου ευνοείται από την απομάκρυνση των αντισταθμιστικών ιόντων από τους φορτισμένους αναλύτες και έχει ως με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλαπλώς φορτισμένων αερίων ιόντων[2,4,6,7].

❖ **Συγκέντρωση αναλύτη.** Δύο διακριτές περιοχές αποτυπώνουν την σχέση μεταξύ της έντασης του σήματος και της συγκέντρωσης του αναλύτη: (i) η γραμμική περιοχή όπου περιλαμβάνει ένα εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ανίχνευσης μέχρι περίπου την τιμή 10^{-5} M και η ένταση του σήματος αυξάνει γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης και (ii) η μη γραμμική περιοχή η οποία αναφέρεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με την ένταση του σήματος να παραμένει σταθερή έως ότου τελικά μειωθεί με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης. Η παρατηρούμενη μείωση του σήματος αυξανόμενης της συγκέντρωσης του αναλύτη αποδίδεται στην

αύξηση του ανταγωνισμού για τον αριθμό των διαθέσιμων φορτίων στα σταγονίδια (κατάσταση κορεσμού) [2].

- ❖ **Γεωμετρία οργάνου.** Το φάσμα μαζών που θα προκύψει επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από την γεωμετρία του οργάνου, η οποία θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να εισέρχεται στο φασματόμετρο μαζών όσο το δυνατόν μικρότερο ποσοστό του διαλύτη. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ξηρού αερίου αντίθετης ροής οδηγεί σε μεγαλύτερο ποσοστό πρωτονίωσης σε σχέση με την χρήση θερμαινόμενου τριχοειδούς χωρίς ξηρό αέριο. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ποιότητα του αερολύματος που εισέρχεται στο φασματόμετρο μαζών επηρεάζεται σημαντικά από την απόσταση και τη γωνία τοποθέτησης του τριχοειδούς από την οπή δειγματοληψίας, παράμετροι που θα πρέπει να εξετάζονται [1,2].

Γ3. Αναλυτές μαζών

Γ3.1. Αναλυτής μαγνητικής εκτροπής απλής εστίασης

Ο αναλυτής απλής εστίασης περιλαμβάνει συνήθως έναν ηλεκτρομαγνήτη ο οποίος προσδίδει στα ιόντα κυκλική τροχιά 90 μοιρών, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Γ1**. Στη διάταξη αυτή τα ιόντα εισέρχονται μέσω μιας οπής A επιταχύνονται έως μια οπή B και στη συνέχεια εισέρχονται στον αναλυτή. Η αλλαγή του δυναμικού επιτάχυνσης μεταξύ των οπών και η σάρωση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου προκαλεί τη κίνηση ιόντων διαφορετικών m/z μέχρι την οπή εξόδου.

Η κινητική ενέργεια ενός ιόντος δίνεται από την **Εξίσωση Γ1**:

$$KE_{\text{ion}} = zeV = \frac{1}{2} mU^2 \quad (\text{Γ1})$$

όπου: V το δυναμικό επιτάχυνσης,

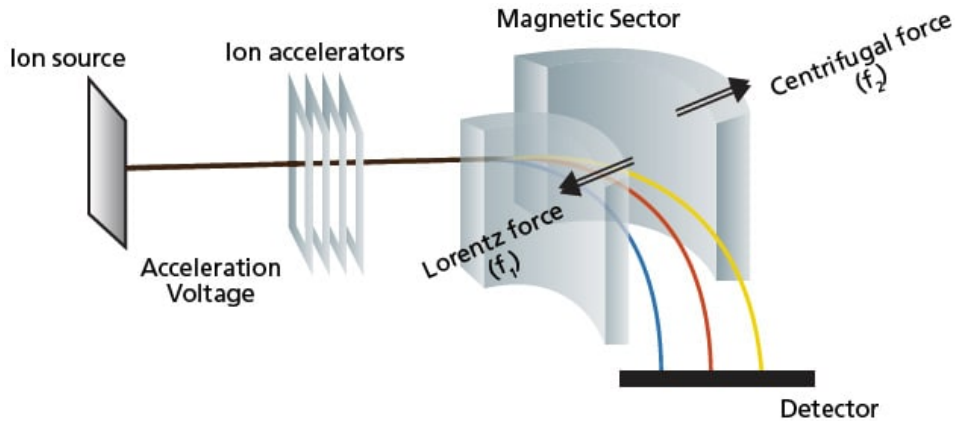
U η ταχύτητα,

e το στοιχειώδες φορτίο του ιόντος ($1.6 \cdot 10^{-19}$ C)

.....z το φορτίο του ιόντος

Τα ελαφρύτερα ιόντα κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα από τα βαρύτερα μέσα στον αναλυτή θεωρώντας ως δεδομένο ότι ιόντα με ίσο φορτίο και ανεξαρτήτως της μάζας

τους, λαμβάνουν την ίδια κινητική ενέργεια κατά την επιτάχυνση τους. Τα ιόντα, διερχόμενα από τον αναλυτή, δέχονται δύο δυνάμεις: του μαγνητικού πεδίου (FM) και την κεντρομόλο δύναμη (FC).



Εικόνα Γ1. Σχηματική απεικόνιση αναλυτή μαγνητικής εκτροπής απλής εστίασης [8].

Για να διέρχεται ένα ιόν μέσω του αναλυτή, η **Εξίσωση Γ2** πρέπει να ισχύει:

$$F_C = F_M \Leftrightarrow \frac{mU^2}{r} = BzeV \quad (\Gamma 2)$$

όπου: r η ακτίνα του τομέα και,
 B η μαγνητική επαγωγή.

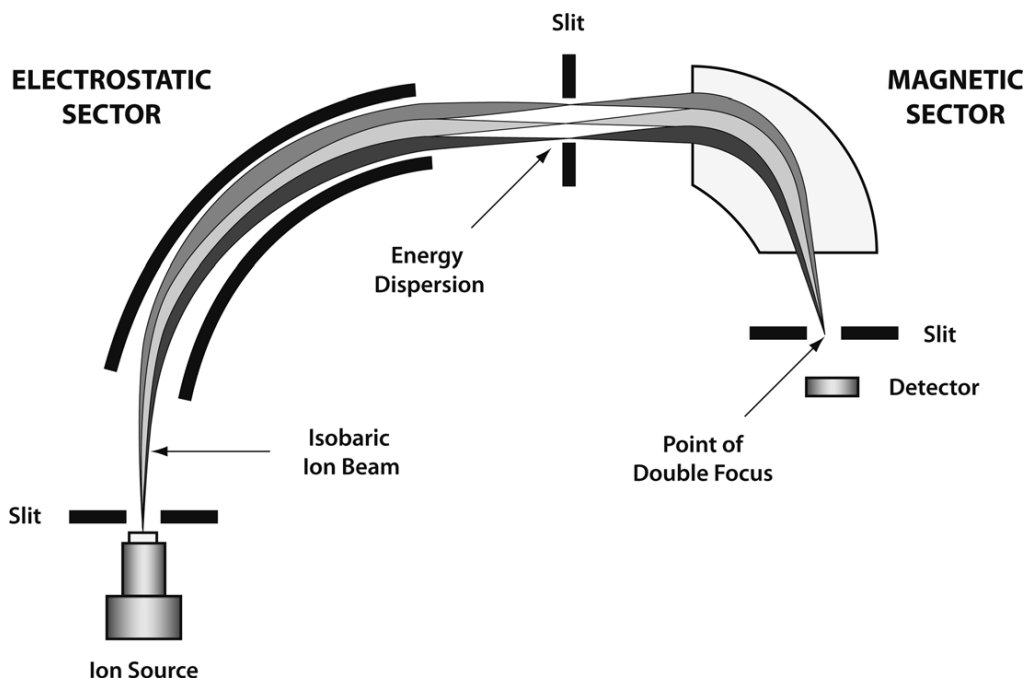
Από την **Εξίσωση Γ1** και **Γ2**, προκύπτει η **Εξίσωση Γ3**:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2V} \quad (\Gamma 3)$$

Η τιμή m/z που επιτρέπει ο αναλυτής να περάσει ένα ιόν, όπως φαίνεται από την εξίσωση αυτή, μπορεί να καθοριστεί από τρεις παραμέτρους: B , r και V . και Μεταβάλλοντας την τιμή της μίας παραμέτρου και διατηρώντας παράλληλα τις δύο από αυτές σταθερές ο αναλυτής μπορεί να σαρώσει τα ιόντα ανάλογα με το m/z που φέρουν. Συνήθως η σάρωση γίνεται με μεταβολή της τιμής της μαγνητικής επαγωγής B , διατηρώντας σταθερό το r και το δυναμικό V [9].

Γ3.2. Αναλυτής μαγνητικής εκτροπής διπλής εστίασης

Οι αναλυτές διπλής εστίασης αποτελούν όργανο αναφοράς σε ορισμένες περιπτώσεις που απαιτείται υψηλή διαχωριστική ικανότητα ($R \geq 30.000$). Κατασκευάζονται με συνδυασμό ηλεκτροστατικών και μαγνητικών πεδίων όπως φαίνεται στην **Εικόνα Γ2** και θεωρούνται όργανα ιδιαίτερος ακριβιά και ογκώδη.



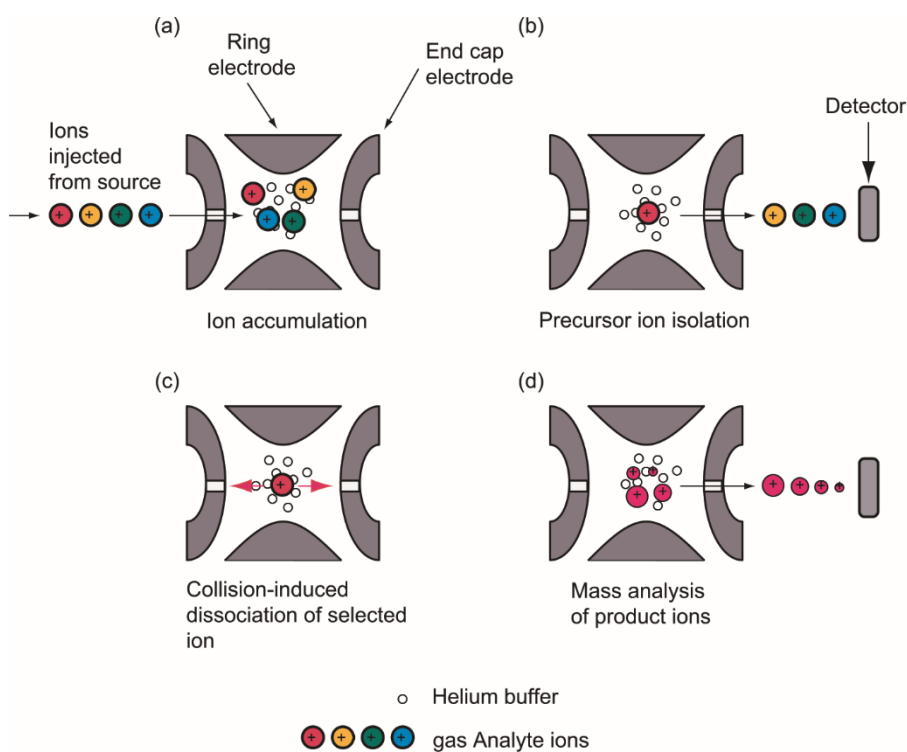
Εικόνα Γ2. Σχηματική απεικόνιση αναλυτή μαγνητικής εκτροπής διπλής εστίασης [10].

Η δέσμη ιόντων διαπερνά έναν ηλεκτροστατικό αναλυτή (ESA), ο οποίος βρίσκεται υπό συνεχές ηλεκτρικό δυναμικό και τα ιόντα εστιάζονται ανάλογα με την E_{kin} τους με ορισμένα μόνο ιόντα να περνούν και να φτάνουν στο μαγνητικό τομέα. Στο σημείο τομής των δύο επιπέδων του ηλεκτροστατικού και μαγνητικού πεδίου τοποθετείται η διάταξη συλλογής και ανίχνευσης των ιόντων. Στο σημείο αυτό θα εστιασθούν μόνο ιόντα ενός συγκεκριμένου m/z για οποιαδήποτε τιμή V και B [10].

Γ3.3. Παγίδα ιόντων (Ion trap, IT)

Η αρχή λειτουργίας της παγίδας ιόντων στηρίζεται στη δημιουργία ενός τρισδιάστατου πεδίου όπου τα προς ανάλυση ιόντα παγιδεύονται υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου τεσσάρων πόλων (δύο ημικυλινδρικά ηλεκτρόδια και δύο

ελάσματα). Τα εισερχόμενα ιόντα κυκλοφορούν στον τρισδιάστατο χώρο και εστιάζονται στο επίπεδο που ορίζεται από τον ανιχνευτή καθώς και το πλέγμα ιοντισμού. Από εδώ μπορεί να πραγματοποιηθεί πλήρης σάρωση των ιόντων που εξέρχονται από την παγίδα ή εναλλακτικά, μπορεί να επιλεγεί ένα συγκεκριμένο ιόν, να θραυσματοποιηθεί και να πραγματοποιηθεί σάρωση όλων των θυγατρικών ιόντων. Τα ιόντα, με εφαρμογή δυναμικού ραδιοσυχνότητας που αυξάνει γραμμικά, αποκτούν αυξανόμενη κινητική ενέργεια. Ενώ όλα τα ιόντα του ίδιου φορτίου λαμβάνουν την ίδια ενέργεια, ωστόσο ιόντα μικρού m/z επιταχύνονται περισσότερο σε σχέση με ιόντα μεγαλύτερου m/z , επομένως εξέρχονται από την παγίδα και οδηγούνται στον ανιχνευτή ενώ ακολουθούν και τα μεγαλύτερα ιόντα πάντα σε σχέση με τη μάζα τους, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Γ3**.



Εικόνα Γ3. Σχηματική απεικόνιση της επαγόμενης διάσπασης μέσω σύγκρουσης (CID) στον αναλυτή παγίδας ιόντων. **(a)** Τα ιόντα από την πηγή ιοντισμού συσσωρεύονται και παγιδεύονται στο χώρο στο κέντρο των ηλεκτροδίων. **(b)** Ιόντα με καθορισμένη τιμή m/z συγκρατούνται στην παγίδα και όλα τα άλλα εξέρχονται **(c)** Τα καθορισμένα ιόντα θραυσματοποιούνται στη συνέχεια με αξονική διέγερση μεταξύ των δύο ακραίων ελασμάτων. **(d)** Τα προκύπτοντα ιόντα προϊόντος εξέρχονται στη συνέχεια και κατευθύνονται προς τον ανιχνευτή [11].

Οι παγίδες ιόντων είναι μικρά σε μέγεθος όργανα που μπορούν να εφαρμοσθούν ικανοποιητικά για αναλύσεις μαζών έως 1.000 Dalton ενώ χαρακτηρίζονται από χαμηλή διαχωριστική ικανότητα (< 10.000). Ωστόσο συνδυάζονται με ανιχνευτές αέριας και υγρής χρωματογραφίας και χαρακτηρίζονται από μεγάλη αξιοπιστία και χαμηλό κόστος ενώ η δυνατότητα λειτουργίας για δίδυμη φασματομετρία μαζών βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στη βιοανάλυση πεπτιδίων-νουκλεοτιδίων [11].

Γ3.4. Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)

Στον αναλυτή χρόνου πτήσης, ο προσδιορισμός του λόγου m/z ενός ιόντος επιτυγχάνεται με μέτρηση του χρόνου της πτήσης του. Τα ιόντα σχηματίζονται σε ακροσωλήνα σε υψηλό δυναμικό τα οποία επιταχύνονται προς γειωμένο μεταλλικό πλέγμα και περνώντας από πλάκες εστίασης εισέρχονται σε ευθύγραμμο σωλήνα μήκους D ο οποίος είναι ελεύθερο πεδίου. Τα ιόντα προσλαμβάνουν την ίδια E_{kin} καθώς επιταχύνονται κάτω από το ίδιο δυναμικό. Η E_{kin} υπολογίζεται από την **Εξίσωση Γ4**:

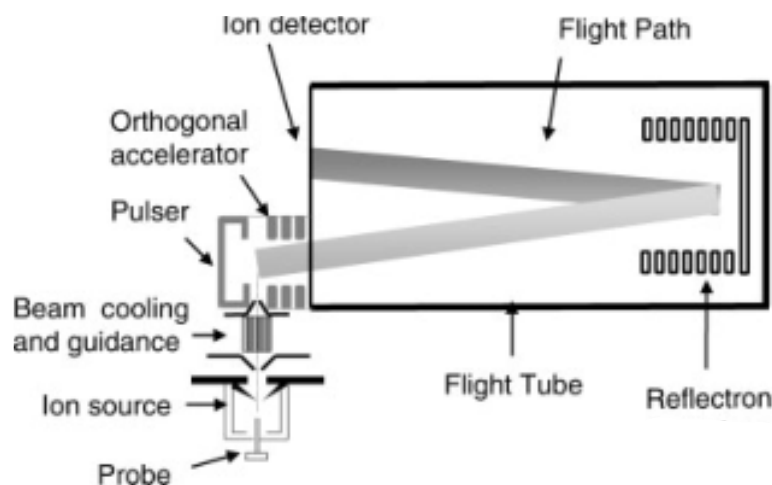
$$E_{kin} = \frac{1}{2} mU^2 \quad (\Gamma 4)$$

όπου: U , η ταχύτητα με την οποία τα ιόντα κινούνται στον ελεύθερο πεδίου σωλήνα.

Τα ιόντα κατά την κίνησή τους στο σωλήνα, κινούνται με διαφορετική ταχύτητα, συνέπεια του διαφορετικού m/z , διαχωρίζονται στο χώρο σε ομάδες και τελικά ανιχνεύονται στο τέλος της διαδρομής, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Γ4**. Ως χρόνος πτήσης ορίζεται η διαφορά του χρόνου από τη στιγμή του ιοντισμού έως την ανίχνευση ενός ιόντος, ο οποίος μετράται για τον προσδιορισμό του m/z από τις **Εξισώσεις Γ5** και **Γ6**:

$$t = \left(\frac{m}{2zE} \right)^{\frac{1}{2}} D \quad (\Gamma 5)$$

$$\frac{m}{z} = 2E \left(\frac{t}{D} \right)^2 \quad (\Gamma 6)$$



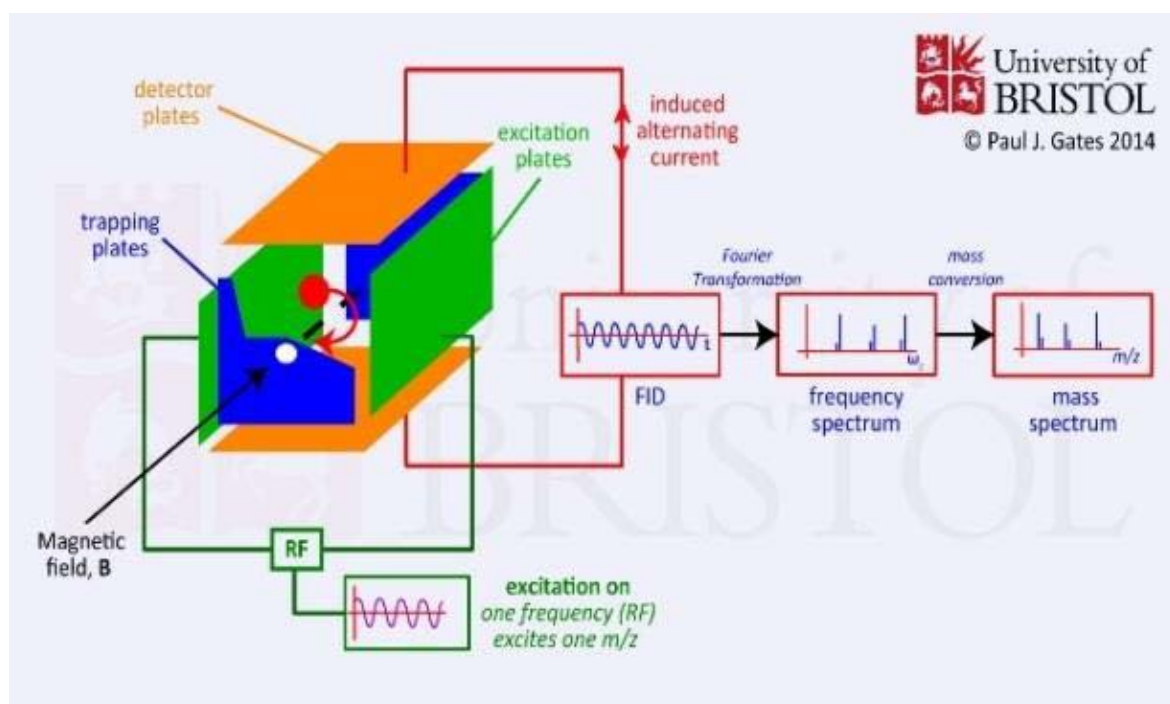
Εικόνα Γ4. Σχηματική απεικόνιση αναλυτή χρόνου πτήσης [12].

Αν και η διαχωριστική ικανότητα των TOF αναλυτών είναι σχετικά περιορισμένη, αυτή βελτιώνεται σημαντικά στα όργανα ανάκλασης, προσφέροντας τη δυνατότητα ανάλυσης ευπαθών μορίων και μεγαλομορίων (πεπτίδια, DNA, πολυσακχαρίτες, πολυμερή κλπ).

Γ3.5. Αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR)

Ο αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier είναι η τελευταία έκδοση του αναλυτή κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων (ICR). Πρόκειται για έναν ηλεκτρομαγνητικό αναλυτή στον οποίο εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο με τέτοια ένταση ώστε η ακτίνα της τροχιάς του ιόντος να γίνεται μικρότερη από τις εσωτερικές διαστάσεις του αναλυτή. Με αυτόν τον τρόπο τα ιόντα παγιδεύονται σε κυκλική τροχιά στο εσωτερικό του ICR και το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο τα εμποδίζει να εξέλθουν από την παγίδα. Η ένταση του σήματος κάθε συχνότητας είναι ανάλογη του αριθμού των ιόντων που έχουν τη συγκεκριμένη τιμή m/z .

Όταν εφαρμόζεται μια κατάλληλη ραδιοσυχνότητα, τα ιόντα που αντιστοιχούν στην εν λόγω ραδιοσυχνότητα διεγείρονται και ανιχνεύονται (Εικόνα Γ5). Μια άλλη μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η διέγερση όλων των ιόντων με μια γρήγορη σάρωση συχνότητας και το προκύπτον σύνθετο σήμα αναλύεται στις επιμέρους συχνότητες με μετασχηματισμό Fourier (FT).



Εικόνα Γ5. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας FT-ICR [13].

Η ανάλυση FT-ICR είναι μια τεχνική υψηλής ανάλυσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μαζών με μεγάλη ακρίβεια. Ο αναλυτής FT-ICR μπορεί να συνδυαστεί με MS και να επιτύχει υψηλότερα επίπεδα ανάλυσης από ό,τι άλλες μορφές φασματομέτρου μάζας, επειδή ένας υπεραγωγίσιμος μαγνήτης είναι πολύ πιο σταθερός από την τάση RF (ραδιοσυχνότητα). Χρησιμοποιείται επίσης για την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων, όπως βιομάζα ή προϊόντα υγροποίησης αποβλήτων. Επιπλέον, αυτή η τεχνική υψηλής ανάλυσης είναι χρήσιμη στη μελέτη μεγάλων μακρομορίων, όπως πρωτεΐνες με πολλαπλά φορτία, τα οποία μπορούν να παραχθούν με ιοντισμό με ESI. Ο αναλυτής FT-ICR-MS έχει ευρεία εφαρμογή σε άλλους κλάδους, όπως η πρωτεομική, η γονιδιωματική και η μεταβολομική.

Τα όργανα FT-ICR είναι εξαιρετικά ακριβά, αλλά το υψηλό τους κόστος αντισταθμίζεται από άλλα πλεονεκτήματα, όπως η απaráμιλλη διαχωριστική τους ικανότητα ($R > 10^6$) και η υψηλή ακρίβεια στους προσδιορισμούς ατομικής μάζας (< 1 ppm), η ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων, η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών ιόντων και η δυνατότητα συνδυασμού τους με αναλύσεις δίδυμης φασματομετρίας μάζας (MS/MS) [14].

Ορισμένα από τα μειονεκτήματά του περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος, την πολύπλοκη λειτουργία, την απαίτηση για ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις λόγω του μεγάλου μεγέθους, τη χαμηλή ταχύτητα σάρωσης (συνήθως 1 Hz) καθώς και την υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} - 10^{-10} Torr).

Γ4. Φασματομετρία μάζας φυσικών προϊόντων: παρελθόν, παρόν και μελλοντικές προοπτικές

Γ4.1. Φασματομετρία μάζας φυσικών προϊόντων

Η χρήση της φασματομετρίας μάζας ως ερευνητικού εργαλείου στον τομέα των φυσικών προϊόντων καθιερώθηκε από τον Djerassi [15-17] και άλλους [18] κυρίως σε μελέτες αλκαλοειδών και τερπενοειδών. Μέσω της τεχνικής του ιοντισμού ηλεκτρονίων (EI) σε συνδυασμό με αναλυτή μαγνητικής εκτροπής λαμβάνονται φάσματα μάζας χαμηλής ανάλυσης όπου προσδιορίζονται τα μοριακά βάρη των υπό μελέτη ενώσεων και από τα θραύσματα αυτά είναι δυνατή η συσχέτιση φασμάτων και δομής.

Το εύρος των πληροφοριών που μπορούν να εξαχθούν μέσω της συσχέτισης φάσματος-δομής έχει μελετηθεί συστηματικά με τη χρήση πρότυπων ενώσεων. Οι πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με EI-MS στις αρχές της δεκαετίας του 1960 αφορούσαν τον προσδιορισμό της δομής των αλκαλοειδών μέσω θραυσματοποίησης Diels-Alder [19], τη διερεύνηση των μοτίβων αντικατάστασης των τριτερπενίων [20] και την ταυτοποίηση φυτικών αλκαλοειδών από τα *Rhazya strictia* και *Aspidosperma quebracho-blanco* [21].

Σήμερα η φασματομετρία μάζας είναι ένα καθιερωμένο και απαραίτητο εργαλείο για την εύκολη και ταχεία ταυτοποίηση νέων ενώσεων στον τομέα των NPs, καθώς η μείωση των σταδίων προετοιμασίας του δείγματος επιτρέπει την εξοικονόμηση χρόνου και δείγματος και επομένως την ταχύτερη και αμεσότερη διαλογή NPs από βιολογικά δείγματα. Μεταξύ του μεγάλου πλήθους τεχνικών φασματομετρίας μάζας, οι τεχνικές MALDI και ESI

έχουν εφαρμοστεί ευρέως στα φυσικά προϊόντα τις τελευταίες δεκαετίες με μεγάλη επιτυχία και αποτελούν σήμερα τις πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές ιοντισμού.

Γ4.2. Υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματομετρία μάζας (HR-MS)

Η HR-MS επέτρεψε τη διαφοροποίηση μοριακών ιόντων με την ίδια τιμή λόγου m/z σε φάσματα χαμηλής ανάλυσης [22] και την εξαγωγή του μοριακού τύπου των υπό μελέτη ουσιών. Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν με μετρήσεις HR-MS σε αναλυτές μαγνητικής εκτροπής διπλής εστίασης (γεωμετρία Nier-Johnson) ή σε όργανα εστιακού επιπέδου (γεωμετρία Mattauch-Herzog) [23]. Η ταυτοποίηση των μοριακών τύπων επιτεύχθηκε με ταύτιση κορυφών [24] σε συνδυασμό με πρόσθετα δεδομένα, όπως θραυσματοποίηση, ισοτοπικά πρότυπα κ.λπ., προκειμένου να περιοριστεί ο αριθμός των πιθανών μοριακών τύπων. Μέσω αυτής της διαδικασίας, η βρουκίνη με μοριακό τύπο $C_{23}H_{26}N_2O_4$ ταυτοποιήθηκε επιτυχώς από το φλοιό του δέντρου *Strychnos henningsii* σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις με σφάλμα μικρότερο από 1 ppm; τα χαρακτηριστικά αυτής της μέτρησης όσον αφορά την ευαισθησία και την πιστότητα είναι συγκρίσιμα με τις πλέον σύγχρονες τεχνικές [25]. Στη συνέχεια, η δομή και ο μοριακός τύπος της βινβλαστίνης και της βινκριστίνης ενός πρώιμου χημειοθεραπευτικού παράγοντα από το φυτό *Vinca rosea* και εκατοντάδων άλλων φυσικών προϊόντων επιλύθηκαν εν μέρει με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας [26].

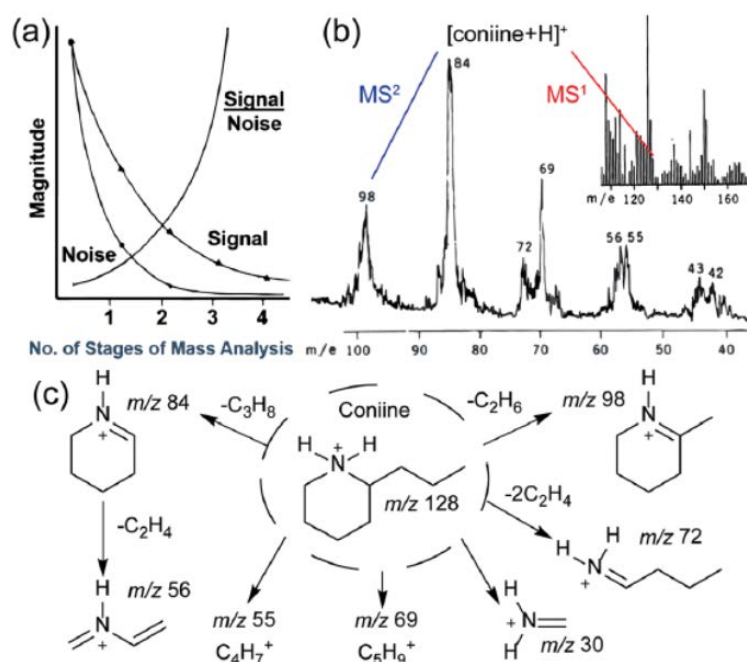
Σήμερα, η σύζευξη οργάνων HR-MS με την αέρια ή την υγρή χρωματογραφία [27-29] παρέχει πρόσθετο διαχωρισμό μορίων από ένα πολύπλοκο δείγμα, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο τον χρονοβόρο και κοστοβόρο καθαρισμό του. Η εισαγωγή της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UPLC) οδήγησε σε βελτίωση της χρωματογραφικής ευαισθησίας, του διαχωρισμού των κορυφών, της ταχύτητας διαχωρισμού καθώς και της ποιότητας των φασμάτων [30]. Παραδείγματα εφαρμογών LC-HR-MS για την ανάλυση NPs, περιλαμβάνουν την ανάλυση υψηλής απόδοσης των φυτοχημικών ουσιών σε ένα φυτικό εκχύλισμα [31] και διαχωρισμός και καθαρισμός μεταβολιτών μυκήτων [32].

Η υψηλή ακρίβεια μέτρησης των σχετικών μοριακών μαζών ήταν και παραμένει μια σημαντική κρίσιμη εφαρμογή της HR-MS στον τομέα της έρευνας των NPs.

Γ4.3. Δίδυμη φασματομετρία μάζας (MS/MS)

Ίσως η πιο σημαντική εξέλιξη που συνέβαλε αποφασιστικά στη μελέτη των φυσικών προϊόντων ήταν η ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων με πειράματα MS/MS. Η πιο συνηθισμένη αντίδραση στα MS/MS είναι η διάσπαση του μητρικού ιόντος σε ένα θυγατρικό ιόν και ένα ουδέτερο μόριο. Η χρήση αυτών των δυνατοτήτων, έχει μεγάλη σημασία για την ταυτοποίηση ενώσεων σε άγνωστα σύνθετα δείγματα, ιδίως σε βιολογικά δείγματα ή περιβαλλοντικά δείγματα όπου οι προσδιοριζόμενες ενώσεις υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις και ιδίως στα φάσματα ιοντισμού ηλεκτρονίων, το σήμα ορισμένων θραυσμάτων είναι πολύ μεγαλύτερο από το σήμα της μητρικής ένωσης. Επιπλέον, η συνδυασμένη γνώση της μοριακής μάζας και της μάζας των θραυσμάτων επιτρέπει την ταυτοποίηση ενώσεων όπου η ανάλυση παρεμποδίζεται από άλλες ενώσεις ή παρουσιάζει πολύ μικρή απόκριση. Η πρώτη εφαρμογή έγινε σε πολύπλοκα μίγματα αλκαλοειδών όπου, μετά από μαλακό ιοντισμό, μετρήθηκαν τα προϊόντα θραυσματοποίησης μέσω CID των επιλεγμένων ιόντων.

Ένα θεμελιώδες πλεονέκτημα της MS/MS είναι η αύξηση του λόγου S/N σε σύγκριση με το κανονικό φάσμα μάζας, ο οποίος αυξάνεται με την αύξηση των σταδίων της ανάλυσης με MS και επιτρέπει την ακριβή ταυτοποίηση μη ανιχνεύσιμων ενώσεων, λόγω του χημικού θορύβου στο κανονικό φάσμα μάζας. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την ανάλυση της κωνεΐνης από το *Conium maculatum* (m/z 128), η οποία, ενώ ήταν αδύνατο να ανιχνευθεί λόγω θορύβου στο πλήρες φάσμα μάζας, ταυτοποιήθηκε με σάρωση MS/MS (Εικόνα Γ6) [33].



Εικόνα Γ6. (a) Πλεονέκτημα σήματος προς θόρυβο της MS/MS με την αύξηση των σταδίων της ανάλυσης με MS, (b) MS¹ του *C. maculatum* (δεξιά) και θραύσματα κωνεΐνης που ανιχνεύθηκαν σε πείραμα MS/MS (αριστερά), (c) Δομικές πληροφορίες που παρέχονται μέσω της θραυσματοποίησης της κωνεΐνης [33].

Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την θραυσματοποίηση της κωνεΐνης και η πορεία που ακολουθήθηκε για την ταυτοποίηση της δομής της φαίνονται στην **Εικόνα Γ6**. Η άμεση ανίχνευση των φυσικών προϊόντων που μπορεί να πραγματοποιηθεί με MS/MS έχει πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών μεθόδων χαρακτηρισμού.

Τα πλεονεκτήματα της MS/MS άνοιξαν το δρόμο για την άμεση ανάλυση φυτικών υλικών. Μια από τις πρώτες και πιο επιτυχημένες εφαρμογές της άμεσης ανάλυσης σε φυσικά προϊόντα που προέρχονται από φυτά ήταν η άμεση εισαγωγή φυτικού ιστού από το φυτό *Erythroxylum coca* στην πηγή ιοντισμού του φασματόμετρου μάζας και η ανίχνευση της κοκαΐνης [34]. Αξίζει να σημειωθεί στις πρώτες αναλύσεις MS/MS χρησιμοποιήθηκαν ακατέργαστα φυτικά εκχυλίσματα από τα οποία εντοπίστηκαν άγνωστα προηγουμένως συστατικά, όπως η μεσκαλίνη από τα φυτικής προέλευσης *Opuntia spinosior* και *Trichocereus peruvianus* [33].

Τα φυσικά προϊόντα μπορούν να ταυτοποιηθούν με διάφορους τρόπους σάρωσης MS/MS, αξιοποιώντας συχνά τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά τους. Υπάρχουν διάφοροι

τύποι τεχνικών σάρωσης MS/MS [35]. Οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνικές σάρωσης MS/MS επέτρεψαν τη χρήση τετραπολικών παγίδων ιόντων για την εκτέλεση πειραμάτων διδιάστατης MS/MS (2D MS/MS), η οποία είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για τη λήψη δεδομένων MS/MS σε ένα πολύπλοκο δείγμα; στη λειτουργία σάρωσης 2D MS/MS μπορούν να καταγραφούν δύο διαστάσεις της μάζας και μία της έντασης σε ένα μόνο στάδιο εισαγωγής ιόντων [36-38]. Ένας εναλλακτικός τύπος τρόπου σάρωσης, ο οποίος έχει ήδη αναφερθεί, είναι η τεχνική MRM, η οποία έχει μηδενικές διαστάσεις μάζας αλλά παρουσιάζει ανώτερες δυνατότητες ανίχνευσης μιας συγκεκριμένης ένωσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν διάφορες γνωστές τεχνικές σάρωσης που αναφέρονται σε μονοδιάστατα πειράματα, όπως η σάρωση παραγόμενων ιόντων, όπου ένα συγκεκριμένο ιόν χαρακτηρίζεται μέσω ενός συνόλου θραυσμάτων ιόντων και της αφθονίας τους. Αυτός ο τρόπος σάρωσης χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό της δομής και στην ανάπτυξη μεθόδων για απαιτητικές μελέτες με βάση την MRM. Μπορούν να σχεδιαστούν στοχευμένες σαρώσεις με χρήση είτε σαρώσεων πρόδρομων ιόντων είτε σαρώσεων απώλειας ουδέτερου μορίου προκειμένου να χαρακτηριστεί ένα άγνωστο δείγμα, για ενώσεις της ίδιας κατηγορίας.

Η τεχνική της απώλειας ουδέτερων μορίων χρησιμοποιείται για τη μελέτη μιας κατηγορίας ενώσεων που παρουσιάζουν κοινή απώλεια ουδέτερων μορίων κατά τη διάρκεια της CID, ενώ η σάρωση πρόδρομων ιόντων γίνεται με το σχηματισμό συγκεκριμένων θραυσματικών ιόντων. Με τη χρήση της τεχνικής της απώλειας ουδέτερων μορίων επιτεύχθηκε η ανίχνευση μιας σειράς ενώσεων που σχετίζονται με την αρτεμισίνη από το βότανο *Artemisia annua* από ένα εξαιρετικά πολύπλοκο πλήρες φάσμα μάζας που ελήφθη από το εκχύλισμα του φυτού [39].

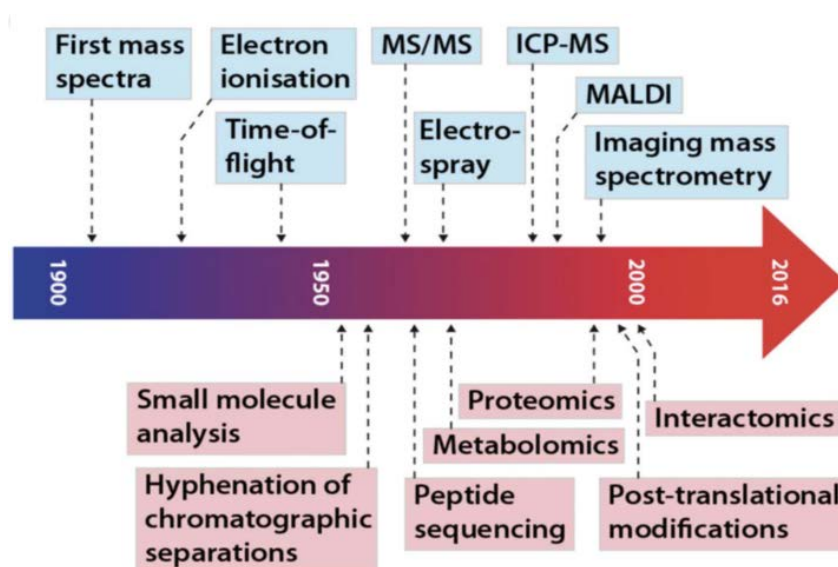
Η τεχνική της σάρωσης παραγόμενων ιόντων χρησιμοποιήθηκε επίσης για την επιβεβαίωση των αναλόγων αρτεμισίνης που προέκυψαν και για μια πρώτη αξιολόγηση της δομής τους με βάση τα μοριακά βάρη και τις λειτουργικές ομάδες [39]. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση κοινών θραυσμάτων που προκύπτουν από συγκεκριμένα πρόδρομα ιόντα. Σε φυτικά εκχυλίσματα από το *Senecio sp.* ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δομικά, πυρρολιζιδινικά αλκαλοειδή με σάρωση πρόδρομου ιόντος ενός κοινού θραύσματος με m/z 120 ($C_8H_{10}N$), σε συνδυασμό με επακόλουθες σαρώσεις παραγόμενων ιόντων [40].

Τα πειράματα MS^n , για $n > 2$ (n , είναι ο αριθμός των βημάτων απομόνωσης/διαχωρισμού ιόντων) είναι ένα εξαιρετικά αξιόπιστο εργαλείο στις μελέτες δομικής διαλεύκανσης φυσικών προϊόντων, ιδίως κατά την εξέταση πολύπλοκων μιγμάτων. Με τη χρήση διαδοχικών τρόπων σάρωσης πρόδρομων ιόντων, όπου το ιόν του προϊόντος ορίζεται από μια συγκεκριμένη επιπλέον θραυσματοποίηση σε σχέση με τη σάρωση πρόδρομων ιόντων, είναι δυνατή η διάκριση ισοβαρών και ισομερών ιόντων, τα οποία απαντώνται συνήθως στα φυσικά προϊόντα [35].

Γ4.4. Οργανολογία φασματομετρίας μάζας και ιοντισμός

Οι αναλυτές μάζας εξελίχθηκαν από αναλυτές μαγνητικής εκτροπής σε τετραπολικούς αναλυτές και από TOF σε IT διαφόρων τύπων, διευρύνοντας το πεδίο έρευνας των φυσικών προϊόντων και της επιστήμης των πρωτεϊνών (Εικόνα Γ7). Η εξέλιξη από τους αναλυτές μαγνητικής εκτροπής απλής εστίασης σε αυτούς της διπλής εστίασης είχε βαθιά επίδραση κατά τις δεκαετίες 60s-80s.

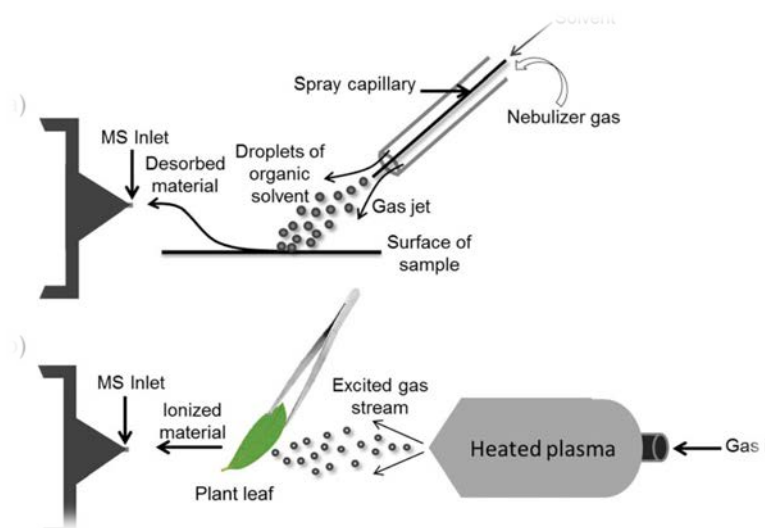
Αναπτύχθηκαν επίσης υβριδικοί αναλυτές, συμπεριλαμβανομένων οργάνων πολλαπλών μαγνητικών εκτροπών, μαγνητικών εκτροπών-τετραπόλων και υβριδίων Q-TOF. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, η ανάπτυξη των παγίδων ιόντων (π.χ. τύποι Paul, Kingdon και Penning) ήρθε στο προσκήνιο, με τα όργανα αυτά να θεωρούνται πρόγονοι των σημερινών παγίδων υψηλής απόδοσης, όπως οι FT-ICR, Orbitrap και Q-IT.



Εικόνα Γ7. Η εξέλιξη των οργάνων φασματομετρίας μάζας [41]

Με την ανάπτυξη του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό [42] και του ιοντισμού εκρόφησης υποβοηθούμενος από το μητρικό υλικό (MALDI) [43,44] τη δεκαετία του 1980, ήρθε το βραβείο Νόμπελ για τη φασματομετρία μάζας, επιτρέποντας τη χρήση της MS για βιολογικές εφαρμογές. Έκτοτε, η κοινότητα των NPs έχει αγκαλιάσει, αξιοποιήσει και εξελίξει εκτενώς και τις δύο αυτές τεχνικές.

Ιδιαίτερη σημασία για τους επιστήμονες των NPs έχει η αναβίωση των μεθόδων ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος, μετά το πρωτοποριακό έργο του Graham Cooks στη μέθοδο του ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού εκρόφησης (Desorption Electrospray Ionization, DESI) το 2004 [45] και του Robert B. Cody στην άμεση ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (Direct Analysis in Real Time, DART) το 2005 [46]. Και οι δύο μέθοδοι χαρακτηρίστηκαν από την ικανότητα να παράγουν δεδομένα φασματομετρίας μάζας σε συνθήκες περιβάλλοντος χωρίς την ανάγκη για επεξεργασία του δείγματος. Οι μέθοδοι ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία που επιτρέπει την ανίχνευση μεγάλου εύρους χημικών ενώσεων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, ακόμη και σε πολύπλοκα δείγματα, γεγονός που επέτρεψε την καθολική εφαρμογή των μεθόδων αυτών. Η μέθοδος DESI χρησιμοποιεί ηλεκτροψεκασμό φορτισμένων σταγονιδίων οργανικού διαλύτη στην επιφάνεια του δείγματος μέσω δέσμης αερίου με αποτέλεσμα την εκρόφηση των υλικών (**Εικόνα Γ8Α**). Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος DART επιτρέπει την άμεση ανάλυση, εκθέτοντας το δείγμα σε ρεύμα αερίου που διεγείρεται από θερμαινόμενο πλάσμα. (**Εικόνα Γ8Β**).



Εικόνα Γ8. Δύο αντιπροσωπευτικές πηγές ατμοσφαιρικού ιοντισμού. Μέθοδοι ιοντισμού α) DESI και β) DART [47].

Περισσότερες από 30 νέες και υβριδικές τεχνικές έχουν εμφανιστεί [48-50] μετά την καθιέρωση των μεθόδων DESI και DART ως ιοντισμός σε συνθήκες περιβάλλοντος, επιτρέποντας την άμεση ανάλυση μορίων από βιολογικά δείγματα. Εφαρμογές τους για την ταυτοποίηση NPs από φυτά και μικροοργανισμούς έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες, όπως ο χαρακτηρισμός γλυκοζιτών τερπενίων από φύλλα *Stevia rebaudiana* και αλκαλοειδών από δηλητηριώδη φυτά [51] μεταξύ άλλων, εφαρμόζοντας DESI [52]. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DART, έχουν προσδιοριστεί πτητικές οργανικές ενώσεις όπως μονοτερπένια και φλαβονοειδή από διάφορα είδη ευκαλύπτου [53], από την *Cassia sieberiana* [54] και κουρκουμίνη και τα παράγωγά της από κουρκουμά [55]. Η DART έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση NPs από μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων αλκαλοειδών από μύκητα θαλάσσιας προέλευσης [56], την άμεση ανάλυση μεταβολιτών από κυανοβακτήρια με χρήση ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού με αφαίρεση με λέιζερ (Laser Ablation Electrospray Ionization, LAESI) [57] και από στελέχη *Pseudomonas* και *Bacillus* με χρήση nanoDESI [58].

Στις μέρες μας, οι σημαντικές βελτιώσεις στον εξοπλισμό και η πρόοδος στις μεθόδους ατμοσφαιρικού ιοντισμού έχουν προσφέρει στην κοινότητα των NPs αυξημένη ευαισθησία με την εφαρμογή ισχυρών οπτικών με βελτιωμένη μετάδοση ιόντων καθώς και

στην ανάπτυξη ευαίσθητων εμπορικών φασματομέτρων μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, όπως τα Q-TOF [59], τα υβριδικά LTQ-Orbitrap και τα FT-ICR [60,61].

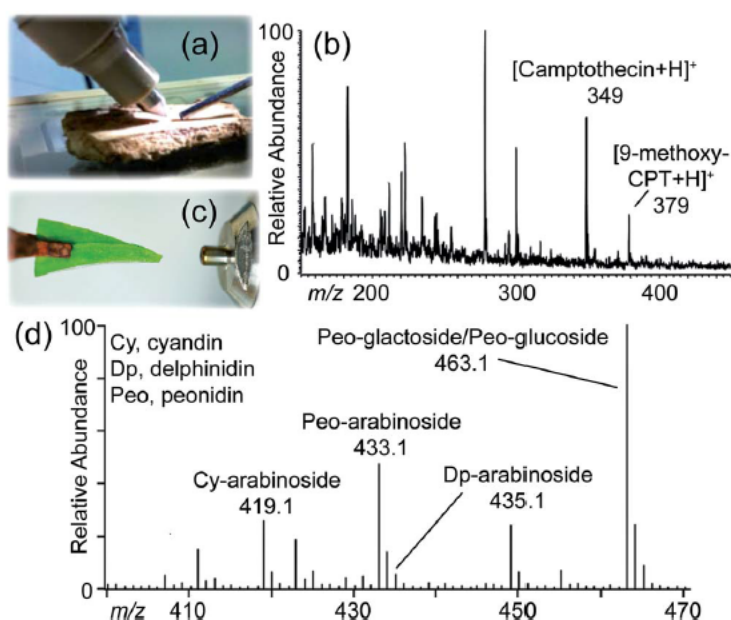
Γ4.4.1. Άμεσος ιοντισμός άθικτου φυτικού υλικού σε συνθήκες περιβάλλοντος

Οι φυτοχημικές ενώσεις αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων που απομονώνονται από τα φυτά, οι οποίες έχουν τεράστιο αντίκτυπο σε διάφορους τομείς και έχουν μεγάλη σημασία τόσο στην έρευνα φυσικών προϊόντων όσο και στην ανάπτυξη της MS. Η ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος ολοκληρώνεται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, καθώς η ανίχνευση βιοδραστικών ενώσεων διευκολύνεται από τη δυνατότητα ανάλυσης επιφανειών χωρίς προεπεξεργασία, συνήθως με δειγματοληψία των συστατικών με θερμική εκχύλιση ή εκχύλιση με διαλύτη. Για παράδειγμα, η μέθοδος DESI χρησιμοποιεί ένα ρεύμα φορτισμένων σταγονιδίων που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του δείγματος, διαλύοντας τους αναλύτες, οι οποίοι στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα MS ως εκτοξευόμενα δευτερογενή μικροσταγονίδια [62]. Οι ρίζες του φυτού *Datura stramonium* αναλύθηκαν με DESI-MS χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασία, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανίχνευση 15 τροπανικών αλκαλοειδών [51]. Χρησιμοποιώντας παρόμοια μεθοδολογία, ανιχνεύθηκαν εύκολα και άμεσα οι γλυκοζίτες που ευθύνονται για τη γλυκιά γεύση των φύλλων της *Stevia rebaudiana* και το δηλητηριώδες αλκαλοειδές κονεΐνης από τους σπόρους του *C. maculatum* [45].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή της MS ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος δεν περιορίζεται σε έναν συγκεκριμένο τύπο φυτικού υλικού, αλλά είναι εξίσου εφαρμόσιμη σε φύλλα, ρίζες, στελέχη, φλοιούς και άνθη. Μέσω άμεσης και ταχείας ανάλυσης φύλλων, στελεχών και φλοιού από το *Nothapodytes nimmioniana* (**Εικόνα Γ9Α** και **Γ9Β**), επιβεβαιώθηκε η παρουσία της καμπτοθεκίνης, μίας αντικαρκινικής ένωσης, και εκτιμήθηκε η συγκέντρωσή της στο φλοιό του δέντρου [63].

Μια πρόσφατη μέθοδος ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος για την ανάλυση φυτικού υλικού είναι ο ψεκασμός φύλλων (Leaf Spraying, LS) [64], μια καινοτόμα μέθοδος σε σχέση με τις προηγούμενες τεχνικές ιοντισμού, καθώς ο ιοντισμός πραγματοποιείται απευθείας στο δείγμα (**Εικόνα Γ9C**). Η τάση και ο διαλύτης, εάν είναι απαραίτητο, εφαρμόζονται είτε σε ένα σημείο στο φυτικό υλικό είτε σε ένα τεχνητό σημείο. Τα

εκχυλισμένα συστατικά ψεκάζονται από το υψηλό ηλεκτρικό πεδίο προς το MS [64]. Μέσω της ανάλυσης ψεκασμού φύλλων, εντοπίστηκαν ανθοκυανίνες στους καρπούς του *Vaccinium macrocarpon* (κράνμπερι) (Εικόνα Γ9D), γλυκοζίτες στα φύλλα του *S. rebaudiana* [65] και αλλεργιογόνα από το *Toxicodendron radicans* [66]. Επιπλέον, με τη διεξαγωγή πειραμάτων LS σε συγγενικά φυτά, μπορούν να εξαχθούν άμεσα συμπεράσματα σχετικά με τις χημικές διαφορές τους, μέσω της σύγκρισης των φασμάτων. Μια τέτοια εφαρμογή είναι η σύγκριση του *Hibiscus moscheutos* και του *Hibiscus syriacus*, όπου ένα νέο πολυυδροξυλιωμένο, μονοτερπενικό αλκαλοειδές πυρρολιδίνης εντοπίστηκε μόνο στο *Hibiscus moscheutos* [67].



Εικόνα Γ9. (a) Εικόνα ανάλυσης DESI-MS του φλοιού του *N. nimmoniana* που δείχνει τον ψεκασμό στα αριστερά και τον δευτερεύοντα σωλήνα μεταφοράς σταγονιδίων στα δεξιά, (b) το προκύπτον φάσμα μάζας με την ιοντισμένη καμπτοθεκίνη και ένα 9-μεθοξυ παράγωγο [51], (c) εικόνα ανάλυσης MS με LS πράσινου κρεμμυδιού που τοποθετείται μπροστά από την είσοδο του MS, (d) LS-MS φάσμα του καρπού του *Vaccinium macrocarpon* (κράνμπερι) που περιέχει ανθοκυανίνες [52].

Γ4.4.2. Φασματομετρική Απεικόνιση Μαζών (MS imaging) με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος

Η μοριακή απεικόνιση φασματομετρίας μάζας με μεθόδους ιοντισμού περιβάλλοντος, όπως η LAESI [68], η nano-DESI [69] και η DESI, έχει καταστεί μια τεχνολογία που επιτρέπει την έρευνα φυσικών προϊόντων και βιολογικών μορίων, παρέχοντας πληροφορίες για τη σχετική αφθονία κάθε ιόντος σε χώρο 2D [70] ή 3D [71]. Η τεχνική αυτή συνδυάζει τη χημική πληροφορία που λαμβάνεται από το MS και τη χωρική πληροφορία για τη διερεύνηση πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων. Με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου, επιτυγχάνεται ο εντοπισμός των δραστικών ενώσεων, όπως στην περίπτωση της κατανομή της κωνεΐνης εντός του στελέχους του *C. maculatum*. Διαπιστώθηκε ότι η σχετική αφθονία της κωνεΐνης έχει μεγάλες διακυμάνσεις ανά σημείο απλά με την ανάλυση όλης της επιφάνειας του στελέχους με τη χρήση DESI-MS [51]. Επιπλέον, η θέση των συστατικών μπορεί να συσχετιστεί με δεδομένα από ανεξάρτητες αναλυτικές τεχνικές για τη διαλεύκανση βιολογικών σχέσεων. Η ανάλυση ενός δείγματος άλγης, που παρουσιάζεται στην **Εικόνα Γ10Α**, αποκάλυψε τη δισδιάστατη χωρική κατανομή των αντι-μυκητιακών βρωμοφυκολιδών, συσχετίζοντας τη διαφορά χρώματος [72].

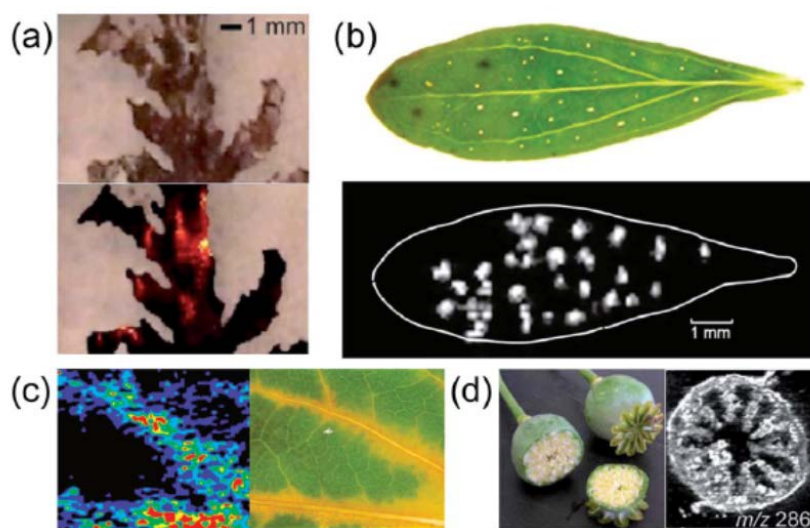
Η άμεση φασματομετρική απεικόνιση μαζών φύλλων έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση φυτοχημικών ουσιών και της δισδιάστατης χωρικής κατανομής τους [73]. Μέσω της μεθόδου αυτής έχει καταστεί δυνατή η ανίχνευση ενδογενών και εξωγενών ενώσεων [74], όπως στη χαρτογράφηση της κατανομής της νικοτίνης στον εγκεφαλικό ιστό αρουραίου [75]. Η απεικόνιση MS παρέχει τόσο χημικές όσο και χωρικές πληροφορίες, επιτρέποντας έτσι να απαντηθούν κρίσιμα ερωτήματα σχετικά με τη σύνθεση, την αποθήκευση και τη βιολογική σημασία των φυσικών προϊόντων.

Γ4.4.3. Φασματομετρική απεικόνιση μαζών αποτυπώματος άθικτου φυτικού υλικού με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος

Η άμεση ανάλυση με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος δεν είναι πάντα δυνατή λόγω της φύσης των βιολογικών υλικών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα συστατικά μεταφέρονται σε μια κατάλληλη επιφάνεια με αποτύπωση και στη συνέχεια εφαρμόζεται φασματομετρική απεικόνιση μαζών με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος, οδηγώντας

έτσι σε δεδομένα υψηλότερης ποιότητας. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί κατά τη μεταφορά των συστατικών, ώστε οι χωρικές σχέσεις στο αρχικό υλικό να παραμείνουν αμετάβλητες. Οι μεταβολίτες χλωροφύλλης που αναλύθηκαν σε γερασμένα φύλλα *Katsura* (*Cercidiphyllum*) ανιχνεύθηκαν άμεσα με DESI-MS, αλλά η ένταση του σήματος βελτιώθηκε μετά τη μεταφορά των συστατικών σε πορώδη επιφάνεια PTFE (**Εικόνα Γ10C**) [76].

Παρόμοια μεθοδολογία εφαρμόστηκε για την ανάλυση του *Hordeum vulgare* [77], των καψουλών του *Paraver somniferum* (**Εικόνα Γ10D**) [78], στα φύλλα του *D. stramonium* [78] και στα πέταλα των λουλουδιών του *Catharanthus roseus* [79] και *Hypericum perforatum* [78]. Τα πέταλα του *H. perforatum* απεικονίστηκαν με DESI-MS, όπου η ανίχνευση της υπερικίνης συσχετίστηκε με τους μαύρους αδένες που υπάρχουν κατά μήκος των άκρων των πετάλων, και η ανιχνεύσιμη υπερφορίνη (**Εικόνα Γ10B**) βρέθηκε να εμφανίζεται σε ζώνες ή/και κηλίδες σε όλο το πέταλο.



Εικόνα Γ10. (a) (Πάνω) Φωτογραφία άλγης που υποβλήθηκε σε DESI-MS και επικάλυψη της με την απεικόνιση ιόντων του βρωμοφυλλικού οξέως με DESI-MS [72], (b) φύλλο *Hypericum perforatum* (πάνω) και εικόνα DESI-MS, που αντιστοιχεί στην υπερφορίνη (κάτω) [73], (c) φωτογραφία φύλλου *Katsura* (*Cercidiphyllum*) (δεξιά) και αντίστοιχη εικόνα ιόντων ενός μεταβολίτη χλωροφύλλης (αριστερά) [74], (d) (Αριστερά) φωτογραφία κάψουλας του *Paraver somniferum* και απεικονιζόμενο αποτύπωμα (δεξιά) που αποκαλύπτει την κατανομή της μορφίνης [73].

Γ4.4.4. Ανάλυση μικροοργανισμών με MS σε συνθήκες περιβάλλοντος

Στις προηγούμενες ενότητες παρουσιάστηκε η ανάλυση των φυσικών προϊόντων φυτικής προέλευσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ιοντισμός σε περιβαλλοντικές συνθήκες εφαρμόζεται επίσης στην ανάλυση φυσικών προϊόντων από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες, επιτρέποντας την ταχεία ανάλυση τους χωρίς την ανάγκη προεπεξεργασίας του δείγματος. Η πλειονότητα των εργασιών που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα αφορά την άμεση *in vitro* ανάλυση βακτηρίων από καλλιέργειες ή/και βιοφίλμ. [80]. Ο νανοψεκασμός με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού εκρόφησης (nano-DESI) έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ραμνολιπιδίων της *Pseudomonas aeruginosa* απευθείας από τρυβλία Petri [58]. Τα γλυκολιπίδια και οι μεταβολίτες του *Synechococcus sp.* [81] και η σουρφακτίνη, ένα επιφανειοδραστικό και αντιβιοτικό, που παράγεται από τον *Bacillus subtilis*, έχουν μελετηθεί *in vitro*. [58,82].

Μέσω της χρήσης MS με ιοντισμό σε συνθήκες περιβάλλοντος σε συνδυασμό με στατιστική πολλαπλών μεταβλητών, έχει επιτευχθεί η διαφοροποίηση βακτηριακών γενών [83] και ειδών [84]. Οι μύκητες δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς με τη χρήση ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά με τη χρήση ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού εκρόφησης με λέιζερ (Electrospray Laser Desorption Ionization, ELDI) ανιχνεύθηκαν τριτερπενοειδή από τα *Ganoderma lucidum* και *Antrodia camphorate* [66].

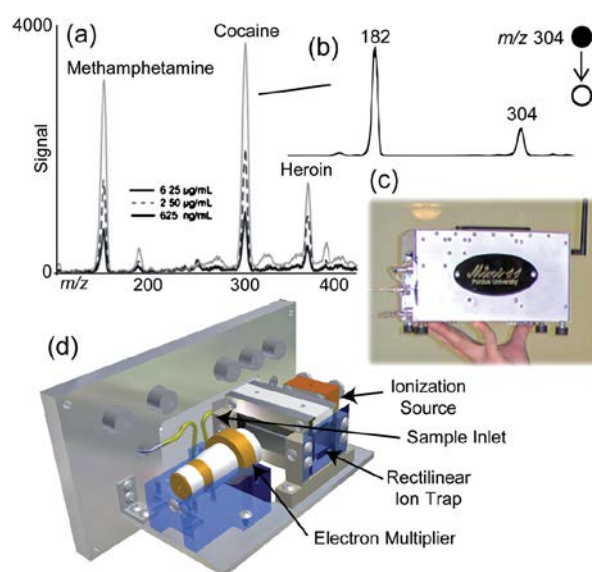
Η MS σε συνθήκες περιβάλλοντος έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών των φυσικών προϊόντων [85]. Παράλληλα, συνδυάζοντας τις χημικές πληροφορίες που λαμβάνονται από τη MS και τη γενετική, επιτυγχάνεται βαθύτερη κατανόηση της βιοχημείας των φυσικών προϊόντων [86]. Επιπλέον, η άμεση απεικόνιση μικροοργανισμών, επιτρέπει την παρακολούθηση των χημικών διεργασιών μεταξύ οργανισμών που λαμβάνουν χώρα στις διεπιφάνειες τους [87]. Το αποτέλεσμα όλων αυτών είναι μια "δυναμική" εικόνα του μεταβολισμού των φυσικών προϊόντων.

Γ4.4.5. MS μικρού μεγέθους (φορητού) και εφαρμογές τους

Η ελαχιστοποίηση του μεγέθους των οργάνων MS αποτελεί στόχο εδώ και δύο δεκαετίες, με την πρώτη περιγραφή ενός μικρού μεγέθους αναλυτή μάζας το 1991 [88]. Με την πάροδο των ετών, οι βελτιώσεις στον τομέα της φασματομετρίας μάζας, όπως οι αντλίες, οι ανιχνευτές και τα ηλεκτρονικά, επέτρεψαν τη μείωση των διαστάσεων και των

απαιτήσεων ισχύος για το σύνολο των συστημάτων ενός φασματομέτρου μάζας. Στο πλαίσιο αυτό, αναπτύχθηκαν αναλυτές μαγνητικής εκτροπής, αναλυτές TOF και αναλυτές IT ως αυτοσυντηρούμενα συστήματα MS [89,90]. Ένα από τα πιο επιτυχημένα μικρού μεγέθους συστήματα MS, χρησιμοποιούν γεωμετρία παγίδας ιόντων που έχουν εξελιχθεί από τις παραδοσιακές τρισδιάστατες και γραμμικές παγίδες ιόντων. Η λειτουργία σε υψηλότερες πιέσεις, το μεγάλο εύρος m/z και η ευαισθησία παρόμοια με εκείνη των εμπορικών οργάνων είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα των φορητών παγίδων ιόντων [88,90,91]. Ο συνδυασμός παγίδων ιόντων σε συνδυασμό με πηγές ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος έχει παράξει την πρώτη γενιά αυτοσυντηρούμενων φασματομέτρων μάζας ικανών για *in situ* ανάλυση.

Η τρέχουσα κατάσταση των MS στα φυσικά προϊόντα βασίζεται στη δειγματοληψία στο πεδίο, στη γρήγορη μεταφορά και στη συνέχεια στην εργαστηριακή ανάλυση. Ακόμη και αν αυτή η διαδικασία αποφέρει σημαντικά αποτελέσματα, είναι δαπανηρή και χρονοβόρα και σχεδόν πάντα προκύπτει η εκ νέου ανακάλυψη ήδη γνωστών ενώσεων. Η δυνατότητα μεταφοράς μικρού μεγέθους συστημάτων MS στο φυσικό περιβάλλον των βιολογικών πηγών που πρόκειται να εξεταστούν, επιτρέπει την αποτελεσματικότερη διεξαγωγή των πειραμάτων [92]. Η μεγάλη ποικιλία ενώσεων που μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μικρού μεγέθους φασματομέτρων μάζας είναι σχεδόν καθολική, με παραδείγματα που περιλαμβάνουν φαρμακευτικά προϊόντα [93], αγροχημικά [94] και πρωτεΐνες [93] μεταξύ άλλων ενώσεων. Η ανίχνευση κοκαΐνης και η τεχνική της σάρωσης παραγόμενων ιόντων με τη χρήση του Mini 10 είναι ενδεικτική των προαναφερθεισών δυνατοτήτων (**Εικόνα Γ11**) [95]. Η ανίχνευση φυσικών προϊόντων με χρήση φορητού MS απεικονίζεται με την ανίχνευση του DDT, ενός φυτοφαρμάκου, και του ζιζανιοκτόνου alachlor από ένα φύλλο καλαμποκιού [94].



Εικόνα Γ11. (α) Ανίχνευση κοκαΐνης, ηρωΐνης και μεθαμφεταμΐνης σε λειτουργΐα πλήρους σάρωσης με τη χρήση του εMini 10, (β) φάσμα που προέκυψε από σάρωση παραγόμενων ιόντων της κοκαΐνης με τη χρήση του Mini 10, (γ) φωτογραφΐα του Mini 11, (δ) σχηματικό διάγραμμα του Mini 10, με αναλυτή παγΐδας ιόντων ορθής γραμμής [95].

Γ5. Βιβλιογραφικές αναφορές

- [1] Gaskell SJ. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*. 1997;32(7):677-88.
- [2] Cole R.B., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, 1997, Wiley, New York.
- [3] Cole RB. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35(7):763-72.
- [4] Manisali I, Chen D, Schneider B. Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: Past, present, and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25:243-56.
- [5] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem*. 1985;57(3):675-9.
- [6] Hopfgartner G., Wachs T., Bean K., Henion J., High-flow ion spray liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem*. 1993;65:439-446.
- [7] Zhou S, Hamburger M. Effects of solvent composition on molecular ion response in electrospray mass spectrometry: Investigation of the ionization processes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1995;9(15):1516-21.
- [8] https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html#section1.
- [9] Bateman, R. Sector Mass Spectrometers. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*. J. C. Lindon, G. E. Tranter and D. W. Koppenaal. Oxford, Academic Press. 2017:50-55.
- [10] Cajka T, Hajslova J, Mastovska K. Mass spectrometry and hyphenated instruments in food analysis. 2008:197–228.
- [11] Hocart, C. H.. 9.10 - Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification. *Comprehensive Natural Products II*. H.-W. Liu and L. Mander. Oxford, Elsevier; 2010:327-88.
- [12] Lacorte S, Fernandez-Alba AR. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrom Rev*. 2006;25(6):866-80.
- [13] <http://www.bris.ac.uk/chemistry/>

- [14] Marshall AG, Hendrickson CL, Shi SD. Scaling MS plateaus with high-resolution FT-ICRMS. *Anal Chem.* 2002;74(9):252-9.
- [15] Djerassi C, Brewer HW, Budzikiewicz H, Orazi OO, Corral RA. The Structures of the Aspidosperma Alkaloids Spegazzinine and Spegazzinidine. *Journal of the American Chemical Society.* 1962;84(18):3480-5.
- [16] Biemann K, Friedmann-Spiteller M. Application of Mass Spectrometry to Structure Problems. V.1 Iboga Alkaloids². *Journal of the American Chemical Society.* 1961;83(23):4805-10.
- [17] Biemann K. The Application of Mass Spectrometry in Organic Chemistry: Determination of the Structure of Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 1962;1:98-111.
- [18] Aust SD, Broquist HP, Rinehart KL. Slaframine. Structural Studies of a Parasympathomimetic Alkaloid of Fungal Origin. *Journal of the American Chemical Society.* 1966;88(12):2879-80.
- [19] Biemann K, Friedmann-Spiteller M, Spiteller G. An investigation by mass spectrometry of the alkaloids of *Aspidosperma quebracho-blanco*. *Tetrahedron Letters.* 1961;2(14):485-92.
- [20] Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerassi C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII.1 Pentacyclic Triterpenes. *Journal of the American Chemical Society.* 1963;85(22):3688-99.
- [21] Schnoes HK, Burlingame AL, Biemann K. Application of mass spectrometry to structure problems: the occurrence of eburnamenine and related alkaloids in *Rhazya stricta* and *Aspidosperma quebracho blanco*. *Tetrahedron Letters.* 1962;3(22):993-9.
- [22] Biemann K. High resolution mass spectrometry of natural products. *Pure and Applied Chemistry.* 1964;9(1):95-118.
- [23] Burgoyne TW, Hieftje GM. An introduction to ion optics for the mass spectrograph. *Mass Spectrom Rev.* 1996;15(4):241-59
- [24] Beynon JH. Mass and abundance tables for use in mass spectrometry. In: Williams AE, editor. Amsterdam, New York, Elsevier Pub. Co.1963.
- [25] Biemann K, Grossert JS, Hugo JM, Occolowitz J, Warren FL. 505. The indole alkaloids. Part IV. The structure of henningsamine. *Journal of the Chemical Society (Resumed).* 1965(0):2814-8.

- [26] Neuss N, Gorman M, Hargrove W, Cone NJ, Biemann K, Buchi G, et al. Vinca Alkaloids. XXI.1 The Structures of the Oncolytic Alkaloids Vinblastine (VLB) and Vincristine (VCR)2. *Journal of the American Chemical Society*. 1964;86(7):1440-2.
- [27] Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(5):1251-64.
- [28] Xie C, Zhong D, Yu K, Chen X. Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC–Q-TOF MS. *Bioanalysis*. 2012;4(8):937-59.
- [29] Maurer HH. What is the future of (ultra) high performance liquid chromatography coupled to low and high resolution mass spectrometry for toxicological drug screening? *Journal of Chromatography A*. 2013;1292:19-24.
- [30] Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, et al. High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res*. 2005;4(2):591-8.
- [31] Eugster P, Guillarme D, Rudaz S, Veuthey J-L, Carrupt P-A, Wolfender J-L. Ultra High Pressure Liquid Chromatography for Crude Plant Extract Profiling. *Journal of AOAC International*. 2011;94:51-70.
- [32] El-Elimat T, Figueroa M, Ehrmann BM, Cech NB, Pearce CJ, Oberlies NH. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J Nat Prod*. 2013;76(9):1709-16.
- [33] Kondrat RW, Cooks RG. Direct analysis of mixtures by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1978;50(1):81A-92A.
- [34] Youssefi M, Cooks RG, McLaughlin JL. Mapping of cocaine and cinnamoylcocaine in whole coca plant tissues by MIKES. *Journal of the American Chemical Society*. 1979;101(12):3400-2.
- [35] Schwartz JC, Wade AP, Enke CG, Cooks RG. Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry. *Anal Chem*. 1990;62(17):1809-18.
- [36] Szalwinski LJ, Holden DT, Morato NM, Cooks RG. 2D MS/MS Spectra Recorded in the Time Domain Using Repetitive Frequency Sweeps in Linear Quadrupole Ion Traps. *Analytical Chemistry*. 2020;92(14):10016-23.

- [37] Snyder DT, Szalwinski LJ, St. John Z, Cooks RG. Two-Dimensional Tandem Mass Spectrometry in a Single Scan on a Linear Quadrupole Ion Trap. *Analytical Chemistry*. 2019;91(21):13752-62.
- [38] Snyder DT, Demond PS, Szalwinski LJ, Dhummakupt ES, McBride EM, Cooks RG, et al. Two-dimensional MS/MS scans on a linear ion trap mass analyzer: Identification of V-series chemical warfare agents. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2019;444:116171.
- [39] Ranasinghe A, Sweatlock JD, Cooks RG. A rapid screening method for artemisinin and its congeners using ms/ms: search for new analogues in *Artemisia annua*. *J Nat Prod*. 1993;56(4):552-63.
- [40] Cooks R, Roush R. Two-Dimensional Mass-Spectrometry-Concepts And Applications To Direct Analysis Of Mixtures. *Chimica & L Industria*. 1984;66(9):539-49.
- [41] A. Doerr, J. Finkelstein, I. Jarchum, C. Goodman and B. Dekker, *Nature Milestones: Mass Spectrometry*, Nature Publishing Group, 2015
- [42] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
- [43] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*. 1988;60(20):2299-301.
- [44] Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol*. 1990;193:280-95.
- [45] Takáts Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Electrosonic Spray Ionization. A Gentle Technique for Generating Folded Proteins and Protein Complexes in the Gas Phase and for Studying Ion–Molecule Reactions at Atmospheric Pressure. *Analytical Chemistry*. 2004;76(14):4050-8.
- [46] Cody RB, Laramée JA, Durst HD. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Analytical Chemistry*. 2005;77(8):2297-302.
- [47] Bouslimani A, Sanchez LM, Garg N, Dorrestein PC. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Natural Product Reports*. 2014;31(6):718-29.

- [48] Monge ME, Harris GA, Dwivedi P, Fernández FM. Mass Spectrometry: Recent Advances in Direct Open Air Surface Sampling/Ionization. *Chemical Reviews*. 2013;113(4):2269-308.
- [49] Harris GA, Galhena AS, Fernández FM. Ambient sampling/ionization mass spectrometry: applications and current trends. *Anal Chem*. 2011;83(12):4508-38..
- [50] Weston DJ. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst*. 2010;135(4):661-8.
- [51] Talaty N, Takáts Z, Cooks RG. Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst*. 2005;130(12):1624-33.
- [52] Jackson AU, Tata A, Wu C, Perry RH, Haas G, West L, et al. Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*. 2009;134(5):867-74.
- [53] Maleknia SD, Vail TM, Cody RB, Sparkman DO, Bell TL, Adams MA. Temperature-dependent release of volatile organic compounds of eucalypts by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009;23(15):2241-6.
- [54] Kpegba K, Agbonon A, Petrovic AG, Amouzou E, Gbeassor M, Proni G, et al. Epiatzelechin from the Root Bark of *Cassia sieberiana*: Detection by DART Mass Spectrometry, Spectroscopic Characterization, and Antioxidant Properties. *Journal of Natural Products*. 2011;74(3):455-9.
- [55] Kim HJ, Jang YP. Direct analysis of curcumin in turmeric by DART-MS. *Phytochem Anal*. 2009;20(5):372-7..
- [56] Watts KR, Loveridge ST, Tenney K, Media J, Valeriote FA, Crews P. Utilizing DART Mass Spectrometry to Pinpoint Halogenated Metabolites from a Marine Invertebrate-Derived Fungus. *The Journal of Organic Chemistry*. 2011;76(15):6201-8.
- [57] Parsieglá G, Shrestha B, Carrière F, Vertes A. Direct analysis of phycobilisomal antenna proteins and metabolites in small cyanobacterial populations by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 2012;84(1):34-8.

- [58] Watrous J, Roach P, Alexandrov T, Heath BS, Yang JY, Kersten RD, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):E1743-52.
- [59] Glauser G, Veyrat N, Rochat B, Wolfender JL, Turlings TC. Ultra-high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for plant metabolomics: a systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers. *J Chromatogr A*. 2013;1292:151-9.
- [60] Savory JJ, Kaiser NK, McKenna AM, Xian F, Blakney GT, Rodgers RP, et al. Parts-per-billion Fourier transform ion cyclotron resonance mass measurement accuracy with a "walking" calibration equation. *Anal Chem*. 2011;83(5):1732-6..
- [61] Park KH, Kim MS, Baek SJ, Bae IH, Seo S-W, Kim J, et al. Simultaneous molecular formula determinations of natural compounds in a plant extract using 15 T Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Plant Methods*. 2013;9(1):15.
- [62] Badu-Tawiah AK, Eberlin LS, Ouyang Z, Cooks RG. Chemical Aspects of the Extractive Methods of Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2013;64(1):481-505..
- [63] Srimany A, Ifa DR, Naik HR, Bhat V, Cooks RG, Pradeep T. Direct analysis of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analyst*. 2011;136(15):3066-8.
- [64] Liu J, Wang H, Cooks RG, Ouyang Z. Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2011;83(20):7608-13.
- [65] Zhang JI, Li X, Ouyang Z, Cooks RG. Direct analysis of steviol glycosides from *Stevia* leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves. *Analyst*. 2012;137(13):3091-8..
- [66] Huang M-Z, Cheng S-C, Jhang S-S, Chou C-C, Cheng C-N, Shiea J, et al. Ambient Molecular Imaging of Dry Fungus Surface by Electrospray Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2012;s 325–327:172–82.
- [67] Muller T, Cooks RG. Differential Rapid Screening of Phytochemicals by Leaf Spray Mass Spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society* [Internet]. 2014 Mar 20;35(3):919–24.

- [68] Nemes P, Barton AA, Vertes A. Three-Dimensional Imaging of Metabolites in Tissues under Ambient Conditions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2009;81(16):6668-75.
- [69] Watrous J, Roach P, Heath B, Alexandrov T, Laskin J, Dorrestein PC. Metabolic profiling directly from the Petri dish using nanospray desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013;85(21):10385-91.
- [70] Esquenazi E, Yang Y-L, Watrous J, Gerwick WH, Dorrestein PC. Imaging mass spectrometry of natural products. *Natural Product Reports*. 2009;26(12):1521-34.
- [71] Eberlin LS, Ifa DR, Wu C, Cooks RG. Three-dimensional visualization of mouse brain by lipid analysis using ambient ionization mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(5):873-6.
- [72] Lane AL, Nyadong L, Galhena AS, Shearer TL, Stout EP, Parry RM, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(18):7314-9.
- [73] Li B, Hansen SH, Janfelt C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2013;348:15-22.
- [74] Eberlin LS, Ferreira CR, Dill AL, Ifa DR, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for lipid characterization and biological tissue imaging. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(11):946-60.
- [75] Lanekoff I, Thomas M, Carson JP, Smith JN, Timchalk C, Laskin J. Imaging Nicotine in Rat Brain Tissue by Use of Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2013;85(2):882-9.
- [76] Müller T, Oradu S, Ifa DR, Cooks RG, Kräutler B. Direct plant tissue analysis and imprint imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2011;83(14):5754-61.
- [77] Li B, Bjarnholt N, Hansen S, Janfelt C. Characterization of Barley Leaf Tissue Using Direct and Indirect Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Journal of mass spectrometry: JMS*. 2011;46:1241-6.

- [78] Thunig J, Hansen SH, Janfelt C. Analysis of Secondary Plant Metabolites by Indirect Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2011;83(9):3256-9.
- [79] Hemalatha RG, Pradeep T. Understanding the molecular signatures in leaves and flowers by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) imaging. *J Agric Food Chem*. 2013;61(31):7477-87.
- [80] Hsu C-C, ElNaggar MS, Peng Y, Fang J, Sanchez LM, Mascuch SJ, et al. Real-Time Metabolomics on Living Microorganisms Using Ambient Electrospray Ionization Flow-Probe. *Analytical Chemistry*. 2013;85(15):7014-8.
- [81] Lanekoff I, Geydebekht O, Pinchuk GE, Konopka AE, Laskin J. Spatially resolved analysis of glycolipids and metabolites in living *Synechococcus* sp. PCC 7002 using nanospray desorption electrospray ionization. *Analyst*. 2013;138(7):1971-8.
- [82] Song Y, Talaty N, Datsenko K, Wanner BL, Cooks RG. *In vivo* recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analyst*. 2009;134(5):838-41.
- [83] Meetani MA, Shin YS, Zhang S, Mayer R, Basile F. Desorption electrospray ionization mass spectrometry of intact bacteria. *J Mass Spectrom*. 2007;42(9):1186-93.
- [84] Zhang JI, Talaty N, Costa AB, Xia Y, Tao WA, Bell R, et al. Rapid direct lipid profiling of bacteria using desorption electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2011;301(1):37-44.
- [85] Nguyen DD, Wu C-H, Moree WJ, Lamsa A, Medema MH, Zhao X, et al. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(28):E2611-E20.
- [86] Evans BS, Zhao C, Gao J, Evans CM, Ju K-S, Doroghazi JR, et al. Discovery of the antibiotic phosacetamycin via a new mass spectrometry-based method for phosphonic acid detection. *ACS Chem Biol*. 2013;8(5):908-13.
- [87] Watrous J, Hendricks N, Meehan M, Dorrestein PC. Capturing bacterial metabolic exchange using thin film desorption electrospray ionization-imaging mass spectrometry. *Anal Chem*. 2010;82(5):1598-600.
- [88] Kaiser RE, Graham Cooks R, Stafford GC, Syka JEP, Hemberger PH. Operation of a quadrupole ion trap mass spectrometer to achieve high mass/charge ratios. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1991;106:79-115.

- [89] Badman ER, Graham Cooks R. Miniature mass analyzers. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35(6):659-71.
- [90] Ouyang Z, Cooks RG. Miniature Mass Spectrometers. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2009;2(1):187-214.
- [91] Gao L, Cooks RG, Ouyang Z. Breaking the pumping speed barrier in mass spectrometry: discontinuous atmospheric pressure interface. *Anal Chem*. 2008;80(11):4026-32.
- [92] Kingston DGI. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *Journal of Natural Products*. 2011;74(3):496-511.
- [93] Gao L, Sugiarto A, Harper JD, Cooks RG, Ouyang Z. Design and characterization of a multisource hand-held tandem mass spectrometer. *Anal Chem*. 2008;80(19):7198-205.
- [94] Mulligan CC, Talaty N, Cooks RG. Desorption electrospray ionization with a portable mass spectrometer: in situ analysis of ambient surfaces. *Chemical Communications*. 2006(16):1709-11.
- [95] Keil A, Talaty N, Janfelt C, Noll RJ, Gao L, Ouyang Z, et al. Ambient Mass Spectrometry with a Handheld Mass Spectrometer at High Pressure. *Analytical Chemistry*. 2007;79(20):7734-9.