

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΕΠΕΤ II**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ  
97-ΔΙΑΤΡΟ-29**

**Επιστημονικός υπεύθυνος: Αντώνης Καφάτος**

**Συνεργάστηκαν:**  
**Αντώνης Τσαρμπόπουλος**  
**Βαγγέλης Γκίκας**  
**Μιχάλης Κυριακάκης**  
**Φλουρή Σοφία**

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι στις Μεσογειακές χώρες παρατηρείται μία θετική επίδραση της διατροφής στη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας καρδιακής νόσου και διαφόρων μορφών καρκίνου (ειδικότερα καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου), όπου η δίαιτα περιλαμβάνει σημαντικές ποσότητες φρέσκων φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, σιτηρών και φυτικών ελαίων (κυρίως ελαιόλαδο). Το κύριο λιπαρό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής είναι το ελαιόλαδο, το οποίο είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα και φτωχό σε κεκορεσμένα λιπαρά οξέα. Επιπλέον φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία περιέχονται στις τροφές αυτές μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της οξείδωσης της LDL και ως εκ τούτου στο σχηματισμό αθηρωματικών πλακών. Ιδιαίτερα το παρθένο ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες και άλλα αντιοξειδωτικά που περιλαμβάνουν πολικές φαινόλες, τοκοφερόλες και καροτένοειδή. Τελευταία, έχει δειχθεί ότι η ελαιουρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη και παράγωγα της, καθώς επίσης και άλλες πολυφαινόλες προστατεύουν την LDL από την οξείδωση υποδηλώνοντας έτσι ότι πολικά αντιοξειδωτικά συστατικά του ελαιολάδου είναι δυνατόν να παρεμποδίσουν τον σχηματισμό κυτταροτοξικών προϊόντων, όπως υπεροξειδία λιπιδίων και ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αθηρωματικής βλάβης. Τα επίπεδα απορρόφησης από το ελαιόλαδο και άλλα τρόφιμα φαινολικών ουσιών δεν έχουν μελετηθεί γι' αυτό και η διερεύνηση που θα γίνει θα έχει σαν σκοπό την ανίχνευση των επιπέδων της ελευρωπαΐνης, τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στο αίμα (πλάσμα ή ορό), εάν αυτό δεν καταστεί δυνατό τότε θα γίνει εναλλακτική μέτρηση των φαινολικών ουσιών σε ούρα (2) που σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες βιοδιαθεσιμότητας η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη αποβάλλονται από τα ούρα. Η μελέτη αυτή θα πραγματοποιηθεί σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την απομόνωση και ανίχνευση της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στο αίμα (πλάσμα ή ορό) ή στα ούρα εάν οι προσπάθειες ανίχνευσης στο αίμα δεν είναι οι αναμενόμενες (δηλαδή το όριο ανίχνευσης μεθόδου είναι μικρότερο από τα επίπεδα των ουσιών που θέλουμε να μετρήσουμε). Έτσι επιλέχθηκαν 8 εθελοντές, 4 άνδρες και 4 γυναίκες με τα παρακάτω κριτήρια:

- 4 άνδρες ηλικίας 20-40 χρόνων
- Μη καπνιστές, φυσιολογικά άτομα, χωρίς σύνδρομο ή άλλο χρόνιο νόσημα
- Με δείκτη Μάζας Σώματος 20-30.

-4 γυναίκες ηλικίας 20-40 χρόνων Μη καπνιστές, φυσιολογικά άτομα, χωρίς σύνδρομο ή άλλο χρόνιο νόσημα  
Με δείκτη Μάζας Σώματος 20-30.

Ο κάθε εθελοντής ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα για δυο ημέρες. Η ελαιουρωπαΐνη λήφθηκε με την μορφή κάψουλας που περιείχε ξηρά φύλλα ελιάς με ορισμένη ποσότητα ελαιουρωπαΐνης.

### 8 εθελοντές

1 <sup>η</sup> ημέρα	Πρωί 8-9	2 ώρες από λήψη	4 ώρες από λήψη
	↑	↑	↑
	Αιμοληψία (ουροληψία) μετά από 12ωρη νηστεία	Λήψη 225 mg ελαιουρωπαΐνης	Αιμοληψία (ουροληψία)

### 8 εθελοντές

2 <sup>η</sup> ημέρα	Πρωί 8-9	2 ώρες από λήψη	4 ώρες από λήψη
	↑	↑	↑
	Αιμοληψία (ουροληψία) μετά από 12ωρη νηστεία	Λήψη 50 mg ελαιουρωπαΐνης	Αιμοληψία (ουροληψία)

Η αιμοληψία έγινε με vacutainers των 10 ml που περιέχουν αντιπηκτικό EDTA για τη συλλογή του πλάσματος και χωρίς αντιπηκτικό για τη συλλογή του ορού, για την ουροληψία χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα ουροδοχεία. Το αίμα θα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 4000 rpm σε σκοτεινό δωμάτιο και μετά από το διαχωρισμό φυλάχθηκαν στους - 80 °C μέχρι την ανάλυση ενώ τα δείγματα των ούρων φυλάχθηκαν στους 4 – 8 ° C .

Κατά τη δεύτερη φάση έγινε εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου και των αποτελεσμάτων.

**ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ  
(oleuropein, tyrosol & hydroxytyrosol) ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ  
ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.**

**A. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ  
(SPE - Solid Phase Extraction).**

Αναπτύχθηκε μέθοδος εκχύλισης (SPE, solid phase extraction) σε σύστημα αυτομάτου συσκευής εκχύλισης στερεάς φάσης (ASPEC XL GILSON). Χρησιμοποιήθηκαν στήλες C-18. αντιστρόφου φάσεως Bond Elute, (500mg - volume 3mL). .

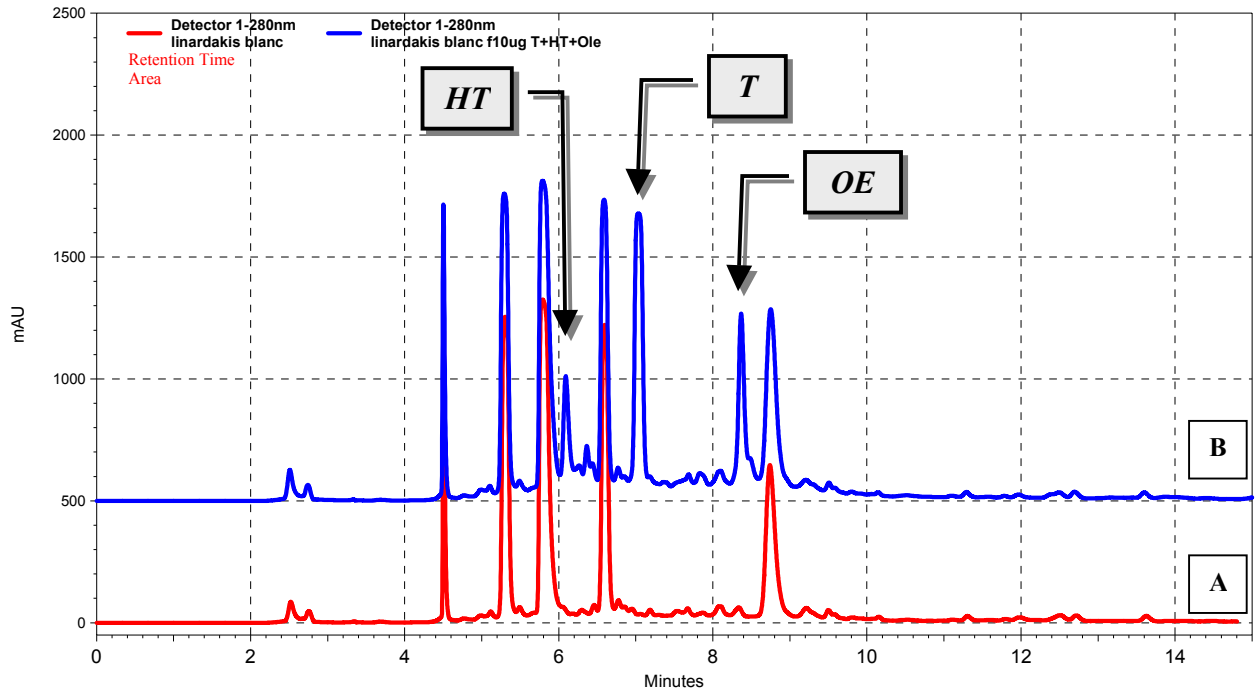
Το προϊόν έκλουσης από την διαδικασία SPE μετά από συμπύκνωση και επανασύσταση σε μίγμα μεθανόλης/νερού ενίεται στον υγρό χρωματογράφο(100μl).

**B. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ  
ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC).**

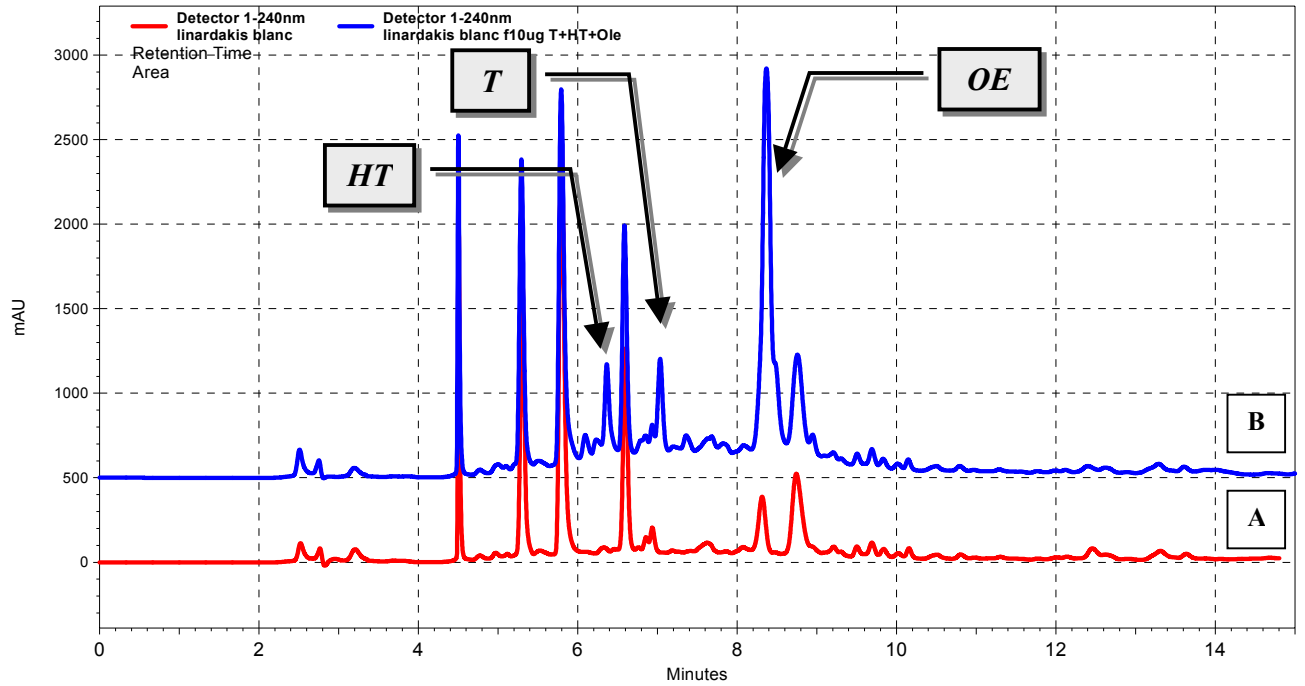
Κατά την ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιείται σύστημα υγρού χρωματογράφου της Thermo Spectra Physics (TSP), που αποτελείται από αντλία βαθμιδωτής έκλουσης – gradient elution- 4 διαλυτών P 4000, θερμοστατούμενο φούρνο, και ανιχνευτή φωτοδιόδων -diode array- UV 6000 LP και loop 100μl. Τα μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση των τριών ουσιών είναι 280 nm για την hydroxytyrosol και την tyrosol, και 240 nm για την oleuropein, διότι σε αυτά τα μήκη κύματος οι ουσίες αυτές εμφανίζουν το μέγιστο απορρόφησης. Χρησιμοποιείται χρωματογραφική στήλη αντιστρόφου φάσεως C-8, μήκους 250mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6mm και διαμέτρου σωματιδίων 7μm που διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 40°C. Η κινητή φάση του συστήματος αποτελείται από μίγμα ακετονιτριλίου (ACN) / οξικού αμμωνίου 0.05M (ammonium acetate-AMA). Οι διαλύτες απαερώνονται περιοδικά σε συσκευή αυτομάτου απαερώσεως (Finnigan TSP).

Διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν από μίγματα των τριών ουσιών σε επίπεδα 1μg/mL, 750ng/mL, 500ng/mL, 250ng/mL, 100ng/mL, 50ng/mL και 25ng/mL. Από τα διαλύματα αυτά δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς επτά σημείων για την ΟΕ με συντελεστή συσχέτισης 0,999. Στην συνέχεια παρασκευάστηκαν δείγματα ανάκτησης (fortified) και δείγματα μάρτυρες (blank), σε πλάσμα αίματος ανθρώπου για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεθόδου. Οι ανακτήσεις της μεθόδου κρίθηκαν ικανοποιητικές με 92% ανάκτηση. Δημιουργήθηκε καμπύλη

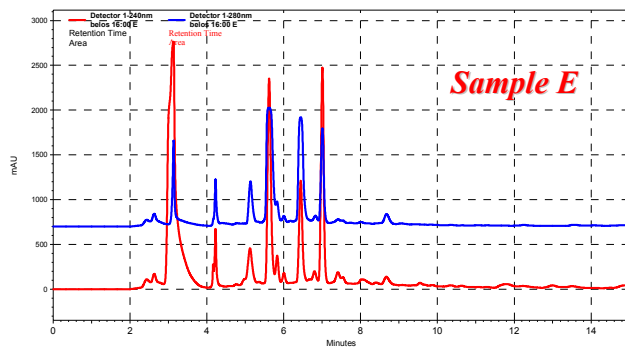
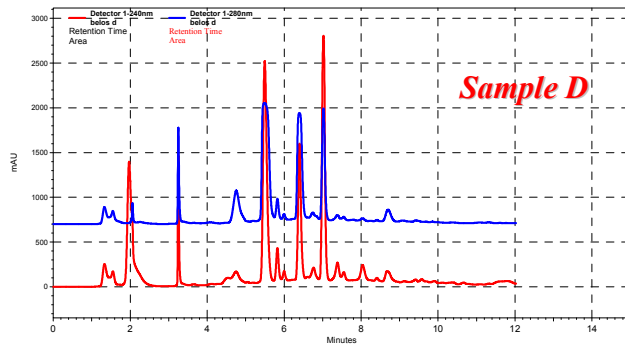
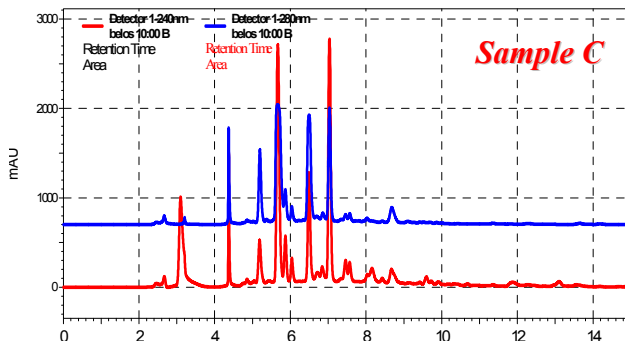
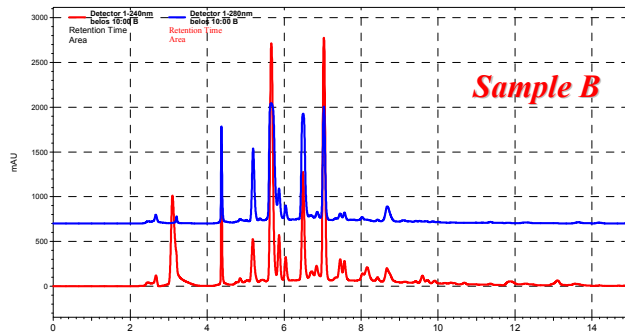
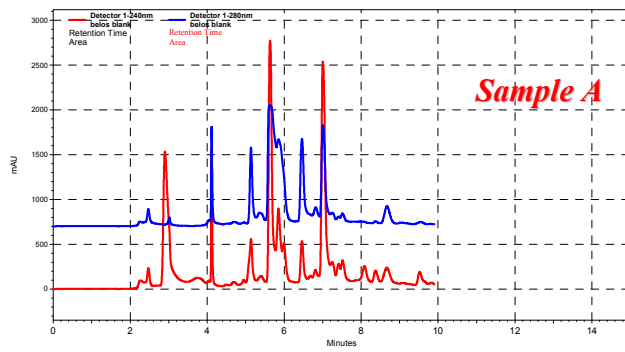
αναφοράς επτά σημείων με εύρος από 1000ng έως 7.5ng (on column) της ολευροϋίν από το πλάσμα αίματος με συντελεστή γραμμικότητας 0,999. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για την ολευροϋίν κυμάνθηκαν στα 7.5ng. Στους χρόνους έκλουσης των τριών ουσιών δεν εμφανίζεται καμία παρεμπόδιση από το υπόστρωμα του δείγματος μάρτυρα.



Το χρωματογράφημα A αντιστοιχεί στο δείγμα blank (πλάσμα Λιναρδάκης), ενώ το χρωματογράφημα B αντιστοιχεί σε δείγμα πλάσμα fortified με τις τρεις ουσίες σε επίπεδο 10μg. Μέγιστη απορρόφηση tyrosol και hydroxytyrosol στα **280 nm**.



Το χρωματογράφημα Α αντιστοιχεί στο δείγμα blank (πλάσμα Λιναρδάκης), ενώ το χρωματογράφημα Β αντιστοιχεί σε δείγμα πλάσμα fortified με τις τρεις ουσίες σε επίπεδο 10µg. Μέγιστη απορρόφηση oleuropein στα **240 nm**.



Για τα επτά δείγματα (Σαρρή, Μπερβανάκη, Μοσχανδρέα, Παπαδάκη, Κάτσης, Κυριακάκης, Λιναρδάκης), δεν ανιχνεύθηκε μετρήσιμη ποσότητα των τριών ουσιών. Στα δείγματα “Μπέλλος” συμπεριλαμβανομένου και του blank, ανιχνεύθηκαν ποσότητες **T**, **HT**, ενώ στο blank ανιχνεύθηκε και μικρή ποσότης **OE**. Η ποσότης της **T** παρέμεινε σταθερή στις διαδοχικές δειγματοληψίες, ενώ η **HT** μειώθηκε σταδιακά. (Στο ανωτέρω σχήμα φαίνονται τα πέντε χρωματογραφήματα από την ανάλυση των διαδοχικών δειγματοληψιών του “Μπέλλος”).

## **Βιβλιογραφία**

- Francesco Visioli, Claudio Galli , Francis Bornet, Alissa Mattei, Rossana Patelli, Giovana Galli, Donatella Caruso (2000) FEBS Letters 468 159 – 160.
- Donatella Caruso, Roberto Colombo, , Rossana Patelli, Flavio Giavarini, Giovanni Galli.(2000) J. Agric. Food Chem 48 1182 – 1185.
- G. Maiani, E. Azzini, M. Ghiselli, M. Serafini and A. Ferro- Luzzi (1996) Natu. Antio. and Food Quality in Atheor. And Cancer Prevention 264 – 272.
- G. Bohuon, A. Baron, J.- F. Drilleau (1991) J. of Chromatography, 555 125 – 136.
- C. Giovannini, E. Straface, D. Modesti, E. Coni, A. Cantafora, M. De Vincenzi, (1999) J. Nutr. 1269 – 1277
- Francesco Visioli, Donatella Caruso, Claudio Galli, Serena Viappiani, Giovanni Calli, Angelo Sala.(2000) Biochemical Research Communications 278 797 – 799.
- Rocio Abia, Javier S. Perona, Yolanda M. Pacheco, Emilio Montero, Francisco J. G. Muriana and Valentina Ruiz – Gutierrez. (1999) J. Nutr. 129 2184 - 2191.
- Chen Bai, Xiaojun Yan, Makiko Takenaka, Keizo Sekiya and Tadahiro Nagata. (1998) J. Agric. Food Chem. 46 3998 – 4001.
- M. Carmen Ramirez- Trotosa, Gloria Urbano, Maria Lopez- Jurado, Teresa Nestares, Maria C. Gomez, Amalia Mir, Eduardo Ros, Jose Mataix, Angel Gi. (1999) J. Nutr. 129 2177 – 2183.
- Tair Lapidot, Stela Harel, Rina Granit, and Joseph Kanner. (1998) J. Agric. Food Chem 46 ,10 4297 – 4302.
- Luciana Mosca, Carlo De Marco, Francesco Visioli, and Carlo Cannela. (2000) J. Agrc. Chem. 48 297 – 301.