



Πανεπιστήμιο Κύπρου  
Τμήμα Χημείας

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΟΞΑΝΘΙΝΩΝ ΣΤΗ ΣΑΡΚΑ ΚΑΙ  
ΣΤΟΥΣ ΣΠΟΡΟΥΣ ΧΑΡΟΥΠΙΟΥ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ  
ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**

**ΧΡΥΣΗ Α. ΤΟΜΟΥΖΟΥ**

**ΜΑΙΟΣ 2021**



Πανεπιστήμιο Κύπρου  
Τμήμα Χημείας

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΡΥΣΗ Α. ΤΟΜΟΥΖΟΥ

### ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Καθηγητής Ιωάννης Πασχαλίδης
2. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Καπνίση - Χριστοδούλου

### ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΟΣ:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευτυχία Πινακουλάκη

ΜΑΙΟΣ 2021

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για τη συνεργασία μας, τη βοήθεια, την κατανόηση και τις συμβουλές της για την επίτευξη της έρευνας αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την εξεταστική επιτροπή, τον Καθηγητή Ιωάννη Πασχαλίδη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Καπνίση Χριστοδούλου που αποδέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, καθώς και για τις υποδείξεις τους στην τελική επιμέλεια του κειμένου της διατριβής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω επιπλέον τη Δρ. Καπνίση για τη δυνατότητα χρήσης ορισμένων οργάνων που βρίσκονταν εντός του Εργαστηρίου Ενόργανης Ανάλυσης, όπως τη συσκευή Λυοφιώσεως (freeze dryer) και του Ομογενοποιητή. Επίσης και το Δρ. Νικολαΐδη για τη δυνατότητα χρήσης της συσκευής περιστροφικής εξάτμισης υπό κενό (rotovapor) στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοαναλυτικής Χημείας για τη συνεργασία που είχαμε, καθώς και τις ερευνητικές ομάδες των Εργαστηρίων Ενόργανης Ανάλυσης, Χημείας Φουλερενίων και Υπερμοριακής Χημείας, Χημείας Μεταλλικών Πλειάδων, Οργανικής Χημείας και Χημικής Βιολογία, Ραδιοαναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας για τη βοήθειά τους οποιαδήποτε στιγμή τη ζητούσα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες όμως οφείλω στη Χάρια Χατζηπάκκου για την υποστήριξη της, τόσο την εργαστηριακή όσο και τη ψυχολογική καθώς και τη δύναμη που μου έδωσε για την ολοκλήρωση της έρευνας. Η αλήθεια ένα ευχαριστώ είναι πολύ λίγο...

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καφεΐνη, η θεοβρωμίνη και η θεοφυλλίνη είναι ανάμεσα στις πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις από την κατηγορία των μεθυλοξανθινών σε τρόφιμα όπως αυτά που περιέχουν κακάο, αλλά και σε ροφήματα όπως ο καφές και το τσάι. Το χαρούπι αποτελεί ένα φρούτο, το οποίο αναδεικνύεται τα τελευταία χρόνια ως πιθανό υποκατάστατο του κακάο. Μεταξύ των αναφερόμενων πλεονεκτημάτων του χαρουπιού έναντι του κακάο είναι η σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα (περίπου 50 φορές) σε καφεΐνη και θεοβρωμίνη. Ωστόσο, πιθανόν να μην ισχύει το ίδιο για τη θεοφυλλίνη, η οποία βρίσκεται σε ίχνη ή απουσιάζει από το κακάο, ενώ μελέτες που αφορούν την παρουσία της στο χαρούπι έχουν πραγματοποιηθεί σε ένα μικρό μόνο αριθμό ποικιλιών. Πιο συγκεκριμένα, σε πορτογαλικές ποικιλίες χαρουπιού, η θεοφυλλίνη ανιχνεύθηκε σε σημαντικές ποσότητες σε εκχυλίσματα άλευρου (σπόροι), ενώ η παρουσία της παρατηρήθηκε στη σάρκα μόνο σε κάποιες από αυτές.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή απορρόφησης UV-Vis για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των μεθυλοξανθινών στη σάρκα και τους σπόρους χαρουπιών κυπριακής και ελληνικής προέλευσης, καθώς επίσης και στα φύλλα χαρουπιάς. Στην πλειοψηφία των δειγμάτων ώριμων σπόρων χαρουπιού η μεθυλοξανθίνη που ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε σχετικά σημαντικές συγκεντρώσεις ήταν η θεοφυλλίνη (TF). Η υψηλότερη συγκέντρωση της θεοφυλλίνης καταγράφηκε σε δείγμα της επαρχίας Λάρνακας και ήταν 37  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (4607  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος). Σε δείγματα από την επαρχία Πάφου και Λεμεσού η θεοφυλλίνη βρέθηκε σε συγκέντρωση 21  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (1617  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) και 34  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (1745  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος), αντίστοιχα. Στα δείγματα σπόρων χαρουπιού κυπριακής προέλευσης ανιχνεύθηκε επίσης η καφεΐνη, όμως βρέθηκε σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, με την υψηλότερη συγκέντρωση να φτάνει στα 13  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (179  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) σε δείγμα της επαρχίας Πάφου. Στα δείγματα σπόρων χαρουπιού κρητικής προέλευσης, ανιχνεύθηκε η θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση 7  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (319  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος). Επίσης, οι μεθυλοξανθίνες, θεοφυλλίνη και καφεΐνη εμφανίστηκαν σε συγκέντρωση 2  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (64  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) και 15  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (656  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος), αντίστοιχα. Αντίθετα, σε δείγματα σπόρων από άγουρα χαρούπια η μεθυλοξανθίνη η οποία ποσοτικοποιήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ήταν η καφεΐνη (CAF) σε μέση τιμή συγκέντρωσης 38  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων. Επιπρόσθετα, στην πλειοψηφία των δειγμάτων σάρκας ώριμων και άγουρων χαρουπιών δεν ανιχνεύθηκαν μεθυλοξανθίνες.

Εξάιρεση αποτελεί δείγμα ώριμης σάρκας από την επαρχία Πάφου στο οποίο ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η παρουσία των τριών μεθυλοξανθινών, με τη θεοφυλλίνη (TF) και την καφεΐνη να βρίσκονται σε συγκέντρωση περίπου 32  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας και τη θεοβρωμίνη σε συγκέντρωση 7  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας. Σε ένα δείγμα της Κρήτης βρέθηκε η παρουσία της θεοβρωμίνης και της θεοφυλλίνης σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Στα δείγματα φύλλων που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκε η παρουσία της καφεΐνης σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις με την υψηλότερη να φτάνει στα 15  $\mu\text{g/g}$  σκόνης φύλλων.

**ABSTRACT**

Caffeine, theobromine and theophylline are among the most common compounds in the category of methylxanthines in foods such as those containing cocoa, but also in beverages such as coffee and tea. Carob is a fruit that has emerged in recent years as a possible substitute for cocoa. Among the reported advantages of locust bean over cocoa is the significantly lower content (about 50 times) of caffeine and theobromine. However, the same may not be true of theophylline, which is found or absent in cocoa, and studies on its presence in locust bean have been performed on only a small number of varieties. More specifically, in Portuguese carob varieties, theophylline was detected in significant quantities in flour extracts (seeds), while its presence was observed in the pulp only in some of them.

In the present work, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV-Vis absorption detector was used to detect and quantify methylxanthines in the pulps and seeds in carobs of Cypriot and Greek origin, as well as in carob leaves. In the majority of carobs seeds samples the methylxanthine detected and quantified at relatively significant concentrations was theophylline (TF). The highest concentration of theophylline was recorded in a sample from Larnaca and was 37  $\mu\text{g} / \text{g}$  of carob seeds powder (4607  $\mu\text{g} / \text{g}$  of extract). In samples from the districts of Paphos and Limassol, theophylline was found at concentration of 21  $\mu\text{g} / \text{g}$  carob seeds powder (1617  $\mu\text{g} / \text{g}$  extract) and 34  $\mu\text{g} / \text{g}$  carob seeds powder (1745  $\mu\text{g} / \text{g}$  extract), respectively. Caffeine was also detected in carob seed samples of Cypriot origin, but was found in relatively low concentrations, with the highest concentration reaching 13  $\mu\text{g} / \text{g}$  of carob seed powder (179  $\mu\text{g} / \text{g}$  of extract) in a sample from Paphos. In the carob seed samples from Crete, theobromine was detected at concentration of 7  $\mu\text{g} / \text{g}$  carob seeds powder (319  $\mu\text{g} / \text{g}$  extract). In addition, theophylline and caffeine were present at a concentration of 2  $\mu\text{g} / \text{g}$  carob seeds powder (64  $\mu\text{g} / \text{g}$  extract) and 15  $\mu\text{g} / \text{g}$  carob seeds powder (656  $\mu\text{g} / \text{g}$  extract), respectively. In contrast, in seed samples from unripe carobs the methylxanthine that was quantified at higher concentrations was caffeine (CAF) at an average concentration of 38  $\mu\text{g} / \text{g}$  seed powder. Moreover, methylxanthines were not detected in the majority of ripe and unripe carobs pulp samples. An exception is a sample of ripe pulps from Paphos, where the presence of the three methylxanthines was detected, with theophylline (TF) and caffeine at a concentration of approximately 32  $\mu\text{g} / \text{g}$  pulp powder and theobromine at a concentration of 7  $\mu\text{g} / \text{g}$  pulp powder. In a sample from Crete the presence of theobromine and theophylline was found in a very low concentration. In the leaf samples examined, the presence of caffeine was detected in relatively low concentrations with the highest reaching 15  $\mu\text{g} / \text{g}$  of leaf powder.

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

	Σελίδα
Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	ii
Abstract.....	iv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	xii
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ</b>	
1.1.Εισαγωγή.....	1
1.2. Στόχος και πρωτοτυπία.....	2
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
2.1. Γενικά.....	3
2.2. Χαρακτηριστικά Χαρουπιάς.....	4
2.3. Χρήσεις των χαρουπιών.....	6
2.4. Χημική σύσταση.....	10
2.5. Μεθυλοξανθίνες.....	13
2.5.1. Δράση Καφεΐνης στον άνθρωπο.....	14
2.5.2. Δράση Θεοφυλλίνης στον άνθρωπο.....	16
2.5.3. Δράση Θεοβρωμίνης στον άνθρωπο.....	17
2.5.4. Βιοσύνθεση Αλκαλοειδών πουρίνης.....	18
2.5.5. Μεταβολισμός – Καταβολισμός Αλκαλοειδών πουρίνης.....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	
3.1. Προσδιορισμό μεθυλοξανθινών στο χαρούπι και σε προϊόντα χαρουπιού.....	21
3.2. Τεχνικές εκχύλισης.....	27
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
4.1. Χημικά.....	30
4.2. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων μεθυλοξανθινών.....	30

4.3. Εκχύλιση μεθυλοξανθινών από σκόνη χαρουπιού.....	30
4.4. Χρωματογραφικές συνθήκες.....	34

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

5.1. Βελτίωση της μεθόδου HPLC για την ανάλυση των μεθυλοξανθινών.....	35
5.2. Αξιολόγηση της μεθόδου HPLC.....	41
5.2.1. Επαναληψιμότητα και ενδιάμεση ακρίβεια.....	41
5.2.2. Γραμμικότητα.....	42
5.2.3. Όρια Ανίχνευσης (LOD) και Όρια Ποσοτικοποίησης (LOQ).....	43
5.3. Μέθοδοι εκχύλισης μεθυλοξανθινών από χαρούπι.....	44
5.4. Περιεκτικότητα μεθυλοξανθινών στα εκχυλίσματα σκόνης χαρουπιού .....	45
5.4.1. Δείγματα Σπόρων Ωριμων Χαρουπιών .....	45
5.4.2. Δείγματα Σπόρων Άγουρων Χαρουπιών.....	49
5.4.3. Δείγματα Σάρκας Ωριμων Χαρουπιών .....	50
5.4.4. Δείγματα Σάρκας Άγουρων Χαρουπιών .....	52
5.4.5 Δείγματα Φύλλων Χαρουπιάς.....	53

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

6.1. Συμπεράσματα.....	55
6.2. Μελλοντική Εργασία.....	57

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	59
---------------------------------	----



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	Σελίδα
<b>Σχήμα 2.1:</b> Παγκόσμια καλλιέργεια της χαρουπιάς.	3
<b>Σχήμα 2.2:</b> Η μορφολογία του δέντρου της χαρουπιάς και τα φύλλα της.	4
<b>Σχήμα 2.3:</b> Τα άνθη της χαρουπιάς.	4
<b>Σχήμα 2.4:</b> Ο καρπός της χαρουπιάς πριν και μετά την ωρίμανση & η σχηματική απεικόνιση του λοβού και του σπόρου του χαρουπιού.	5
<b>Σχήμα 2.5:</b> Μεταποίηση χαρουπιών.	7
<b>Σχήμα 2.6:</b> Το κόμμι του χαρουπιού.	8
<b>Σχήμα 2.7:</b> Σκόνη χαρουπιού vs σκόνη κακάο.	8
<b>Σχήμα 2.8:</b> Προϊόντα που παράγονται από το χαρούπι.	10
<b>Σχήμα 2.9:</b> Τα κύρια συστατικά σε σάρκα και σπόρους χαρουπιού.	12
<b>Σχήμα 2.10:</b> Συντακτικοί τύποι των μεθυλξανθινών με τις εμπειρικές & IUPAC ονομασίες τους.	14
<b>Σχήμα 2.11:</b> Η κύρια βιοσυνθετική οδός καφεΐνης από ξανθοσίνη. Αρκετές N-μεθυλοτρανσφεράσες (SAM) με διαφορετικές εξειδικεύσεις υποστρώματος συμβάλλουν στη μετατροπή ως προς τον σχηματισμό της καφεΐνης.	19
<b>Σχήμα 2.12:</b> Καταβολικές οδοί της καφεΐνης αλλά και των άλλων αλκαλοειδών πουρίνης.	20
<b>Σχήμα 5.1:</b> Χρωματογραφήματα μεταβάλλοντας την εκατοστιαία ποσότητα των διαλυτών σε σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενο από H <sub>2</sub> O:ACN. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1η Θεοβρωμίνη (TB), 2η Θεοφυλλίνη (TF) και 3η Καφεΐνη (CAF).	36

<b>Σχήμα 5.2:</b>	Χρωματογράφημα ελέγχου συστήματος κινητής φάσης αποτελούμενη από H <sub>2</sub> O : MeOH σύστασης 70:30. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1 <sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2 <sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3 <sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).	37
<b>Σχήμα 5.3:</b>	Μεταβολή ταχύτητα ροής κινητής φάσης σε σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενο από 80 H <sub>2</sub> O : 20 ACN. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1 <sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2 <sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3 <sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).	38
<b>Σχήμα 5.4:</b>	Μεταβολή ταχύτητα ροής κινητής φάσης σε σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενο από 90 H <sub>2</sub> O : 10 ACN. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1 <sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2 <sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3 <sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).	39
<b>Σχήμα 5.5:</b>	Χρωματογραφήματα των δυο ιδανικών συστημάτων κινητής φάσης (H <sub>2</sub> O:ACN και H <sub>2</sub> O:MeOH). Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1 <sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2 <sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3 <sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).	39
<b>Σχήμα 5.6:</b>	Χρωματογραφήματα μείγματος πρότυπων διαλυμάτων μεθυλοξανθινών για συγκεντρώσεις 0,5 - 10 µg/ml.	42
<b>Σχήμα 5.7:</b>	Καμπύλες βαθμονόμησης πρότυπων μεθυλοξανθινών.	42
<b>Σχήμα 5.8:</b>	Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού (μπλε) στο οποίο έγινε ταυτοποίηση κορυφών με χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος μεθυλοξανθινών (πορτοκαλί)..	44
<b>Σχήμα 5.9:</b>	Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων σπόρων χαρουπιού από Λάρνακα στα οποία ανιχνεύθηκε η παρουσία της TF και της CAF στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών και πρότυπης TF	46
<b>Σχήμα 5.10:</b>	Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων σπόρων χαρουπιού από Πάφο στα οποία ανιχνεύθηκε η παρουσία της TF και της CAF στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών και πρότυπης TF.	46

- Σχήμα 5.11:** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σπόρων χαρουπιού από Λεμεσό στο οποίο ανιχνεύθηκε η παρουσία της TF στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση της κορυφής με τη χρήση της μεθόδου Spiking πρότυπης TF.. 47
- Σχήμα 5.12:** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σπόρων χαρουπιού από Κρήτη στο οποίο ανιχνεύθηκε η παρουσία των μεθυλοξανθινών στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών. 48
- Σχήμα 5.13:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων άγουρων σπόρων από Λάρνακα στα οποία ανιχνεύθηκαν κάποιες από τις μεθυλοξανθίνες στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών 49
- Σχήμα 5.14:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων σάρκας από Πάφο και Κρήτη στα οποία ανιχνεύθηκαν κάποιες από τις μεθυλοξανθίνες στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών 50
- Σχήμα 5.15:** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σάρκας άγουρων χαρουπιών από τη Λάρνακα στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών. 52
- Σχήμα 5.16:** Χρωματογραφήματα με ανίχνευση στα 273 nm εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιού από την Λάρνακα. Έγινε έλεγχος της παρουσίας των μεθυλοξανθινών με σύγκριση του μείγματος πρότυπων ουσιών. 54

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελίδα
<b>Πίνακας 2.1:</b> Τα κύρια αλκαλοειδή που απομονώνονται σε διάφορα φυτά.	14
<b>Πίνακας 3.1:</b> Συνοπτικές πειραματικές συνθήκες HPLC που αναφέρονται στη βιβλιογραφία	25
<b>Πίνακας 3.2:</b> Περιεκτικότητα των μεθυλοξανθινών σε δείγματα σπόρων και σάρκας χαρουπιού και προϊόντων χαρουπιού.	26
<b>Πίνακας 3.3:</b> Συνοπτικές πειραματικές διαδικασίες μεθόδων εκχύλισης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.	29
<b>Πίνακας 4.1:</b> Συνοπτικές πειραματικές διαδικασίες των τεχνικών εκχύλισης που πραγματοποιήθηκαν.	33
<b>Πίνακας 5.1:</b> Συνθήκες των μεθόδων HPLC που πραγματοποιήθηκαν.	40
<b>Πίνακας 5.2:</b> Χρόνοι έκλυσης ( $t_R$ ) των μεθυλοξανθινών και Διαχωριστική Ικανότητα ( $R_s$ ) των προσδιοριζόμενων ουσιών.	40
<b>Πίνακας 5.3:</b> Οι εξισώσεις της καμπύλης βαθμονόμησης, ο συντελεστής συσχέτισης τους και οι τιμές $RSD_{(time)}$ (%), $RSD_{(area)}$ (%), LOD και LOQ για τη θεοβρωμίνη, τη θεοφυλλίνη και την καφεΐνη, αντίστοιχα.	43
<b>Πίνακας 5.4:</b> Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σπόρων χαρουπιού) και ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα σπόρων ώριμων χαρουπιού της Κύπρου και της Κρήτης.	48
<b>Πίνακας 5.5:</b> Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σπόρων χαρουπιού) και ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα σπόρων άγουρων χαρουπιών.	49
<b>Πίνακας 5.6:</b> Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού) και ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα ώριμης σάρκας της Κύπρου και της Κρήτης.	51
<b>Πίνακας 5.7:</b> Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού) και ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα σάρκας άγουρων χαρουπιών.	52
<b>Πίνακας 5.8:</b> Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σκόνης φύλλων) και ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα φύλλων χαρουπιού.	54

**ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ**

ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
CAF	Caffeine	Καφεΐνη
Carrez I	Zinc Acetate Dihydrate	Διένυδρος Οξικός Ψευδάργυρος
Carrez II	Potassium Hexacyano-Ferrate (II)-3 Water	Τριένυδρο Εξακυανοσιδηρούχο (II) Κάλιο
CO <sub>2</sub>	Carbon Dioxide	Διοξείδιο του Άνθρακα
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Συστοιχίας Διόδων
E410	Natural Additive	Φυσικό Πρόσθετο
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων
H <sub>2</sub> O	Water	Νερό
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
LBG	Locust Bean Gum	Κόμμι Χαρουπιού
LOD	Limited Of Detection	Όριο Ανίχνευσης
LOQ	Limited Of Quantification	Όριο Ποσοτικοποίησης
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MS	Mass Spectrometry	Φασματογράφος Μάζας
NH <sub>3</sub>	Ammonia	Αμμωνία
NP	Normal Phase	Κανονική Φάση

---

RP	Reversed Phase	Αντίστροφη Φάση
Rs	Resolution	Διαχωριστική Ικανότητα
RSD	Relative Standard Deviation	Επαναληψιμότητα
TB	Theobromine	Θεοβρωμίνη
TF	Theophylline	Θεοφυλλίνη
$t_R$	Retention Time	Χρόνος Κατακράτησης
UV	Ultraviolet Detector	Υπεριώδης Ακτινοβολία

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ

### 1.1. Εισαγωγή

Οι κυριότερες μεθυλοξανθίνες που απαντώνται σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης όπως ο καφές, το τσάι και το κακάο είναι η καφεΐνη, η θεοφυλλίνη και η θεοβρωμίνη [1]. Η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μεθυλοξανθίνες δημιουργεί ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα λόγω των πιθανών θετικών αλλά και αρνητικών επιδράσεων που επιφέρουν στην ανθρώπινη υγεία [2]. Ορισμένες από τις θετικές επιδράσεις που επιφέρει η κατανάλωση των μεθυλοξανθινών είναι η διέγερση του Κ.Ν.Σ που έχει ως αποτέλεσμα την εγρήγορση, τη βοήθεια στη μνήμη και τη δράση ενάντια στην υπνηλία [3]. Επίσης διεγείρεται η καρδιακή, η αναπνευστική και η νεφρική λειτουργία [3, 4]. Παρόλα αυτά, η κατανάλωση μεθυλοξανθινών πέραν των επιτρεπτών ποσοτήτων όπως αναφέρει η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA), μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες. Κάποιες από αυτές είναι η καρδιακή αρρυθμία, υπέρταση και κόπωση, πονοκέφαλος, ναυτία και τάση για εμετό, όπως επίσης και έκκριση γαστρικού υγρού έχοντας ως αποτέλεσμα γαστροϊσοφαγική παλινδρόμηση [4, 5, 6].

Το χαρούπι, το οποίο προωθείται τα τελευταία χρόνια ως υποκατάστατο του κακάο, αναφέρεται ως ένα τρόφιμο που περιέχει καφεΐνη και θεοβρωμίνη, αλλά σε σημαντικά χαμηλότερες ποσότητες σε σχέση με το κακάο [2]. Σημαντικό είναι το κενό που υπάρχει στη βιβλιογραφία αναφορικά με την παρουσία της θεοφυλλίνης στο χαρούπι, καθώς οι μελέτες που διερεύνησαν την παρουσία της σε δείγματα χαρουπιού είναι περιορισμένες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη σε πορτογαλικές ποικιλίες χαρουπιού, στην οποία η θεοφυλλίνη αναφέρεται ως η πλέον άφθονη ένωση σε μεθανολικά εκχυλίσματα αλεύρου (προερχόμενο από σπόρους χαρουπιού) ανάμεσα στις ενώσεις (πολυφαινόλες) που αναλύθηκαν [7]. Αντίθετα, στην περίπτωση της σάρκας των πορτογαλικών ποικιλιών χαρουπιού, η θεοφυλλίνη ανιχνεύεται σε ορισμένες μόνο από αυτές [8]. Τέλος, μελέτη ιταλικής ποικιλίας χαρουπιού αναφέρει ότι δεν ανιχνεύεται η θεοφυλλίνη στην ποικιλία αυτή [9]. Πραγματοποιήθηκε και ένα μικρός αριθμός μελετών για τον προσδιορισμό της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης στη σάρκα των χαρουπιών όπου ορίστηκαν ως μη ανιχνεύσιμες ή αν εντοπίστηκαν βρέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις [10-12].

## 1.2.Στόχος και πρωτοτυπία

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της παρουσίας των μεθυλοξανθινών, καφεΐνης, θεοβρωμίνης και θεοφυλλίνης στους σπόρους και τη σάρκα χαρουπιού κυπριακής και ελληνικής προέλευσης με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Επισημαίνεται ότι η παρουσία της θεοφυλλίνης σε χαρούπια κυπριακής και ελληνικής προέλευσης δεν έχει μελετηθεί ακόμα. Πρωτοτυπία της εργασίας αποτελεί, επίσης, η σύγκριση άγουρων και ώριμων χαρουπιών, ώστε να διαπιστωθεί εάν η ωρίμανση επηρεάζει την ποσότητα και το προφίλ των μεθυλοξανθινών. Η ανάλυση πραγματοποιείται τόσο στη σάρκα όσο και στους σπόρους χαρουπιού, αλλά και σε δείγματα φύλλων χαρουπιάς, προκειμένου να ελεγχθεί η κατανομή των μεθυλοξανθινών στα μέρη αυτά.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1.Γενικά

Η χαρουπιά (ξυλοκερατιά, τερατσιά) ανήκει στην οικογένεια Leguminosae, στο γένος *Ceratonia siliqua* L. Η ονομασία της χαρουπιάς προέρχεται από την ελληνική λέξη κέρασ (κέρατο) και τη λατινική λέξη «siliqua» εκφράζοντας τη σκληρότητα και το σχήμα του λοβού [13, 14].

Η κύρια χώρα καταγωγής του φυτού είναι η Μέση Ανατολή και αποτελεί σημαντικό στοιχείο της μεσογειακής χλωρίδας [14]. Εκτός από τη μεσογειακή λεκάνη όπου μπορεί κανείς να εντοπίσει τις χαρουπιές όπως την Ισπανία, Ιταλία, Πορτογαλία, Ελλάδα, Κύπρος, Μάλτα, καλλιεργούνται και σε άλλες χώρες όπως το Μαρόκο, το Ισραήλ, τη Τουρκία, τη Τυνησία, την Παλαιστίνη, το Λίβανο και την Αίγυπτο [16, 17]. Ακόμη και σε περιοχές της Αμερικής μπορεί να καλλιεργηθεί, όπως στην Καλιφόρνια, στο Μεξικό, στη Χιλή, στην Αυστραλία, στη Νότια Αφρική όπου παρατηρείται παρόμοιο κλίμα με το Μεσογειακό [15, 18] (Σχήμα 2.1).



**Σχήμα 2.1:** Παγκόσμια καλλιέργεια της χαρουπιάς [14].

Σύμφωνα με τα στοιχεία του 2012 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), η καλλιεργούμενη έκταση της χαρουπιάς ανέρχεται σε 82.000 εκτάρια περίπου παγκοσμίως. Αυτή η έκταση αντιστοιχεί σε μια ετήσια παραγωγή της τάξης των 170.000 τόνων περίπου [14, 18], πράγμα που εξαρτάται σημαντικά από την αποδοτικότητα του δέντρου σε παραγωγή καρπού. Η αποδοτικότητα εξαρτάται από ελεγχόμενους και μη παράγοντες, όπως οι ποικιλίες των χαρουπιών, οι καλλιεργητικές φροντίδες που ακολουθούνται, οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην κάθε χώρα, και από πολλές άλλες αιτίες [14, 15].

## 2.2.Χαρακτηριστικά Χαρουπιάς

Η χαρουπιά είναι δέντρο αειθαλές και μακρόβιο, μέτριου έως μεγάλου μεγέθους. Μπορεί να φθάσει τα 10 μέτρα ύψος με πλαγιόκλαδη κυρίως βλάστηση, κόμη σφαιρική και δυνατούς βλαστούς με τραχύ φλοιό.

Τα φύλλα έχουν χρώμα χαλκοκόκκινο στη νεαρή ηλικία και βαθυπράσινο όταν ωριμάσουν. Είναι λεία και δερματώδη και καλύπτονται από κηρώδη επίστρωση που αποτρέπει την απώλεια υγρασίας σε ημίξηρα κλίματα. Γυαλιστερά από πάνω και ωχροπράσινα από κάτω [14, 15] (Σχήμα 2.2).



**Σχήμα 2.2:** Η μορφολογία του δέντρου της χαρουπιάς και τα φύλλα της [w1].

Το χαρουπόδεντρο ανθίζει σε συγκεκριμένη περίοδο, αρχίζοντας από τα τέλη Αυγούστου και ολοκληρώνεται η ανθοφορία του το Νοέμβριο [14]. Ο χρόνος και η διάρκεια της περιόδου άνθησης εξαρτάται από τις τοπικές κλιματικές συνθήκες [17]. Τα άνθη έχουν χρώμα πρασινοκόκκινο και δυσάρεστη (βαριά) οσμή (κυρίως τα αρσενικά). Διακρίνονται σε αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα. Μόνο ένα ορισμένο ποσοστό από τα άνθη αποδίδει καρπούς [14, 15] (Σχήμα 2.3).



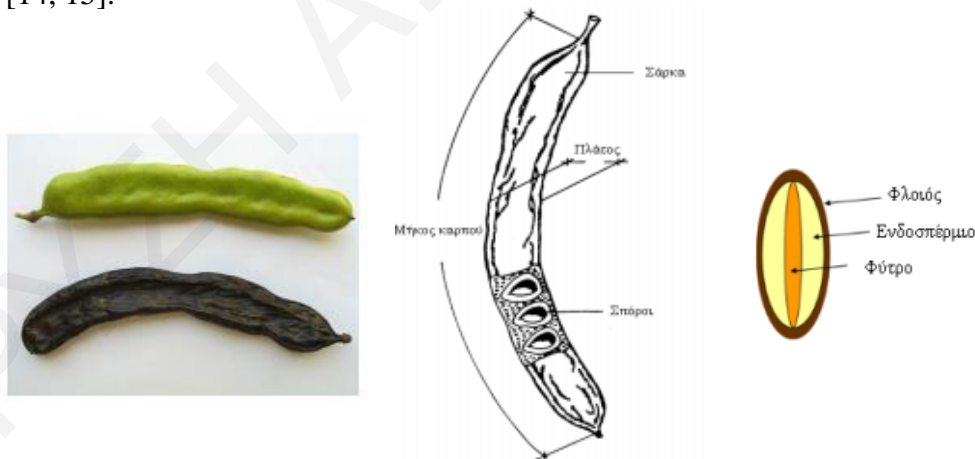
**Σχήμα 2.3:** Τα άνθη της χαρουπιάς [w2].

Οι καρποί της χαρουπιάς είναι μακριοί, σφιχτοί και σκληροί πράσινου χρώματος όταν είναι άγουροι [15], ευθύγραμμοι ή καμπυλωτοί (τοξοειδής) [20]. Όταν ωριμάσουν αποκτούν σκούρο καφέ χρώμα, ξυλώδη και συρρικνωμένη μορφή, δερματώδη υφή [14], λόγω της

μείωσης της περιεκτικότητας του σε υγρασία [18]. Αποτελούνται κατά 90% από σάρκα (πούλπα), που είναι πλούσια σε σακχαρόζη, γλυκόζη, κυτταρίνη και τανίνες, και κατά 10% από σπόρους [14].

Ο ώριμος καρπός της χαρουπιάς έχει βάρος 5 μέχρι 30g, μήκος από 10 έως 30 cm και πλάτος από 1,5 μέχρι 3,5 cm με τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία του και τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή όπου αναπτύσσεται [17, 18, 20], (Σχήμα 2.4). Συγκεκριμένα ο καρπός αποτελείται από το εξωτερικό περίβλημα του καρπού που ονομάζεται περικάρπιο και είναι σκληρό με δερματώδες περίβλημα και το μεσοκάρπιο που είναι το εσωτερικό του καρπού που είναι μαλακότερο, σαρκώδες και πλούσιο σε σάκχαρα.

Κάθε καρπός περιέχει περίπου 10-16 σκληρά σπέρματα, γυαλιστερά και κεραμόχροα [14], όπου είναι διατεταγμένοι με γραμμικό μη επικαλυπτόμενο τρόπο [17] μέσα σε εγκάρσια κοιλότητα [15] στο μεσοκάρπιο της σάρκας. Είναι συμπιεσμένοι και ελαφρώς επιμηκισμένοι με διαστάσεις 8 έως 10 mm μήκος, 7 έως 8 mm πλάτος και 3 έως 5 mm πάχος [17]. Οι σπόροι και αυτοί με τη σειρά τους απαρτίζονται από το φλοιό (30-35%), το ενδοσπέρμιο (35-45%) και το φυτό (25-30%) [15, 20, 21]. Χαρακτηριστικό των σπερμάτων είναι ότι έχουν όλα το ίδιο βάρος. Λέγεται ότι το μέτρημα του χρυσού γινόταν με αυτά. Από αυτό άλλωστε προέρχεται και η μονάδα βάρους ‘καράτι’ όπου πήρε το όνομα του από το κέρατο, δηλαδή το χαρούπι [14, 15].



**Σχήμα 2.4:** Ο καρπός της χαρουπιάς πριν και μετά την ωρίμανση [w1] & η σχηματική απεικόνιση του λοβού και του σπόρου του χαρουπιού [17].

Ενδείξεις που δηλώνουν ότι τα χαρούπια είναι ώριμα και έχουν εξασφαλίσει τα ανώτατα επίπεδα σακχάρων (σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας) είναι το χρώμα του φλοιού του καρπού. Συγκεκριμένα τα χαρούπια είναι έτοιμα να συγκομισθούν όταν ο φλοιός

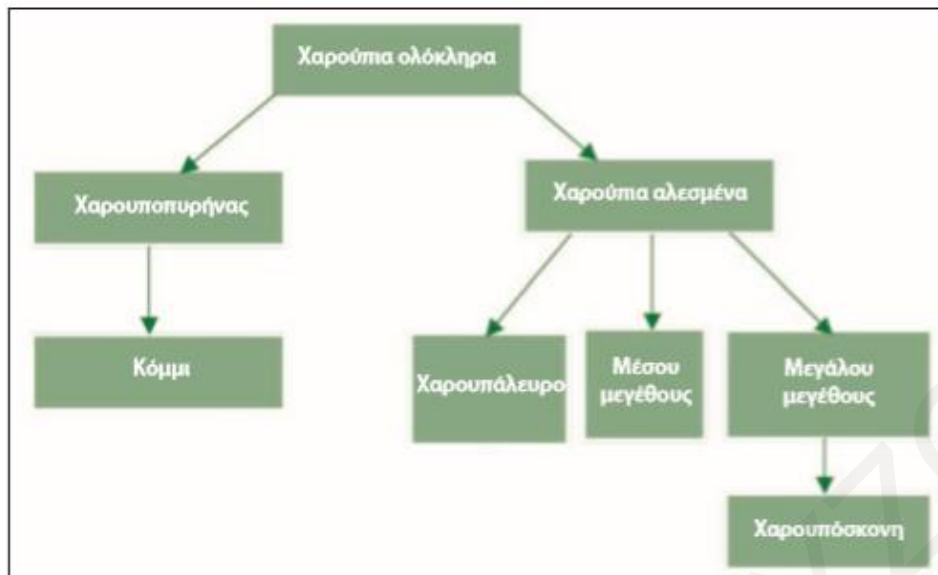
τους έχει αποκτήσει το χαρακτηριστικό χρώμα της ποικιλίας κατά την ωρίμανση (καστανό) [14].

### 2.3.Χρήσεις των χαρουπιών

Η χαρουπιά στην Κύπρο καλλιεργείται από πολύ παλιά και αποτελούσε μια από τις κύριες πηγές εισοδήματος των κατοίκων καθώς κατατασσόταν ως ένα από τα πιο σημαντικά εξαγωγίμα προϊόντα, τα οποία λόγω της συνεχούς συναλλαγής του ονομαζόταν «μαύρος χρυσός». Ωστόσο λόγω των χαμηλών τιμών πώλησης που παρατηρήθηκε κατά τη δεκαετία του 1960, καθώς επίσης και της ραγδαίας οικιστικής ανάπτυξης, της αύξησης του κόστους των εργατικών, της χρήσης τους ως ξυλοκάρβουνα και καυσόξυλα, του σκληρού ανταγωνισμού από άλλες μεσογειακές χώρες αλλά και λόγω άλλων παραγόντων, η χαρουπιά παραμελήθηκε και συρρικνώθηκε σε έκταση και σταδιακά ακολούθησε φθίνουσα πορεία [14, 22].

Η καλλιέργεια της χαρουπιάς γινόταν εδώ και πάρα πολλά χρόνια σε διάφορα μέρη του κόσμου όπως προαναφέραμε, με τους καρπούς της να χρησιμοποιούνται τόσο ως τροφή για τον άνθρωπο και τα ζώα όσο και για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τα χαρούπια ως μια φθηνή πρώτη ύλη για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων έχει αυξηθεί και κυρίως ενδιαφέρον παρατηρήθηκε από τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών [23-25].

Τα χαρούπια διατίθενται αυτούσια ή μεταποιούνται σε διάφορα προϊόντα. Οι διάφορες μορφές με τις οποίες διατίθενται τα χαρούπια παρουσιάζονται πιο κάτω (Σχήμα 2.5). Επομένως ανάλογα με τη μορφή στην οποία διατίθενται έχουν και την ανάλογη χρήση [14].



Σχήμα 2.5: Μεταποίηση χαρουπιών [14].

Βιομηχανικά τα χαρούπια χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή του κόμμεος χαρουπιού, ενός προϊόντος που εξάγεται από το ενδοσπέρμιο των σπόρων και χρησιμοποιείται ευρέως στα τρόφιμα ως ένα φυσικό πρόσθετο (E 410) λόγω της ικανότητας του να δρα ως πηκτικός και σταθεροποιητικός παράγοντας (γαλακτωματοποιητής) [26]. Συναντάται κυρίως στα παγωτά λόγω της ιδιότητας του να απορροφά νερό και να διογκώνεται με σκοπό την αποτροπή του διαχωρισμού των συστατικών του γαλακτώματος και επομένως τη διατήρηση των φυσικών χαρακτηριστικών και της υφής του παγωτού. Στα τυροκομικά προϊόντα δρα με τον ίδιο τρόπο όπως και στα παγωτά αλλά επίσης προσδίδει καλύτερη υφή, δυνατότητα επάλειψης και ομοιογένειας. Στις σούπες δρα αυξάνοντας το ιξώδες τους στα επιθυμητά επίπεδα, αλλά και σαν πηκτικό σε μαρμελάδες, κρέμες, πελτέδες και άλλα. Επιπρόσθετα το κόμμι χρησιμοποιείται στα αλλαντικά αέρος και στα βραστά συμβάλλοντας στη βελτίωση της υφής και της ποιότητας. Χρησιμοποιείται ακόμη και σε υποκατάστατα προϊόντα κρέατος που παρασκευάζονται από φυτικές πρωτεΐνες (π.χ. σόγια), δίνοντας την αίσθηση ότι πρόκειται για κρέας. Στην αρτοποιία χρησιμοποιείται για την παραγωγή ζυμαριών και έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη χρήση αυγών και προσδίδει μαλακότητα. Το κόμμι προστίθεται και σε κονσερβοποιημένες τροφές κατοικίδιων ώστε να αποκτηθεί η επιδιωκόμενη υφή. Παράλληλα λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε θερμίδες και ζάχαρη θεωρείται υποκατάστατο του αμύλου και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται για κατασκευή προϊόντων διαίτης [15].

Εκτός όμως από τη βιομηχανία τροφίμων το κόμμι χαρουπιού βρίσκει εφαρμογές και στο βιομηχανικό τομέα των υλικών. Ο σπόρος του χαρουπιού είναι ένα προϊόν που χρησιμοποιείται

για άριστης ποιότητας κόλλες, φωτογραφικά φιλμ και βαφές. Με εκχύλιση των σπόρων λαμβάνεται ένα έλαιο που χρησιμοποιείται στη σαπωνοποίηση. Επιπρόσθετα η κολλώδης ουσία που περιέχετε στους σπόρους είναι χρήσιμη στη χαρτοβιομηχανία[15].

Από το φυτό των σπόρων, από την άλλη, παράγεται το αλεύρι φύτρων χαρουπιού, το οποίο εξαιτίας της υψηλής του περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βρίσκει ευρεία εφαρμογή στα συμπληρώματα διατροφής για τον άνθρωπο [7]. Το συγκεκριμένο αλεύρι δεν περιέχει γλουτένη, αλλά είναι πλούσιο σε καρουβίνη ένα συστατικό των τροφίμων που προορίζονται για άτομα με δυσανεξία στη γλουτένη (κοιλιοκάκη) [27].



**Σχήμα 2.6:** Το κόμμα του χαρουπιού [w3].

Μεγάλες ποσότητες σάρκας παραμένουν ανεκμετάλλευτες. Υφίσταται διαφορετική επεξεργασία, ανάλογα με το που προορίζεται η χρήση τους [2]. Η σάρκα του χαρουπιού χρησιμοποιείται κυρίως στην κτηνοτροφία όπου και χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή [28] λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και φυτικές ίνες και τη χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες [14].

Από τη σάρκα του χαρουπιού αφού αφαιρεθούν τα σπόρια, ψηθεί και αλεσθεί, προκύπτει η σκόνη του χαρουπιού ή αλλιώς το αλεύρι του χαρουπιού. Το προκύπτον αλεύρι αποτελεί μια γλυκαντική ουσία που παρουσιάζει γεύση και εμφάνιση παρόμοια με αυτή του κακάο, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του. Η απουσία της καφεΐνης και των παραγώγων της αποτελεί μια εναλλακτική λύση αντικατάστασης του κακάο [2,27].



**Σχήμα 2.7:** Σκόνη χαρουπιού [w4] vs σκόνη κακάο [w5].

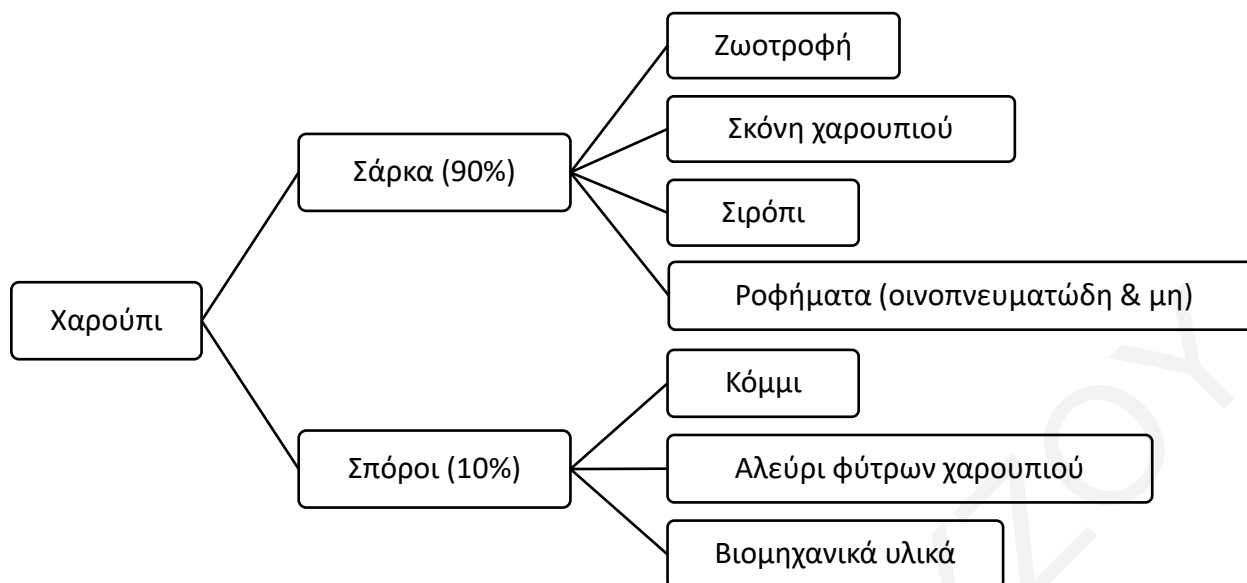
Επομένως λόγω της παρουσίας των σακχάρων και το γεγονός ότι θυμίζει το κακάο μπορεί να το αντικαταστήσει σε οποιαδήποτε συνταγή (μπισκότα, κέικ, σοκολατοειδή γλυκίσματα, ροφήματα). Υπάρχουν είδη αρκετά προϊόντα στην αγορά και σε αυτά μπορεί να προστεθούν η χαρουπόσκονη και η χαρουπολάτα. Επιπλέον χρησιμοποιούνται και για την παρασκευή οινοπνευματωδών ποτών [15] και αφηγημάτων [19], καθώς και σιροπιού από χαρούπι [2].

Στην ιατρική, το αλεύρι του χαρουπιού χρησιμοποιείται σε σκευάσματα κατά των παιδικών διαρροιών και των κολικών. Επιπρόσθετα χρησιμοποιείται για την παρασκευή φαρμάκων εναντίον του βήχα και της χρόνιας βρογχίτιδας, αλλά είναι ιδανικό και για παιδιά που πάσχουν από κοκίτη. Τέλος, το χαρουπόμελο που παρασκευάζεται από τον καρπό θεωρείται προϊόν υγιεινής διατροφής, καταπραΰνει το στομάχι και βοηθά στην ομαλή λειτουργία του εντέρου.

Ακόμη όσον αφορά τη βιοτεχνολογία οι ερευνητές απέδειξαν ότι μετά από κατάλληλη επεξεργασία μπορεί να παραχθεί ενέργεια έτσι ώστε να αντικαταστήσει τη βενζίνη και το πετρέλαιο. Ο καρπός μπορεί να αποδώσει μεθάνιο ή αλκοόλη, όπου είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί σε κινητήρες εσωτερικής καύσης, κυρίως στα αυτοκίνητα, για θέρμανση και παραγωγή ενέργειας στη βιομηχανία [15].

Εκτός όμως από τις πιο πάνω χρήσεις τους, η χαρουποκαλλιέργεια μπορεί να προσφέρει σημαντικά και στη βελτίωση του φυσικού περιβάλλοντος. Μπορεί να ευδοκιμήσει σε ξηρές περιοχές και σε φτωχά εδάφη όπου άλλα είδη δέντρων δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Επιπλέον, στη χαρουπιά αποδίδονται ειδικές ικανότητες απορρόφησης του μόλυβδου που υπάρχει στην ατμόσφαιρα. Ακόμη, λόγω του πλούσιου ριζικού συστήματος που έχει μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δασικό δέντρο για προστασία του εδάφους από τη διάβρωση.

Σύμφωνα με στοιχεία από τη Στατιστική Υπηρεσία το 2012 η καλλιεργούμενη έκταση της χαρουπιάς στην Κύπρο ανέρχεται στα 1.709 εκτάρια, έκταση η οποία αντιστοιχεί σε 9.123 τόνους συνολικού όγκου παραγωγής και 214 εκατομμύρια ευρώ αξία παραγωγής. Το 34% του συνολικού όγκου παραγωγής χαρουπιών στην Κύπρο διατίθεται στην κυπριακή βιομηχανία για σκοπούς μεταποίησης, το 20% προορίζεται ως ζωοτροφή και το 46% προορίζεται για εξαγωγή [14].



Σχήμα 2.8: Προϊόντα που παράγονται από το χαρούπι.

#### 2.4.Χημική σύσταση

Η σύσταση των χαρουπιών και γενικά των προϊόντων που προκύπτουν από αυτά, έδειξαν τη μεγάλη διατροφική τους αξία και προσέλκυσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για περαιτέρω μελέτη [29]. Ο καρπός της χαρουπιάς είναι ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτογενών και δευτερογενών μεταβλητών [20, 30]. Οι λοβοί της χαρουπιάς διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυτά σάκχαρα (40-65%) [28], κυρίως σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη [20]. Στο γεγονός αυτό αποδίδεται η γλυκιά τους γεύση και αποτελεί ένα φυσικό γλυκαντικό με άρωμα και εμφάνιση παρόμοια με της σοκολάτας [10]. Αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιείται συχνά ως υποκατάστατο του κακάο. Επίσης οι λοβοί περιέχουν πολλές πολυφαινόλες που ανήκουν στην τάξη των συμπυκνωμένων ταννινών [28], και χάρη σε αυτές οφείλεται η αντιοξειδωτική τους ικανότητα [10,21].

Επιπλέον περιέχει σχετικά χαμηλά ποσά πρωτεϊνών (1-5%), και μεταλλικών στοιχείων (1-6%) με κυριότερα το Κάλιο (K), το Ασβέστιο (Ca), το Μαγνήσιο (Mg), το Νάτριο (Na) και το Σίδηρο (Fe) [17, 28]. Το γεγονός ότι έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπη (0,2-0,8%), καθώς και η παρουσία των φυτικών ινών (9-13%) σε αυτά τα καθιστά στην κατηγορία των υγιεινών τροφίμων και ως σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών [21, 28].

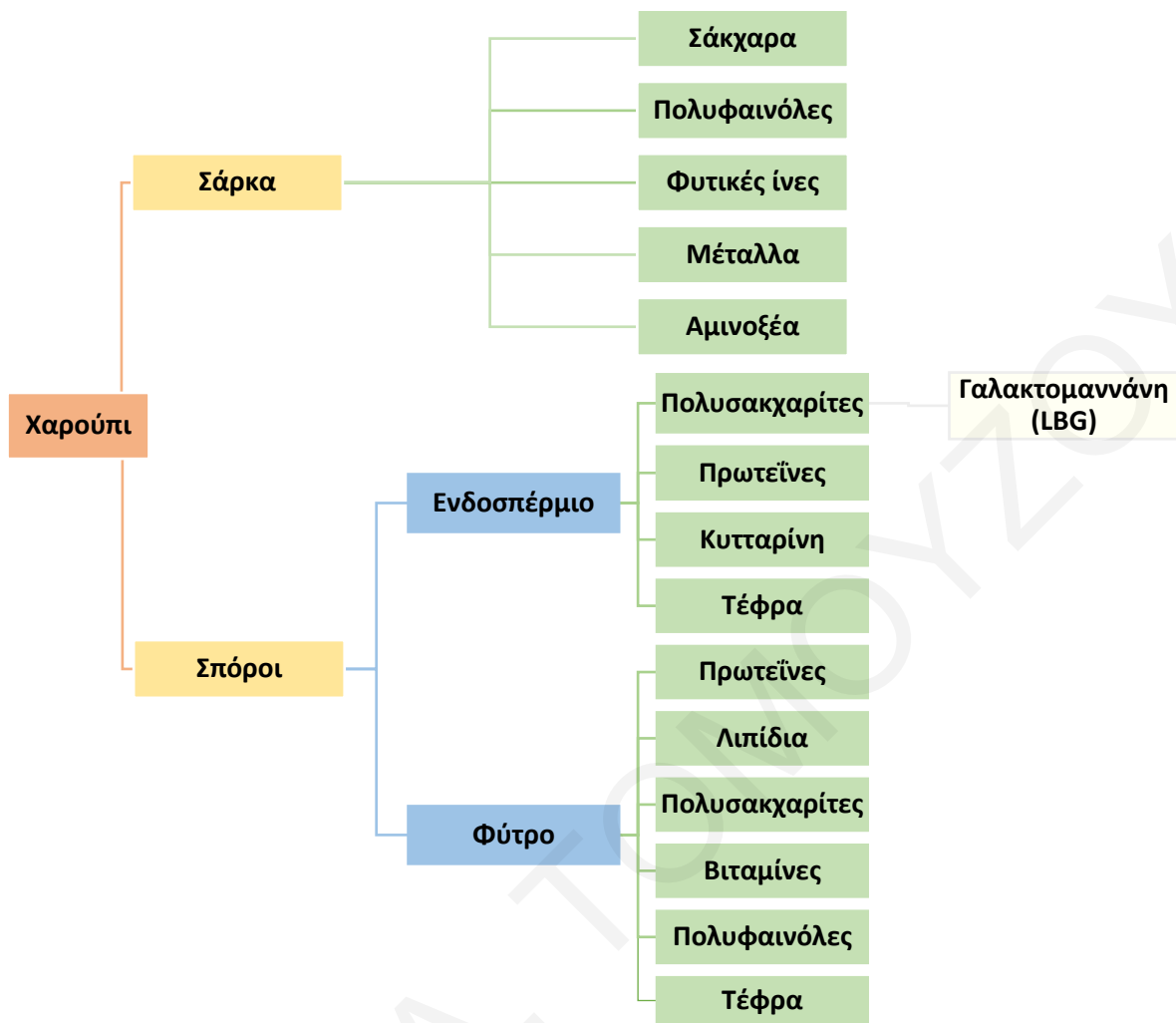
Το ενδοσπέρμιο των σπόρων πολυφαινολεσαι από μονάδες σακχάρων, μαννόζης (73-86%) και γαλακτόζης (27-14%), σε αναλογία 4:1 και από πολυσακχαρίτες [16]. Αποτελείται από υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες (50000-3000000). Η γαλακτομαννάνη (LBG) αποτελεί τον κύριο πολυσακχαρίτη του κόμμεος όπου έχει πηκτωματικές ιδιότητες. Λόγω των



διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει το LBG είναι ένα ευπροσάρμοστο υλικό που χρησιμοποιείται για πολλές εφαρμογές [16, 32] και είναι γνωστό ως πρόσθετο E410 [7], όπως προαναφέραμε στο υποκεφάλαιο 2.3. Είναι εξαιρετικός σταθεροποιητής γαλακτωμάτων και η απουσία τοξικότητας επιτρέπει τη χρήση τους στην υφαντική, φαρμακευτική, βιοϊατρική, στα καλλυντικά και στη βιομηχανία τροφίμων [31]. Το κόμμι είναι μια λευκή έως κιτρινωπή λευκή σκόνη σχεδόν άοσμη. Η τυπική σύνθεση του ενδοσπέρμιου είναι η ακόλουθη: πολυσακχαρίτες (80-91%), πρωτεΐνη (3-7%), κυτταρίνη (1-4%) και τέφρα (0.4-1%) (δηλαδή ανόργανα στοιχεία) [16, 32].

Τέλος η σύνθεση του φύτρου του χαρουπιού έδειξε ότι η θρεπτική αξία του είναι σημαντική λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε πρωτεΐνη (> 50%). Το έλαιο του φύτρου (5-8%) είναι πλούσιο σε φυσικά αντιοξειδωτικά. Η σημαντική συγκέντρωση βιταμινών και των πολυσακχαριτών καθιστά το αλεύρι του φύτρου ένα πολύτιμο πρόσθετο στα τρόφιμα (σε παιδικές τροφές, σούπες, μπισκότα, κλπ.) [33]. Το φύτρο γενικά αντιπροσωπεύει το 23-25% του βάρους του σπόρου. Αποτελείται κατά κύριο λόγο από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, υγρασία και τέφρα και πολυφαινόλες. Η κύρια πρωτεΐνη που υπερισχύει είναι η καρουβίνη. Η καρουβίνη είναι ένα μίγμα πολλών πρωτεϊνών διαφορετικού μοριακού μεγέθους και αποτελεί το 50% του βάρους του φύτρου. Αυτό το μίγμα πρωτεΐνης έχει αναφερθεί ότι κατέχει παρόμοιες ιδιότητες με τη γλουτένη, η οποία μπορεί να την αντικαταστήσει στις περιπτώσεις πάθησης από κοιλιοκάκη (δυσανεξίας στην γλουτένη) [7, 27, 34].

Η χημική σύσταση του χαρουπιού όμως εξαρτάται από διάφορους παράγοντες που την επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό. Κυριότεροι παράγοντες θεωρούνται η ποικιλία του χαρουπιού, η γεωγραφική προέλευση, ο βαθμός ωρίμανσης του, οι κλιματολογικές και οι καλλιεργητικές συνθήκες.



Σχήμα 2.9: Τα κύρια συστατικά της σάρκας και των σπόρων του χαρουπιού [20].

## 2.5. Μεθυλοξανθίνες

Τα τελευταία χρόνια η ευρεία κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μεθυλοξανθίνες προκάλεσε αυξημένο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, τη βιομηχανία τροφίμων, τους καταναλωτές και τα μέσα ενημέρωσης για τις πιθανές θετικές αλλά και τις αρνητικές επιδράσεις που μπορεί να επιφέρουν στην ανθρώπινη υγεία. Η υπερβολική έκθεση σε μεθυλοξανθίνες αποτελεί ανησυχία στις μέρες μας [2].

Οι μεθυλοξανθίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από νουκλεοτίδια πουρίνης και είναι γνωστά ως αλκαλοειδή πουρίνης [17] ή ξανθίνες [3].

Η καφεΐνη (*1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη*) είναι το πιο σημαντικό αλκαλοειδές πουρίνης που απομονώθηκε σε κόκκους καφέ (2,5% κ.β.) και σε φύλλα τσαγιού (5% κ.β.). Η καφεΐνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα φυτά καφέ το 1819 από το F. F. Runge [1, 3, 35] και στη συνέχεια το 1827 ο Oudry απομόνωσε μία ένωση από την ποικιλία *Camellia sinensis* (τσάι) που είχε παρόμοιες επιδράσεις με την καφεΐνη. Δέκα χρόνια αργότερα, οι Jobat και Mulder (1837) χαρακτήρισαν αυτή την ένωση ως καφεΐνη [1, 35]. Η πρώτη συνολική σύνθεση της καφεΐνης έγινε το 1895 από τον E. Fischer [1, 3]. Η καφεΐνη εντοπίστηκε στη συνέχεια σε πολλά φυτά και από τότε οι φυσιολογικές επιδράσεις της ήταν ο κύριος λόγος αυτό το αλκαλοειδές να γίνεται ένα από τα πιο μελετημένα φάρμακα μέχρι στιγμής [35].

Η θεοφυλλίνη (*1,3-διμεθυλοξανθίνη*) ανακαλύφθηκε ως συστατικό στα φύλλα τσαγιού από τον Albert Kossel το 1888 [36]. Εκτός όμως από τα φυτά *Camellia Sinensis* (τσάι) απομονώθηκε και από τα φυτά *Coffea Arabica* (ποικιλία καφέ) [37]. Η ιστορία της ένωσης αυτής ήταν μακρά και επιτυχημένη. Χρησιμοποιήθηκε αλλά ακόμη εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε αρκετά φάρμακα για διάφορους ιατρικούς σκοπούς [36] που θα γίνει αναφορά πιο κάτω.

Και τέλος, η θεοβρωμίνη (*3,7-διμεθυλοξανθίνη*) είναι το βασικό αλκαλοειδές [37] που απομονώθηκε από τους σπόρους του δέντρου κακάο [38] αλλά εντοπίστηκε και σε άλλα φυτά [37] (όπως στο πράσινο τσάι), και στη συνέχεια συντέθηκε μέσω της ξανθίνης από το Fischer [38]. Είναι ένα πικρό αλκαλοειδές της οικογένειας των μεθυλοξανθινών. Παρά το όνομα του, η ένωση δεν περιέχει βρώμιο. Η θεοβρωμίνη προέρχεται από το *Theobroma*, το γένος του κακάο, το οποίο αποτελείται από τις ελληνικές ρίζες "Θεός" (theo) και τη βρώμη ("food"), που σημαίνει "φαγητό των θεών". Είναι το κύριο αλκαλοειδές που βρίσκεται στο κακάο και τη σοκολάτα, και είναι μια από τις αιτίες για την αύξηση της καλλιέργειας του [37]. Η ποσότητα της θεοβρωμίνης που βρίσκεται στη σοκολάτα είναι αρκετά μικρή ώστε η σοκολάτα να μπορεί

να καταναλωθεί με ασφάλεια από ανθρώπους σε μεγάλες ποσότητες, αλλά για τα ζώα που μεταβολίζουν πιο αργά τη θεοβρωμίνη, μπορεί να θεωρηθεί και ως δηλητήριο [37, 38].



**Σχήμα 2.10:** Συντακτικοί τύποι των μεθυλξανθινών [39] με τις εμπειρικές & IUPAC ονομασίες τους [1].

**Πίνακας 2.1:** Τα κύρια αλκαλοειδή που απομονώνονται σε διάφορα φυτά [1].

Λατινικό Όνομα	Συνηθισμένο Όνομα	Κύριο Αλκαλοειδές
<i>Coffea arabica</i>	Arabica coffee	Καφεΐνη
<i>Coffea canephora</i>	Robusta coffee	Καφεΐνη
<i>Camellia sinensis</i>	Tea	Καφεΐνη
<i>Camellia assamica</i>	Assam tea	Καφεΐνη
<i>Camellia taliensis</i>		Καφεΐνη
<i>Camellia irrawadiensis</i>		Θεοβρωμίνη
<i>Camellia ptilophylla</i>	Cocoa tea	Θεοβρωμίνη
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao (cocoa)	Θεοβρωμίνη
<i>Paullinia cupana</i>	Guarana	Καφεΐνη
<i>Cola sp.</i>	Cola	Καφεΐνη
<i>Citrus sp.</i>		Καφεΐνη
<i>Ilex paraguariensis</i>	Yerba mate	Καφεΐνη

### 2.5.1. Δράση Καφεΐνης στον άνθρωπο

Υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις για την καφεΐνη και την ανθρώπινη υγεία [39]. Καταναλώνεται ευρέως και είναι παρούσα σε διάφορα ποτά και τρόφιμα. Η ίδια η καφεΐνη αλλά και τα διάφορα ανάλογα της έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη βιοϊατρική έρευνα [4] για αυτό και έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Η καφεΐνη δρα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ) όπου αναπτύσσει ανταγωνιστική δράση ως προς την αδενοσύννη με αποτέλεσμα να ελευθερώνεται αδρεναλίνη [1, 3, 4]. Η αύξηση της έκκρισης της ορμόνης αυτής έχει ως αποτέλεσμα να καθιστάται ως εθιστική ουσία [39]. Η διεγερτική δράση της αρχίζει 15 λεπτά μετά την κατανάλωση της και διαρκεί 5 με 6 ώρες. Μια κανονική δόση (100 mg) έχει ως αποτέλεσμα να διεγείρει την καρδιακή λειτουργία

[3], με πιθανότητα μείωσης του κινδύνου καρδιακών παθήσεων [39]. Βοηθάει στο μεταβολισμό και κατ' επέκταση στη σωματική απόδοση [39], (δρα ως λιπολυτικό [4]). Παράλληλα βοηθά και στην αναπνοή, δρώντας κατά του άσθματος. Ενισχύει την αρτηριακή πίεση και τη θερμοκρασία του σώματος και προάγει τη συστολή των αιμοφόρων αγγείων στα έντερα, αλλά τη διαστολή τους στον εγκέφαλο. Η μεγαλύτερη κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο έχει ως αποτέλεσμα να βοηθάει ενάντια στην υπνηλία [3], να αυξάνεται η προσοχή και η απόδοση της μνήμης, αλλά και η διάθεση γενικότερα και το άτομο να βρίσκεται σε εγρήγορση [39]. Επιπρόσθετα έρευνες που πραγματοποιήθηκαν ως προς τις θεραπευτικές προοπτικές των ξανθινών είχαν αναφέρει ότι μπορούν να βοηθήσουν στη Νόσο του Alzheimer και του Parkinson, ως αντικαταθλιπτικά [43], (λόγω της έκκρισης της αδρεναλίνης [3, 39]), ως αγχολυτικά αλλά και ως γνωστικά ενισχυτικά [4] αφού βοηθούν στη μνήμη [39]. Ακόμη βοηθούν κατά του διαβήτη, κατά του πόνου, και ορισμένων μορφών καρκίνου. Δρουν ως διουρητικά, άρα βοηθούν σε περιπτώσεις νεφρικών προβλημάτων. Τέλος, ως αναπνευστικό στόχο έχουν τη δυνατότητα να βοηθήσουν ως αντιβηχικά, κατά της άπνοιας και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας [4].

Πέραν όμως των θετικών οφελών που προσφέρει η χρήση κανονικής δόσης καφεΐνης, η επιστημονική κοινότητα εξέφρασε ανησυχία σχετικά με το ενδεχόμενο η καφεΐνη να προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Σύμφωνα με αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών η υπερβολική δόση καφεΐνης έχει ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητες ενέργειες όπως το υπερβολικό άγχος [39, 41], πρόκληση τρόμου [39], ανησυχίας και νευρικότητας [5]. Προκαλεί παράλληλα έκκριση γαστρικού οξέος και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκληθούν συμπτώματα καούρας και δυσπεψίας [39], ναυτίας, τάση για εμετό, διάρροιας και διουρίας. Επιπρόσθετα, μπορεί να προκαλέσει και ταχυκαρδία [5] ή κάποιου είδους καρδιακής αρρυθμίας [5, 40]. Ακολούθως, γίνεται αναφορά ότι μπορεί να προκληθούν συμπτώματα στέρησης, παραληρήματος και επιληπτικής κρίσης. Επιπρόσθετα μπορεί να οδηγήσει το άτομο σε υπέρταση [4], λόγω του γεγονότος ότι η καφεΐνη μπορεί να κρατήσει το άτομο σε εγρήγορση άρα χωρίς ύπνο για μεγάλη περίοδο [39, 41]. Ακόμη, αναφέρεται ότι ορισμένα από τα συμπτώματα της υπερβολικής δόσης της καφεΐνης μπορεί να είναι και η υπεργλυκαιμία [5]. Παράλληλα η υπερβολική κατανάλωση καφεΐνης επιδρά στην ισορροπία του ασβεστίου και επομένως την κατάσταση των οστών [40] και προκαλεί προβλήματα κατά την κύηση και το θηλασμό [41].

Σε περιπτώσεις προσπάθειας να σταματήσει κάποιος την κατανάλωση καφεΐνης, έχουν αναφερθεί συμπτώματα όπως πονοκέφαλοι, κόπωση, υπνηλία, ευερεθιστότητα, δυσκολία

συγκέντρωσης ακόμη και συμπτώματα κατάθλιψης. Για αυτό απαιτείται σταδιακή απόσυρση από την καφεΐνη για αποφυγή αυτών των συμπτωμάτων. Ορισμένοι άνθρωποι έχουν ανοσία, ενώ άλλοι είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι και μπορεί να έχουν συμπτώματα, όπως έχουν προαναφερθεί ακόμη και μετά από ένα φλιτζάνι καφέ [39]. Τέλος είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η κατανάλωση καφεΐνης σε περίπτωση κατανάλωσης φαρμάκων μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό του φαρμάκου ή της καφεΐνης, αυξάνοντας τον κίνδυνο τοξικών επιδράσεων, όπως για παράδειγμα να βλάψουν το ήπαρ [5].

Η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) κατέληξε στα ακόλουθα συμπεράσματα όσον αφορά την επιτρεπόμενη ποσότητα καφεΐνης για αποφυγή των ανεπιθύμητων παρενεργειών της. Δεν προκαλούν ανησυχίες για την ασφάλεια ενός ενήλικα ανθρώπου δόσεις 200 mg από όλες τις πηγές διατροφής. Έστω 100 mg καφεΐνης είναι δυνατό να επηρεάσουν τον ύπνο, ενώ 400 mg ημερήσιας πρόληψης, που μπορεί να καταναλωθεί καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας δεν προκαλούν ανησυχίες για την ασφάλεια ενός υγιούς ανθρώπου. Όσον αφορά τις γυναίκες που κυοφορούν έχει οριστεί ότι 200 mg καθ' όλη τη διάρκεια της μέρας από όλες τις πηγές τροφής είναι αποδεκτό. Και τέλος όσον αφορά τα παιδιά και τους εφήβους θεωρείται ότι δεν προκαλείται ανησυχία και αποτελεί ένα ασφαλές επίπεδο, δόση 3 mg/kg σωματικού βάρους [42, 43].

### **2.5.2. Δράση Θεοφυλλίνης στον άνθρωπο**

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η θεοφυλλίνη είχε ανακαλυφθεί αρκετά χρόνια πριν και συναντάται ως χημικό συστατικό στο τσάι [44], (αλλά και σε άλλα φυτά [45]). Έχει τις ίδιες ψυχοδραστικές ιδιότητες με την καφεΐνη [44], αφού δρα και διεγείρει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Η ένωση αυτή, έχει ως κύρια φαρμακολογική δράση τη βρογχοδιαστολή, λόγω της χαλαρωτικής επίδρασης της στους λείους μυείς της τραχείας, των βρόγχων και των πνευμονικών αγγείων [44]. Εξαιτίας της ισχυρής βρογχοδιασταλτικής δράσης της, η θεοφυλλίνη χρησιμοποιείται για περισσότερο από 70 χρόνια στην αντιμετώπιση του άσθματος και των χρόνιων αποφρακτικών αναπνευστικών παθήσεων τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα [46, 47]. Ο Samuel Hirsch ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε αυτή τη δράση της ένωσης, το 1992, παρά το γεγονός ότι το 1936 είχε επισημανθεί η ευνοϊκή επίδραση της θεοφυλλίνης στην ασθματική κατάσταση, αυτό το εύρημα δεν οδήγησε στη χρήση αυτού του φαρμάκου [36] με τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του [47, 48]. Επίσης, η ουσία αυτή προκαλεί διέγερση του αναπνευστικού συστήματος, επιδρά στο μυοκάρδιο και προκαλεί περιφερική αγγειοδιαστολή, χαλαρώνοντας τις μυϊκές ίνες των αγγείων [46], δρώντας ως καρδιακό φάρμακο [36] για τη

θεραπεία της στηθάγχης. Επιπρόσθετα, αυξάνει τις γαστρικές εκκρίσεις [44] και δρα ως ήπιο διουρητικό [36, 46].

Η θεοφυλλίνη διατίθεται σε σκευάσματα βραδείας απελευθέρωσης για να αποφευχθούν τυχών παρενέργειες. Απαιτείται τακτική χρήση της για να είναι αποτελεσματική, γιατί δεν έχει άμεση επίδραση, επομένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανακούφιση αιφνίδιων αναπνευστικών προβλημάτων [49]. Έχει γίνει όμως αναφορά, για μελλοντική χρήση της θεοφυλλίνης για τη μείωση της σοβαρότητας της νεφροπάθειας, για τη θεραπεία σε προβλήματα αναπνοής κατά τον ύπνο, και τέλος για τη θεραπεία της λευχαιμίας [48].

Παρόλα αυτά υπάρχουν και ανεπιθύμητες παρενέργειες όταν υπερβεί η συγκέντρωση της στον ανθρώπινο οργανισμό. (Η ασφαλής συγκέντρωση για αποφυγή παρενεργειών είναι 5-10 mg/L [57]). Οι πιο συχνά παρατηρούμενες είναι ο πονοκέφαλος, η ναυτία, ο εμετός [47, 50]. Μερικές από τις σοβαρές παρενέργειες, συμπεριλαμβάνουν καρδιακές αρρυθμίες και επιληπτικές κρίσεις [47]. Μπορεί επίσης να υπάρξει αυξημένη έκκριση οξέος στο στομάχι έχοντας ως αποτέλεσμα τη γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και διούρηση [51]. Γενικότερα, η θεοφυλλίνη θεωρείται ότι έχει ισχυρότερα τοξικά αποτελέσματα από την καφεΐνη [2].

Περαιτέρω κλινικές μελέτες πρέπει να γίνουν έτσι ώστε να γνωρίζουμε σε καλύτερο βαθμό αν τα συμπτώματα αυτά αποτελούν κύριο μειονέκτημα της χρήσης του ως φάρμακο [50] και αν θα πρέπει να εντοπιστεί ασφαλέστερο [47].

### 2.5.3 Δράση Θεοβρωμίνης στον άνθρωπο

Οι επιδράσεις της θεοβρωμίνης έχουν μελετηθεί λιγότερο σε σύγκριση με την καφεΐνη. Είναι γνωστό ότι η ουσία αυτή ασκεί κάποια θετικά αποτελέσματα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο. Όπως και η καφεΐνη, δρα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, και είναι ανταγωνιστής στους υποδοχείς αναγνώρισης της αδενοσίνης, έχοντας με αυτό τον τρόπο ψυχοδραστική δράση [52]. Με λίγα λόγια έχει παρόμοια δραστηριότητα που παρατηρείται και στην καφεΐνη, όπως δηλαδή την αύξηση της ενέργειας, του κινήτρου για εργασία, της ετοιμότητας, κ.α. [53]. Συγκριτικά όμως, η καφεΐνη είναι πιο ισχυρό διεγερτικό, ενώ η θεοβρωμίνη πιο ήπιο. Εντούτοις και τα δυο βελτιώνουν τη διάθεση του καταναλωτή, με τη διαφορά ότι η καφεΐνη μπορεί να προκαλέσει άγχος ως μια από τις παρενέργειες της.

Στο παρελθόν η χρήση της θεοβρωμίνης ήταν ως διουρητικό (όμως είχε ασθενέστερη δράση από τη θεοφυλλίνη), για τη θεραπεία της στηθάγχης και της υπέρτασης [37]. Όμως ακόμη και

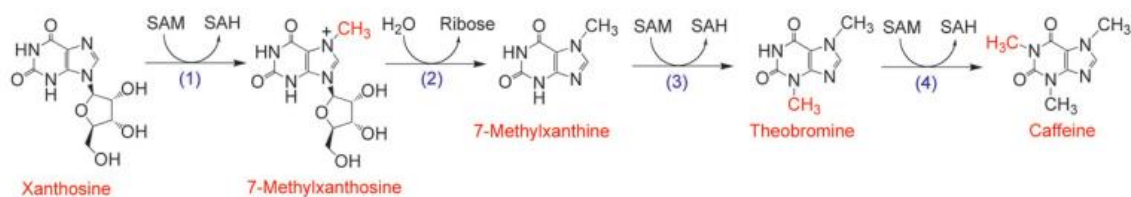
σήμερα χορηγείται για την καρδιαγγειακή προστασία αφού δρα στην αρτηριακή πίεση [52] ως αγγειοδιασταλτικό. Χρησιμοποιείται ως βρογχοδιασταλτικό [37] και είναι χρήσιμο στο άσθμα, αλλά και σε άλλα προβλήματα της αναπνευστικής οδού, όπως ο βήχας [52-54]. Επιπρόσθετα, η θεοβρωμίνη είναι σε θέση να προστατεύσει την επιφάνεια σμάλτου των δοντιών [52], βοηθώντας στη σκληρότητα, του σμάλτου [53]. Ακόμη, έχει γίνει αναφορά ότι η θεοβρωμίνη θεωρείται χρήσιμη για την απώλεια βάρους. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για να επιβεβαιωθεί αυτό [52]. Τέλος, η θεοβρωμίνη δεν έχει κάποια επίδραση στην κατάσταση και στην ποιότητα του ύπνου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της καφεΐνης. Επομένως επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα ότι η θεοβρωμίνη είναι ασθενέστερη από την καφεΐνη [55] και είναι λιγότερο ισχυρό διεγερτικό [37, 53].

Η θεοβρωμίνη είναι ασφαλής ουσία για τον άνθρωπο και έχει λιγότερα ανεπιθύμητα αποτελέσματα από την καφεΐνη [52, 56]. Μπορεί όμως να προκληθεί γαστρεντερική δυσλειτουργία [6] με αποτέλεσμα να γίνει παλινδρόμηση οξέος, επειδή χαλαρώνει ο οισοφαγικός σφιγκτήρας. Επομένως, υπάρχει δυνατότητα πρόσβασης του στομαχικού οξέος στον οισοφάγο [37]. Αυτό πολύ πιθανόν να προκαλέσει ναυτία ή και τάση για εμετό [6]. Επιπρόσθετα, έχει γίνει αναφορά ότι η θεοβρωμίνη είναι δυνατόν να προκαλέσει πονοκέφαλο [57]. Τέλος, μια βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφέρθηκε ότι πιθανόν να αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό [58]. Γενικότερα όμως δε γίνεται αναφορά σε κάποια σοβαρή παρενέργεια που μπορεί να προκαλέσει η αυξημένη δόση της. Επομένως θεωρείται γενικός ασφαλής.

#### **2.5.4. Βιοσύνθεση Αλκαλοειδών πουρίνης**

Οι μεθυλοξανθίνες σχηματίζονται από νουκλεοτίδια πουρίνης που βρίσκονται στα φυτά. Η κύρια βιοσυνθετική οδός της καφεΐνης είναι μια αλληλουχία τεσσάρων βημάτων αποτελούμενη από τρεις μεθυλιώσεις και μία αντίδραση νουκλεοσιδάσης με ξανθοσίνη, που ενεργεί ως αρχικό υπόστρωμα (Σχήμα 2.11) [39, 60]. Παρόλο που οι πληροφορίες έχουν ληφθεί κυρίως από τον καφέ (*Coffea arabica* και *Coffea canephora*) και από το τσάι (*Camellia sinensis*), τα διαθέσιμα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η οδός είναι ουσιαστικά η ίδια και σε άλλα φυτά που σχηματίζουν μεθυλοξανθίνες, όπως είναι το κακάο, οι καρποί guarana, και άλλα. [1, 39, 60].





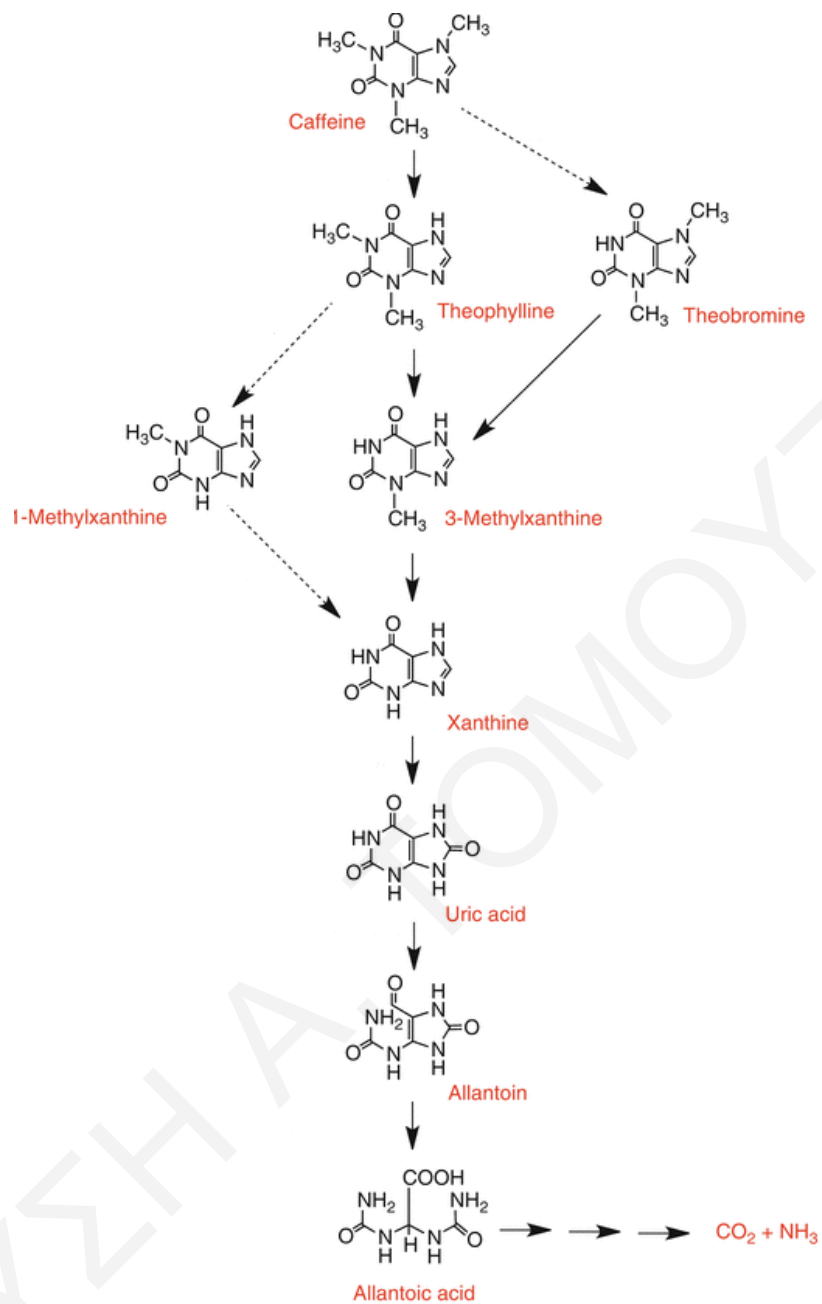
**Σχήμα 2.11:** Η κύρια βιοσυνθετική οδός καφεΐνης από ξανθοσίνη. Αρκετές N-μεθυλοτρανσφεράσες (SAM) με διαφορετικές εξειδικεύσεις υποστρώματος συμβάλλουν στη μετατροπή ως προς το σχηματισμό της καφεΐνης [60].

Σε αντίθεση με τα φυτά τσαγιού και καφέ, μερικά άλλα είδη φυτών συσσωρεύουν θεοβρωμίνη και όχι καφεΐνη. Αυτή είναι η περίπτωση των σπόρων του κακάο *Theobroma* (κακάο) [59]. Λίγα όμως είναι γνωστά για τη βιοσύνθεση και την αποικοδόμηση αλκαλοειδών πουρίνης σε φυτά συσώρευσης θεοβρωμίνης [59, 61]. Παρόλο που υπάρχουν πολλές δυνατότητες, μια εξήγηση είναι ότι δεν διαθέτουν τη δραστηριότητα SAM (δότες μεθυλίου [1]) και συνεπώς δεν είναι σε θέση να μετατρέψουν τη θεοβρωμίνη σε καφεΐνη [59].

### 2.5.5. Μεταβολισμός – Καταβολισμός Αλκαλοειδών πουρίνης.

Κατά την ωρίμαση των καρπών των δέντρων η ποσότητα των μεθυλοξανθινών αυξάνεται, όπως αποτελεί το παράδειγμα της καφεΐνης. Ωστόσο, είναι πολύ αργή η αποικοδομήση της με την απομάκρυνση των τριών μεθυλομάδων να γίνεται σταδιακά, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ξανθίνης. Η κύρια καταβολική οδός είναι: καφεΐνη → θεοφυλλίνη → 3-μεθυξανθίνη → ξανθίνη. Η ξανθίνη ανοικοδομείται περαιτέρω από τη συμβατική οδό καταβολισμού πουρίνης προς CO<sub>2</sub> και NH<sub>3</sub> μέσω ουρικού οξέος, αλλαντοΐνης και αλλαντοϊκού οξέος (Σχήμα 2.12) [59, 60].

Η θεοφυλλίνη μετατρέπεται σε CO<sub>2</sub> πολύ πιο γρήγορα από την καφεΐνη, υποδεικνύοντας ότι η μετατροπή της καφεΐνης σε θεοφυλλίνη είναι το κύριο βήμα περιορισμού του ρυθμού καταβολισμού της καφεΐνης και ο λόγος για τον οποίο η καφεΐνη συσσωρεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ιστούς των καρπών [60]. Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση της θεοβρωμίνης όπου καταβολίζεται άμεσα [24].



Σχήμα 2.12: Καταβολικές οδοί της καφεΐνης αλλά και των άλλων αλκαλοειδών πουρίνης [39].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 3.1. Προσδιορισμός μεθυλοξανθινών στο χαρούπι και σε προϊόντα χαρουπιού με υγρή χρωματογραφία

Οι έρευνες για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεθυλοξανθινών στα χαρούπια έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της προοπτικής χρήσης του χαρουπιού ως υποκατάστατο του κακάο. Η αυξημένη ζήτηση στο κακάο έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται σταδιακά η τιμή του, τόσο λόγω κοινωνικό-πολιτικών συμφερόντων όσο και για περιβαλλοντικούς λόγους (καιρικά φαινόμενα, παράσιτα, ασθένειες) και γι' αυτό προωθούνται υποκατάστατα του, όπως το χαρούπι. Στο κακάο η περιεκτικότητα σε μεθυλοξανθίνες φτάνει το 3 %. Πιο συγκεκριμένα, η θεοβρωμίνη είναι κυρίαρχη και αντιπροσωπεύει το 2 %, ενώ η καφεΐνη βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες (~ 1 %) και η θεοφυλλίνη σε ίχνη. Η περιεκτικότητα τους στο κακάο εξαρτάται από το γονότυπο, την προέλευση του κακάο, το βαθμό ωρίμανσης και τη τεχνική ζύμωσης που χρησιμοποιείται, σύμφωνα με βιβλιογραφικές μελέτες [63 - 65]. Αντίθετα, στο χαρούπι η καφεΐνη και η θεοβρωμίνη, είτε δεν ανιχνεύονται είτε είναι σε ιχνοποσότητες. Η θεοφυλλίνη έχει ανιχνευθεί σε σημαντικές ποσότητες στα εκχυλίσματα χαρουπιού ορισμένων ποικιλιών, ενώ σε άλλα απουσιάζει [2]. Επομένως, είναι σημαντικό να γίνει η μελέτη της παρουσίας θεοφυλλίνης σε περισσότερες ποικιλίες χαρουπιών, όπως τις κυπριακές και τις ελληνικές, για τις οποίες δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία.

Η χαρουπιά παράγει καρπούς πλούσιους σε πολυφαινολικές ενώσεις, που έχουν μελετηθεί εκτενώς μέσω επιστημονικών ερευνών. Σε ορισμένες μελέτες που διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών, αναφέρεται και ο προσδιορισμός των αλκαλοειδών πουρίνης [7, 8, 9, 10]. Ανάλογα με το τμήμα στο οποίο διεξάγεται η ανάλυση, είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν διαφορετικές ενώσεις και σε διαφορετικές ποσότητες. Επομένως, μελέτες πραγματοποιήθηκαν τόσο στους σπόρους, όσο και στη σάρκα της χαρουπιάς αλλά ακόμη και σε φύλλα της χαρουπιάς [7,-12].

Η μελέτη που διεξήγαγε η ερευνητική ομάδα του Corsi L. et al [9] ασχολήθηκε με αναλύσεις σε φύλλα και σε ολόκληρο τον καρπό της χαρουπιάς με σκοπό την αξιολόγηση της κατανομής των πολυφαινολικών ενώσεων στα δυο αυτά διαφορετικά τμήματα του δέντρου. Μέσω απλής τεχνικής εκχύλισης που εφάρμοσαν στα δείγματα τους, θέλησαν να ελέγξουν την ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατικού καρκινώματος σε ποντίκια. Παρατήρησαν ότι τα εκχυλίσματα είχαν παρουσιάσει έντονη μεταβολή του

κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με σημαντικό παράγοντα να αποτελεί η δοσολογία του εκχυλίσματος. Η μέθοδος HPLC με ανιχνευτή UV-Vis που ανέπτυξαν συμπεριλαμβάνει εννέα πολυφαινολικές ενώσεων, καθώς επίσης την καφεΐνη και της θεοφυλλίνη. Με χρήση αντίστροφης φάσης στήλη C<sub>18</sub> και βαθμιδωτής έκλουσης επιτεύχθηκε η ανάλυση των εκχυλισμάτων του καρπού και των φύλλων της χαρουπιάς. Ως κινητή φάση διαλυτών χρησιμοποιήθηκε νερό, διάλυμα φωσφορικού οξέος 0.5 %, ακετονιτρίλιο και μεθανόλη σε διάφορες αναλογίες, με ροή της κινητής φάσης 1 ml/min. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 40 °C και η ανίχνευση των υπό μελέτη ουσιών έγινε στα 205 nm (Πίνακας 3.1). Σημαντικό ήταν το γεγονός πως σε κανένα από τα δείγματα της Σικελίας που μελέτησαν δεν ανιχνεύθηκε η καφεΐνη και η θεοφυλλίνη (Πίνακας 3.2).

Ανάλογες έρευνες διεξήγαγε και η Custodio L. et al. [7, 8] μαζί με τους συνεργάτες της. Γνωρίζοντας ότι τα εκχυλίσματα χαρουπιού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, θέλησαν να προσδιορίσουν τα αντιοξειδωτικά που έχουν κυτταροτοξική δραστηριότητα μειώνοντας τη βιωσιμότητα καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας [7], αλλά και διάφορων άλλων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων [8], μέσω εκχύλισης με μεθανόλη. Η ομάδα τους μελέτησε 12 πολυφαινόλες και τη θεοφυλλίνη σε οκτώ δείγματα (6 θηλυκά και 2 ερμαφρόδιτα) πορτογαλικής προέλευσης, θέλοντας να ελέγξουν πως το φύλο και η ποικιλία επηρεάζουν σημαντικά το χημικό περιεχόμενο και κατ' επέκταση τις βιολογικές δραστηριότητες των εκχυλισμάτων από τους σπόρους των χαρουπιών [7]. Παράλληλα στις ίδιες ποικιλίες, μελετήθηκε και η σάρκα και προσδιορίστηκαν 6 πολυφαινόλες και η θεοφυλλίνη [8]. Η ανάλυση HPLC των εκχυλισμάτων από το ενδοσπέρμιο των σπόρων του χαρουπιού αλλά και της σάρκας έγινε με χρήση αντίστροφης φάσης στήλη C<sub>18</sub>. Στη βαθμιδωτή έκλουση με ροή 0,5 ml/min, όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβαλλόταν σταδιακά με σκοπό την επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού των ενώσεων που ήθελαν να μελετήσουν, επέλεξαν ως διαλύτες τη μεθανόλη και το νερό με 2.5 % οξικό οξύ. Η ανάλυση των δειγμάτων με όγκο έγχυσης 40 μl πραγματοποιήθηκε στους 25 °C (Πίνακας 3.1). Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν παρατίθενται στον Πίνακα 3.2, όπου παρατηρείται ότι η θεοφυλλίνη ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε στα εν λόγω υπό μελέτη δείγματα. Συγκεκριμένα στα δείγματα σάρκας που μελετήθηκαν, τα ερμαφρόδιτα δέντρα είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε θεοφυλλίνη σε μέση τιμή συγκέντρωσης 1000 μg/g χαρουπιού, ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση την είχε η ποικιλία Costela/Canela σε συγκέντρωση που έφτανε τα 600 μg/g χαρουπιού. Σε δυο από τα δείγματα που μελέτησαν, της ποικιλίας Mulata και της Gasparinha δεν ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση της. Στα δείγματα σπόρων που μελετήθηκαν η τιμή της συγκέντρωσης της θεοφυλλίνης

συγκεκριμένα για την ποικιλία Mulata είχε την υψηλότερη τιμή σε 1600  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος χαρουπιού. Τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε 500  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος χαρουπιού την είχε η ποικιλία Galhosa. Γενικότερα η μέση τιμή της θεοφυλλίνης στα δείγματα σάρκας που μελετήθηκαν κυμάνθηκε στα 867  $\mu\text{g/g}$  χαρουπιού και στα δείγματα σπόρων στα 1183  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος χαρουπιού.

Η Ortega N. et al. [10] και η ομάδα της, θέλοντας να μειώσει το χρόνο ανάλυσης των πολύπλοκων δειγμάτων χαρουπιού για τη μελέτη των πολυφαινολών και να επιτύχει γρηγορότερη και ευαίσθητη τεχνική προσδίδοντας αξιόπιστα αποτελέσματα, εφάρμοσε τη μέθοδο UPLC συζευγμένη με διπλό φασματογράφο μάζας. Ο σκοπός τους ήταν ο προσδιορισμός 20 πολυφαινολών, όπως επίσης και της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης σε δείγματα σάρκας χαρουπιού από την Ισπανία (Καταλονία). Με χρήση νερού με 0.2 % οξικού οξέος και ακετονιτρίλιο ως διαλύτες κινητής φάσης σε βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης, έχοντας ροή 0.4 ml/min επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη ουσιών. Η θερμοκρασία ανάλυσης των δειγμάτων της πραγματοποιήθηκε στους 30 °C και μέσω του ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδιόδων (PDA) στα 278 και 339 nm επιτεύχθηκε η ανίχνευση των ουσιών (Πίνακας 3.1). Η συγκέντρωση της θεοβρωμίνης προσδιορίστηκε στα 25  $\mu\text{g/g}$  χαρουπιού και της καφεΐνης στα 39  $\mu\text{g/g}$  χαρουπιού (Πίνακας 3.2).

Ένας μικρός αριθμός επιστημονικών ερευνών, είχαν ως κύριο στόχο της μελέτης τους τον προσδιορισμό των μεθυλοξανθινών στα δείγματα των χαρουπιών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έρευνα του Winston J. [62]. Στόχος της έρευνας του ήταν ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης σε προϊόντα κακάο και χαρουπιού, μέσω της HPLC τεχνικής. Χρησιμοποιήθηκε στήλη  $\text{C}_{18}$  για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των μεθυλοξανθινών. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προϊόντων χαρουπιού ήταν το νερό και η μεθανόλη σε ένα ισοκρατικό σύστημα έκλουσης. Για τα δείγματα χαρουπιού η αναλογία ήταν 23 MeOH : 77 H<sub>2</sub>O και 30 MeOH : 70 H<sub>2</sub>O για τα δείγματα σοκολάτας που μελέτησε, αντίστοιχα, με ρυθμό ροής 1,0 ml/min. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV – Vis ρυθμισμένος σε μήκος κύματος στα 280 nm (Πίνακας 3.1).

Μέσω της έρευνας παρατηρήθηκε ότι τα προϊόντα χαρουπιού περιείχαν χαμηλότερες ποσότητες καφεΐνης και θεοβρωμίνης σε σύγκριση με τα προϊόντα σοκολάτας. Ειδικότερα η μέση τιμή της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης στα δείγματα σοκολάτας κυμάνθηκε στα 0,39 mg/g και 3,25 mg/g, αντίστοιχα. Το προϊόν που παρουσίασε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις

των αναλυτών ήταν το κακάο. Η θεοβρωμίνη ήταν στα 20,3 mg/g και η καφεΐνη 3,14 mg/g. Το προϊόν με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των μεθυλοξανθινών ήταν η σοκολάτα επάλειψης (infant chocolate custard pudding), όπου είχε περιεκτικότητα 0,22 mg/g σε θεοβρωμίνη και 0,008 mg/g σε καφεΐνη. Η θεοβρωμίνη ήταν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι η καφεΐνη στα υπό μελέτη δείγματα μιας και είναι η κύρια μεθυλοξανθίνη που συναντάται στα προϊόντα κακάο (υποκεφάλαιο 2.2). Από την άλλη, οι μέσες τιμές των αναλυτών στα δείγματα χαρουπιών που μελετήθηκαν ήταν πολύ χαμηλότερες. Η θεοβρωμίνη ήταν στα 0,25 mg/g και η καφεΐνη στα 0,03 mg/g. Την υψηλότερη συγκέντρωση την είχε το προϊόν carob chips and nuggets σε συγκέντρωση θεοβρωμίνης 0,50 mg/g και καφεΐνης 0,067 mg/g. Υπήρξαν και τρία προϊόντα στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν οι αναλύτες και προσδιορίστηκαν ως μη ανιχνεύσιμοι (n.d). Σε γενικές γραμμές, στα δείγματα χαρουπιού οι υπό μελέτη αναλύτες δεν ανιχνεύθηκαν ή βρέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Πίνακας 3.2).

Άλλη επιστημονική μελέτη από την ομάδα του Khelifa M. et al. [11] είχε ως στόχο τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης της σάρκας των χαρουπιών από το Μαρόκο, συμπεριλαμβανομένων και των μεθυλοξανθινών καφεΐνης και θεοβρωμίνης Μέσω HPLC τεχνικής συζευγμένη με UV ανιχνευτή και ισοκρατικό σύστημα διαλυτών μεθανόλης και νερού σε αναλογία 30 προς 70 (Πίνακας 3.1) παρατήρησαν ότι τα υπό μελέτη δείγματα ήταν απαλλαγμένα από αυτές τις ουσίες, ορίζοντας τις ως μη ανιχνεύσιμες (Πίνακας 3.2).

Τέλος μια άλλη σχετικά πρόσφατη έρευνα του 2018 που πραγματοποίησε η Papaefthiou E. και η ομάδα της [12] είχε ως στόχο τον προσδιορισμό της διατροφικής σύνθεσης παραδοσιακών προϊόντων χαρουπιού αλλά και τη μελέτη της σάρκας των τριών κύριων κυπριακών ποικιλιών χαρουπιού. Η κινητή φάση του HPLC ήταν ισοκρατικό σύστημα μεθανόλης και νερού αναλογίας 30:70, με ρυθμό ροής 1 ml/min. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης επιτεύχθηκε με χρωματογραφική στήλη C<sub>18</sub> και ο όγκος έκχυσης του εκχυλίσματος ήταν 10 μl. Ο συνολικός χρόνος έκλουσης κάθε δείγματος που μελετήθηκε καθορίστηκε περίπου στα 15 λεπτά (Πίνακας 3.1). Μέσω των αποτελεσμάτων που εξήχθηκαν παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα σε καφεΐνη και θεοβρωμίνη στα δείγματα προϊόντων χαρουπιού αλλά και της σάρκας των τριών κυπριακών ποικιλιών χαρουπιού της Κύπρου βρέθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου. Το μόνο προϊόν στο οποίο ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης ήταν η πραλίνα με σιρόπι χαρουπιού, στο οποίο οι συγκεντρώσεις των αναλυτών ποσοτικοποιήθηκαν στα 2,51 mg/100 ml δείγματος (Πίνακας 3.2).

**Πίνακας 3.1:** Συνοπτικές πειραματικές συνθήκες HPLC που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

	Corsi L. Et al (2002) [9]	Custodio L. et al (2011) [7,8]	Ortega N. et al (2009) [10]	Winston J. et al (1984) [62]	Khliga M. et al (2013) [11]	Papaeifstathiou E. et al (2018) [12]
	<b>Πειραματικές Συνθήκες</b>					
Στήλη	RP - C <sub>18</sub> (100 Å, 250 x 4.6 mm)	120 ODS - A (150mm x 4.0 µm, 5 µm)	Acquity High Strength Silica (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 µm)	Altex Ultra- sphere-ODS (4.6 mm x 25 cm)	C18 (4.6 D.I., 200mm, 5µm)	C18 (300 mm x 3.9 mm x 5µm)
Σύστημα Κινητής φάσης	Βαθμιωτή Έκλυση · H <sub>2</sub> O · 0.5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · ACN · MeOH	Βαθμιωτή Έκλυση · H <sub>2</sub> O/2.5% AcOH · MeOH	Βαθμιωτή Έκλυση · H <sub>2</sub> O/0.2 % AcOH · ACN	Ισοκρατική Έκλυση · 77 % H <sub>2</sub> O · 23 % MeOH	Ισοκρατική Έκλυση · 70 % H <sub>2</sub> O · 30 % MeOH	Ισοκρατική Έκλυση · 70 % H <sub>2</sub> O · 30 % MeOH
Κινητή Φάση						
Θερμοκρασία στήλης (°C)	40	25	30	-	-	-
Ροή (ml/min)	1	0.5	0.4	1	-	1
Ανιχνευτής	UV-Vis (205 nm)	UV-Vis	PDA - 278 & 339 nm & MS/MS	UV-Vis (280 nm)	UV-Vis	PDA - 273 nm
Χρόνος Ανάλυσης (min)	40	50	16	-	-	15

**Πίνακας 3.2:** Περιεκτικότητα των μεθυλοξανθινών σε δείγματα σπόρων και σάρκας χαρουπιού και προϊόντων χαρουπιού.

Δείγματα		Συγκέντρωση (μg/g carob)			Βιβλιογραφία
		TB	TF	CAF	
Καρπός Σικελίας		-	n.d	n.d	Corsi L. et al [9]
Φύλλα χαρουπιάς		-	n.d	n.d	
		Συγκέντρωση TB & CAF (mg/100 ml)			
Σάρκα Κυπριακών χαρουπιών	Κουμποτά	< LOD			Papaefstathiou et al [12]
	Κουντούρκα	< LOD			
	Τηλλυριάς	< LOD			
	Προϊόντα από χαρούπι	< LOD			
	Πραλίνα με σιρόπι χαρουπιού	2,51			
		Συγκέντρωση (μg/g carob)			
		TB	TF	CAF	
Σάρκα Μαροκινών χαρουπιών		n.d	-	n.d	Khelifa et al. [11]
Σάρκα χαρουπιών Καταλονίας		24.8 ± 3.3	-	38.5 ± 4.8	Ortega et al. [10]
Σάρκα Πορτογαλικών χαρουπιών	Mulata	-	-	-	Custodio et al. [7, 8]
	Galhosa	-	700	-	
	Aida	-	900	-	
	Gasparinha	-	-	-	
	Costela/Canela	-	600	-	
	Preta de Lagos	-	900	-	
	Hemaphrodites	-	1000	-	
		Συγκέντρωση (μg/g extract)			
Σπόροι Πορτογαλικών χαρουπιών	Mulata	-	1600	-	Custodio et al. [7, 8]
	Galhosa	-	500	-	
	Aida	-	1000	-	
	Gasparinha	-	1300	-	
	Costela/Canela	-	1300	-	
	Hemaphrodites	-	1400	-	

### 3.2. Τεχνικές εκχύλισης μεθυλοξανθινών

Το στάδιο της επεξεργασίας των δειγμάτων των χαρουπιών αποτελεί ένα από τα βασικότερα μέρη της συνολικής αναλυτικής διαδικασίας προσδιορισμού των μεθυλοξανθινών. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί διαφορετικές μέθοδοι προετοιμασίας των δειγμάτων των χαρουπιών, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εν λόγω βιοδραστικών ουσιών. Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές εξαγωγής των αναλυτών από τα χαρούπια βασίζεται στην εκχύλιση στερεού-υγρού (solid-liquid extraction, SLE).

Ο Corsi et al. [9] στην έρευνα του, όπως προαναφέρθηκε, είχε ως σκοπό τον προσδιορισμό των πολυφαινολών αλλά και δυο μεθυλοξανθινών, της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης. Μέσω απλής τεχνικής εκχύλισης, με χρήση ζεστού νερού, πέτυχε την εξαγωγή των υπό μελέτη ουσιών. Πιο συγκεκριμένα σκόνη σάρκας χαρουπιού ή σκόνης φύλλων χαρουπιού



προστέθηκαν σε ζεστό νερό και ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος. Το προκύπτον εκχύλισμα συλλέχθηκε και λυοφιλιώθηκε.

Ακολούθως στην έρευνα της η Papaefstathiou et al. [12] για την εξαγωγή των μεθυλοξανθινών καφεΐνης και θεοβρωμίνης, από τις τρεις κυπριακές ποικιλίες χαρουπιών, αλλά και από τα παραγόμενα προϊόντα από χαρούπι, πραγματοποιήθηκε χρήση λουτρού υπερήχων για διάστημα 30 λεπτών, αφού προστέθηκε λίγη ποσότητα ζεστού νερού. Έπειτα συμπληρώθηκε ο όγκος του νερού (συνολικός όγκος 50 ml) στο δείγμα και ακολούθησε γρήγορη ανάδευση για ακόμη 30 λεπτά. Επιπρόσθετα είχαν προστεθεί διαλύματα 1 ml Carrez I και Carrez II, αντίστοιχα. Ο ρόλος της χρήσης αυτών των διαλυμάτων είναι προκειμένου να προκύψουν εκχυλίσματα απαλλαγμένα από λίπη και πρωτεΐνες.

Ο Khliga et al. [11] και η ομάδα του στη μελέτη τους εφάρμοσαν δυο ξεχωριστές τεχνικές εκχύλισης για τις μεθυλοξανθίνες στα δείγματα τους. Για τον προσδιορισμό της θεοβρωμίνης συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε απλή μέθοδο εκχύλιση στερεού-υγρού (SLE) με χρήση μόνο νερού υπό γρήγορη ανάδευση. Από την άλλη, για τον προσδιορισμό της καφεΐνης, ακολουθήθηκε διαφορετική τεχνική εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, μέσω τεχνικής Soxhlet και χρήσης χλωροφορμίου ως διαλύτη έγινε η εξαγωγή της καφεΐνης από τα υπό μελέτη δείγματα. Μέσω συσκευής περιστροφικής εξάτμισης υπό κενό (rotary evaporation) απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης. Μικρή ποσότητα ζεστού νερού προστέθηκε και αφού το εκχύλισμα φιλτραρίστηκε, έγινε έγχυση του στο HPLC για ανάλυση. Από τα χρωματογραφήματα που πάρθηκαν δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός ούτε της θεοβρωμίνης ούτε και της καφεΐνης και για αυτό αναφέρθηκαν ως μη ανιχνεύσιμες (not detected, n.d.).

Πιο περίπλοκη τεχνική εκχύλισης είχε εφαρμόσει ο Ortega et al. [10] και οι συνεργάτες του προκειμένου να προσδιορίσουν μια ομάδα πολυφαινόλων αλλά και την καφεΐνη και τη θεοβρωμίνη στα υπό μελέτη δείγματα χαρουπιών. Αρχικά είχε γίνει χρήση του διαλύτη εξανίου για να απομακρυνθούν τα λίπη και να μην αποτελούν εμπόδιο στη μετέπειτα ανάλυση των εκχυλισμάτων με τη χρήση του orbital αναδευτήρα. Ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος και μετά το στερεό κρατήθηκε και συνεχίστηκε επαναλαμβανόμενη διαδικασία τέσσερις φορές για την εξαγωγή των αναλυτών. Συγκεκριμένα στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε καθορισμένος όγκος διαλύματος ακετόνης - νερού (70:30) και μέσω της συσκευής Polytron αναδευτήρα για ένα σύντομο χρονικό διάστημα. Μετέπειτα, ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος. Μετά από κάθε επανάληψη το εκχύλισμα συλλεγόταν και ακολουθούσε

περιστροφική εξάτμιση (rotary evaporation) για απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη προτού λυοφιλωθεί.

Τέλος, η Custodio et al. [7, 8] βασιζόμενη σε προηγούμενες έρευνες που πραγματοποίησε για τα χαρούπια εφάρμοσε τη τεχνική Soxhlet για να εξαγάγει τη θεοφυλλίνη από τους σπόρους και τη σάρκα των χαρουπιών από τις οκτώ θηλυκές πορτογαλικές ποικιλίες και των δυο ερμαφρόδιτων δέντρων που μελέτησε. Με τη χρήση του εξανίου ως αρχικό διαλύτη είχε επιτύχει την απομάκρυνση των λιπιδίων και ακολούθως μέσω των μεθανολικών εκχυλισμάτων ήταν εφικτός ο προσδιορισμός των αναλυτών. Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα σπόρων αφέθηκαν για 2 x 3 ώρες στο διαλύτη με εξάνιο και ακολούθως στη μεθανόλη για ακόμη 5 ώρες. Το προκύπτον εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε και μετέπειτα απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης μέσω συσκευής περιστροφικής εξάτμισης υπό κενό (rotary evaporation).

Πίνακας 3.3: Συνοπτικές πειραματικές διαδικασίες μεθόδων εκχύλισης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία

Τεχνικές εκχύλισης					
Corsi L. et al [9]	Papaefstathiou E. et al [12]	Khliga M. et al [11]	Ortega N. et al [10]	Custodio L. et al [7,8]	
Συνοπτικές Διαδικασίες					
Εκχύλιση <b>TF &amp; CAF</b>	Εκχύλιση <b>TB &amp; CAF</b>	Εκχύλιση <b>TF</b>	Εκχύλιση <b>CAF</b>	Εκχύλιση <b>TB &amp; CAF</b>	Εκχύλιση <b>TF</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 g σκόνης χερουπιού</li> <li>• 100 ml ζεστού H<sub>2</sub>O για 15 min</li> <li>• Φυγοκέντριση για 10 min</li> <li>• Λυοφιλίωση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g σκόνης χερουπιού</li> <li>• Προσθήκη λίγου ζεστού H<sub>2</sub>O σε λουτρό υπερήχων για 30 min</li> <li>• Προσθήκη 1 ml Carrez I &amp; 1 ml Carrez II</li> <li>• Συμπλήρωση H<sub>2</sub>O και ανάδευση για 30 min</li> <li>• Διήθηση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 g σκόνης χερουπιού</li> <li>• Προθήκη H<sub>2</sub>O</li> <li>• Ανάδευση για 30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 90 min με χλωροφόρμιο</li> <li>• Rotary εξάτμιση</li> <li>• Προσθήκη ζεστού H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 g σκόνης χερουπιού με 5 ml n-hexane για 20 min σε orbital shaker</li> <li>• Φυγοκέντριση για 15 min</li> <li>• 70% Ακετονη : H<sub>2</sub>O για 5 min στο Polytron <b>x 4</b></li> <li>• Φυγοκέντριση για 8 min</li> <li>• Rotary εξάτμιση</li> <li>• Λυοφιλίωση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g σκόνης χερουπιού</li> <li>• 2 x 3 h με n-hexane</li> <li>• 5 h με MeOH</li> <li>• Φυγοκέντριση για 10 min</li> <li>• Rotary εξάτμιση</li> </ul>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1. Χημικά

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες καφεΐνης (CAF), θεοβρωμίνης (TB,  $\geq 98\%$ ) και θεοφυλλίνης (TF,  $\geq 99\%$ ) υψηλής καθαρότητας. Για τα διαλύματα Carrez I και Carrez II χρησιμοποιήθηκαν διένυδρος οξικός ψευδάργυρος (zinc acetate dehydrate) και τριένυδρο εξακυανοσιδηρούχο (II) κάλιο (potassium hexacyano-ferrate (II)-3 water (99%)), αντίστοιχα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είτε ως κινητή φάση είτε για την προετοιμασία της στήλης ήταν νερό ( $H_2O$ ), μεθανόλη (MeOH, 99,8%) και ακετονιτρίλιο (ACN, 99,8%). Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες όπως εξάνιο (n-hexane) και ακετόνη (acetone) για ορισμένες περιπτώσεις εκχυλίσεων. Οι διαλύτες και το απεσταγμένο νερό ήταν υψηλής καθαρότητας (βαθμού υγρής χρωματογραφίας). Όλα τα χημικά προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

### 4.2. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων μεθυλοξανθινών

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων μεθυλοξανθινών εύρους συγκεντρώσεων 0,5-10  $\mu\text{g/ml}$  παρασκευάστηκαν 300  $\mu\text{g/ml}$  διαλυμάτων θεοβρωμίνης, θεοφυλλίνης και καφεΐνης, αντίστοιχα. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία 2 mL για κάθε πρότυπο διάλυμα. Τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 5, και 10  $\mu\text{g/ml}$ . Για κάθε συγκέντρωση λήφθηκαν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα εις τριπλούν.

### 4.3. Εκχύλιση μεθυλοξανθινών από χαρούπι και φύλλα χαρουπιών

Οι λοβοί ώριμων χαρουπιών λήφθηκαν από τις τρεις επαρχίες της Κύπρου, Λάρνακας (Δεκέλεια), Λεμεσού (Συνεργατισμός Χαρουπιών) και Πάφου (Αμαργέτη) αλλά και από την Κρήτη. Παράλληλα ελέγχθηκαν και άγουροι λοβοί της επαρχίας Λάρνακας (Δεκέλεια), όσο και φύλλα χαρουπιάς από την επαρχία Λάρνακας. Τα δείγματα που λήφθηκαν από την επαρχία Λάρνακας, τόσο τα άγουρα όσο και τα ώριμα, καθώς και τα φύλλα πάρθηκαν από το ίδιο δέντρο.

Πριν από την ανάλυση, οι λοβοί χαρουπιών πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, ξηράθηκαν στον αέρα, τεμαχίστηκαν, διαχωρίστηκε η σάρκα από τους σπόρους, αλέσθηκαν (με χρήση Thermomix), αποθηκεύτηκαν σε πλαστικά σακουλάκια υπό κενό και διατηρήθηκαν στους  $4^\circ\text{C}$  μέχρι την ανάλυση τους.

Η εκχύλιση των μεθυλοξανθινών από διαφορετικές μήτρες τροφίμων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική φύση των τροφίμων, από τα χαρακτηριστικά των τροφίμων (μέγεθος σωματιδίων του δείγματος, παρουσία παρεμβαλλόμενων ουσιών) και από τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόζεται. Συνεπώς, δεν υπάρχει ενιαία διαδικασία για τη βέλτιστη εκχύλιση όλων των μεθυλοξανθινών από όλες τις μήτρες τροφίμων. Επομένως, ακολουθήθηκαν πέντε διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης βασιζόμενες σε βιβλιογραφικές μελέτες (υποκεφάλαιο 3.2.), αλλά και με βάση τον εργαστηριακό εξοπλισμό που διαθέταμε, τόσο για τη σάρκα όσο και για τους σπόρους των ώριμων και των άγουρων χαρουπιών, καθώς και για τα φύλλα της χαρουπιάς (Πίνακας 4.1):

**(Α)** Αρχικά ζυγίστηκαν 15 g σκόνης χαρουπιού ή 3 g σπόρων ή φύλλων όπου προστέθηκαν 150 mL ή 30 ml κρύου νερού αντίστοιχα, και αφέθηκαν για 12 ώρες στους 4 °C προκειμένου να απομακρυνθούν οι διαλυτοί υδατάνθρακες (σάκχαρα), πριν από την εκχύλιση. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκε και διηθήθηκε υπό κενό με χωνί Buhner. Το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε μετά από τη διήθηση κρατήθηκε και προστέθηκε σε αυτό 150 mL νερό όπου με συσκευή reflux επιτεύχθηκε βρασμός με ανάδευση για 15 λεπτά. Ακολούθως αφέθηκε μέχρι να κρυώσει, έγινε φυγοκέντρηση και στη συνέχεια διήθηση υπό κενό με χρήση χωνιού Buhner. Το προκύπτον εκχύλισμα αφού τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη, πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση του. (Corsi et al. 2002; Hadjirakou et al. 2018) [9, 30]

**(Β)** Ζυγίστηκαν 2 g δείγματος, και προστέθηκαν 10 mL ζεστού νερού. Τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (sonicator) για περίπου 30 min και μετά προστέθηκαν 1 mL Carrez I και 1 mL Carrez II, προκυμμένου να απομακρυνθούν τυχόν λίπη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 40 mL νερό όπου έγινε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για ακόμα 30 min. Με το τέλος της διαδικασίας αυτής έγινε φυγοκέντρηση του δείγματος και διήθηση υπό κενό. Το διήθημα τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και πραγματοποιήθηκε λυοφιλίωση του. (Papaftathiou et al 2018) [12]

**(Γ)** Ζυγίστηκαν 2 g δείγματος, και προστέθηκαν 200 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθησε έντονη ανάδευση για 30 λεπτά. Το προκύπτον εκχύλισμα πάρθηκε με φυγοκέντρηση και διήθηση υπό κενό και ακολούθως λυοφιλιώθηκε. (Khlifa et al. 2013) [11]

**(Δ)** Αρχικά ζυγίστηκαν 1 g δείγματος, προστέθηκαν 5 mL εξανίου και ακολουθήσε γρήγορη ανάδευση μέσω της χρήσης reflux για 20 min. Ακολούθως έγινε φυγοκέντρηση του δείγματος για 15 min (4 ° C, 12500 g στροφές) και κρατήθηκε το στερεό υπόλειμμα όπου χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια. Σε αυτό προστέθηκε 5 mL διάλυμα ακετόνης:νερού (70:30)

όπου για 5 λεπτά έγινε ανάδευση του με τη χρήση του ομογενοποιητή. Μετά το πέρας της ανάδευσης (5 λεπτά) ακολούθησε φυγοκέντρηση για 8 λεπτά (4 ° C, 12500 g στροφές). Τα βήματα αυτά επαναλήφθηκαν συνολικά τέσσερις φορές και κάθε φορά γινόταν συλλογή του εκχυλίσματος και το δείγμα υποβαλλόταν στην προαναφερθείσα τεχνική. Το τελικό εκχύλισμα διηθήθηκε υπό κενό και έπειτα απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης με συσκευή περιστροφικής εξάτμισης υπό κενό (rotavapor) και ξηράθηκε με λυοφιλίωση. (Ortega et al. 2009) [10]

**(E)** Ζυγίστηκαν 3,75 g δείγματος όπου εκχυλίστηκαν με συσκευή Soxhlet, αρχικά με εξάνιο (150 ml) για 5 ώρες, για να απομακρυνθούν τα λιπίδια, και στη συνέχεια με μεθανόλη (150 ml) για 5 ώρες. Τα εκχυλίσματα μεθανόλης διηθήθηκαν και έπειτα απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης με συσκευή περιστροφικής εξάτμισης υπό κενό (rotavapor). Προστέθηκε μικρή ποσότητα νερού και ακολούθως ξηράθηκαν με λυοφιλίωση. (Custodio et al 2009) [7, 8]

Όλα τα στερεά εκχυλίσματα διατηρήθηκαν σε προζυγισμένα vials υπό άζωτο στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυσή τους.

**Πίνακας 4.1:** Συνοπτικές πειραματικές διαδικασίες των τεχνικών εκχύλισης που πραγματοποιήθηκαν.

Τεχνικές εκχύλισης				
A	B	Γ	Δ	E
Hadjipakkou H. et al [30] Corsi L. et al [9]	Papafstathiou E. et al [12]	Khliga M. et al [11]	Ortega N. et al [10]	Custodio L. et al [7,8]
Συνοπτικές Διαδικασίες				
<ul style="list-style-type: none"> <li>15 g σκόνης χαρουπιού ή 3 g σπόρων/φυλλα</li> <li>150 ml ή 30 ml κρύου H<sub>2</sub>O για 12 ώρες στους 4 °C</li> <li>Φυγοκέντριση</li> <li>Reflux στερεού υπολείμματος και 150 ml H<sub>2</sub>O για 15 min</li> <li>Φυγοκέντριση</li> <li>Διήθηση</li> <li>Λυοφιλίωση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 g σκόνης χαρουπιού</li> <li>Προσθήκη 10 ml ζεστού H<sub>2</sub>O σε λουτρό υπερήχων για 30 min</li> <li>Προσθήκη 1 ml Carrez I &amp; 1 ml Carrez II</li> <li>40 ml H<sub>2</sub>O και ανάδευση για 30 min</li> <li>Διήθηση</li> <li>Λυοφιλίωση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 g σκόνης χαρουπιού</li> <li>Προσθήκη 200 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>Ανάδευση για 30 min</li> <li>Φυγοκέντριση</li> <li>Διήθηση</li> <li>Λυοφιλίωση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 g σκόνης χαρουπιού με 5 ml n-hexane για 20 min σε Reflux</li> <li>Φυγοκέντριση για 15 min</li> <li>70% Acetone:30 % H<sub>2</sub>O για 5 min στον Ομογενοποιητή <b>x4</b></li> <li>Φυγοκέντριση για 8 min</li> <li>Rotary εξάτμιση</li> <li>Διήθηση</li> <li>Λυοφιλίωση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Soxhlet τεχνική</li> <li>3,75 g σκόνης χαρουπιού</li> <li>5 h με n-hexane</li> <li>5 h με MeOH</li> <li>Rotary εξάτμιση</li> <li>Λυοφιλίωση</li> </ul>

#### 4.4. Χρωματογραφικές συνθήκες

Τα πειράματα διεξήχθησαν στο σύστημα Thermo Scientific – Dionex Ultimate 3000 (HPLC). Για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των τριών υπό μελέτη ουσιών χρησιμοποιήθηκε στήλη Acclaim™ 120A° Dionex Bonded Silica Products C<sub>18</sub> μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm, με πληρωτικά σωματίδια διαμέτρου 5 μm (4,6 x 250 mm, 5μm). Η συγκεκριμένη στήλη αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Είναι με τέτοιο τρόπο σχεδιασμένη για να συγκρατεί υδρόφοβες ενώσεις σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό τη ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας <sup>[69]</sup>. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Συγκεκριμένα ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε 70 % H<sub>2</sub>O και 30 % MeOH με σταθερή ταχύτητα ροής 1 mL/min και χρόνο έκλουσης 45 λεπτά για κάθε δείγμα. Η έκλουση των αναλυτών ήταν εντός 15 λεπτών, αλλά τα επιπλέον 30 λεπτά ήταν για μια διαδικασία καθαρισμού της στήλης πριν από κάθε ανάλυση των δειγμάτων. Κάθε δείγμα αναλυόταν τρεις φορές προκειμένου να ελεγχθεί ο παράγοντας επαναληψιμότητας. Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών εκλούσεων η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C και ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 10 μL. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 273 nm. Πριν από κάθε πρώτη έγχυση του δείγματος η στήλη ξεπλενόταν με 50:50 (%) H<sub>2</sub>O:MeOH, και μετά το τέλος κάθε πειραματικού ελέγχου η στήλη διατηρόταν σε διαλύτη H<sub>2</sub>O:ACN σε αναλογία 30:70 (%) αντίστοιχα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είτε ως κινητή φάση είτε για ξέπλυμα της στήλης ήταν υψηλής καθαρότητας (βαθμού HPLC). Απαραίτητη ήταν επίσης η απαέρωση τους ώστε να αποφευχθεί η απόφραξη των πόρων των σωματιδίων της στήλης ή η διακοπή της ροής του διαλύτη από φυσαλίδες. Πραγματοποιήθηκε διήθηση των διαλυτών μέσα από ειδικές μεμβράνες (Nylon 66 Filter Membranes, μέγεθος πόρων 0,45 μm, διαμέτρου 47 mm) και χρήση υπερήχων (sonicator) για διάστημα 25 λεπτών για την απαέρωση τους.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. Βελτιστοποίηση της μεθόδου HPLC για την ανάλυση των μεθυλοξανθινών

Έχοντας υπόψη τις βιβλιογραφικές μελέτες που προαναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 3 αλλά και μελετώντας έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη των μεθυλοξανθινών στο κακάο, στον καφέ, και σε άλλα προϊόντα επιλέχθηκε η μέθοδος HPLC – UV ως κατάλληλη και αξιόπιστη τεχνική προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης των συγκεντρώσεων των μεθυλοξανθινών [63-65], τόσο στη σάρκα όσο και στους σπόρους των χαρουπιών.

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της αναλυτικής μεθόδου HPLC ελέγχθηκαν οι παράμετροι της σύστασης της κινητής φάσης και της ταχύτητας ροής της. Έχοντας στη διάθεση μας τη στήλη Acclaim™ 120A° Dionex Bonded Silica Products C<sub>18</sub> μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm, με πληρωτικά σωματίδια διαμέτρου 5 μm (4,6 x 250 mm, 5μm), της Thermo, δοκιμάστηκαν διάφορες τεχνικές διαχωρισμού των πρότυπων υπό μελέτη ουσιών, μεταβάλλοντας τους παράγοντες που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

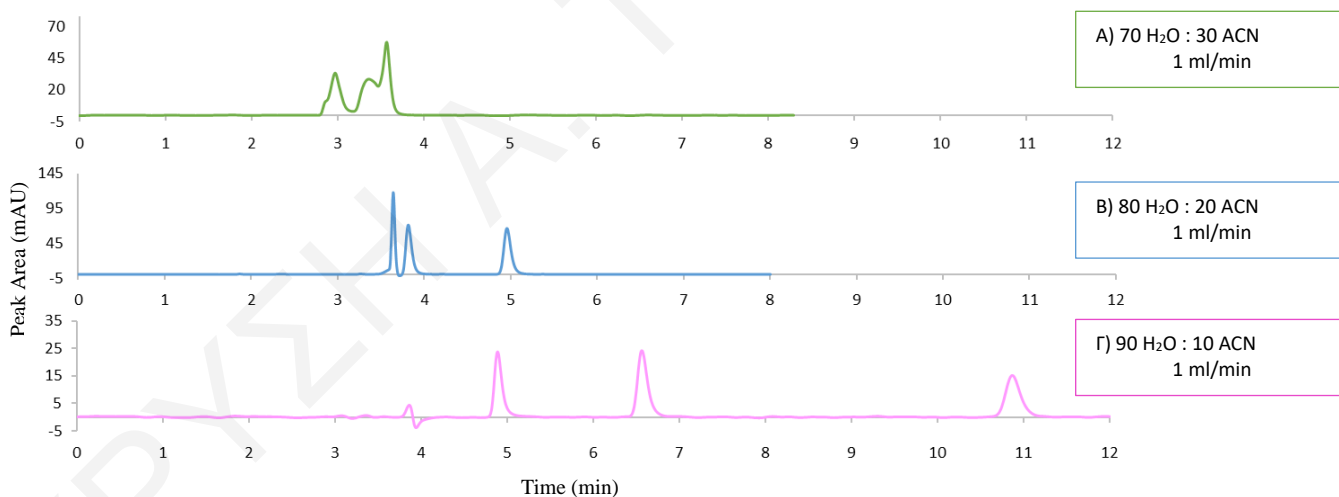
Αρχικά, μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά της θεοβρωμίνης, της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης, μεταβάλλοντας τη σύσταση της κινητής φάσης. Πιο συγκεκριμένα μεταβάλλοντας την εκατοστιαία ποσότητα αλλά και το είδος των διαλυτών της κινητής φάσης. Η συγκέντρωση των αναλυτών στο πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό ήταν 0,1 mg/ml και η ανίχνευση τους έγινε στα 273 nm. Ξεκινώντας, μελετήθηκε κινητή φάση που αποτελείται από νερό (H<sub>2</sub>O) και ακετονιτρίλιο (ACN) σε τρεις διαφορετικές εκατοστιαίες συστάσεις (70 H<sub>2</sub>O : 30 ACN, 80 H<sub>2</sub>O : 20 ACN και 90 H<sub>2</sub>O : 10 ACN) σε ένα ισοκρατικό σύστημα έκλουσης των διαλυτών, όπως φαίνονται και στον Πίνακα 5.1. Παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας την αναλογία της σύστασης της πολικής φάσης επιτεύχθηκε σημαντικά καλύτερος διαχωρισμός των εν λόγω αναλυτών. Συγκεκριμένα όταν η σύσταση της κινητής φάσης ήταν 70 H<sub>2</sub>O : 30 ACN, δεν είχε επιτευχθεί καλός διαχωρισμός των μεθυλοξανθινών με αποτέλεσμα τη συνέκλουση τους, σύμφωνα με τα φάσματα του πρότυπου μίγματος των αναλυτών που πάρθηκαν. Η σειρά έκλουσης των αναλυτών είχε ως εξής: πρώτα εκλούστηκε η θεοβρωμίνη, στα 2,97 λεπτά, ακολούθως η θεοφυλλίνη στα 3,37 λεπτά και αμέσως μετά η καφεΐνη στα 3,56 λεπτά (Σχήμα 5.1 (A), Πίνακας 5.2). Σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε με κινητή φάση 80 H<sub>2</sub>O : 20 ACN. Όμως, δεν επιτεύχθηκε καλός διαχωρισμός των υπό μελέτη ουσιών, αφού η θεοβρωμίνη και η θεοφυλλίνη εκλούστηκαν σε παρεμφερείς χρόνους.

Η διαχωριστική ικανότητα για τα ζεύγη των μεθυλοξανθινών υπολογίστηκε μέσω της σχέσης:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

όπου  $(t_R)_B$  είναι ο χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας και  $(t_R)_A$  είναι ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας που εκλύεται αμέσως στο χρωματογράφημα.  $W_A$  και  $W_B$  είναι το εύρος της αντίστοιχης κορυφής (δηλ. η βάση της κορυφής). Δύο ουσίες θεωρείται ότι διαχωρίζονται πλήρως, όταν το  $R_s$  είναι ίσο τουλάχιστον με 1,5 [66].

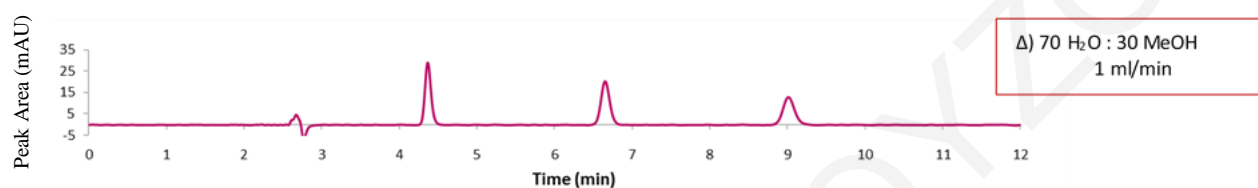
Επομένως, η διαχωριστική ικανότητα για το ζεύγος θεοβρωμίνης – θεοφυλλίνης έδωσε τιμή 1,73 και 8,14 για το ζεύγος θεοφυλλίνη – καφεΐνη. Η σειρά έκλουσης των αναλυτών ήταν η ίδια. Η θεοβρωμίνη εκλούστηκε πρώτη στα 3,64 λεπτά, η θεοφυλλίνη στα 3,81 λεπτά και η καφεΐνη στα 4,95 λεπτά (Σχήμα 5.1 (B), Πίνακας 5.2). Καλύτερη διαχωριστική ικανότητα παρατηρήθηκε όταν η σύσταση της κινητής φάσης ήταν 90 H<sub>2</sub>O : 10 ACN. Η διαχωριστική ικανότητα για τη θεοβρωμίνη – θεοφυλλίνη είχε  $R_s (TB-TF) = 9,26$  και τη θεοφυλλίνη – καφεΐνη,  $R_s (TF-CAF) = 15,68$ . Παρόλα αυτά ήταν σχετικά μεγάλος ο χρόνος έκλουσης των αναλυτών μιας και η ολοκλήρωση της ανάλυσης διάρκεσε 12 λεπτά. Η θεοβρωμίνη εκλούστηκε στα 4,81 λεπτά, η θεοφυλλίνη στα 6,45 λεπτά και η καφεΐνη στα 10,79 λεπτά (Σχήμα 5.1 (Γ), Πίνακας 5.2).



**Σχήμα 5.1:** Χρωματογραφήματα μεταβάλλοντας την εκατοστιαία ποσότητα των διαλυτών σε σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενο από H<sub>2</sub>O : ACN. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1<sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2<sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3<sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).

Τέλος, για να ελεγχθεί και ένα άλλο μίγμα διαλυτών ως κινητή φάση έχοντας υπόψη τις τρεις βιβλιογραφικές μελέτες που πραγματοποίησαν αποκλειστικά τεχνική για προσδιορισμό των μεθυλοξανθινών στα εκχυλίσματα χαρουπιών, επιλέχθηκε να ελεγχθεί κινητή φάση που

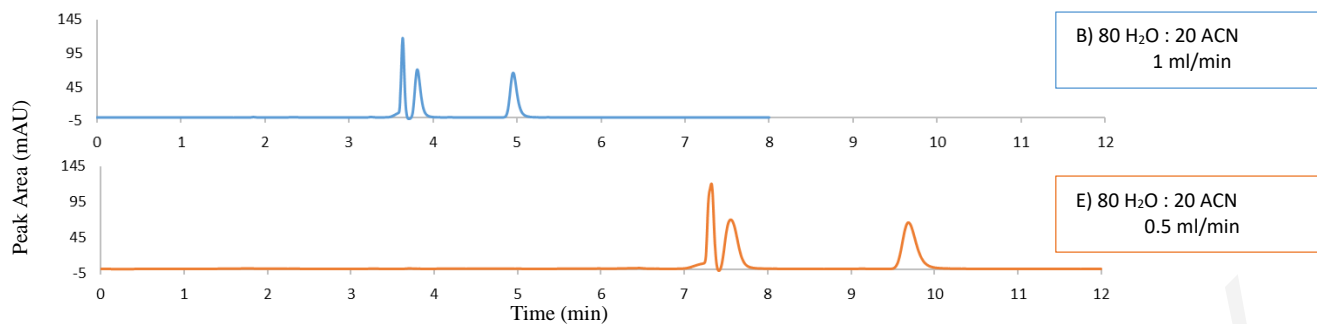
αποτελείτο από νερό (H<sub>2</sub>O) και μεθανόλη (MeOH) σε εκατοστιαία σύσταση 70:30, σε ισοκρατικό σύστημα έκλουσης (Πίνακας 5.1). Επιτεύχθηκε διαχωρισμός της θεοβρωμίνης και της θεοφυλλίνης έχοντας διαχωριστική ικανότητα  $R_s (TB-TF) = 12,95$  και της θεοφυλλίνης με την καφεΐνη  $R_s (TF-CAF) = 9,69$ . Παράλληλα ο χρόνος έκλουσης των ουσιών ήταν ικανοποιητικός (10 λεπτά). Η σειρά έκλουσης διατηρήθηκε η ίδια, με τη θεοβρωμίνη να εκλύεται στα 4,35 λεπτά, η θεοφυλλίνη στα 6,61 λεπτά και η καφεΐνη στα 8,94 λεπτά (Σχήμα 5.2 (Δ), Πίνακας 5.2).



**Σχήμα 5.2:** Χρωματογράφημα ελέγχου συστήματος κινητής φάσης αποτελούμενη από H<sub>2</sub>O : MeOH σύστασης 70:30. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1<sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2<sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3<sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).

Όπως παρατηρήθηκε, η σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών σε όλα τα συστήματα διαλυτών που ελέγχθηκαν διατηρήθηκε η ίδια. Η καφεΐνη είναι η λιγότερο πολική από τις τρεις μεθυλοξανθίνες. Διαθέτοντας τρεις μεθυλικές ομάδες στο μόριό της, έχει ως αποτέλεσμα να αλληλοεπιδρά σε μεγαλύτερο βαθμό με την άπολη στατική φάση και να εκλύεται τελευταία. Η θεοβρωμίνη και η θεοφυλλίνη αποτελούν συντακτικά ισομερή που διαθέτουν δύο μεθυλικές ομάδες. Με βάση την τιμή της διπολικής τους ροπής, η θεοβρωμίνη είναι πιο πολική από τη θεοφυλλίνη και άρα αναμένεται να εκλουσθεί πρώτη, όπως πράγματι παρατηρήθηκε πειραματικά.

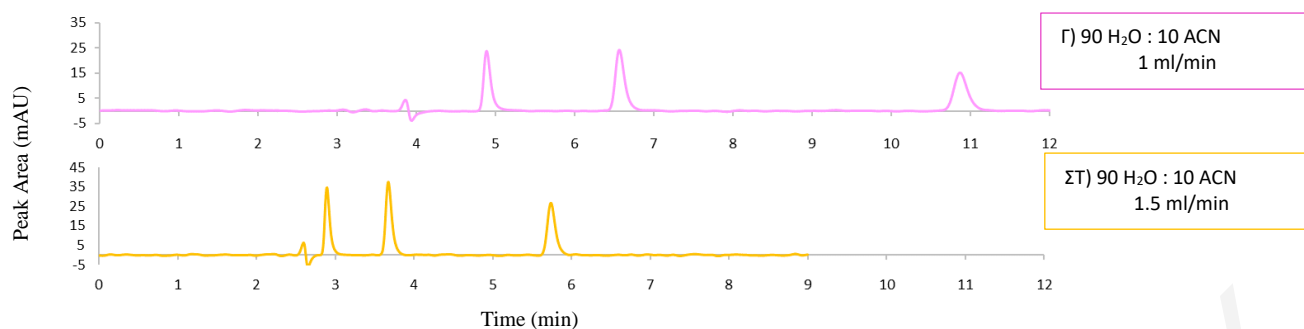
Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Προσπαθώντας να βελτιωθεί η διαχωριστική ικανότητα στο σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενη από 80% H<sub>2</sub>O και 20% ACN ελέγχθηκε τι θα συνέβαινε μειώνοντας τη ροή της κινητής φάσης σε 0,5 ml/λεπτό. Παρατηρήθηκε, ότι η αλλαγή αυτή είχε ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έκλουσης των αναλυτών και κατεπέκταση μεγάλο χρόνο ανάλυσης. όπως φάνηκε από το χρωματογράφημα που πάρθηκε (Σχήμα 5.3 (E)). Αντίθετα όταν ο ρυθμός ροής ήταν 1 ml/λεπτό στο ίδιο σύστημα διαλυτών επιτεύχθηκε συντομότερη ανάλυση (Σχήμα 5.3 (B)). Εντούτοις αυτό δεν είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας των αναλυτών.



**Σχήμα 5.3:** Μεταβολή ταχύτητα ροής κινητής φάσης σε σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενο από 80 H<sub>2</sub>O : 20 ACN. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1<sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2<sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3<sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).

Παράλληλα ελέγχθηκε η αύξηση της ταχύτητα ροής πως θα επηρέαζε το σύστημα διαλυτών όπου αρχικά επιτεύχθηκε αρκετά καλός διαχωρισμός. Συγκεκριμένα στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση H<sub>2</sub>O:ACN σε εκατοστιαία αναλογία 90:10 ελέγχθηκε ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης 1,5 ml/λεπτό. Παρατηρήθηκε ότι επιτεύχθηκε γρηγορότερη έκλυση των αναλυτών και κατεπέκταση σύντομος χρόνος ανάλυσης. Παρόλα αυτά επηρεάστηκε η διαχωριστική ικανότητα των ζευγών των αναλυτών.

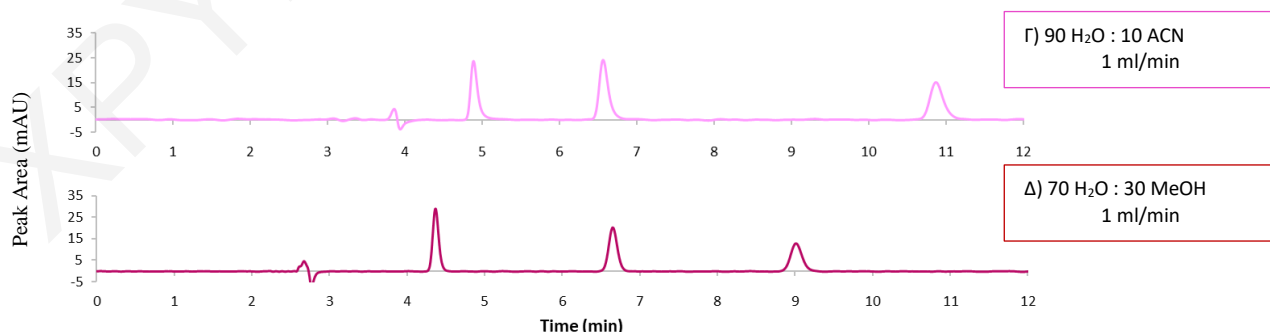
Λεπτομερέστερα, όταν ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 ml/λεπτό η θεοβρωμίνη εκλούστηκε στα 4,81 λεπτά, αμέσως μετά η θεοφυλλίνη στα 6,45 λεπτά και τέλος η καφεΐνη στα 10,79 λεπτά. Αντιθέτως, όταν ο ρυθμός των διαλυτών ήταν 1,5 ml/λεπτό η θεοβρωμίνη εκλούστηκε συντομότερα, στα 2,91 λεπτά, η θεοφυλλίνη στα 3,69 λεπτά και η καφεΐνη στα 5,73 λεπτά. Το γεγονός αυτό, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως επηρέασε τη διαχωριστική ικανότητα των ζευγών των διαλυτών. Ειδικότερα, στην πρώτη περίπτωση όταν η κινητή φάση είχε ροή 1 ml/λεπτό η διαχωριστική ικανότητα για το ζεύγος θεοβρωμίνη - θεοφυλλίνη ήταν  $R_s (TB-TF) = 9,26$  και για το ζεύγος θεοφυλλίνη - καφεΐνη,  $R_s (TF-CAF) = 15,68$ . Στη δεύτερη περίπτωση όταν η κινητή φάση είχε ροή 1,5 ml/λεπτό ο διαχωρισμός της θεοβρωμίνης - θεοφυλλίνης είχε διαχωριστική ικανότητα  $R_s (TB-TF) = 6,24$  και η θεοφυλλίνη - καφεΐνη,  $R_s (TF-CAF) = 12,53$  (Σχήμα 5.4 (Δ & ΣΤ), Πίνακας 5.2).



**Σχήμα 5.4:** Μεταβολή ταχύτητα ροής κινητής φάσης σε σύστημα κινητής φάσης αποτελούμενο από 90 H<sub>2</sub>O : 10 ACN. Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1<sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2<sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3<sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).

Η επίδραση της θερμοκρασίας αλλά και το σύστημα έκλουσης των διαλυτών δεν μελετήθηκαν, αν και αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που μπορεί να συμβάλουν στη βελτίωση του διαχωρισμού των υπό μελέτη αναλυτών αλλά και στη μείωση του χρόνου ανάλυσής τους. Αυτό συνέβη γιατί επιτεύχθηκε αρκετά καλός διαχωρισμός των αναλυτών μεταβάλλοντας τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν, πραγματοποιώντας την ανάλυση του μίγματος μεθυλοξανθινών στους 25 °C. Παράλληλα δεν ελέγχθηκε βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης, λόγω του γεγονότος ότι οι υπό μελέτη αναλύτες ήταν μόνο τρεις και μέσω ενός απλού ισοκρατικού συστήματος επιτεύχθηκε καλός διαχωρισμός τους.

Οι κινητές φάσεις H<sub>2</sub>O:ACN και H<sub>2</sub>O:MeOH, σύστασης 90:10 και 70:30, αντίστοιχα θεωρήθηκαν οι ιδανικότερες. Καταλληλότερη θεωρήθηκε η κινητή φάση αποτελούμενη από νερό (H<sub>2</sub>O) και μεθανόλη (MeOH), σύστασης 70:30. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο σύντομο χρόνο ανάλυσης, αλλά και στη μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των αναλυτών, γεγονός που θα διευκόλυνε τη μετέπειτα ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων από τα εκχυλίσματα των χαρουπιών, που είναι πολύπλοκα δείγματα (Σχήμα 5.5 (Γ & Δ)).



**Σχήμα 5.5:** Χρωματογραφήματα των δυο ιδανικών συστημάτων κινητής φάσης (H<sub>2</sub>O:ACN και H<sub>2</sub>O:MeOH). Σειρά έκλουσης των μεθυλοξανθινών: 1<sup>η</sup> Θεοβρωμίνη (TB), 2<sup>η</sup> Θεοφυλλίνη (TF) και 3<sup>η</sup> Καφεΐνη (CAF).

**Πίνακας 5.1:** Συνθήκες των μεθόδων HPLC που πραγματοποιήθηκαν .

	A	B	Γ	Δ	E	ΣΤ
Στήλη	RP - C18 (4.6 x 250 mm, 5μm)					
Σύστημα Κινητής φάσης	Ισοκρατική έκλυση					
Κινητή Φάση	· 70 % H <sub>2</sub> O · 30 % ACN	· 80 % H <sub>2</sub> O · 20 % ACN	· 90 % H <sub>2</sub> O · 10 % ACN	· 70 % H <sub>2</sub> O · 30 % MeOH	· 80 % H <sub>2</sub> O · 20 % ACN	· 90 % H <sub>2</sub> O · 10 % ACN
Θερμοκρασία στήλης (°C)	25	25	25	25	25	25
Ροή (ml/min)	1	1	1	1	0,5	1,5
Έγχυση δείγματος (μl)	20	20	10	10	20	10
Ανιχνευτής	UV - 273 nm	UV - 273 nm	UV - 273 nm	UV - 273 nm	UV - 273 nm	UV - 273 nm
Χρόνος Ανάλυσης (min)	5	6	12	10	11	7

**Πίνακας 5.2:** Χρόνοι έκλυσης ( $t_R$ , min) των μεθυλοξανθινών και Διαχωριστική Ικανότητα ( $R_s$ ) των προσδιοριζόμενων ουσιών.

	Μεθυλοξανθίνες	Χρόνοι Έκλυσης ( $t_R$ , min)	Διαχωριστική Ικανότητα ( $R_s$ )
A	TB	2,97	$R_s (TB-TF) < 1,5$ $R_s (TF-CAF) < 1,5$
	TF	3,37	
	CAF	3,56	
B	TB	3,64	$R_s (TB-TF) = 1,73$ $R_s (TF-CAF) = 8,14$
	TF	3,81	
	CAF	4,95	
Γ	TB	4,81	$R_s (TB-TF) = 9,26$ $R_s (TF-CAF) = 15,68$
	TF	6,45	
	CAF	10,79	
Δ	TB	4,35	$R_s (TB-TF) = 12,95$ $R_s (TF-CAF) = 9,69$
	TF	6,61	
	CAF	8,94	
E	TB	7,33	$R_s (TB-TF) = 1,16$ $R_s (TF-CAF) = 7,36$
	TF	7,55	
	CAF	9,69	
ΣΤ	TB	2,91	$R_s (TB-TF) = 6,24$ $R_s (TF-CAF) = 12,53$
	TF	3,69	
	CAF	5,73	

## 5.2. Αξιολόγηση της μεθόδου HPLC

Η αξιολόγηση της μεθόδου HPLC-UV έγινε με βάση τα κριτήρια της επαναληψιμότητας (run to run) με τον προσδιορισμό της εκατοστιαίας σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD (%)), όσον αφορά τους χρόνους κατακράτησης και τα εμβαδά απορρόφησης των μεθυλοξανθινών εντός επαναλαμβανόμενων μετρήσεων της ίδιας ημέρας, της γραμμικότητας, των ορίων ανίχνευσης (LODs) και ποσοτικοποίησης (LOQs) και της σταθερότητας.

### 5.2.1. Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκε με τη μέτρηση των τιμών της εκατοστιαίας σχετικής τυπικής απόκλισης, RSD (%), όσον αφορά τους χρόνους κατακράτησης και τα εμβαδά των κορυφών, της θεοβρωμίνης, της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης αντίστοιχα. Σύμφωνα με την IUPAC η RSD για μια σειρά μετρήσεων με πρότυπα διαλύματα θα πρέπει να είναι  $\leq 2\%$ .

Η επαναληψιμότητα επομένως υπολογίστηκε με τη χρήση των ακόλουθων εξισώσεων:

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad , \quad SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Όπου, RSD: σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation)

SD: απόλυτη τυπική απόκλιση

$x_i$ : αριθμητική τιμή της μέτρησης  $i$

$$\bar{x}: \text{μέση τιμή } N \text{ μετρήσεων} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}, \quad (N=3) \quad [67]$$

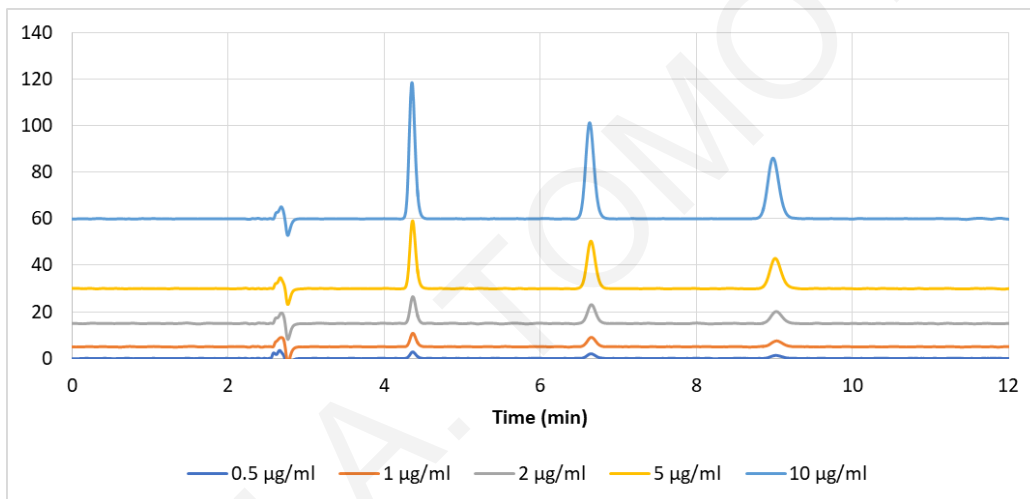
Οι τιμές RSD (%) του χρόνου κατακράτησης που προέκυψαν μετά από μετρήσεις μέσα στην ίδια ημέρα για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας ήταν 0,5 για τη θεοβρωμίνη, 0,7 για τη θεοφυλλίνη και 1 για την καφεΐνη. Σχετικά με τα RSD (%) των εμβαδών των κορυφών των υπό μελέτη αναλυτών ήταν για τη θεοβρωμίνη 0,3, για τη θεοφυλλίνη 0,5 και την καφεΐνη 1,3 (Πίνακας 5.3).

Οι χρόνοι κατακράτησης των αναλυτών ελέγχονταν σε κάθε ανάλυση που πραγματοποιείτο. Αυτό γινόταν πριν από την έναρξη της ανάλυσης των υπό μελέτη δειγμάτων, αλλά και μετά από κάθε ανάλυση, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα και η επαναληψιμότητα του συστήματος.

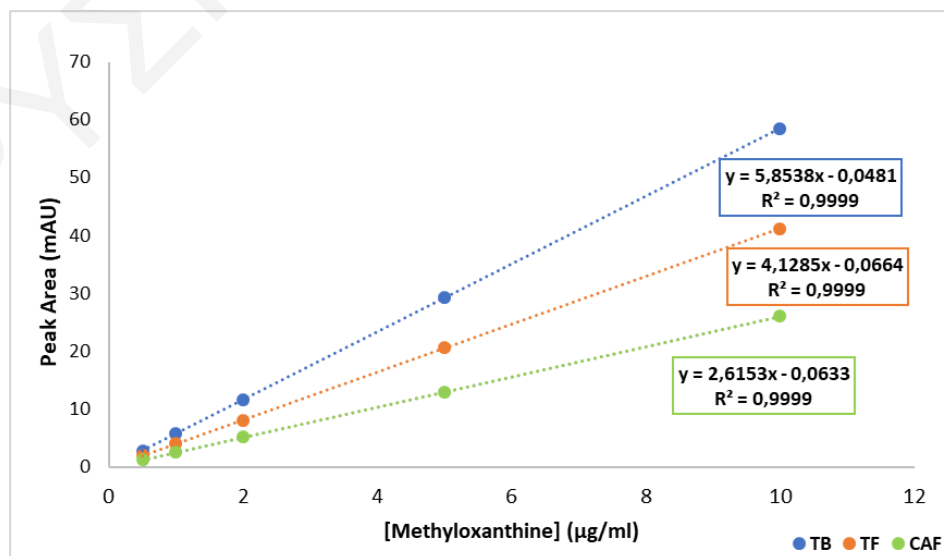
### 5.2.2. Γραμμικότητα

Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου HPLC–UV που αναπτύχθηκε, κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης ενός μείγματος και των τριών αναλυτών (Σχήμα 5.7). Τα χρωματογραφήματα μείγματος των πρότυπων διαλυμάτων της θεοβρωμίνης, της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης, διαφόρων συγκεντρώσεων, που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης φαίνονται στο Σχήμα 5.7. Πιο συγκεκριμένα, η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5 - 10  $\mu\text{g/ml}$  μέσω διαδοχικών αραιώσεων του μείγματος των πρότυπων υδατικών διαλυμάτων.

Η γραμμικότητα της καμπύλης η οποία εξετάστηκε σύμφωνα με το συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε να είναι  $R^2 < 0,9999$  και ως εκ τούτου η γραμμικότητα χαρακτηρίστηκε εξαιρετικά καλή.



**Σχήμα 5.6:** Χρωματογραφήματα μείγματος πρότυπων διαλυμάτων μεθυλοξανθινών για συγκεντρώσεις 0,5 - 10  $\mu\text{g/ml}$ .



**Σχήμα 5.7:** Καμπύλες βαθμονόμησης πρότυπων μεθυλοξανθινών.



### 5.2.3. Όρια Ανίχνευσης (LOD) και Όρια Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Η μέθοδος αξιολογήθηκε επίσης ως προς τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ), τα οποία αποτελούν τα σημαντικότερα στοιχεία προσδιορισμού των αναλυτών αφού προσδίδουν την ευαισθησία της ανίχνευσης τους.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης εκτιμήθηκαν με βάση την εμπειρική προσέγγιση:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{m} \quad , \quad LOQ = \frac{10 \times SD}{m}$$

Όπου, SD είναι η τυπική απόκλιση και m η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης [68].

Οι εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης των τριών υπό μελέτη μεθυλοξανθινών, ο αντίστοιχος συντελεστής συσχέτισης, η σχετική τυπική απόκλιση, καθώς και οι τιμές που υπολογίστηκαν για τα LOD's και τα LOQ's των υπό μελέτη ενώσεων παρατίθενται στον ακόλουθο Πίνακα 5.3.

**Πίνακας 5.3:** Οι εξισώσεις της καμπύλης βαθμονόμησης, ο συντελεστής συσχέτισης και οι τιμές  $RSD_{(time)}$  (%),  $RSD_{(area)}$  (%), LOD και LOQ για τη θεοβρωμίνη, τη θεοφυλλίνη και την καφεΐνη, αντίστοιχα.

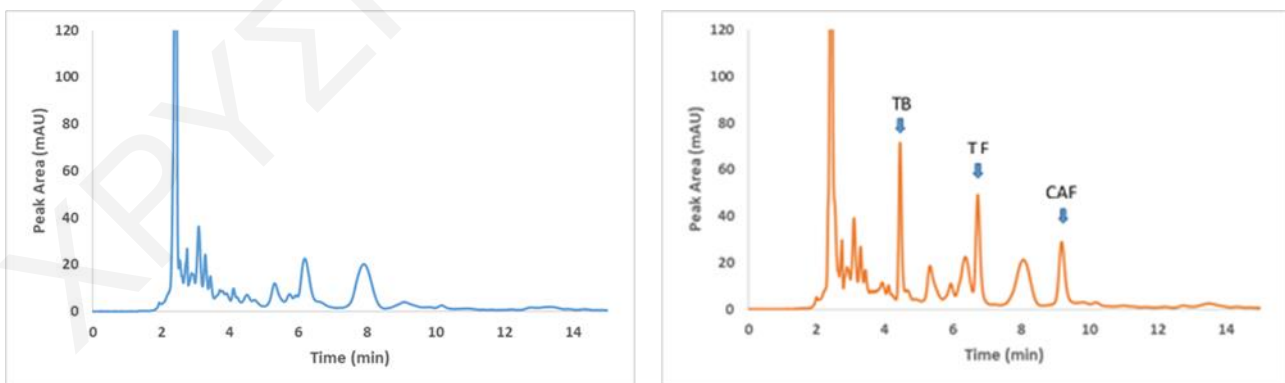
Ένωση	Εξίσωση Καμπύλης βαθμονόμησης	R <sup>2</sup>	RSD <sub>(time)</sub> (%)	RSD <sub>(area)</sub> (%)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
<b>TB</b>	$y = 5,8538 x - 0,0481$	0,9999	0,1	0,3	0,04	0,1
<b>TF</b>	$y = 4,1285 x - 0,0664$	0,9999	0,2	0,5	0,05	0,1
<b>CAF</b>	$y = 2,6153 x - 0,0633$	0,9999	0,3	1,3	0,02	0,06

Για την εξακρίβωση της παρουσίας τους στα δείγματα χαρουπιού που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των κορυφών που εμφανίζονταν στα χρωματογραφήματα, με βάση το χρόνο κατακράτησης τους, σε σχέση με το μέσο χρόνο κατακράτησης των πρότυπων διαλυμάτων που ήταν για τη θεοβρωμίνη στα 4,35 λεπτά, για τη θεοφυλλίνη στα 6,61 λεπτά και για την καφεΐνη στα 8,94 λεπτά. Επιπρόσθετα, έγινε επιπλέον έλεγχος για επιβεβαίωση της παρουσίας τους με χρήση της μεθόδου Spiking πρότυπων ουσιών.

### 5.3. Μέθοδοι εκχύλισης μεθυλοξανθινών από χαρούπι

Στο εργαστήριο δοκιμάστηκαν διάφορες μέθοδοι εκχύλισης βασιζόμενες στη βιβλιογραφία (υποκεφάλαιο 3.2) για την εκχύλιση των μεθυλοξανθινών από τα χαρούπια με τις κατάλληλες διαφοροποιήσεις (υποκεφάλαιο 4.3). Το σημαντικότερο και ταυτόχρονα πιο κρίσιμο στάδιο της αναλυτικής πορείας για τον προσδιορισμό των αναλυτών είναι η προετοιμασία του δείγματος. Αυτό αποτελεί ένα βήμα, στο οποίο ο αναλυτής καλείται να επιτύχει την εκλεκτική απομόνωση των αναλυτών από την εξεταζόμενη μήτρα, απομακρύνοντας τις υπόλοιπες παρεμποδίζουσες ουσίες. Αυτό θα διασφαλίσει τη λήψη χρωματογραφημάτων υψηλής ευκρίνειας, καθιστώντας εύκολη την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση τους. Βασικός στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου επεξεργασίας των δειγμάτων τόσο της σάρκας όσο και των σπόρων χαρουπιού, η οποία θα επέτρεπε την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της θεοβρωμίνης, της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης. Έτσι, εφαρμόστηκαν οι πειραματικές διαδικασίες που περιγράφηκαν στο υποκεφάλαιο 4.3. Αναλύθηκαν δείγματα ώριμων χαρουπιών που πάρθηκαν από την Κύπρο και πιο συγκεκριμένα από την επαρχία Πάφου (Αμαργέτη), Λεμεσού (Συνεργατισμός) και Λάρνακας (Δεκέλια) αλλά και εισαγόμενα χαρούπια της Κρήτης. Επιπρόσθετα, αναλύθηκαν και άγουρα δείγματα χαρουπιών αλλά και φύλλα από το δέντρο της χαρουπιάς (Δεκέλια).

Λόγω των πολύπλοκων χρωματογραφημάτων που πάρθηκαν και με τις πέντε τεχνικές εκχύλισης που πραγματοποιήθηκαν, η ταυτοποίηση των αναλυτών έγινε με τη χρήση της μεθόδου ‘spiking’. Κατά τη μέθοδο αυτή έγινε προσθήκη περισσειας του ενός εκ των τριών αναλυτών ή ακόμη και μείγμα των πρότυπων αναλυτών. (Σχήμα 5.7).



Σχήμα 5.8: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σάρκας χαρουπιού (μπλε) στο οποίο έγινε ταυτοποίηση κορυφών με χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος μεθυλοξανθινών (πορτοκαλί).

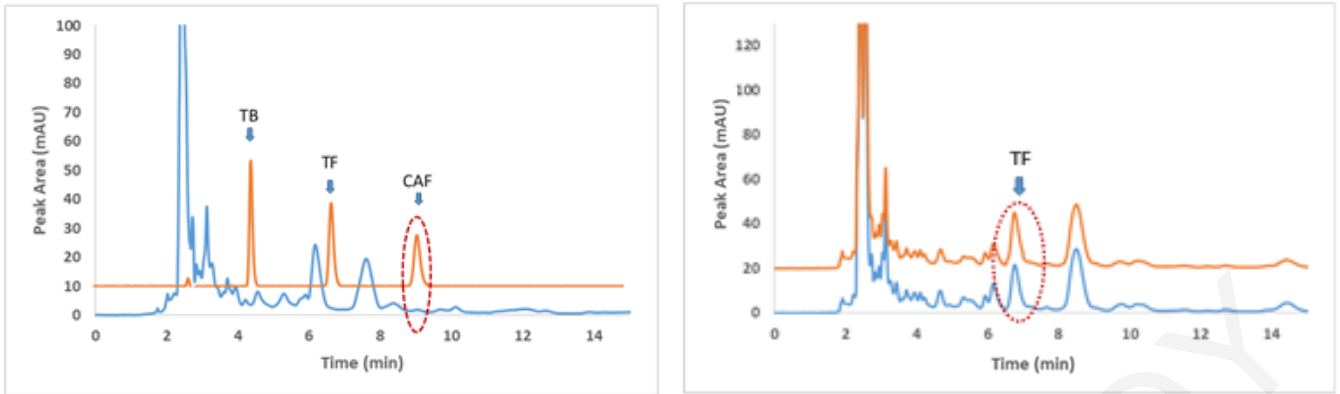
Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης δεν δοκιμάστηκαν συστηματικά ώστε να βρεθεί η βέλτιστη διαδικασία, αλλά εφαρμόστηκαν και οι πέντε τεχνικές στα δείγματα προσδίδοντας διακυμαινόμενα αποτελέσματα. Εντούτοις, για τα δείγματα σπόρων χαρουπιού επιλέγηκαν οι τεχνικές Γ και Ε και για τα δείγματα σάρκας χαρουπιού οι τεχνικές Α και Δ (υποκεφάλαιο 4.3). Η επιλογή των τεχνικών αυτών έγινε γιατί αποδείχθηκαν ως πιο αποτελεσματικές για την εξαγωγή των υπό μελέτη αναλυτών από τα διαφορετικά τμήματα του καρπού του χαρουπιού, με τη δυνατότητα προσδιορισμού τους. Αντίθετα με τις άλλες τεχνικές δεν κατέσται δυνατή η εξαγωγή των αναλυτών από τα δείγματα και κατεπέκταση τον προσδιορισμό τους.

#### **5.4. Περιεκτικότητα μεθυλοξανθινών στα εκχυλίσματα χαρουπιού**

##### **5.4.1. Δείγματα Σπόρων Ωριμων Χαρουπιών**

Παρατηρώντας τα δείγματα σπόρων που μελετήθηκαν έδωσαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Η θεοφυλλίνη αποτελεί την μεθυλοξανθίνη που ποσοτικοποιήθηκε σε αρκετά εκχυλίσματα. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Custodio et al. [7] που πραγματοποίησαν πειράματα στο ενδοσπέρμιο πορτογαλικών χαρουπιών (υποκεφάλαιο 3.1), στα οποία επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση της θεοφυλλίνης. Επιπρόσθετα, η καφεΐνη ήταν παρούσα σε αρκετά από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, όμως εντοπίστηκε σε χαμηλότερες σχετικά συγκεντρώσεις. Σε δείγμα σπόρων της Κρήτης ταυτοποιήθηκε η παρουσία και των τριών μεθυλοξανθινών.

Τα εκχυλίσματα σπόρων της επαρχίας Λάρνακας συγκριτικά με τα εκχυλίσματα των άλλων επαρχιών είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε θεοφυλλίνη (Πίνακας 5.4). Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση θεοφυλλίνης που καταγράφηκε ήταν 37 μg/g σκόνης σπόρων χαρουπιού θεοφυλλίνη (4607 μg/g εκχυλίσματος), εφαρμόζοντας την ίδια βιβλιογραφική τεχνική εκχύλισης που εφάρμοσαν οι Custodio et al. [7] (Ε) (Σχήμα 5.9 (β)). Παράλληλα, σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε η παρουσία της καφεΐνης, όμως βρέθηκε σε πολύ μικρή συγκέντρωσή, σε τιμή που κυμάνθηκε σε 2 μg/g σκόνης σπόρων χαρουπιού (132 μg/g εκχυλίσματος) (Γ) (Σχήμα 5.9 (α)).

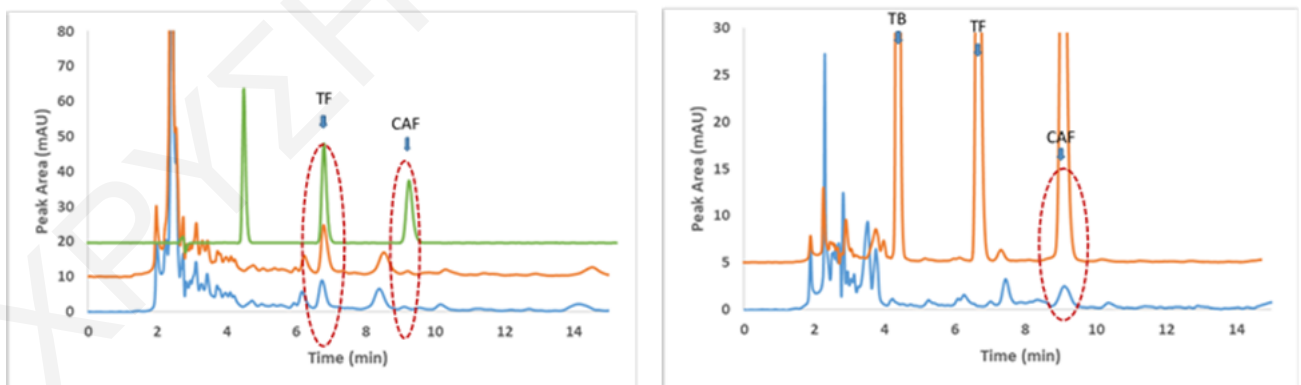


(α) Σπόροι Λάρνακας (Γ – Standard Mix)

(β) Σπόροι Λάρνακας (E – Spiked TF)

**Σχήμα 5.9:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων σπόρων χαρουπιού από Λάρνακα στα οποία ανιχνεύθηκε η παρουσία της TF και της CAF στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών και πρότυπης TF.

Από τα εκχυλίσματα των σπόρων της επαρχίας Πάφου, η καφεΐνη, ήταν παρούσα σχεδόν σε όλα τα εκχυλίσματα (Πίνακας 5.4). Όμως η παρουσία της ήταν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση να φτάνει στα 13  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (179  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Γ) (Σχήμα 5.10 (β)) και τη μικρότερη στα 2  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (184  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Α) (Σχήμα 5.10 (α)). Μονάχα σε ένα από τα εξεταζόμενα δείγμα (Α) προέκυψε εκχύλισμα στο οποίο η θεοφυλλίνη βρέθηκε σε υψηλή σχετικά συγκέντρωση και ήταν εφικτή η ποσοτικοποίηση της. Εντοπίστηκε σε συγκέντρωση σχεδόν 21  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (1617  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Α) (Σχήμα 5.10 (α)).

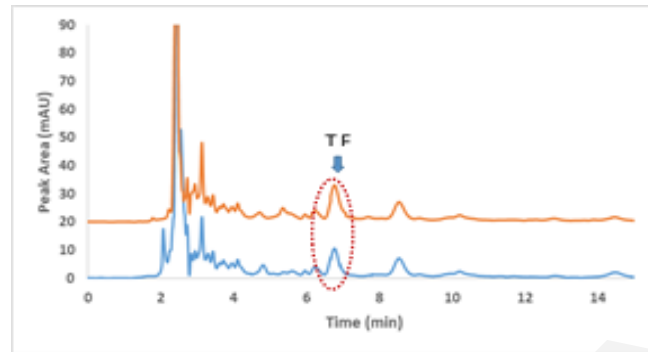


(α) Σπόροι Πάφου (A – Spiked TF &amp; Standard Mix)

(β) Σπόροι Πάφου (Γ – Spiked Mix)

**Σχήμα 5.10:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων σπόρων χαρουπιού από Πάφο στα οποία ανιχνεύθηκε η παρουσία της TF και της CAF στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών και πρότυπης TF.

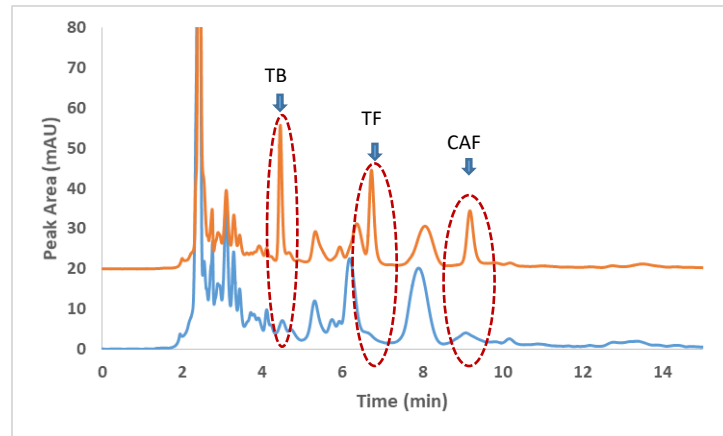
Όσον αφορά τα εκχυλίσματα της επαρχίας Λεμεσού σε ένα επιβεβαιώθηκε η παρουσία της θεοφυλλίνης σε συγκέντρωση 34  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (1745  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Γ) (Σχήμα 5.7 (α)). Σε ένα από τα δείγματα μέσω της τεχνικής που εφαρμόστηκε (Ε) δεν ήταν εφικτή η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση κάποιας μεθυλοξανθίνης.



(α) Σπόροι Λεμεσού (Γ – Spiked TF)

**Σχήμα 5.11:** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σπόρων χαρουπιού από Λεμεσού στο οποίο ανιχνεύθηκε η παρουσία της TF στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση της κορυφής με τη χρήση της μεθόδου Spiking πρότυπης TF.

Σε εκχύλιμα σπόρων της Κρήτης με την τεχνική εκχύλισης Γ ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις και οι τρεις μεθυλοξανθίνες ενώ με την τεχνική εκχύλισης Ε δεν ανιχνεύθηκε καμία από αυτές. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε η θεοβρωμίνη και η συγκέντρωσή της ήταν σε χαμηλά επίπεδα 7  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (319  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος). Επίσης η θεοφυλλίνη η οποία ήταν η κύρια μεθυλοξανθίνη που ποσοτικοποιήθηκε σε ορισμένα εκχυλίσματα δειγμάτων της Κύπρου σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανιχνεύθηκε στο ίδιο εκχύλιμα που προαναφέρθηκε σε χαμηλή συγκέντρωση σε τιμή περίπου 2  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (64  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος). Η καφεΐνη από την άλλη, βρέθηκε σε συγκέντρωση 15  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σπόρων χαρουπιού (656  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Σχήμα 5.12 (α)).



(α) Σπόροι Κρήτης (Γ – Spiked Mix)

**Σχήμα 5.12:** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σπόρων χαρουπιού από Κρήτη στο οποίο ανιχνεύθηκε η παρουσία των μεθυλοξανθινών στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών.

**Πίνακας 5.4:** Συγκέντρωση (μg/g σπόρων χαρουπιού) και (μg/g εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών των δειγμάτων ώριμων σπόρων χαρουπιού της Κύπρου και της Κρήτης.

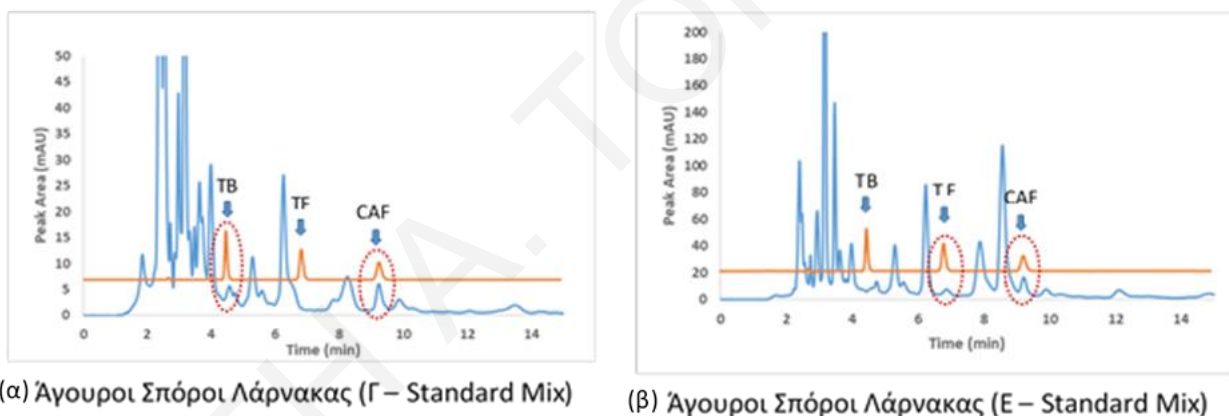
Δείγματα	Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση (μg/g σπόρων χαρουπιού)			Συγκέντρωση (μg/g εκχυλίσματος)		
		TB	TF	CAF	TB	TF	CAF
Σπόροι Λάρνακας	Γ	n.d	n.d	1,9 ± 0,0	n.d	n.d	131,8 ± 2,1
	Ε	n.d	36,9 ± 0,1	n.d	n.d	4606,6 ± 12,5	n.d
Σπόροι Πάφου	Α	n.d	20,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1	n.d	1617,3 ± 7,9	183,9 ± 7,9
	Γ	n.d	n.d	13,1 ± 0,2	n.d	n.d	178,8 ± 2,7
Σπόροι Λεμεσού	Γ	n.d	34,0 ± 0,3	n.d	n.d	1744,8 ± 15,4	n.d
	Ε	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Σπόροι Κρήτης	Γ	7,3 ± 0,3	1,5 ± 0,1	15,0 ± 0,1	319,3 ± 13,1	63,5 ± 4,2	656,0 ± 4,4
	Ε	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Η υψηλότερη συγκέντρωση της θεοφυλλίνης που ποσοτικοποιήθηκε στα εκχυλίσματα σπόρων των πορτογαλικών ποικιλιών από τους Custodio et al. ήταν 1600 μg/g εκχυλίσματος και η μικρότερη στα 500 μg/g εκχυλίσματος. Η μέση τιμή της θεοφυλλίνης ήταν 1183 μg/g εκχυλίσματος. Στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία η υψηλότερη τιμή θεοφυλλίνης σε εκχύλιση ήταν 4607 μg/g εκχυλίσματος και η μικρότερη εντοπίστηκε στα 64 μg/g εκχυλίσματος. Στη μελέτη των Custodio et al. δεν ανιχνεύθηκε ούτε ποσοτικοποιήθηκε άλλη μεθυλοξανθίνη. Στα υπό μελέτη δείγματα μας εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν η καφεΐνη και σε ένα μόνο δείγμα η θεοβρωμίνη. Η υψηλότερη τιμή της καφεΐνης ήταν σε συγκέντρωση 656 μg/g εκχυλίσματος και η μικρότερη 132 μg/g εκχυλίσματος. Η θεοβρωμίνη βρέθηκε σε συγκέντρωση 319 μg/g εκχυλίσματος.

### 5.4.2. Δείγματα Σπόρων Άγουρων Χαρουπιών

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκριτική μελέτη σπόρων από άγουρα χαρούπια προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στην περιεκτικότητα σε μεθυλοξανθίνες ανάλογα του σταδίου ωρίμανσης.

Από τα υπό μελέτη δείγματα παρατηρήθηκε πως η καφεΐνη ήταν η κύρια μεθυλοξανθίνη η οποία ανιχνεύθηκε σε αυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις (Πίνακας 5.5). Οι τιμές στις οποίες κυμάνθηκε ήταν 39  $\mu\text{g/g}$  σκόνης άγουρων σπόρων χαρουπιού (5148  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (E) (Σχήμα 5.13 (β)) και 38  $\mu\text{g/g}$  σκόνης άγουρων σπόρων χαρουπιού (970  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Γ) (Σχήμα 5.13 (α)) με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Σε κάποια από τα δείγματα βρέθηκε η παρουσία της θεοφυλλίνης (E) αλλά και της θεοβρωμίνης (Γ). Οι μεθυλοξανθίνες αυτές όμως, ποσοτικοποιήθηκαν αλλά ήταν σε χαμηλές τιμές. Για παράδειγμα η θεοφυλλίνη προσδιορίστηκε σε συγκέντρωση 9  $\mu\text{g/g}$  σκόνης άγουρων σπόρων χαρουπιού (1192  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (E) (Σχήμα 5.13 (β)) και η θεοβρωμίνη ανιχνεύθηκε σε συγκέντρωση 6  $\mu\text{g/g}$  σκόνης άγουρων σπόρων χαρουπιού (153  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Γ) (Σχήμα 5.13 (α)).



**Σχήμα 5.13:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων άγουρων σπόρων από Λάρνακα στα οποία ανιχνεύθηκαν κάποιες από τις μεθυλοξανθίνες στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών

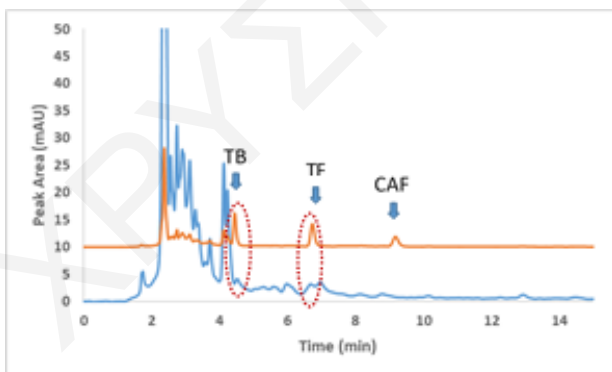
**Πίνακας 5.5:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$  σπόρων χαρουπιού) και ( $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα σπόρων άγουρων χαρουπιού.

Δείγματα	Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σπόρων χαρουπιού)			Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος)		
		TB	TF	CAF	TB	TF	CAF
Άγουρου Χαρουπιού	Γ	5,9 ± 0,4	n.d	37,5 ± 0,1	153,0 ± 10,4	n.d	970,0 ± 2,6
	E	n.d	8,9 ± 0,1	38,5 ± 0,1	n.d	1191,8 ± 13,4	5148,2 ± 13,4

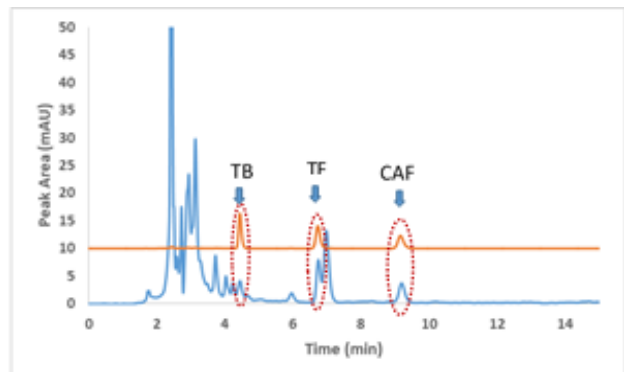
Η παρουσία της καφεΐνης σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα άγουρων σπόρων αλλά η απουσία της στα ώριμα, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η καφεΐνη αποικοδομείται καθώς ωριμάζει ο καρπός. Γι' αυτό και η μεθυλοξανθίνη που εντοπίζετε σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ώριμους σπόρους των χαρουπιών είναι η θεοφυλλίνη (υποκεφάλαιο 2.7). Είναι ένα πιθανό σενάριο για την αιτιολογία της συμπεριφορά της παρουσίας των διαφορετικών μεθυλοξανθινών στα δυο διαφορετικά στάδια ωρίμανσης του καρπού.

### 5.4.3. Δείγματα Σάρκας Ωριμων Χαρουπιών

Σε ένα από τα δείγματα σάρκας χαρουπιού (επαρχία Πάφου) ήταν εφικτή η ταυτοποίηση της παρουσίας και των τριών υπό μελέτη μεθυλοξανθινών. Συγκεκριμένα, η θεοφυλλίνη εντοπίστηκε στο δείγμα σε συγκέντρωση 32  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας χαρουπιού ((268  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) και η καφεΐνη σε συγκέντρωση 32  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας χαρουπιού (265  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος). Από την άλλη η θεοβρωμίνη βρέθηκε σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα αυτό, σε συγκέντρωση 7  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας χαρουπιού (60  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) (Δ τεχνική εκχύλισης) (Σχήμα 5.14 (β)). Όσον αφορά τα δείγματα σάρκας της Κρήτης που ελέγχθηκαν μπορούμε να πούμε πως και σε αυτά η παρουσία των μεθυλοξανθινών ήταν περιορισμένη, όπως και στα δείγματα της Λάρνακας και της Λεμεσού. Η παρουσία των αναλυτών στα εκχυλίσματα ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο δείγμα (Α τεχνική εκχύλισης) στο οποίο ταυτοποιήθηκε η παρουσία της θεοβρωμίνης και της θεοφυλλίνης, οι οποίες βρέθηκαν σε συγκέντρωση 2 (243  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) και 1  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας χαρουπιού (168  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος), αντίστοιχα (Σχήμα 5.14 (α)).



(α) Σάρκα Κρήτης (Α – Spiked Mix)



(β) Σάρκα Πάφου (Δ – Spiked Mix)

**Σχήμα 5.14:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων σάρκας από Πάφο και Κρήτη στα οποία ανιχνεύθηκαν κάποιες από τις μεθυλοξανθίνες στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών



**Πίνακας 5.6:** Συγκέντρωση (μg/g σάρκας χαρουπιού) και (μg/g εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα ώριμης σάρκας της Κύπρου και της Κρήτης.

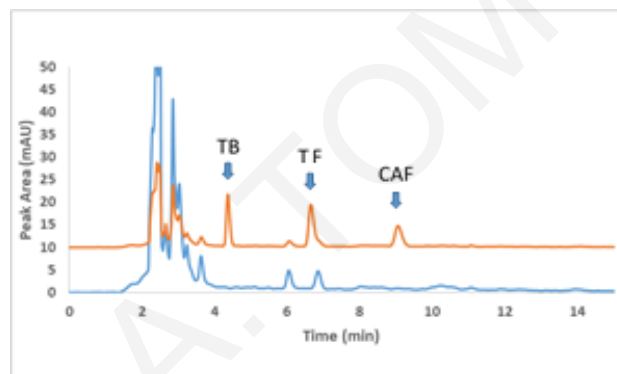
Δείγματα	Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση (μg/g σάρκας χαρουπιού)			Συγκέντρωση (μg/g εκχυλίσματος)		
		TB	TF	CAF	TB	TF	CAF
Σάρκα Πάφου	A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Δ	<b>7,1 ± 0,7</b>	<b>31,6 ± 0,0</b>	<b>31,4 ± 0,1</b>	<b>60,2 ± 5,9</b>	<b>267,5 ± 0,3</b>	<b>265,4 ± 0,8</b>
Σάρκα Λάρνακας	A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Δ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Σάρκα Λεμεσού	A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Δ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Σάρκα Κρήτης	A	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>1,0 ± 0,4</b>	n.d	<b>242,9 ± 16,2</b>	<b>167,8 ± 65,8</b>	n.d
	Δ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Η σάρκα των ώριμων χαρουπιών των επαρχιών Λάρνακας και Λεμεσού που μελετήθηκαν επομένως, είναι απαλλαγμένη από την παρουσία των μεθυλοξανθινών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τις μελέτες που διεξήγαγε ο Corsi et al [9], ο Khelifa et al [11] και η Papaefstathiou et al [12], οι οποίοι ανέφεραν ότι οι μεθυλοξανθίνες είναι μη ανιχνεύσιμες στα εκχυλίσματα σάρκας από χαρούπι. Εξαιρέση αποτελεί το εκχύλισμα Πάφου (Δ τεχνική εκχύλισης) στο οποίο ανιχνεύθηκε η παρουσία και των τριών υπό μελέτη μεθυλοξανθινών. Το δείγμα σάρκας Πάφου, έρχεται εν μέρει σε συμφωνία με την έρευνα του Ortega et al [10] καθώς στα δείγματα σάρκας της μελέτης αυτής ποσοτικοποιήθηκε η θεοβρωμίνη και η καφεΐνη. Συγκεκριμένα στην έρευνα του Ortega et al [10] η θεοβρωμίνη εντοπίστηκε σε συγκέντρωση 25 μg/g σάρκας χαρουπιού και η καφεΐνη σε συγκέντρωση 39 μg/g σάρκας χαρουπιού. Στην παρούσα μελέτη στο υπό εξέταση δείγμα η θεοβρωμίνη βρέθηκε σε συγκέντρωση 7 μg/g σάρκας χαρουπιού και η καφεΐνη σε 31 μg/g σάρκας χαρουπιού. Η θεοφυλλίνη δεν προσδιορίστηκε στην έρευνα του Ortega et al [10] γιατί δεν άνηκε στο στόχο μελέτης τους. Από την άλλη όμως, το γεγονός της ποσοτικοποίησης της θεοφυλλίνης στο δικό μας δείγμα έρχεται σε συμφωνία με την έρευνα των Custodio et al [8] που πραγματοποίησαν σε σάρκες πορτογαλικών χαρουπιών στις οποίες ποσοτικοποιήθηκε σε υψηλές σχετικά συγκεντρώσεις. Η μέση τιμή της θεοφυλλίνης που ποσοτικοποιήθηκε ήταν 850 μg/g σάρκας χαρουπιού. Στην παρούσα μελέτη το δείγμα της επαρχίας Πάφου η θεοφυλλίνη βρέθηκε σε συγκέντρωση 32 μg/g σάρκας χαρουπιού. Επιπρόσθετα σε συμφωνία εν μέρει με την έρευνα του Ortega et al [10] έρχεται και το δείγμα της Κρήτης στο οποίο ποσοτικοποιήθηκε η παρουσία της θεοβρωμίνης όπου εντοπίστηκε σε 2 μg/g σάρκας χαρουπιού. Παράλληλα το δείγμα σάρκας της Κρήτης στο οποίο ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η θεοφυλλίνη έρχεται σε συμφωνία με την έρευνα της Custodio et al [8] όμως στην περίπτωση αυτή η

θεοφυλλίνη βρέθηκε σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση, 1  $\mu\text{g/g}$  σάρκας χαρουπιού, από αυτές της βιβλιογραφικής ανασκόπησης και του υπό μελέτη δείγματος της Πάφου.

#### 5.4.4. Δείγματα Σάρκας Άγουρων Χαρουπιών

Για το σκοπό της μελέτης της παρουσίας ή όχι και κατεπέκταση του προσδιορισμού των μεθυλοξανθινών κατά το στάδιο της ωρίμανσης των χαρουπιών μελετήθηκαν και άγουρα δείγματα. Τα δείγματα σάρκας άγουρων χαρουπιών στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι τεχνικές εκχύλισης πάρθηκαν από την επαρχία Λάρνακας από το ίδιο δέντρο από το οποίο αναλύθηκαν και τα ώριμα χαρούπια. Στα δείγματα δεν ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση καμίας μεθυλοξανθίνης, παρά μόνο σε δυο περιπτώσεις όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία της καφεΐνης όμως βρισκόταν σε χαμηλή συγκέντρωση όπου δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί γιατί βρισκόταν κάτω από τα όρια ποσοτικοποίησης της.



Άγουροι Σάρκα Λάρνακας (B – Spiked Mix)

**Σχήμα 5.15:** Χρωματογράφημα εκχυλίσματος σάρκας άγουρων χαρουπιών από τη Λάρνακα στα 273 nm. Έγινε ταυτοποίηση των κορυφών με τη χρήση της μεθόδου Spiking μείγματος πρότυπων ουσιών.

**Πίνακας 5.7:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$  σάρκας χαρουπιού) και ( $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα σάρκας άγουρων χαρουπιών.

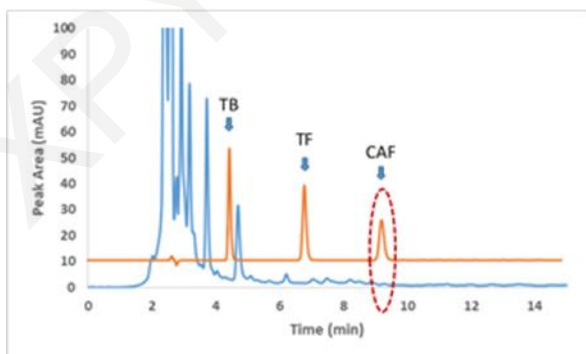
Δείγματα	Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σάρκας χαρουπιού)			Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος)		
		TB	TF	CAF	TB	TF	CAF
Άγουρη Σάρκα	A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	B	n.d	n.d	< LOQ	n.d	n.d	< LOQ
	Γ	n.d	n.d	< LOQ	n.d	n.d	< LOQ
	Δ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	E	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Από αυτό, πιθανόν να μπορεί να συσχετιστούν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των ώριμων χαρουπιών και συγκεκριμένα από τα δείγματα που πάρθηκαν από το ίδιο δέντρο αφού ωρίμασαν. Τόσο στα άγουρα όσο και στα ώριμα δείγματα σάρκας χαρουπιών από τη Λάρνακα δεν είχε επιτευχθεί ο προσδιορισμός καμίας υπό μελέτη μεθυλοξανθίνης. Επομένως συμπεραίνουμε πως τα δείγματα σάρκας χαρουπιών είναι πιθανόν απαλλαγμένα από την παρουσία των μεθυλοξανθινών ή αν υπάρχουν βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Όπως φάνηκε με την περίπτωση της παρουσίας της καφεΐνης στα δείγματα άγουρης σάρκας χαρουπιών, η συγκέντρωσή τους ήταν πολύ χαμηλή και επομένως δεν επιτρεπόταν η ποσοτικοποίηση της.

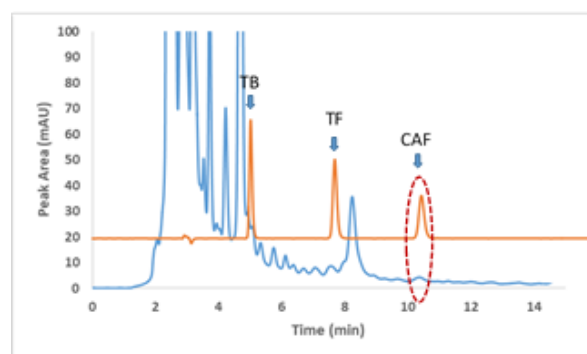
#### 5.4.5. Δείγματα Φύλλων Χαρουπιάς

Τέλος για το σκοπό της μελέτης της κατανομής των μεθυλοξανθινών πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις και στα φύλλα του δέντρου της χαρουπιάς. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν φύλλα που συλλέχθηκαν από την επαρχία Λάρνακας (Δεκέλεια) από το ίδιο δέντρο από το οποίο αναλύθηκαν τα ώριμα και τα άγουρα δείγματα χαρουπιών.

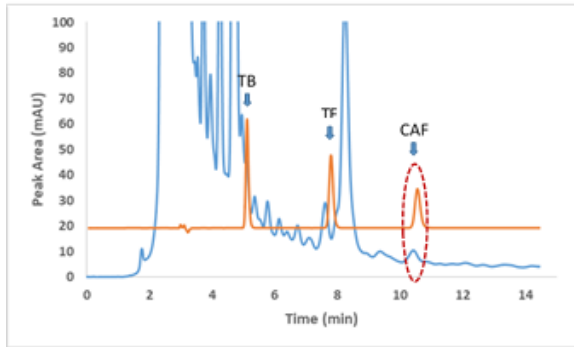
Με τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της καφεΐνης στα εν λόγω δείγματα. Η υψηλότερη συγκέντρωση όπου προσδιορίστηκε ήταν 14,61  $\mu\text{g/g}$  σκόνης φύλλων (Δ) (Σχήμα 5.16 (γ)) και η μικρότερη 1,85  $\mu\text{g/g}$  σκόνης φύλλων (Γ) (Σχήμα 5.16 (β)). Σε ένα άλλο δείγμα δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της λόγω του γεγονότος ότι ήταν κάτω από τα όρια ποσοτικοποίησης της (Β) (Σχήμα 5.16 (α)). Τα αντίστοιχα χρωματογράφημα που λήφθηκε κατά την ανάλυση των δειγμάτων παρατίθεται στο Σχήμα 5.16 στο οποίο δεν έγινε περαιτέρω έλεγχος με τη χρήση της μεθόδου Spiking μίγματος προτύπων, αλλά ο έλεγχος της παρουσίας τους πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης πρότυπου μίγματος αναλυτών.



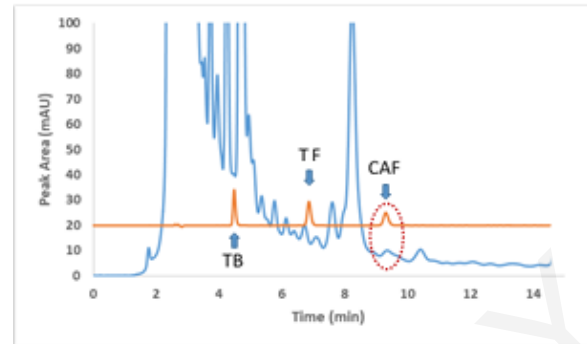
(α) Φύλλα Λάρνακας (Β – Standard Mix)



(β) Φύλλα Λάρνακας (Γ – Standard Mix)



(γ) Φύλλα Λάρνακας (Δ – Standard Mix)



(δ) Φύλλα Λάρνακας (E – Standard Mix)

**Σχήμα 5.16:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων φύλλων χαρουπιού από την Λάρνακα στα 273 nm. Έγινε έλεγχος της παρουσίας των μεθυλοξανθινών με σύγκριση του μείγματος πρότυπων ουσιών.

Όπως διαπιστώθηκε στα φύλλα της χαρουπιάς μπορεί να ανιχνευθεί η καφεΐνη. Γεγονός που έρχεται σε διαφωνία με την επιστημονική έρευνα του Corsi et al. [9], όπου στα δείγματα μελέτης του δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης, των δυο αυτών μεθυλοξανθινών όπου επικεντρώθηκε στην έρευνα του. Αντίθετα στα κυπριακά φύλλα που μελετήθηκαν προσδιορίστηκε η καφεΐνη που κυμάνθηκε σε μέση τιμή 7,76  $\mu\text{g/g}$  σκόνης φύλλων χαρουπιού.

**Πίνακας 5.8:** Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$  σκόνης φύλλων) και ( $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) των μεθυλοξανθινών στα δείγματα φύλλων χαρουπιού.

Δείγματα	Μέθοδος εκχύλισης	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ σκόνης φύλλων)			Συγκέντρωση ( $\mu\text{g/g}$ εκχυλίσματος)		
		TB	TF	CAF	TB	TF	CAF
Φύλλα	A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	B	n.d	n.d	< LOQ	n.d	n.d	< LOQ
	Γ	n.d	n.d	$1,9 \pm 0,0$	n.d	n.d	$22,1 \pm 0,2$
	Δ	n.d	n.d	$14,6 \pm 0,2$	n.d	n.d	$236,0 \pm 3,2$
	E	n.d	n.d	$6,8 \pm 0,2$	n.d	n.d	$97,1 \pm 2,9$

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### 6.1. Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής εφαρμόστηκαν πέντε τεχνικές εκχύλισης μεθυλοξανθινών. Εκχυλίστηκαν δείγματα σάρκας και σπόρων χαρουπιού, τόσο άγουρα όσο και ώριμα χαρούπια, καθώς και φύλλα από το δέντρο της χαρουπιάς. Από τις αρχικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκαν ως πιο αξιόπιστες τεχνικές εκχύλισης για τους σπόρους χαρουπιών οι τεχνικές Γ και Ε ενώ για τη σάρκα οι τεχνικές Α και Δ (Κεφάλαιο 4.3.). Μέσω των τεχνικών αυτών είχε επιτευχθεί η αποτελεσματικότερη εξαγωγή των μεθυλοξανθινών.

Για τον προσδιορισμό των μεθυλοξανθινών χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με ανιχνευτή UV-Vis. Η αναλυτική μεθοδολογία για την ποσοτικοποίηση των μεθυλοξανθινών βρέθηκε μετά από μια σειρά πειραματικών ελέγχων όπου διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω ισοκρατικού συστήματος έκλουσης με τη χρήση κινητής φάσης 70 % H<sub>2</sub>O και 30 % MeOH, με σταθερή ταχύτητα ροής 1 ml/min και σε σταθερή θερμοκρασία στους 25 °C. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 10 μl και η ανίχνευση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε στα 273 nm. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ), μέσω των οποίων διαπιστώθηκε η καταλληλότητα της για τη συγκεκριμένη ανάλυση (υποκεφάλαιο 5.2).

Ανάλογα του τμήματος του χαρουπιού στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ανάλυση επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση διαφορετικών μεθυλοξανθινών. Από την ανάλυση των εκχυλισμάτων ώριμων σπόρων χαρουπιού που μελετήθηκαν, προέκυψε ότι η μεθυλοξανθίνη που συναντάται σε αρκετά εκχυλίσματα είναι η θεοφυλλίνη. Αυτό φυσικά παρατηρήθηκε στα κυπριακά δείγματα σπόρων. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της θεοφυλλίνης που ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε στα κυπριακά εκχυλίσματα ώριμων σπόρων χαρουπιού ήταν 31 μg/g σκόνης σπόρων χαρουπιού. Παράλληλα στα κυπριακά δείγματα ήταν παρόν, όμως σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και η καφεΐνη, με μέση τιμή συγκέντρωσης 8 μg/g σκόνης σπόρων χαρουπιού.

Τα εκχυλίσματα της Κρήτης, παρουσίασαν εντελώς διαφορετική συμπεριφορά. Η θεοφυλλίνη δεν αποτελούσε την κύρια μεθυλοξανθίνη που προσδιορίστηκε σε αυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις (2 μg/g σκόνης σπόρων χαρουπιού). Υψηλότερη συγκέντρωση είχε η καφεΐνη όπου εντοπίστηκε σε 15 μg/g σκόνης σπόρων χαρουπιού (656 μg/g εκχυλίσματος). Επιπρόσθετα ταυτοποιήθηκε και η παρουσία της θεοβρωμίνης (TB) σε συγκέντρωση 7 μg/g

σκόνης σπόρων χαρουπιού (319  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος). Η παρουσία της θεοβρωμίνης δεν παρατηρήθηκε σε κάποια από τα δείγματα της Κύπρου.

Για τον σκοπό της μελέτης της παρουσίας και του προσδιορισμού των μεθυλοξανθινών κατά το στάδιο της ωρίμανσης των χαρουπιών πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις και σε δείγματα άγουρων χαρουπιών. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από το ίδιο δέντρο από το οποίο μελετήθηκαν και τα ώριμα χαρούπια της ίδια επαρχίας (Λάρνακας). Μελετώντας επομένως τα εκχυλίσματα των άγουρων σπόρων παρατηρήθηκε ότι η κύρια μεθυλοξανθίνη που ήταν παρούσα σε αυτά ήταν η καφεΐνη.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των μεθυλοξανθινών στα δείγματα σπόρων ώριμων και άγουρων χαρουπιών παρατηρείται πως η μεθυλοξανθίνη που εντοπίζεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στους άγουρους σπόρους χαρουπιού είναι η καφεΐνη ενώ στους ώριμους η θεοφυλλίνη. Το γεγονός ότι η καφεΐνη δεν προσδιορίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ώριμους σπόρους μπορεί να οφείλεται στην αποικοδόμηση που πραγματοποιείται σε αυτή (υποκεφάλαιο 2.5.5). Για αυτό και η μεθυλοξανθίνη που εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ώριμους σπόρους χαρουπιού είναι η θεοφυλλίνη. Συγκεκριμένα στα εκχυλίσματα σπόρων από άγουρα χαρούπια η μέση τιμή της καφεΐνης που εντοπίστηκε ήταν 38  $\mu\text{g/g}$  σκόνης άγουρων σπόρων χαρουπιού και στα εκχυλίσματα σπόρων ώριμων χαρουπιών ήταν 8  $\mu\text{g/g}$  σκόνης ώριμων σπόρων και η θεοφυλλίνη 31  $\mu\text{g/g}$  σκόνης ώριμων σπόρων.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα της σάρκας των ώριμων χαρουπιών των επαρχιών Λάρνακας, Λεμεσού και Κρήτης που μελετήθηκαν, μπορούν να θεωρηθούν απαλλαγμένα από την παρουσία των μεθυλοξανθινών. Σε ένα από τα εκχύλισμα της Πάφου ανιχνεύθηκε η παρουσία και των τριών υπό μελέτη μεθυλοξανθινών. Η θεοφυλλίνη και η καφεΐνη βρέθηκαν σε σχετικά υψηλές τιμές, σχεδόν 32  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας χαρουπιού (265  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος) σε αντίθεση με τη θεοβρωμίνη που βρέθηκε σε συγκέντρωση, 7  $\mu\text{g/g}$  σκόνης σάρκας χαρουπιού (60  $\mu\text{g/g}$  εκχυλίσματος).

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα σάρκας των άγουρων χαρουπιών παρατηρήθηκε ότι ήταν απαλλαγμένα από την παρουσία των μεθυλοξανθινών ή αν εντοπιζόταν η παρουσία τους, δεν ήταν εφικτή η ποσοτικοποίηση τους αφού βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις μικρότερες του Ορίου Ποσοτικοποίησης ( $< \text{LOQ}$ ). Από αυτό συμπεραίνεται ότι τόσο τα άγουρα όσο και τα ώριμα χαρούπια είναι απαλλαγμένα από μεθυλοξανθίνες ή αν υπάρχουν βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τέλος για τη μελέτη της κατανομής των μεθυλοξανθινών στα διάφορα μέρη του δέντρου μελετήθηκαν και φύλλα από το δέντρο της χαρουπιάς. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από το ίδιο δέντρο από το οποίο συγκομίστηκαν τα δείγματα των ώριμων και των άγουρων χαρουπιών. Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η καφεΐνη εντοπίζεται σε αυτά τα εκχυλίσματα αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις με μέση τιμή 8 μg/g σκόνης φύλλων χαρουπιού.

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα διάφορα δείγματα που πάρθηκαν από τις διαφορετικές επαρχίες της Κύπρου αλλά και από της Κρήτης παρατηρήθηκαν οι διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις των υπό μελέτη αναλυτών. Από αυτό συμπεραίνεται ότι πιθανώς ο γονότυπος καθώς και το περιβάλλον επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των αναλυτών για αυτό και παρατηρήθηκαν διακυμαινόμενα αποτελέσματα.

## 6.2. Μελλοντική εργασία

Μελλοντικές ερευνητικές ενέργειες θα μπορούσαν να γίνουν και να επικεντρωθούν στα ακόλουθα σημεία.

- Μελέτη δειγμάτων χαρουπιών από τα οποία να γνωρίζουμε την ποικιλία, τις καλλιεργητικές και περιβαλλοντικές συνθήκες, προκειμένου να μπορέσουν να εξαχθούν πιο σαφή αποτελέσματα και να υπάρχει μια πιο γενική εικόνα προκειμένου να αναφερθούμε πως κάποια ποικιλία έχει ή όχι μεθυλοξανθίνες.
- Περαιτέρω μελέτη της διαδικασίας εξαγωγής μεθυλοξανθινών από τα δείγματα σάρκας αλλά και των σπόρων προκειμένου να βρεθεί η κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης τους που να επιτρέπει την απομάκρυνση των προσμίξεων και παρουσιάζει υψηλή απόδοση στην απομόνωση των μεθυλοξανθινών.
- Εκτενέστερος μελέτη των σπόρων όπου θα διαχωρίζονται ο φλοιό, το ενδοσπέρμιο και το φυτό, προκειμένου να μελετηθεί αποκλειστικά το ενδοσπέρμιο ως προς την παρουσία των μεθυλοξανθινών.
- Περαιτέρω μελέτη των δειγμάτων κατά τα στάδια ωρίμανσης προκειμένου να ελεγχθεί πως ο βαθμός ωρίμανσης επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των μεθυλοξανθινών και να αποδειχθεί κατά πόσο μπορεί να θεωρηθεί βάσιμο το σενάριο που εξάχθηκε από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων ώριμων και άγουρων σπόρων χαρουπιού.

- Σημαντική θα ήταν η μελέτη και των προϊόντων που παράγονται με βάση το χαρούπι προκειμένου να ελεγχθούν πως επηρεάζονται οι αρχικές συγκεντρώσεις των μεθυλοξανθινών λόγω των διαφόρων πρακτικών επεξεργασίας που ακολουθούνται για την παρασκευή τους και να γίνει μια σύγκριση των αρχικών δειγμάτων μέχρι το τελικό προϊόν.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] Anaya A. L., Cruz-Ortega R., & Waller G. R. (2006). "Metabolism and ecology of purine alkaloids". *Front Biosci*, 11(Suppl 1), 2354.
- [2] Loullis A., & Pinakoulaki E. (2018). "Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications". *European Food Research and Technology*, 244(6), 959-977.
- [3] Rosemeyer H. (2004). "The chemodiversity of purine as a constituent of natural products". *Chemistry & biodiversity*, 1(3), 361-401.
- [4] Daly J. W. (2007). "Caffeine analogs: biomedical impact. Cellular and molecular life sciences", 64(16), 2153-2169.
- [5] Higdon J. V., & Frei B. (2006). "Coffee and health: a review of recent human research". *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(2), 101-123.
- [6] Dettelbach H. R., & Aviado D. M. (1985). "Clinical pharmacology of pentoxifylline with special reference to its hemorrheologic effect for the treatment of intermittent claudication". *The Journal of Clinical Pharmacology*, 25(1), 8-26.
- [7] Custódio L., Escapa A. L., Fernandes E., Fajardo A., Aligué R., Alberício F., & Romano A. (2011). "Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts". *Plant foods for human nutrition*, 66(1), 78-84.
- [8] Custódio L., Fernandes E., Escapa A. L., Fajardo A., Aligué R., Alberício F., & Romano A. (2011). "Antioxidant and cytotoxic activities of carob tree fruit pulps are strongly influenced by gender and cultivar. *Journal of agricultural and food chemistry*", 59(13), 7005-7012.
- [9] Corsi L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi C., & Baraldi M. (2002). "Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*", 73(7-8), 674-684.
- [10] Ortega N., Macia A., Romero M. P., Trullols E., Morello J. R., Angles N., & Motilva M. J. (2009). "Rapid determination of phenolic compounds and alkaloids of carob flour by improved liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7239-7244.

- [11] Khelifa M., Bahloul A., & Kitane S. (2013). "Determination of chemical composition of carob pod (*Ceratonia siliqua* L) and its morphological study". *J. Mater. Environ. Sci*, 4(3), 348-353.
- [12] Papaefstathiou E., Agapiou A., Giannopoulos S., & Kokkinofra R. (2018). "Nutritional characterization of carobs and traditional carob products". *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2151-2161.
- [13] Karababa E., & Coşkuner Y. (2013). "Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): An industrial gum yielding crop". *Industrial Crops and Products*, 42, 440-446.
- [14] Κώστα Χ. (Λειτουργός Γεωργίας Α'). "Η καλλιέργεια της χαρουπιάς, Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος – Τμήμα Γεωργίας", Έκδοση 8/2016, Λευκωσία-Κύπρος.
- [15] Καραμουρδής Α. (2015). "Αξιοποίηση των προϊόντων χαρουπιάς (*ceratonia siliqua*) στη χημική βιομηχανία". Πτυχιακή Εργασία.
- [16] Αλεξιάδου Α., Αλεξιάδου Ε. (2013). "Διατροφική αξία αλεύρων από φυτό χαρουπιού, μελέτη της χημικής σύστασης τριών ποικιλιών της Κύπρου". Πτυχιακή Εργασία
- [17] Battle I., & Tous J. (1997). "Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L".
- [18] Nasar-Abbas S. M., e-Huma Z., Vu T. H., Khan M. K., Esbenshade H., & Jayasena V. (2016). "Carob kibble: A bioactive-rich food ingredient". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 63-72.
- [19] Srour N.; Daroub H.; Toufeili I.; Olabi A. (2016). "Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatments and assessing their effect on quality characteristics". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3047-3057.
- [20] Goulas V., Stylos E., Chatziathanasiadou M. V., Mavromoustakos T., & Tzakos A. G. (2016). "Functional components of carob fruit: Linking the chemical and biological space". *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1875.

- [21] Salinas M. V., Carbas B., Brites C., & Puppo M. C. (2015). "Influence of different carob fruit flours (*Ceratonia siliqua* L.) on wheat dough performance and bread quality". *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1561-1570.
- [22] Το Δέντρο της Χρονιάς 2008 - Η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua* L.), Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Δασών.
- [23] Hadrich B., Dimitrov K., & Kriaa K. (2017). "Modelling investigation and parameters study of polyphenols extraction from carob (*Ceratonia siliqua* L.) using experimental factorial design". *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), e12769.
- [24] Durazzo A., Turfani V., Narducci V., Azzini E., Maiani G., & Carcea M. (2014). "Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours". *Food chemistry*, 153, 109-113.
- [25] Barracosa P., Osorio J., & Cravador A. (2007). "Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region". *Scientia Horticulturae*, 114(4), 250-257.
- [26] Martin-Diana, A. B., Izquierdo, N., Albertos, I., Sanchez, M. S., Herrero, A., Sanz, M. A., & Rico, D. (2017). "Valorization of carob's germ and seed peel as natural antioxidant ingredients in gluten-free crackers". *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), e12770.
- [27] Bengoechea, C., Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., & Puppo, M. C. (2008). "Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins". *Food chemistry*, 107(2), 675-683.
- [28] Kumazawa S., Taniguchi M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M. S., & Nakayama T. (2002). "Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of agricultural and food chemistry*", 50(2), 373-377.
- [29] Ayaz F. A., Torun H., Ayaz S., Correia P. J., Alaiz M., Sanz C., & Strnad M. (2007). "Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds". *Journal of Food Quality*, 30(6), 1040-1055.

- [30] Χατζηπάκκου Χ., Πίνακουλάκη Ε., (2018). "Επίδραση Καθαρών Πολυφαινολών και Εκχυλίσματος Πολυφαινολών από Χαρούπι Στο Σχηματισμό Ακρυλαμιδίου κατά την Αντίδραση Maillard στο Μοντέλο Ασπαραγίνης / Γλυκόζης"., Διατριβή Μάστερ.
- [31] El Batal H., & Hasib A. (2013). "Optimization of extraction process of carob bean gum purified from carob seeds by response surface methodology". *Optimization*, 12, 1-10.
- [32] Kawamura Y. (2008). "Carob Bean Gum: Chemical and technical Assessment". Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Geneva, Switzerland.
- [33] Maza M. P., Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F. J., Millán F., & Vioque E. (1989). "Carob bean germ seed (*Ceratonia siliqua*): study of the oil and proteins". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(4), 495-502.
- [34] Wang Y., Belton P. S., Bridon H., Garanger E., Wellner N., Parker M. L., & Noel T. R. (2001). "Physicochemical studies of caroubin: a gluten-like protein". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3414-3419.
- [35] Mazzafera, P. (2004). "Catabolism of caffeine in plants and microorganisms". *Front Biosci*, 9, 1348-1359.
- [36] Wettengel R. (1998). "Theophylline--past present and future". *Arzneimittel-Forschung*, 48(5A), 535-539.
- [37] PubChem, Open Chemistry Database, 'Theophylline' & 'Theobromine', U.S. National Library of Medicine
- [38] Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., & Kuroda, M. (2010). "Human–Environment Interactions–Taste".
- [39] Ashihara H., Yokota T., & Crozier A. (2013). "Purine alkaloids, cytokinins and purine-like neurotoxin alkaloids".
- [40] Nawrot P., Jordan S., Eastwood J., Rotstein J., Hugenholtz A., & Feeley M. (2003). "Effects of caffeine on human health". *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1-30.
- [41] Smith A. (2002). "Effects of caffeine on human behavior". *Food and chemical toxicology*, 40(9), 1243-1255.

- [42] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2015). Scientific opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal*, 13(5), 4102.
- [43] Caffeine European Food Safety Authority – EFSA
- [44] Marcus J. B. (2013). "Culinary nutrition: the science and practice of healthy cooking". Academic Press.
- [45] Hendeles L., & Weinberger M. (1983). "Theophylline a "state of the art" review". *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 3(1), 2-44.
- [46] Ψαρρά Θ. (2010). "Φαρμακολογική μελέτη των δράσεων της θεοφυλλίνης και των μεταβολιτών της στον πεπτικό σωλήνα του κουνελιού". (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Κτηνιατρική).
- [47] Ito K., Lim S., Caramori G., Cosio B., Chung K. F., Adcock I. M., & Barnes P. J. (2002). "A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8921-8926.
- [48] Vassallo R., Lipsky J. J. (1998, April). "Theophylline: recent advances in the understanding of its mode of action and uses in clinical practice". In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 73, No. 4, pp. 346-354). Elsevier.
- [49] Hendeles L., Iafrate R. P. & Weinberger M. (1984). "A clinical and pharmacokinetic basis for the selection and use of slow release theophylline products". *Clinical pharmacokinetics*, 9(2), 95-135.
- [50] Pauwels R. D. M. N. C., Van Renterghem D., Van Der Straeten M., Johannesson N., & Persson C. G. A. (1985). "The effect of theophylline and enprofylline on allergen-induced bronchoconstriction". *Journal of allergy and clinical immunology*, 76(4), 583-590.
- [51] Barnes P. J. (2005). "Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons". *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(4), 334-339.
- [52] Martínez-Pinilla E., Oñatibia-Astibia A., & Franco R. (2015). "The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption". *Frontiers in pharmacology*, 6, 30.

- [53] Haritha K., Kalyani L., & Rao A. L. (2014). "Health Benefits of Dark Chocolate". *Journal of Advanced Drug Delivery*, 1(4), 184-94.
- [54] Usmani O. S., Belvisi M. G., Patel H. J., Crispino N., Birrell M. A., Korbonits M., & Barnes P. J. (2005). "Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough". *The FASEB journal*, 19(2), 231-233.
- [55] Dorfman L. J., & Jarvik M. E. (1970). "Comparative stimulant and diuretic actions of caffeine and theobromine in man". *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 11(6), 869-872.
- [56] Franco R., Oñatibia-Astibia A., & Martínez-Pinilla E. (2013). "Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate". *Nutrients*, 5(10), 4159-4173.
- [57] Simons F. E. R., Becker A. B., Simons K. J., & Gillespie C. A. (1985). "The bronchodilator effect and pharmacokinetics of theobromine in young patients with asthma". *Journal of allergy and clinical immunology*, 76(5), 703-707.
- [58] Neufingerl N., Zebregs Y. E., Schuring E. A., & Trautwein E. A. (2013). "Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations: a randomized controlled trial". *The American journal of clinical nutrition*, 97(6), 1201-1209.
- [59] Ashihara H., Kato M., & Chuang-xing Y. (1998). "Biosynthesis and metabolism of purine alkaloids in leaves of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*)". *Journal of Plant Research*, 111(4), 599-604.
- [60] Ashihara H., Sano H., & Crozier A. (2008). "Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering". *Phytochemistry*, 69(4), 841-856.
- [61] Koyama Y., Tomoda Y., Kato M., & Ashihara H. (2003). "Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves". *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(11-12), 977-984.
- [62] Craig W. J., & Nguyen T. T. (1984). "Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products". *Journal of Food Science*, 49(1), 302-303.
- [63] Peláez, P. P., Bardón, I., & Camasca, P. (2016). Methylxanthine and catechin content of fresh and fermented cocoa beans, dried cocoa beans, and cocoa liquor. *Scientia Agropecuaria*, 7(4), 355-365.

- [64] Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoagrowing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280.
- [65] Trognitz, B., Cros, E., Assemat, S., Davrieux, F., Forestier-Chiron, N., Ayestas, E., & Hermann, M. (2013). Diversity of cacao trees in Waslala, Nicaragua: associations between genotype spectra, product quality and yield potential. *PLoS One*, 8(1), e54079.
- [66] Καρκαλούσος Π., Γεωργίου Ζ., Κρούπης Χ., Παπαϊωάννου Α., Πλαγεράς Π., Σπυρόπουλος Β., & Φούντζουλα Χ. (2015). "Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα".
- [67] Skoog, Douglas A., et al. "Αρχές της ενόργανης ανάλυσης", Κωσταράκης, Αθήνα, (2015).

#### Ιστοσελίδες:

w1: Ceratonia ilique, Wikipedia, [http://www.wikiwand.com/en/Ceratonia\\_siliqua](http://www.wikiwand.com/en/Ceratonia_siliqua)

w2: Carob Tree – Ceratonia siliqua, Urban Forest Ecosystems Institute, <https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/ceratonia-siliqua>

w3: [http://www.lbg.it/SEEDGUM-raw\\_materials.html](http://www.lbg.it/SEEDGUM-raw_materials.html)

w4: Τσιγλάκη Θ., Χαρούπι: Ένα τρόφιμο αξίας πολλών «καρατίων», Rethemnos Live, International Portal (Σεπ 15, 2018), <https://rethemnos.gr/charoypi-ena-trofimo-axias-pollon-kar/>

w5: Hyper Foods, Βιολογικό Κακάο Σκόνη Ωμό, <http://www.hyperfoods.gr>