

**Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας**

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

*Εργαστήριο Ζωοτεχνίας*

MIS 380231

*Δράση 1<sup>η</sup> : Μεθοδολογία ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων*

**Παραδοτέα: D1\_P1**

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΒΙΟΝΕΡΓΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ**



### I. Μέθοδοι εκχύλισης φλαβονοειδών από ιστό ορνίθων

Πραγματοποιήθηκαν δύο δοκιμές εκχύλισης, με εμβολιασμό (spiking) καθορισμένης ποσότητας φλαβονοειδούς (εσπεριδίνη).

1) Μέρος του ιστού (μούτι κοτόπουλου) ψύχθηκε σε υγρό άζωτο (-197 °C) και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε μπλέντερ για να τεμαχιστεί. Ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες από τον τεμαχισμένο ιστό:

Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα (gr)
M4ΜΠ	5.046
E4ΜΠ	5.299
N4ΜΠ	5.480

Ακολούθως, προστέθηκαν από 10 ml CHCl<sub>3</sub> και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή υπερήχων (60Hz – 15 min) για εκχύλιση του λίπους. Ακολούθησε διήθηση, έκπλυση με 10 ml CHCl<sub>3</sub> και στη συνέχεια συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη με ρεύμα αζώτου. Αναλυτικά ζυγίστηκαν τα παρακάτω υπολείμματα λίπους:

Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα (mgr)
M4ΜΠ	124
E4ΜΠ	139
N4ΜΠ	179

Ο ιστός στην συνέχεια εκχυλίστηκε εκ νέου με MeOH, 10 ml, με χρήση υπερήχων (15 min, 60Hz). Συλλέχθηκε το υπερκείμενο με πιπέτα και ακολούθησε συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη με ρεύμα αζώτου. Αναλυτικά ζυγίστηκαν τα παρακάτω υπολείμματα από την εκχύλιση με διαλύτη μεθανόλη (MeOH):

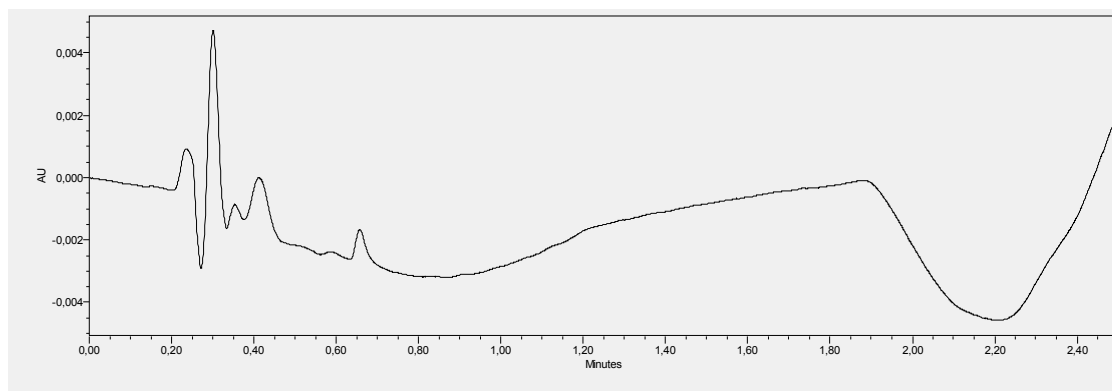


Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα (mgr)
M4ΜΠ	122.0
E4ΜΠ	116.6
N4ΜΠ	146.1

Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (UPLC – Acquity Waters). Οι συγκεντρώσεις για τα τρία δείγματα ήταν :

Κωδικός Δείγματος	Συγκέντρωση (μg/mL)
M4ΜΠ	0.2
E4ΜΠ	-
N4ΜΠ	-

Το χρωματογράφημα για το δείγμα M4ΜΠ παρουσιάζεται στο σχήμα 1.



**Σχήμα 1.** Χρωματογράφημα δείγματος M4M ύστερα από την εκχύλιση των φλαβονοειδών από ιστό ορνίθων (μούτι κοτόπουλου).

2) Μέρος του ιστού (στήθος από κοτόπουλο) ψύχθηκε σε υγρό άζωτο (-197 °C) και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε μπλέντερ για να τεμαχιστεί. Ζυγίστηκαν οι παρακάτω ποσότητες από τον τεμαχισμένο ιστό:



Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα (gr)
M4Σ	2.043
M4Σ	2.042

Ακολούθησε εμβολιασμός-προσθήκη 1.95 mg (A) και 2.36 mg (B) αντιστοίχως εσπεριδίνης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml CHCl<sub>3</sub>/MeCN 1:2 v/v και το μίγμα αναδεύτηκε σε Vortex για 30 sec. Ακολούθησε εκχύλιση με ηπερήχους για 10 min (40 kHz) και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε με ρεύμα αζώτου. Στο υπόλοιμα του ιστού, προστέθηκαν 10 ml CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 80:20 v/v, το μίγμα αναδεύτηκε σε Vortex για 30 sec , ακολούθησε εκχύλιση με ηπερήχους για 10 min και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε με ρεύμα αζώτου. Αναλυτικά ζυγίστηκαν τα παρακάτω υπολείμματα από την εκχύλιση με μεθανόλη/νερό:

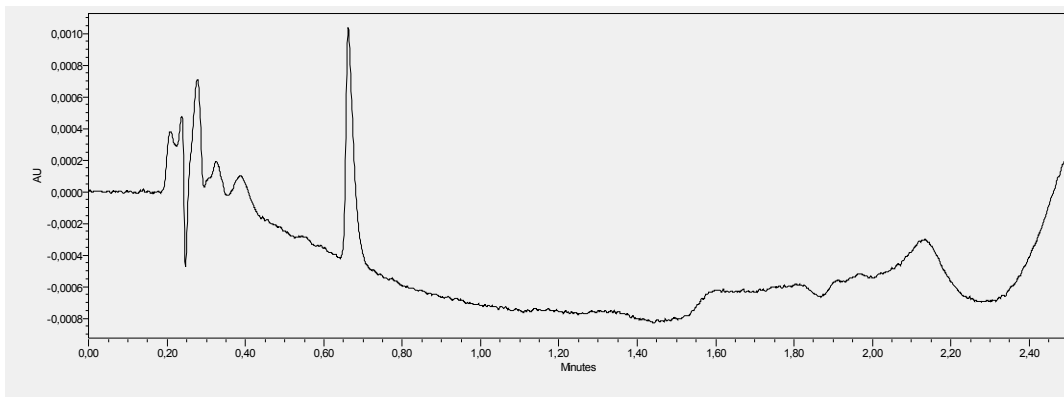
Κωδικός Δείγματος	Ποσότητα (mgr)
M4Σ	36.1
M4Σ	31.8

Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (UPLC – Acquity Waters). Οι συγκεντρώσεις για τα δυο δείγματα ήταν

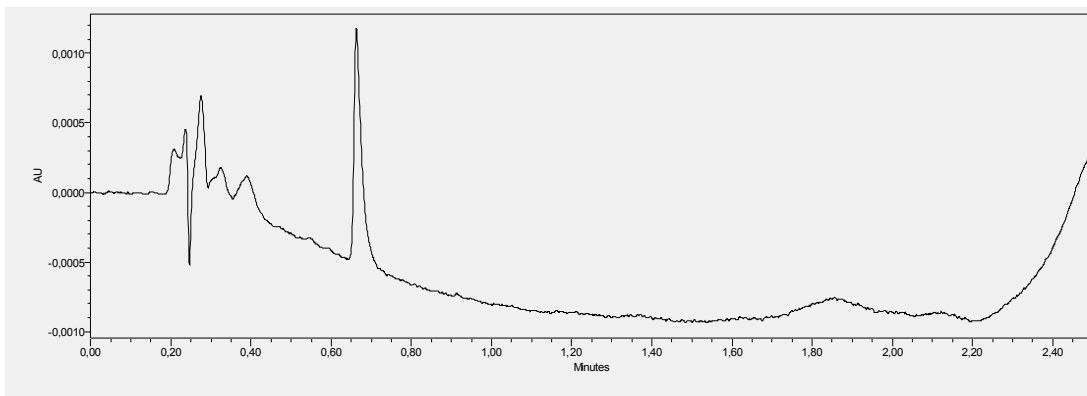
Κωδικός Δείγματος	Συγκέντρωση (μg/mL)
M4Σ	0.223
M4Σ	0.222

Τα χρωματογραφήματα για τα δυο δείγματα παρουσιάζονται στα σχήματα 2-3.





Σχήμα 2. Χρωματογράφημα εκχύλισης φλαβονοειδών από το δείγμα M4S από ιστό ορνίθων (στήθος κοτόπουλου).



Σχήμα 3. Χρωματογράφημα εκχύλισης φλαβονοειδών από το δείγμα M4S από ιστό ορνίθων (στήθος κοτόπουλου).

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

A. Κομινάκης  
Αν. Καθηγητής

M. Χαρισμιάδου  
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης  
Ερευνητής



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης