

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

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

**Δράση 3<sup>η</sup> : Ποιότητα σφαγίου και κρέατος ορνίθων**

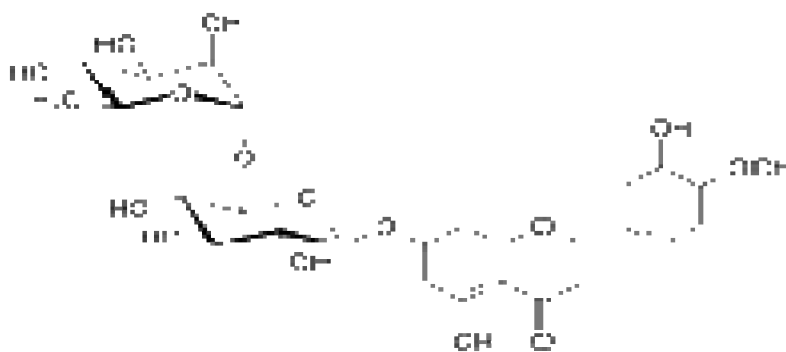
**Παραδοτέο: D3\_P1a**

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΕΤΙΝΗΣ, ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΟΡΝΙΘΩΝ**



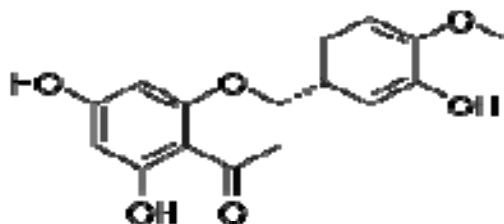
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΕΤΙΝΗΣ, ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΟΡΝΙΘΩΝ

Στα πλαίσια αξιοποίησης των φυσικών αντιοξειδωτικών Εσπεριδίνης (Σχήμα 1), Εσπερετίνης (Σχήμα 2), Ναρινγίνης (Σχήμα 3) και Ναρινγενίνης (Σχήμα 4) στην εκτροφή των αγροτικών ζώων για παραγωγή προϊόντων ποιότητας, αναπτύχθηκε μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού τους σε βιολογικά δείγματα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με υβριδικό φασματόμετρο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, συνδυασμού γραμμικής και τροχιακής παγίδας (LTQ-Orbitrap Discovery- Thermo Finnigan) εφοδιασμένο με πηγή ιονισμού ESI, σε αρνητικό ιονισμό.

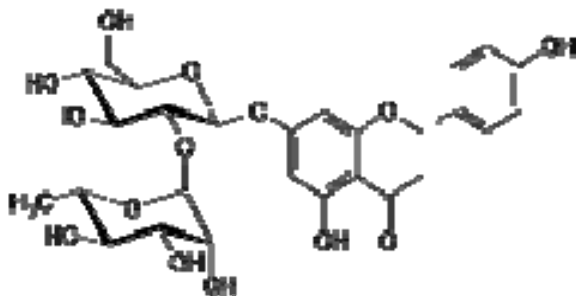


Σχήμα 1. Χημική δομή Εσπεριδίνης ( $C_{28}H_{34}O_{15}$ ) με Μοριακό Βάρος  $MW=610,56$  g/mol.

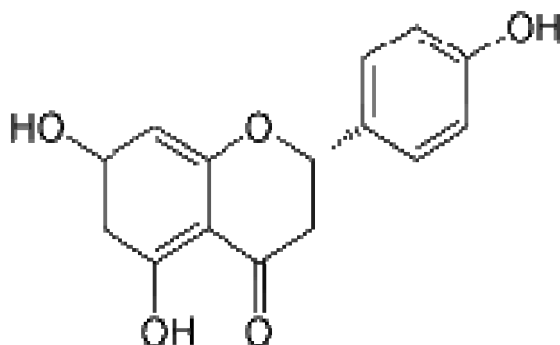




Σχήμα 2. Χημική δομή Εσερετίνης (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) με Μοριακό Βάρος, MW=302,27 g/mol.



Σχήμα 3. Χημική δομή Ναρινγίνης (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>) με Μοριακό Βάρος, MW=580,54 g/mol.



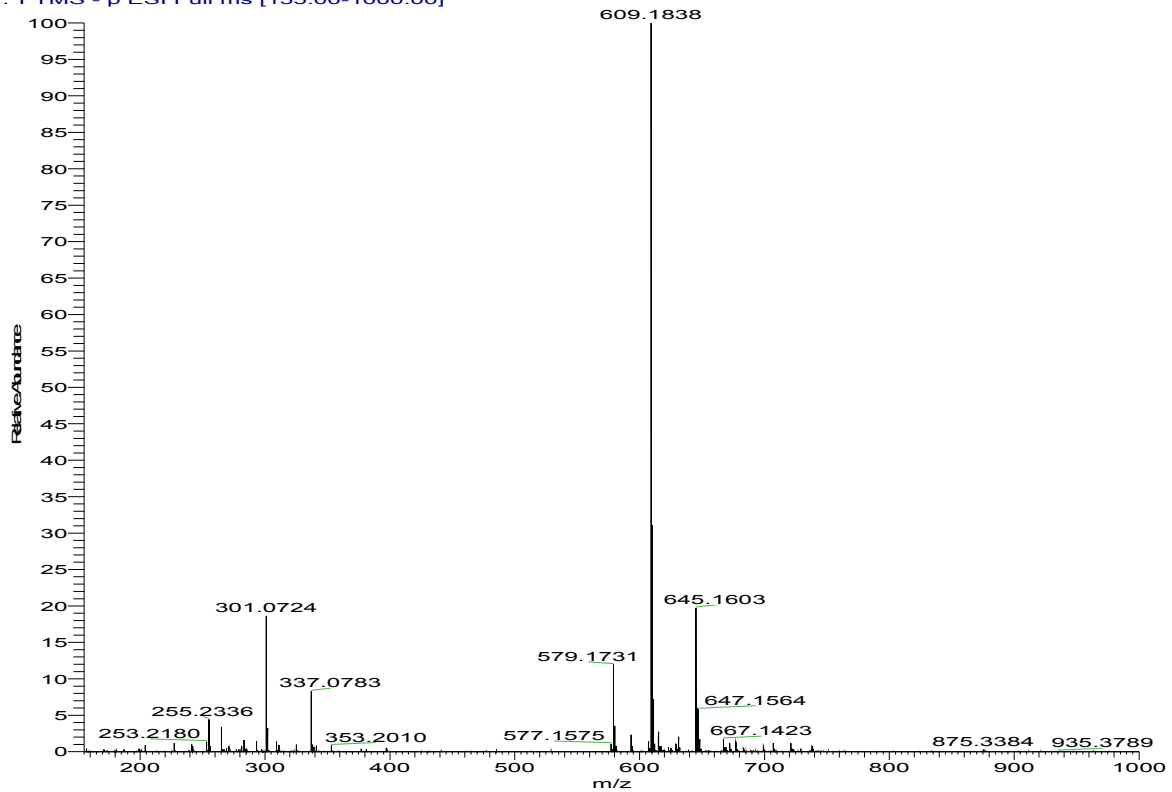
Σχήμα 4. Χημική δομή Ναρινγενίνη ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) με Μοριακό Βάρος, MW=272,257 g/mol.

#### 1, Ανάπτυξη μεθοδολογίας ανίχνευσης των μορίων Εσπεριδίνης, Εσπερετίνης, Ναρινγίνης και Ναρινγενίνης.

Οι ουσίες διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση  $C=5 \text{ ug/mL}$  και ενέθηκαν στο φασματόμετρο LTQ-Orbitrap, με απευθείας έγχυση (direct infusion) προκειμένου να ερευνηθεί η καταλληλότερη μέθοδος ιονισμού. Παρατηρήθηκε ότι ο ιοντισμός και των τεσσάρων υπό ανάλυση μορίων ήταν ικανοποιητικός σε αρνητικό ιονισμό (Σχήμα 5-8). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τροποποίηση της μεθοδολογίας για τον καθορισμό των βέλτιστων παραμέτρων με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους σε βιολογικά δείγματα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 1.



HD\_FTMS\_ESI - #30 RT: 0.98 AV: 1 NL: 2.47E6  
T: FTMS - p ESI Full ms [155.00-1000.00]



Σχήμα 5. Φάσμα Μάζας πλήρους σάρωσης Εσπεριδίνης.

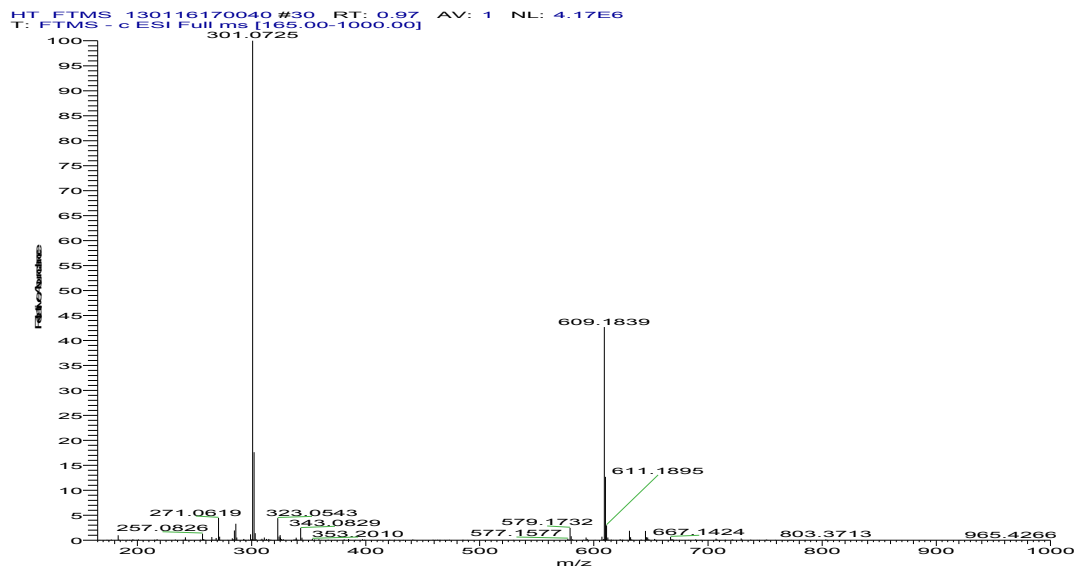
Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

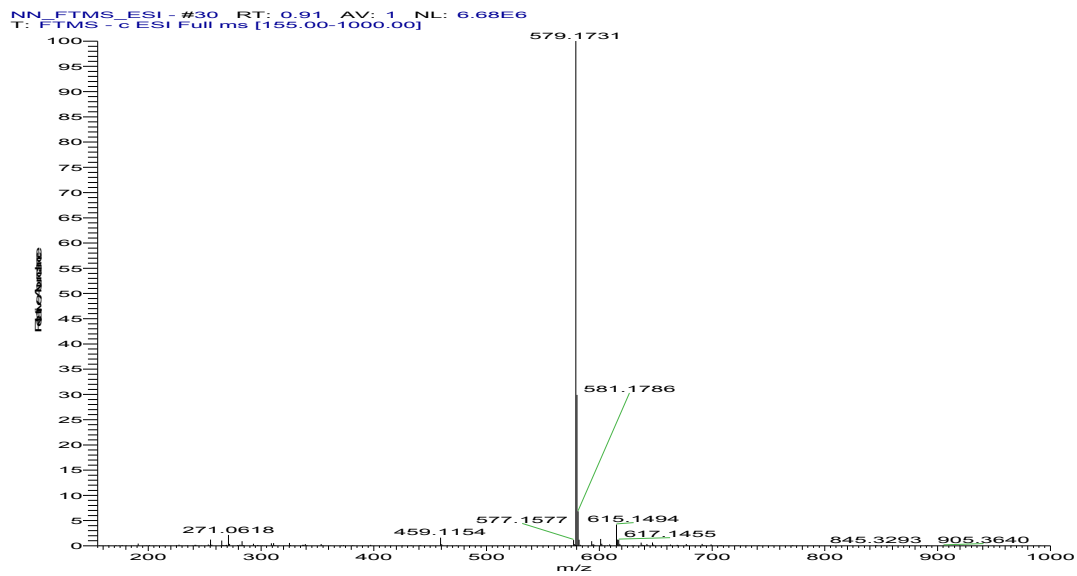
ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



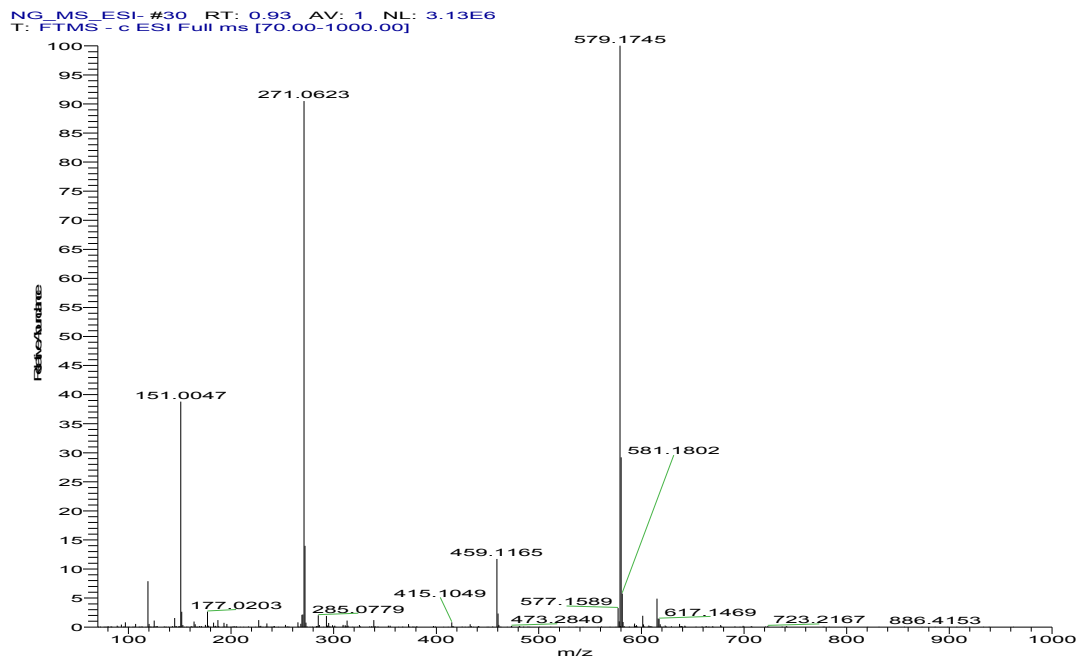
Σχήμα 6. Φάσμα Μάζας πλήρους σάρωσης Εσπερετίνης.





Σχήμα 7. Φάσμα Μάζας πλήρους σάρωσης Ναρινγίνης.





Σχήμα 8. Φάσμα Μάζας πλήρους σάρωσης Ναρινγενίνης.

Source Voltage (KV)	3,50
Capillary Voltage (V)	-1,00
Tube Lens (V)	-88,36





Multipole RF Amplifier (Vp-p)	400,00
Multipole 00 offset (V)	4,00
Lens 0 Voltage (V)	4,50
Multipole 0 offset (V)	5,25
Lens 1 Voltage (V)	10,00
Gate Lens offset (V)	48,00
Multipole 1 offset (V)	6,00
Front Lens (V)	5,25
Ion Trap Zoom Microscans	1
Ion Trap Zoom Max Ion Time (ms)	50,00
Ion Trap Full Microscans	1
Ion Trap Full Max Ion Time (ms)	200,00

**Πίνακας 1.** Βέλτιστες παράμετροι για τον εντοπισμό των μορίων Εσπεριδίνης, Εσπεριτίνης, Ναριγίνης και Ναργενίνης σε βιολογικά δείγματα, με τη χρήση UHPLC-HRMS.



## II. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των μορίων σε βιολογικά δείγματα με τη χρήση LTQ-Orbitrap Discovery.

Εντοπίζοντας τις κατάλληλες παραμέτρους για την ανίχνευση κάθε ουσίας ξεχωριστά, αναπτύχθηκε μεθοδολογία για το διαχωρισμό και την ανίχνευση τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά και των τεσσάρων ουσιών ταυτόχρονα σε βιολογικά δείγματα. Σε πρώτη φάση διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών διαλυτών της κινητής φάσης καθώς και η αναλογία τους στη μονάδα του χρόνου. Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων μελετήθηκαν οι χρόνοι έκλουσης των ουσιών (Retention Time) και η ευαισθησία ανίχνευσης τους (Peak Intensity) (Σχήμα 9).

### **Methodology:**



	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	P2
0	0.00	95.0	5.0	0.0	0.0	200.0	
1	0.10	80.0	20.0	0.0	0.0	200.0	
2	1.00	80.0	20.0	0.0	0.0	200.0	
3	1.10	70.0	30.0	0.0	0.0	200.0	
4	3.00	70.0	30.0	0.0	0.0	200.0	
5	3.10	50.0	50.0	0.0	0.0	200.0	
6	5.00	50.0	50.0	0.0	0.0	200.0	
7	5.10	0.0	0.0	100.0	0.0	200.0	
8	5.50	0.0	0.0	100.0	0.0	200.0	
9	5.60	95.0	5.0	0.0	0.0	350.0	
10	7.00	95.0	5.0	0.0	0.0	350.0	
11	7.10	95.0	5.0	0.0	0.0	200.0	
12	14.00	95.0	5.0	0.0	0.0	200.0	

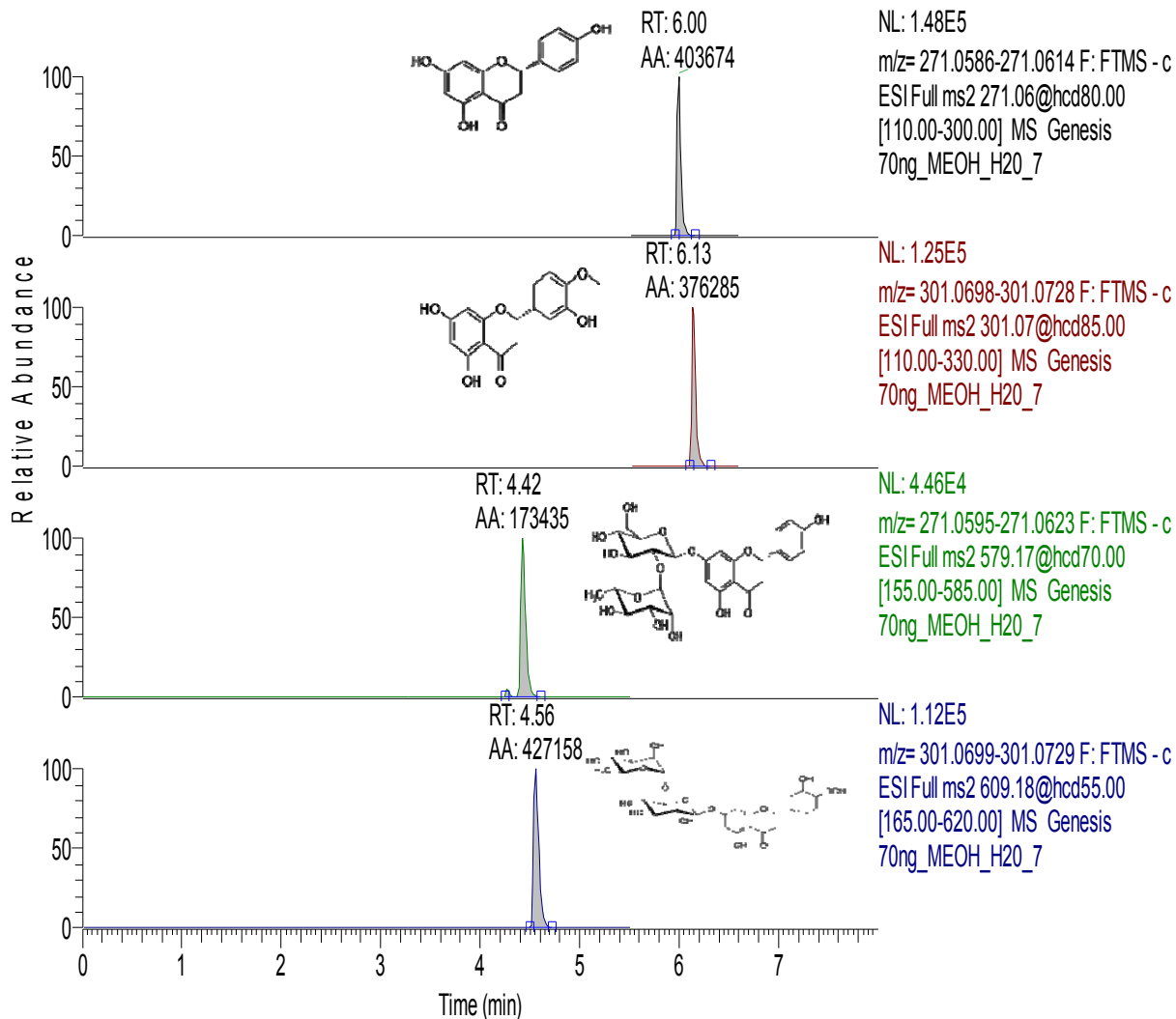
A: H<sub>2</sub>O 0,1% aa

B: ACN

C: IProp/ACN/Acet 58:40:2



RT: 0.00 - 8.00



Σχήμα 9. Χρωματογράφημα διαχωρισμού των τεσσάρων μορίων .

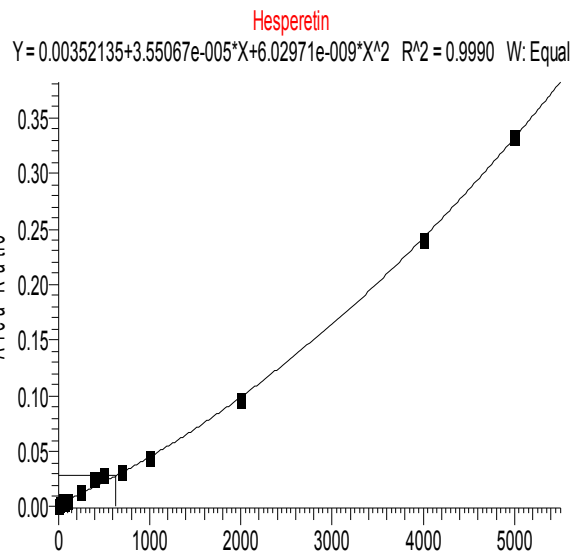
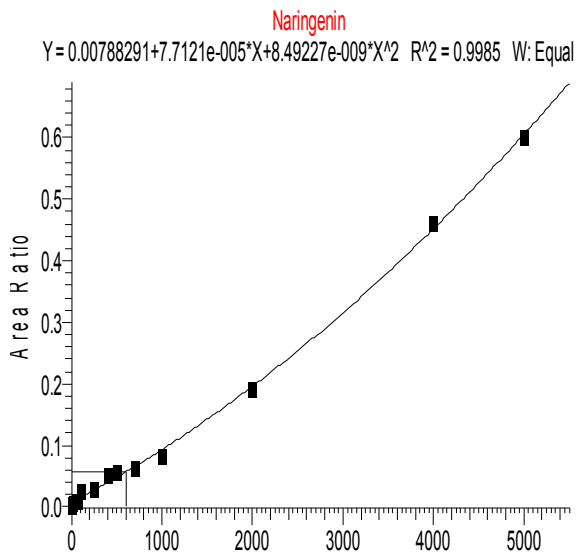
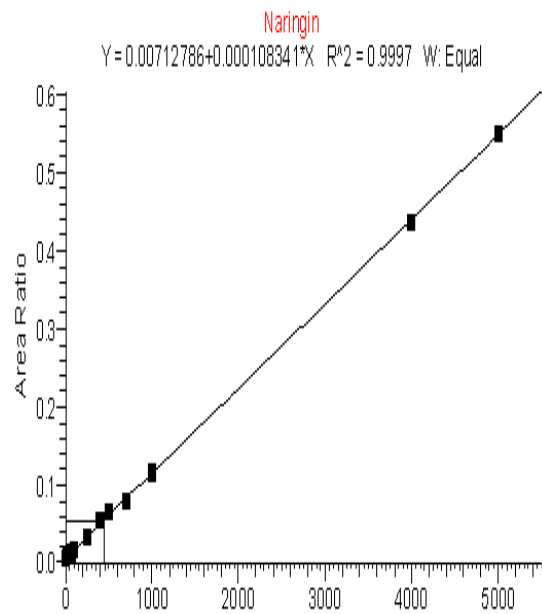
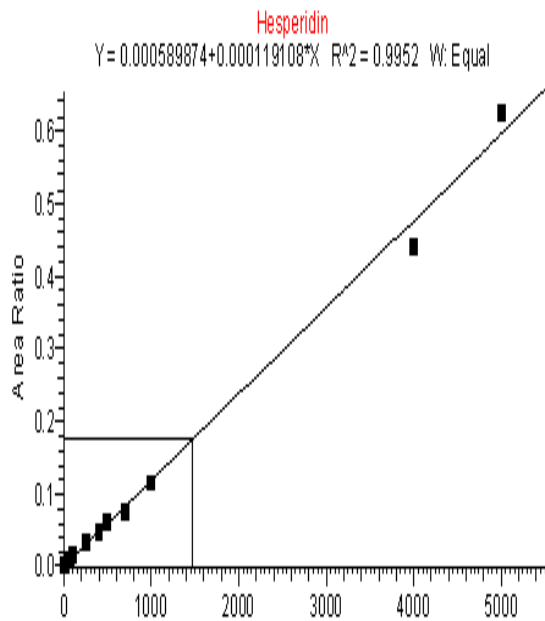


### III. Ανάπτυξη μεθοδολογίας ανάκτησης των μορίων από πλάσμα με τη μέθοδο της Υγρής-Υγρής Εκχύλισης (L-L Extraction).

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τεσσάρων μορίων σε πλάσμα από ορνίθια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με τη μέθοδο της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη για την κατακρύμνιση των πρωτεϊνών την ακετόνη και ως εσωτερικό πρότυπο για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων την 4-ιωδοφαινόλη. Σε πλάσμα (50  $\mu$ l) προστέθηκαν 10  $\mu$ l διαλύματος εσωτερικού προτύπου (IS) συγκέντρωσης 10  $\mu$ g/mL, ακολούθησε κατακρύμνιση με 400  $\mu$ l ακετόνης και έντονη ανάδευση. Το υπερκείμενο που συλλέχτηκε ύστερα από φυγοκέντρηση στις 13,500 rpm για 10 λεπτά εξατμίστηκε σε μηχάνημα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση σε 50  $\mu$ l διαλύτη,

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς εύρους από 5 ng/mL έως 5  $\mu$ g/mL σε πλάσμα μάρτυρα.





Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης  
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ  
2007-2013  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη  
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των τεσσάρων μορίων σε πλάσμα ύστερα από συλλογή σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία:

- 4 ώρες (Πρώτη Δειγματοληψία)
- 8 ώρες (Δεύτερη Δειγματοληψία)
- 30 ημέρες (Τρίτη Δειγματοληψία)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους κάτωθεν πίνακες:

➤ **ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΠΡΩΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

	Hesperetin	Naringenin	Hesperidin	Naringin
Code	Calculated Amount (ng/mL)	Calculated Amount (ng/mL)	Calculated Amount (ng/mL)	Calculated Amount (ng/mL)
102	Detected	ND	Detected	ND
103	ND	ND	26,910	Detected
126	Detected	ND	23,572	Detected
128	ND	ND	Detected	ND
138	ND	ND	ND	ND
139	Detected	ND	ND	ND



140	ND	Detected	Detected	ND
15	ND	Detected	Detected	ND
153	Detected	ND	Detected	20,262
161	ND	ND	ND	ND
162	ND	ND	ND	Detected
177	ND	ND	5,019	38,234
178	Detected	Detected	ND	ND
187	Detected	ND	13,002	8,261
188	ND	Detected	Detected	Detected
19	Detected	ND	Detected	ND
201	Detected	Detected	5,057	11,796
202	67,433	Detected	Detected	Detected
203	16,743	Detected	196,387	23,047
21	Detected	ND	5,937	ND
211	Detected	ND	Detected	9,247
226	ND	ND	9,785	21,240





237	Detected	ND	ND	ND
238	ND	ND	ND	Detected
240	ND	ND	Detected	8,491
251	ND	ND	17,349	Detected
252	ND	ND	Detected	ND
261	5,379	ND	ND	ND
263	ND	51,343	Detected	Detected
277	ND	ND	Detected	ND
28	ND	ND	6,100	Detected
286	ND	ND	ND	Detected
289	ND	21,519	Detected	ND
29	ND	ND	Detected	ND
3	ND	ND	Detected	ND
39	9,254	ND	Detected	ND
52	ND	ND	Detected	ND
61	ND	ND	16,920	Detected



62	Detected	ND	Detected	ND
63	16,983	ND	20,790	Detected
77	26,197	ND	5,663	ND
78	Detected	ND	Detected	ND
89	Detected	ND	Detected	ND
90	Detected	Detected	227,332	Detected
91	Detected	ND	22,292	5,962

Detected: 1,5-5 ng/mL

➤ **ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΔΕΥΤΕΡΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

Code	Naringin		Hesperidin		Naringenin		Hesperetin	
	Calculated	Amount (ng/mL)	Calculated	Amount	Calculated	Amount	Calculated	Amount (ng/mL)
101	ND		ND		ND		ND	
102	ND		ND		ND		ND	
103	ND		126,009		ND		ND	
111	ND		40,951		ND		ND	

 <b>Ευρωπαϊκή Ένωση</b> Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο	 <b>ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ</b> <b>ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ</b> <i>επένδυση στην κοινωνία της γνώσης</i> ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ <b>ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ</b> Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης	 <b>ΕΣΠΑ</b> <b>2007-2013</b> πρόγραμμα για την ανάπτυξη ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
---	---	--

112	ND	ND	ND	ND
126	ND	Detected	ND	ND
128	ND	11,614	ND	ND
138	ND	ND	ND	ND
139	ND	Detected	ND	ND
140	ND	ND	ND	165,044
151	ND	ND	ND	ND
153	ND	ND	ND	ND
15	ND	35,818	ND	ND
161	ND	ND	ND	ND
162	ND	11,371	ND	ND
163	ND	ND	ND	ND
176	ND	Detected	ND	ND
177	ND	Detected	ND	ND
178	ND	17,099	ND	ND
187	ND	16,196	ND	ND



188	ND	Detected	ND	ND
19	ND	Detected	ND	ND
201	ND	27,175	ND	ND
202	ND	ND	ND	ND
203	ND	46,682	ND	ND
211	ND	ND	ND	ND
212	ND	Detected	ND	ND
21	ND	10,711	ND	ND
226	ND	Detected	ND	ND
229	ND	ND	ND	ND
237	ND	ND	ND	ND
238	ND	16,896	ND	ND
240	ND	14,054	ND	ND
251	ND	ND	ND	ND
252	ND	ND	ND	ND
253	ND	ND	ND	ND



261	ND	ND	ND	ND
263	ND	ND	ND	ND
276	ND	10,405	ND	ND
277	ND	10,625	ND	ND
27	ND	ND	ND	ND
286	ND	ND	ND	ND
287	ND	36,055	ND	ND
289	ND	ND	ND	ND
28	ND	Detected	ND	14,342
29	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
39	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
51	ND	ND	ND	Detected
52	ND	Detected	ND	ND



6	ND	95,588	ND	ND
62	ND	ND	ND	ND
63	ND	ND	ND	Detected
76	ND	39,192	ND	ND
77	ND	ND	ND	ND
78	ND	Detected	ND	ND
89	ND	Detected	ND	ND
91	ND	ND	ND	ND

Detected: 1,5-5 ng/mL

➤ **ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΡΙΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

	<b>Naringin</b>	<b>Hesperidin</b>	<b>Naringenin</b>	<b>Hesperetin</b>
<b>Code</b>	Calculated Amount (ng/mL)	Calculated Amount (ng/mL)	Calculated Amount (ng/mL)	Calculated Amount (ng/mL)
101	ND	16,951	ND	ND
102	ND	ND	ND	ND
103	348,619	1853,485	66,829	44,705



111	ND	ND	ND	ND
112	ND	ND	ND	ND
126	ND	ND	ND	ND
128	ND	ND	ND	ND
138	ND	ND	ND	ND
139	ND	200,788	ND	9,865
140	ND	ND	ND	ND
151	1167,006	80,022	ND	ND
153	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND
161	4009,328	446,311	202,771	23,19
162	ND	ND	ND	ND
163	ND	ND	ND	ND
176	36,806	ND	ND	ND
177	4839,91	1214,6	409,889	35,339
178	479,534	41,11	ND	ND
187	ND	ND	ND	ND
188	73,59	ND	ND	ND
19	ND	415,859	10,013	29,99
201	1269,996	49,728	ND	ND
202	41,089	ND	ND	ND
203	36,483	Detected	ND	ND
211	66,401	ND	ND	ND
212	29,4	ND	ND	ND
21	ND	335,423	ND	14,395



226	39,23	ND	ND	ND
229	ND	ND	ND	ND
231	Detected	ND	ND	ND
237	ND	ND	ND	ND
238	279,739	Detected	ND	ND
240	ND	ND	ND	ND
251	ND	792,85	Detected	33,577
252	ND	ND	ND	ND
253	ND	ND	ND	ND
261	ND	279,227	ND	5,821
263	ND	ND	ND	ND
276	ND	676,893	ND	57,612
277	ND	ND	ND	ND
27	ND	ND	ND	ND
286	34,878	3644,316	836,234	891,074
287	26,649	415,068	39,651	53,331
28	ND	289,571	ND	Detected
29	ND	1020,867	35,645	55,974
2	ND	41,182	ND	ND
38	ND	419,625	ND	17,278
39	ND	161,118	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
51	ND	ND	ND	ND
52	ND	ND	ND	ND
62	ND	276,386	ND	13,3





63	13,362	1445,031	Detected	39,336
64	ND	ND	ND	ND
76	ND	ND	ND	ND
77	ND	733,88	ND	20,744
78	ND	ND	ND	ND
89	ND	Detected	ND	ND
91	ND	49,653	ND	ND
289	Detected	334,934	Detected	326,445

**Detected:** 1,5-5 ng/mL

### Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Α. Κομνάκης  
Αν. Καθηγητής

Μ. Χαρισμάδου  
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης  
Ερευνητής

