

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

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 1^η : Μεθοδολογία ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων

Παραδοτέο: D1_P3α

**ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΙΤΙΝΗΣ,
ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ**



Στα πλαίσια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των μορίων Εσπεριδίνης, Εσπεριτίνης, Ναργενίνης και Ναργινίνης σε πλάσμα όρνιθας, αναζητήθηκε η μέθοδος μέγιστης ανάκτησης και επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες και μεθοδολογίες. Δοκιμάστηκε τόσο η μέθοδος της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction) όσο και της στερεάς φάσεως εκχύλιση (Solid Phase Extraction, SPE). Αναλύθηκαν δείγματα από μάρτυρα όρνιθας στα οποία προστέθηκαν τα προς μελέτη μόρια προ της εκχύλισης (pre-spike) και μετά της εκχύλισης (post-spike). Σκοπός ήταν η εύρεση της μεθοδολογίας εκείνης με το μέγιστο ποσοστό ανάκτησης και των τεσσάρων μορίων.

Ως διαλύτες κατακρήμνισης στη μέθοδο της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction) δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες. Ενδεικτικά, δοκιμάστηκαν το ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, μεθανόλη με 0.1% οξικό οξύ, ακετόνη, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 1:1 (v/v), μεθανόλη με 1% προσθήκη φορμικού οξέος στο πλάσμα, μεθανόλη με 5% προσθήκη φορμικού οξέος στο πλάσμα, ακετονιτρίλιο που περιείχε 3% φορμικό οξύ, τριχλωροοξικό οξύ και μεθανόλη σε αναλογία 1:1 (v/v) (Ying et al., 2007, Ma et al., 2010, Mullen et al., 2008, Zhu et al., 2012, Felgines et al., 2000). Στη μεθοδολογία της στερεάς φάσεως εκχύλισης στερεής φάσεως (HLB) τόσο των 10 mgr όσο και των 30 mgr. Για την έκλουση των μορίων από τα φυσίγγια πληρώσεως χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες όπως μεθανόλη, μεθανόλη με προσθήκη στο πλάσμα 1% φορμικό οξύ, μεθανόλη και προσθήκη στο πλάσμα 3% φορμικό οξύ, ακετονιτρίλιο, ακετονιτρίλιο και προσθήκη στο πλάσμα 3% φορμικό οξύ, ακετονιτρίλιο και προσθήκη στο πλάσμα 5% φορμικό οξύ (Kanaze et al., 2003, Saeidi et al., 2011, Bock et al., 2008, Irakli et al., 2012)

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η κάτωθεν:



- Προετοιμασία Δειγμάτων προ της εκχύλισης (**pre-spike**)

Μελετήθηκε η ανάκτηση των μορίων σε εύρος συγκέντρωσης από 5 ng/mL έως 500 ng/mL με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Σε 50 μl πλάσματος από μάρτυρα προστέθηκαν 10 μl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη Μεθανόλη-Νερό (1:1 v/v). Ακολούθησε κατακρήμιση με προσθήκη διαφόρων όγκων (200, 400, 800, 2X200, 2X400) από τους υπό δοκιμή διαλύτες. Μετά την κατακρήμιση έγινε έντονη ανάδευση (vortex) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 50 μl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

- Προετοιμασία Δειγμάτων μετά της εκχύλισης (**post-spike**)

Μελετήθηκε η ανάκτηση των μορίων σε εύρος συγκέντρωσης από 5 ng/mL έως 500 ng/mL με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Σε 50 μl πλάσματος από μάρτυρα προστέθηκαν 10 μl νερό. Ακολούθησε κατακρήμιση με προσθήκη διαφόρων όγκων (200, 400, 800, 2X200, 2X400) από τους υπό δοκιμή διαλύτες. Μετά την κατακρήμιση έγινε έντονη ανάδευση (vortex) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο όπου και προστέθηκαν 10 μl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη Μεθανόλη-Νερό σε αναλογία 1:1 (v/v) και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό



ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 50 μl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

Η μελέτη του ποσοστού ανάκτησης έγινε συγκρίνοντας τα δείγματα προ και μετά της εκχύλισης $\{R\% = (\text{area post spike} / \text{area pre spike}) \times 100\}$.

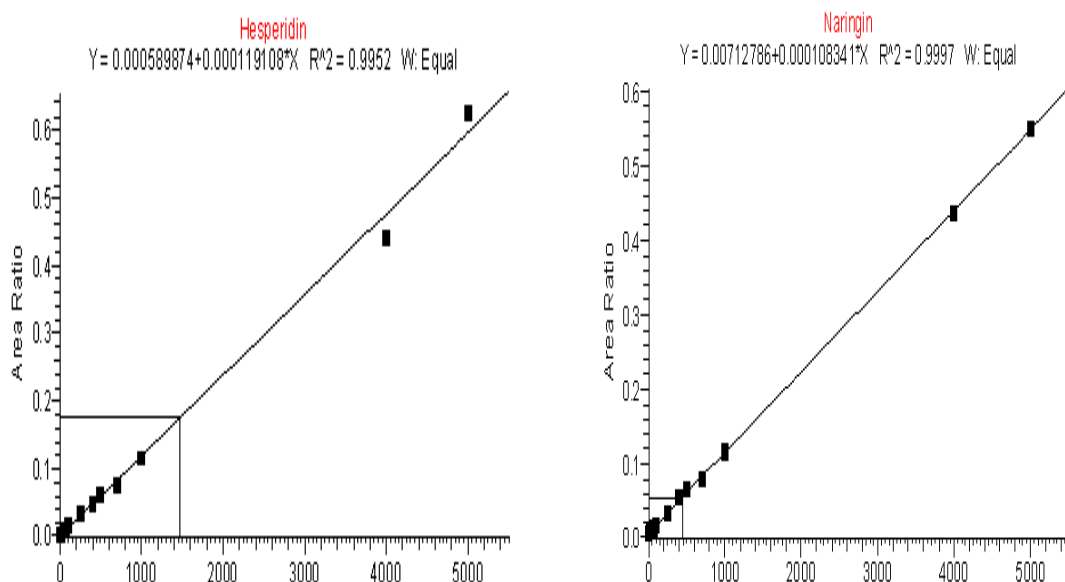
Παρατηρήσαμε το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη κατακρύμνισης παγωμένη ακετόνη (V=400 μl) (Πίνακας1).

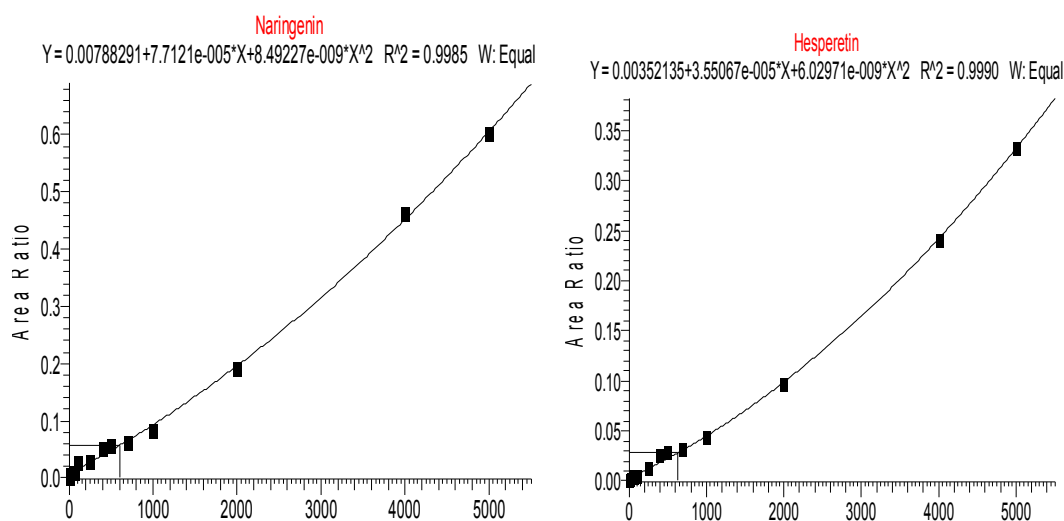
Μόρια	Ανάκτηση (%)							
	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL	50 ng/ml	100 ng/mL	250 ng/mL	400 ng/mL	500 ng/mL
Ναριγίνης	53,65	72,26	100	100	99,56	100	100	82,67
Εσπεριδίνης	65,98	68,53	89,16	100	100	100	100	74,02
Ναριγενίνη	91,33	57,68	100	98,36	80,45	72,59	100	75,87
Εσπεριτίνη	77,38	76,02	87,40	91,72	89,63	100	95,22	85,06



Πίνακας1. Ποσοστό ανάκτησης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη κατακρύμνισης της ακετόνη.

Δημιουργήθηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας σε 3 επίπεδα (Quality Control Samples), χαμηλής, μεσαίας και υψηλής συγκέντρωσης, επί 6 φορές σε κάθε επίπεδο, και αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς εύρους από 5 ng/mL έως 5 μg/mL σε πλάσμα μάρτυρα (συνολικά 3 καμπύλες) για να μελετήσουμε τη γραμμικότητα και την επαναληψιμότητα της μεθοδολογίας.





Σε κάθε περίπτωση ο συντελεστής συσχέτισης ήταν μεγαλύτερος από 0,99 ενώ η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια ήταν εντός των αποδεκτών ορίων (επαναληψιμότητα %RSD<15, ακρίβεια %Er<15%). Προκειμένου να εκτιμηθεί το φαινόμενο υποστρώματος (matrix effect) οι καμπύλες μετά την εκχύλιση συγκρίθηκαν με καμπύλες προτύπων διαλυμάτων (M.O 95%).

Βιβλιογραφία

1. Bock C, Waldmann KH, Ternes W. Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a Cyclopiia genistoides (honeybush tea) extract. *Nutr Res.* 28(12):879-91.
2. Felgines C, Texier O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Régerat F, Rémésy C. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(6):G1148-54.



3. [Irakli MN](#), [Samanidou VF](#), [Biliaderis CG](#), [Papadoyannis IN](#). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. [J Sep Sci](#). 35(13):1603-11. doi: 10.1002/jssc.201200140.
4. [Kanaze FI](#), [Kokkalou E](#), [Georgarakis M](#), [Niopas I](#). Validated high-performance liquid chromatographic method utilizing solid-phase extraction for the simultaneous determination of naringenin and hesperetin in human plasma. [J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci](#). 801(2):363-7.
5. [Ma C](#), [Gao W](#), [Gao Y](#), [Man S](#), [Huang L](#), [Liu C](#). Identification of chemical constituents in extracts and rat plasma from Fructus Aurantii by UPLC-PDA-Q-TOF/MS. [Phytochem Anal](#). 22(2):112-8.
6. [Mullen W](#), [Archeveque MA](#), [Edwards CA](#), [Matsumoto H](#), [Crozier A](#). Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. [J Agric Food Chem](#). 56(23):11157-64.
7. [Saeidi I](#), [Hadjmohammadi MR](#), [Peyrovi M](#), [Iranshahi M](#), [Barfi B](#), [Babaei AB](#), [Dust AM](#). HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. [J Pharm Biomed Anal](#). 56(2):419-22.
8. [Ying X](#), [Lu X](#), [Sun X](#), [Li X](#), [Li F](#). Determination of vitexin-2"-O-rhamnoside in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. [Talanta](#). 72(4):1500-6.
9. [Zhu Y](#), [Tong L](#), [Zhou S](#), [Sun H](#), [Bi K](#), [Zhang B](#). Simultaneous determination of active flavonoids and alkaloids of Tang-Min-Ling-Pill in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. [J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci](#). 904:51-8.

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Α. Κομινάκης
Αν. Καθηγητής

Μ. Χαρισμάδου
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης
Ερευνητής

