

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

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 2^η : Ενσωμάτωση των ουσιών στο σιτηρέσιο των ζώων

Παραδοτέα: D2_P1

ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΠΟΥΛΠΑΣ ΣΕ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΙΝΗ



Ελήφθησαν 4 δείγματα πούλπας εσπεριδοειδών (P1-P4). Οι δύο πούλπες ήταν με τη μορφή νιφάδων (flakes) και δύο με τη μορφή συμπαγών κυλίνδρων (pellets).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εκχύλισης των υποστρωμάτων με διαφορετικές τεχνικές. Αυτές περιλάμβαναν:

1. Εκχύλιση με απλή ανάδευση
2. Εκχύλισης με reflux σε αντirroή
3. Εκχύλιση με συσκευή κεφαλής υπερήχων

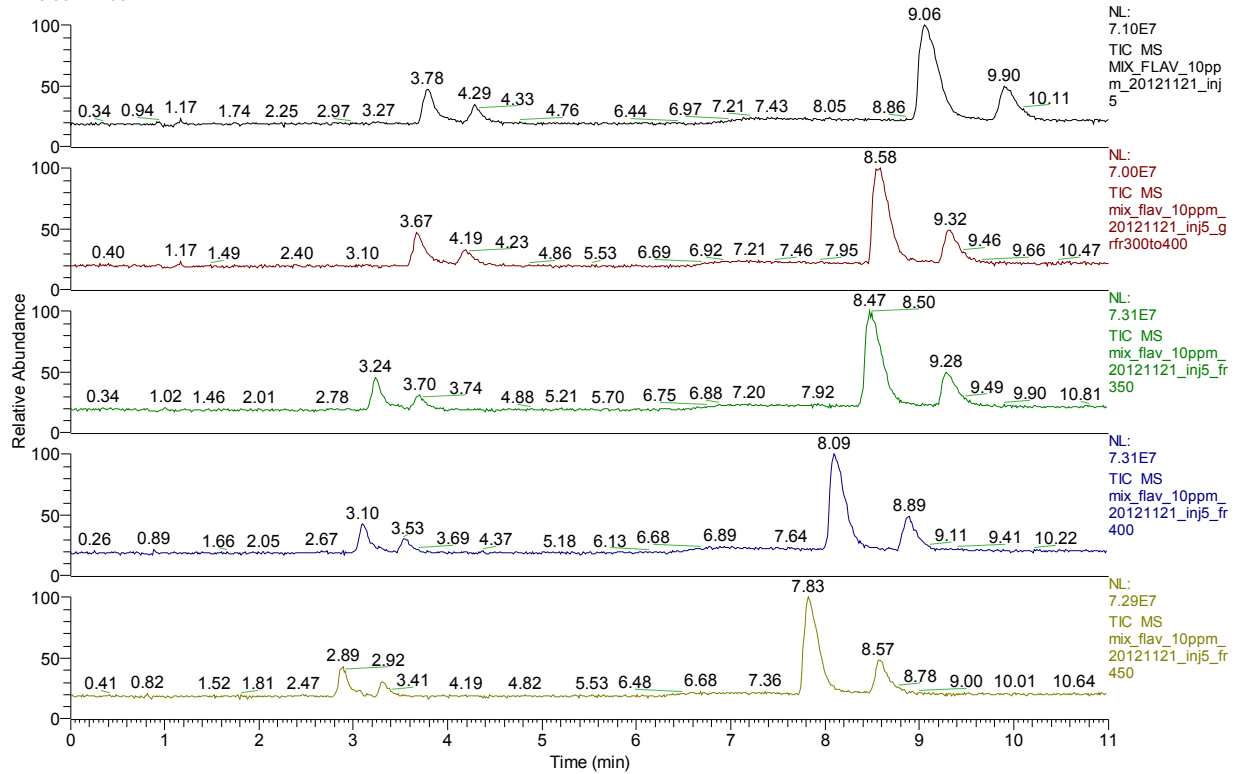
Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (α) νερό, (β) μεθανόλη και (γ) υδατική μεθανόλη 80:20 (v:v).

Συγκεκριμένα, η διαδικασία ξεκινά με τη λήψη 5g από κονιορτοποιημένη πούλπα. Δίδεται έμφαση στην ορθή δειγματοληψία για την ομοιογένεια του δείγματος ιδιαίτερα στην περίπτωση που η πούλπα είναι με τη μορφή ανομοιογενών νιφάδων.

Στα 5g προστίθενται 50mL διαλύτη. Τα εκχυλίσματα μετά από διήθηση τοποθετούνται σε περιστροφικό συμπυκνωτή μέχρι ξηρού. Ζύγιση του στερεού υπολείμματος δίνει την απόδοση της εκχύλισης.

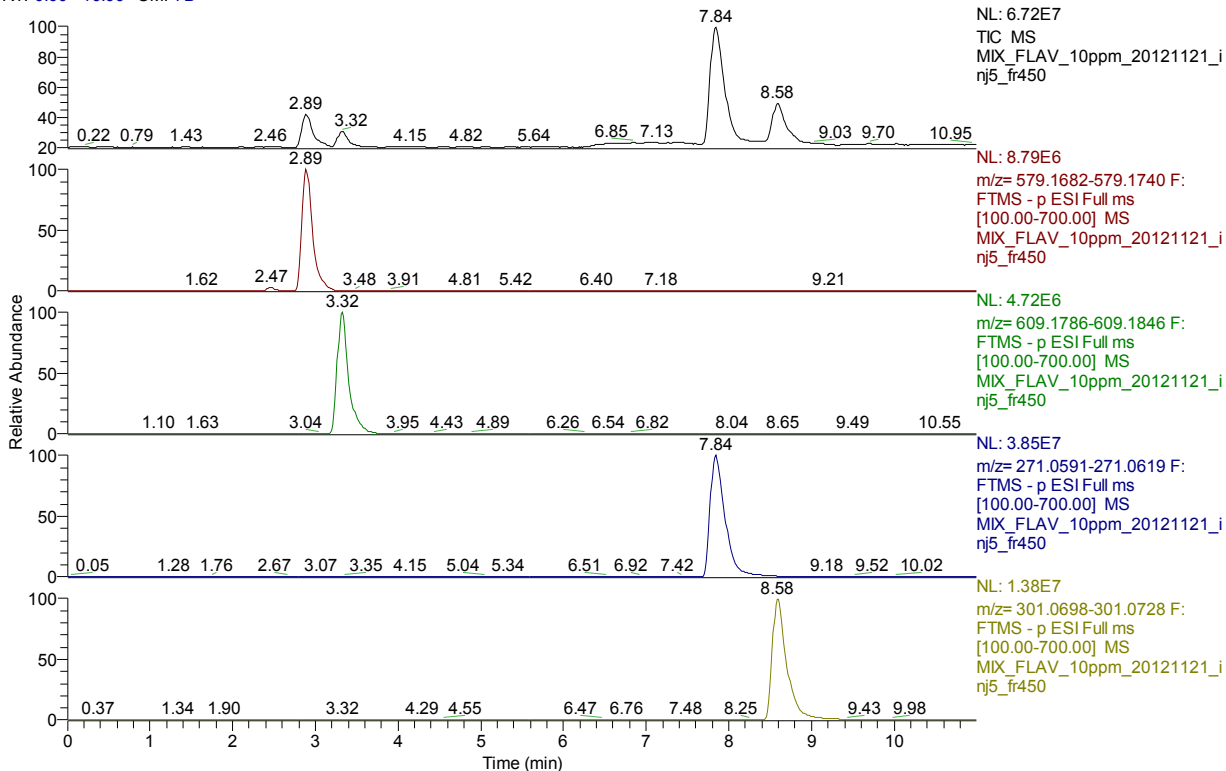
Παράλληλα, πρότυπες ουσίες της εσπεριδίνης, εσπεριτίνης, ναρινγίνης και ναρινγενίνης χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου σε φασματογράφο LC-MS (Orbitrap). Ενδεικτικά παρουσιάζονται ορισμένα από τα χρωματογραφήματα που κατάφεραν να διαχωρίσουν τις 4 ενώσεις σε χρόνο μικρότερο των 11 λεπτών (Σχήμα 1). Τα χαρακτηριστικά της επιλεγθείσας μεθόδου παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.

RT: 0.00 - 11.00

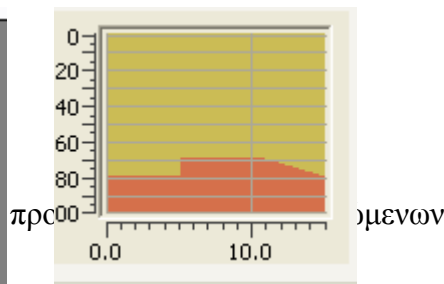


Σχήμα 1. Δοκιμαστικά χρωματογραφήματα μίγματος φλαβονοειδών σε συγκέντρωση 10ppm. Η επιλεχθείσα μέθοδος επιτυγχάνει το διαχωρισμό των τεσσάρων πρότυπων ενώσεων σε 10 λεπτά.

RT: 0.00 - 10.99 SM: 7B

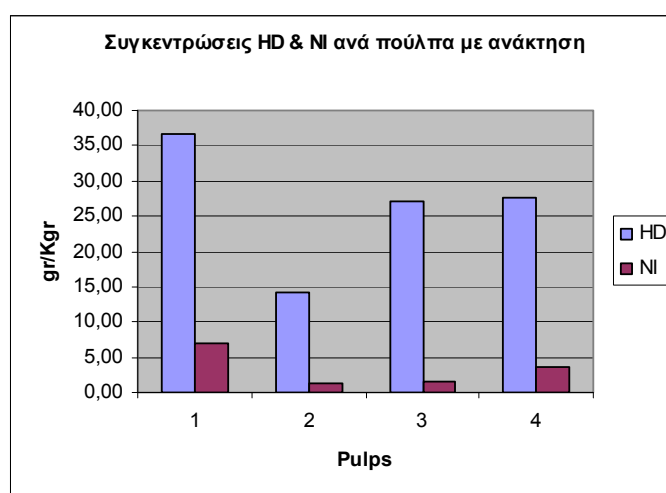


	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	P2
0	0.00	0.0	80.5	0.0	19.5	450.0	
1	5.00	0.0	80.5	0.0	19.5	450.0	
2	5.10	0.0	70.0	0.0	30.0	450.0	
3	11.00	0.0	70.0	0.0	30.0	450.0	
4	15.00	0.0	80.5	0.0	19.5	450.0	
Σ φ	5	100.0	0.0	0.0	0.0	450.0	



Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν καμπύλες αναφοράς αρχικά για τους γλυκοζίτες, δεδομένης της ύπαρξης των τελευταίων στα μελετώμενα υποστρώματα της πούλπας. Σύγκριση των τριών μεθόδων εκχύλισης κατέδειξε την εκχύλιση στους 80°C με κάθετο ψυκτήρα για μία ώρα, με χρήση μεθανόλης ως την πλέον κατάλληλη για την μεγαλύτερη ανάκτηση των υπό μελέτη φλαβονοειδών. Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίστηκε 53% για την εσπεριδίνη και 45% για τη ναρινγίνη. Με τη μέθοδο αυτή εκχυλίστηκαν και οι 4 πούλπες.

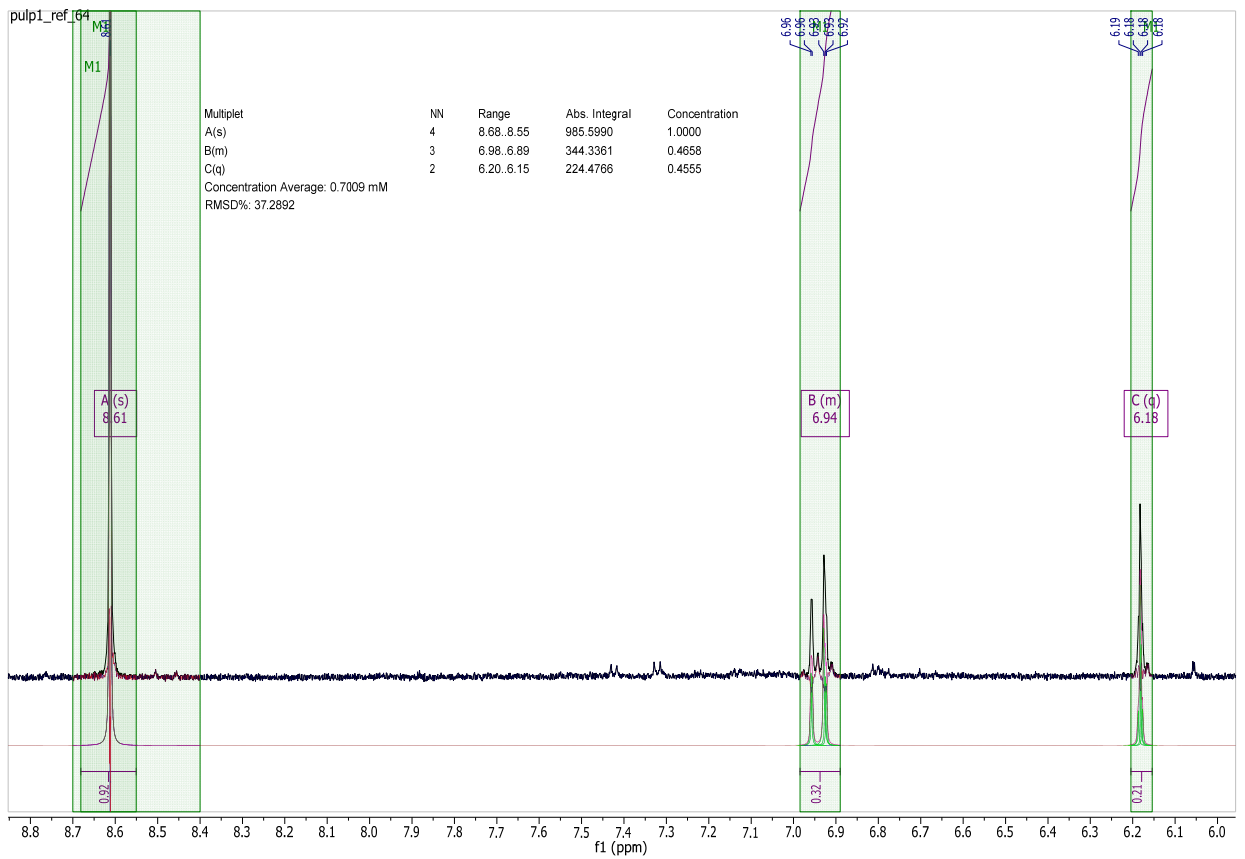
Παράλληλα επιχειρήθηκε ποσοτική μέθοδος ανίχνευσης των φλαβονοειδών και με χρήση φασματοσκοπίας NMR, προθέτοντας εσωτερικό πρότυπο πυραζίνης και χρησιμοποιώντας την ακολουθία ^1H και χρόνο εφησυχασμού 36sec (T1 για πρωτόνια πυραζίνης=7sec, RD=5T1). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



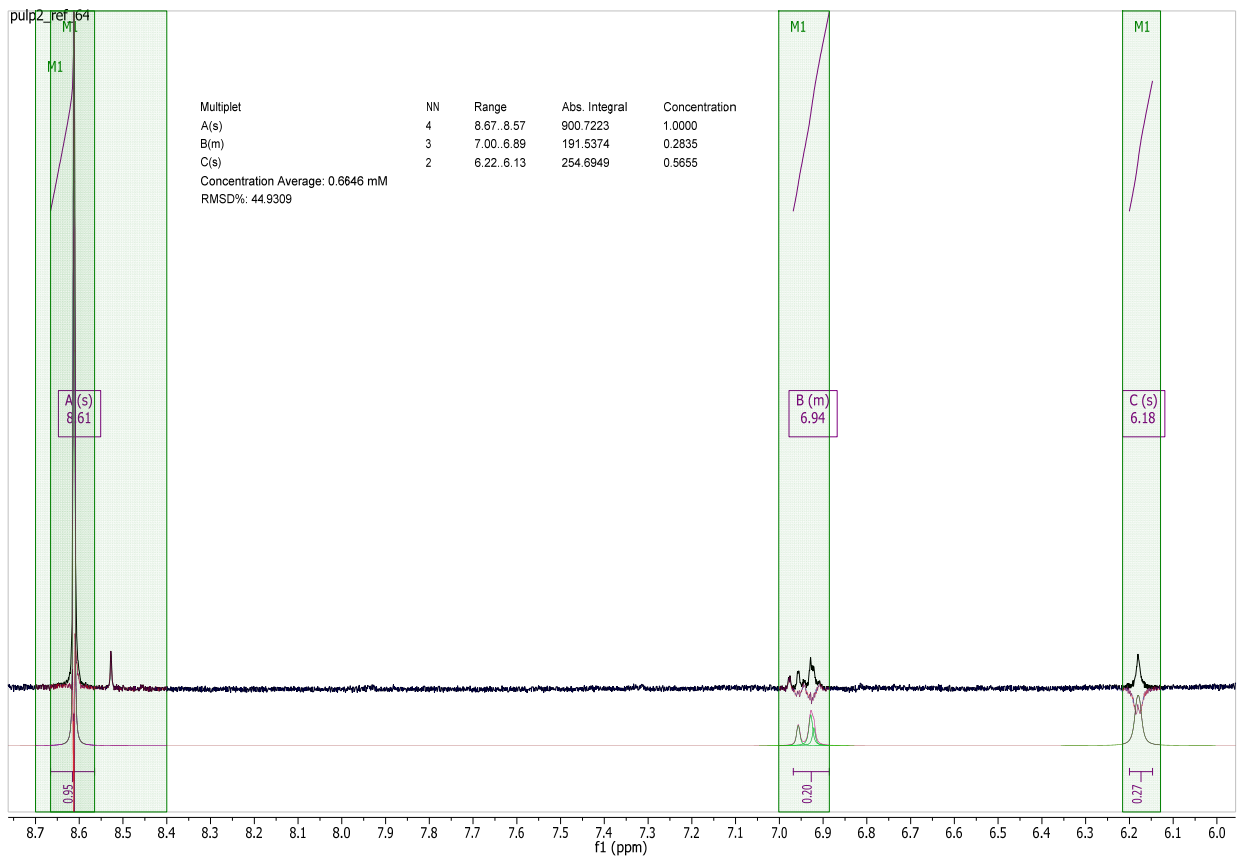
Διάγραμμα 1. Περιεκτικότητα διαφορετικών ειδών πούλπας σε εσπεριδίνη (HD) και ναρινγίνη (NI)

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με ολοκλήρωση των κορυφών με χρήση του λογισμικού MestReNova . Τα ληφθέντα φάσματα παρουσιάζονται στο παράρτημα.

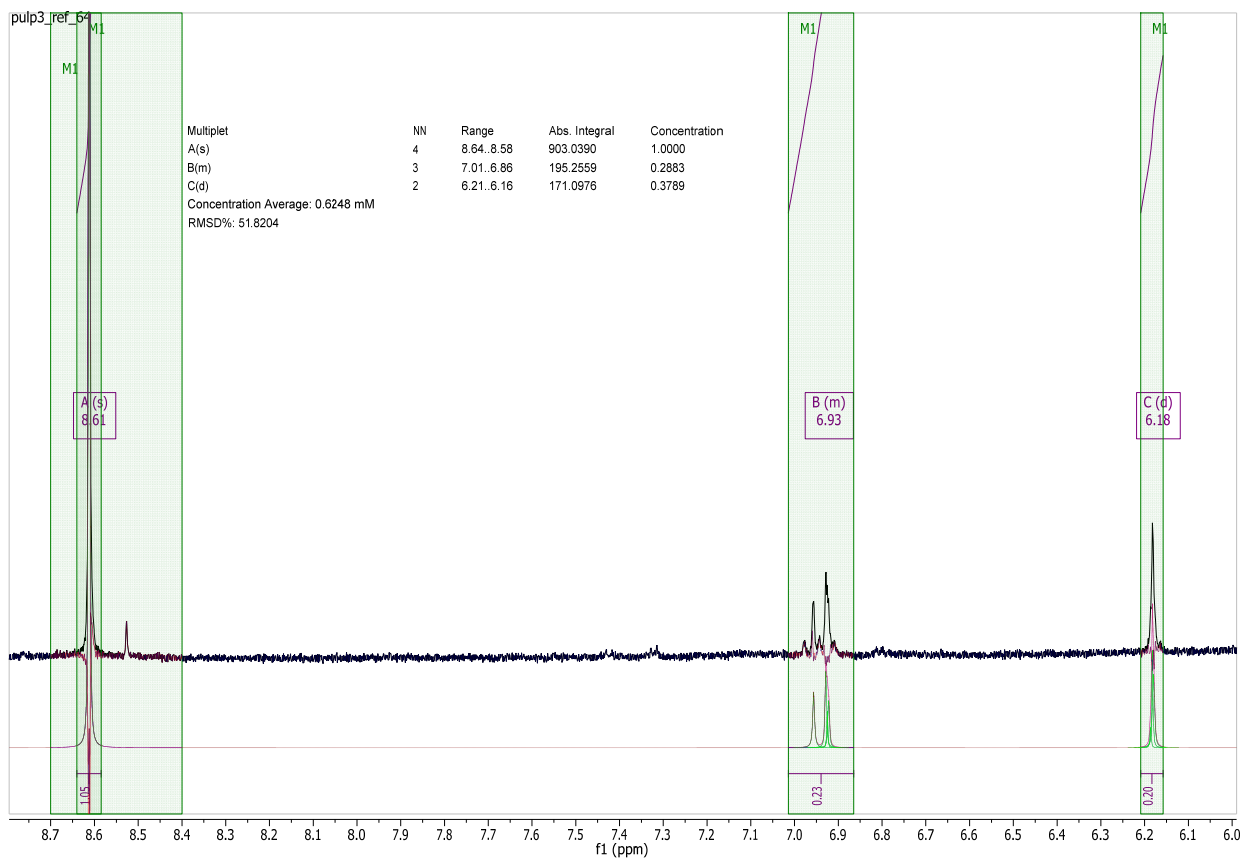
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



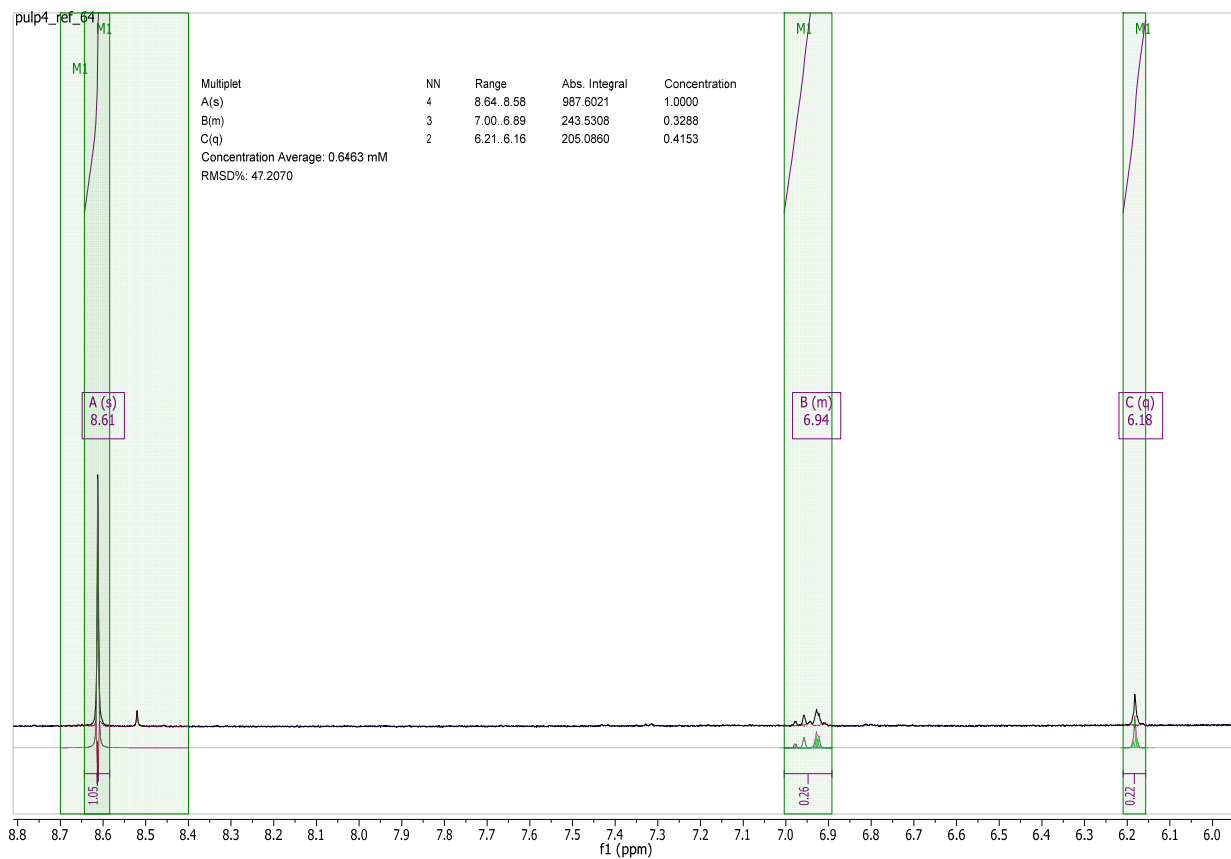
Φάσμα ^1H NMR από τον ποσοτικό υπολογισμό της συγκέντρωσης στην πούλπα 1.



Φάσμα ^1H NMR από τον ποσοτικό υπολογισμό της συγκέντρωσης στην πούλπα 2.



Φάσμα ^1H NMR από τον ποσοτικό υπολογισμό της συγκέντρωσης στην πούλπα 3.



Φάσμα ^1H NMR από τον ποσοτικό υπολογισμό της συγκέντρωσης στην πούλπα 4.

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Α. Κορινάκης
Αν. Καθηγητής

Μ. Χαρισμάδου
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης
Ερευνητής