



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΑ, ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ, ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ
ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ ΤΗΣ *PENAEUS KERATHURUS*.

ΛΙΝΤΙΤΑ ΚΟΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ
ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΑ, ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ, ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ ΤΗΣ *PENAEUS KERATHURUS*

ΛΙΝΤΙΤΑ ΚΟΡΑ

AM 102610

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σ. Μηνιάδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Σ. Μηνιάδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Μ. Κωμαΐτης, Καθηγητής Γεωπονικού Παν/μίου Αθηνών

Ν. Θωμαΐδης, επικ. Καθηγητής Τμ. Χημείας, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Σ. Μηνιάδου-Μειμάρογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Επιβλέπουσα**
- 2. Μ. Κωμαΐτης, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**
- 3. Ν. Θωμαΐδης, Επίκουρος Καθηγητής Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 4. Α. Σιαφάκα, Καθηγήτρια Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 5. Χ. Προεστός, Λέκτορας Τμ. Χημείας ΕΚΠΑ**
- 6. Β. Σινάνογλου, Λέκτορας ΤΕΙ Αθηνών**
- 7. Π. Ζουμπουλάκης, Ερευνητής Δ, Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 12.12.2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΑ, ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ, ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ ΤΗΣ *PENAEUS KERATHURUS*.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η γενική χημική σύσταση (λίπος, υγρασία, τέφρα, και πρωτεΐνες), η σύσταση των ολικών, πολικών και ουδετέρων λιπιδίων (χοληστερόλη και τριγλυκερίδια), η σύσταση των λιπαρών οξέων των ολικών, πολικών, καθώς και των επί μέρους τάξεων των κυριότερων πολικών λιπιδίων (PC και PE), στους μύες και κεφαλοθώρακες της γαρίδας *Peneaus kerathurus*. Η εργασία εστιάστηκε κυρίως στον προσδιορισμό και τη μελέτη της μοριακής δομής των φωσφολιπιδίων (PC, PE, Sph και LPC) και αρσενολιπιδίων, καθώς και τον προσδιορισμό των καροτενοειδών, τα οποία αποτελούν ενώσεις με σημαντικές βιολογικές δράσεις. Επίσης προσδιορίστηκαν μέταλλα και μεταλλοειδή όπως Fe, Cu, Zn, Mn, Se, Mg, Ni, Cr, Cd, As, Pb, Hg. Για αυτό το λόγο εφαρμόστηκε συνδυασμένη μεθοδολογία η οποία περιελάμβανε τεχνικές HPLC, LC-ESI-MS/MS, NMR, φασματομετρικές κ.α. Για την παραπάνω μελέτη επιλέχθηκαν γαρίδες του είδους *P. kerathurus* οι οποίες αποτελούν σημαντικό μέρος της μεσογειακής διατροφής και καταναλώνονται σε μεγαλύτερη κλίμακα από τα υπόλοιπα καρκινοειδή (αστακοί, караβίδες, καβούρια), ενώ αποτελεί και αντικείμενο ιχθυοκαλλιέργειας.

Το λίπος, η υγρασία, η τέφρα και οι πρωτεΐνες των μυών της *P. kerathurus* βρέθηκαν $0.6\pm 0.02\%$ επί του νωπού ιστού, $77.41\pm 0.27\%$, $1.93\pm 0.34\%$ και $19.20\pm 0.49\%$ αντίστοιχα και των κεφαλοθωράκων $1.43\pm 0.04\%$ επί του νωπού ιστού, $39.00\pm 0.18\%$, και $12.02\pm 0.15\%$ αντίστοιχα (δεν έγινε προσδιορισμός πρωτεϊνών).

Τα πολικά λιπίδια βρέθηκαν ότι αποτελούσαν το $68.02\pm 0.51\%$ των ολικών λιπιδίων των μυών της *P. kerathurus* ενώ μόνο το $46.5\pm 0.7\%$ των κεφαλοθωράκων. Επίσης βρέθηκε ότι τα πολικά λιπίδια των μυών και των κεφαλοθωράκων αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια ($> 94\%$ των πολικών λιπιδίων).

Η μελέτη της σύστασης των επιμέρους τάξεων των πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων έδειξε ότι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) αποτελεί το κύριο φωσφολιπίδιο (55.6% και 46.4% αντίστοιχα) ενώ ακολουθεί η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) (29.3% και 25.7% αντίστοιχα). Η σφιγγομυελίνη (Sph), η καρδιολιπίνη (CL), η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (LPC), η

φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI) προσδιορίστηκαν σε μικρότερα ποσοστά.

Στα ουδέτερα λιπίδια των μυών βρέθηκε ότι οι στερόλες αποτελούσαν το κύριο συστατικό (84.9 % των ολικών ουδετέρων λιπιδίων) ενώ στα ουδέτερα λιπίδια των κεφαλοθωράκων, το κύριο συστατικό ήταν τα τριγλυκερίδια (67.2 % των ολικών ουδετέρων λιπιδίων).

Από την μελέτη της σύστασης των λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων βρέθηκε ότι τα κυριότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα στους μύες και κεφαλοθώρακες ήταν το C16:0 (παλμιτικό) σε ποσότητες 127.24 ± 2.77 και 343.78 ± 12.71 mg/100g νωπού ιστού αντίστοιχα, και το C18:0 (στεατικό) σε ποσότητες 62.99 ± 1.52 και 128.85 ± 8.20 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα, τα κύρια μονοακόρεστα το C16:1 ω-9 cis (παλμιτελαϊκό) σε ποσότητες 54.05 ± 0.33 και 103.29 ± 4.06 mg /100 g νωπού ιστού αντίστοιχα και το C18:1 ω-9 cis (ελαϊκό) σε ποσότητες 106.97 ± 2.47 και 188.7 ± 17.83 mg/100g νωπού ιστού αντίστοιχα. Στα κύρια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βρέθηκε το C20:5 ω-3 cis (EPA) σε ποσότητες 166.87 ± 2.57 και 214.49 ± 20.36 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα όπως και το C22:6 ω-3 cis (DHA) σε ποσότητες 125.31 ± 1.67 και 208.62 ± 30.27 mg/100g νωπού ιστού αντίστοιχα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι μύες και οι κεφαλοθώρακες ήταν πλουσιότεροι σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδιαίτερος σε ω-3 (EPA και DHA) έναντι των μονοακόρεστων. Όσο αφορά τον προσδιορισμό των περιεχόμενων λιπαρών οξέων στα πολικά λιπίδια και σε επιμέρους τάξεις φωσφολιπιδίων, το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus* ήταν παρόμοιο, ενώ το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων PC και PE των μυών της γαρίδας ήταν μεγαλύτερο από αυτό των κεφαλοθωράκων. Το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών καθώς και των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων PC και PE βρέθηκε μεγαλύτερο συγκριτικά με αυτό στα αντίστοιχα κλάσματα των κεφαλοθωράκων. Η αναλογία ω-3/ω-6 βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερη στα πολικά λιπίδια, στην φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) των μυών (2.49 ± 0.005 , 1.66 ± 0.02 και 1.76 ± 0.05) συγκριτικά με την ίδια αναλογία στους κεφαλοθώρακες. Ο λόγος EPA/DHA βρέθηκε μεγαλύτερος της μονάδας στην φωσφατιδυλοχολίνη (3.52 ± 0.002) και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (2.74 ± 0.01) τόσο των μυών όσο και των

κεφαλοθωράκων. Για την ταυτοποίηση της μοριακής δομής των φωσφολιπιδίων και αρσενολιπιδίων, στα ολικά λιπίδια (χλωροφορμική φάση από Bligh-Dyer) των μυών και κεφαλοθωράκων της μελετούμενης γαρίδας τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια) απομονώθηκαν από τα ολικά λιπίδια των μυών και κεφαλοθωράκων (χωριστά) της γαρίδας *P. kerathurus* με την τεχνική Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE), προσδιορίστηκε η αναλογία πολικών και ουδετέρων, ακολούθησε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των επιμέρους λιπιδικών τάξεων και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα μοριακά είδη φωσφολιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας με παρασκευαστική TLC, αναλύθηκαν πρώτα:

- Ως αμιγή μοριακά είδη με ηλεκτροψεκασμό θετικών ιόντων σε σειρά με φασματομετρία μαζών (ESI-MS/MS) όπου ταυτοποιήθηκαν αλκυλο-ακυλο-, αλκενυλο-ακυλο- και διακυλο-παράγωγα. Ανιχνεύθηκαν ως κύριο πρόδρομο ιόν το θετικό ψευδο-μοριακό ιόν $[M+H^+]$ και ως παραγόμενο ιόν του, το βασικό ιόν της κεφαλής-ομάδας (π.χ φωσφοχολίνη σε τιμή m/z 184) καθώς και κορυφές με τιμές m/z που αντιστοιχούν σε ιόντα λιπαρών οξέων $[RCOO^-]$.
- Ως υδρολυμένα μόρια (μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση), με την εφαρμογή της τεχνικής LC-MS/MS με παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) για τον προσδιορισμό ενώσεων του αρσενικού όπως: DMA, AC (αρσενοχολίνη), οξο- και θειο- αρσενοσάκχαρα.

Επίσης για την ποιοτική ανάλυση καθώς και για τον προσδιορισμό της μοριακής δομής των πολικών λιπιδίων (φωσφολιπιδίων), των κυριότερων ενώσεων τους, φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), καθώς και της σφιγγομυελίνης (SPH) και λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) εφαρμόστηκε και φασματοσκοπία NMR. Με την τεχνική αυτή μελετήθηκαν τα φάσματα 1H και ^{31}P για την κάθε ένωση χωριστά. Η ταυτοποίηση των κορυφών στα φάσματα πρωτονίου των δειγμάτων (PC και PE) έγινε σε σύγκριση με τα φάσματα πρωτονίου προτύπων ουσιών της PC, PE, SPH, LPC, καθώς και τα δισδιάστατα πειράματα gCOSY (ομοπυρηνικό πείραμα συσχέτισης πυρήνων υδρογόνου μέσω δεσμού) και HSQC (ετεροπυρηνικό πείραμα συσχέτισης πυρήνων υδρογόνου με τους πυρήνες των ανθράκων που είναι άμεσα συνδεδεμένοι). Επίσης, με χρήση τεχνικών δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR (COSY, HSQC, HMBC) επιβεβαιώθηκε η παρουσία πλασμαλογόνων (αλκυλο-1-ενυλο ether) στο κλάσμα των πολικών λιπιδίων, ταυτοποιώντας τα χαρακτηριστικά πρωτόνια του διπλού δεσμού (O-CH=CH-).

Από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των καροτενοειδών βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα των ολικών καροτενοειδών στους μύες της *P. kerathurus* (3.33 ± 0.07 mg/g ολικών λιπιδίων) ήταν μικρότερη από την περιεκτικότητά τους στους κεφαλοθώρακες (9.30 ± 0.10 mg/g ολικών λιπιδίων). Όσο αφορά την σύσταση των καροτενοειδών που προσδιορίστηκαν στο λίπος των μυών και των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus* (Πίνακας 10.1.2) φαίνεται ότι η κανθαξανθίνη είναι το κύριο συστατικό τόσο στους μύες (0.73 ± 0.03 mg/100g νωπού ιστού) όσο και στους κεφαλοθώρακες (4.12 ± 0.07 mg/100g νωπού ιστού). Ακολουθούν η ζεαξανθίνη (0.52 ± 0.03 mg/100 g νωπού ιστού), η ελεύθερη ασταξανθίνη (0.42 ± 0.02 mg/100 g νωπού ιστού) και η *all-trans*-λουτεΐνη (0.32 ± 0.02 mg/100 g νωπού ιστού) στους μύες καθώς και η ελεύθερη ασταξανθίνη (2.70 ± 0.05 mg/100g νωπού ιστού), η *all-trans*-λουτεΐνη (2.65 ± 0.05 mg/g νωπού ιστού) και η ζεαξανθίνη (2.29 ± 0.06 mg/100 g νωπού ιστού) στους κεφαλοθώρακες (Σχήμα 10.1.1). Σε μικρότερες ποσότητες προσδιορίστηκαν μονοεστέρες και διεστέρες της ασταξανθίνης στους μύες και κεφαλοθώρακες, ενώ η κρυπτοξανθίνη ανιχνεύθηκε μόνο στους κεφαλοθώρακες.

Τέλος, σε λυοφυλιωμένα δείγματα των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας προσδιορίστηκαν μέταλλα σε μg/g ξηρού ιστού (Fe $33,2 \pm 0,2$ και $98,33 \pm 0,1$ μg/g ξηρού ιστού, Cu $13,08 \pm 0,02$ και $120,68 \pm 0,02$ μg/g ξηρού ιστού, Zn $110,38 \pm 0,09$ και $142,15 \pm 0,09$ μg/g ξηρού ιστού, Mn $0,21 \pm 0,1$ και $1,18 \pm 0,1$ μg/g ξηρού ιστού, Mg $1795 \pm 3,1$ και $3157 \pm 3,1$ μg/g ξηρού ιστού, Ni $0,03 \pm 0,02$ και $0,17 \pm 0,02$, Cd $0,025 \pm 0,01$ και $0,46 \pm 0,01$, Pb $1,57 \pm 0,1$ και $1,65 \pm 0,1$ μg/g ξηρού ιστού αντίστοιχα, και μεταλλοειδή (Se $0,27 \pm 0,4$ και $0,068 \pm 0,4$ μg/g ξηρού ιστού, As $35,05 \pm 0,2$ και $27,4 \pm 0,2$ μg/g ξηρού ιστού), με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης. Σε κανέναν από τους δυο ιστούς δεν προσδιορίστηκε Cr. Hg ($0,068 \pm 3,1$ μg/g ξηρού ιστού) προσδιορίστηκε μόνο στους κεφαλοθώρακες.

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν τις γαρίδες ως τρόφιμο με σύσταση ανερχόμενου ενδιαφέροντος, δεδομένης της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε φωσφολιπίδια, ξανθοφύλλες και πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα, όπως και ως σημαντική πηγή αρσενολιπιδίων και αρσενοσακχάρων, τα οποία αποτελούν ενώσεις με σημαντικές βιολογικές δράσεις.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: γαρίδα, φωσφολιπίδια, αρσενολιπίδια, καροτενοειδή, μέταλλα, μεταλλοειδή, NMR, LC-MS/MS, ΦΑΑ.

ABSTRACT

ARSENOLIPIDS, PHOSPHOLIPIDS, CAROTENOIDS AND METALS OF *PENAEUS KERATHURUS*

In the present research work chemical composition (fat, moisture, ash and proteins), lipid composition (of total lipid, polar lipids and neutral lipids including cholesterol and triglycerides) as well as fatty acid composition (of total lipids, polar lipids and of individual classes PE, PC) of the muscle and cephalothorax of shrimp *Peneaeus kerathurus* were studied. The objective of this work was the determination and the study of molecular structures of phospholipids (PC, PE, Sph and LPC) and arsenolipids as well as the determination of carotenoids which are known for their important biological activity. Moreover, metals and metalloids such as: Fe, Cu, Zn, Mn, Se, Mg, Ni, Cr, Cd, As, Pb and Hg were analyzed. In order to achieve the experimental research work as above mentioned, the combination of methodology was applied including HPLC, LC-ESI-MS/MS, NMR, spectroscopy techniques etc.

P. kerathurus is the most popular shrimp among the other species of shrimps and represent a substantial part of the Mediterranean diet, is consumed in larger quantities than other edible decapod crustaceans such as prawn, lobster or crab and is subject of aquaculture.

The percentage of fat, humidity, ash and protein of the muscle tissue of *P. kerathurus* was $0.6\pm 0.02\%$ of wet tissue, $77.41\pm 0.27\%$, $1.93\pm 0.34\%$ and $19.20\pm 0.49\%$ respectively while that of cephalothorax tissue was $1.43\pm 0.04\%$ of wet tissue $39.00\pm 0.18\%$ and $12.02\pm 0.15\%$ respectively (protein was not determined).

The polar lipids proportion in muscle and cephalothorax total lipids was found to be $68.02\pm 0.51\%$ and $46.5\pm 0.7\%$ respectively, and they had phospholipids as the major component (>94 % of PL).

According to the study of composition of individual classes of muscle and cephalothorax phospholipids was found that PC was the major phospholipids (55.6% and 46.4% respectively) followed by PE (29.3% and 25.7% respectively), while Sph, CL, LPC, PS and PI were determined as minor components.

Sterols were the major component of muscle neutral lipids (84,9 % of total neutral lipids) while triacylglycerols were the dominant component of cephalothorax neutral lipids (67.2 % of total neutral lipids).

The fatty acids profile of muscle and cephalothorax total lipids did not differ significantly. So, C16:0 (127.24 ± 2.77 and 343.78 ± 12.71 mg/100g of wet tissue), C18:0 (62.99 ± 1.52 and 128.85 ± 8.20 mg/100g of wet tissue), C16:1 ω -9 cis (54.05 ± 0.33 και 103.29 ± 4.06 mg /100g of wet tissue) and C18:1 ω -9 cis (106.97 ± 2.47 and 188.7 ± 17.83 mg/100 g of wet tissue) were the main fatty acids. The contents of PUFA, the essential fatty acids were C20:5 ω -3 cis (EPA) (166.87 ± 2.57 and 214.49 ± 20.36 mg/100 g of wet tissue respectively) and C22:6 ω -3 cis (DHA) (125.31 ± 1.67 and 208.62 ± 30.27 mg/100 g of wet tissue respectively).

According to the above-cited results, muscle and cephalothorax lipids contain higher levels of PUFA, mainly ω -3 fatty acids (EPA και DHA) then MUFA.

Furthermore, the fatty acid profile of muscle and cephalothorax polar lipids were studied. The contents of SFA was the same, while the content of SFA of individual phospholipid classes (PE, PC) was higher in muscle then cephalothorax. The contents of PUFA of polar lipids and individual phospholipids (PE, PC) was higher in muscle then cephalothorax. The ratio ω -3/ ω -6 of polar lipids, PC and PE was higher in muscle (2.49 ± 0.005 , 1.66 ± 0.02 and 1.76 ± 0.05) in comparison with that of cephalothorax.

The ratio EPA/DHA of PC (3.52 ± 0.002) and PE (2.74 ± 0.01) was higher of unit in muscle as well as cephalothorax.

In order to study and identify the molecular structures of phospholipids and arsenolipids, total lipids (of chloroform layer from Bligh-Dyer) of muscle and cephalothorax were separated into neutral and polar lipids by SPE (solid phase extraction) and the ratio between polar lipids and neutral lipids was determined. After that, the qualitative and quantitative analysis of individual lipid classes was performed. Furthermore, molecular species of muscle and cephalothorax phospholipids of shrimp were isolated by preparative TLC in order to analyze and identify:

- the molecular structure (diacyl, alkyl-acyl and alkyl-enyl-acyl derivates) of intact phospholipids in positive ion mode LC- ESI-MS/MS (electrospray ionization tandem Mass Spectrometry). Precursor ion scanning for m/z 184

selectively detected only $[M+H^+]$ ions for choline -containing phospholipids and (the polar choline phosphate head group show a fragment at m/z 184) and fragments at m/z 281, 283 [this signals correspond to $(RCOO^-)$ ions].

- the molecular structure of individual phospholipids after their hydrolysis (mild alkaline and acid hydrolysis). LC-ESI-MS/MS in the selected reaction monitoring (SRM) mode was used for the detection of organoarsenic species such as: DMA, AC (arsenocholine), oxo - arsenosugars.

In order to identify and determine the molecular structure of polar lipids (phospholipids), their main compounds, phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), as well as Sph and LPC, High Resolution NMR spectroscopy was used. 1H and ^{31}P NMR was used for the identification of specific lipid classes. 2D COSY and HSQC techniques as well as 1H spectra of standards (PC and PE) were used to elucidate the characteristic peaks of individual phospholipids.

Two dimensional NMR spectroscopy (COSY, HSQC, HMBC) was applied for the identification of plasmalogens (alk-1-enyl glyceryl ethers) in polar lipids. Distinctive signals corresponding to the protons of double bond ($O-CH=CH-$) near the vinyl ether group were shown to be the most useful in the qualitative analysis of plasmalogens.

The qualitative and quantitative analysis of carotenoid pigments was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Carotenoid content of *P. kerathurus* muscle (3.33 ± 0.07 g/100 g of total lipids) was lower than in cephalothorax (9.30 ± 0.10 g/ 100 g of total lipids). The carotenoid profile and content of *Penaeus kerathurus* muscle and cephalothorax lipids, is given in Table 10.1.2. The major carotenoid was found canthaxanthin in both muscle (0.73 ± 0.03 mg/100g of wet tissue) and cephalothorax (4.12 ± 0.07 mg/100 g of wet tissue), followed by zeaxanthin (0.52 ± 0.03 mg/100 g of wet tissue), free astaxanthin (0.42 ± 0.02 mg/100 g of wet tissue) and *all-trans* lutein (0.32 ± 0.02 mg/100 g of wet tissue) in muscle, while free astaxanthin (2.70 ± 0.05 mg/100 g of wet tissue), *all-trans* lutein (2.65 ± 0.05 mg/g of wet tissue) and zeaxanthin (2.29 ± 0.06 mg/100g of wet tissue) were found in cephalothorax (Figure 10.1.1). Furthermore, lesser amount mono ester and diester of astaxanthin were also determined in both tissues, while cryptoxanthin was detected only in cephalothorax.

Finally, concentrations of metals and metalloids in samples of muscle and cephalothorax of shrimp were measured (Fe $33,2\pm 0,2$ and $98,33\pm 0,1$ μ g/g dry tissue,

Cu $13,08 \pm 0,02$ and $120,68 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, Zn $110,38 \pm 0,09$ and $142,15 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, Mn $0,21 \pm 0,1$ and $1,18 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, Mg $1795 \pm 3,1$ and $3157 \pm 3,1$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, Ni $0,03 \pm 0,02$ and $0,17 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, Cd $0,025 \pm 0,01$ and $0,46 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, Pb $1,57 \pm 0,1$ and $1,65 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, and metalloids (Se $0,27 \pm 0,4$ and $0,068 \pm 0,4$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue, As $35,05 \pm 0,2$ and $27,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue), by Atomic Absorption Spectrometry. Cr was not detected in both tissues, while Hg was found only in cephalothorax ($0,068 \pm 3,1$ $\mu\text{g/g}$ dry tissue).

As shrimps consist of protein, phospholipids carotenoids, metals and polyunsaturated fatty acids ω -3, they present high nutritional value and are estimated as a source of arsenolipids and arsenosugars with important biological activity.

KEYWORDS: shrimp, phospholipids, arsenolipids, PC, PE.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο 2007-2011. Την Επιβλέπουσα, Δρ. Σοφία Μηνιάδου-Μειμάρογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ'όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Εκφράζω επίσης θερμές ευχαριστίες στο Δρ. Μ. Κωμαΐτη, Καθηγητή της Χημείας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις χρήσιμες υποδείξεις του ως μέλους της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής,

Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Νίκο Θωμαΐδη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, για την καθοδήγηση και διαρκή βοήθειά του, χωρίς την οποία δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σημαντικό μέρος της Δ.Δ., καθώς και το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας για τη διάθεση των οργάνων του εργαστηρίου του για τον προσδιορισμό αρσενολιπιδίων και μετάλλων.

Ευχαριστώ επίσης θερμά το Δρ. Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Ερευνητή Δ του Εργαστηρίου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Ε.Ι.Ε, για την άριστη συνεργασία και την υποστήριξή του για την λήψη των φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ πολύ την κ. Ε. Στρατή, εργαστηριακό συνεργάτη του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών και μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Εργαστηρίου Τροφίμων των Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ για την άριστη συνεργασία στον προσδιορισμό των χρωστικών.

Επίσης ευχαριστώ το Δρ. Σπύρο Περγαντή, Καθηγητή του Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη χορήγηση του προτύπου Kelp Powder και για τη σημαντική συνεργασία του και τη Δρ. Θεσσαλού Λεγάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας, για τις σημαντικές πληροφορίες που μου έδωσε για τον οργανισμό ο οποίος αποτέλεσε αντικείμενο αυτής της Δ.Δ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ Βασιλεία Σινάνογλου, Λέκτορα του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης, καθώς και για την αποφασιστική συμβολή της στη συγγραφή της Δ.Δ.

Ευχαριστώ πολύ όλο το προσωπικό και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων και Βιοχημείας για το πολύ καλό κλίμα καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Δ.Δ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους, την υποστήριξη και κατανόηση καθ'όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Λιντίτα Κόρα

Αθήνα, 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Γενικές πληροφορίες για την γαρίδα <i>P. kerathurus</i>	1
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	4
1.1	Λιπίδια.....	4
1.2	Φωσφολιπίδια.....	5
1.2.1	Φωσφογλυκερίδια.....	5
1.2.2	Σφιγγοφωσφολιπίδια.....	11
1.3	Ταυτοποίηση φωσφολιπιδίων	12
1.4	Φασματομετρία μαζών φωσφολιπιδίων.....	16
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	18
2.1	Ενώσεις του αρσενικού.....	18
2.2	Ενώσεις του αρσενικού σε θαλάσσιους οργανισμούς.....	25
2.3	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	29
2.3.1	Μέθοδοι διαχωρισμού και ταυτοποίησης των ενώσεων του αρσενικού.....	29
2.3.2	Φασματομετρία μαζών.....	30
2.3.3	HPLC-ES-MS/MS με SRM.....	32
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	34
3.1	Καροτενοειδή.....	34
3.1.1	Κετοκαροτενοειδή.....	35

3.1.2	Ασταξανθίνη.....	35
3.2	Ανασκόπηση μελετών των καροτενοειδών σε καρκινοειδή.....	38
3.3	Ο ρόλος των καροτενοειδών.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4		
	Μέταλλα.....	41
4.1	Απαραίτητα μέταλλα για τον ανθρώπινο οργανισμό.....	41
4.2	Τοξικά μέταλλα για τον ανθρώπινο οργανισμό.....	46
4.3	Μέταλλα στους θαλάσσιους οργανισμούς.....	48
4.4	Μέγιστες τιμές ανοχής (MRL) των τοξικών μετάλλων στα καρκινοειδή	49
	ΣΚΟΠΟΣ.....	50
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	51
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	52
5.a	Συλλογή και επεξεργασία γαρίδων P.kerathurus.....	52
5.1	Εκχύλιση λιπιδίων κατά Bligh-Dyer.....	53
5.2	Λυοφυλίωση-Προσδιορισμός Υγρασίας.....	53
5.3	Προσδιορισμός τέφρας.....	54
5.4	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Kjeldahl.....	55
5.5	Προσδιορισμός μετάλλων.....	56
5.5.1	Υγρή χώνευση.....	56
5.5.2	Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης.....	57
5.6	Σταθμικός προσδιορισμός λιπιδίων.....	58
5.7	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.....	59

5.7.1	Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPTLC).....	59
5.7.2	Μονοδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPTLC)	59
5.7.3	Εμφάνιση χρωματογραφήματος.....	59
5.8	Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου.....	60
5.9	Εκχύλιση στερεάς φάσης λιπιδίων.....	62
5.10	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).....	63
5.11	Iatroscan (TLC / FID)	65
5.11.1	Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση λιπιδίων.....	65
5.12	Προσδιορισμός καρροτενοειδών με HPLC.....	69
5.13	Αεριοχρωματογραφία λιπαρών οξέων (αερίου - υγρού) GLC.....	70
5.13.1	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων..	70
5.14	ΧΗΜΙΚΕΣ ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ.....	70
5.14.1	Ήπια αλκαλική υδρόλυση λιποειδών	70
5.14.2	Μερική όξινη υδρόλυση.....	71
5.15	Φασματοσκοπία NMR.....	71
5.15.1	Βασικές έννοιες φασματοσκοπίας.....	72
5.15.2	Είδη φασμάτων NMR.....	72
5.15.2.A	Φάσματα μίας διάστασης.....	72
5.15.2.B	Φάσματα δυο διαστάσεων.....	73
5.15.3	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ³¹ P NMR	74
5.15.4	Ταυτοποίηση φωσφολιπιδίων με Φασματοσκοπία NMR	74
5.16	Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem MS).....	76
5.16.1	Τεχνική πλήρης σάρωσης.....	77

5.16.2	Τεχνική σάρωσης προϊόντων ιόντων.....	77
5.16.3	Τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος	78
5.16.4	Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης αντιδράσεων θραυσματοποίησης.....	78
5.16.5	LC-ES-MS/MS φωσφολιπιδίων και ενώσεων του αρσενικού	78
	A) Επιλεκτική παρακολούθηση αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring, SRM)	79
	B) Πλήρης σάρωση των επιμέρους ενώσεων φωσφολιπιδίων (Full Scan).....	84
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	88
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	90
6.1	Γενική χημική σύσταση.....	90
6.1.1	Προσδιορισμός υγρασίας, ολικής πρωτεΐνης και τέφρας	90
6.2	Απομόνωση των ολικών λιπιδίων της γαρίδας <i>P. kerathurus</i>	92
6.2.1	Διαχωρισμός των ολικών λιπιδίων σε ουδέτερα και πολικά με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).	92
6.3	Προσδιορισμός ολικών, πολικών, ουδέτερων λιπιδίων και των επιμέρους ενώσεων τους με Iatroscan (TLC/ FID)	94
6.4	Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των ολικών και πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας <i>P. kerathurus</i>	95
6.5	Διαχωρισμός και απομόνωση των επί μέρους τάξεων φωσφολιπιδίων από τα κλάσμα των ολικών λιπιδίων με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	104
6.5.1	Προσδιορισμός φωσφόρου.....	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1	Ταυτοποίηση δομής προτύπου και δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) με NMR.....	111
7.2	Ταυτοποίηση δομής προτύπου και δείγματος της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης με NMR	120
7.3	¹ H NMR των πολικών λιπιδίων που απομονώθηκαν με την τεχνική SPE.....	126
7.4	Αξιολόγηση αποτελεσμάτων NMR.....	135

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

	LC-ESI-MS/M με SRM των φωσφολιπιδίων της <i>P.kerathurus</i>	138
8.1	Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PC των κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση.....	138
8.1.1	Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού της PC των κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.....	139
8.1.2	Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PC των κεφαλοθωράκων μετά από μερική όξινη υδρόλυση.....	139
8.2	Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PE μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM).	140
8.2.1	Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PE μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.....	140
8.2.2	Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PE μετά από μερική όξινη υδρόλυση.....	141
8.3	Ταυτοποίηση μοριακών ειδών της LPC μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική	

	Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM).....	142
8.3.1	Ταυτοποίηση ενώσεων της LPC κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.....	143
8.3.2	Ταυτοποίηση ενώσεων της LPC κεφαλοθωράκων και μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.....	144
8.4	Ταυτοποίηση μοριακών ειδών της Sph (μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM).....	146
8.4.1	Ταυτοποίηση ενώσεων της Sph των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.....	146
8.4.2	Ταυτοποίηση ενώσεων της Sph των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.....	147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

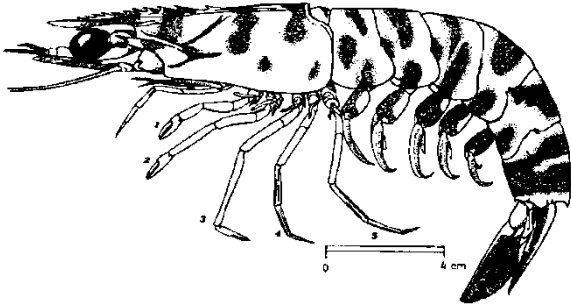
	Μελέτη μοριακών δομών φωσφολιπιδίων και αρσενολιπιδίων της γαρίδας <i>P. kerathurus</i> με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική πλήρης σάρωσης πρόδρομου ιόντος.	152
9.1	Μελέτη μοριακών δομών της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας <i>P. Kerathurus</i> με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 184.....	152
9.2	Μελέτη μοριακών δομών της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων και μυών με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 218.....	158
9.3	Μελέτη μοριακών δομών της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας <i>P. kerathurus</i> με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 245.....	163

9.4	Μελέτη μοριακών δομών των αρσενόσακχάρων στο κλάσμα της φωσφατιδυλογολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας <i>P. kerathurus</i> με LC-ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 483.....	167
9.5	Μελέτη μοριακών δομών της σφιγγομυελίνης των μυών της γαρίδας <i>P. kerathurus</i> με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική πλήρους σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 245.....	171
 Κεφάλαιο 10		
10.1	Μελέτη των καρτενοειδών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).	179
 Κεφάλαιο 11		
11.1	Προσδιορισμός μετάλλων και μεταλλοειδών.....	182
 Συνολική εκτίμηση αποτελεσμάτων.....		
		189
 ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....		
		195
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		
		197

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γενικές πληροφορίες για την γαρίδα *P. kerathurus*

1.1 *Penaeus (Melicertus) Kerathurus*



Φύλο: Αρθρόποδα [1]
Ομοταξία: Καρκινοειδή
Τάξη: Δεκάποδα
Υπόταξη: Δενδροβραχιωτά
Οικογένεια: **Penaeidae**
Γένος: *Penaeus*
Είδος: ***Penaeus kerathurus***

Η ομοταξία των καρκινοειδών [1] αριθμεί περί τα 31.300 είδη. Η οικολογική σημασία των καρκινοειδών, και ιδιαίτερα των πολύ μικρών σε μέγεθος είναι πολύ σημαντική. Οι οργανισμοί αυτοί τρέφονται [1,2] με μονοκυτταρικά φύκη, τα οποία αποτελούν την βάση της τροφικής αλυσίδας ενώ οι ίδιοι αποτελούν τροφή των ψαριών και πολλών άλλων θαλασσιών οργανισμών. Κατά συνέπεια, τα μικρά σε μέγεθος καρκινοειδή αποτελούν έναν ζωικό κρίκο στις τροφικές αλυσίδες του γλυκού και του αλμυρού νερού. Από τα καρκινοειδή τα περισσότερο γνωστά είναι τα **δεκάποδα**, τα οποία περιλαμβάνουν τους αστακούς, караβίδες, **γαρίδες**, παγούρους, καβούρια κ.α. Γενικά, στην τάξη των δεκαπόδων υπάγεται το 1/3 περίπου του συνόλου των καρκινοειδών [1]. Τα περισσότερα είδη δεκαπόδων είναι εδώδιμα ή ακίνδυνα, μόνο τρία είδη καβουριών της Ιαπωνίας μπορούν να θεωρηθούν δηλητηριώδη. Είδη με εμπορικό ενδιαφέρον στην Ελλάδα είναι οι αστακοί (*Palinurus elephas*, *Homarus gammarus*), η караβίδα (*Nephrops norvegicus*) και μερικά είδη γαρίδων (*Parapenaeus longirostris*, *Penaeus kerathurus*, *Aristeus antennatus* και *Aristaemomorpha foliacea*). Οι οργανισμοί αυτή είναι γνωστοί στον άνθρωπο από πολύ παλιά, λόγω του ότι απαντούν πολύ συχνά στις ακτές και λόγω της παρουσίας τους σε ποικίλους βιοτόπους. Πιστεύεται ότι η πιο αρχέγονη ομάδα είναι τα **Penaeidae** που διαχωρίζονται από τις υπόλοιπες εξαιτίας του ότι τα είδη που ανήκουν σ' αυτήν παράγουν και αποθέτουν αβγά ελεύθερα και έχουν προνύμφη ναύπλιο. Αντίθετα, σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες τα αβγά επωάζονται από τα θηλυκά άτομα και η προνύμφη

είναι ζώϊδιο. Τα δεκάποδα εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία σχημάτων, όπου διακρίνουμε δύο μορφές: τα **Μακρόουρα** (γαρίδες, αστακοί, караβίδες) και τα Βραχύουρα (καβούρια).

Η *Penaeus (Melicertus) Kerathurus* [2,3] αλιεύεται σε όλη τη Μεσόγειο. Έχει μεγάλη αξία για το μεγάλο μέγεθος καθώς και για την άριστη γεύση της. Αλιεύεται με ανεμότρατες και ευκαιριακά με γρυπούς της παραλίας (Γιουγκοσλαβία), τριπλά δίχτυα (Κύπρος, Τυνησία), δίχτυα (βόρεια Αδριατική, Σικελία, Τυνησία) και φράγματα (Τυνησία). Οι νεαρές αλιεύονται με παραγάδια (Μαρόκο). Γενικά αλιεύεται σε μεγάλες ποσότητες. Συχνά παρουσιάζεται στις αγορές της Ισπανίας, του Μαρόκου, της νότιας Ιταλίας και της Τυνησίας, ενώ μόνο ευκαιριακά ή σπάνια αλλού. Διατίθεται φρέσκια ή κατεψυγμένη. Πειραματική ιχθυοκαλλιέργεια γίνεται στην Ισπανία και στη νότια Αδριατική.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά [1], του οργανισμού είναι παρόμοια με τα συνήθη χαρακτηριστικά των υπολοίπων καρκινοειδών. Όσον αφορά στο μέγεθος τους αξίζει να αναφερθεί ότι τα αρσενικά είναι μικρότερα από τα θηλυκά. Συγκεκριμένα το συνολικό μέγιστο μήκος για τα αρσενικά είναι 18cm ενώ για τα θηλυκά 22.5 cm. Το συνήθες μέσο μήκος είναι από 8 έως 14 cm για τα αρσενικά και 17 cm για τα θηλυκά. Ο χρωματισμός επίσης ποικίλει και διαφέρει ανάλογα με το φύλο. Τα αρσενικά είναι συνήθως ανοιχτόχρωμα με ρόδινες εγκάρσιες ραβδώσεις πάνω στην κοιλιά. Τα θηλυκά είναι πρασινοκίτρινα ή γκριζοκίτρινα με χαλκοπράσινες ή μωβ-καφέ ραβδώσεις. Ο εξωσκελετός μοιάζει πολύ με αυτόν των υπολοίπων αρθροπόδων, είναι όμως εμποτισμένος με άλατα Ca. Η επιεψυμενίδα είναι διπλή και εμποτισμένη με άλατα Ca. Η απόθεση ασβεστίου επιτρέπει τη σχετικά γρήγορη σκλήρυνση επιεψυμενίδας μετά τις διάφορες εκδύσεις. Η έκδυση [4,5,6] είναι το φαινόμενο της απόπτωσης της επιδερμίδας και της εκ νέου δημιουργίας της, που παρατηρείται σε πολλά είδη ασπόνδυλων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινοειδών, όπως οι γαρίδες. Κατά την διαδικασία της έκδυσης παρατηρούνται δραματικές αλλαγές στα ζώα σε διάφορα επίπεδα, όπως στη διάρθρωση του σώματος, τις βιολογικές διεργασίες, τη συμπεριφορά, το μεταβολισμό, την αναπαραγωγή, ακόμα και την αισθητηριακή τους οξύτητα, τα οποία επηρεάζονται όλα με άμεσα και έμμεσα από αυτές περιοδικές αντικαταστάσεις του δέρματος και των υποκείμενων κύκλων τους στη μεταβολική συσσώρευση [4,5]. Σε υγιείς γαρίδες, ο κύκλος της έκδυσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές στη διάρκεια της ζωής τους προκειμένου να αυξηθεί το σωματικό τους μέγεθος και η μάζα τους. Κατά την έκδυση, αρχικά αλλάζει το χρώμα της γαρίδας και γίνεται υπόλευκο. Η γαρίδα αποτραβιέται σε

ένα σημείο, κατά προτίμηση κοντά στην επιφάνεια του νερού, όπου αρχίζει να συσπάται. Σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα ανοίγει ο εξωσκελετός πίσω από το κεφάλι και σταδιακά αποκόπτεται πλήρως από το σώμα της γαρίδας [5]. Στη συνέχεια χρειάζεται ένα μικρό διάστημα, για να συνέλθει και να αρχίσει να κινείται κανονικά. Όσο ακόμα ο νέος εξωσκελετός είναι μαλακός, η γαρίδα γεμίζει το σώμα της με νερό, για να αποκτήσει όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέγεθος. Η έκδυση [6], ως σημαντική πτυχή της φυσιολογίας των καρκινοειδών, μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, χρωστικών, μετάλλων και την κατανομή αυτών μεταξύ των μαλακών ιστών και του εξωσκελετού. Συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι ο εξωσκελετός των καρκινοειδών μπορεί να απομονώσει μέταλλα και να συμβάλει στην αποβολή τους μέσω της έκδυσης [6].



Εικόνα 1. Αποκολλημένος εξωσκελετός γαρίδας μετά από έκδυση [6].

Η διατροφή: Η γαρίδα renaid θεωρείται παμφάγος-νεκροφάγος [1,2]. Αναφέρονται ως παράδειγμα η *Penaeus monodon*, *Penaeus indicus*, *Penaeus merguensis*, *Metapenaeus spp.* και *Peneaus kerathurus*, που τρέφονται κυρίως με φύκη, μικρά καρκινοειδή, μαλάκια, πολυχαίτες και αποσαθρωμένα. Η διατροφή τους διαφέρει ανάλογα με το είδος γαρίδας και την περιοχή. Στην Σιγκαπούρη *P. indicus* τρέφεται με μεγάλα καρκινοειδή, *Metapenaeus ensis* τρέφεται με φύκη, και *M. mastersii* είναι παμφάγος. Η *Penaeus kerathurus* είναι βαθύβιος οργανισμός [7]. Συχνάζει στα νερά των θαλασσών καθώς και σε γλυκά νερά (οι νεαρές) πάνω από αμμουδερούς βυθούς, στα 5-90 μέτρα βάθος και συνήθως μέχρι τα 40 μέτρα. Η επιβίωση της (κυρίως για τις νύμφες και τις ανήλικες) εξαρτάται από το συνδυασμό θερμοκρασίας και αλατότητας. Συνδυασμός χαμηλής θερμοκρασίας και χαμηλής αλατότητας είναι ανεπιθύμητος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Λιπίδια

Ως λιπίδια χαρακτηρίζονται φυσικά απαντώμενες ενώσεις οι οποίες είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, με μοριακές δομές που διαφέρουν κατά περίπτωση σημαντικά και φυσιολογική δράση κοινή [8,9]. Η διατύπωση ενός κοινού ορισμού για τα λιπίδια είναι δύσκολη, γιατί, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες ή τους υδατάνθρακες, που αποτελούνται από παρόμοιες δομικές μονάδες (αμινοξέα και μονοσακχαρίτες αντίστοιχα), αυτά δεν έχουν ομογενείς δομικές μονάδες (π.χ έχουν λιπαρά οξέα λιπαρές αλκοόλες, γλυκερόλη, στερόλες, σάκχαρα, υδρογονάνθρακες κλπ). Έτσι, ως λιπίδια χαρακτηρίζονται τα αδιάλυτα στο νερό οργανικά βιομόρια, τα οποία διαλύονται όμως σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες ή και μίγματα μη πολικών και πολικών οργανικών διαλυτών. Ακόμη, ως λιπίδια χαρακτηρίζονται οι ενώσεις εκείνες που περιέχουν μακριάς αλυσίδας υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεύδες, λιπαρά οξέα και παράγωγα αυτών, όπως γλυκερίδια, κηρούς, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια και σουλφολιπίδια.

Στα λιπίδια υπάγονται και ενώσεις, οι οποίες συνήθως κατατάσσονται σε άλλες κατηγορίες, όπως οι “λιποδιαλυτές” βιταμίνες A, D, E και K και τα παράγωγά τους (καροτενοειδή, στερόλες, εστέρες στερολών). Οι ενώσεις αυτές συγκαταλέγονται στα λιπίδια, διότι είναι συνήθως συνδεδεμένες σε μεμβράνες και λαμβάνονται μαζί με τα φωσφολιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια, κατά την εκχύλισή τους από τα κύτταρα ή τους ιστούς, με «λιπαρούς» διαλύτες.

Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες κοινές βιολογικές δράσεις διάφορων λιπιδικών μορίων, οι οποίες επιβεβαιώνουν την ταξινόμησή τους ως λιπίδια [2,10,11].

1. Ενώσεις με σημαντικές μεταβολικές δράσεις
2. Αποτελούν δομικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών και των κυττάρων και συμμετέχουν στις διάφορες διεργασίες (π.χ διαπερατότητα) που γίνονται μέσω μεμβρανών.
3. Αποτελούν πηγές ενέργειας αλλά και ενώσεις αποθήκευσης ενέργειας
4. Δρουν ως προστατευτικός μανδύας στην επιφάνεια πολλών οργανισμών και οργάνων.

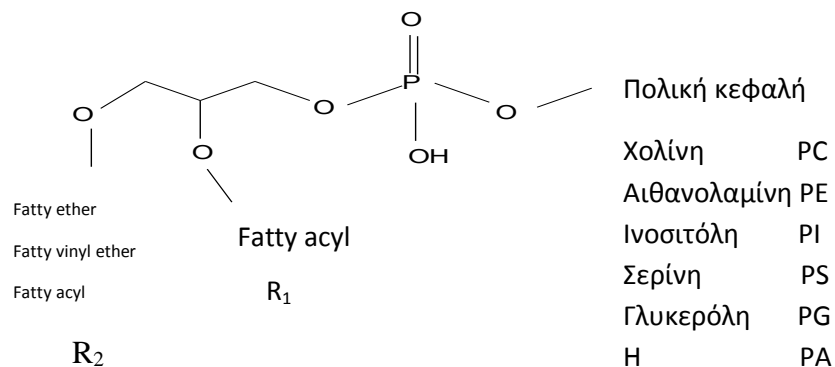
5. Έχουν κάποιες πολύ σημαντικές βιολογικές δράσεις, όπως είναι η συμμετοχή τους στη κυτταρική αναγνώριση και η δράση τους ως ορμόνες ή βιταμίνες, φορείς για τη διακίνηση άλλων μορίων κλπ.

1.2 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς από τα αρχαιοβακτήρια και τα φυτά έως τον άνθρωπο [12,13]. Αυτά τα υδρόφοβα μόρια αποτελούν τα δομικά υλικά των κυτταρικών μεμβρανών (σχηματίζοντας ένα διμοριακό στρώμα λιπιδίων) αλλά επιπλέον παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα άλλων λειτουργιών, από την διαμερισματοποίηση του κυτταροπλάσματος έως τη στέγαση πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, τη διακυτταρική προσκόλληση και την υποστήριξη κυτταροσκελετού [14]. Επιπλέον χρησιμεύουν ως δεξαμενή πρόδρομων μορίων για βιολογικά ενεργά λιπίδια-μεσολαβητές [15]. Οι δυο συνήθεις δομικές τάξεις φωσφολιπιδίων, οι οποίες απαντώνται στα ευκαριωτικά κύτταρα είναι οι σφιγγομυελίνες και τα φωσφογλυκερίδια. Άφθονα φωσφογλυκερίδια αποτελούν επίσης συστατικά των προκαριωτικών κυττάρων [16].

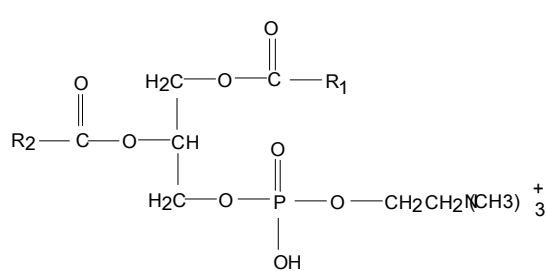
1.2.1 Φωσφογλυκερίδια

Τα φωσφογλυκερίδια [16] είναι τριεστέρες γλυκερόλης με λιπαρά οξέα και φωσφορικό οξύ. Στο μόριο της γλυκερόλης οι δυο υδροξυλομάδες είναι εστεροποιημένες με οργανικά οξέα και η τρίτη με ένα ανόργανο οξύ, το φωσφορικό οξύ. Η φωσφορική ομάδα στον C_3 δια μέσου εστεροποίησης με διαφορετικές αλκοόλες σχηματίζει μια μεγάλη ποικιλία φωσφολιπιδίων, όπως τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI), φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) (Σχήμα 1.2.1.1). Παρόλο που τα λιπαρά οξέα μπορεί να είναι οποιαδήποτε μέλος από C_{12} – C_{22} , η άκυλο ομάδα στον C_1 είναι συνήθως κορεσμένη, ενώ η άκυλο ομάδα του C_2 είναι ακόρεστη.

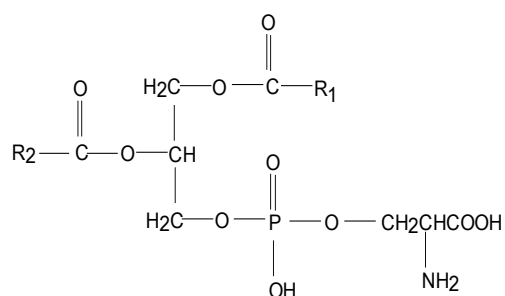


Σχήμα 1.2.1.1 Γενικός τύπος των φωσφογλυκεριδίων [16]

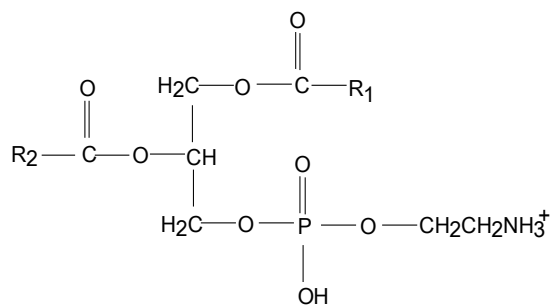
Στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, η αλκυλομάδα αναφέρεται ως υποκατάστατης στις θέσεις sn-1, sn-2 χωρίς να προσδιορίζεται αν η ομάδα αυτή είναι αιθερική ή εστερική. Στη θέση sn-2 βρίσκεται συνήθως ένας εστερικός δεσμός, ενώ στη θέση sn-1 βρίσκεται εστερική ομάδα ή ενυλο αιθέρα (πλασμαλογόνα, υποενώσεις ή μορφές των φωσφολιπιδίων) ή αλκυλαιθέρα (αιθερικές υποενώσεις των φωσφολιπιδίων) ή μονοακυλο-λυσο μορφή, Πίνακας 1.2.1.1.



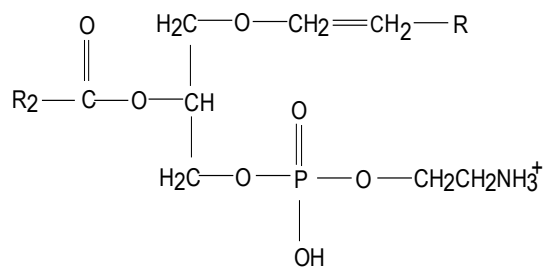
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC) [17]



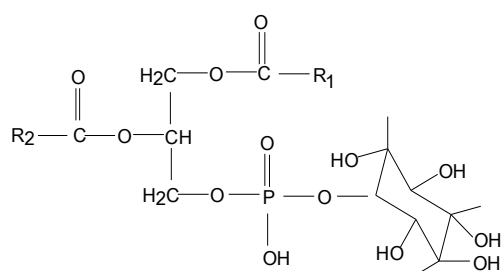
Φωσφατιδυλοσερίνη (PS) [17]



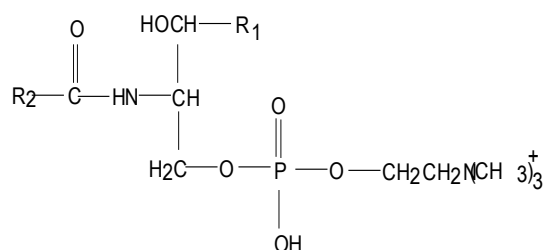
Φωσφατιδυλαιθανολμίνη (PE) [17]



Πλασμαλογόνα PE (pPE) [17]



Φωσφατιδυλοινωσιτόλη (PI) [17]



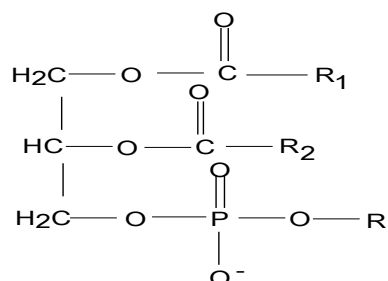
Σφιγγομυελίνη (Sph) [17]

Η παρουσία των παραγώγων των γλυκεροφωσφολιπιδίων διαφέρει ανάλογα με τον ιστό. Για παράδειγμα τα αιθερικά λιπίδια βρίσκονται στις αντιφλεγμονώδεις κυτταρικές μεμβράνες [18] και τα πλασμαλογόνα είναι συστατικά του καρδιακού [19] και του εγκεφαλικού ιστού [20]. Επίσης, η διαφοροποίηση των ειδών των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από τα είδη ακυλο-λιπαρών οξέων επειδή το μήκος της αλυσίδας και ο βαθμός ακορεστότητας των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων είναι διαφορετικός.

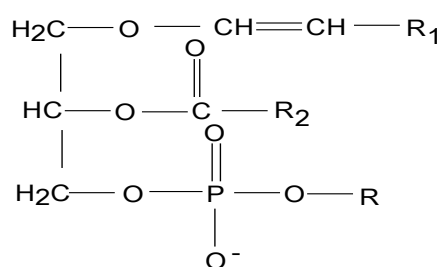
Πίνακας 1.2.1.1. Παράγωγα φωσφολιπιδίων [21]

Συντακτικός Τύπος

Ονοματολογία

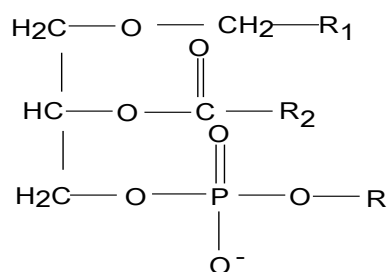


Διακυλεστερική δομή (Ολα)

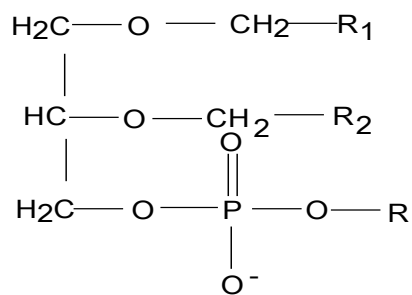


Μονοακυλο-μονοαλκ-1-ενυλο-
αιθερική δομή

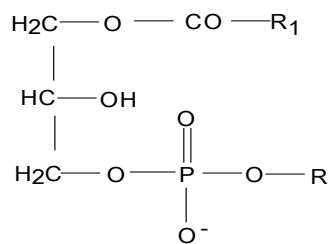
(πλασμαλογόνα, PC, PE, PS)



Μονοακυλο-μονοαλκυλοαιθερική
δομή

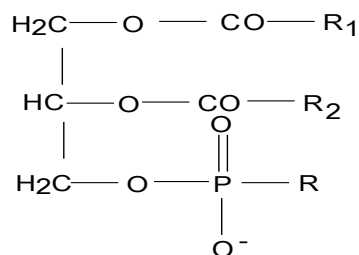


Διακυλαιθερική δομή (PG, PGP)



Μονοακυλο-λυσσο δομή

α-(ή β-) ισομερές (PS, PE, PC)



Φωσφονική δομή (PE)

Όπου R= αζωτούχος βάση ή παράγωγο πολυόλης και R₁, R₂= κορεσμένες ή ακόρεστες αλυσίδες λιπαρών οξέων

Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE (Σχήμα 1.2.1.2) είναι γενικά το δεύτερο πιο διαδεδομένο κλάσμα γλυκεροφωσφολιπιδίων και απαντάται σε μεγάλες ποσότητες σε ζωικούς και φυτικούς ιστούς. Η PE ζωικής προέλευσης έχει συνήθως περισσότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία συγκεντρώνονται στη θέση sn-2. Είναι μη όξινο λιπίδιο και κατά την υδρόλυσή του αποδίδει 1 mol αιθανολαμίνης, 1 mol γλυκερόλης, 2 mol λιπαρών οξέων και 1 mol φωσφορικό οξύ [9]. Αλκυλ- και αλκενυλ- ανάλογα όπου η διαφορετική ομάδα βρίσκεται στη θέση sn-1, παρουσιάζονται περιστασιακά στον ίδιο ιστό, όπου υπάρχουν και διακυλο-ομάδες.

Η λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, στην οποία μόνο μια από τις διαθέσιμες θέσεις είναι εστεροποιημένη με ένα λιπαρό οξύ, συναντάται σπάνια σε μερικούς φυτικούς και ζωικούς ιστούς.

Τα μερικά μεθυλιωμένα παράγωγά της απαντώνται σε μικρές ποσότητες σε πολλούς οργανισμούς, ως μεταβολικά ενδιάμεσα, κατά τη μετατροπή της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης προς φωσφατιδυλογολίνη. Είναι πιθανό η PE να συντίθεται στον οργανισμό μέσω γλυκίνης [1] και πιθανόν σερίνης, ενώσεις οι οποίες βιοσυντίθενται φυσιολογικά στους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς.

Η φωσφατιδυλοχολίνη, PC (Σχήμα 1.2.1.2), είναι ένα από τα φωσφογλυκερίδια που απαντώνται πιο συχνά και αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά των μεμβρανών σε ανώτερα φυτά και ζώα. Η PC αποτελείται από δυο μόρια λιπαρού οξέος που εστεροποιούνται με την 3-φωσφορική- L- γλυκερόλη, η οποία περιέχει ένα μόριο χολίνης προσδεμένο με φωσφοδιεστερικό δεσμό.

Η δομή είναι ετερογενής ως προς τα μόρια των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα που ανευρίσκονται στο κλάσμα φωσφατιδυλοχολίνης εξαρτώνται από το είδος του ιστού από τον οποίο απομονώθηκε, από τη διαίτα του ζώου και άλλους παράγοντες [22].

Η θέση sn-1 καταλαμβάνεται σχεδόν πάντα από κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ στη θέση sn-2 εμφανίζονται C₁₈, C₂₀ και C₂₂ πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η PC είναι μη όξινο λιπίδιο και κατά την υδρόλυση αποδίδει χολίνη μαζί με τα άλλα συστατικά των γλυκεροφωσfolιπιδίων. Σε μερικούς ιστούς έχουν ανιχνευτεί μικρές ποσότητες συμπλόκων με αλκυλ-, ή βυνυλ-αιθέρες στη θέση sn-2.

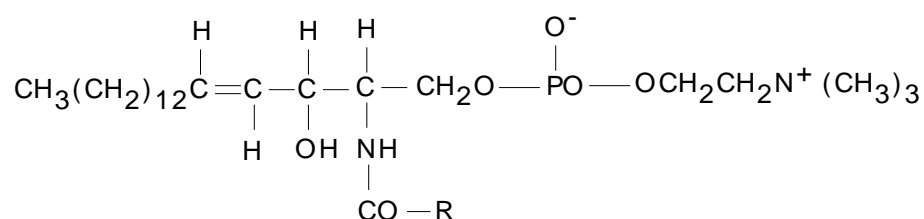
Η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, στην οποία μόνο η μια από τις δυο θέσεις είναι εστεροποιημένη με ένα λιπαρό οξύ, παρουσιάζεται συνήθως σε μικρές ποσότητες όταν υπάρχει και η PC. Στις περισσότερες περιπτώσεις θεωρείται ότι η θέση sn-1 είναι εστεροποιημένη, γεγονός όμως που δεν επιβεβαιώνεται εύκολα, λόγω της εύκολης μετατόπισης της ακυλ-ομάδας, ενώ υπάρχουν αποδείξεις ότι μπορούν να συνυπάρχουν και τα δυο ισομερή στον ίδιο ιστό [9]. Η χολίνη, όπως και τα απαραίτητα λιπαρά οξέα και η σφινγομυελίνη, δεν βιοσυντίθενται στον οργανισμό γι' αυτό και πρέπει να λαμβάνονται με τη διατροφή. Η έλλειψη χολίνης περιορίζει την οξειδωση των λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας και τον καταβολισμό τους στο ήπαρ [23]. Όσον αφορά τα φωσfolιπίδια των βενθικών καρκινοειδών (καβούρια, αστακοί, γαρίδες κ.α) σε μεγαλύτερο ποσοστό απαντάται η PC και η PE [24].

Η σφινγομυελίνη, Sph [21] (Σχήμα 1.2.1.2.) αποτελείται από τη σφινγοσίνη, μια αμινοαλκοόλη που περιέχει μια επιμήκη ακόρεστη υδρογονανθρακική αλυσίδα. Στη σφινγομυελίνη, η αμινομάδα της σφινγοσίνης συνδέεται με το λιπαρό οξύ μέσω ενός αμιδικού δεσμού. Επίσης, η πρωτοταγής υδροξυλομάδα της σφινγοσίνης εστεροποιείται σε φωσφορυλοχολίνη. Η σφινγομυελίνη εμφανίζεται κυρίως σε μεμβράνες ιστών θηλαστικών, όπως στον εγκέφαλο, το συκώτι, την καρδιά, τα ερυθροκύτταρα αίματος κλπ. Οι περικυτταρικές μεμβράνες έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σφινγομυελίνη, ενώ τη μικρότερη οι μεμβράνες των μιτοχονδρίων και των πυρήνων. Η περιεκτικότητα σε σφινγομυελίνη αυξάνεται με την ηλικία και ειδικότερα στους ιστούς

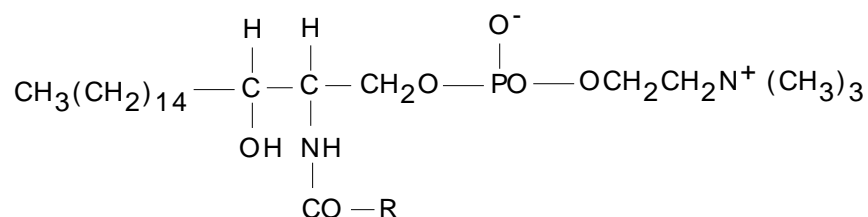
που έχουν σχετικά χαμηλή ανασύνθεση φωσφολιπιδίων, όπως ο νευρικός ιστός και τα αιμοφόρα αγγεία. Επίσης, αυξάνεται σε μερικές ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση ή μερικές μορφές καρκίνου. Αντίθετα σε άλλες ασθένειες, όπως η λευχαιμία, ελαττώνεται. Όσον αφορά τα φωσφολιπίδια των βενθικών καρκινοειδών (καβούρια, αστακοί, γαρίδες κ.α), η Sph βρίσκεται σε χαμηλό ποσοστό (3.08-9.03 %) σε σύγκριση με την PC και PE [24,1], το ποσοστό αυτό αυξάνεται σημαντικά σε καλλιεργημένα είδη καρκινοειδών (π.χ. *P. monodon* ιχθυοκαλλιέργειας 11.39 %).

1.2.2 Σφιγγοφωσφολιπίδια

Τα σφιγγολιπίδια [21] είναι κυρίως παράγωγα της σφιγγομυελίνης, του φωσφορυλοχολινεστέρα μίας N-ακυλο-σφιγγοσίνης (κηραμίδιο) και της διϋδροσφιγγοσίνης (σφιγγανίνη). Οι γενικοί τους τύποι δίνονται παρακάτω:



N-ακυλο-trans-4-σφιγγερίνη-1-φωσφορυλοχολίνη [21]



N-ακυλο-σφιγγανίνη-1-φωσφορυλοχολίνη [21]

1.3 Ταυτοποίηση φωσφολιπιδίων

Κατά την ανάλυση φυσικών μιγμάτων φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), φωσφατιδυλοχολίνης (PC) [21], χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό ψεκασμό θετικών ή αρνητικών ιόντων, ταυτοποιούνται

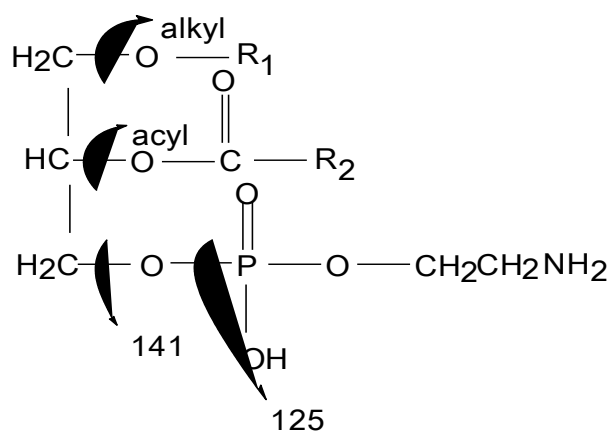
- αλκυλο-ακυλο-παράγωγα
- αλκενυλο-ακυλο-παράγωγα
- διακυλο-παράγωγα

Κύριο παραγόμενο ιόν είναι το ψευδο-μοριακό ιόν, θετικό $[M+H^+]$ ή αρνητικό $[M-H^-]$.

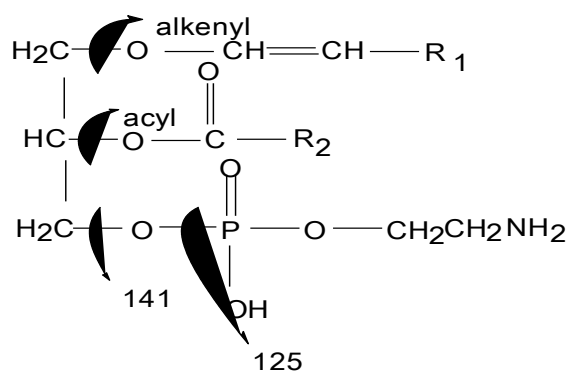
Λαμβάνονται επίσης κορυφές που αντιστοιχούν σε ιόντα λιπαρών οξέων $[RCOO^-]$, που επιβεβαιώνουν την παρουσία συγκεκριμένων ακυλο-παραγώγων. Λαμβάνονται επίσης κορυφές σε αρκετά μεγάλη αφθονία που αντιστοιχούν στα ιόντα της

- φωσφοαιθανολαμίνης σε m/z 141
- φωσφονοαιθανολαμίνης σε m/z 125
- φωσφοχολίνης σε m/z 184

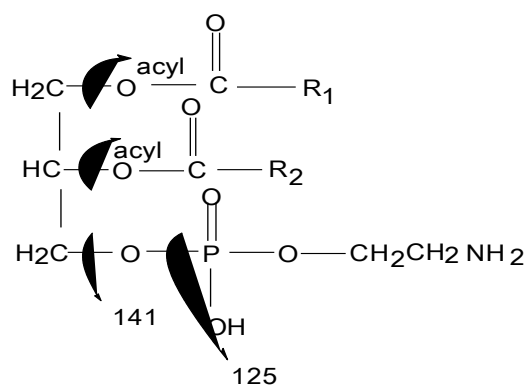
Παρακάτω στο σχήμα παρατίθεται ένα μοντέλο θραυσμάτωσης αλκυλο-ακυλο παραγώγων:



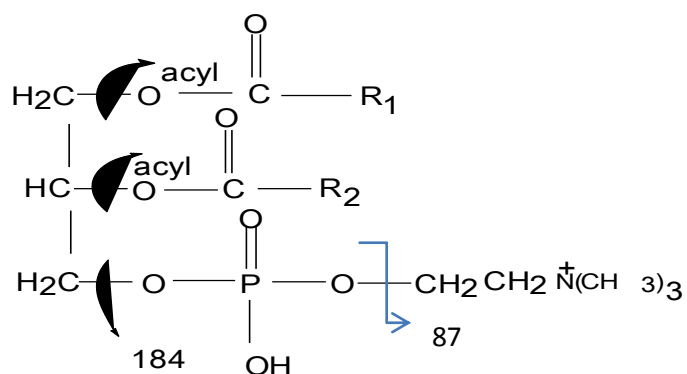
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (αλκυλο-ακυλο – παράγωγα



Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (αλκενυλο- ακυλο παράγωγα)



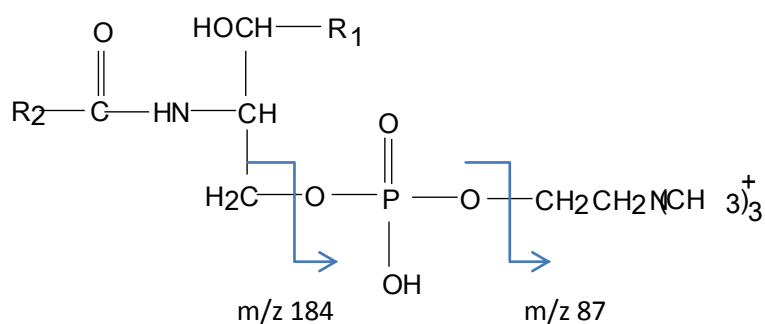
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (διακυλο παράγωγα)



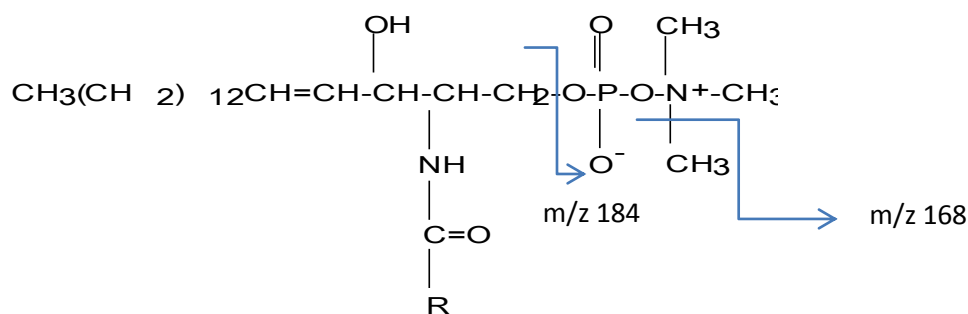
Φωσφατιδυλοχολίνη (διάκυλο παράγωγα)

Η σφιγγομυελίνη (Sph, κηραμίδυλο-φωσφοχολίνη) [16], που αποτελεί συστατικό πολλών μεμβρανών θηλαστικών, αποτελείται από ένα N-ακυλο-λιπαρό οξύ συνδεδεμένο με έναν υδρογονάνθρακα μακριάς αλυσίδας και φωσφοχολίνη. Κατά την ανάλυση φυσικών μιγμάτων της με ES-MS πέρα από το μοριακό ιόν, παρήχθησαν σε μεγάλη αφθονία τα

ίοντα με m/z 184 και 168, που αντιστοιχούν στη φωσφοχολίνη μετά από απόσπαση ενός μεθυλίου.



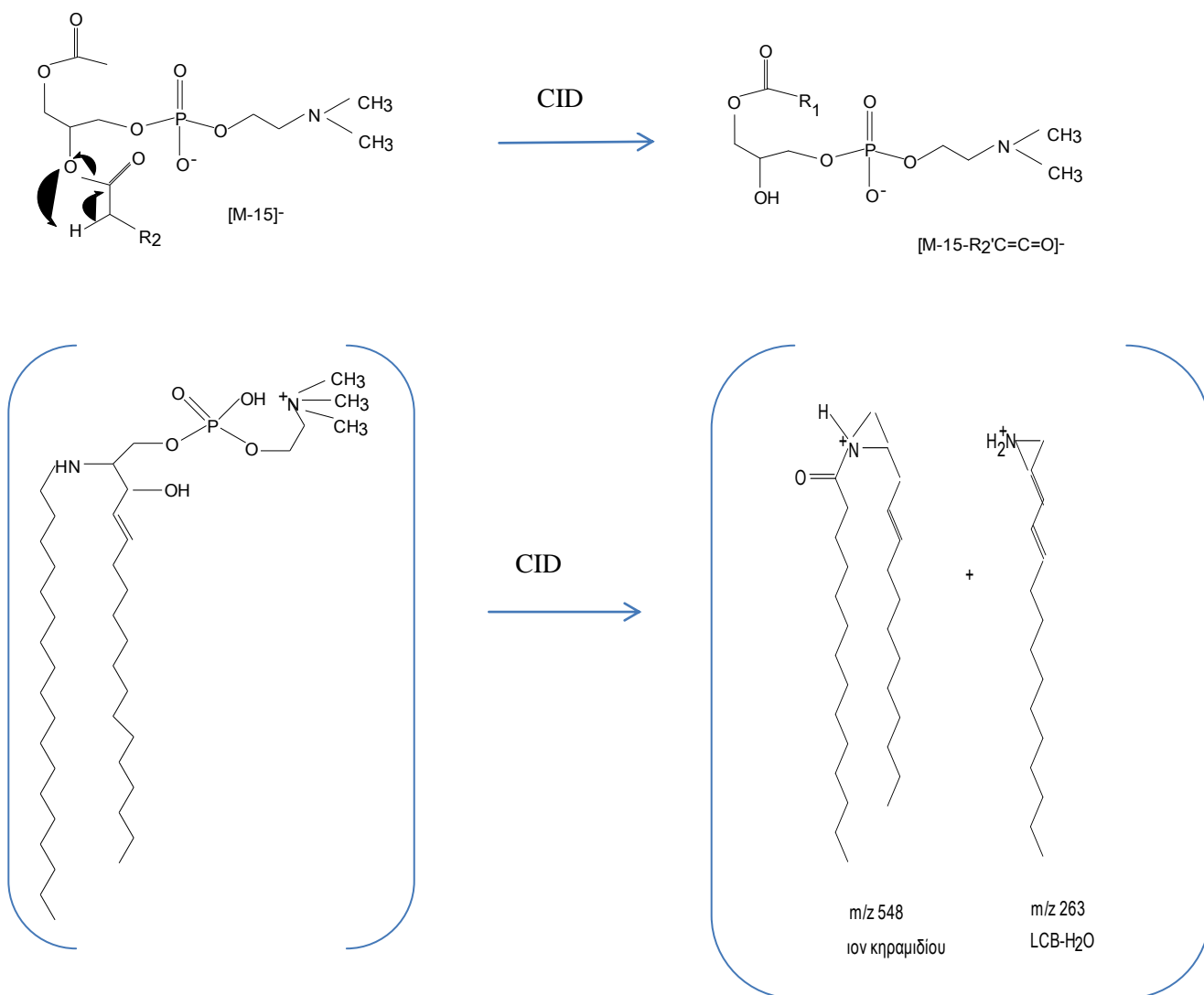
Σφιγγομυελίνη [17]



N-ακυλο-σφιγγενο-φωσφοχολίνη [21]

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό της σφιγγομυελίνης (Sph) [16] ομοιάζει με αυτόν της γλυκεροφωσφατιδυλοχολίνης. Γενικά είναι το άτομο του αζώτου (quaternary) που καθορίζει τη συμπεριφορά του μορίου; παρ'όλα αυτά έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι με σκοπό την βελτίωση της θραυσματοποίησης του μορίου, ειδικότερα στη θραύση του θετικού μοριακού ιόντος $[M+H]^+$. Τέτοια είδη μοριακών ιόντων λαμβάνονται ως θετικά ιόντα. Το μόνο ιόν που λαμβάνεται είναι σε m/z 184, το οποίο αντιστοιχεί στη φωσφοχολίνη. Παρ'όλο που το ιόν αυτό μας δίνει τη σημαντική πληροφορία για τη μοριακή δομή της σφιγγομυελίνης, δεν υπάρχουν πληροφορίες όσον αφορά το μοριακό βάρος της ένωσης αυτής, δεδομένου ότι δε λαμβάνεται το μοριακό ιόν. Για παράδειγμα δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε ακριβώς την ακυλο-ομάδα του λιπαρού οξέος ή τη φύση της βάσης μακριάς αλυσίδας. Καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν με την εφαρμογή χημικού ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση σε σειρά με φασματομετρία μάζας. Από την τεχνική αυτή εντοπίστηκε η απόσπαση τριμεθυλαμίνης ενωμένης με ένα μόριο νερού και του χαρακτηριστικού ιόντος κηραμιδίου (ceramide specific ion). Το χαρακτηριστικό ιόν

κηραμίδιου σε m/z 548 και η ένυδρη βάση μακριάς αλυσίδας σε m/z 264 απεικονίζονται στο Σχήμα 1.3.1.

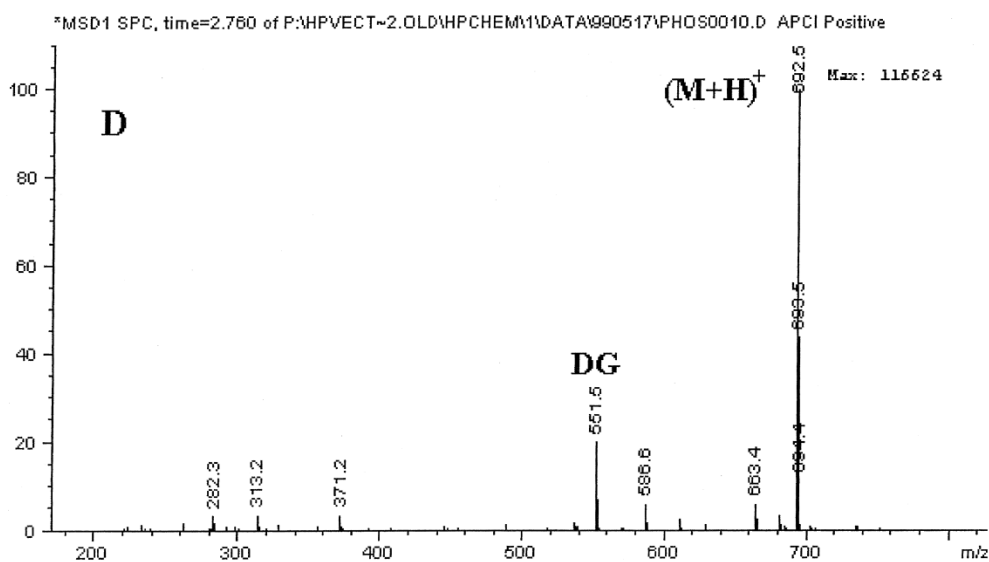
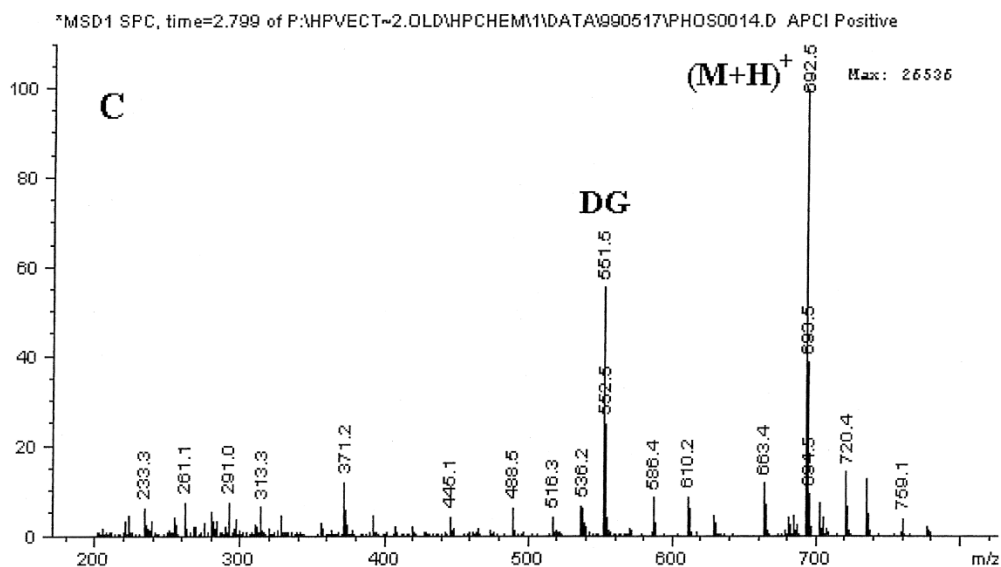


Σχήμα 1.3.1. Το ιόν κηραμίδιου [16] με m/z 548 και η βάση μακριάς αλυσίδας m/z 264.

1.4 Φασματομετρία μαζών φωσφολιπιδίων

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την ανάλυση των μοριακών δομών των φωσφολιπιδίων [25]. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται με βάση την ποσότητα του δείγματος που είναι διαθέσιμη προς ανάλυση καθώς και του οργάνου που διαθέτει το εργαστήριο. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτική ανάλυση των φωσφολιπιδίων είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ποικιλία συστημάτων ανίχνευσης.

Η δυνατότητα σύζευξης της HPLC με τη φασματομετρία μαζών (MS) έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές για το διαχωρισμό και τη δομική ανάλυση των αμιγών μοριακών ειδών φωσφολιπιδίων. Μερικές από τις τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί είναι: θερμοψεκασμός (thermospray/plasmaspray), ηλεκτροψεκασμός (electrospray), χημικός ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (particle beam) σε ατμοσφαιρική πίεση (atmospheric pressure chemical ionization APCI). Ο Carrier et al (2000), μελέτησε τα φωσφολιπίδια του αβγού και της σόγιας με APCI θετικού ιοντισμού. Προέκυψαν το κύριο παραγόμενο ψευδομοριακό ιόν $[M+H^+]$ και ιόντα διγλυκεριδίων. Στο φάσμα μαζών λαμβάνονται κορυφές σε m/z 341.2, 313.2 εξαιτίας της απόσπασης της εστεροποιημένης φωσφατιδικής ομάδας από την λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (από κρόκο αβγού) σε m/z 524.4 (LPC C18:0) και m/z 496 (LPC C16:0). Η κορυφή με m/z 551.5 αντιστοιχεί στο ιόν του διγλυκεριδίου (προκύπτει από PC, PE με την απώλεια είτε της φωσφοχολίνης είτε της φωσφοαιθανολαμίνης) όπου στη θέση sn-1, sn-2 είναι συνδεδεμένο με παλμιτικό οξύ (Σχήμα 1.4.1). Επίσης το m/z 495.4 αντιστοιχεί στο ιόν διγλυκεριδίου συνδεδεμένο με διμυριστικό οξύ (C 14:0).



Σχήμα 1.4.1. Φάσμα μαζών θετικού ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση της C) DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) και της D) DPPE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine). Τάση θραυσμάτωσης 80V, περιοχή σάρωσης m/z 200-800. Ψευδο-μοριακό ιόν $[M+H]^+$ και ιόν διγλυκεριδίων (DG) [25].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Ενώσεις του αρσενικού

Το αρσενικό είναι ένα τοξικό στοιχείο [26]. Η τοξικότητά του εξαρτάται από τον τύπο της ένωσης του αρσενικού. Η πιο τοξική μορφή του αρσενικού είναι οι αρσίνες, οι οποίες είναι ενώσεις υδρογόνου και αρσενικού και σχηματίζονται σε αναγωγικό περιβάλλον από ανόργανα και οργανικά οξέα του αρσενικού. Η διασπορά του στο περιβάλλον είναι περιορισμένη επειδή ενώνεται εύκολα με το οξυγόνο δημιουργώντας το οξειδίο As_4O_6 γνωστό και ως "λευκό αρσενικό". Έχουν χαμηλό σημείο βρασμού ($-55^{\circ}C$ AsH_3 , $+2^{\circ}C$ CH_3AsH_2 , $+36^{\circ}C$ $(CH_3)_2As$, $+52^{\circ}C$ $(CH_3)_3As$), επειδή είναι εξαιρετικά πτητικά. Η τοξικότητα των ενώσεων του αρσενικού σχετίζεται άμεσα με τη χημική δομή του. Το ανόργανο αρσενικό είναι και το πιο τοξικό (αρσενικικό-arsenate, αρσενικόδες-arsenite), ενώ οι μεθυλο-ενώσεις του (MMA, DMA, TMAO, TETRA) είναι λιγότερο τοξικές. Οι ενώσεις αυτές είναι πρόδρομες για περισσότερες σύμπλοκες οργανικές και μη τοξικές ενώσεις, όπως είναι η αρσеноβεταιίνη (AsB), η αρσеноχολίνη (AsC) και τα αρσενοσάκχαρα (AsS) [27]. Πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί, λόγω της αδυναμίας τους να αποφύγουν την έκθεσή τους σε ενδεχόμενα τοξικά ανόργανα είδη αρσενικού, έχουν αναπτύξει νέους μηχανισμούς για βιολογική μεταβολή και αποτοξίνωσή τους [28,29]. Το ανόργανο αρσενικό βρίσκεται σε αφθονία στο θαλασσινό νερό και σε ιζήματα, ενώ στους θαλάσσιους οργανισμούς το στοιχείο αυτό βιοσυσσωρεύεται ως οργανικές μη τοξικές ενώσεις, οι οποίες έχουν προταθεί ως τελικά προϊόντα των πορειών αποτοξικοποίησης. Ανθρωπογενής μόλυνση του περιβάλλοντος μπορεί να τροποποιεί ή να μεταβάλλει την περιβαλλοντική βιοπροσαρμογή του χημικού στοιχείου αυτού με αποτέλεσμα τη σχετική παρουσία των τοξικών ενώσεων του στους ιστούς εκτεθειμένων οργανισμών [30]. Τα αρσενολιπίδια είναι πιθανά τελικά προϊόντα των διαδικασιών αποτοξίνωσης αρσενικού άλατος και οξειδωτικής μεθυλίωσης. Η προτεινόμενη βιογένεση των αρσενολιπιδίων είναι βασισμένη στη φυσική διαδικασία μεταβολισμού του αρσενικού και όλες οι ενώσεις που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή είναι φυσικά προϊόντα που προέρχονται από φύκη. Τα διαφορετικά είδη αρσено-ενώσεων [29] αποδεικνύονται ότι αποτελούν μια αποτελεσματική θεραπεία για την οξεία προμυελωτική λευχαιμία και έχει υπάρξει ελπιδοφόρος δραστηριότητα που σημειώνεται και σε άλλους τύπους καρκίνου. Επίσης, διάφορα είδη των ενώσεων του αρσενικού δείχνουν να είναι αναστολείς της γλυκεροκινάσης και παρουσιάζουν μια υποσχόμενη δραστηριότητα για την αντιμετώπιση

αιματολογικών και στερεών όγκων. Αρσενολιποσώματα παρουσίασαν υψηλή αντικαρκινική δράση εναντίον *Trypanosoma brucei* παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των διαφόρων ειδών καρκινικών κυττάρων.

Αναλύσεις διαχωρισμού και ταυτοποίησης (speciation) [26,29], του αρσενικού επεκτάθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν ανιχνεύθηκε αρκετή ποσότητα στους θαλάσσιους οργανισμούς. Ταυτοποιήθηκε μεγάλη ποικιλία ενώσεων του αρσενικού σε φυσικά δείγματα, όπως:

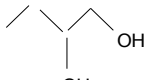
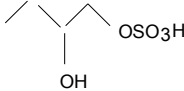
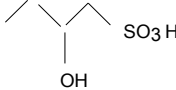
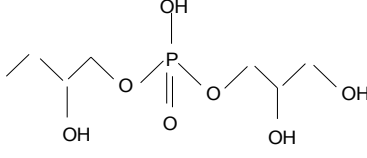
1- ανόργανες ενώσεις του αρσενικού (III) [αρσενικόδες οξύ -H₃AsO₃ arsenious acid] και του αρσενικού (V) [αρσενικό οξύ-arsenic acid, H₃AsO₄] [29].

Αρσενικόδες [Arsenite, As(III)]	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \diagdown \\ \text{As} - \text{O}^- \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array}$
Αρσενικό [Arsenate, As (V)]	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO} - \text{As} - \text{O}^- \\ \\ \text{OH} \end{array}$

2-Μέθυλο ενώσεις του αρσενικού, όπως το DMA (διμεθυλαρσενικό οξύ,dimethylarsinic acid) MMA (μονομεθυλο-αρσενικό οξύ, monomethylarsonic acid) [29].

Methylarsonate (MMA)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As} - \text{O}^- \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Dimethylarsinate (DMA)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

3-οργανικές ενώσεις του αρσενικού, αρσενοβεταΐνη (AsB) και αρσενοχολίνη (AsC).

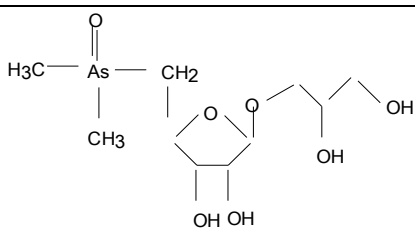
Μη τοξικά, (Non toxic) Υδατοδιαλυτές ενώσεις του As	Συντακτικοί τύποι
Arsenobetaine (AsB) [29] Βρίσκεται άφθονα σε θαλάσσιους οργανισμούς	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Arsenocholine (AsC) [29] Βρίσκεται σε μικρή ποσότητα σε θαλάσσιους οργανισμούς	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Arsenosugars (AsS) [26] Βρίσκεται άφθονα σε θαλάσσιους οργανισμούς και σε θαλάσσια φύκη	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OR} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>R=  OH Glycerol</p> <p>R=  OSO₃H Sulfate</p> <p>R=  SO₃H Sulfonate</p> <p>R=  Phosphate-</p>

Οι οργανικές ενώσεις του αρσενικού περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες ενώσεων: **τις υδατοδιαλυτές και τις λιποδιαλυτές ενώσεις του αρσενικού.**

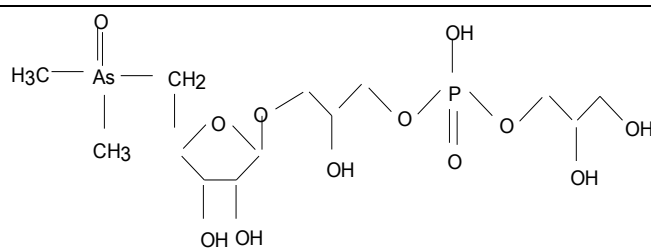
1-υδατοδιαλυτές ενώσεις του αρσενικού, η χημική δομή των οποίων έχει μελετηθεί ευρέως. Στις έρευνες αυτές αναφέρεται ότι η αρσеноβεταΐνη (AB) βρίσκεται σε αφθονία στους θαλάσσιους οργανισμούς, ενώ τα αρσενοσάκχαρα ή τα διμεθυλο-αρσινουλ-ριβοζίτες (arsenosugars ή dimethylarsinoylribosides) απαντούν κυρίως στα θαλάσσια φύκη [31].

1.α) Αρσενοσάκχαρα απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το brown kelp *Ecklonia radiata* [26] in 1981. Ο όρος αρσενοσάκχαρα χρησιμοποιείται για ενώσεις που αποτελούνται από 5-δεοξυπεντόζη και μία αρσενούλ- ή αρσενοθειούλ- ομάδα (arsinoyl or arsinothioyl group) προσδεμένη με το άτομο του άνθρακα στη θέση 5. Επίσης οι ενώσεις αυτές είναι υποκαταστημένες με διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες στο άτομο του άνθρακα στη θέση 1. Τα παράγωγα δεοξυ-5- αρσινούλο-5-δ-ριβοσιδίου (5-deoxy-5-arsinoyl-5-d-riboside) κατέχουν είτε αρσενούλο διμεθυλιωμένο είτε τριμεθυλιωμένο αρσόνιουμ ιον. Στη φύση βρίσκονται συχνότερα τα είδη **όξο** (Σχήμα 2.1.1.) και **θειό** [32] (Σχήμα 2.1.2.) παρά η πεντασθενής διμεθυλιωμένη οξομορφή.

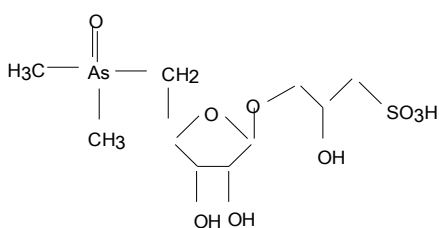
Σχήμα 2.1.1. Οξο-αρσενοσάκχαρα [32]



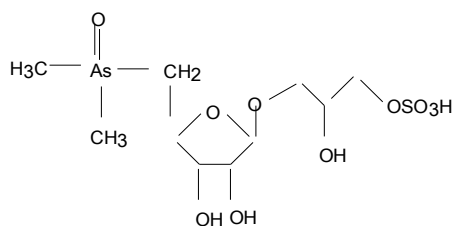
**dimethylarsinylglycerolriboside,
DMAsSugarGlycol**



**dimethylarsinyl phosphateriboside
DMASugarPhosphate**

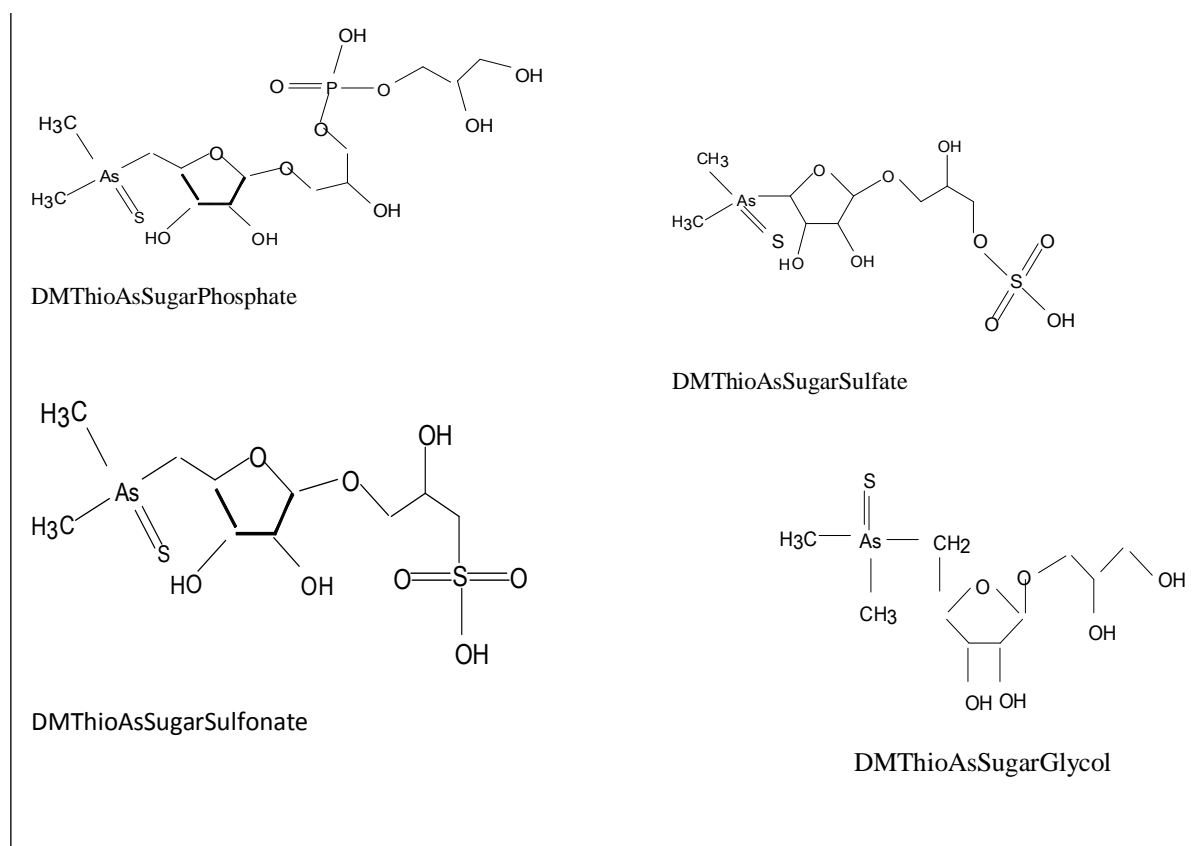


**dimethylarsinyl sulfonateriboside
DMAsSugarSulfonate**



**dimethylarsinyl sulfateriboside
DMAsSugarSulfate**

Σχήμα 2.1.2. Θειοαρσενοσάκχαρα [32]



2-Αρσενολιπίδια [33]. Οι ενώσεις αυτές έχουν βρεθεί σε περιορισμένο αριθμό θαλάσσιων οργανισμών, πιθανώς εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης, δυσκολίας της απομόνωσης και έλλειψης των κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό τους. Το πρώτο αρσενολιπίδιο που απομονώθηκε από καφέ φύκη ή φαιοφύκη είδους *Undaria pinnatifida* και ταυτοποιήθηκε φασματοσκοπικά (spectroscopically) είναι το φωσφατιδυλοαρσενοσάκχαρο [34]. Στις μελέτες που ακολούθησαν, η χημική δομή των αρσενολιπιδίων βασίστηκε στο διαχωρισμό και την ταυτοποίηση (speciation) των υδατοδιαλυτών ενώσεων του αρσενικού (οι οποίες μπορεί να είναι προϊόντα ενζυμικής ή χημικής διάσπασης) που προέκυψαν από τη χημική ή ενζυμική υδρόλυση των ενώσεων αυτών (arsenolipid-containing fraction). Τα πιο σημαντικά αρσενολιπίδια που έχουν βρεθεί είναι το DMA- προσδεμένο και AC- προσδεμένο με φωσφολιπίδια (DMA, AC-containing phospholipids) σε είδος καρχαρία (starspotted shark) *Mustelus manazo* [35,36], το φωσφατιδυλοαρσενοσάκχαρο (arsenosugar) και η φωσφατιδυλοαρσενοχολίνη σε είδος αστακού *Panulirus Cygnus* [37] (western rock lobster), το φωσφατιδυλοδιμέθυλαρσινικό οξύ (arsinic acid) και DMA- προσδεμένο με σφιγγομυελίνη (Πίνακα 2.1.1.) στο καλαμάρι *Todarodes pacificus* (Japanese flying squid)

[38], το DMA- προσδεμένο με φωσφολιπίδια στη φώκια *Pusa hispida* [39] (ringed-seal) και το φωσφατιδυλοαρσενοσάκχαρο σε καφέ φύκη *Laminaria digitata* [40]. Οι πιο πρόσφατες ενώσεις τύπου αρσενολιπιδίου που ταυτοποιήθηκαν τελευταία είναι το DMA-προσδεμένο με λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας και βρέθηκε στο λίπος συκωτιού του μπακαλιάρου [41], καθώς και DMA-προσδεμένο με υδρογονάνθρακες στο capelin oil [42], Σχήμα 2.3.



Σχήμα 2.3 DMA προσδεμένο με υδρογονάνθρακες [42].

Πίνακας 2.1.1. Αρσενολιπίδια που έχουν ταυτοποιηθεί σε θαλάσσιους οργανισμούς. (Βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, δύσκολη η απομόνωση τους).

Αρσενολιπίδια (λιποδιαλυτές ενώσεις του As)	Συντακτικοί τύποι
<p>Phosphatidyl-arsenosugar</p> <p>Western rock lobster [37] (<i>Panulirus cygnus</i>)</p>	
<p>DMA- containing phospholipids</p>	

<p>Japanese flying squid [38] <i>Todarodes pacificus</i></p>	
<p>AC-containig phospholipids</p> <p>Το As(V) αντικαθιστά το άζωτο (N) στη χολίνη</p> <p>Western rock lobster [37] <i>(Panulirus cygnus)</i></p>	
<p>DMA-containig sphingomyelin</p> <p>Japanese flying squid [38] <i>Todarodes pacificus</i></p>	

2.2 Ενώσεις του αρσενικού σε θαλάσσιους οργανισμούς

Η ύπαρξη του αρσενικού σε ασπόνδυλα [28,29] έχει αποκαλυφθεί μόνο τα τελευταία 20-25 χρόνια. Η αρσενοβεταΐνη είναι η σημαντικότερη ένωση στους θαλάσσιους οργανισμούς, ενώ τα αρσενοσάκχαρα και το αρσενικό άλας κυριαρχούν στα θαλάσσια φύκη. Τα θαλάσσια φύκη συνθέτουν πολλές διαφορετικές βιολογικά δραστικές ενώσεις, παράγοντας οργανο-αρσενικές ενώσεις και μεταλλο-υπεροξειδάσεις. Αρκετοί ερευνητές ασχολήθηκαν με τις ενώσεις αυτές. Ο Lunde ήταν ο πρώτος που ανίχνευσε συγκέντρωση 0.5-4.8 ppm αρσενικού στα εκχυλίσματα των λιπιδίων στα θαλάσσια και γλυκού νερού

φύκη. Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν κατά τη μελέτη αυτή παρουσιάζονται παρακάτω Σχήμα 2.2.1.

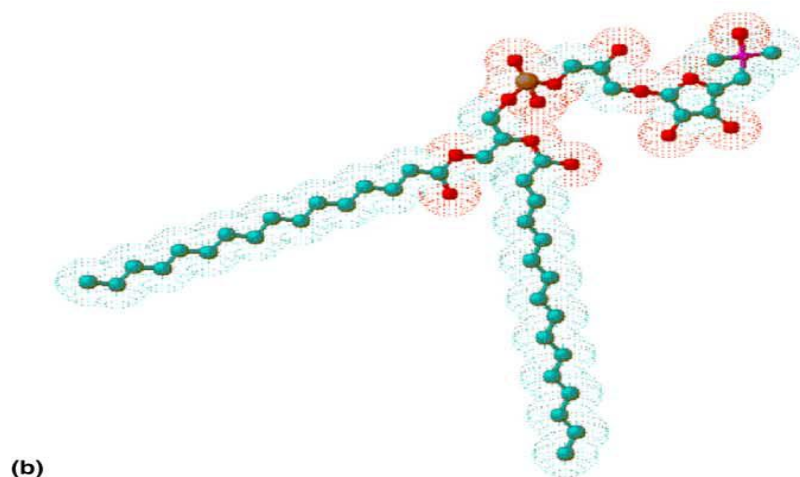
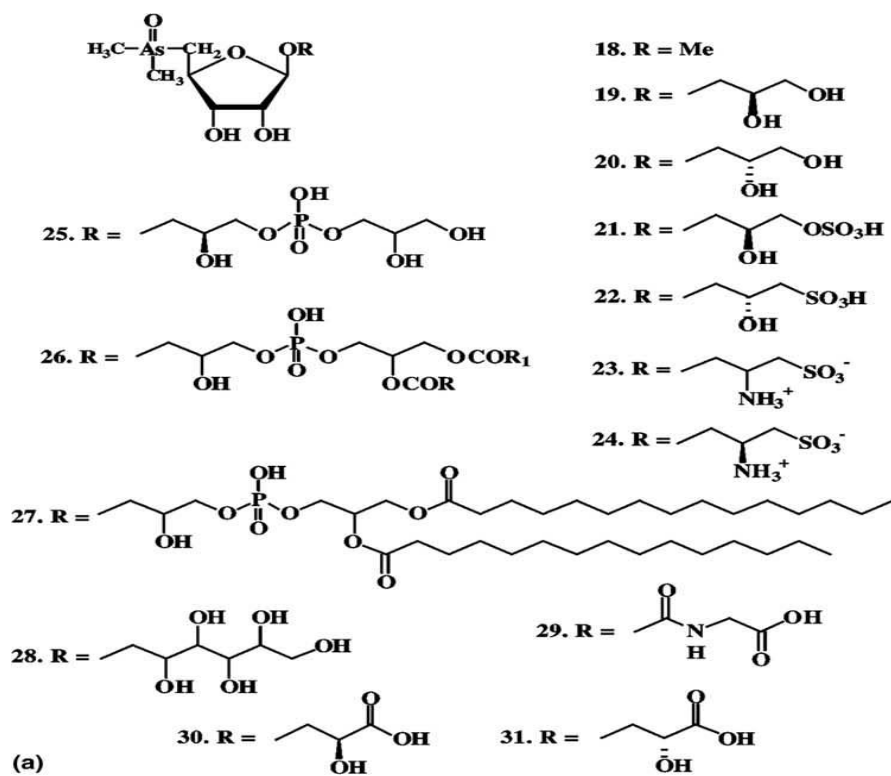
Αργότερα οι έρευνες επεκτάθηκαν εκτός από τα θαλάσσια φύκη και σε ψάρια, μύδια και στρείδια με σκοπό τον προσδιορισμό ανόργανου αρσενικού, όπως As(III), As(V) και οργανο-αρσενικών ενώσεων. Καθορίστηκαν περισσότερα από 17 διαφορετικά είδη τέτοιων ενώσεων, Σχήμα 2.2.2.

Η σημαντικότερη ένωση του αρσενικού σε ψάρια και θαλάσσιους οργανισμούς είναι η αρσενοβεταΐνη, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί την κύρια πηγή αρσενικού. Επίσης, το ιόν τετραμεθυλαρσωνίου απαντά συνήθως σε θαλάσσιους οργανισμούς και ιδιαίτερα στα δίλοβα μαλάκια, όπου μπορεί να είναι η σημαντικότερη μορφή αρσενικού. Το οξειδίο της τριμεθυλαρσίνης και η αρσενοχολίνη εμφανίζονται επίσης ως δευτερεύουσες ενώσεις αρσενικού πλην κάποιων εξαιρέσεων. Αρσενοσάκχαρα βρίσκονται κυρίως στα φυτοφάγα θαλάσσια ζώα. Η πηγή τους είναι τα θαλάσσια φύκη με τα οποία τα ζώα αυτά τρέφονται και είναι γενικά απόντα στα υψηλότερα τροφικά επίπεδα.

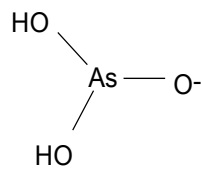
1- **Σε θαλάσσια μαλάκια** (*Thais bitubercularis*, *Thais distinguenda* και *Manila musiva*) που αλιεύθηκαν στο Πουκέτ της Ταϊλάνδης ανιχνεύθηκαν ενώσεις αρσενικού και συγκεκριμένα μεγάλη ποσότητα αρσενοβεταΐνης και μικρότερες ποσότητες αρσενοχολίνης και ιόντος τετραμεθυλοαρσωνίου. Επίσης βρέθηκαν ίχνη δυο μη αναγνωρισμένων ενώσεων αρσενικού, καθώς και μίγματα των ενώσεων αυτών. Η παρουσία τους στα θαλάσσια μαλάκια είναι σύμφωνη με την υπόθεση ότι τα αρσενολιπίδια μετασχηματίζονται σε αρσενοβεταΐνη μέσω της αρσενοχολίνης στα ζώα.

2- Είδη ενώσεων του αρσενικού εντοπίστηκαν και σε **θαλάσσια όστρακα**. Στα όστρακα βρέθηκε υψηλή ποσότητα διμεθυλ-αρσινυλ-ριβόζης, ενώ σε μικρότερη ποσότητα η αρσενοβεταΐνη. Ωστόσο καμία ανόργανη μορφή αρσενικού δεν ανιχνεύθηκε, καθιστώντας την κατανάλωση οστράκων λιγότερο επικίνδυνη. Επίσης, σε δύο τύπους μαργαριτοφόρων στρειδιών βρέθηκε αρσενοβεταΐνη, ενώ σε τμήματά τους ίχνη ή πολύ μικρές ποσότητες ενώσεων αρσενικού συμπεριλαμβανομένου του ιόντος τετραμεθυλαρσωνίου και της αρσενοχολίνης.

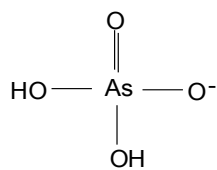
3- **Στη γαρίδα** *Rimicurus exoculata*, που συλλέχθηκε από τον Ατλαντικό ωκεανό, σε μύδια και στον γλυκού νερού αστακό *Procambarus clarkii* ανιχνεύθηκαν ποσότητες αρσενικού. Συγκεκριμένα στη γαρίδα η κύρια ένωση αρσενικού ήταν η αρσενοβεταΐνη, ενώ στα μύδια και τον αστακό παράγωγα της διμεθυλ-αρσινυλ-ριβόζης.



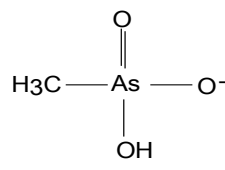
Σχήμα 2.2.1. α) Αρσενολιπίδια που έχουν απομονωθεί σε θαλάσσια και γλυκού νερού φύκη β) Δομή αρσενολιπιδίου σε 3D, όπου το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε άτομο άνθρακα, το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε οξυγόνο, το βαθυκόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε αρσενικό και το καφέ αντιστοιχεί σε φωσφόρο [29].



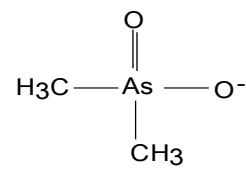
Arsenic (III)
(arsenite)



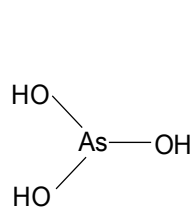
Arsenic (V)



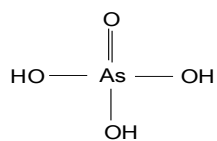
Methylarsonate
(MMA)



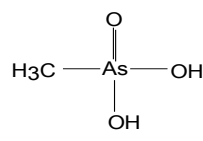
Dimethylarsinate
(DMA)



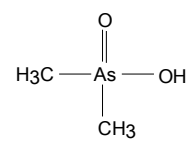
Arsous acid



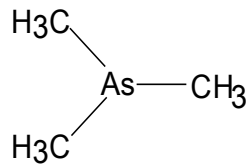
Arsenic acid



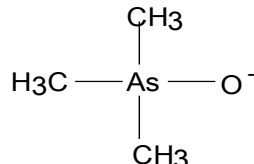
Methylarsonic
acid (MMA)



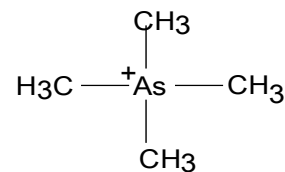
Dimethylarsonic
acid (DMA)



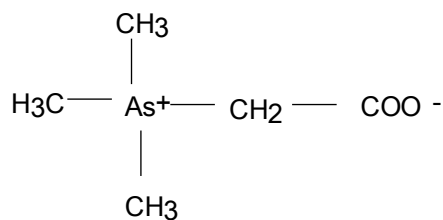
Trimethylarsine



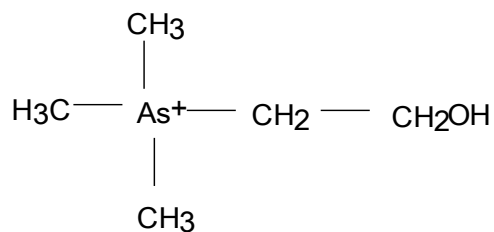
Trimethylarsine oxide
(TMAO)



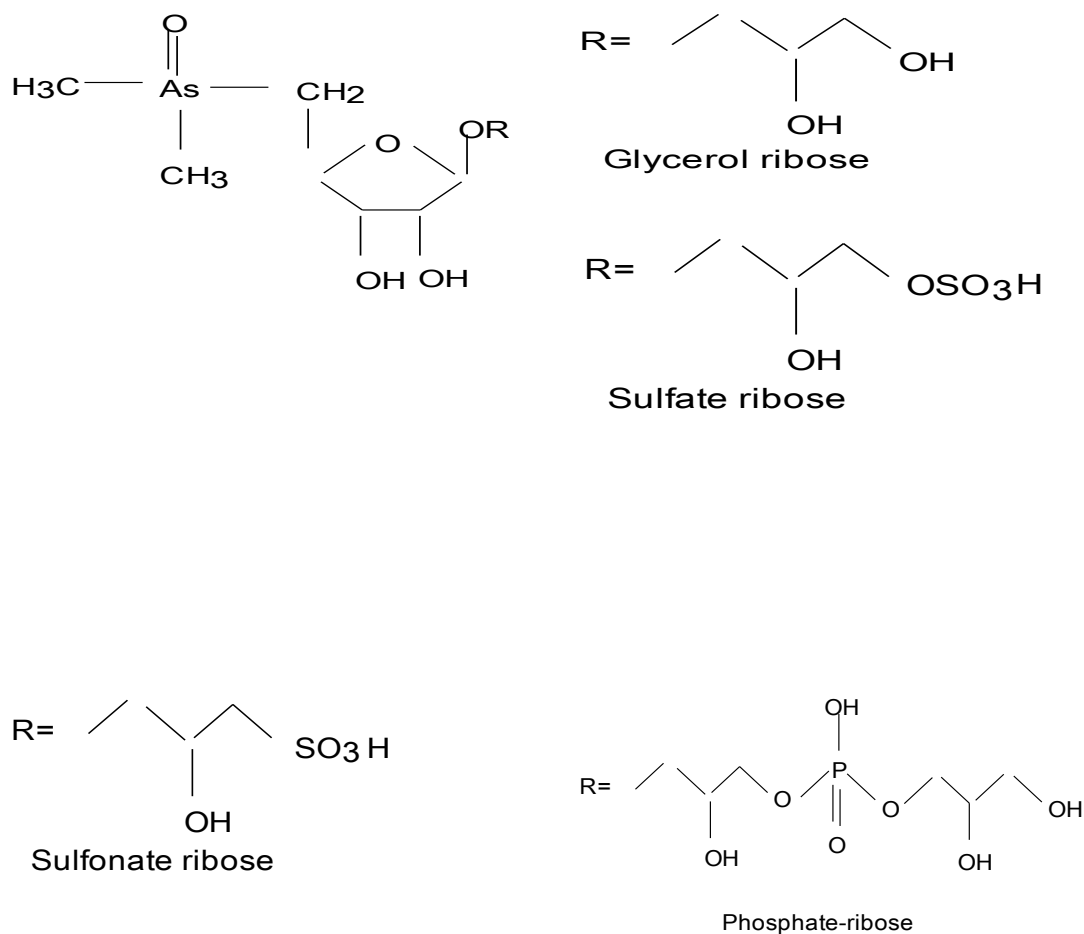
Tetramethyl-arsonium
ion (TETRA)



Arsenobetaine (AB)



Arsenocholine (AC)



Σχήμα 2.2.2. Ανόργανες ενώσεις και οργανικές ενώσεις του αρσενικού που έχουν βρεθεί στα φυτά, μανιτάρια, ψάρια, μαλάκια, ασπόνδυλα και φύκη [29].

2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ

2.3.1 Μέθοδοι διαχωρισμού και ταυτοποίησης των ενώσεων του αρσενικού

Η κρυσταλλογραφία NMR X-ray [28], αποτέλεσε από τις πρώτες τεχνικές ταυτοποίησης ενώσεων του αρσενικού, με βασικό μειονέκτημα την απαίτηση μεγάλης ποσότητας δειγμάτων (Kg). Μια επιτυχής τεχνική διαχωρισμού και ταυτοποίησης των αρσενοσακχάρων σε καφέ φύκη ήταν η χρωματογραφία ανιόνταλλαγής. Με την τεχνική αυτή οι χρόνοι έκλουσης των προτύπων ενώσεων του αρσενικού χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των άγνωστων φυσικών ενώσεων του αρσενικού

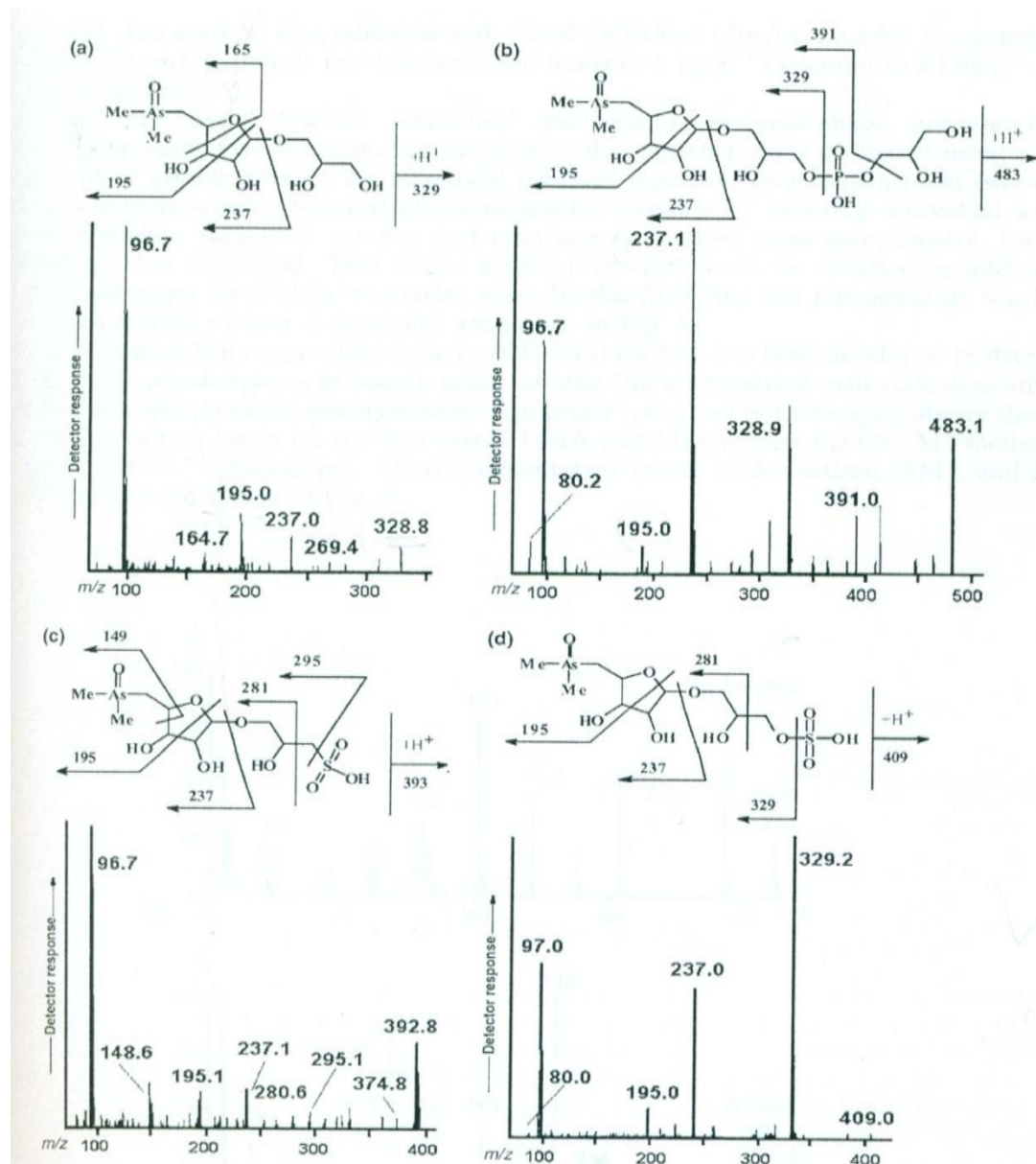
στα φύκη. Η ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών έγινε με σκοπό την εξασφάλιση και διεύρυνση της πληροφορίας για τη χημική δομή των ειδών ξεχωριστά. Μερικές τεχνικές είναι:

HPLC-ICP-MS [29] αντίστροφης-φάσης, ανιόν-ανταλλαγής, κατιόν-ανταλλαγής, HPLC-ES-MS/MS και GC-MS. Το 1980 εφαρμόζεται η φασματομετρία μαζών, η οποία επιτρέπει πολύ μεγάλο αριθμό αναλύσεων και υψηλή ευαισθησία.

Οι περισσότερες μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανάλυση των διαφόρων ενώσεων του αρσενικού βασίζονται σε τεχνικές διαχωρισμού όπως: HPLC-ICP-MS, GC-HG-AAS, GC-ICP-MS. Η τεχνική HPLC ICP-MS χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ανόργανων ενώσεων του αρσενικού (αρσενίτες, αρσενάτες), οργανοαρσενικών ενώσεων (MMA, DMA, AB, AC, TMAO, TETRA) και αρσενοσάκχαρα (ψάρια, θαλάσσια φύκη κ.α). Από τις όλες τις ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί, αρσενοβεταΐνη βρέθηκε ως κύρια ένωση σε θαλάσσια ζώα, ενώ αρσενοσάκχαρα και arsenate κυριαρχούν σε θαλάσσια φύκη.

2.3.2 Φασματομετρία μαζών

Η ανάπτυξη των κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών για τη μελέτη της μοριακής δομής διαφόρων ενώσεων έχει γίνει πλέον αναγκαία [29]. Υπάρχουν πολλές τεχνικές της φασματομετρίας μάζας που εφαρμόστηκαν με σκοπό το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ενώσεων του αρσενικού, όπως φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS), ηλεκτροψεκασμός σε σειρά με φασματομετρία μαζών (ES-MS/MS) σε συζυγία με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και GC-MS. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού σε δείγματα θαλάσσιας προέλευσης επιτεύχθηκε με HPLC αντίστροφης φάσης και ιονανταλλαγής σε συζυγία με ES-ITMS. Τα φάσματα αυτά περιέχουν χαρακτηριστικά δομικά θραύσματα ιόντων για κάθε αρσενοσάκχαρο. Σε κάθε φάσμα μαζών παρατηρείται ένα κοινό παραγόμενο ιόν, το οποίο λαμβάνεται και από τα τέσσερα αρσενοσάκχαρα που εξετάστηκαν με την τεχνική αυτή (Σχήμα 2.3.2.1).



Σχήμα 2.3.2.1. Φάσματα μαζών σάρωσης προϊόντων ιόντων των προτονιομένων μοριακών ιόντων και χημική δομή των διμεθυλοαρσινουλριβοσιδια παραγώγων (dimethylarsinoylribose derivatives, $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ το καθένα). a) Αρσενοσάχαρο, 3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropylene glycol; b) Αρσενοσάχαρο, 3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl-2,3-hydroxy-propyl phosphate; c) Αρσενοσάχαρο, 3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropanesulfonic acid and d) Αρσενοσάχαρο, 3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl hydrogen sulfate [29].

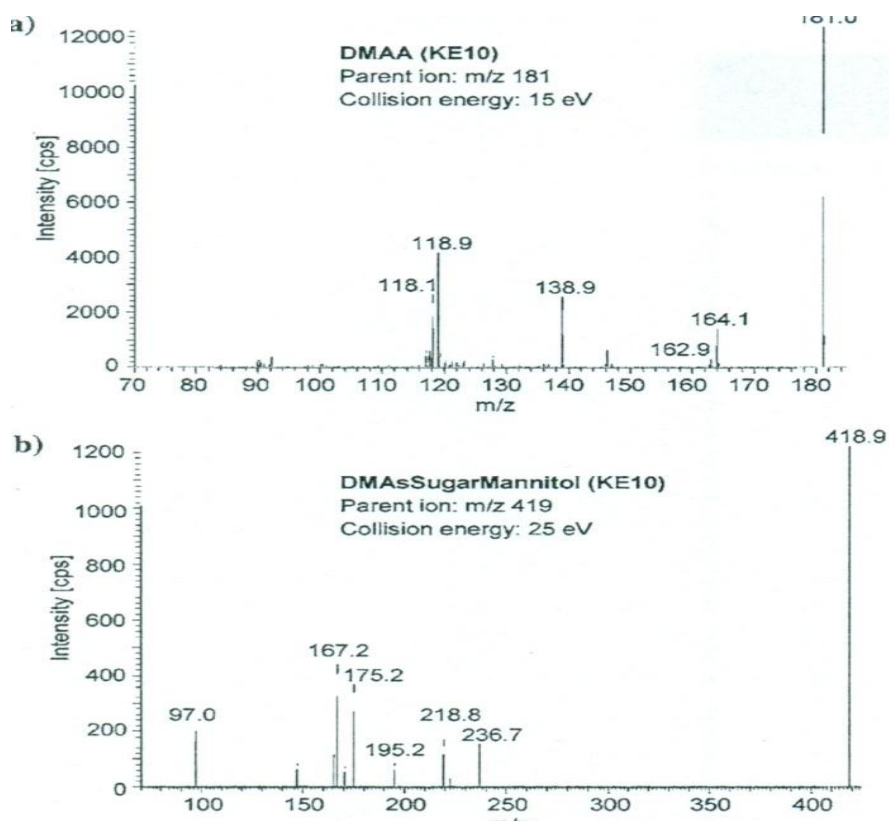
2.3.3 HPLC-ES-MS/MS με SRM

Η τεχνική HPLC-ES-MS/MS με επιλεκτική παρακολούθηση αντιδράσεων (SRM), συνδυάζει την υψηλή εκλεκτικότητα με την υψηλή ευαισθησία για την ανίχνευση των οργανικών ενώσεων του αρσενικού [43]. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε πάνω σε δώδεκα διαθέσιμα εμπορικά είδη θαλάσσιων φυκών με σκοπό την εξερεύνηση και την ανάδειξη των πλεονεκτημάτων της τεχνικής αυτής σε σύγκριση με την HPLC-ICPMS. Τριάντα οργανικές ενώσεις του αρσενικού έχουν προσδιοριστεί στα εκχυλίσματα φυκών με την τεχνική HPLC-ES- SRM. Όλα τα είδη αναλύθηκαν με μέθοδο ανιονανταλλαγής σε συνδυασμό με κατιόν-ανιόν HPLC μέθοδο, εκτός από τα τέσσερα είδη DMThioAsSugars τα οποία μελετήθηκαν μόνο με μέθοδο ανιονανταλλαγής. Οι SRM μεταπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ενώσεων του αρσενικού παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.3.1. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής των δυο HPLC-ES-SRM μεθόδων για το χαρακτηρισμό των οργανικών ενώσεων του αρσενικού φαίνεται στις επιπλέον κορυφές από αυτές που προσδιορίστηκαν ή ταυτοποιήθηκαν σε σύγκριση με την HPLC-ICPMS. Στο σχήμα 2.3.3.2 παρουσιάζονται φάσματα με καλό σήμα σε αναλογία με το θόρυβο (signal-to-noise ratios) τα οποία ελήφθησαν για τα περισσότερα είδη. Η ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων έδειξε ότι η ανάπτυξη των μεθόδων αυτών μας επιτρέπει την ταυτοποίηση των ενώσεων του αρσενικού τα οποία είναι αδύνατον να ανιχνευθούν με ICP-MS.

Πίνακας 2.3.3.1. SRM μετάπτωση και ενέργεια θραυσματοποίησης CE (eV) για τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων του αρσενικού [43] .

Ενώσεις του αρσενικού	SRM 1	CE	SRM 2	CE
TMA	135>120	22	135>105	22
AsB	179>120	21	179>105	30
AsB-2	193>105	28	193>120	28
AsB-3	207>87	20	207>121	20
AsC	165>121	23	165>105	23
TMAO	137>107	26	137-122	20
TMASugarGlycol	327>193	34	327>120	34
TMASugarHydroxy	253>193	25	253>163	25
TMASugarMethoxy	267>75	26	267>120	38
TMASugarPhosphate	481>327	30	481>389	30
TMASugarSulfonate	391>235	26	391>293	26
TMASugarSulfate	407>327	20	407>193	40
DMA	139>91	24	139>109	24

DMAA	181>119	15	181>139	15
DMAAsugarAdenine	372>237	20	372>178	28
DMAAsugarAminoSulfonate	392>97	30	392>295	25
DMAAsugarCarboxyl	343>97	28	343>237	16
DMAAsugarGlycol	329>97	25	329>237	15
DMAAsugarHydroxy	255>97	24	255>195	24
DMAAsugarPhosphate	483>97	40	483>237	25
DMAAsugarSulfonate	393>97	30	393>237	20
DMAAsugarSulfate	409>329	15	409>97	35
DMThioAsSugarGlycol	345>97	20	345>253	10
DMThioAsSugarPhosphate	499>253	15	499>97	27
DMThioAsSugarSulfonate	409>97	25	409>253	15
DMThioAsSugarSulfate	425>97	30	425>253	15
MMA	141>91	30		

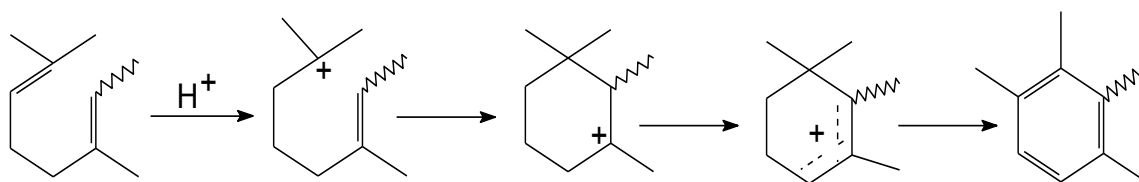


Σχήμα 2.3.3.2. Φάσματα μαζών παραγόμενων ιόντων του διμεθυλοαρσινούλο οξέος (DMAA) (a)and DMAAsugarMannitol (b) τα οποία έληφθησαν με ανιονανταλλαγή HPLC-ES-MS/MS από εκχύλισμα δείγματος kelp (KE10) [43].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπένια με μοριακό τύπο $C_{10}H_{56}$ και ανήκουν στις λιποδιαλυτές χρωστικές, στις οποίες οφείλονται κατά κύριο λόγο τα κίτρινα και τα κόκκινα χρώματα του φυτικού και ζωικού βασιλείου [44]. Είναι ευρύτατα διαδεδομένα στη φύση σε όλους τους φωτοσυνθέτοντες οργανισμούς από τα βακτήρια και τους μύκητες έως τα ανώτερα φυτά. Σ'αυτά οφείλεται το κίτρινο χρώμα του κρόκου του αβγού, του καλαμποκιού, των καρότων καθώς και το κόκκινο χρώμα της τομάτας. Συναντώνται επίσης στους θαλάσσιους οργανισμούς (π.χ. στο δέρμα των ψαριών, στους αστερίες, στις ανεμώνες της θάλασσας και στα κοράλλια), συχνά ενωμένα με τις πρωτεΐνες. Από χημική άποψη, το κεντρικό τμήμα του μορίου των περισσότερων καροτενοειδών αποτελείται από μια μακριά συζυγική αλυσίδα, που περιλαμβάνει τέσσερις μονάδες ισοπρενίου, με τον κεντρικό δεσμό τύπου κεφαλή-κεφαλή. Τα άκρα της αλυσίδας μπορεί να είναι και τα δυο ανοικτά ή το ένα να είναι ανοικτό και το άλλο να έχει δακτύλιο ή και τα δυο να έχουν δακτύλιο. Μητρική ουσία των καροτενοειδών είναι το φυτοένιο, το οποίο διαθέτει μόνο τρεις συζυγικούς διπλούς δεσμούς, ενώ οι άλλοι έξι είναι μη συζυγείς. Ενζυματική αφυδρογόνωση του φυτοενίου οδηγεί στη σύνθεση του λυκοπενίου, με δεκατρείς *trans* διπλούς δεσμούς. Κυκλοποίηση του φυτοενίου προς πολυκυκλικά συστήματα, όπως το σκουαλένιο προς στερόλες και τριτερπένια δεν γίνεται, ενδεχομένως λόγω του άκαμπτου κεντρικού τριενικού συστήματος, το οποίο δεν ευνοεί διάταξη κατάλληλη για κυκλοποίηση. Όμως οι μη συζυγικοί ακραίοι διπλοί δεσμοί μπορούν να κυκλοποιηθούν και ιδιαίτερα σε ορισμένους θαλάσσιους οργανισμούς οδηγούν σε αρωματικό δακτύλιο Σχήμα 3.1.1.



Σχήμα 3.1.1. Ο σχηματισμός του αρωματικού δακτυλίου σε θαλάσσιους οργανισμούς [44].

Το χρώμα των καροτενοειδών οφείλεται στην εκτεταμένη συζυγία της κεντρικής αλυσίδας. Ανάλυση με ακτίνες X έδειξε ότι τα περισσότερα φυσικά καροτενοειδή έχουν όλους τους διπλούς δεσμούς σε *trans* διαμόρφωση, η οποία έχει μεγαλύτερη σταθερότητα, ενώ λίγα μόνο διαθέτουν συνδιασμούς *cis-trans* διαμορφώσεων. Στερεοχημικοί παράγοντες και συνεπιπεδότητα αλυσίδας και δακτυλίου είναι στοιχεία που καθορίζουν τη σταθερότητα ορισμένων ισομερών έναντι άλλων, τα οποία δεν είναι δυνατό να υπάρξουν.

Στα ζώα το β-καροτένιο είναι ένα βασικό συστατικό της διατροφής, το οποίο αφού ενυδατωθεί και διασπασθεί, αποτελεί πηγή της βιταμίνης A ή ρετινόλης. Και στα φυτά όμως τα καροτενοειδή έχουν μεγάλη φυσιολογική σημασία, διότι δρουν ως υποδοχείς της φωτεινής ακτινοβολίας, συμμετέχοντας έτσι στη φωτοσύνθεση με μετάδοση της ενέργειας διέγερσής τους στη χλωροφύλλη. Επιπλέον προστατεύουν την κυτταρική καταστροφή λόγω της φωτοοξειδωσης, η οποία προκαλείται από οξυγονούχες ρίζες και διεγερμένες καταστάσεις, που εμφανίζονται στα πρώτα στάδια της φωτοσύνθεσης. Τα καροτενοειδή είναι ασταθείς χρωστικές, ιδιαίτερα ευοξειδωτές κυρίως όταν εκτίθενται στον αέρα ή κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας. Εύκολα επίσης παθαίνουν *cis-trans* ισομερίωση κατά τη διάρκεια της κατεργασίας τους. Όλα τα παραπάνω πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επεξεργασία απομόνωσής τους. Τα διαλύματα των καροτενοειδών πρέπει να φυλάσσονται στο σκοτάδι και συνιστάται να διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία και σε ατμόσφαιρα αζώτου.

3.1.1 Κετοκαροτενοειδή

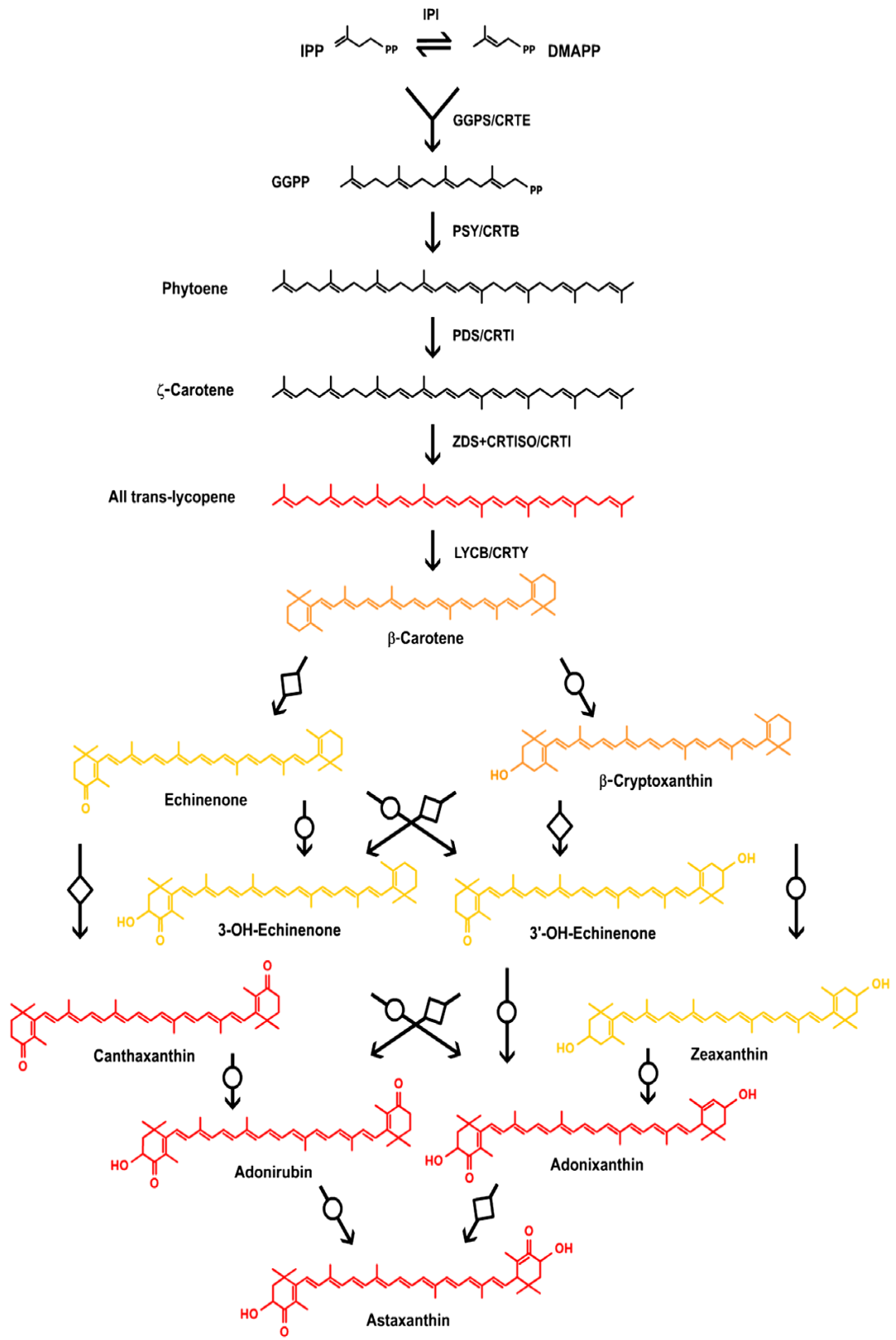
Τα κετοκαροτενοειδή αποτελούν μια ομάδα καροτενοειδών τα οποία περιέχουν τουλάχιστον μία κετο-ομάδα είτε στη γραμμική αλυσίδα είτε στο δακτύλιο β-ιονόνης [45]. Μεταξύ διαφόρων ειδών καροτενοειδών που έχουν βρεθεί στα φυτά, μανιτάρια ή βακτήρια, τα πιο σημαντικά από την βιοτεχνολογική άποψη η την χρήση τους σε υδατοκαλλιέργειες είναι η ασταξανθίνη (3,3'-διυδροξυ-β,βκαροτένιο-4,4'-διονη) και η κανθαξανθίνη (β,β-καροτένιο-4,4'-διονη) [45].

3.1.2 Ασταξανθίνη

Η ασταξανθίνη (ASX) [45] είναι μια κόκκινη χρωστική που απαντά στην οικογένεια των ξανθοφυλλών και βρίσκεται στα καρκινοειδή (γαρίδα και αστακό), καθώς και σε άλλους

θαλάσσιους οργανισμούς . Οι ζωικοί οργανισμοί, όπως πουλιά φλαμένγκο και ορτύκια δεν μπορούν να συνθέσουν την χρωστική αυτή, αλλά συσσωρεύουν σημαντική ποσότητα μέσω της διατροφής τους. Τα κετοκαροτενοειδή σπάνια βρίσκονται στα πετάλια λουλουδιών των υψηλών φυτών, αλλά πολλοί μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια της θάλασσας *Agrobacterium aurantiacum*, φύκη γλυκού νερού όπως *Haematococcus pluvialis*, και μύκητα *Xanthophyllomyces dendrorhous* μπορούν να συνθέτουν χρωστικές κετοκαροτενοειδών. Η παρουσία της υδροξύλ- και κέτο- ομάδας ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση σε σύγκριση με άλλα καροτενοειδή. Η ασταξανθίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Η αντιοξειδωτική δράση της ASX είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από των άλλων καροτενοειδών, όπως της ζεαξανθίνης, λουτεΐνης, κανθαξανθίνης και β-καροτενίου, και εκατό φορές μεγαλύτερη από τη δράση της α-τοκοφερόλης. Επίσης, συνεισφέρει στην υγεία του δέρματος και της όρασης, έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και ανασταλτική δράση οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας στον ανθρώπινο οργανισμό. Συμμετέχει στην πρόληψη της διαβητικής νεφροπάθειας, εμφανίζει αντικαρκινική δράση και παίζει ρόλο στη ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού.

Η μετατροπή του β-καροτενίου σε κανθαξανθίνη μέσω της κετοκαροτενοειδούς εκινενόνης καταλύεται από το ένζυμο BKT (κετολάση του β-καροτενίου). Η ασταξανθίνη είναι προϊόν υδροξυλίωσης του β-καροτενίου μέσω του ενζύμου υδροξυλάσης (Σχήμα 3.1.2.1). Η αντίδραση μετατροπής (ketolation) της ζεαξανθίνης σε κετοπαράγωγο μέσω αδονιξανθίνης οδηγεί στο σχηματισμό της ασταξανθίνης, σύμφωνα με την μελέτη των C. Zhu, et al [45].



Σχήμα 3.1.2.1. Βιοσυνθετική πορεία καροτενοειδών [45].

3.2 Ανασκόπηση μελετών των καροτενοειδών σε καρκινοειδή

Οι Lopes et al., [46] μελέτησαν τα καροτενοειδή της καλλιεργημένης redspotted γαρίδας *Penaeus paulensis* από την Βραζιλία, τα οποία βρέθηκαν να αποτελούνται κυρίως από ελεύθερη ασταξανθίνη (5.3mg/100g ξηρού υπολείμματος), μονοεστέρες και διεστέρες της ασταξανθίνης. Τα ίδια αποτελέσματα αναφέρθηκαν για τα είδη *Charybdis cruciata* (marine crab), *Euphasia superba* (antartic krill shrimp) από τους Sachindra et al [47]. Οι Yamaguchi et al., [48], βρήκαν ότι η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή ήταν αυξημένη στα απόβλητα κεφαλοθωράκων της άγριας γαρίδας *P. monodon* (50.2 ± 8.5 μg/g) και μειωμένη σε αυτά της καλλιεργημένης γαρίδας *P. monodon* (24.3 ± 5.5 μg/g).

Οι N.M. Sachindra et al., [47] μελέτησαν τα καροτενοειδή στα καβούρια (marine and fresh water crabs) της θάλασσας και του γλυκού νερού της Ινδίας. Συγκεκριμένα έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των καροτενοειδών στους μύες και στο κέλυφος και των δυο ειδών. Η ολική περιεκτικότητα των καροτενοειδών στα καβούρια ήταν χαμηλότερη στους μύες σε σύγκριση με το κέλυφος και των δυο ειδών, (Πίνακα 3.2.1.)

Πίνακα 3.2.1. Ολική περιεκτικότητα των καροτενοειδών στο κρέας και στο κέλυφος των καβουριών [47].

	Θαλάσσια καβούρι <i>C. cruciata</i>		Καβούρι του γλυκού νερού <i>P. potamon</i>	
Ολική περιεκτικότητα καροτενοειδών μg/g	Μύες	Κέλυφος	Μύες	Κέλυφος
	3,4±0.6	11,0±0.5	4,1±0.4	6,9±0.6

Από την μελέτη των καροτενοειδών με HPLC βρέθηκε ότι η ασταξανθίνη και οι εστέρες της ήταν τα κυριότερα καροτενοειδή στο καβούρι της θάλασσας, ενώ στο καβούρι του γλυκού νερού βρέθηκε ως κύριο καροτενοειδές η ζεαξανθίνη. Η σύσταση των κυριότερων καροτενοειδών και στα δύο είδη παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.2.

Πίνακας 3.2.2. Σύσταση [47] (g/100g των ολικών καροτενοειδών) των κυριότερων καροτενοειδών του εκχυλίσματος του καβουριού της θάλασσας και του γλυκού νερού.

	Θαλάσσια καβούρι <i>C. cruciata</i>		Καβούρι του γλυκού νερού, <i>P. potamon</i>	
	Μύες	Κέλυφος	Μύες	Κέλυφος
Ασταξανθίνη	17,3±1.1	23,6±1.4	9,3±0.6	7,2±1.0
Μονοεστέρας ασταξανθίνης	26,4±2.0	15,2 ±1.3	11,2±1.0	3,7± 1.2
Διεστέρας ασταξανθίνης	23,9 ±2.1	26,7± 2.8	16,0±1.1	3,8± 1.1
β-καροτένιο	3,6 ±1.3	5,1 ± 1.4	7,4 ±1.6	3,6 ±1.2
Ζεαξανθίνη	0,49 ±0.35	5,0 ± 1.7	42,0±2.6	74,8±4.2
Άγνωστο	27,6 ±3.9	24,4 ± 2.8	14,1±1.1	6,9± 2.1

Οι Teruhisa Katayama et al., μελέτησαν τα καροτενοειδή της γαρίδας *Peneaus japonicus* [49]. Οι χρωστικές του κελύφους και των εσωτερικών οργάνων διαχωρίστηκαν με φασματοφωτομετρία απορρόφησης και στη συνέχεια εξετάστηκαν τα φάσματα απορρόφησης και η συμπεριφορά τους στη στήλη. Τα καροτενοειδή του κελύφους ήταν η ασταξανθίνη, η φοενιχοξανθίνη, η διυδροξυπιραδιξανθίνη, η 3,3'-διυδροξυ-ε-καροτένιο, και ίχνη λουτεΐνης, ζεαξανθίνης, κανθαξανθίνης, εκινόνης, και β-καροτενίου. Οι χρωστικές των εσωτερικών του οργάνων που βρέθηκαν ήταν η ασταξανθίνη, το β-καροτένιο, η εκινόνη, η κανθαξανθίνη, η 3,3'-διυδροξυ-ε-καροτένιο και σε μικρότερο ποσοστό η διυδροξυπιραδιξανθίνη. Επίσης προτάθηκε η μεταβολική πορεία μετατροπής του β-καροτενίου σε ασταξανθίνη ως εξής:

β-καροτένιο → εκινόνη → κανθαξανθίνη → φοενιχοξανθίνη → ασταξανθίνη [49].

Η σύσταση των καροτενοειδών στα απόβλητα της γαρίδας *Pandalus borealis* βρέθηκε να αποτελείται από ασταξανθίνη 3.95%, μονοεστέρες ασταξανθίνης 19.72%, διεστέρες ασταξανθίνης 74.29% και ζεαξανθίνη 0.62% [50].

3.3 Ο ρόλος των καροτενοειδών

Είναι πλέον ευρέως γνωστό και βέβαια επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι ο ρόλος των καροτενοειδών δεν περιορίζεται απλά στην απόδοση συγκεκριμένου χρώματος στις τροφές που περιέχονται, αλλά τα καροτενοειδή, μαζί με τις βιταμίνες C και E, αποτελούν βασικά αντιοξειδωτικά [51]. Οι έρευνες μάλιστα καταδεικνύουν ότι η κατάλληλη λήψη αυτών των σημαντικών θρεπτικών συστατικών μπορεί να συμβάλει στην καθυστέρηση ή την αποτροπή της εκδήλωσης καρκίνου, καρδιακών παθήσεων, καταρράκτη και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία. Τα καροτενοειδή της διατροφής συνεισφέρουν στη συνολική πρόσληψη βιταμίνης A.

Πιστεύεται ότι δεν υπάρχει ξεχωριστή ανάγκη για β-καροτένιο ή άλλα καροτενοειδή. Παρ'όλα αυτά, πολλές επιστημονικές επιτροπές θεωρούν ότι η βέλτιστη λήψη είναι τουλάχιστον 6 mg ανά ημέρα συνολικά.

Τα καροτενοειδή εκτός ότι είναι πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης A, δρουν ως «εκκαθαριστές» ελεύθερων ριζών. Αυτό σημαίνει ότι έχουν τη δυνατότητα να προστατεύουν το ευαίσθητο περιεχόμενο των κυττάρων από βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και πιθανώς να αδρανοποιούν μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ουσίες. Χωρίς τα καροτενοειδή, τα φυτά θα καταστρέφονταν σύντομα μετά την ανατολή του ηλίου. Τα καροτενοειδή παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία από τις επικίνδυνες ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται όταν τα φυτά εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία. Καταναλώνοντας τροφές πλούσιες σε καροτενοειδή, προσφέρουμε στα κύτταρά μας παρόμοια αντιοξειδωτική προστασία.

Τα καροτενοειδή συμβάλλουν στην αποφυγή πρόκλησης βλαβών στα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από διάφορους παράγοντες, όπως ο ήλιος, ο καπνός του τσιγάρου, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων, τα εντομοκτόνα καθώς και από τις μεταβολικές διεργασίες του ίδιου του οργανισμού.

Όπως το σύμπλεγμα βιταμινών B και το μίγμα των τοκοφερολών στη βιταμίνη E, έτσι και τα καροτενοειδή δρουν καλύτερα ως μίγμα παρά ως μεμονωμένες ουσίες. Παρ'όλο λοιπόν που το β-καροτένιο είναι γνωστό για την αντιοξειδωτική του δράση, διερευνάται πλέον με ιδιαίτερο ενδιαφέρον η δράση και άλλων καροτενοειδών, κυρίως λόγω της έρευνας που γίνεται σχετικά με τη σύνδεση διατροφής και εμφάνισης ασθενειών. Θεωρείται ότι η πιο αποτελεσματική γενική προστασία του οργανισμού εξασφαλίζεται περισσότερο με τη λήψη μίγματος καροτενοειδών, παρά με τη λήψη υψηλής δοσολογίας ενός μεμονωμένου καροτενοειδούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα μεταλλικά στοιχεία παίζουν ουσιώδη ρόλο στα βιολογικά συστήματα και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Η παρουσία των μεταλλικών ιόντων στους ζώντες οργανισμούς είναι τόσο σημαντική, ώστε δεν μπορεί να υπάρξει ζωή χωρίς αυτά. Τα μέταλλα δεν είναι απαραίτητα μόνο ως στοιχείο διατροφής, η έλλειψη των οποίων μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία και επικίνδυνες καταστάσεις στον οργανισμό, αλλά αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο της δομής πολλών βιολογικά σημαντικών ενώσεων, όπως πρωτεϊνών και ενζύμων. Εκτός των ενζύμων που περιέχουν μέταλλο στη δομή τους, υπάρχουν και ένζυμα που χωρίς την παρουσία μετάλλων δεν μπορούν να εκδηλώσουν την καταλυτική τους δράση. Δεν είναι βέβαια όλα τα μέταλλα απαραίτητα για τη ζωή, γιατί πολλά απ' αυτά είναι τοξικά και άρα επιβλαβή. Στα μέταλλα της ζωής συγκαταλέγονται τα Ca, Cu, Mg, K, Zn, Mn, Sn [52].

4.1. Απαραίτητα μέταλλα για τον ανθρώπινο οργανισμό

Απαραίτητα μέταλλα θεωρούνται τα μέταλλα που βρίσκονται σε σταθερή αναλογία στους ιστούς και η έλλειψή τους από την τροφή προκαλεί διάφορες ανωμαλίες για την ανάπτυξη και συντήρηση του οργανισμού [53].

Ορισμένα από αυτά (Ca, Na και Mg) βρίσκονται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες και λέγονται μακροστοιχεία. Άλλα μέταλλα όπως Fe, Mn, Cu, Zn, Co και F βρίσκονται σε μικροποσότητες και λέγονται μικροστοιχεία. Τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία συμβάλλουν στην ομαλή διακίνηση των θρεπτικών συστατικών καθώς και στη διατήρηση της φυσιολογικής οξύτητας του αίματος και την καλή λειτουργία των εξωκρινών αδένων [54].

Χαλκός

Ο χαλκός (Cu) είναι το δεύτερο πιο άφθονο στοιχείο που απαντάται στα βιολογικά συστήματα μετά το σίδηρο και τον ψευδάργυρο. Η ποσότητα του χαλκού στον οργανισμό ως μη δεσμευμένος είναι ελάχιστη, ενώ κυρίως βρίσκεται συνδεδεμένος με ένζυμα, με αποθηκευτικές πρωτεΐνες και με πρωτεΐνες μεταφοράς [6].

Παίζει ρόλο στη δομή και λειτουργία του νευρικού συστήματος. Βοηθά στην αναπαραγωγή και είναι απαραίτητο συστατικό για την χρωμάτωση των μαλλιών. Ο χαλκός παίζει σημαντικό ρόλο στην καλή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Από την έλλειψη του χαλκού στη διαίτα μπορεί να εκδηλωθούν συμπτώματα όπως αναιμία, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, ανωμαλία στη λειτουργία της καρδιάς (λόγω μείωσης της HDL και αύξηση της LDL), σκελετικές ανωμαλίες, εκφυλισμό του νευρικού συστήματος, κακή χρωμάτωση των μαλλιών, κύρωση του ήπατος κ.ά. Σε αντίθεση, υπάρχουν ασθένειες που οφείλονται στα υψηλά επίπεδα του χαλκού στον οργανισμό όπως οι ασθένειες του Parkinson και του Alzheimer. Έρευνες έδειξαν ότι διανοητικές ασθένειες, όπως σχιζοφρένεια, συνδέονται με υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού στον εγκέφαλο.

Η τοξική πλευρά του χαλκού [52] οφείλεται στην ικανότητα του να σχηματίζει δραστικές ρίζες οξυγόνου κατά την μεταβολή της οξειδωτικής του κατάστασης από Cu (I) σε Cu (II). Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα βιολογικά μόρια και το DNA προκαλώντας βλάβη ή σχάση της έλικας, που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε καρκινογένεση. Πλούσιες πηγές σε χαλκό είναι τα οστρακοειδή, οι γαρίδες, το συκώτι, τα καρύδια, το μαύρο πιπέρι, το κακάο, τα όσπρια, τα ξηρά φρούτα κ.α.

Μαγνήσιο

Το μαγνήσιο (Mg) είναι απαραίτητο στην σύνθεση των πρωτεϊνών και είναι σημαντικός ενεργοποιητής διαφόρων ενζύμων [54]. Μαζί με το ασβέστιο, ελέγχει τη σύσπαση των μυών. Βοηθάει στην πρόληψη των καρδιακών παθήσεων και της υψηλής πίεσης. Βελτιώνει την λειτουργία των πνευμόνων και παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου. Η έλλειψη μαγνησίου μπορεί να προκαλέσει νευρομυϊκή δυσλειτουργία, αίσθημα κόπωσης και κακή απορρόφηση κάποιων συστατικών, όπως του ασβεστίου και του καλίου. Άλατα του μαγνησίου χρησιμοποιούνται ως μέταλλο-θεραπευτικά φάρμακα. Υψηλές δόσεις θα αποσταθεροποιήσουν την ισορροπία των άλλων μετάλλων και θα δημιουργήσουν ασθένειες όπως παθήσεις των νεφρών, υπόταση, γαστρεντερικά προβλήματα, ξηροδερμία, διάρροια και προβλήματα στις αρθρώσεις. Πηγές μαγνησίου είναι τα καρύδια, τα θαλασσινά, τα σκούρα πράσινα λαχανικά, τα φρούτα και το σκληρό νερό.

Σίδηρος

Ο σίδηρος (Fe) βρίσκεται στην αιμογλοβίνη (60%) και συμμετέχει στην μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Είναι συστατικό της αίμης η οποία περιέχεται σε κάποιες πρωτεΐνες, όπως στην αιμογλοβίνη και τη μυογλοβίνη, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταφορά και την αποθήκευση οξυγόνου. Επίσης, ο σίδηρος βρίσκεται κυρίως συνδεδεμένος με πρωτεΐνες και σε ένα πολύ μικρό ποσοστό απαντάται ως ελεύθερος. Αυτό οφείλεται από τη μία πλευρά στην αδιαλυτότητα του σιδήρου στο νερό και από την άλλη στο ότι ο ελεύθερος σίδηρος είναι τοξικός για τα κύτταρα. Το μέταλλο αυτό απαιτείται για τη σύνθεση του DNA διότι το ριβονουκλεοτίδιο είναι ένζυμο που εξαρτάται αυτόν [54]. Η ανεπάρκεια σιδήρου μπορεί να προκαλέσει αναιμία, η οποία εκδηλώνεται με ωχρότητα του δέρματος, κόπωση, ζαλάδα, ευαισθησία στο κρύο, εξασθένηση της αναπνοής και ταχυκαρδία. Στην καθημερινή του διατροφή ο ενήλικος άνθρωπος πρέπει να λαμβάνει περισσότερο από 10 mg Fe, ωστόσο μόνο το 10% της ποσότητας αυτής απορροφάται από τον οργανισμό. Μεγαλύτερη ανάγκη σε σίδηρο έχουν τα παιδιά, οι έφηβοι και οι γυναίκες. Κύριες πηγές σιδήρου είναι το κρέας, το συκώτι, το κοτόπουλο, το ψάρι, τα στρείδια, το κακάο και το χαβιάρι [52].

Ψευδάργυρος

Ο ψευδάργυρος (Zn) αποτελεί απαραίτητο διατροφικό στοιχείο και έχει πολλές σπουδαίες φυσικές λειτουργίες. Βοηθά στην επούλωση των πληγών, συμμετέχει στην ασβεστοποίηση των οστών και στη μεταφορά CO₂ στα ερυθρά αιμοσφαίρια και είναι απαραίτητος για υγιές δέρμα, μαλλιά και οστά. Επίσης, συμμετέχει στη σύνθεση και στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδρογονανθράκων και συμβάλλει στην ανάπτυξη και λειτουργία διάφορων οργάνων [6]. Ο ψευδάργυρος είναι συστατικό διάφορων ενζυμικών συστημάτων που συμμετέχουν στη χώνεψη και στην αναπνοή, βοηθά στη μείωση του λακτικού οξέος του σώματος μετά από έντονη μυϊκή δραστηριότητα και παίζει ρόλο στη σπερματογονία. Συμμετέχει στην εκπομπή σημάτων από το κύτταρο με σκοπό την απελευθέρωση ορμονών και τη μετάδοση ωθήσεων των νεύρων, ενώ οι πρωτεΐνες που περιέχουν ψευδάργυρο παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων και τη μεταγραφή [54]. Η έλλειψη ψευδαργύρου μπορεί να επιφέρει εξασθένηση της όρασης, καταστροφή των ιστών και νευρική ανορεξία. Η μνήμη, η ανάπτυξη του εγκεφάλου και το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί επίσης να

επηρεαστούν. Αντίθετα, η υπερβολική απορρόφηση ψευδαργύρου μπορεί να μειώσει την απορρόφηση χαλκού και σιδήρου, επειδή υπάρχει ανταγωνισμός ανάμεσα στα μεταλλικά αυτά στοιχεία στο πεπτικό σύστημα. Πλούσιες πηγές σε ψευδάργυρο είναι το μοσχαρίσιο κρέας, τα πουλερικά, το συκώτι, τα στρείδια, τα μπαχαρικά και οι σταφίδες, ενώ φτωχές πηγές είναι τα φρούτα, τα λαχανικά και το γάλα.

Μαγγάνιο

Το μαγγάνιο (Mn) βρίσκεται σε όλους τους ζώντες οργανισμούς. Τα μεγαλύτερα ποσοστά μαγγανίου στον ανθρώπινο οργανισμό παρατηρούνται στα οστά, το συκώτι και τα νεφρά. Το μαγγάνιο υποστηρίζει το ανοσοποιητικό σύστημα, ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και συμμετέχει στην παραγωγή ενέργειας και στη αναπαραγωγή των κυττάρων. Βοηθάει μαζί με τη βιταμίνη Κ στην πήξη του αίματος και στην αντιμετώπιση του stress. Υπερβολική συγκέντρωση μαγγανίου διαταράσσει το νευρομυϊκό σύστημα και προκαλεί ηπατική δυσλειτουργία.

Η έλλειψη μαγγανίου προκαλεί την εμφάνιση κόκκινου φολιδωτού εξανθήματος στο δέρμα του άνω κορμού, μπορεί να επιδεινώσει βλάβες όπως καθυστέρηση στην ανάπτυξη, σκελετικές ανωμαλίες, μειωμένη αναπαραγωγικότητα, απώλεια βάρους και μαλλιών, μειωμένη αντίληψη και κακό μεταβολισμό των λιπιδίων. Πλούσιες πηγές σε μαγγάνιο είναι το ρύζι, τα μπαχαρικά, το σιτάρι, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά και το τσάι. Αντιθέτως, βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στο κρέας και το ψάρι [52].

Σελήνιο

Το σελήνιο (Se), ως ιχνοστοιχείο είναι απαραίτητο για την διατροφή, ενσωματώνεται με αντιοξειδωτικά ένζυμα, τις σεληνιοπρωτεΐνες. Το σελήνιο παίζει ρόλο στη μείωση της απορρόφησης του υδραργύρου από τους ιστούς στα ψάρια και στον άνθρωπο. Μια πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ σεληνίου και υδραργύρου μπορεί να προκαλέσει διάφορες επιπλοκές στη δημόσια υγεία [54]. Πολύ καλές πηγές σεληνίου αποτελούν τα καρύδια, τα ψάρια, τα θαλασσινά (στρείδια), τα εντόσθια (νεφρά και συκώτι), το κρέας, τα δημητριακά, τα λαχανικά και άλλα φυτά.

Χρόμιο

Το χρώμιο (Cr) υφίσταται ως τρισθενές (Cr III) το οποίο είναι βιολογικά ενεργό και ως εξασθενές (Cr VI) το οποίο είναι τοξικό στον ανθρώπινο σώμα. Το τρισθενές χρώμιο

είναι απαραίτητο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδρογονανθράκων, επειδή βελτιώνει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα έτσι ώστε να μπορέσουν να παράγουν ενέργεια (ATP). Το χρώμιο έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει τα επίπεδα της χοληστερίνης και των τριγλυκεριδίων. Παρ'όλο που βρίσκεται σε μικρή ποσότητα παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδρογονανθράκων και στον έλεγχο του σακχάρου στους διαβητικούς. Η οστεοπόρωση στη ραχοκοκαλιά συμβαίνει συχνά όταν το χρώμιο είναι αφύσικα χαμηλό σε αναλογία με το χαλκό, το κάλιο, το σελήνιο το βανάδιο. Το χρώμιο είναι απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία του παραθυρεοειδή. Ωστόσο, ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που ευθύνεται για την απώλεια των οστών λόγω των χαμηλών επιπέδων χρωμίου, κυρίως στις δυτικές χώρες, είναι η γλυκόζη και όλες οι απλές πηγές υδατανθράκων. Η έλλειψή του μπορεί να προκαλέσει διάφορες καρδιακές καταστάσεις, ανωμαλίες στο μεταβολισμό και διαβήτη [6].

Πηγές χρωμίου είναι το μοσχάρι, το συκώτι, το κοτόπουλο, τα αβγά, οι πατάτες, τα ψάρια, οι πράσινες πιπεριές, οι μπανάνες, η μπίρα και το πόσιμο νερό. Όταν αποθηκεύονται τρόφιμα σε δοχεία χάλυβα ή κονσέρβες, οι συγκεντρώσεις του χρωμίου μπορεί να αυξηθούν [52].

Νικέλιο

Το νικέλιο (Ni) ως ιχνοστοιχείο δεν είναι τοξικό, αντιθέτως είναι απαραίτητο για διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η ενεργοποίηση ενζύμων, η ενεργοποίηση της ινσουλίνης και η ρύθμιση του ενδιάμεσου μεταβολισμού. Επίσης, σημαντική είναι η αλληλεπίδρασή του με το σίδηρο. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί χωρίς ακόμα να έχει εξηγηθεί ο μηχανισμός, ότι η έλλειψη νικελίου μειώνει την απορρόφηση του σιδήρου και ότι η έλλειψη σιδήρου ενισχύει την πρόσληψη νικελίου από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η επιβάρυνση του ανθρώπινου οργανισμού με νικέλιο (Ni) οφείλεται κυρίως στη διατροφή, το πόσιμο νερό και τον εισπνεόμενο αέρα. Μερικές επιπτώσεις του νικελίου στον ανθρώπινο οργανισμό είναι δερματικές αλλεργίες (δερματίτιδα), προβλήματα στην αναπνευστική λειτουργία όπως εμφάνιση άσθματος, προβλήματα στο ανοσοποιητικό σύστημα, απορύθμιση της ενδοκρινολογικής λειτουργίας, καρδιοαγγειακές και νεφρικές παθήσεις [52].

4.2 ΤΟΞΙΚΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Το κάδμιο (Cd) συνιστά ένα από τα σπανιότερα μέταλλα στον φλοιό της Γης. Συνήθως αποτελεί πρόσμιξη στα ορυκτά του ψευδαργύρου [55]. Βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην κατασκευή μπαταριών ενώ η παρουσία του είναι έντονη κοντά σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις, μονάδες επεξεργασίας ψευδαργύρου και σιδήρου και εγκαταστάσεις αποτέφρωσης αποβλήτων. Κάποιες δευτερεύουσες χρήσεις αφορούν την κατασκευή ανθεκτικών στην διάβρωση κραμάτων με σίδηρο και άλλα μέταλλα. Δεν θεωρείται απαραίτητο για τον ανθρώπινο οργανισμό στοιχείο, αντίθετα εμφανίζει τοξικότητα είτε ως μέταλλο είτε υπό μορφή ενώσεων. Λόγω της παρόμοιας χημικής του συμπεριφοράς με τον ψευδάργυρο, έχει την ικανότητα να τον αντικαθιστά και να προκαλεί βλάβες και δυσλειτουργίες στον οργανισμό. Βιοσυσσωρεύεται στα νεύρα και στο συκώτι, ενώ υπάρχουν έντονες υποψίες και για καρκινογόνο δράση. Στην ταξινόμηση του IARC του 1993, το κάδμιο και οι ενώσεις του κατατάχτηκαν στην ομάδα I (καρκινογόνες ουσίες στον άνθρωπο). Παράδειγμα χρόνιας έκθεσης σε κάδμιο αποτέλεσε η ασθένεια Itai-Itai που παρατηρήθηκε στην Βόρεια Ιαπωνία.

Ο μόλυβδος (Pb) [55] αποτελεί ένα μέταλλο του οποίου η χρήση ξεκίνησε ήδη από την κλασική εποχή. Απαντά στον γήινο φλοιό σε ποσοστό 0,0018%. Σήμερα χρησιμοποιείται στην παραγωγή ηλεκτρικών στοιχείων, σε εγκαταστάσεις χύτευσης και γενικά στην μεταλλουργία. Τα τελευταία 50 χρόνια αυξήθηκε ραγδαία η χρήση του στην πετρελαϊκή βιομηχανία ως οργανομεταλλικό πρόσθετο στην βενζίνη κίνησης. Όπως και το κάδμιο, δεν είναι απαραίτητο στον άνθρωπο. Μπορεί να εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό με κατάποση, εισπνοή ή (πιο δύσκολα) με απευθείας απορρόφηση από το δέρμα. Σε οποιαδήποτε μορφή είναι τοξικός, αλλά ιδιαίτερα δραστικά είναι τα αλκυλιωμένα παράγωγα του, που προκαλούν νευρολογικές βλάβες. Παρουσιάζει βιοσυσσώρευση στα οστά και επηρεάζει την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα πολλές δυσλειτουργίες.

Το αρσενικό (As) είναι ένα από τα τοξικότερα στοιχεία που μπορεί να βρεθούν. Οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν στο αρσενικό μέσω των τροφίμων, του νερού και του αέρα [6]. Η έκθεση μπορεί επίσης να γίνει μέσω της επαφής του δέρματος με το χώμα ή το νερό που περιέχει αρσενικό. Τα επίπεδα αρσενικού στα τρόφιμα είναι αρκετά χαμηλά. Τα ψάρια και τα θαλασσινά απορροφούν το αρσενικό από το νερό στο οποίο ζουν.

Ευτυχώς, αυτή είναι κυρίως η λιγότερο βλαβερή οργανική μορφή του αρσενικού, αλλά τα ψάρια που περιέχουν σημαντική ποσότητα ανόργανου αρσενικού μπορεί να είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία.

Η έκθεση στο ανόργανο αρσενικό μπορεί να έχει διάφορες επιπτώσεις στην υγεία, όπως ενοχλήσεις στο στομάχι και το έντερο, μειωμένη παραγωγή ερυθρών και λευκών κυττάρων αίματος, αλλαγές στο δέρμα και ενοχλήσεις στους πνεύμονες. Η λήψη σημαντικών ποσοτήτων ανόργανου αρσενικού μπορεί να ενισχύσει τις πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος, καρκίνου των πνευμόνων, καρκίνου στο συκώτι και λεμφατικού καρκίνου. Η έκθεση στο ανόργανο αρσενικό μπορεί να προκαλέσει στειρότητα και αποβολές στις γυναίκες και ακόμη μπορεί να προκαλέσει δερματικές διαταραχές, μειωμένη αντίσταση σε μολύνσεις, καρδιακές ανωμαλίες και εγκεφαλικές βλάβες σε άνδρες και γυναίκες. Τέλος, το ανόργανο αρσενικό μπορεί να βλάψει το DNA. Το οργανικό αρσενικό δεν μπορεί να προκαλέσει ούτε καρκίνο, ούτε βλάβη στο DNA. Αλλά η έκθεση σε υψηλές δόσεις έχει επίπτωση στην ανθρώπινη υγεία, όπως νευρικές βλάβες και πόνους στο στομάχι.

Το εξασθενές χρώμιο (Cr VI) [6] αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Συνήθης τρόπος πρόσληψης του από τον άνθρωπο είναι το μολυσμένο νερό φρέατος. Τα προβλήματα υγείας που προκαλούνται από το χρώμιο (VI) είναι δερματικά εξανθήματα, στομαχικές διαταραχές και έλκη, αναπνευστικά προβλήματα και βλάβες στα νεφρά και στο ήπαρ. Μπορεί να αποδυναμώσει το ανοσοποιητικό σύστημα, να προκαλέσει αλλαγή του γενετικού υλικού, καρκίνο των πνευμόνων, ακόμη και θάνατο. Γνωρίζοντας την τοξικότητα και προκειμένου να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα των επιδράσεων των τοξικών ουσιών στον άνθρωπο, χρησιμοποιείται ο όρος «προσωρινή ανεκτή εβδομαδιαία δόση» (PTWI), δηλαδή η μέγιστη ποσότητα της ουσίας σε mg/kg σωματικού βάρους, που μπορεί να ληφθεί χωρίς επιπτώσεις σε χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας.

Ο υδράργυρος (Hg) είναι ένα αντιδρών βαρύ μέταλλο το οποίο προέρχεται από φυσικές πηγές [52]. Από την ατμόσφαιρα ο υδράργυρος μετακυλά στο νερό της βροχής και μέσω αυτής μεταφέρεται στις λίμνες και τους ωκεανούς, όπου μετατρέπεται μέσω μικροβιακής δραστηριότητας σε οργανικό μεθυλικό υδράργυρο, το οποίο απορροφάται άμεσα και μεταφέρεται ενεργά μέσα στους ιστούς. Συγκεκριμένα ο μεθυλδράργυρος είναι εξαιρετικά τοξικός στους θαλάσσιους οργανισμούς, στο ευρύτερο περιβάλλον και επομένως και στον άνθρωπο. Δηλητηριάσεις από υδράργυρο καταναλώνοντας θαλασσινά

έχουν αναφερθεί σε ακτές του Περού και της Μεσογείου. Σε ορισμένα περιστατικά, διάφορα προϊόντα αλιείας έχουν αποσυρθεί ως ακατάλληλα εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης υδραργύρου. Άλλες επιδράσεις του υδραργύρου στον άνθρωπο είναι βλάβη στις εγκεφαλικές λειτουργίες, στο DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις με συνέπεια το δερματικό κνησμό, την κούραση και τους πονοκεφάλους, ενώ επιδρά αρνητικά στην αναπαραγωγή, προκαλώντας βλάβη του σπέρματος και αποβολές. Η τοξικότητα του υδραργύρου στα τρόφιμα είναι πολύ σπάνια και σχεδόν πάντα προκαλείται από την περιβαλλοντική ρύπανση.

4.3 Μέταλλα στους θαλάσσιους οργανισμούς

Τα μέταλλα αποτελούν φυσικά συστατικά του θαλάσσιου περιβάλλοντος, αν και εισάγονται σε αυτό και από ανθρωπογενείς πηγές. Βαρέα μέταλλα, όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος και ο σίδηρος είναι ουσιώδη για το μεταβολισμό των θαλάσσιων οργανισμών, ενώ μερικά άλλα όπως ο υδράργυρος, το κάδμιο και ο μόλυβδος δεν έχουν γνωστό ρόλο στα βιολογικά συστήματα [6].

Η μελέτη της συγκέντρωσης των μετάλλων σε διάφορους ιστούς των θαλάσσιων οργανισμών είναι χρήσιμη στη ταυτοποίηση του οργάνου που εμφανίζει ειδική επιλεκτικότητα και ευαισθησία στη συσσώρευση. Προηγούμενες έρευνες που αφορούσαν συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στα καρκινοειδή έχουν ανακαλύψει την τάση μερικών στοιχείων να συσσωρεύονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Για παράδειγμα, στα επινεφρίδια και στο ηπατοπάγκρεας συσσωρεύονται υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου από τους μυες. Αντίθετα, ο ψευδάργυρος βρέθηκε περισσότερο στα σπλάχνα και στους μύες από τους άλλους ιστούς. Η αυξημένη συγκέντρωση ψευδαργύρου στα σπλάχνα και στους μυες οφείλεται κυρίως στο ρόλο του ως ενεργοποιητής των πολυάριθμων ενζύμων που υπάρχουν στο ηπατοπάγκρεας και τα μιτοχόνδρια των καρκινοειδών. Στα είδη *Palaemonetes varians* και *Dorippe granulata* βρέθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις χαλκού στα βράγχια και χαμηλότερες στον εξωσκελετό ενώ σε άλλα καρκινοειδή ήταν το ηπατοπάγκρεας που περιείχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε χαλκό.

Η συσσώρευση [6] βαρέων μετάλλων στον ιστό εξαρτάται κυρίως από τις συγκεντρώσεις των μετάλλων σε νερό καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως αλατότητα, pH, σκληρότητα νερού και θερμοκρασία. Οικολογικές απαιτήσεις, φύλο, μέγεθος και

αναπαραγωγή των θαλάσσιων οργανισμών βρέθηκαν, επίσης, να επηρεάζουν τη συσσώρευση μετάλλων στους ιστούς τους.

Το μέγεθος των θαλάσσιων οργανισμών παίζει σημαντικό ρόλο στο περιεχόμενο σε μέταλλα στους ιστούς καθώς και η μεταβολική τους δραστηριότητα. Για παράδειγμα, η μεταβολική δραστηριότητα ενός νεαρού ατόμου είναι φυσιολογικά υψηλότερη σε σχέση με αυτήν ενός μεγαλύτερου ατόμου, με αποτέλεσμα τα μέταλλα να συσσωρεύονται περισσότερο στα νεαρά άτομα παρά στα μεγαλύτερα.

Οι θαλάσσιες εκτάσεις της Μεσογείου είναι εκτεθειμένες σε ανθρωπογενείς επιδράσεις, όχι μόνο λόγω της εντατικής αλιείας, αλλά και λόγω της ρύπανσης από βιομηχανίες, τη γεωργία και τις υδατοκαλλιέργειες στις παράκτιες περιοχές. Συγκεκριμένα, οι γαρίδες επειδή μεταβολίζουν αρκετούς από τους ρύπους θεωρούνται ότι αποτελούν βιο-ένδειξη της μόλυνσης του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα [57].

4.4 Μέγιστες τιμές ανοχής (MRL) των τοξικών μετάλλων στα καρκινοειδή

Ο κανονισμός (ΕΚ) 1881/2006 (για τον καθαρισμό μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμίξεις στα τρόφιμα) [58] καθορίζει τις μέγιστες τιμές του καδμίου, του μόλυβδου και υδραργύρου στα τρόφιμα. Οι μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές για το κάδμιο, υδράργυρο και το μόλυβδο παρουσιάζονται παρακάτω:

	ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ ΑΝΟΧΗΣ (mg/kg)		
	Κάδμιο	Μόλυβδος	Υδράργυρος
ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ	0,5	0,5	0.5

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός και η μελέτη της μοριακής δομής των φωσφολιπιδίων και αρσενολιπιδίων και ο προσδιορισμός των καροτενοειδών, στους μύες και κεφαλοθώρακες της γαρίδας *Penaeus kerathurus*, τα οποία αποτελούν ενώσεις με σημαντικές βιολογικές δράσεις. Επίσης και ο προσδιορισμός μετάλλων και μεταλλοειδών όπως Fe, Cu, Zn, Mn, Se, Mg, Ni, Cr, Cd, As, Pb, Hg. Για αυτό το λόγο εφαρμόστηκε συνδυασμένη μεθοδολογία, η οποία περιελάμβανε τεχνικές HPLC, LC-MS/MS, NMR, φασματομετρικές κ.α.

Ο λόγος που επιλέχθηκε *P. kerathurus* είναι ότι οι γαρίδες αποτελούν σημαντικό μέρος της μεσογειακής διατροφής και καταναλώνονται σε μεγαλύτερη κλίμακα από τα υπόλοιπα καρκινοειδή (αστακοί, караβίδες, καβούρια). Από τα διάφορα είδη γαρίδας η *P. kerathurus* είναι το πλέον δημοφιλές είδος και καταναλώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ αποτελεί και αντικείμενο ιχθυοκαλλιέργειας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.α Συλλογή και επεξεργασία γαρίδων *P. kerathurus*



Εικόνα 1. Δείγματα γαρίδας *P. kerathurus*

29 ενήλικες γαρίδες του είδους *Penaeus kerathurus* που αλιεύθηκαν από την θαλάσσια περιοχή του Πλαταμώνα, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Αρχικά μετρήθηκε το μήκος και το βάρος κάθε γαρίδας χωριστά και βρέθηκε ότι ο μέσος όρος του μήκους ήταν 17,9 cm και ο μέσος όρος του βάρους 21.2 g. Στη συνέχεια αποχωρίστηκαν οι ουρές (μύες-βρώσιμο τμήμα) από τους κεφαλοθώρακες, αφαιρέθηκαν από τους μύες το κέλυφος και το έντερο και ζυγίστηκαν οι μύες (317.84 g) και οι κεφαλοθώρακες χωριστά (229.1 g).

Παραλήφθηκαν οι μύες και οι κεφαλοθώρακες από 20 γαρίδες συνολικού βάρους 219,2 g μυών και 158,0 g κεφαλοθωράκων χωριστά, για την εκχύλιση του λίπους με την μέθοδο Bligh-Dyer [59].

Για τους προσδιορισμούς τέφρας, υγρασίας και πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυών και κεφαλοθωράκων που προέρχονται από 9 γαρίδες *P. kerathurus* των οποίων το βάρος των μυών ήταν 98,64g και των κεφαλοθωράκων 71,1 g, τα οποία στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε λυοφυλίωση και ομογενοποιήθηκαν χωριστά σε γουδί από αχάτη.

5.1 Εκχύλιση λιπιδίων κατά Bligh-Dyer [59]

Αντιδραστήρια και όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (CHCl_3 , CH_3OH , H_2O) αναλυτικής καθαρότητας
- Σφαιρικές φιάλες των 100 ή 250 ml.
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Rotavapor BuchRE III.

Αναλυτική πορεία

Παραλήφθηκε δείγμα μυών και κεφαλοθωράκων χωριστά (όπως περιγράφεται στο 5.α) ομογενοποιήθηκε και εκχυλίσθηκαν τα λιπίδια κάθε ιστού με χλωροφόρμιο/μεθανόλη (1:2 v/v). Το μίγμα των εκχυλισμάτων διηθήθηκε σε χωνί Buchner και το ίζημα-υπόλειμμα μυών και κεφαλοθωράκων χωριστά, εκπλύθηκε με διάλυμα χλωροφορμίου/μεθανόλης/ νερού 1:2:0.8 (v/v/v). Τα ενωμένα διηθήματα κάθε ιστού συλλέχθηκαν χωριστά και μεταφέρθηκαν σε διαχωριστικές χοάνες. Συμπληρώθηκε ο όγκος με υπολογισμένες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού, έτσι ώστε η αναλογία χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού να καταστεί περίπου ίση με 1:1:0.9 (v/v/v), προκειμένου να γίνει το σύστημα διφασικό. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων στη χοάνη, παραλήφθηκε η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση) για τη μελέτη των λιπιδίων. Σε περίπτωση που κατά το διαχωρισμό των δύο φάσεων δημιουργηθεί γαλάκτωμα, προστίθεται NaCl και αναταράσσεται η χοάνη για να διαλυθεί το γαλάκτωμα. Στη συνέχεια ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε περιστρεφόμενη συσκευή κενού (Flash Evaporator) στους 30-32°C και τα λιπίδια αναδιαλύθηκαν σε διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 9:1 (v/v) και φυλάχθηκαν στο ψυγείο για περαιτέρω μελέτη.

5.2 Λυοφυλίωση- Προσδιορισμός Υγρασίας [60, 61]

Όργανα

LabconcoFreezone 4.5

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην κατάψυξη του υλικού και στη συνέχεια στην εξάχνωση του πάγου. Η εξάχνωση επιτυγχάνεται διατηρώντας μια διαφορά τάσης ατμών μεταξύ του

μετώπου του πάγου του τροφίμου και του άμεσου περιβάλλοντος. Η πλήρης ξήρανση γίνεται σε τρία στάδια: α) Με την ψύξη το νερό απομακρύνεται από τα εφυδατωμένα συστατικά της τροφής σχηματίζοντας κρυστάλλους ή εύτηκτα μίγματα (αυτό έγινε πριν την τοποθέτηση του υλικού στο θάλαμο ξήρανσης σε βαθιά κατάψυξη), β) με εξάχνωση απομακρύνεται ο πάγος, γ) το υγρό παραμένει στο σύστημα freeze-drying και εξατμίζεται με απλή ανύψωση της θερμοκρασίας.

Η μέθοδος στηρίζεται στην εξασφάλιση συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης κάτω από το τριπλό σημείο του νερού, δηλαδή 0 °C και 4,7 mmHg. Το τριπλό σημείο του νερού προκύπτει από διαγράμματα πίεσης – θερμοκρασίας και είναι το σημείο στο οποίο τέμνονται η καμπύλη τάσης των κορεσμένων ατμών, η καμπύλη τήξεως και η καμπύλη εξάχνωσης και στο οποίο συνυπάρχουν σε ισορροπία και οι τρεις φάσεις (στερεό-υγρό-αέριο).

Στην πράξη η λυοφυλίωση γίνεται με πίεση μικρότερη του 1mm στήλης Hg και θερμοκρασία από -4 έως -16 °C. Αν το κενό διατηρείται στην περιοχή 0,1- 2 mm στήλης Hg και η θερμοκρασία ελέγχεται, ώστε να μην τήκεται ο πάγος, η εξάχνωση προσχωρεί στην επιφάνεια και το μέτωπο του πάγου υποχωρεί προς το κέντρο του τροφίμου.

5.3 Προσδιορισμός τέφρας [61]

Όργανα

- Φούρνος
- Πυριαντήριο
- Πορσελάνινο χωνευτήριο
- Ζυγός ακριβείας

Αναλυτική πορεία

Σε προζυγισμένο χωνευτήριο πορσελάνης ζυγίσθηκε 1g δείγματος (το οποίο επεξεργάσθηκε όπως περιγράφεται στο 5.α) και τοποθετήθηκε στο φούρνο στους ~200°C για 2h μέχρι σταθερού βάρους. Ακολούθως, το υπόλειμμα αφέθηκε στους ~550°C για 5h μέχρι τέλειας καύσεως (αποτέφρωση). Αφού ψύχθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στον ξηραντήρα, ζυγίσθηκε το παραμένον άκαυστο υπόλειμμα και υπολογίσθηκε η περιεκτικότητα του δείγματος σε τέφρα επί τοις εκατό.

5.4 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Kjeldahl [63]

Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδο, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αζώτου στα τρόφιμα. Κατά τη μέθοδο Kjeldahl υπολογίζεται το ολικό άζωτο και στη συνέχεια η πρωτεΐνη με ένα ειδικό συντελεστή για κάθε τρόφιμο. ($\Sigma \psi \acute{\alpha} \rho \iota \alpha = 6.25$)

Συσκευές και όργανα

- Συσκευή Kjeldahl
- Συσκευή απόσταξης
- Προχοΐδα

Αντιδραστήρια

- Άνυδρο K_2SO_4
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- π. H_2SO_4 ελεύθερο αζώτου
- HCl 0,1N
- NaOH 40%
- H_3BO_3 2%
- Δείκτης: Mixed indicator acc. to SHER (BÜCHI, Switzerland)

End point pH 4.65, Color: brown- grey. Warning point: change of color to blue
End point: change of color to brown grey. Partno. :003512

Αναλυτική πορεία

Ζυγίσθηκαν 0,5 έως 1,0 g ξηρού δείγματος (το οποίο επεξεργάστηκε όπως περιγράφεται στο 5.α) και μεταφέρθηκαν στη φιάλη Kjeldahl. Προστέθηκε ο καταλύτης (14 g K_2SO_4 και 1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) και 20 ml π. H_2SO_4 ελεύθερου αζώτου. Οι φιάλες Kjeldahl μεταφέρθηκαν στην συσκευή Kjeldahl και ξεκίνησε πρώτα το κενό και μετά η θέρμανση. Η καύση διήρκεσε περίπου 45-60 λεπτά (το διάλυμα απέκτησε γαλαζοπράσινο χρώμα).

Διακόπηκε η θέρμανση και οι φιάλες Kjeldahl μεταφέρθηκαν εκτός συσκευής για να κρυώσουν. Προστέθηκαν 40 ml νερού και 120 ml NaOH 40% και πραγματοποιήθηκε απόσταξη με υδρατμούς. Το απόσταγμα συλλέχθηκε σε μια κωνική η οποία περιείχε 60 ml H_3BO_3 2% και 1 ml δείκτη, ενώ το σωληνάκι της συσκευής μέσω του οποίου συλλέχθηκε το απόσταγμα θα πρέπει να είναι βυθισμένο στο διάλυμα του βορικού οξέος, ώστε να μην διαφεύγει η αποσταζόμενη αμμωνία, η απόσταξη διήρκεσε περίπου 3-4 λεπτά, μέχρι να συλλεχθούν περίπου 100 ml αποστάγματος. Ακολούθησε ογκομέτρηση του περιεχομένου της κωνικής με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0,1N και τα ml που καταναλώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ολικού αζώτου. Το διάλυμα στο τελικό σημείο έχει πορτοκαλί χρώμα. Για καλύτερα αποτελέσματα γίνεται παράλληλα και τυφλός προσδιορισμός.

5.5 Προσδιορισμός μετάλλων

5.5.1 Υγρή χώνευση [64]

Μετά την ξήρανση των δειγμάτων, παραλαβή των συνολικών ανόργανων συστατικών με τη μέθοδο της υγρής χώνευσης. Τα σκεύη και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την κατεργασία των δειγμάτων ήταν στο σύνολό τους γυάλινα ή πλαστικά. Η χρήση μεταλλικών σκευών απεφεύχθη επιμελώς, ενώ οι χειρισμοί γίνονταν πάντα με γάντια πολυαιθυλενίου. Όλα τα σκεύη, γυάλινα και μη, που χρησιμοποιήθηκαν, παλαιώθηκαν για μια εβδομάδα με νιτρικό οξύ 65% και εκπλύθηκαν επανειλημμένως με δις αποσταγμένο νερό Milli-Q.

Συσκευές

- Οβίδες από τυφλόν
- Ογκομετρική φιάλη των 25ml
- Θερμαντική πλάκα

Αντιδραστήρια

- Νιτρικό οξύ 65%, Suprapur (Merck)
- Δις απιονισμένο νερό Milli-Q

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα δείγματος 0,5g (το οποίο επεξεργάστηκε όπως περιγράφεται στο 5.α), ζυγίστηκε με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων εισήχθηκε σε δοχείο τεφλόν.

Προστέθηκαν 8-10 ml HNO₃ 65% (suprapur) και το σκεύος θερμάνθηκε σε θερμομαντική πλάκα για 5 ώρες στους 100 °C. Το διαυγές διάλυμα που προέκυψε από τη χώνευση παραλήφθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml με 1N HNO₃.

5.5.2 Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης [65,66]

α) Με φλόγα (Φλογοφασματομετρία)

Ο ρόλος της φλόγας είναι να φέρει το μελετούμενο στοιχείο σε ατομική μορφή. Οι λύχνι που χρησιμοποιούνται στην ατομοποίηση με φλόγα βασίζονται στην αρχή της προανάμιξης στρωτής ροής, όπου το κατάλληλο καύσιμο αέριο και το οξειδωτικό αναμειγνύονται και στη συνέχεια οδηγούνται στη φλόγα. Το δείγμα του αερολύματος αναμειγνύεται με τα αέρια πριν την καύση. Κατά την διάρκεια της καύσης το αέριο έχει ατομοποιηθεί και τότε μπορεί να απορροφήσει ακτινοβολία. Τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα εντός της φλόγας, κατά τον ψεκασμό διαλύματος της ένωσης του μεταλλοϊόντος είναι:

- Εξάτμιση του διαλύτη
- Εξάχνωση-μετατροπή του στερεού σε αέρια κατάσταση
- Διάσπαση των μορίων σε ουδέτερα άτομα ή ρίζες
- Θερμική διέγερση μέρους των ουδετέρων ατόμων λόγω συγκρούσεων ή ιοντισμός τους.
- Πιθανός σχηματισμός οξειδίων των μετάλλων που οδηγεί σε χημικές παρεμποδίσεις.

β) Με Ηλεκτροθερμική Ατομοποίηση

Από τους τύπους των τεχνικών της ατομικής απορρόφησης χωρίς φλόγα η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι ο θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη. Οι φούρνοι χρησιμοποιούνται για να ατομοποιήσουν στερεά, πυκνά εναιωρήματα και διαλύματα για την ατομική απορρόφηση. Τα πιο συνηθισμένα στάδια της ηλεκτροθερμικής ατομοποίησης είναι τα εξής :

- Ξήρανση του δείγματος
- Απανθράκωση /πυρόλυση του υποστρώματος του δείγματος

- Ατομοποίηση
- Καθαρισμός του γραφίτη

Τα πλεονεκτήματα της ατομοποίησης χωρίς φλόγα σε σχέση με την ατομοποίηση με φλόγα είναι η υψηλότερη ευαισθησία (ppb), η δυνατότητα ανάλυσης μικρών όγκων και η δυνατότητα αυτοματοποίησης με τη χρήση αυτόματου δειγματολήπτη, γεγονός που συμβάλλει στην καλύτερη επαναληψιμότητας σε σχέση με τη συμβατική έγχυση.

Αναλυτική πορεία

- Ο προσδιορισμός του σιδήρου, χαλκού, σεληνίου, μαγγανίου, νικελίου, χρωμίου, καδμίου, μολύβδου και αρσενικού έγινε με **ηλεκτροθερμική φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (ETAAS)** και με διόρθωση σήματος υποβάθρου μέσω του φαινομένου Zeeman (με χρήση του φασματοφωτομέτρου ατομικής απορρόφησης PerkinElmerModelSIMAA 6000).
- προσδιορισμός του μαγνησίου, ψευδαργύρου έγινε με **Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με Φλόγα (FAAS)** (με χρήση του φασματοφωτομέτρου ατομικής απορρόφησης Perkin Elmer 2380 με διόρθωση υποβάθρου με λυχνία D₂).
- Για τον υδράργυρο χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ψυχρού ατμού φασματοφωτομέτρου ατομικής απορρόφησης (με Perkin Elmer Analyst 700 εξοπλισμένο με FIAS 400).

5.6 Σταθμικός προσδιορισμός λιπιδίων [60]

Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για προσδιορισμό του ξηρού βάρους των λιπιδίων, ύστερα από απομάκρυνση του διαλύτη και απόκτηση σταθερού βάρους.

Αναλυτική πορεία

Σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζύγισης φέρεται ορισμένος όγκος εκχυλίσματος λιπιδίων (χλωροφορμική φάση από B-D) και απομακρύνεται ο διαλύτης με ρεύμα αζώτου. Έπειτα το φιαλίδιο τοποθετείται σε ξηραντήρα για 48h και ζυγίζεται μέχρι σταθερού βάρους.

Από τη διαφορά βάρους του φιαλιδίου πριν και μετά, υπολογίζεται το ξηρό βάρος των λιπιδίων.

5.7 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας [67,68]

5.7.1 Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPTLC)

5.7.2 Μονοδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (HPTLC)

Αναλυτική πορεία

Οι πλάκες για αναλυτική χρήση χωρίστηκαν σε παράλληλες κάθετες λωρίδες πλάτους 1,5-2,0cm. Το διάλυμα του δείγματος ή του προτύπου λιπιδίου, όγκου 10-20μλ, τοποθετήθηκε με μικροσύριγγα σε κάθε λωρίδα και σε ύψος περίπου 2 cm. Η ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας έγινε σε κορεσμένο θάλαμο με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν το μέτωπο του διαλύτη έφθασε μέχρι στο επιθυμητό ύψος (περίπου 17cm), οι πλάκες ανασύρθηκαν από το θάλαμο και παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος να στεγνώσουν.

5.7.3 Εμφάνιση χρωματογραφήματος

1. Έκθεση σε ατμούς ιωδίου [69]

Όλα τα είδη λιπιδίων εμφανίζονται ως κίτρινες ή καστανόχρωμες κηλίδες. Πλεονεκτεί, γιατί είναι απλή, σύντομη και επιτρέπει στη συνέχεια τη χρήση άλλων ειδικών αντιδραστηρίων εμφάνισης, εφόσον το ιώδιο κατά την παραμονή του στον αέρα εξαχνώνεται.

2. Καύση των κηλίδων με θειικό οξύ [70]

Είναι γενικό αντιδραστήριο εμφάνισης. Η πλάκα ψεκάζεται ομοιόμορφα με διάλυμα θειικού οξέος 50% και θερμαίνεται στους 120 °C για 10 min. Έτσι, κάθε οργανική ένωση απανθρακώνεται και εμφανίζεται σαν μαύρη κηλίδα.

3. Αντιδραστήριο νινυδρίνης.

Είναι αντιδραστήριο εμφάνισης αμινοξέων, αμινών και αμινοσακχάρων. Η πλάκα ψεκάζεται ομοιόμορφα με διάλυμα 0,2% (w/v) νινυδρίνης σε αιθανόλη και θερμαίνεται

στους 110 °C για 5-10 min. Όσες ενώσεις περιέχουν πρώτο ταγή και δεύτερο ταγή αμινομάδα εμφανίζονται σαν κόκκινο – βιολετί κηλίδες.

4. Αντιδραστήριο Dittmer-Lester [71]

Ειδικό αντιδραστήριο εμφάνισης των φωσφο(νο) λιπιδίων. Παρασκευάζεται με την ανάμειξη ίσων όγκων των παρακάτω διαλυμάτων και τόσης ποσότητας νερού (7-8 όγκοι) ώστε το τελικό διάλυμα να γίνει γαλαζοπράσινο.

Διάλυμα Α: 40,11 g MoO₃ διαλύονται σε 1L H₂SO₄ 25N. (Η διάλυση υποβοηθείται με ήπια θέρμανση).

Διάλυμα Β: 1,78 g σκόνης μεταλλικού Mo προστίθενται σε 500ml διαλύματος Α και το μίγμα βράζεται για 5 min. Ο ψεκασμός με το αντιδραστήριο εμφανίζει όσες ενώσεις περιέχουν φωσφόρο σαν μπλε κηλίδες.

5.8 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου [72,73, 74]

Όργανα

- Φασματόμετρο ορατού υπεριώδους (UV-VIS), Spectronic 210 της Bausch-Lomb
- Αμμόλουτρο ή ελαιόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας 170-180°C
- Κυκλοαναδευτήρας
- Μακρόλαιμοι σωλήνες Pyrex

Αντιδραστήρια

- Υπερχλωρικό οξύ 72% (HClO₄ 12N)
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4%, 2,125g μολυβδαινικού αμμωνίου 4 H₂O διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500mL (Προσοχή, το αντιδραστήριο αυτό δεν πρέπει να χρησιμοποιείται μετά από 10 μήνες).
- Διάλυμα ANSA (αμίνιο- ναυθόλο-σουλφονικό οξύ): Διαλύονται 30g NaHSO₃ ή 28,5 g Na₂S₂O και 6g Na₂SO₃ σε 250 mL απεσταγμένο νερό. Στο προκύπτον διάλυμα διαλύονται 0,5 g ANSA. Το διάλυμα αφήνεται 3 ώρες σε ηρεμία και αν σχηματισθεί ίζημα διηθείται. Φυλάσσεται στο ψυγείο και θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από την ημέρα της παρασκευής του.

-Αντιδραστήριο ANSA: Πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού αναμιγνύονται 4mL διαλύματος ANSA με 6 mL νερού.

-Πρότυπο διάλυμα KH_2PO_4 : Το KH_2PO_4 ξηραίνεται στους 105°C για μια ώρα. Διαλύονται 175,75 mg KH_2PO_4 σε 100mL νερού. 1mL του διαλύματος αυτού περιεκτικότητας 1,7575 mg/mL αραιώνεται στα 100 mL οπότε προκύπτει διάλυμα περιεκτικότητας σε φώσφορο 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

-Προεπιστρωμένες πλάκες 20x20 cm (Merck)

-Οξικός αιθυλεστέρας (Merck)

Αναλυτική πορεία:

Δείγματα εν διαλύσει: Δείγματα λιπιδίων περιεκτικότητας 0,5-4 μg φωσφόρου μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες Pyrex 18x180 mm, εξατμίστηκε ο διαλύτης μέχρι ξηρού, σε ρεύμα αζώτου και προστέθηκαν 0,5 mL HClO_4 72%. Συγχρόνως παραλήφθηκαν 5 δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν μόνο 0,5 mL HClO_4 72% για τα πρότυπα δείγματα και τον τυφλό προσδιορισμό. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ελαιόλουτρο ή αμμόλουτρο θερμοκρασίας $170-180^\circ\text{C}$ για μια ώρα. Στη συνέχεια ψύχθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστέθηκαν 1mL νερό, 3mL μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4% και 0.5 mL αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου ακλούθησε καλή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα. Στους τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες των προτύπων προστέθηκαν 0.2,0.5 και 1mL προτύπου διαλύματος KH_2PO_4 αντίστοιχα και νερό μέχρι συνολικού όγκου 1 mL. Για τον τυφλό προσδιορισμό προστέθηκε μόνο 1mL νερό και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Κατόπιν οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ζέον υδρόλουτρο για 10 λεπτά και ψύχθηκαν για 20 λεπτά ώστε να αναπτυχθεί πλήρως το χρώμα. Τα πρότυπα και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 820 nm έναντι λευκού προσδιορισμού. Κατά τη διάρκεια της φωτομέτρησης απαιτείται συνεχής ανάδευση των δειγμάτων ώστε το χρώμα να κατανέμεται ομοιόμορφα.

β) Δείγματα που προέρχονται από TLC

Δείγματα πολικών ή ολικών λιπιδίων (περιεκτικότητας 10-16 μg φωσφόρου) υποβλήθηκαν σε δισδιάστατο χρωματογραφικό διαχωρισμό με το ακόλουθο σύστημα ανάπτυξης: 1^η διάστατη, χλωροφόρμιο/ μεθανόλη/οξικό οξύ/νερό (50:25:6:2 v/v/v/v), 2^η διάστατη, χλωροφόρμιο /μεθανόλη/ νερό (65:20: 3 v/v/v). Μετά την έκθεση της πλάκας

σε ατμούς ιωδίου τα τμήματά του που αντιστοιχούν σε κάθε συστατικό αποξέστηκαν χωριστά σε δοκιμαστικούς σωλήνες (1,8 x18cm). Επίσης αποξέστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τμήματα αναλόγου μεγέθους που δεν έχουν λιπίδια, για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και του λευκού προσδιορισμού. Ακολούθησε η καύση και οι υπόλοιπες κατεργασίες με τη σειρά όπως αναφέρεται στον προσδιορισμό φωσφόρου. Λόγω της παρουσίας silica gel, το περιεχόμενο των σωλήνων είναι θολό μετά την ανάπτυξη του μπλε χρώματος. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα οι σωλήνες προ της φωτομέτρησης τοποθετήθηκαν σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 20-22 °C επί 10 min, για να αποκτήσουν ομοιόμορφη θερμοκρασία και στη συνέχεια εκχυλίσθηκε το χρώμα από κάθε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με 5 ml οξικού αιθυλεστέρα, παραλήφθηκε η άνω έγχρωμη (μπλε) φάση και φωτομετρήθηκε στα 780 nm.

5.9 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) λιπιδίων [75]

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία στερεάς φάσης είναι μια μέθοδος υγρής /στερεής εκχύλισης που στηρίζεται στην ικανότητα του προσροφητικού υλικού να κατακρατά τις διάφορες ουσίες με δυνάμεις μη ομοιοπολικής φύσεως, ενώ τα διάφορα κλάσματα ανακτώνται μετά από έκλυση με κατάλληλο διαλύτη. Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η απομόνωση και κλασμάτωση των λιπιδίων και άλλων τάξεων ουσιών.

Αντιδραστήρια και συσκευές

- Χλωροφόρμιο (καθ. HPLC 99,8 %)
- Εξάνιο (p.a Merck)
- Μεθανόλη (p.a SDS)
- Ειδικός θάλαμος κενού τύπου WatersSep-PackVacuumManitold
- Waters Sep-Pack Vac Silica Catridges (100cc)

Αναλυτική πορεία

Εφτά δοκιμαστικοί σωλήνες πλένονται, ξηραίνονται και αφού αριθμηθούν, ζυγίζονται με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (μέχρι σταθερού βάρους). Έπειτα τοποθετούνται κάτω από υποδοχέα κενού, προκειμένου να γίνει η συλλογή των αντίστοιχων κλασμάτων. Χρειάζονται δύο επιπλέον σωλήνες για εκπλύσεις της στήλης. Η μικροστήλη των 100 mg

τοποθετείται στον ειδικό υποδοχέα κενού και εκπλένεται αρχικά με 2 ml χλωροφόρμιο/εξάνιο 1/1 v/v. Ποσότητα ολικών λιπιδίων έως 8 mg ζυγίζεται με ακρίβεια. Η ποσότητα των λιπιδίων που θα διαχωριστεί διαλύεται σε 0,5 ml χλωροφόρμιο/εξάνιο 1/1 v/v και διαβιβάζεται με πιπέτα Pasteur στη μικροστήλη που έχει τοποθετηθεί σε καινούργια θέση οπότε λαμβάνεται το κλάσμα 1. Μετά ακολουθεί μετακίνηση της μικροστήλης με το δείγμα σε νέα θέση και προσθήκη 0,5 ml χλωροφόρμιο/εξάνιο 1/1 v/v οπότε λαμβάνεται το κλάσμα 2. Διαβιβάζονται από την μικροστήλη 5,5 ή 7 ml χλωροφορμίου και λαμβάνεται το κλάσμα 3 από τον νέο υποδοχέα. Στις δυο επόμενες θέσεις τοποθετούνται στη μικροστήλη από 5,5 ml χλωροφορμίου, οπότε συλλέγονται τα κλάσματα λιπιδίων 4 και 5. Τα κλάσματα 1 έως 5 περιέχουν ουδέτερα λιπίδια. Ακολούθως, διέρχονται από την μικροστήλη 5,5 ή 7 ml μεθανόλης προκειμένου να εκχυλιστούν τα πολικά λιπίδια από τη μικροκλώνα και λαμβάνεται το κλάσμα 6 στο νέο υποδοχέα. Τέλος, διαβιβάζοντας 5.5 ml μεθανόλης στην επόμενη θέση κενού, συλλέγεται το κλάσμα 7, που περιέχει υπολείμματα των πολικών λιπιδίων.

Μετά το τέλος του διαχωρισμού, πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου, ακολουθεί ζύγιση και υπολογίζεται το βάρος των λιπιδικών κλασμάτων κάθε σωλήνα και από εκεί μπορεί να υπολογιστεί αριθμητικά το ποσοστό των ουδετέρων και των πολικών λιπιδίων στα ολικά λιπίδια. Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος επιτυχίας του διαχωρισμού του δείγματος του λιπιδίου και της καθαρότητας των λαμβανόμενων κλασμάτων με μονοδιάστατη TLC. Τα 7 κλάσματα τοποθετούνται σε πλάκα μαζί με πρότυπα λιπιδίων στα εξής συστήματα ανάπτυξης: πετρελαϊκός αιθέρας/αιθέρας/οξικό οξύ 70/30/1 v/v/v (ουδέτερο σύστημα) και χλωροφόρμιο /μεθανόλη /οξικό οξύ/ νερό 50/25/6/2 v/v/v/v (πολικό σύστημα). Και οι δύο πλάκες εκτίθενται σε ατμούς ιωδίου.

5.10 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) [74]

Πρόκειται για χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας όπου, μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό τα συστατικά αποξέονται και εκχυλίζονται από το silica, οπότε και παραλαμβάνονται απομονωμένα σε καθαρή μορφή.

Αντιδραστήρια και όργανα

Μικροσύριγγες Hamilton των 250 µl

Θάλαμοι ανάπτυξης που κλείνουν αεροστεγώς

Έτοιμες πλάκες SilG-50 διαστάσεων 20*20cm και πάχους 0,5mm Macherey-Nagel, της Merck

Ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκαν ολικά λιποειδή κρόκου αβγού

Η προετοιμασία της πλάκας και ανάπτυξή της

Η πλάκα ενεργοποιείται στους 120°C για 40 λεπτά. Μετά χαράσσεται στην άκρη της πλάκας μια λωρίδα. Η πλάκα τοποθετείται σε κορεσμένο θάλαμο για την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος.

Εμφάνιση του χρωματογραφήματος

Μετά από την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος η πλάκα αφήνεται στον απαγωγό προς πλήρη εξάτμιση του διαλύτη και εμφανίζεται μετά από έκθεση σε ατμούς ιωδίου. Οι προς απόξεση ζώνες, με την βοήθεια της καθαρής καρφίτσας, προσημειώνονται περιγραμματικά. Με την εξάχνωση του ιωδίου γίνεται προσεκτική και ποσοτική απόξεση του silica των ζωνών του δείγματος, σε χωριστό καθαρό σωλήνα φυγοκέντρησης από όπου και θα εκχυλιστεί το αντίστοιχο λιπίδιο.

Εκχύλιση λιπιδίων από το silica

Η εκχύλιση του λιπιδίου από το silica ακολούθησε τα παρακάτω στάδια:

- Προσθήκη, στο δοκιμαστικό σωλήνα με το silica, 30 ml διαλύματος χλωροφορμίου/ μεθανόλης/ νερού 1/ 2 /0,8 (αρχικά βάζω 10ml διαλύματος 1/ 2/ 0,8 για μια καλή ανάδευση και στη συνέχεια συμπληρώνω μέχρι 30 ml).
- Ισχυρή ανάδευση του σωλήνα με κυκλοαναδευτήρα.
- Φυγοκέντρηση στις 200 στροφές (rpm) για 10 λεπτά.
- Η ποσοτική μεταφορά του διαυγούς υπερκειμένου σε ογκομετρικό κύλινδρο ενώ το silica εκχυλίζεται άλλες δυο φορές με τον ίδιο τρόπο.
- Συμπλήρωση όγκου ενωμένων εκχυλισμάτων στα 95 ml και μεταφορά σε διαχωριστική χοάνη.
- Πρόσθεση των 25 ml χλωροφορμίου και 25ml νερού.

- Ανατάραξη μείγματος. Το περιεχόμενο αφήνεται μια νύχτα στο ψυγείο, προς διαχωρισμό των φάσεων.
- Παραλαβή της κάτω χλωροφορμικής φάσης η οποία περιέχει τα λιπίδια, ενώ απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστρεφόμενη συσκευή απόσταξης κενού.

5.11 Iatroscan (TLC/ FID) [76]

5.11.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση λιπιδίων

Αρχή μεθόδου

Το Iatroscan MK-6 (TLC/ FID–FPD Analyser) (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) είναι ένα αυτόματο σύστημα ανίχνευσης λιπιδικών συστατικών. Διαχωρίζει τα λιπιδικά συστατικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) και ένα φωτομετρικό ανιχνευτή (F.P.D.). Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος για το διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιείται σε ράβδους λεπτής στιβάδας από χαλαζία, τα Chromarods. Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ποιότητα των διαχωρισμών και η ακρίβεια και σαφήνεια των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 5.11.1.1: Iatroscan MK-6 (TLC/FID–FPD Analyser) (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)

Η ανάπτυξη των Chromarods πρέπει να γίνεται σε σταθερή θερμοκρασία, καθώς η μεταβολή αυτής επηρεάζει την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, όπως και τη διαχωριστική ικανότητα.

Τα Chromarods είναι ράβδοι χαλαζία λεπτής στιβάδας επιστρωμένες με κατάλληλο ανόργανο προσροφητικό υλικό (Silica-gel ή Alumina). Είναι τοποθετημένα καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διεργασίας σε μεταλλικό πλαίσιο χωρητικότητας δέκα ράβδων και με βαθμονόμηση του ύψους των ράβδων (1-100 mm).

Η συνολική συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος εν διαλύσει θα πρέπει να κυμαίνεται από 10 έως 20 mg/mL (1-2% w/v). Το διάλυμα του δείγματος τίθεται στην κάθε ράβδο με μικροσύριγγα σε καθορισμένη απόσταση από τη βάση της ράβδου και ο όγκος που επιλέγεται για καλύτερο διαχωρισμό είναι 1.0μL (2-5 μg/κορυφή ή συστατικό του δείγματος). Το σημείο θέσης της κηλίδας του διαλύματος του δείγματος σε κάθε ράβδο είναι καθορισμένο και επιλέγεται με την τοποθέτηση του μεταλλικού πλαισίου με τις ράβδους σε κατάλληλη γυάλινη βάση, που διαθέτει μια άσπρη γραμμή-οδηγό, βάση της οποίας τίθεται η κάθε κηλίδα.

Η ανάπτυξη γίνεται σε απόσταση καθορισμένη από τη βάση της ράβδου και πάντα μικρότερη από το άνω άκρο αυτής (10 cm). Η απόσταση ανάπτυξης δεν πρέπει να διαφοροποιείται σε κάθε μέτρηση, διότι, όταν μεταβάλλεται, επηρεάζει σημαντικά την απόσταση που διανύουν οι κηλίδες των συστατικών (R_f), όπως και το εμβαδό των κορυφών στο χρωματογράφημα (peak area). Όσο μεγαλύτερο είναι το μέτωπο του διαλύτη (απόσταση που διανύει η κινητή φάση) τόσο αυξάνεται το R_f κάθε συστατικού και μειώνεται το εμβαδόν των κορυφών, οπότε εξασφαλίζεται καλύτερη διαχωριστική ικανότητα.

Η ευαισθησία του ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (F.I.D.) εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του αέρα και του υδρογόνου, όπως και από την ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα. Η βέλτιστη ροή αέρα και υδρογόνου είναι αντίστοιχα 2 L/min και 160 mL/min. Μικρότερη ροή υδρογόνου μειώνει τη θερμοκρασία της φλόγας και μπορεί να επιφέρει ατελή καύση ορισμένων συστατικών. Τέλος, η ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα μπορεί να κυμανθεί από 10 έως 60 sec/ράβδο, επιλέγεται δε ως βέλτιστη η τιμή των 20-30 sec/ράβδο (0.50-0.33 cm/sec).



Εικόνα 5.11.1.2. Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods

Οργανολογία

Iatroscan MK-6 (TLC / FID–FPD Analyser) (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokyo, Japan)

Chromarods: Types SIII (Silica gel type)

Ανιχνευτής: Hydrogen flame ionization detector (F.I.D.)

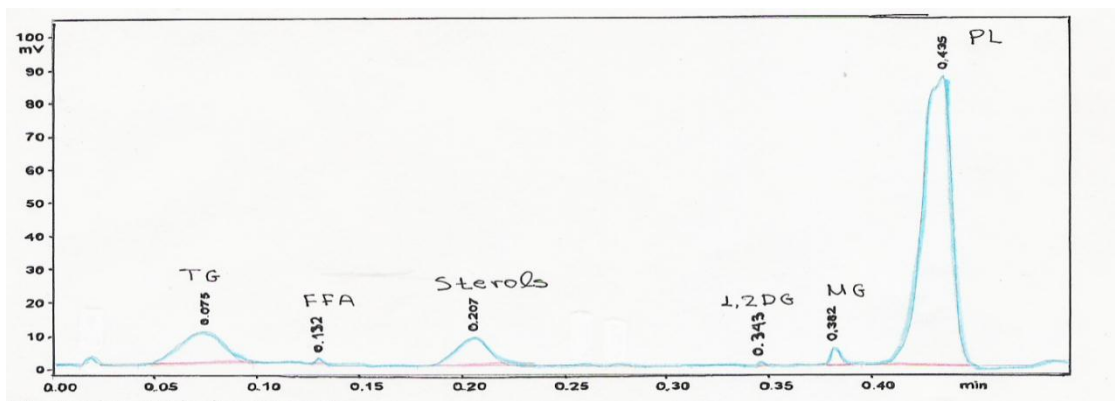
Ροήυδρογόνου: 160 mL/min

Ροήαέρα: 2 L/min

Ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα: 30 sec/ράβδο (0.33 cm/sec)

Αναλυτική πορεία

Παραλήφθηκαν μίγματα λιπιδίων (ολικά, ουδέτερα ή πολικά), εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και το υπόλειμμα αναδιαλύθηκε σε χλωροφόρμιο/μεθανόλη (9:1 v/v) προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 10-20 mg/ml. Από κάθε δείγμα λιπιδίων ελήφθησαν 0.5-1.0 μl διαλύματος και τοποθετήθηκαν με μικροσύριγγα σε απόσταση 1.00cm από το ένα άκρο της ράβδου. Παραλήφθηκαν διαλύματα πρότυπων λιπιδίων (εστέρες στερολών, χοληστερόλη, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, σφιγγομυελίνη, λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοϊνοσίτης καθαρότητας 99%) ίδιας συγκέντρωσης. Οι ράβδοι τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε κορεσμένο θάλαμο με κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν ολοκληρώθηκε η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, οι ράβδοι ανασύρθηκαν από το θάλαμο και αφέθηκαν μέχρι πλήρους εξατμίστησης των διαλυτών. Μια ράβδος (η πρώτη συνήθως) ελήφθη κενή ώστε να χρησιμοποιηθεί για λευκό προσδιορισμό. Ακολούθησε τοποθέτηση των ράβδων στο θάλαμο του Iatroscan και καύση των διαχωρισμένων λιπιδίων με φορά από το μέτωπο του διαλύτη προς το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων. Για δείγματα ολικών λιπιδίων επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός τους σε ουδέτερα και πολικά λιπίδια με τα παρακάτω συστήματα διαλυτών ανάπτυξης.



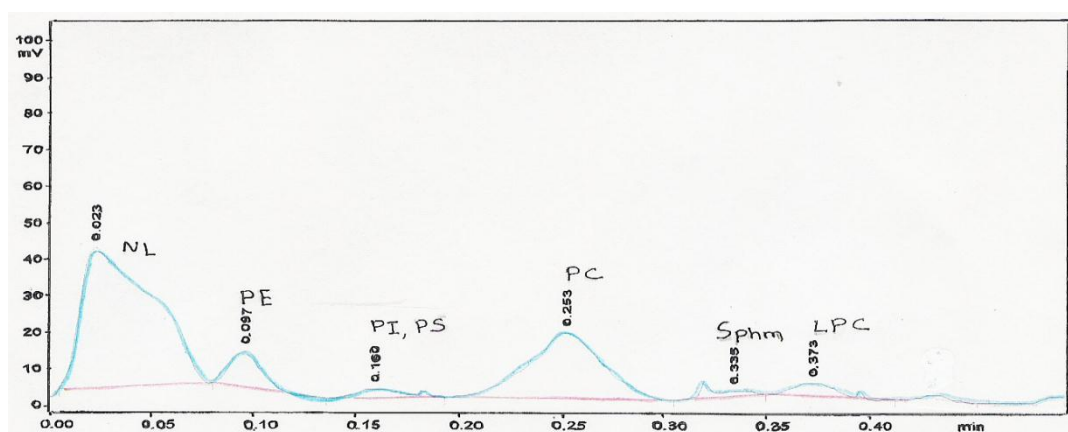
Σχήμα 5.11.1.3. Χρωματογράφημα ανάλυσης με τεχνική Iatroscan. Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης n-εξανίου/ διαιθυλαιθέρα/ φορμικού οξέος (n-H:DE:FA), 60:15:1.5 v/v/v. Διαχωρισμός μίγματος πρότυπων ουδέτερων λιπιδίων.

Πίνακας 5.11.1.1: Ανάλυση μίγματος πρότυπων ουδέτερων λιπιδίων με τεχνική Iatroscan σε ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης n-εξανίου/ διαιθυλαιθέρα/ φορμικού οξέος (n-H:DE:FA), 60:15:1.5 v/v/v.

Χρόνος έκλυσης (min)

Sterol Esters	TG	FFA	Sterols	1.2-DG	MG	PL
0.02-0.04	0.07-0.10	0.11-0.12	0.20-0.24	0.31-0.34	0.36-0.39	0.42-0.45

Απόσταση ανάπτυξης: 10 cm



Σχήμα 5.11.1.4. Χρωματογράφημα από ανάλυση με τεχνική Iatroscan. Πολικό σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού (C:M:W), 50:20:2 v/v/v. Διαχωρισμός μίγματος πρότυπων πολικών λιπιδίων.

Πίνακας 5.11.1.2. Ανάλυση μίγματος πρότυπων πολικών λιπιδίων με τεχνική Iatroskan σε πολικό σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού (C:M:W), 50:20:2 v/v/v.

Χρόνος έκλουσης (min)						
PE	PI	PS	l-PE	PC	Sphm	l-PC
0.09-0.11	0.11-0.14	0.14-0.18	0.22-0.23	0.26-0.28	0.34-0.35	0.38-0.39

Απόσταση ανάπτυξης: 10 cm

Στατιστική ανάλυση

Σε όλες τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD). Έγινε στατιστική επεξεργασία αυτών των τιμών (δοκιμή t) με το υπολογιστικό πρόγραμμα στατιστικής SPSSv.10.0.

5.12 Προσδιορισμός καρτενοειδών με HPLC [77]

Για τον προσδιορισμό των διαφορετικών καρτενοειδών αναλύθηκαν τα ολικά λιπίδια των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τα δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν. Το λιπιδικό διάλυμα από την εκχύλιση Bligh and Dyer εξατμίσθηκε μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκε σε ακετόνη-εξάνιο (2:3, by vol.). Στη συνέχεια τα διαλύματα διηθήθηκαν από φίλτρο 0.45 μm, όπου 20.00 μL του παραπάνω διηθήματος ενίονται στην HPLC. Το σύστημα HPLC (Hewlett Packard Series 1100, Waldbronn, Germany) διαθέτει ανιχνευτή διάταξης διόδων (HP 1100 Series Diode Array Detector), αντλία τύπου HP 1100 Quaternary Pump, απαερωτή τύπου Agilent 1100 Series Micro Vacuum Degasser και εισαγωγή Rheodyne model 7010 Sample Injector. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν μία YMC (Tokyo, Japan) C₃₀ column (250x4.6 mm I.D., 5 μm particle).

Η κινητή φάση αποτελείται από ακετονιτρίλιο (A), 1-βουτανόλη (B) και χλωρομεθάνιο (C) με την παρακάτω βαθμωτή έκλυση: αρχικά 69.3 % A, 29.7% B και 1.0% C, το οποίο αυξάνεται σε 4% C στα 10 min, 12% C στα 20 min, 30% C στα 40 min και επανέρχεται σε 1% C στα 50 min. Η κινητή φάση έχει ταχύτητα ροής 2 mL min⁻¹. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Chem Station for LC 3D software (Agilent Technologies 1999–2000, Waldbronn, Germany). Ο προσδιορισμός των κυριότερων καρτενοειδών έγινε συγκρίνοντας τους χρόνους εκλούσεως αυτών με

τους χρόνους εκλούσεως προτύπων καροτενοειδών. Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των καροτενοειδών ήταν: all-*trans* λουτεΐνη, ζεαξανθίνη, κανθαξανθίνη, κρυπτοξανθίνη, ασταξανθίνη και all-*trans* β-καροτένιο από τη Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich Company, UK).

5.13 Αεριοχρωματογραφία (αερίου - υγρού) GLC[1,2]

5.13.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων

5.14 ΧΗΜΙΚΕΣ ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ

Οι υδρολύσεις ή η σαπωνοποίηση χρησιμοποιείται για να διασπά τους εστερικούς δεσμούς παρέχοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και αλκοόλες αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποσκοπεί στην παραλαβή των λιπαρών οξέων για αναλυτικούς σκοπούς. Μερικές φορές οι εστέρες στερολών και οι αλκοόλες είναι συστατικά που μας ενδιαφέρουν περισσότερο. Οι υδρολύσεις εφαρμόζονται κάτω από αλκαλικές συνθήκες για μια ήπια αντίδραση.

5.14.1 Ήπια αλκαλική υδρόλυση λιπιδίων [78]

Όργανα

Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας

Κυκλοαναδευτήρας

Βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες Pyrex

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα NaOH 1,2N σε μεθανόλη –νερό (1:1 v/v)
- Διάλυμα οξεϊκού οξέος 1N
- Διάλυμα χλωροφορμίου
- Διάλυμα ισοβουτανόλης
- Απεσταγμένο νερό

Αναλυτική πορεία

Δείγμα λιπιδίου περιεκτικότητας 5-10 μmol τοποθετήθηκε σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα pyrex και ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα αναδιαλύθηκε σε 1 mL χλωροφορμίου-μεθανόλης (1: 4 v/v), προστέθηκε 0.1 mL NaOH 1.2N αναμείχθηκε καλά στον κυκλοαναδευτήρα και τοποθετήθηκε σε υδρόλουτρο 45 °C επί 20 min. Στη συνέχεια εξουδετερώθηκε με 0.5 mL διάλυμα οξικού οξέος 1N, προστέθηκαν 2 mL χλωροφορμίου/μεθανόλης (9:1 v/v), 1mL ισοβουτανόλης και 2 mL νερού, αναμείχθηκαν καλά στον κυκλοαναδευτήρα και παρέμειναν για περίπου μια ώρα προς διαχωρισμό των φάσεων. Απομακρύνθηκε η πάνω υδατική φάση με σιφόνιο Pasteur και εκπλύθηκε η χλωροφορμική φάση 2 φορές με 1mL μεθανόλης/νερό (1 :2 v/v).

Οι ενωμένες υδατικές φάσεις που περιείχαν τους γλυκεροφωσφορικούς εστέρες ενώθηκαν και μελετήθηκαν ποσοτικά με προσδιορισμό φωσφόρου.

Στη χλωροφορμική φάση μελετήθηκαν τα σταθερά στην υδρόλυση λιπίδια που περιέχονταν σε αυτή.

5.14.2 Μερική όξινη υδρόλυση [79]

Με την υδρόλυση αυτή διασπάται ο αμιδικός δεσμός των σφιγγοφωσφολιπιδίων και εν μέρει ο εστερικός δεσμός μεταξύ σφιγγοειδών και της φωσφορυλο- ή φωσφονο-αμινοβάσης.

Αντιδραστήρια

-Διάλυμα HCl 2N

Αναλυτική πορεία

Δείγμα που περιείχε 1 mg λιπιδίου τοποθετήθηκε σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα pyrex και ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε ρεύμα αζώτου. Προστέθηκε 0,5 ml διάλυμα HCl 2N και το μείγμα τοποθετήθηκε σε πυριαντήριο 100°C για 100 λεπτά. Στη συνέχεια εκχυλίσθηκαν τα λιπαρά οξέα με 1 ml πετρελαϊκό αιθέρα (σ.ζ. 40 °C-60 °C), πέντε φορές και στο υπόλοιπο υδρόλυμα προστέθηκε υπολογισμένη ποσότητα χλωροφορμίου μεθανόλης και νερού, ώστε να προκύψει τελικά αναλογία 8/4/3 v/v/v (αναλογία Folch's). Μετά από ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα το μίγμα παρέμεινε σε ηρεμία για το διαχωρισμό των δυο φάσεων. Στη χλωροφορμική κατανέμονται τα λιπαρά οξέα και τα σφιγγοειδή, ενώ στην υδατική οι φωσφορικές ή φωσφονικές αμινοβάσεις.

5.15 Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

5.15.1 Βασικές έννοιες φασματοσκοπίας

Ο Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR [80]. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπιν. Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσοτέρων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών. Τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνική μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και δυναμικής ενώσεων σε στερεά κατάσταση.

5.15.2 Είδη φασμάτων NMR

Τα φάσματα NMR που μπορούν να ληφθούν και να αναλυθούν χωρίζονται στα φάσματα μίας ή δύο διαστάσεων (1D NMR και 2D NMR).

5.15.2. A) Φάσματα μίας διάστασης

Τα φάσματα μίας διάστασης χρησιμοποιούνται κυρίως για λήψη φασμάτων πυρήνων ^1H , ^{13}C και ^{31}P και απεικονίζουν τις συχνότητες συντονισμού (ppm) του κάθε πυρήνα. Στα 1D φάσματα που προαναφέρθηκαν, η λήψη των δεδομένων γίνεται αμέσως μετά την εκπομπή του παλμού στο δείγμα.

Φασματοσκοπία πρωτονίου (^1H - NMR)

Το δείγμα ακτινοβολείται με παλμό (p1) διάρκειας κάποιων μικροδευτερολέπτων (μs), ο οποίος εκτρέπει τη μαγνήτιση των πυρήνων υδρογόνου από τη θέση ισορροπίας. Η FID (Free Induction Decay, Ελευθέρως Φθίνουσα Επαγωγή) που λαμβάνεται κατά την αποδιέγερση των πυρήνων μετασχηματίζεται κατά Fourier αποδίδοντας μια Λορεντσιανή (Lorentzian) καμπύλη αποδιέγερσης σε συχνότητα χαρακτηριστική για το μελετούμενο

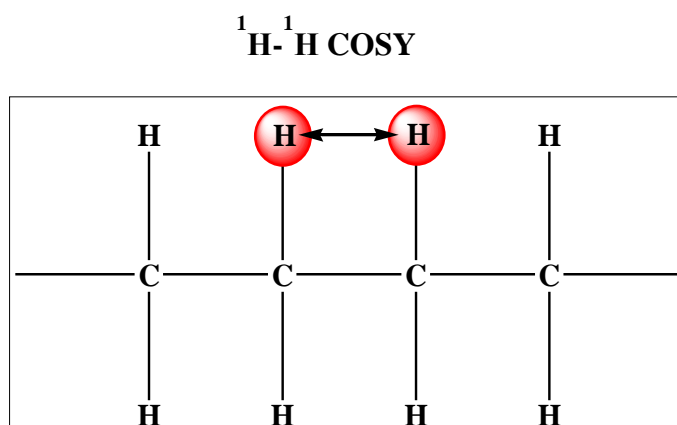
πυρήνα και το περιβάλλον του. Επειδή η φασματοσκοπία πρωτονίου είναι ποσοτική, είναι δυνατός ο υπολογισμός του αριθμού των πρωτονίων σε ένα μόριο μέσω της ολοκλήρωσης των φασματικών κορυφών.

5.15.2 Β) Φάσματα δυο διαστάσεων

Τα δυο διαστάσεων φάσματα χωρίζονται σε 2 υποκατηγορίες, τα ομοπυρηνικά (π.χ. COSY, NOESY) και τα ετεροπυρηνικά (π.χ. HSQC, HMBC) ανάλογα με τον αν μελετάται ένας ή δύο πυρήνες ταυτόχρονα. Έτσι στα ομοπυρηνικά έχουμε τον ίδιο πυρήνα και στους δύο άξονες ενώ στα ετεροπυρηνικά έχουμε διαφορετικούς πυρήνες στους δύο άξονες.

Φάσμα δυο διαστάσεων COSY

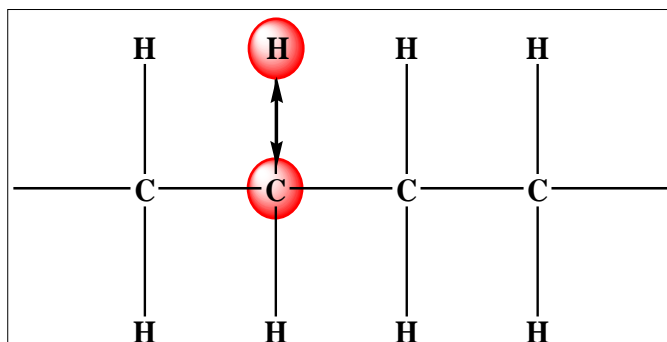
Τα φάσματα COSY (Correlated Spectroscopy) απεικονίζουν τη σχέση μεταξύ πυρήνων του δείγματος με τους γειτονικούς τους πυρήνες και αφορά μόνο πυρήνες πρωτονίου (^1H). Η συσχέτιση των πυρήνων είναι αποτέλεσμα της σύζευξής τους μέσω δεσμών με μια σταθερά σύζευξης J . Διευκρινίζεται ότι σύζευξη πραγματοποιείται μόνο μεταξύ γειτονικών πρωτονίων.



Φάσμα δυο διαστάσεων 2D-HSQC

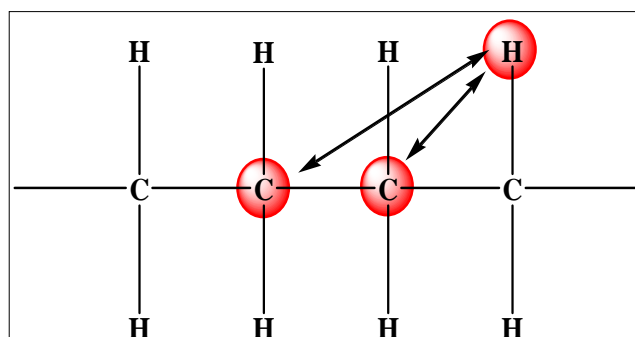
Τα σήματα του φάσματος 2D-HSQC, παριστάνουν τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων και των ανθράκων με τους οποίους υπάρχει απευθείας σύνδεση. Επομένως, με αυτόν τον τρόπο γίνεται εύκολα η ταυτοποίηση των ατόμων άνθρακα, εκτός των τεταρτοταγών. Στο ετεροπυρηνικό φάσμα 2D-HSQC ανιχνεύονται οι ετεροπυρηνικές συζεύξεις $^1J_{\text{C-H}}$. Η σταθερά σύζευξης των πρωτονίων που συνδέονται απευθείας με τους άνθρακες είναι κατά μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από τις

αντίστοιχες σταθερές συζεύξεις των πρωτονίων που χωρίζονται με δύο ή τρεις δεσμούς με άνθρακες, και για αυτό το λόγο ανιχνεύονται.



Φάσμα δυο διαστάσεων 2D-HMBC

Τα σήματα του φάσματος HMBC, παριστάνουν τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων και των απομακρυσμένων ανθράκων. Με χρήση του πειράματος 2D-HMBC, γίνεται η ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα. Τα σήματα αναπαριστούν τους συσχετισμούς μεταξύ πρωτονίων και των γειτονικών σε αυτά ατόμων άνθρακα.



5.15.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ${}^{31}\text{P}$ NMR [81, 82]

Μεταξύ όλων των πυρήνων που βρίσκονται στα φωσφολιπίδια ο φωσφόρος (εκτός του πρωτονίου) χρησιμοποιείται στην έρευνα των φωσφολιπιδίων. Ένα κύριο πλεονέκτημα των ${}^{31}\text{P}$ πυρήνων είναι η συγκριτικά υψηλή ευαισθησία τους και οι απλές εργαστηριακές απαιτήσεις για την καταγραφή ${}^{31}\text{P}$ NMR φάσματος. Από όλους τους πυρήνες ο φώσφορος κατέχει τον υψηλότερο γυρομαγνητικό λόγο, ο οποίος σε συνδυασμό με την υψηλή φυσική του αφθονία οδηγεί σε μια καλή ανιχνευσιμότητα ακόμα και σε χαμηλά πεδία. Αν και το πρωτόνιο είναι αρκετά ευαίσθητο το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι η επικαλυπτόμενες χημικές μετατοπίσεις σε σύνθετα δείγματα και η ανάγκη για

απομάκρυνση του διαλύτη, ειδικά σε υδατικά διαλύματα. Τα κλάσματα των φωσφολιπιδίων μπορούν εύκολα να διαφοροποιηθούν μέσω του ^{31}P NMR, εάν το δείγμα είναι κατάλληλα προετοιμασμένο.

5.15.4 Ταυτοποίηση φωσφολιπιδίων με Φασματοσκοπία NMR [83]

Οργανολογία

Φασματογράφος HR-NMR Varian 600 MHz

Πρότυπες ουσίες

1. Phosphatidylethanolamine (egg), Cat. No.: 1045, LotNo.:21672. Matreya, Inc (50 mg/1ml CHCl_3)
2. Phosphatidyl Choline (egg), Cat. No.:1044, Lot. No.: 214 24. Matreya, Inc (50 mg/1ml CHCl_3)
3. Phosphatidyl Inositol (plant), (Na-salt), Cat No.:1048, Lot No.: 21588, Matreya, Inc (10mg/ml CHCl_3).
4. Cardiolipin (diphosphatidylglycerol, from bovine heart), C-5646, Sigma (10 mg).
5. Sphingomyelin from chicken egg yolk, 85615, Biochemica
6. L- α -Phosphatidyl-L-serine, 5 mg, P-7769, Lot 123H8383, Sigma.

Αντιδραστήρια

Χλωροφόρμιο $-d_1$ (Merck) Δευτερίωσης 99,98%

Σωληνίσκοι NMR 5 mm UP509- NORELL



Μέθοδος [83]

NMR. Φάσματα πρωτονίου NMR καταγράφηκαν σε φασματογράφο Varian 600 MHz και σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C). Το εύρος του φάσματος ^1H επιλέχθηκε στα 7,225 Hz, και του ^{13}C στα 37,878 Hz. Ο παλμός των 90° για το πρωτόνιο μετρήθηκε στα 7,8 μs . Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Mestre Nova.

Πειραματική διαδικασία

Τα πολικά πρότυπα (PE, PC, PI, PS, Sph και LPC) ποσότητας 2.50-5mg αναδιαλύθηκαν σε 0.65 ml δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και τοποθετήθηκαν σε σωληνίσκο NMR (5 mm). Μόνο για το πρότυπο της σφινγομυελίνης χρειάστηκε να προστεθούν μερικές σταγόνες δευτεριωμένης μεθανόλης (CD_3OD) στα 0.65 ml δευτεριωμένου χλωροφορμίου CDCl_3 έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάλυση της ουσίας.

Για τη διαδικασία λήψης των απομονωθέντων συστατικών, ελήφθησαν 5 mg δείγματος πολικών λιπιδίων (10 ml) από ολικά (τα ολικά λιπίδια διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα με SPE) τα οποία ήταν διαλυμένα σε CHCl_3 : MeOH 9:1 v/v. Απομάκρυνση του διαλύτη πραγματοποιήθηκε με ροή ρεύματος αζώτου και στη συνέχεια το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 0.65 ml CDCl_3 και μεταφέρθηκε με πιπέτα paster στο σωληνίσκο NMR. Τέλος, προσδιορίστηκαν τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, $^{31}\text{P NMR}$, COSY, HSQC και HMBC.

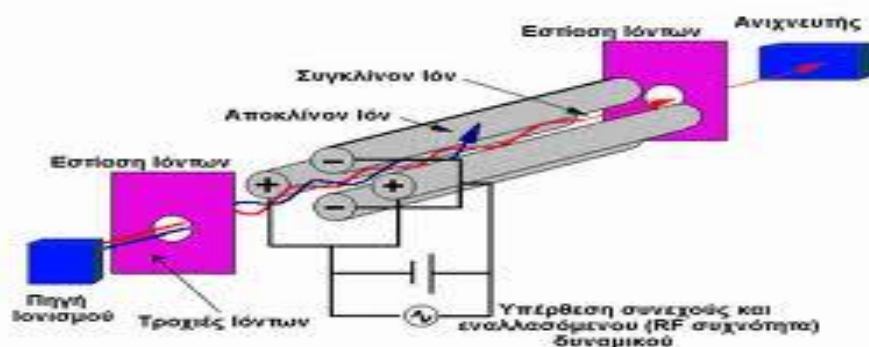
5.16. Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem MS) [84]

Για τη ταυτοποίηση της δομής μιας ένωσης συχνά απαιτούνται από τη φασματομετρία μαζών περισσότερες πληροφορίες από τη μάζα του μοριακού ιόντος (δηλαδή το μοριακό βάρος της ένωσης). Για το λόγο αυτό είναι μεγάλης σημασίας η διάσπαση της ένωσης σε χαρακτηριστικά θραύσματα. Η αναγνώριση της ταυτότητας αυτών των θραυσμάτων μας επιτρέπει στη συνέχεια να έχουμε μια ασφαλέστερη αναγνώριση της δομής της αρχικής ένωσης. Η διάσπαση της μητρικής ένωσης γίνεται λόγω του περιβάλλοντος υψηλής ενέργειας μέσα στο οποίο κινούνται τα μόρια της αναλυόμενης ένωσης. Στις λεγόμενες "ήπιες" μεθόδους ιονισμού που χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό θραύσης και στις οποίες ανήκει ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, θα μπορούσε να επιτευχθεί υψηλό ποσοστό θραύσης εάν εφαρμοζόταν στην πηγή ιόντων υψηλότερη ενέργεια. Όμως δεν είναι αυτό το ζητούμενο, το επιθυμητό είναι η διατήρηση του μοριακού ιόντος, η ανάλυση του και ο προσδιορισμός της μάζας αυτών. Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί τεχνικές και όργανα στα οποία πραγματοποιούνται με την ακόλουθη σειρά οι εξής λειτουργίες:

- ο διαχωρισμός μαζών των αναλυόμενων ενώσεων
- η απομόνωση της μάζας της ένωσης που μας ενδιαφέρει
- η διάσπαση της σε θραύσματα
- η σάρωση της μάζας των θραυσμάτων

-ο προσδιορισμός των μαζών των θραυσμάτων

Η τεχνική αυτή καλείται Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem MS). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι οι ανιχνευτές ιοντικής παγίδας και τριπλού τεραπόλου (QqQ). Στην τελευταία περίπτωση, ο τετραπολικός αναλυτής, σε συνδυασμό με τα οπτικά φίλτρα, επιτρέπει μόνο ιόντα με ορισμένη τιμή m/z να περάσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται. Για το λόγο αυτό ο τετραπολικός αποκαλείται συχνά και φίλτρο μαζών (Σχήμα 5.16.1).



Σχήμα 5.16.1 Τετραπολικός αναλυτής μαζών.

Πηγή: http://tccc.iesl.forth.gr//AMS_EPEAEK/course/LazPap/MSLab.

Στη δίδυμη φασματομετρία μαζών υπάρχουν τρία τετράπολα (Q1, Q2, Q3) [85]. Το Q1 και το Q3 χρησιμοποιούνται ως αναλυτές μαζών, ενώ το δεύτερο τετράπολο Q2 είναι κυψελίδα σύγκρουσης και λειτουργεί ως συσκευή διέλευσης ιόντων. Συγκεκριμένα, η κυψελίδα σύγκρουσης είναι ένας χώρος που περιβάλλει το Q2 όπου συμβαίνει διάσπαση ενώσεων επαγόμενη από σύγκρουση, εφόσον υπάρχει το αέριο σύγκρουσης.

5.16.1 Τεχνική πλήρους σάρωσης

Στην απλή φασματομετρία μαζών, όπου χρησιμοποιείται ένας τετραπολικός αναλυτής μαζών, Q1, μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική πλήρους σάρωσης (FS), με την οποία σαρώνεται ένα καθορισμένο εύρος μαζών m/z και από το φάσμα μπορεί να προσδιοριστεί η μοριακή μάζα της ένωσης.

5.16.2 Τεχνική σάρωσης προϊόντων ιόντων

Κατά το πρώτο στάδιο της ανάλυσης με την τεχνική σάρωσης προϊόντων ιόντων (Product scan), από το Q1 διέρχεται ιόν ορισμένου λόγου m/z , το οποίο αντιστοιχεί στο επιθυμητό

πρόδρομο ιόν. Το επιλεγμένο πρόδρομο ιόν στη συνέχεια εισέρχεται στην κυψελίδα σύγκρουσης Q2 στο οποίο θραυματοποιείται σε προϊόντα ιόντα με διάσταση επαγόμενη από σύγκρουση. Τα ιόντα που παράχθηκαν στην κυψελίδα σύγκρουσης εισέρχονται στο Q3 για το δεύτερο στάδιο ανάλυσης. Το Q3 σαρώνει καθορισμένο εύρος λόγων m/z αποδίδοντας το φάσμα μαζών των προϊόντων που δημιουργήθηκαν από τη θραυματοποίηση του επιλεγμένου πρόδρομου ιόντος. Αυτή η τεχνική σάρωσης χρησιμοποιείται για την διερεύνηση της δομής άγνωστης ένωσης από τα επιμέρους θραύσματα.

5.16.3 Τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος

Η τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος (Parent scan) χρησιμοποιείται για τη διαλογή ενώσεων που δίνουν τα ίδια θραύσματα όταν υποβάλλονται σε πειράματα δίδυμης φασματομετρίας μαζών MS/MS. Κατά την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος από το Q3 διέρχεται προϊόν ιόν καθορισμένου λόγου m/z , ενώ το Q1 σαρώνει τα πρόδρομα ιόντα εντός ορισμένου εύρους ιόντων m/z . Τελικά, λαμβάνονται φάσμα μαζών των πρόδρομων ιόντων τα οποία θραυματοποιούνται στο συγκεκριμένο προϊόν ιόν.

5.16.4 Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης αντιδράσεων θραυματοποίησης

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή παρακολουθείται το ρεύμα ιόντων που σχετίζεται με την m/z μετάπτωση ενός συγκεκριμένου πρόδρομου ιόντος προς ένα καθορισμένο προϊόν ιόν μετά από διάσταση επαγόμενη από σύγκρουση, μέσα στην κυψελίδα σύγκρουσης. Όταν επιλέγεται μια μετάπτωση για παρακολούθηση, η τεχνική ονομάζεται SRM (Single Reaction Monitoring).

5.16.5 LC-ESI-MS/MS φωσφολιπιδίων και ενώσεων του αρσενικού

Υλικά και Αντιδραστήρια

A) Πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για των προσδιορισμό ενώσεων του αρσενικού
Arsenobetaine, 50 mg, Fluka Analytical, > 95%, EC label 11093, Lot and Filling Code 40608241, MW 178.06.

Cacodylic acid 98%, MW 138.01, 5gr, ACROS ORGANICS, 318150050, Lot A0265393
Arsenocholine, Product code AR 60010, Lot No AR 60010/0106, quantity 500 mg. Argus Chemical Srl.

Kelp powder-μείγμα προτύπων αρσενοσακχάρων το οποίο μας χορήγησε Δρ. Σπύρο Περγαντή, καθηγητή του Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης.

Kelp powder [43]-Τα θαλάσσια μακροφύκη τα οποία τα συναντάμε ως Kelp ή seaweed, χρησιμοποιούνται κυρίως στη Βόρεια Αμερική ως συμπληρώματα διατροφής, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας τους σε ιώδιο, μέταλλα και βιταμίνες. Επίσης τα φύκη συσσωρεύουν το αρσενικό ως χημικό στοιχείο από το νερό της θάλασσας με αποτέλεσμα να βρίσκεται σχετικά σε υψηλή περιεκτικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 7-50 mg/kg επί ξηρού ιστού. Συστηματική κατανάλωση των συμπληρωμάτων θαλασσιών φυκών σε συνδυασμό με άλλα είδη θαλάσσιας τροφής έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ημερήσιας δόσης σε αρσενικό. Εδώ χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση αρσενοσακχάρων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.16.1.

B) Πολικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση φωσφολιπιδίων

L-a-phosphatidylcholine from egg yolk, 1,2-diacyl-sn glycerol-3-sn phosphocholine. P3556-25 mg, Sigma.

3-sn-Phosphatidylethanolamine, from bovine brain, Type I, P7693, 5mg, Sigma.

Sphingomyelin from chicken egg yolk, 85615,50 mg, Fluka >98% .

Lyso- lecithin (egg) 50mg. Matreya Inc, Cat. No 1046. Lot No 21335 (LPC).

Η ανάλυση δειγμάτων έγινε Α) με επιλεκτική παρακολούθηση αντιδράσεων (SRM) και Β) με πλήρη σάρωση.

A) Επιλεκτική παρακολούθηση αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring, SRM)

LC/ESI-MS/MS (SRM) μέθοδος αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των ενώσεων του αρσενικού σε υδρολυμένα κλάσματα λιπιδικών ενώσεων της γαρίδας επειδή η μέθοδος αυτή είναι μια ισχυρή προσέγγιση για την ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας και επαναληψιμότητας σε σύγκριση με άλλες τεχνικές.

Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα των μυών και κεφαλοθωράκων, πρώτα διαχωρίστηκαν με παρασκευαστική TLC σε επιμέρους τάξεις λιπιδίων (PC, PE, LPC, Sph και X). Στη συνέχεια αφού προηγήθηκε έλεγχος καθαρότητας στο κάθε λιπίδιο χωριστά (Σχήμα 6.5.1.1. Κεφ.6 Αποτελέσματα και Συζήτηση, υποκεφ. 6.5.1.), τα επιμέρους κλάσματα λιπιδίων

υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση, όπως περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος, υποκεφ. 5.14. Οι χημικές υδρολύσεις αυτές έγιναν με σκοπό τη διάσπαση των ενώσεων αυτών σε υδατοδιαλυτές ενώσεις του αρσενικού τα οποία προσδιορίστηκαν με LC-ESI-MS/MS με SRM.

Συνθήκες μέτρησης LC-ESI-MS/MS με SRM

Οι αναλύσεις των αναφερθέντων δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Thermo TSQ, Quantum Access, το οποίο αποτελείται από φασματομέτρο μαζών τριπλού τετραπόλου συνδεδεμένο με αντλία υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UHLC Accela pump) με πηγή ηλεκτροψεκασμού (ESI) Ion Max και θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη. Η αναλυτική στήλη ήταν Cosmosil Hilic 5 μ m, 150 x 2.0mm. Η καταγραφή και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Xcalibur 2.0.6. Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο (ACN)/ φορμικό αμμώνιο 75:25 v/v. Χρόνος ανάλυσης 60 min. Εύρος σάρωσης m/z 0.6, χρόνος σάρωσης 50 ms. Στην πηγή ιοντισμού ESI εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός. SRM μεταπτώσεις [πρόδρομο ιόν > προϊόν ιόν] και ενέργεια θραυσματοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ενώσεων του αρσενικού παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.16.2. Η ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών έγινε βάση την σύγκριση των χρόνων ανάλυσης των προτύπων με αυτών των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό πρώτα μελετήθηκαν τα χρωματογραφήματα των προτύπων Kelp, As(V), AsB, DMA και AsC και οι χρόνοι ανάλυσης του κάθε προτύπου χωριστά όπως παρουσιάζεται στους Πίνακες 5.16.1 και 5.16.2 και σχήματα 5.16.1 και 5.16.2.

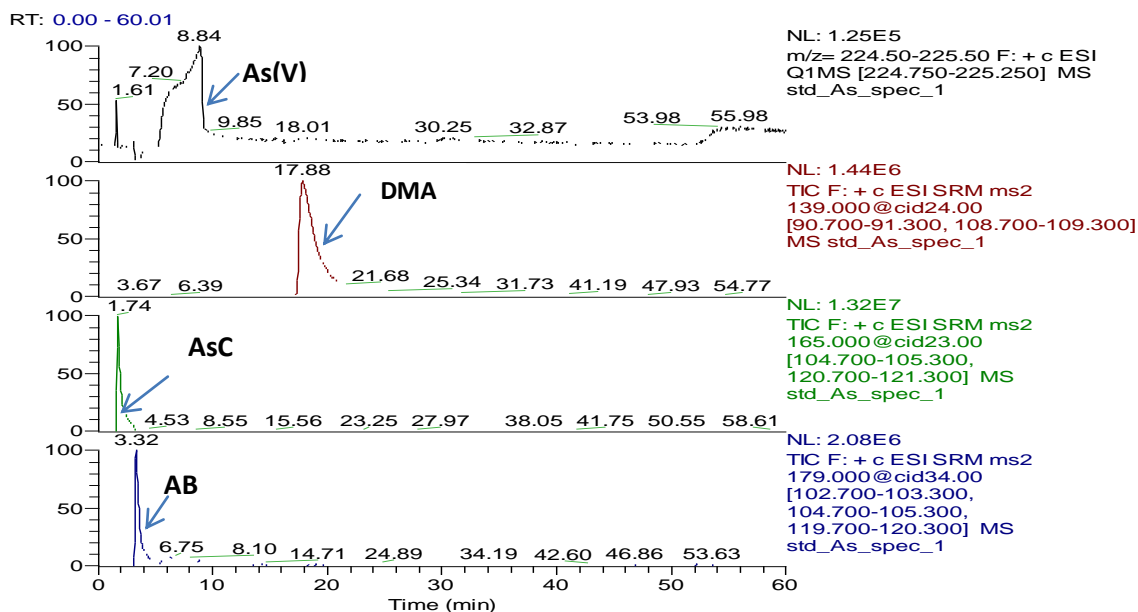
Πίνακας 5.16.1 Χρόνοι ανάλυσης, SRM μεταπτώσεις και ενέργεια θραυσματοποίησης (CE) των αρσενοσακχάρων του εκχυλίσματος του προτύπου Kelp powder το οποίο μελετήθηκε με LC-ESI-MS/MS.

Ενώσεις του αρσενικού	SRM-1	SRM-2	Rt (min)	CE (V)
<i>DMoxoAsSugars</i>				
DMA _s -Glycol	329>97	329>236	4.3-4.4	25, 15
DMA _s -Sulfonate	393>97	393>236	20.8-21.0	30, 20
DMA _s -Phosphate	483>97	483>236	34.1-34.6	40, 25
<i>DMA_s Sugar Sulfate</i>				
DMA _s -Sulfate	409>97	409>236 409>328	16.7	25, 15,15

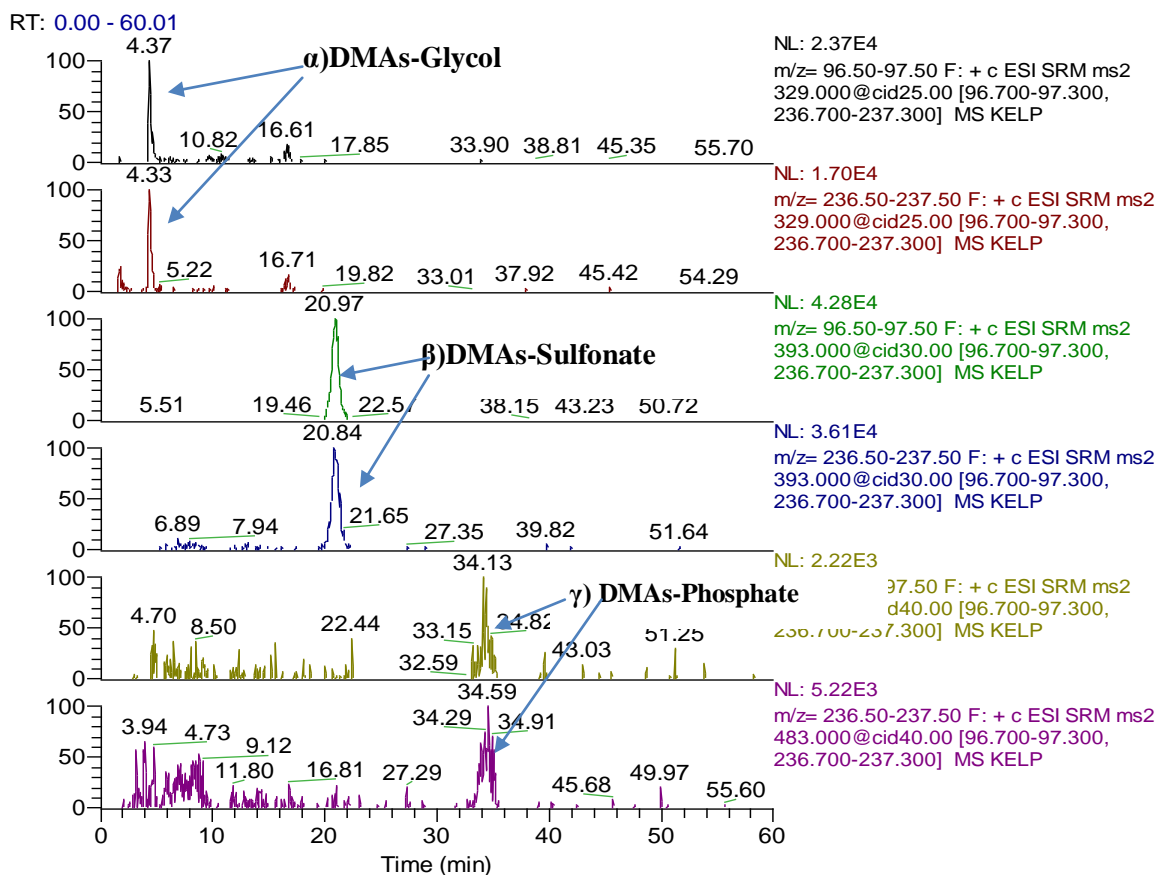
<i>DM thio As Sugar Sulfonate</i>				
DM thio As- Sulfonate	άγνωστη			
<i>DM thio As Sugar Sulfate</i>				
DM thio As-Sulfate	425>97 425>345	425>253	7.9-8.5	30, 15 10
<i>DM thio As Sugar Glycol</i>				
DM thio As Glycol	345>97	345>252	2.7	20, 10
Άγνωστο				
<i>DM thio As Sugar Phosphate</i>				
DM thio As Phosphate	499>97	499>253	18.9-19.1	27, 15

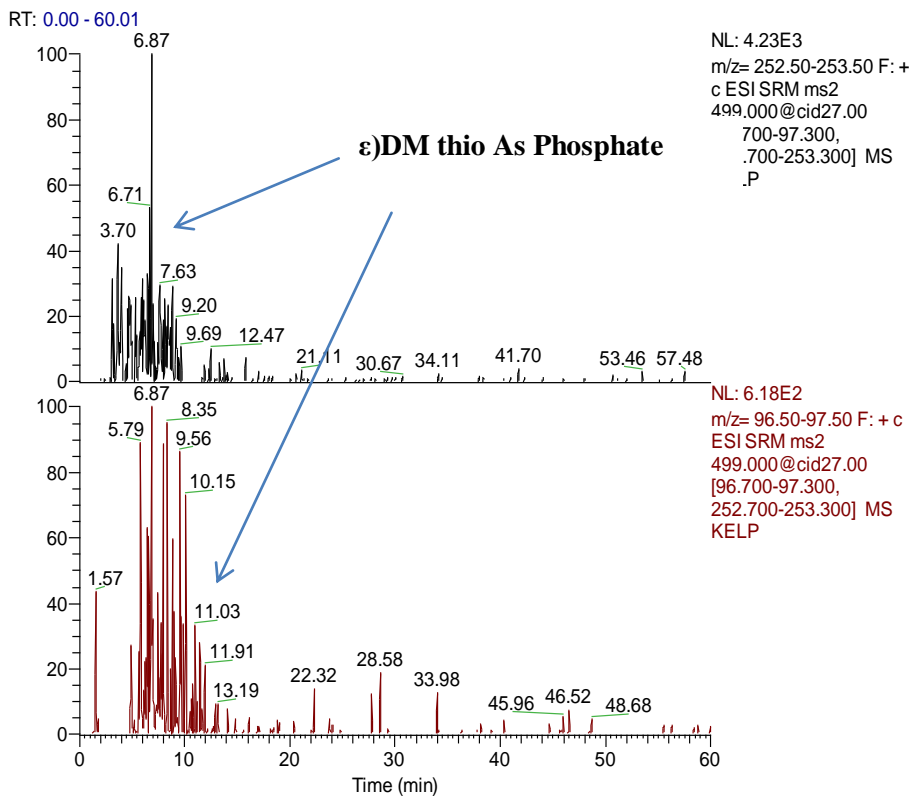
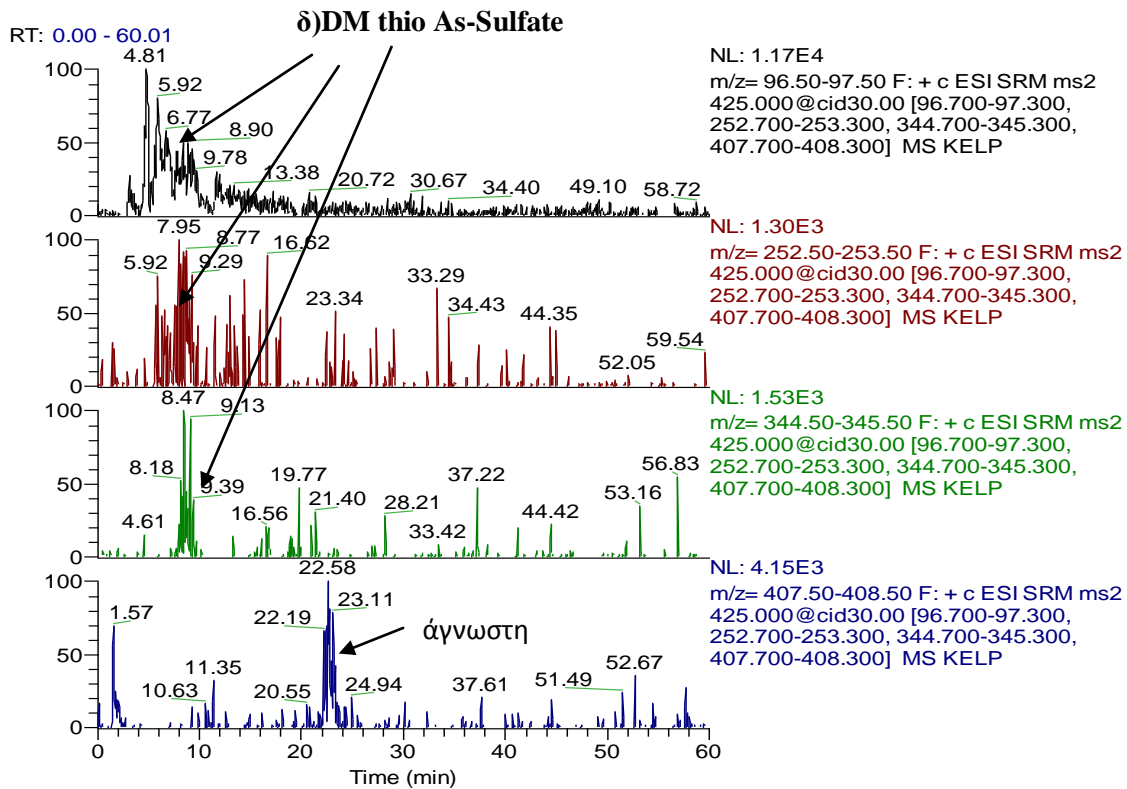
Πίνακας 5.16.2. Χρόνοι ανασχέσεις, SRM μεταπτώσεις και ενέργεια θραυσματοποίησης (CE) των προτύπων As(V), DMA, AsC και AB

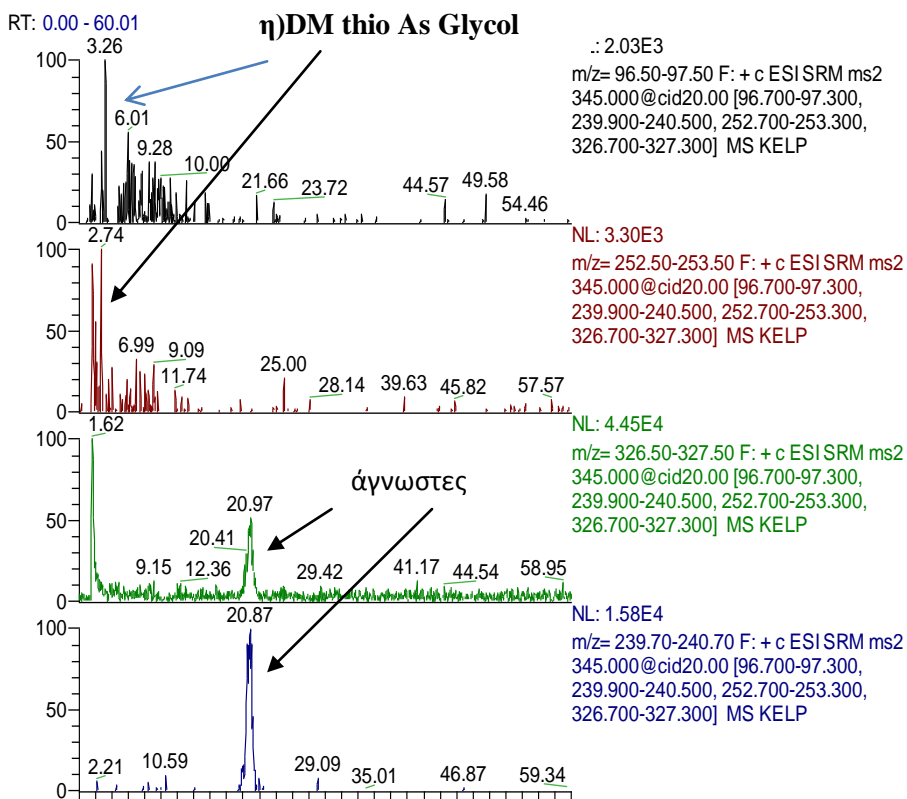
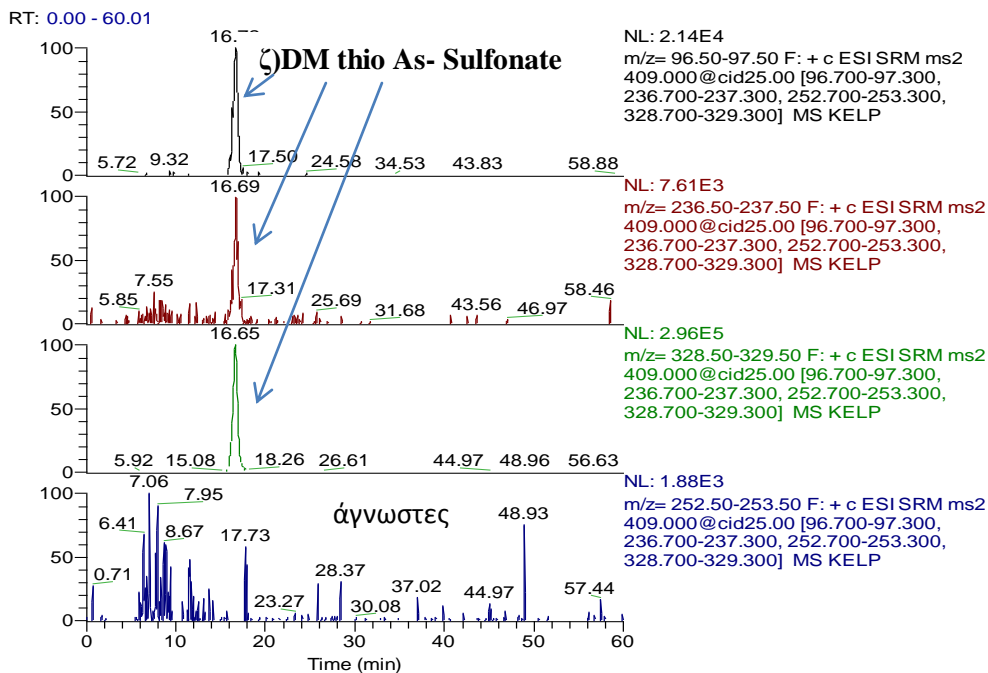
Πρότυπες ενώσεις του αρσενικού	SRM	Rt (min)	CE (V)
As(V)	225.5	8.8	
DMA	139>91	17.8	24
AsC	165>105	1.74	23
AB	179>103	3.32	28



Σχήμα 5.16.1. SRM χρωματογραφήματα των προτύπων ενώσεων του αρσενικού, **As(V)** RT 8.84 min, **DMA** RT 17.8 min, **AsC** RT 1.74 min και **AsB** RT 3.32 min.







Σχήμα 5.16.2. SRM χρωματογραφήματα με (ESI +) των αρσενοσακχάρων του εκχυλίσματος του προτύπου Kelp powder. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν είναι: α)DMAs-Glycol, β)DMAs-Sulfonate, γ)DMAs-Phosphate, δ)DMthioAs-Sulfate, ε)DM thio-AsPhosphate, ζ)DMthioAs-Sulfonate και η) DMthioAsGlycol. Κάποιες ενώσεις του

προτύπου έχουν διασπαστεί, και παρουσιάζουν κορυφές σε διαφορετικούς χρόνους έκλουσης από αυτό του προτύπου Kelp, για το λόγο αυτό τις αναφέρουμε ως άγνωστες.

B) Πλήρης σάρωση των επιμέρους ενώσεων φωσφολιπιδίων (Full Scan)

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε άθικτα ή αμιγή δείγματα λιπιδίων.

Μελετήθηκε πρότυπο της φωσφατιδυλοχολίνης και δείγμα της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων και μυών με πειράματα σάρωσης πρόδρομου ιόντος με m/z 184 στην περιοχή m/z 700-900. Ταυτόχρονα επιλέχθηκαν πειράματα MS/MS για την εύρεση προϊόντων ιόντων επιλεγμένων προδρόμων ιόντων με αφθονία $>10^4$ κρούσεις στην περιοχή m/z 100-800 [86,87,88].

Η ανάλυση δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Thermo TSQ, Quantum Access, το οποίο αποτελείται από φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου συνδεδεμένο με αντλία υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UHLC Accela pump) με πηγή ηλεκτροψεκασμού (ESI) Ion Max και θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη. Η αναλυτική στήλη ήταν X-Bridge HILIC 150mmx 2.1mm. Η καταγραφή και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Xcalibur 2.0.6. Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο (ACN)/ φορμικό οξύ (75:25). Το δυναμικό θραυσματοποίησης 35 V. Στην πηγή ιοντισμού ESI εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός. Χρόνος ανάλυσης 60 min.

Σε κάθε μέτρηση λαμβανόταν το φάσμα πλήρους σάρωσης (Full scan) για εύρος μαζών m/z 700-900 με χρόνο σάρωσης 0.50 s. Αυτό που αλλάζει για κάθε μέθοδο που εφαρμόζεται με σκοπό την ταυτοποίηση των ενώσεων του αρσενικού στα κλάσματα των λιπιδίων (PC, PE, LPC, Sph) είναι ιόντα προϊόντα με m/z 184, 218, 245, 483 (Πίνακας 5.16.4, Πίνακας 5.16.5, Σχήμα 5.16.3).

Προετοιμασία δειγμάτων

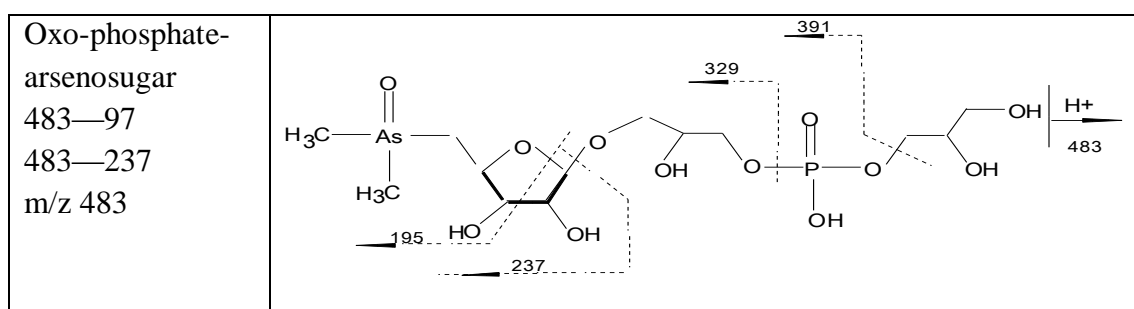
Τα δείγματα της PC, PE, LPC, Sph τα οποία απομονώθηκαν από τα ολικά λιπίδια μυών και κεφαλοθωράκων της μελετούμενης γαρίδας με παρασκευαστική TLC, παραλήφθηκαν με εκχύλιση Bligh-Dyer, η χλωροφορμική φάση κάθε δείγματος εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και αναδιαλύθηκε σε μίγμα ακετονιτρίλιου/ νερού (4:1) μέχρι τελικού όγκου 1ml.

Πίνακας 5.16.4. Πιθανές μοριακές δομές της φωσφατιδύλοχολίνης μετά από αντικατάσταση της φωσφοχολίνης με DMA, του φωσφόρου και του αζώτου με As.

<p>Το μόριο της φωσφατιδύλοχολίνης</p> <p>Θραύσμα φωσφοχολίνης m/z 184</p>	
<p>Αντικατάσταση της ομάδας $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ με $\text{As}(\text{CH}_3)_2\text{O}$ (DMA)</p> <p>m/z 218</p>	
<p>Β) Αντικατάσταση του φωσφόρου (P) με αρσενικό (As)</p> <p>m/z 228</p>	
<p>Γ) Αντικατάσταση του αζώτου (N) με το αρσενικό (As)</p> <p>m/z 245</p>	

Πίνακας 5.16.5. Πιθανές μοριακές δομές της σφιγγομυελίνης μετά από αντικατάσταση της χολίνης με DMA και του αζώτου με As.

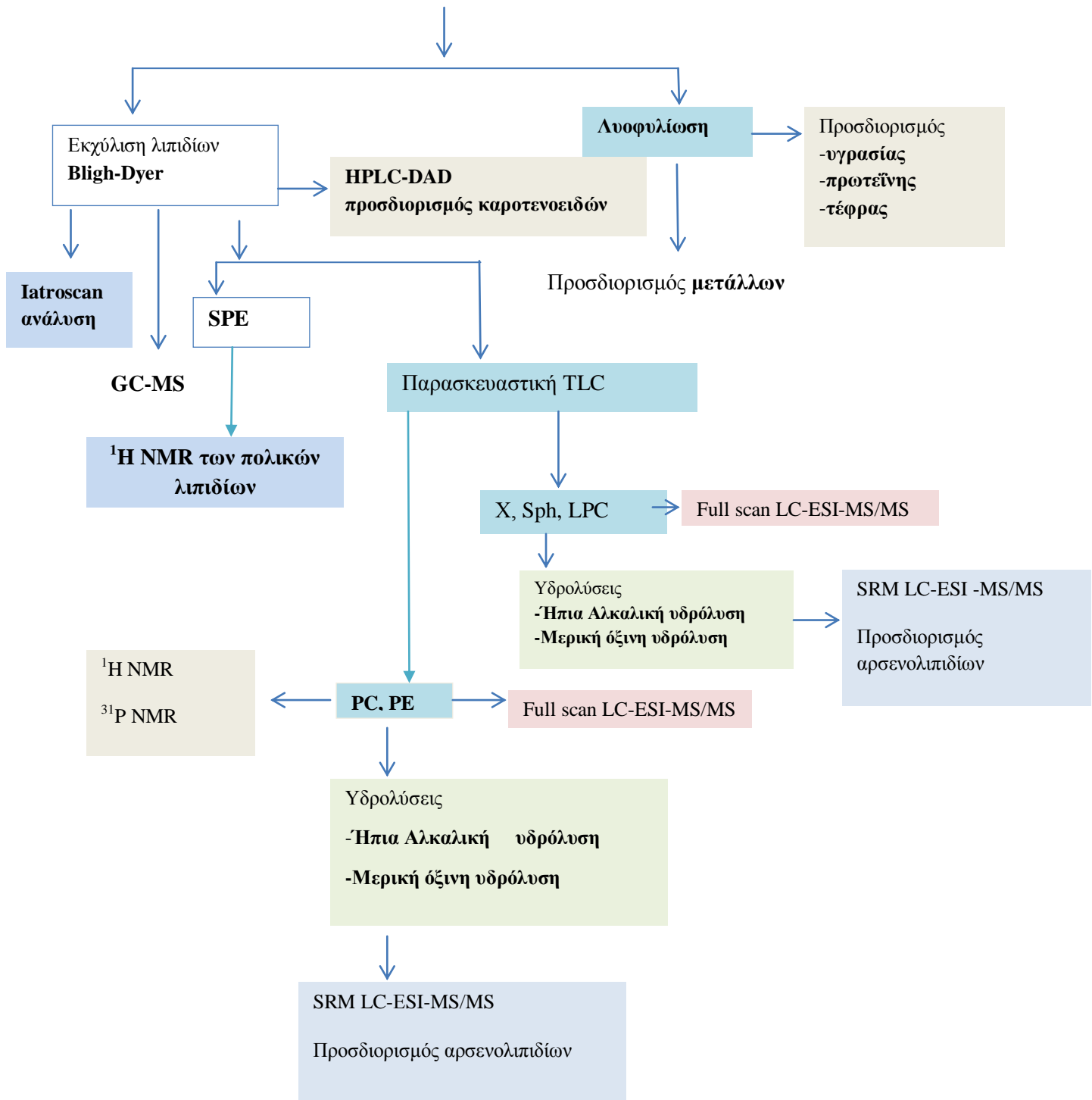
<p>φωσφοχολίνη</p> <p>m/z 184</p>	<p>m/z 184</p> <p>m/z 87</p>
<p>Αντικατάσταση της χολίνης με DMA</p> <p>m/z 218</p>	<p>m/z 218</p>
<p>Αντικατάσταση του αζώτου (N) με το αρσενικό (As)</p> <p>m/z 245</p>	<p>m/z 245</p>



Σχήμα 5.16.3. Μοριακή δομή αρσενοσακχάρου (Οξο-phosphate-arsenosugar) με m/z 483 [29].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Θαλάσσια Γαρίδα *Penaeus kerathurus*



Διάγραμμα αναλύσεων των λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Γενική χημική σύσταση



ΥΓΡΑΣΙΑ
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ
ΤΕΦΡΑ
ΛΙΠΟΣ
ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

Σχήμα 6.1 *Penaeus kerathurus*

6.1.1 Προσδιορισμός υγρασίας, ολικής πρωτεΐνης και τέφρας

Σε αντιπροσωπευτικά δείγματα των μυών και κεφαλοθωράκων, προσδιορίστηκε η υγρασία, η πρωτεΐνη και η τέφρα όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.1, 5.2, 5.3, Πειραματικό Μέρος, κεφάλαιο 5. Οι μέσοι όροι (SD) τριών μετρήσεων (N=3) για τους προσδιορισμούς αυτούς φαίνονται στον Πίνακα 6.1.1.1.

Πίνακας 6.1.1.1. Υγρασία, τέφρα, πρωτεΐνη εκφρασμένα % του νωπού ιστού των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus*. Σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές άλλων ειδών γαρίδας από την διεθνή βιβλιογραφία.

Σύσταση (% νωπού ιστού)		Υγρασία	Τέφρα	Πρωτεΐνη
<i>P. kerathurus</i>	Μύες	77.41±0.27a	1.93±0.34ac	19.20±0.49a
	Κεφ/κες	39.00±0.18A	12.02±0.15A	–
<i>A. antennatus</i> [6]	Μύες	69.57±2.02b	1.75±0.01a	25.77±0.87b
	Κεφ/κες	51.38±2.09B	10.05±1.90B	–
<i>A. foliacea</i> [6]	Μύες	65.55±2.00b	2.12±0.01c	27.30±0.91b
	Κεφ/κες	48.21 ± 1.97B	13.44 ± 1.93A	–

<i>Parapenaeus longirostris</i> [89]	Μύες	78.0±5.3ac	1.44±0.13c	16.60±0.22c
	Κεφ/κες	71.7±1.4C	5.80±0.24C	–
<i>Solonocera indica</i> [6]	Μύες	83.60±0.90c	0.68±0.04d	13.70±0.50d
	Κεφ/κες	80.40±0.50D	6.50±0.30D	8.20±0.10e
<i>Aristeus alcocki</i> [6]	Μύες	81.00±0.20c	0.65±0.16d	15.10±0.10f
	Κεφ/κες	77.20±0.70E	4.00±0.20E	8.60±0.40e
<i>Penaeus monodon</i> [90]	Μύες	80.47±0.26c	0.95±0.01e	17.10±0.56c
<i>Crangon crangon</i> [6]	Μύες	79.21±0.01c	1.39±0.01c	18.47±0.09g
<i>Penaeus vannamei</i> [90]	Μύες	77.21±0.18a	1.47±0.10c	18.8±0.23g

Διαφορετικό μικρό γράμμα για τους μύες και κεφαλαίο για τους κεφαλοθώρακες στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Από τα δεδομένα του Πίνακα 6.1.1.1. φαίνεται ότι οι μύες των *P. kerathurus*, *Aristeus antennatus* και *Aristaeomorpha foliacea* [6] περιείχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό υγρασίας από αυτό των κεφαλοθωράκων. Επιπλέον βρέθηκε ότι οι κεφαλοθώρακες των ειδών *Parapenaeus longirostris* [89], *Solonocera indica* [6] και *Aristeus alcocki* [6] περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας από αυτό των κεφαλοθωράκων των άλλων ειδών γαρίδων του Πίνακα 6.1.1.1 Επίσης από την σύγκριση του ποσοστού υγρασίας των μυών όλων των παραπάνω ειδών γαρίδων φαίνεται ότι μεταξύ τους υπάρχει σημαντική ή μη διακύμανση, γεγονός που πιθανόν εξαρτάται από το είδος της γαρίδας. Το ποσοστό της τέφρας των κεφαλοθωράκων τόσο της υπό μελέτη γαρίδας *P. kerathurus* όσο και όλων των άλλων ειδών που παρουσιάζονται στο Πίνακα 6.1.1.1 είναι σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με αυτή των μυών. Αυτό οφείλεται στο ότι από τους μύες έχει αφαιρεθεί το κέλυφος, πριν από τον προσδιορισμό της τέφρας, ενώ στους κεφαλοθώρακες παραμένει. Τέλος, το ποσοστό της περιεχόμενης πρωτεΐνης στους μύες

παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των ειδών, με τους μύες της *P. kerathurus* να παρουσιάζουν από τα υψηλότερα ποσοστά.

6.2 Απομόνωση των ολικών λιπιδίων της γαρίδας *P. kerathurus*

Οι γαρίδες προέρχονται από το Αιγαίο Πέλαγος (θαλάσσια περιοχή Πλαταμώνα-Κατερίνης). Το μήκος των γαρίδων κατά μέσο όρο ήταν 21.2 cm. και ο μέσος όρος του βάρους ήταν 17.9 g. Παραλήφθηκαν οι μύες αφού αποχωρίστηκαν από τους κεφαλοθώρακες και αφαιρέθηκε το έντερο και το κέλυφος (εξωσκελετός ως μη βρώσιμος). Στη συνέχεια τα λιπίδια των παραπάνω ιστών εκχυλίστηκαν χωριστά με τη μέθοδο Bligh – Dyer, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.5 στο Πειραματικό Μέρος, κεφάλαιο 5.

Από το σταθμικό προσδιορισμό βρέθηκε ότι τα ολικά λιπίδια (χλωροφορμική φάση της Bligh – Dyer) αποτελούσαν το 0.60 % του νωπού μυϊκού ιστού και το 1.43 % του νωπού ιστού των κεφαλοθωράκων. Από τον προσδιορισμό του λιπιδικού φωσφόρου υπολογίστηκε το % ποσοστό των φωσφολιπιδίων στα ολικά λιπίδια. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. 2.1.

Πίνακας 6.2.1. Γενικά αναλυτικά στοιχεία των ολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*

<i>P. kerathurus</i>	Βάρος ολικών λιπιδίων (g)	Λιπίδια του νωπού ιστού (%)
Μύες	1.32±0.05	0.60±0.02
Κεφαλοθώρακας	2.26±0.09	1.43±0.04

Όπως φαίνεται (Πίνακας 6.2.1.) οι κεφαλοθώρακες περιέχουν υπερδιπλάσιο ποσοστό λίπους έναντι των μυών. Το ποσοστό των ολικών λιπιδίων % του νωπού ιστού των μυών της *P. kerathurus* βρέθηκε μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ποσοστό της *P. longirostris* (0.54±0.04) [89], ενώ μικρότερο από το αντίστοιχο ποσοστό των *Aristeus antennatus* (0.72±0.01) [6], *P. monodon* (1.23±0.36) και *P. vannamei* (1.30±0.09) [90]. Επίσης το ποσοστό των ολικών λιπιδίων % του νωπού ιστού των κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus* βρέθηκε μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ποσοστό της *P. longirostris* (0.66±0.06) [89] και μικρότερο από το αντίστοιχο ποσοστό της *Aristeus antennatus* (3.52±0.01) [6].

6.2.1 Διαχωρισμός των ολικών λιπιδίων σε ουδέτερα και πολικά με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).

Ο διαχωρισμός των ολικών λιπιδίων της γαρίδας σε πολικά και ουδέτερα που πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στερεάς φάσης (υποκεφάλαιο 5.9 στο Πειραματικό Μέρος). Από τον προσδιορισμό του λιπιδικού φωσφόρου στα παραπάνω κλάσματα υπολογίστηκε το ποσοστό των φωσφολιπιδίων στα πολικά λιπίδια. Το ποσοστό των πολικών και ουδέτερων λιπιδίων στα ολικά λιπίδια υπολογίστηκε με σταθμικό προσδιορισμό των κλασμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 6.2.1.1.

Πίνακας 6.2.1.1. Αποτελέσματα σταθμικού προσδιορισμού και προσδιορισμού φωσφόρου στα ολικά, πολικά και ουδέτερα λιπίδια της *P.kerathurus*

Δείγμα	Μυών	Κεφαλοθωράκων
Ολικά λιπίδια (g/100 g νωπού ιστού)	0.6±0.02a*	1.43±0.05b
Πολικά λιπίδια (% w/w) των ολικών λιπιδίων	68.02±0.51a	46.5±0.7b
Ουδέτερα λιπίδια (% w/w) των ολικών λιπιδίων	31.98 ± 0.6a	58.5±0.50b
Φωσφολιπίδια (% w/w) των ολικών λιπιδίων	65.0±0.02a	44.0±0.41b
Φωσφολιπίδια (% w/w) των πολικών λιπιδίων	95.6±0.42a	94.6±0.43b
Φωσφολιπίδια (g/100 g νωπού ιστού)	0.41 ± 0.03a	0.44 ± 0.05a

*Διαφορετικό γράμμα στην ίδια γραμμή υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Από τον παραπάνω Πίνακα 6.2.1.1. φαίνεται ότι τα ολικά λιπίδια των μυών περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό πολικών λιπιδίων (είναι κυρίως φωσφολιπίδια) σε αντίθεση με τους κεφαλοθώρακες που βρέθηκε ότι περιείχαν κυρίως ουδέτερα λιπίδια. Το αυξημένο ποσοστό των ουδετέρων λιπιδίων στα ολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία του ηπατοπαγκρέατος το οποίο περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια. Επομένως, το ποσοστό των φωσφολιπιδίων στα ολικά λιπίδια των μυών είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό στους κεφαλοθώρακες,. Επειδή η ποσοστιαία σύσταση δεν εξασφαλίζει κατ' ανάγκη πληροφορίες και για την ποσοτική σύσταση, προσδιορίστηκαν τα g φωσφολιπιδίων /100 g νωπού ιστού και βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus* δεν διαφέρει σημαντικά.

6.3 Προσδιορισμός ολικών, πολικών, ουδετέρων λιπιδίων και των επιμέρους ενώσεων τους με Iatroscan (TLC/ FID)

Με τη τεχνική Iatroscan (TLC/ FID) (Κεφάλαιο 5 -Παράγραφος 5.11) έγινε ποιοτική και ποσοτική μελέτη των ολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες 6.3.1. και 6.3.2.

Πίνακας 6.3.1. Σύσταση των επιμέρους τάξεων των πολικών λιπιδίων % (w/w) των ολικών πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*

%(w/w)/PL	Car	PE	PS+PI	PC	Sph	LPC
Μύες	5.3±0.2	29.3±0.3	0.5±0.1	55.6±0.6	9.2±0.3	2.0±0.1
Κεφαλοθώρακες	15.4±0.3	25.7±0.2	7.4±0.1	46.4±0.4	4.05±0.2	1.05±0.2

Η μελέτη της σύστασης των πολικών λιπιδίων των μυών της *P. kerathurus* έδειξε ότι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) αποτελεί το κύριο φωσφολιπίδιο σε ποσοστό 55.6%, ενώ ακολουθεί η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) (29.3%). Σε μικρότερα ποσοστά προσδιορίστηκαν σφιγγομυελίνη (Sph), καρδιολιπίνη (Car), λυσο- φωσφατιδυλοχολίνη (LPC), φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI). Παρόμοια εικόνα

παρουσιάζουν τα πολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων στα οποία η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη είναι τα κύρια συστατικά τους με ποσοστά 46.4% και 25.7 % αντίστοιχα (Πίνακας 6.3.1). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά για την σύσταση των πολικών λιπιδίων των γαρίδων των ειδών *Aristeus antennatus* και *Aristaeomorpha foliacea* [6], (τα οποία μελετήθηκαν από την ίδια ερευνητική ομάδα) με την διαφορά ότι στα πολικά τους λιπίδια, αντίθετα από τα πολικά της *P.kerathurus*, δεν προσδιορίστηκε καρδιολιπίνη (Car). Επίσης, διαφέρουν ως προς τα ποσοστά των επί μέρους τάξεων των πολικών λιπιδίων. Συγκεκριμένα τα ολικά πολικά λιπίδια των μυών της *P. kerathurus* περιέχουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό PE και μικρότερα ποσοστά Sph και LPC συγκριτικά με τα πολικά λιπίδια των μυών των ειδών *Aristeus antennatus* και *Aristaeomorpha foliacea* [6]. Όσον αφορά τα ολικά πολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus*, βρέθηκε ότι περιείχαν μικρότερο ποσοστό PC συγκρινόμενο με το ποσοστό της PC στα πολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων των *A. antennatus* και *A. foliacea* [6], στα οποία δεν βρέθηκαν επίσης, αντίθετα από τα πολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus*, PS, PI και LPC.

Πίνακας 6.3.2. Σύσταση των επιμέρους τάξεων των ουδετέρων λιπιδίων % (w/w) των ολικών ουδετέρων λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*.

%(w/w)/NL	HC	CE. WAX	TG	F.Alc. DG	Sterol	MG
Μύες	0.67±0.2	1.36 ±0.3	7.61±0.1	3.51±0.6	84.9±0.3	1.96±0.1
Κεφ/ρακες	-	4.0±0.3	67.2±0.1	5.7±0.5	17.7±0.4	1.2±0.1

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6.3.2., φαίνεται ότι το κύριο συστατικό των ουδετέρων λιπιδίων είναι οι στερόλες σε ποσοστό 84.9 % των ολικών ουδετέρων λιπιδίων των μυών της *P. kerathurus*, ενώ τα τριγλυκερίδια (TG) και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (F. FA) περιέχονται σε χαμηλότερα ποσοστά (7.6% και 3.51%). Στους κεφαλοθώρακες τα τριγλυκερίδια βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό (67.2 %) και τα υπόλοιπα λιπίδια, στερόλες (Sterol), ελεύθερα λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια (MG) σε μικρότερα ποσοστά.

6.4 Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των ολικών και πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*.

Τα λιπαρά οξέα των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας προσδιορίστηκαν με αεριοχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC-MS) όπως περιγράφονται στις Μ.Δ.Ε. των Λ. Κόρα [2] και Α. Τσαπέ [1].

Πίνακας 6.4.1. Σύσταση λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων των μυών της γαρίδας *P. kerathurus*

Λιπαρά οξέα	Χημικός τύπος	% Λ.Ο των TFA	mgΛ.Ο/100g νωπού ιστού
Μυριστικό	C 14:0	0.68 ± 0.00	6.54 ± 0.14
Δεκαπεντανοϊκό	C 15:0	1.27 ± 0.00	12.19 ± 0.26
Cis-10- δεκαπεντενοϊκό	C 15:1	0.43 ± 0.00	4.16 ± 0.05
Παλμιτικό	C 16:0	13.25 ± 0.04	127.24 ± 2.77
Παλμιτελαϊκό	C 16:1	5.63 ± 0.08	54.05 ± 0.33
15-μεθυλο-δεκαεξανοϊκό	C 17:0 I	0.94 ± 0.01	9.07 ± 0.13
Δεκαεπτανοϊκό	C 17:0	2.73 ± 0.01	26.27 ± 0.71
Cis 9.10 μεθελενοδεκαεξανοϊκό	C 17 0 cyclo	2.05 ± 0.01	1.92 ± 0.02
2-υδροξυ-δεκατετρανοϊκό	C 14:0 2-OH	0.7± 0.03	6.79± 0.02
Στεατικό	C 18:0	6.56 ± 0.03	62.99± 1.52
Ελαϊκό	C 18:1n-9c	11.14 ± 0.05	106.97± 2.47
Βακενικό	C 18:1n-7c	4.81 ± 0.00	4.49 ± 0.09
Λινελαϊκό	C 18:2n-6c	1.38 ± 0.03	13.21 ± 0.49
Α-λινολενικό	C18:3 n-3	0.33 ± 0.01	3.13 ± 0.06
Αραχιδικό	C 20:0	0.56 ± 0.01	5.43 ± 0.05
Cis-11-εικοσενοϊκό	C 20:1 n-9	1.15 ± 0.00	11.07 ± 0.15
Cis-13.16-εικοσαδιενοϊκό	C 20:2 n-6	1.16 ± 0.01	11.19 ± 0.44
Αραχιδονικό	C 20:4n-6	11.04 ± 0.00	105.99± 2.03
Cis5.8.11.14.17εικοσιπεντενοϊκό	C 20:5n-3	17.28 ± 0.31	166.87 ± 2.57
Ερουκικό	C 22:1n-9	0.37 ± 0.01	3.60 ± 0.04

Εικοσιδυοπεντενοϊκό	C 22:5 n-3	1.12 ± 0.01	1.05 ± 0.04
Λιγνοκερικό	C 24:0	2.21 ± 0.03	21.26 ± 0.04
Cis-4.7.10.13.16.19-εικοσιδυοεξενοϊκό	C 22:6n-3	13.05 ± 0.08	125.31 ± 1.67
Σ κορεσμένων		30.95	297.51
Σ μονοακόρεστων		23.54	226.04
Σ πολυακόρεστων		45.35	436.55
Σ ω-3		31.77	306.16
Σ ω-6		13.58	130.39

Πίνακας 6.4.2. Σύσταση των λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*

Λιπαρά οξέα	Χημικός τύπος	% Λ.Ο των TFA	mgΛ.Ο/100g νωπού ιστού
Μυριστικό	C14:0	1.89±0.15	37.66 ± 0.74
Μυριστελαϊκό	C14:1	0.33±0.03	6.60 ± 0.02
Δεκαπεντανοϊκό	C15:0	2.15±0.15	42.95 ± 1.23
Cis-10-δεκαπεντενοϊκό	C15:1	0.80±0.05	15.98 ± 0.62
Παλμιτικό	C16:0	17.20±1.08	343.78 ± 12.71
Παλμιτελαϊκό	C16:1	5.17±0.31	103.29 ± 4.06
3-υδροξυ-δωδεκανοϊκό	3-OH C12:0	0.16 ± 0.22	3.35 ± 4.74
15-μεθυλο-δεκαεξανοϊκό	iso-C17:0	1.96±0.11	39.15 ± 1.70
Δεκαεπτανοϊκό	C17:0	2.73±0.13	54.54 ± 2.77
cis-9.10-μεθυλενο-δεκαεξανοϊκό	C17:0 cyclo	1.82±0.08	36.50 ± 1.95
2-υδροξυ-δεκατετρανοϊκό	2-OH C14:0	0.93 ± 0.05	18.66 ± 0.89
Στεατικό	C18:0	6.44±0.23	128.85 ± 8.20

Ελαϊκό	C18:1 n-9 cis	9.41±0.05	188.71 ± 17.83
Βακενικό	C18:1 n-7 cis	4.20±1.03	85.33 ± 29.00
3-υδρόξυ-δεκατετρανοϊκό	3-OH C14:0	0.36±0.05	7.27 ± 1.64
Λινελαϊδικό	C18:2 n-6 trans	0.32±0.04	6.29 ± 0.19
Λινελαϊκό	C18:2 n-6 cis	1.07 ± 0.03	21.38 ± 1.59
Δεκαεννεανοϊκό	C19:0	0.29 ±0.01	5.81 ± 0.47
γ-λινολενικό	C18:3 n-6	0.43 ± 0.00	8.70 ± 0.87
cis-9.10-μεθυλενοδεκαοκτανοϊκό	C19:0 cyclo	0.30 ± 0.01	6.00 ± 0.36
α-λινολενικό	C18:3 n-3	0.40 ± 0.03	8.01 ± 1.47
2-υδρόξυ-δεκαεξανοϊκό	2-OH C16:0	0.30 ± 0.00	5.49 ± 0.60
Αραχιδικό	C20:0	2.49 ± 0.02	49.86 ± 5.39
cis-11-εικοσενοϊκό	C20:1 n-9	1.88 ± 0.02	37.77 ± 3.27
cis-13.16-εικοσαδιενοϊκό	C20:2 n-6	2.07 ± 0.04	41.56 ± 4.85
Cis-8.11.14-εικοσατριενοϊκό	C20:3 n-6	0.20 ± 0.28	4.29 ± 6.06
Αραχιδονικό	C20:4 n-6	8.65 ± 0.07	173.47 ± 15.86
cis-11.14.17-εικοσατριενοϊκό	C20:3 n-3	0.58 ± 0.01	11.55 ± 1.26
Βεχενικό	C22:0	0.83 ± 0.51	17.18 ± 11.81
cis-5.8.11.14.17-εικοσαπεντενοϊκό	C20:5 n-3	10.70 ± 0.05	214.49 ± 20.36
Ερουκικό	C22:1 n 9	0.64 ± 0.00	12.88 ± 1.27
Εικοσιδυοπεντενοϊκό	C22:5 n-3	0.63 ± 0.00	12.60 ± 1.32
Λιγνοσερικό	C24:0	2.30 ± 0.01	46.20 ± 4.73
cis-4.7.10.13.16.19-εικοσιδυοεξενοϊκό	C22:6 n-3	10.38 ± 0.48	208.62 ± 30.27
Σ κορεσμένων	Σω:0	42.44	849.53
Σ μονοακόρεστων	Σω:1	22.44	450.56
Σ πολυακόρεστων	Σω:n	35.11	705.13

Σ ω-3	Σω:3	14.60	455.27
Σω-6	Σω:6	12.74	255.69

Από τους Πίνακες 6.4.1 και 6.4.2 φαίνεται ότι: α) τα κύρια κορεσμένα λιπαρά οξέα στους μύες και κεφαλοθώρακες ήταν το C16:0 (παλμιτικό) σε ποσότητες 127.24 ± 2.77 , 343.78 ± 12.71 mg /100 g νωπού ιστού και το C18:0 (στεατικό) σε ποσότητες 62.99 ± 1.52 , 128.85 ± 8.20 mg /100 g νωπού ιστού αντίστοιχα, β) κύρια μονοακόρεστα το C16:1 ω-9 cis (παλμιτελαϊκό) σε ποσότητες 54.05 ± 0.33 , 103.29 ± 4.06 mg /100 g νωπού ιστού και το C18:1 ω-9 cis (ελαϊκό) σε ποσότητες 106.97 ± 2.47 , 188.71 ± 17.83 mg /100 g νωπού ιστού αντίστοιχα και γ) κύρια πολυακόρεστα το C 20:5 ω-3 cis (EPA) σε ποσότητες 166.87 ± 2.57 , 214.49 ± 20.36 και το C 22:6 ω-3 cis (DHA) σε ποσότητες 125.31 ± 1.67 , 208.62 ± 30.27 αντίστοιχα. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τόσο οι μύες όσο και οι κεφαλοθώρακες ήταν πλουσιότεροι σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα κυρίως ω-3 συγκριτικά με τα μονοακόρεστα. Όσον αφορά τα σύνολα των λιπαρών οξέων, φαίνεται ότι τόσο στους μύες όσο και στους κεφαλοθώρακες το σύνολο των PUFA ήταν μεγαλύτερο από το σύνολο των MUFA, ενώ ήταν μεγαλύτερο από το σύνολο των SFA στους μύες και μικρότερο στους κεφαλοθώρακες. Σύμφωνα με τα παραπάνω προκύπτει ότι τόσο οι μύες όσο και οι κεφαλοθώρακες της *P. kerathurus* αποτελούν πολύ καλή πηγή PUFA κυρίως ω-3 (EPA και DHA). Οι κεφαλοθώρακες επειδή δεν θεωρούνται βρώσιμοι και συνήθως απορρίπτονται μπορεί να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων σε συμπληρώματα διατροφής.

Πίνακας 6.4.3. Σύσταση % (w/w) λιπαρών οξέων επί των ολικών λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθώρακων της γαρίδας *P. kerathurus*.

Χημικός Τύπος	(PL)	(PL)
Λιπαρών οξέων	Κεφαλοθώρακες	Μύες
C14:0	0.68 ± 0.12	0.69 ± 0.02
C15:0	1.35 ± 0.18	1.41 ± 0.03
C15:1	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.01

C16:0	13.73 ± 1.22	14.01 ± 0.11
C16:1	4.43 ± 0.39	5.16 ± 0.01
iso-C17:0	1.01 ± 0.06	0.91 ± 0.02
C17:0	2.96 ± 0.13	3.17 ± 0.04
C17:0 cyclo	1.85 ± 0.11	1.83 ± 0.02
2-OH C14:0	0.73 ± 0.02	0.70 ± 0.02
C18:0	7.89 ± 0.17	8.21 ± 0.17
C18:1 n-9 cis	12.43 ± 0.33	10.53 ± 0.15
C18:1 n-7 cis	3.74 ± 0.11	3.54 ± 0.02
C18:2 n-6 trans	0.25 ± 0.10	-
C18:2 n-6 cis	1.17 ± 0.03	1.43 ± 0.03
C18:3 n-6	0.39 ± 0.05	-
C19:0 cyclo	0.11 ± 0.06	-
C18:3 n-3	0.33 ± 0.00	0.45 ± 0.02
2-OH C16:0	0.11 ± 0.15	-
C20:0	0.79 ± 0.02	0.53 ± 0.02
C20:1 n-9	0.73 ± 0.01	1.01 ± 0.06
C20:2 n-6	1.43 ± 0.02	1.28 ± 0.01
C20:3 n-6	0.15 ± 0.21	-
C20:4 n-6	12.46 ± 0.30	10.78 ± 0.06
C20:5 n-3	14.54 ± 0.26	15.09 ± 0.03
C22:1 n 9	0.10 ± 0.14	0.35 ± 0.00
C22:5 n-3	0.44 ± 0.03	1.40 ± 0.08
C24:0	2.48 ± 0.22	2.34 ± 0.28
C22:6 n-3	13.37 ± 1.55	14.84 ± 0.34
Σύνολο κορεσμένων	33.67	33.80

Σύνολο μονοακόρεστων	21.80	20.93
Σύνολο πολυακόρεστων	44.53	45.27
Σύνολο ω - 3	28.68	30.38
Σύνολο ω - 6	15.85	12.21

Από τον Πίνακα 6.4.3 φαίνεται ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων διαφέρει ως προς την σύσταση (π.χ. τα λιπαρά οξέα C18:2 n-6 trans, C18:3 n-6, 2-OH C16:0, κλπ. προσδιορίστηκαν μόνο στους κεφαλοθώρακες) ενώ όσον αφορά τα ποσοστά των κυριότερων λιπαρών οξέων, δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση την αναλογία ω-3/ω-6 στα πολικά λιπίδια των μυών.

Στα πολικά λιπίδια των μυών της υπό μελέτη γαρίδας, τα σύνολα των PUFA, MUFA, SFA βρέθηκαν παρόμοια με τα αντίστοιχα των ολικών λιπιδίων των μυών. Αντίθετα, στα πολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων, το σύνολο των πολυακόρεστων (44.5%), βρέθηκε μεγαλύτερο από αυτό των κορεσμένων (33.67%), όταν στα ολικά τους λιπίδια το σύνολο των SFA (42.4%) ήταν μεγαλύτερο από αυτό των PUFA (35.1%),.

Όσον αφορά το σύνολο των MUFA βρέθηκε τόσο στα πολικά όσο και στα ολικά λιπίδια των κεφαλοθωράκων σε παρόμοιο ποσοστό . (21.8% και 22.4% αντίστοιχα)

Πίνακας 6.4.4. Σύσταση % (w/w) λιπαρών οξέων επί των ολικών λιπαρών οξέων των μοριακών ειδών της φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης της γαρίδας *P. kerathurus*.

Λ. Οξέα	% Λ.Ο, PE		% Λ.Ο, PC	
	Μύες	κεφαλοθώρακες	Μύες	κεφαλοθώρακες
C14:0	-	1.73±0.07	0.38±0.03	1.52±0.05
C15:0	-	3.21±0.12	-	2.82±0.09
C15:1	-	0.68±0.02	-	0.62±0.03

C16:0	21.30±0.51	27.37±1.95	14.03±0.60	25.10±0.48
C16:1 ω-7	4.63±0.18	10.08±0.76	3.64±0.13	8.36±0.44
Iso-C17:0	1.85±0.16	1.54±0.02	1.17±0.06	1.52±0.05
C17:0	5.19±0.43	4.37±0.12	4.70±0.29	4.24±0.06
cyclo-C17:0	2.16±0.10	3.00±0.15	2.30±0.12	2.88±0.17
2-OH C14:0	1.59±0.16	0.93±0.03	1.22±0.04	1.03±0.09
C18:0	13.64±2.91	8.93±0.74	10.86±0.65	8.59±0.02
C18:1 ω-9	11.39 ±2.57	18.58 ± 2.25	14.65 ± 0.79	18.56±0.23
C18:1 ω-7	4.87±0.17	5.53±2.78	3.61±0.18	5.69±0.46
C18:2 ω-6	-	-	1.82±0.01	1.43±0.07
C18:3 ω-6	-	-	-	0.19±0.07
C18:3 ω-3	-	0.13±0.33	1.27±0.04	0.28±0.12
C20:0	-	0.67±0.04	1.02±0.06	0.73±0.01
C20:1 ω-9	-	0.84±0.17	1.02±0.05	1.00±0.01
C20:2 ω-6	3.86±1.33	0.76±0.01	5.56±0.20	0.78±0.02
C20:3 ω-6	-	-	-	1.25±0.07
C20:4 ω-6	8.69±1.29	3.25±0.15	11.28±0.75	3.82±0.09
C22:1 ω-9	-	0.16±0.41	-	0.54±0.05

C20:5 ω-3	10.90±0.08	3.82±0.37	12.39±0.57	4.19±0.08
C22:5 ω-3	-	0.83±0.57	1.64±0.08	2.51±0.15
C24:0	-	0.22±0.57	1.38±0.08	0.61±0.02
C22:6 ω-3	9.91±0.81	2.30±0.37	4.52±0.05	1.19±0.04

Από τον παραπάνω Πίνακα 6.4.4 φαίνεται ότι η PE μυών και κεφαλοθωράκων βρέθηκε ότι περιείχε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ω-3 λιπαρών οξέων κυρίως EPA και DHA συγκριτικά με την PC. Επίσης όσο αφορά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, η PC μυών και κεφαλοθωράκων περιείχε μεγαλύτερο ποσοστό παλμιτικού και μικρότερο στεατικού σε σχέση με την PE. Τέλος η PC μυών και κεφαλοθωράκων περιείχε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με την PE.

Πίνακας 6.4.5. Στατιστική ανάλυση των λιπαρών οξέων (w/w %) ^{a,b} των πολικών λιπιδίων (PL) και μοριακών δομών της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) και φωσφατιδυλογολίνης (PC) μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*.

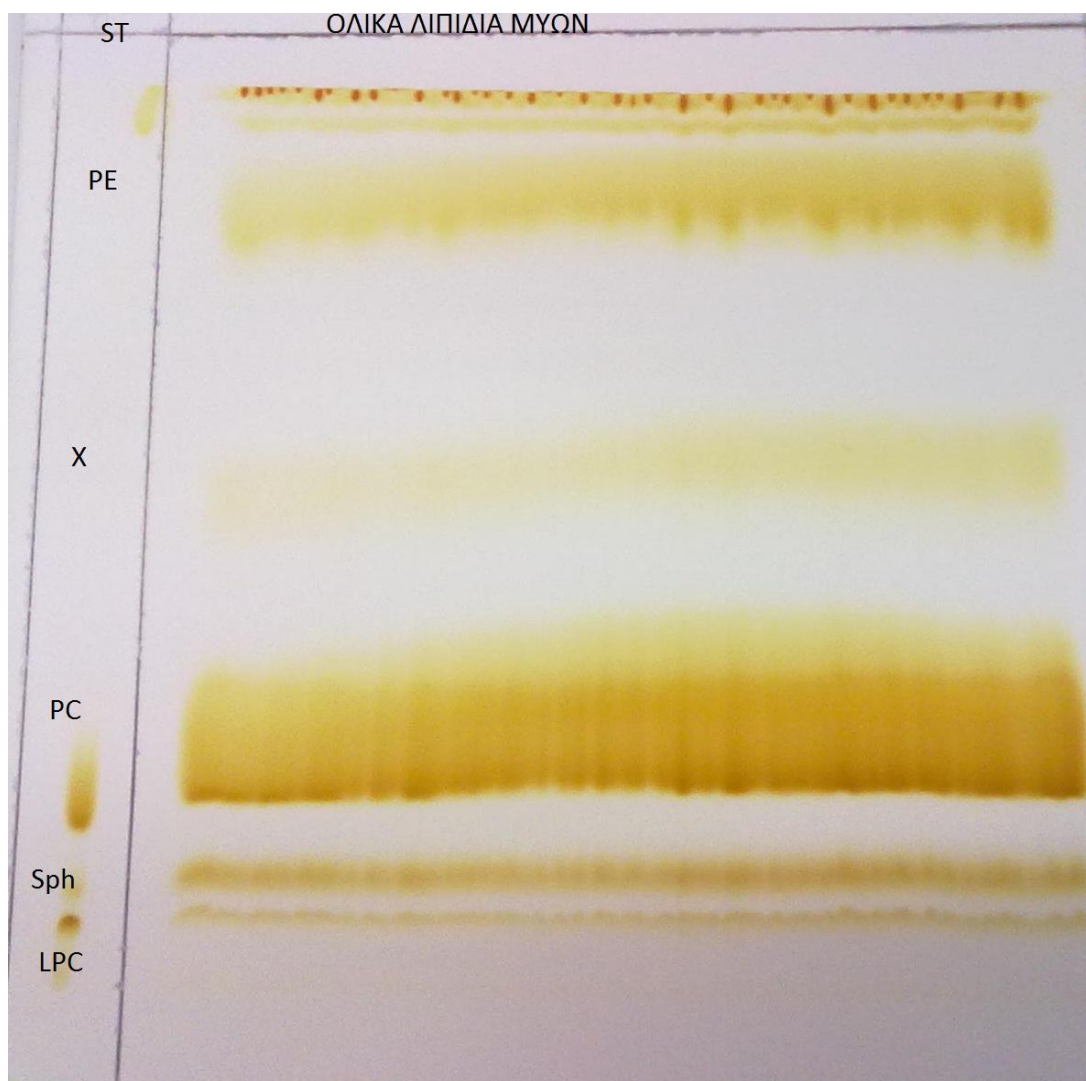
Λ.Οξέα	PL muscle	PL Cep/rax	PE muscle	PE cep/rax	PC muscle	PC cep/rax
Σ saturated	33.80±0.10A	33.67±0.11A	45.74±1.24B	38.10±1.07C	51.99±0.66D	49.24±0.70E
Σ MUFA	20.93±0.13A	21.80±0.17A	20.89±0.49A	24.49±0.38B	35.71±0.57C	34.91±0.45C
Σ PUFA	45.27±0.16A	44.53±0.21B	33.37±0.22C	37.42±0.25D	12.15±0.36E	15.85±0.32F
Σ ω-3	30.38±0.14A	28.68±0.16B	20.81±0.25C	19.82±0.14D	7.08±0.35E	8.17±0.12F
Σ ω-6	12.21±0.08A	15.85±0.11B	12.55±0.30A	18.66±0.65C	4.01±0.08D	7.47±0.12E
ω-3/ω-6	2.49±0.005A	1.81±0.003B	1.66±0.02C	1.06±0.03D	1.76±0.05B	1.09±0.002D

- ✓ Από τον Πίνακα 6.4.5 φαίνεται ότι το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus* βρέθηκε παρόμοιο, ενώ το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων (PC και PE) των μυών της γαρίδας ήταν μεγαλύτερο από αυτό των κεφαλοθωράκων.
- ✓ Το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών καθώς και των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων (PC και PE) είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κλάσματα των κεφαλοθωράκων .
- ✓ Ο λόγος ω-3/ω-6 βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερος στα πολικά λιπίδια, στη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και τη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) των μυών (2.49±0.005, 1.66±0.02 και 1.76±0.05) συγκρινόμενη με την ίδια αναλογία στους κεφαλοθώρακες.
- ✓ Ο λόγος EPA/DHA βρέθηκε μεγαλύτερος της μονάδας στην φωσφατιδυλοχολίνη (3.52±0.002) και φωφατιδυλοαιθανολαμίνη (2.74±0.01) τόσο των μυών όσο και του κεφαλοθώρακα. Η αναλογία ω-3/ω-6 είναι σημαντική για την ανθρώπινη υγεία επειδή πολλές ανθρωπολογικές, διατροφικές και γενετικές μελέτες δείχνουν ότι η χαμηλή αναλογία ω-3/ω-6 λιπαρών οξέων ενισχύει την παθογένεια των διαφόρων ασθενειών όπως καρδιαγγειακές παθήσεις οστεοπόρωση, καρκίνος και άλλα, ενώ η υψηλή αναλογία είναι επιθυμητή επειδή περιορίζει τον κίνδυνο διαφόρων χρόνιων παθήσεων [91].

6.5 Διαχωρισμός και απομόνωση των επί μέρους τάξεων φωσφολιπιδίων από τα κλάσματα των ολικών λιπιδίων με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

Ποσότητα ολικών λιπιδίων (περίπου 450 γ φωσφόρου) μυών και κεφαλοθωράκων χωριστά τοποθετήθηκαν σε παρασκευαστικές πλάκες TLC 20x20 cm και αναπτύχθηκαν σε πολικό σύστημα χλωροφορμίου/μεθανόλης/οξείκου οξέος/ νερού 50/25/6/2 v/v/v/v έναντι προτύπου ολικών λιπιδίων κρόκου αβγού. Η εμφάνιση των πολικών λιπιδίων

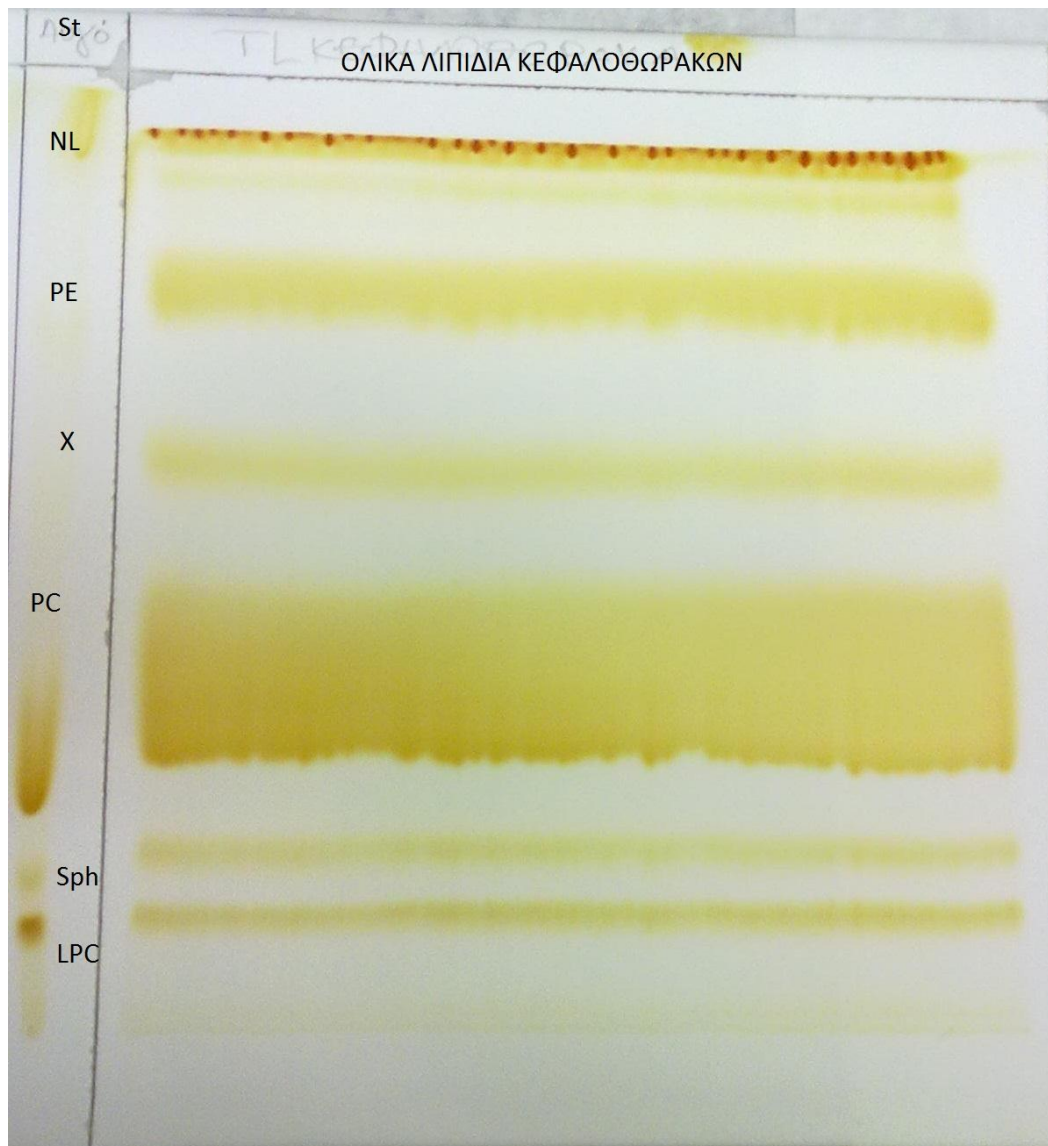
έγινε με έκθεση σε ατμούς ιωδίου (Σχήμα 6.5.1 και 6.5.2). Μετά την εξάχνωση του ιωδίου οι οριζόντιες ζώνες των διαφορετικών λιπιδικών ενώσεων αποξύστηκαν [PE, X, PC, Sph και LPC] και παραλήφθησαν τα λιπιδικά κλάσματα όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.10 στο Πειραματικό Μέρος. Στόχος της παραπάνω διαδικασίας ήταν ο διαχωρισμός και η παραλαβή των επιμέρους τάξεων πολικών λιπιδίων, ώστε να ταυτοποιηθούν οι μοριακές τους δομές.



Σχήμα 6.5.1. Παρασκευαστική TLC των ολικών λιπιδίων των μυών της γαρίδας *P. kerathurus*.

Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ/ νερό 50:25:6:2 v/v/v/v

Εμφάνιση: Έκθεση σε ατμούς ιωδίου

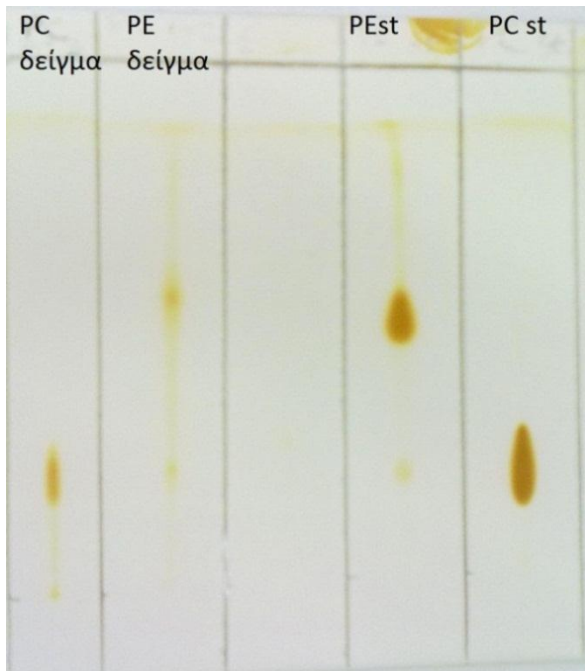


Σχήμα 6.5.2 Παρασκευαστική TLC των ολικών λιπιδίων των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*.

Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ/ νερό 50:25:6:2 v/v/v/v

Εμφάνιση: Έκθεση σε ατμούς ιωδίου.

Στην συνέχεια έγινε έλεγχος καθαρότητας των επιμέρους πολικών λιπιδίων (στα δείγματα μυών και κεφαλοθωράκων) έναντι πολικών προτύπων και ολικών λιπιδίων κρόκου αβγού με HPTLC σε πολικό σύστημα ανάπτυξης (Σχήμα 6.5.3 και 6.5.4).



Σχήμα 6.5.3. HPTLC των κλασμάτων της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοχολίνης που παρελήφθησαν από παρασκευαστική TLC από ολικά λιπίδια των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P.kerathurus*.

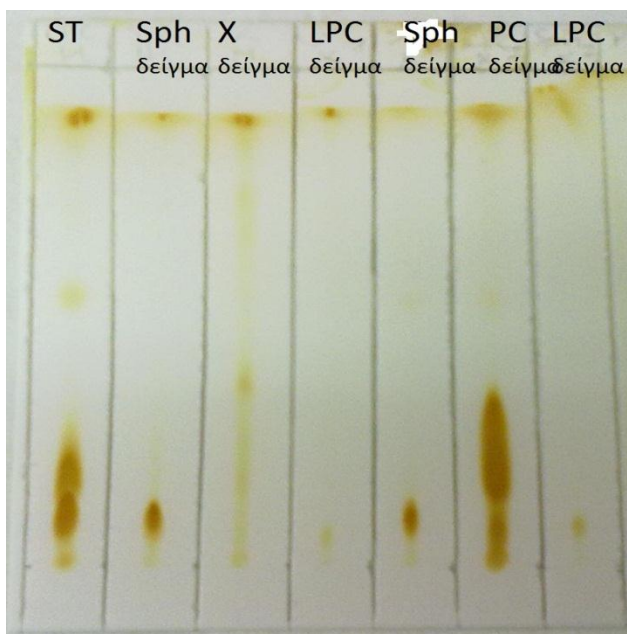
PC δείγμα - φωσφατιδυλοχολίνη μετά την κλασμάτωση από παρασκευαστική TLC

PE δείγμα- φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη μετά την κλασμάτωση από παρασκευαστική TLC.

PC st. PE st- Πρότυπα της φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης αντίστοιχα.

Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ/ νερό 50:25:6:2 v/v/v/v

Εμφάνιση: Έκθεση σε ατμούς ιωδίου.



Σχήμα 6.5.4 HPTLC των επιμέρους συστατικών (Sph. LPC. X. PC δείγμα) που απομονώθηκαν με παρασκευαστική TLC από ολικά λιπίδια των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P.kerathurus*.

ST- μίγμα προτύπων της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, φωσφατιδυλοχολίνης, λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και σφιγγομυελίνης.

Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ/ νερό 50:25:6:2 v/v/v/v

Εμφάνιση: Έκθεση σε ατμούς ιωδίου.

6.5.1 Προσδιορισμός φωσφόρου

Σε δείγμα λιπιδίων εκάστης ζώνης που προέκυψε από την παρασκευαστική χρωματογραφία των ολικών λιπιδίων (μυών και κεφαλοθωράκων) έγινε προσδιορισμός φωσφόρου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5.1.1.

Πίνακας 6.5.1.1. Αποτελέσματα του προσδιορισμού φωσφόρου στα κλάσματα που προέκυψαν από την παρασκευαστική TLC των φωσφολιπιδίων της γαρίδας *P. kerathurus* [μέσος όρος (SD), n=3].

Λιπίδια	% των φωσφολιπιδίων του κεφαλοθώρακα	% των φωσφολιπιδίων μυών
Car	12.3 ± 0.2	4.0 ± 0.1
PE	24.6 ± 0.2	28.2 ± 0.3
PS+PI	6.2 ± 0.1	4.5 ± 0.1
LPE	0.9 ± 0.1	-
PC	47.1 ± 0.4	54.0 ± 0.5
Sph	6.9 ± 0.2	7.3 ± 0.2
LPC	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1

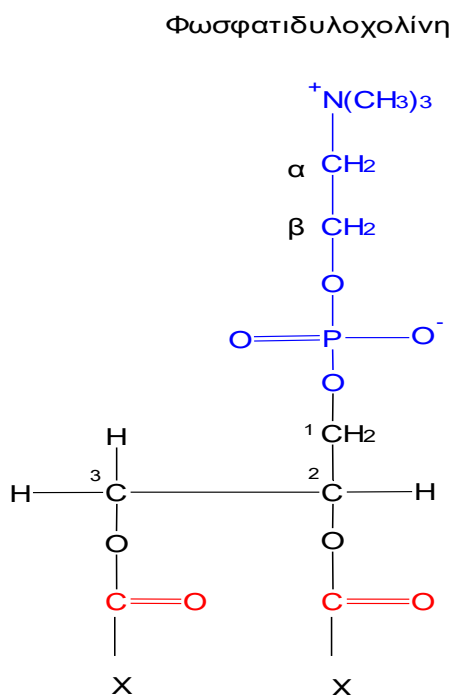
Σχόλια

Από τα δεδομένα του Πίνακα 6.5.1.1, φαίνεται ότι η σύσταση των φωσφολιπιδίων τόσο των μυών όσο και των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus* συμφωνούν με τα δεδομένα από την διεθνή βιβλιογραφία που αφορούν την σύσταση των φωσφολιπιδίων των δεκάποδων καρκινοειδών, στα οποία έχει βρεθεί ότι τα κυριότερα είδη φωσφολιπιδίων είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και σε μικρότερο ποσοστό η φωσφατιδυλοσερίνη και η φωσφατιδυλοϊνσιτόλη [92,93].

Τα φωσφολιπίδια των μυών (Πίνακας 6.5.1.1) βρέθηκε ότι περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό PE και PC και μικρότερο Car συγκρινόμενα με αυτά των κεφαλοθωράκων. Στα ολικά φωσφολιπίδια των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus* το ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης (PC, 54.0 ± 0.5 % και 47.1 ± 0.4 % αντίστοιχα), ήταν παρόμοιο με αυτό που αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία για διαφορετικά είδη καρκινοειδών στους μύες των οποίων το ποσοστό της PC κυμαίνονταν από 40-60% των ολικών φωσφολιπιδίων όπως οι γαρίδες *Penaeus monodon* (PC 44.8% επί των ολικών φωσφολιπιδίων) [94], *Penaeus indicus* [93] (PC 44.5% ολικών φωσφολιπιδίων), *Metapenaeus dobsoni* (PC 49.5% ολικών φωσφολιπιδίων) και *Eriocheir sinensis* (PC 54.2% ολικών φωσφολιπιδίων) [95].

Η περιεκτικότητα των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P.kerathurus* σε φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (54.0 ± 0.5 %, 47.1 ± 0.4 % επί των ολικών φωσφολιπιδίων αντίστοιχα), συμφωνεί με τα δεδομένα από την βιβλιογραφία για το ποσοστό της PE στα φωσφολιπίδια διαφορετικών ειδών γαρίδας στις οποίες η PE κυμαίνεται από 20-30 % των ολικών φωσφολιπιδίων των μυών, όπως τα είδη *P. monodon* (26.4 % των ολικών φωσφολιπιδίων), *P. indicus* (30.8 % των ολικών φωσφολιπιδίων), *M. dobsoni* (27.0 % των ολικών φωσφολιπιδίων) και *E. sinensis* (20.0 % των ολικών φωσφολιπιδίων) [95].

7.1 Ταυτοποίηση δομής προτύπου και δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).



Σχήμα 7.1.1. Δομή της πολικής κεφαλής του μορίου της PC

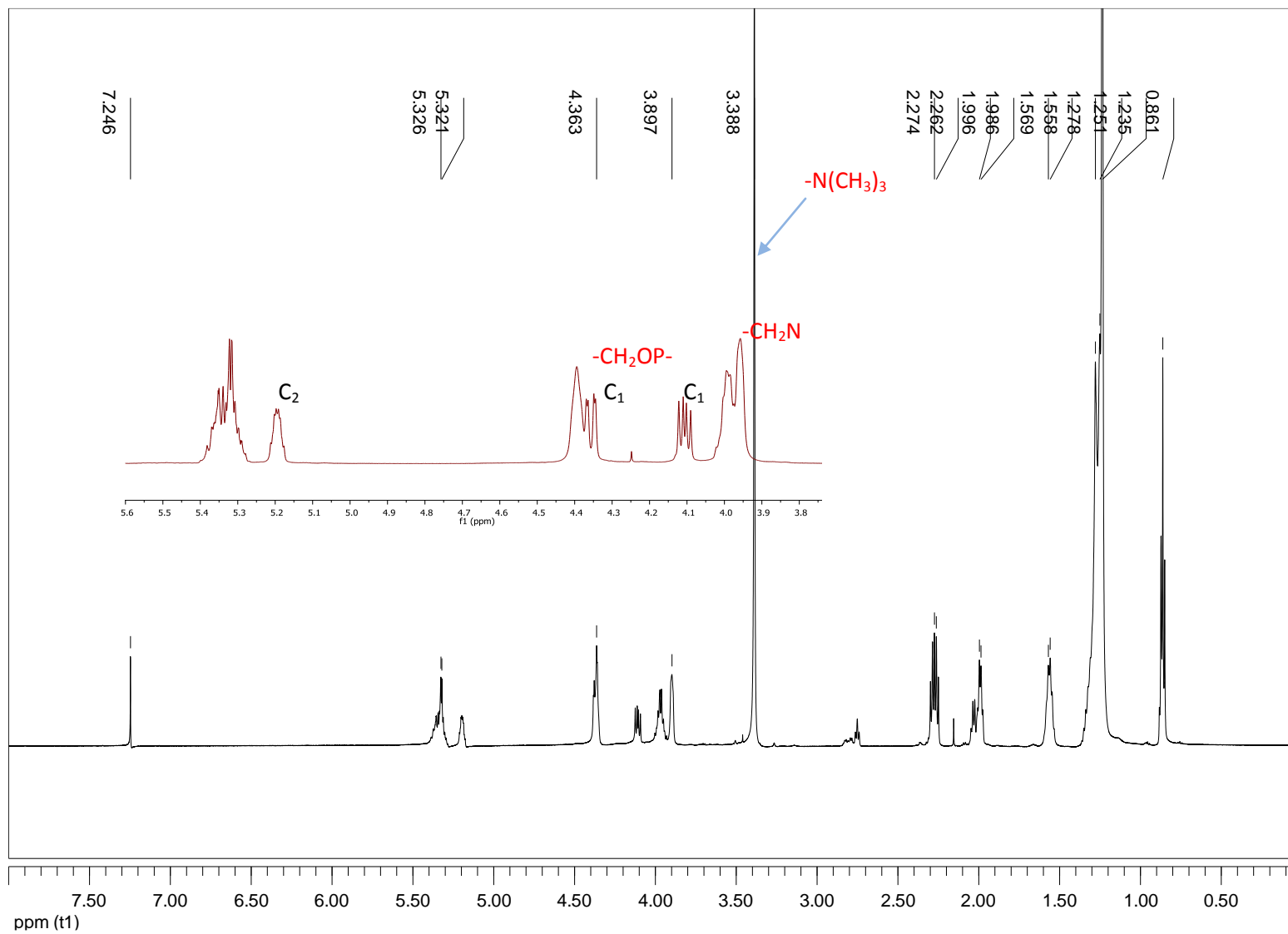
Οι κορυφές στο φάσμα ^1H της πρότυπης ένωσης φωσφατιδυλοχολίνης (PC) αποτιμήθηκαν με βάση τη διδιάστατη φασματοσκοπία COSY (ομοπυρηνικό πείραμα συσχέτισης πυρήνων υδρογόνου μέσω δεσμού) και HSQC (ετεροπυρηνικό πείραμα συσχέτισης πυρήνων υδρογόνου με τους πυρήνες των ανθράκων που είναι άμεσα συνδεδεμένοι) με την παράλληλη βοήθεια των δεδομένων της βιβλιογραφίας. Οι αποτιμήσεις των κορυφών δίνονται πάνω στο Σχήμα 7.1.2.

Η ισχυρής έντασης απλή κορυφή που βρίσκεται στα 3,39 ppm οφείλεται στα 9 υδρογόνα των μέθυλο υποκαταστατών του αζώτου της φωσφατιδυλοχολίνης $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ και αποτελεί την χαρακτηριστική κορυφή της PC. Από σήμα COSY ταυτοποιούνται στα 3,90 ppm τα δύο πρωτόνια (2H) της μεθυλενομάδας που βρίσκεται σε α-θέση από την χαρακτηριστική ομάδα της χολίνης $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3$. Αντίστοιχα, μέσω φάσματος COSY ταυτοποιούνται τα πρωτόνια της μεθυλενομάδας που βρίσκεται σε β-θέση από την χαρακτηριστική ομάδα της χολίνης $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3$ στην πολλαπλή κορυφή στα 4,10 ppm (Σχήμα 7.1.3). Η πολλαπλή κορυφή στα 5,20 ppm ολοκληρώνεται για 1 υδρογόνο αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό πρωτόνιο του υδρογόνου του C_2 του γλυκερολικού

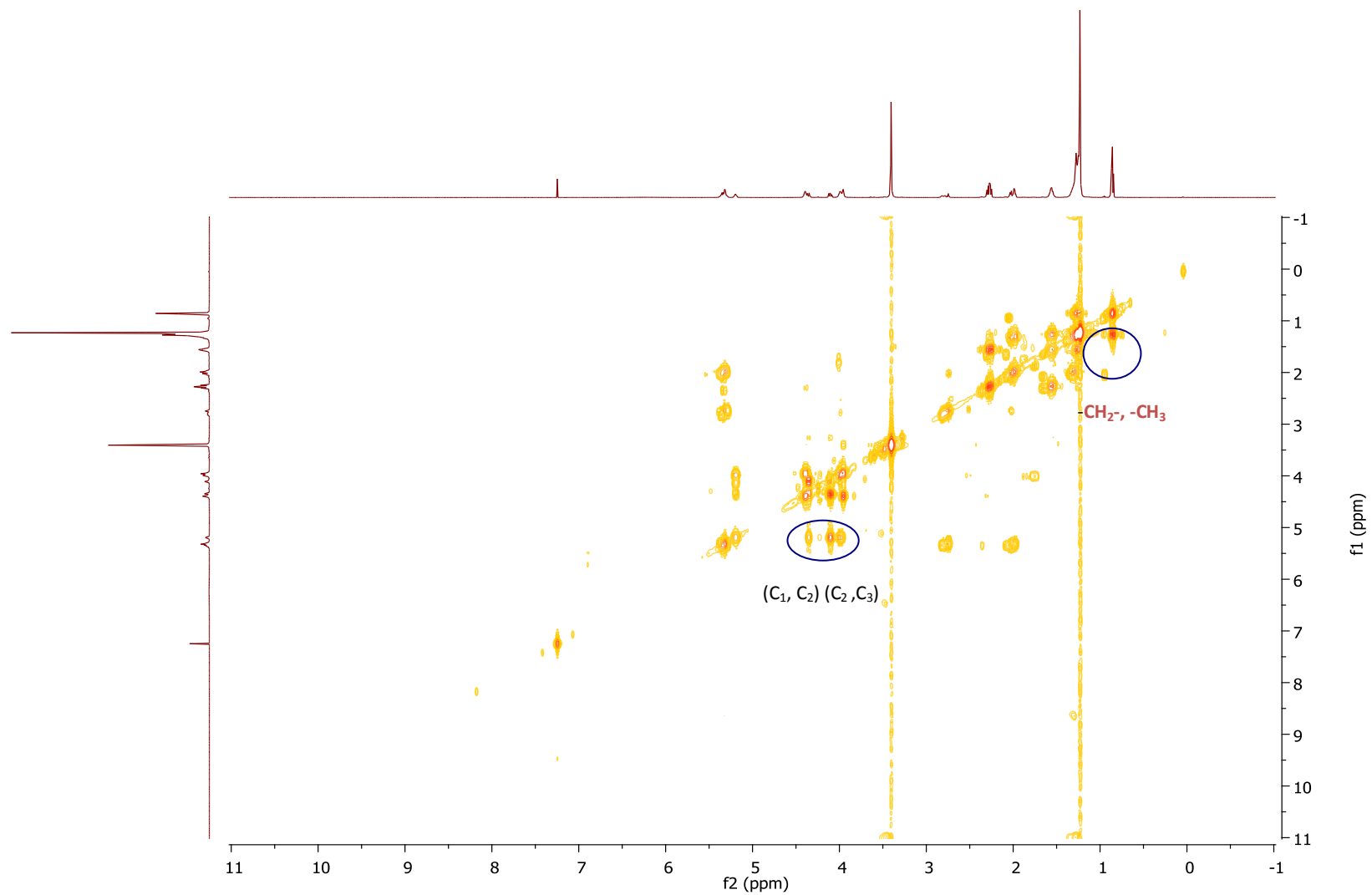
σκελετού. Από σήμα COSY, ταυτοποιούνται στα 4,36 ppm και στα 4,05 ppm τα δυο υδρογόνα του C₁ του γλυκερολικού σκελετού. Επιπρόσθετα, στην κορυφή στα 3,99 ppm ταυτοποιούνται τα δύο υδρογόνα του C₃ του γλυκερολικού σκελετού.

Η πολλαπλή κορυφή στα 2,26 ppm αποτιμάται στα πρωτόνια στην α-θέση από την ομάδα του καρβονυλίου του εστέρα-CH₂CO- και μέσω COSY αποτιμάται η κορυφή στα 1,56 ppm στα πρωτόνια σε β-θέση ως προς το καρβονύλιο -CH₂CH₂CO-. Τέλος οι κορυφές στα 1.25 ppm και 0.86 ppm αποτιμώνται αντίστοιχα στις μεθυλενομάδες -CH₂- και στις τελικές μεθυλομάδες -CH₃- των λιπαρών αλυσίδων.

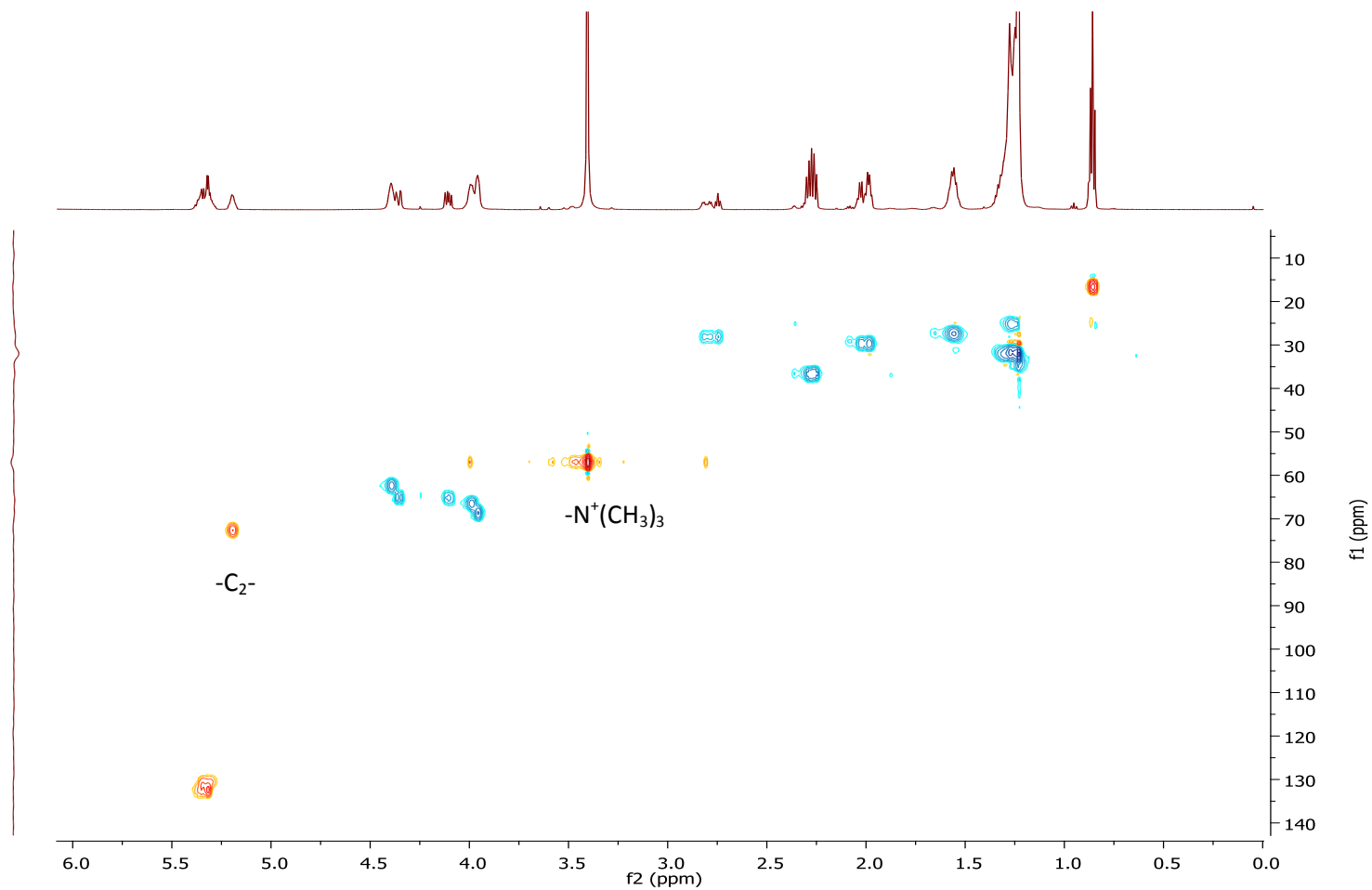
Ανάλογη αποτίμηση πραγματοποιήθηκε και για το δείγμα της PC που απομονώθηκε από παρασκευαστική TLC. Αντιπαράθεση των αποτελεσμάτων της ταυτοποίησης με αυτήν του πρότυπου παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.1.1.



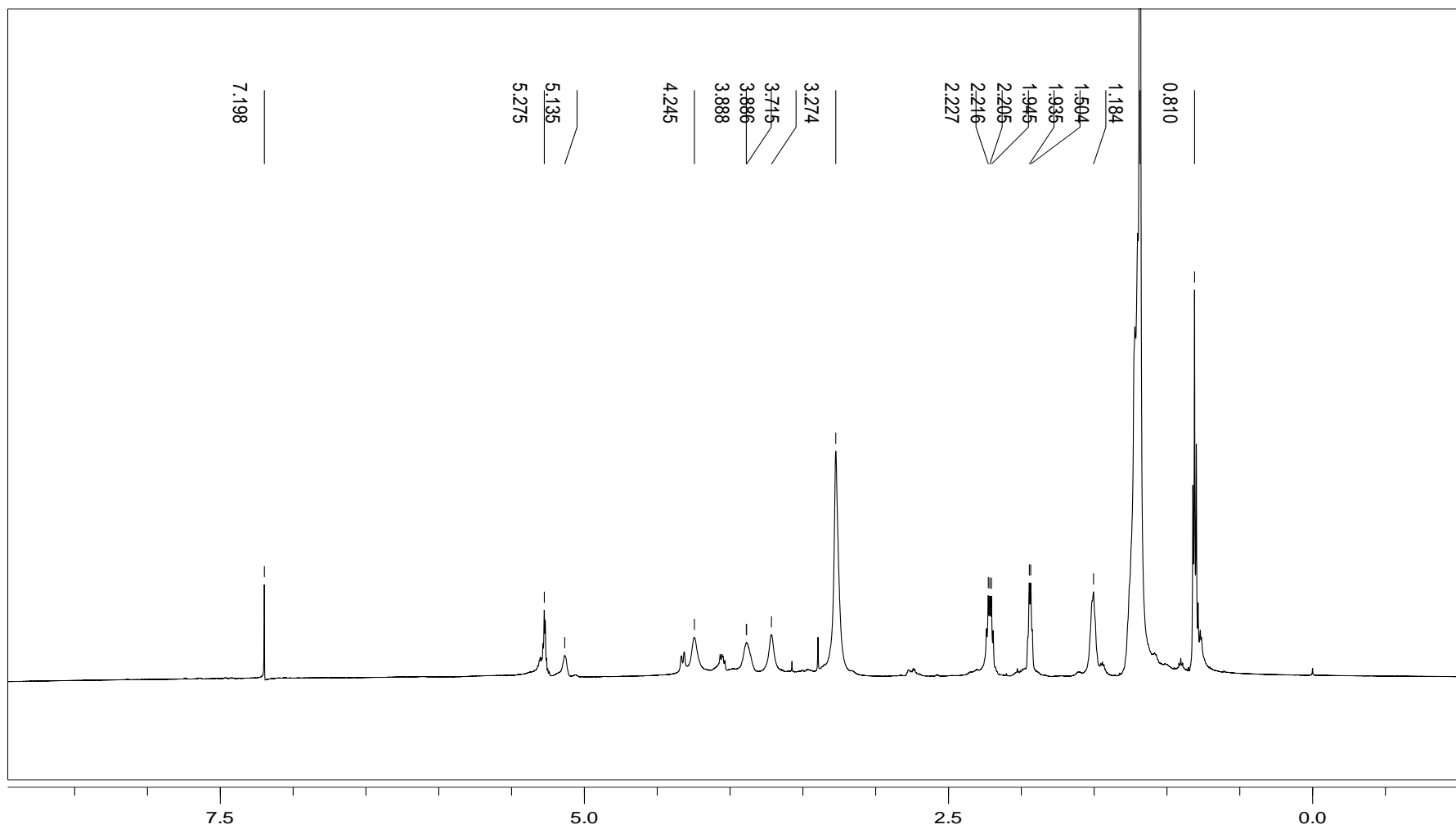
Σχήμα 7.1.2. Φάσμα 1H NMR της πρότυπης ένωσης PC. Η αποτίμηση παρουσιάζεται πάνω στις κορυφές.



Σχήμα 7.1.3. Φάσμα 2D NMR COSY της πρότυπης ουσίας PC. Τα εκτός διαγωνίου σήματα συσχετίζουν πυρήνες υδρογόνου που βρίσκονται σε γειτονικά άτομα άνθρακα.



Σχήμα 7.1.4. Φάσμα 2D NMR HSQC της πρότυπης ουσίας PC. Τα σήματα δίνουν συσχετίσεις μεταξύ πυρήνων υδρογόνων με τους άνθρακες τους. Τα κόκκινα σήματα αποδίδονται σε πρωτοταγείς και τριτοταγείς άνθρακες ενώ τα μπλε σήματα σε δευτεροταγείς άνθρακες.

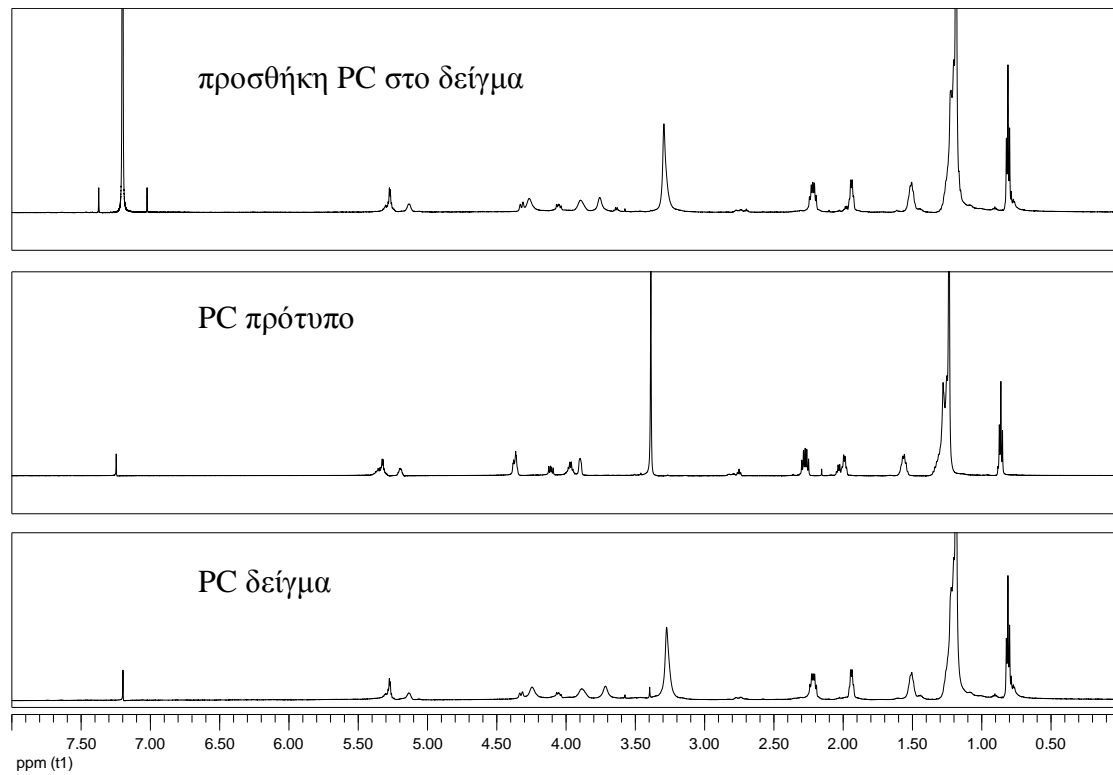


Σχήμα 7.1.5 Φάσμα ^1H NMR του δείγματος της PC που απομονώθηκε με παρασκευαστική TLC.

Πίνακας 7.1.3. Σύγκριση χημικών μετατοπίσεων του ^1H μεταξύ προτύπου και δείγματος της PC

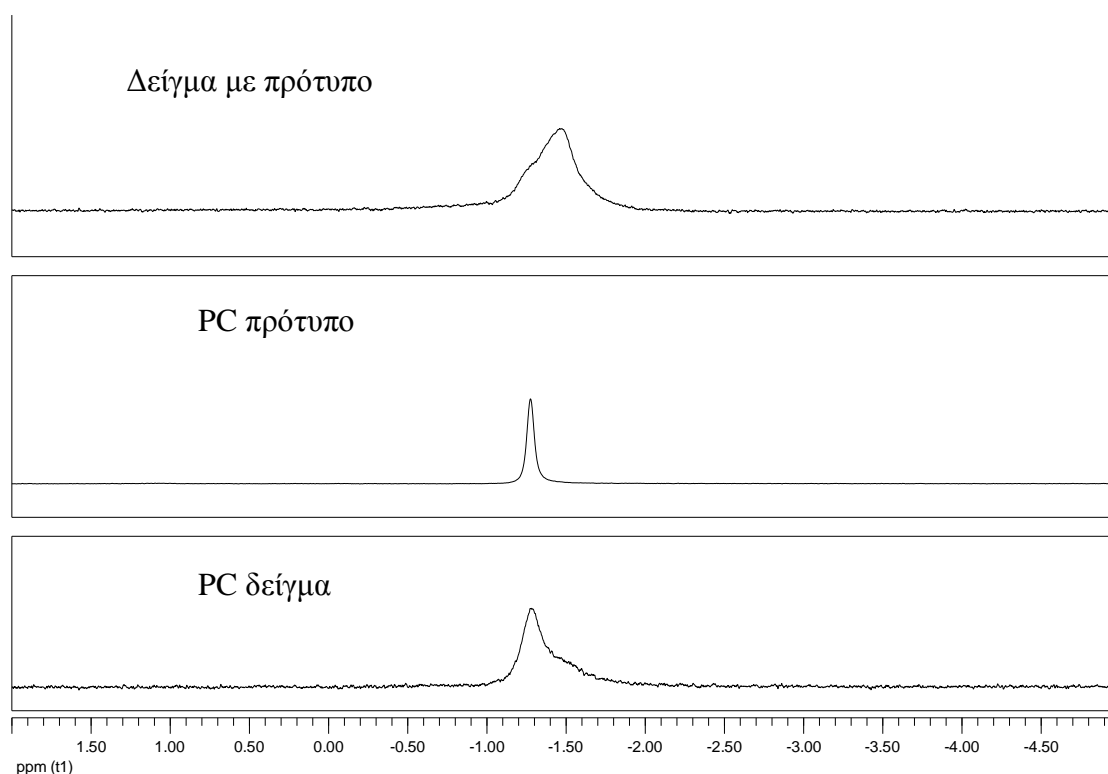
PC πρωτόνια	δ (ppm) πρότυπο	δ (ppm) δείγμα
POCH_2	4.10	4.24
CH_2N	3.90	3.71
$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.39	3.27
C_1H_2	4.05, 4.36	4.05, 4.31
C_2H_2	5.20	5.14
C_3H_2	3.99	3.90
$(\alpha)\text{CH}_2\text{CO}-$	2.26	2.26
$(\beta)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$	1.56	1.56
$-\text{CH}_2-\text{Λ.Οξέων}$	1.25	1.25
$-\text{CH}_3 \text{ Λ.Οξέων}$	0.86	0.86

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσθήκης πρότυπων ενώσεων (spiking) σε αυξημένες συγκεντρώσεις προκειμένου να επαληθευτεί η ύπαρξη των ενώσεων αυτών στα υπό μελέτη δείγματα.



Σχήμα 7.1.6. Σύγκριση φασμάτων πρωτονίου ^1H του πρότυπου PC, του δείγματος PC καθώς και της προσθήκης πρότυπου PC στο δείγμα.

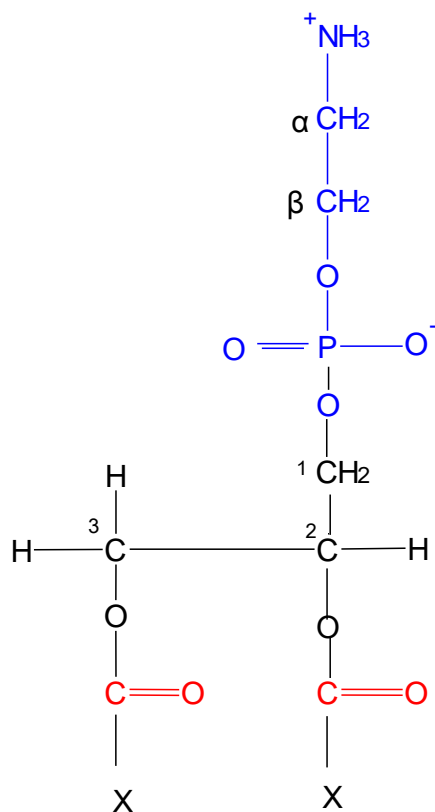
Παράλληλα ελήφθησαν φάσματα NMR ^{31}P (Σχήμα 7.1.7) τόσο στο δείγμα όσο και στο πρότυπο. Η κορυφή στα $-1,3$ ppm είναι χαρακτηριστική της ομάδας της φωσφατυδιλοχολίνης και αυξάνεται κατά την προσθήκη της πρότυπης ουσίας στο δείγμα. Η διαφορά στο εύρος της κορυφής του δείγματος σε σχέση με το πρότυπο, δικαιολογείται πιθανώς από την ύπαρξη παραγώγων γλυκεροφωσφολιπιδίων στο δείγμα όπως θα παρουσιαστεί στη συνέχεια του κεφαλαίου.



Σχήμα 7.1.7. Σύγκριση φασμάτων ^{31}P του πρότυπου PC, του δείγματος PC καθώς και της προσθήκης πρότυπου PC στο δείγμα.

7.2. Ταυτοποίηση δομής προτύπου και δείγματος της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE)

Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη



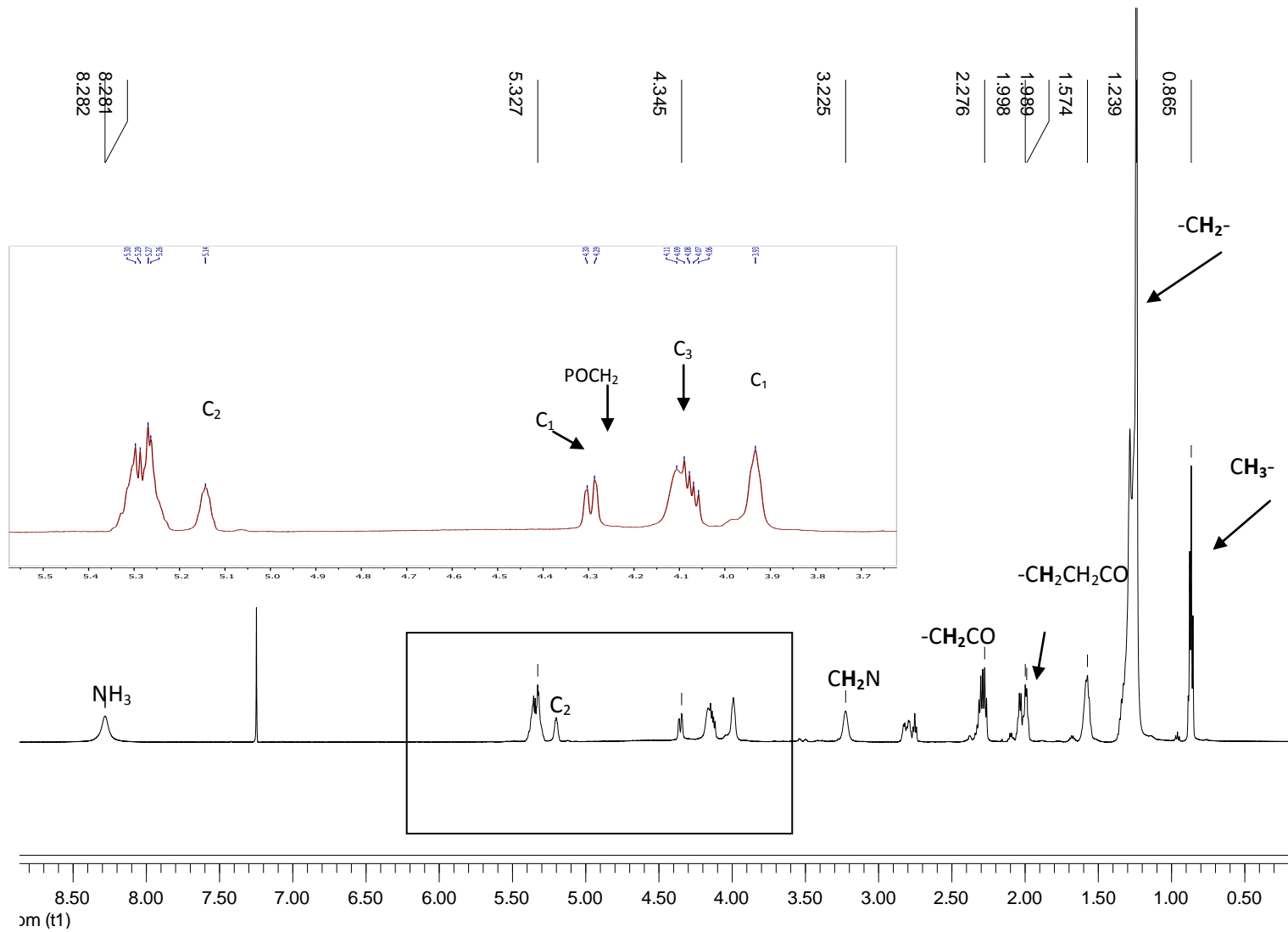
Σχήμα 7.2.1. Δομή της πολικής κεφαλής του μορίου της PE

Όπως και στην περίπτωση της PC, το φάσμα ¹H της PE (Σχήμα 7.2.2.) αποτιμήθηκε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα και τη δισδιάστατη φασματοσκοπία NMR (Πίνακας 7. 2.1 Σχήμα 7.2.3 και 7.2.4).

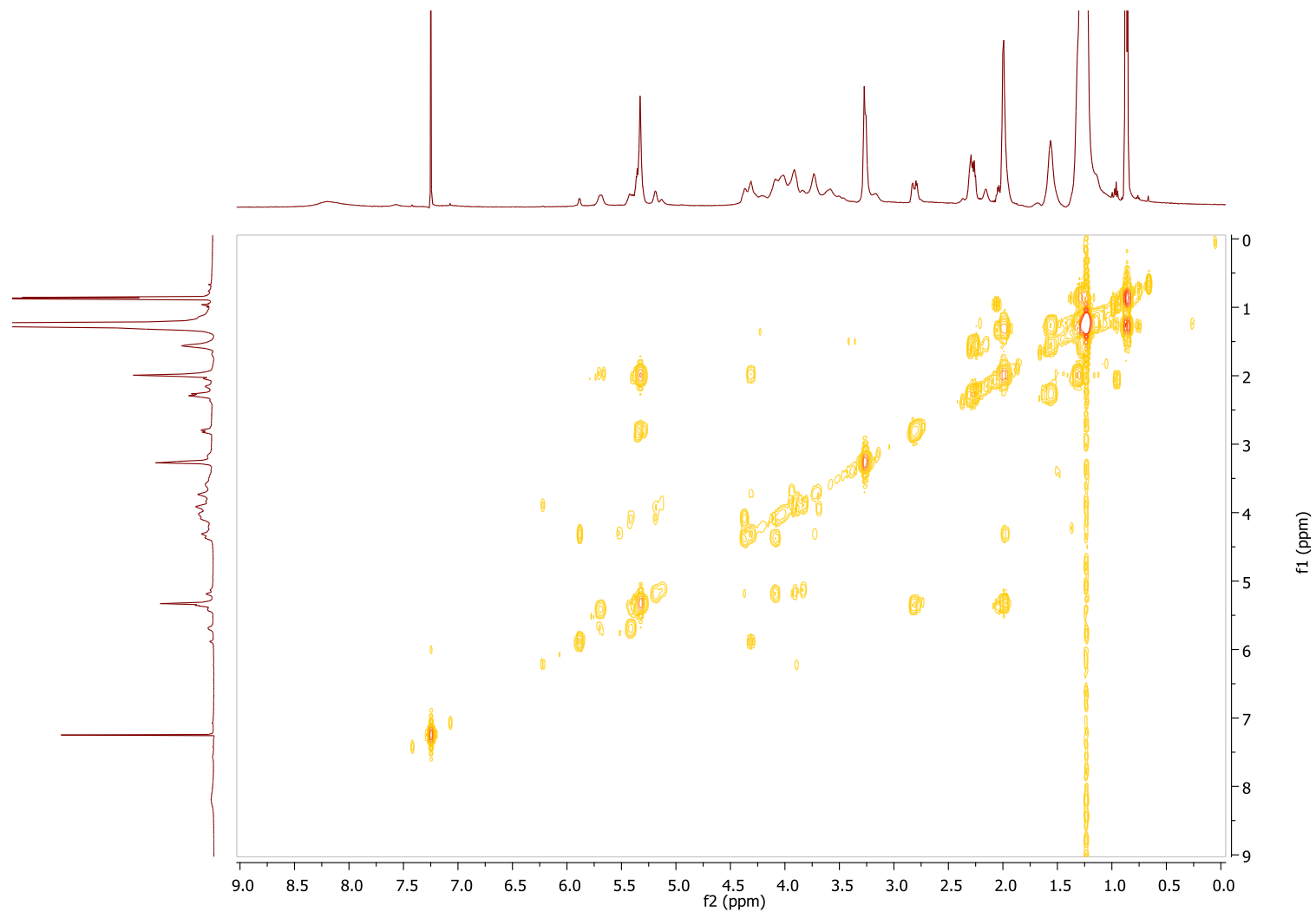
Πίνακας 7. 2.1. Σύγκριση χημικών μετατοπίσεων του ^1H μεταξύ προτύπου και δείγματος της PE

PE πρωτόνια	δ (ppm) πρότυπο	δ (ppm) δείγμα
POCH_2	4.16	4.24
CH_2N	3.23	3.23
NH_3	8.28	7.95
C_1	4.13; 4.35	3.95; 4.27
C_2	5.20	5.17
C_3	3.99	4.08
$(\alpha)\text{CH}_2\text{CO-}$	2.27	2.23
$(\beta)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$	1.57	1.94
$-\text{CH}_2-\text{L.Οξέων}$	1.24	1.18
$-\text{CH}_3 \text{ L.Οξέων}$	0.86	0.81

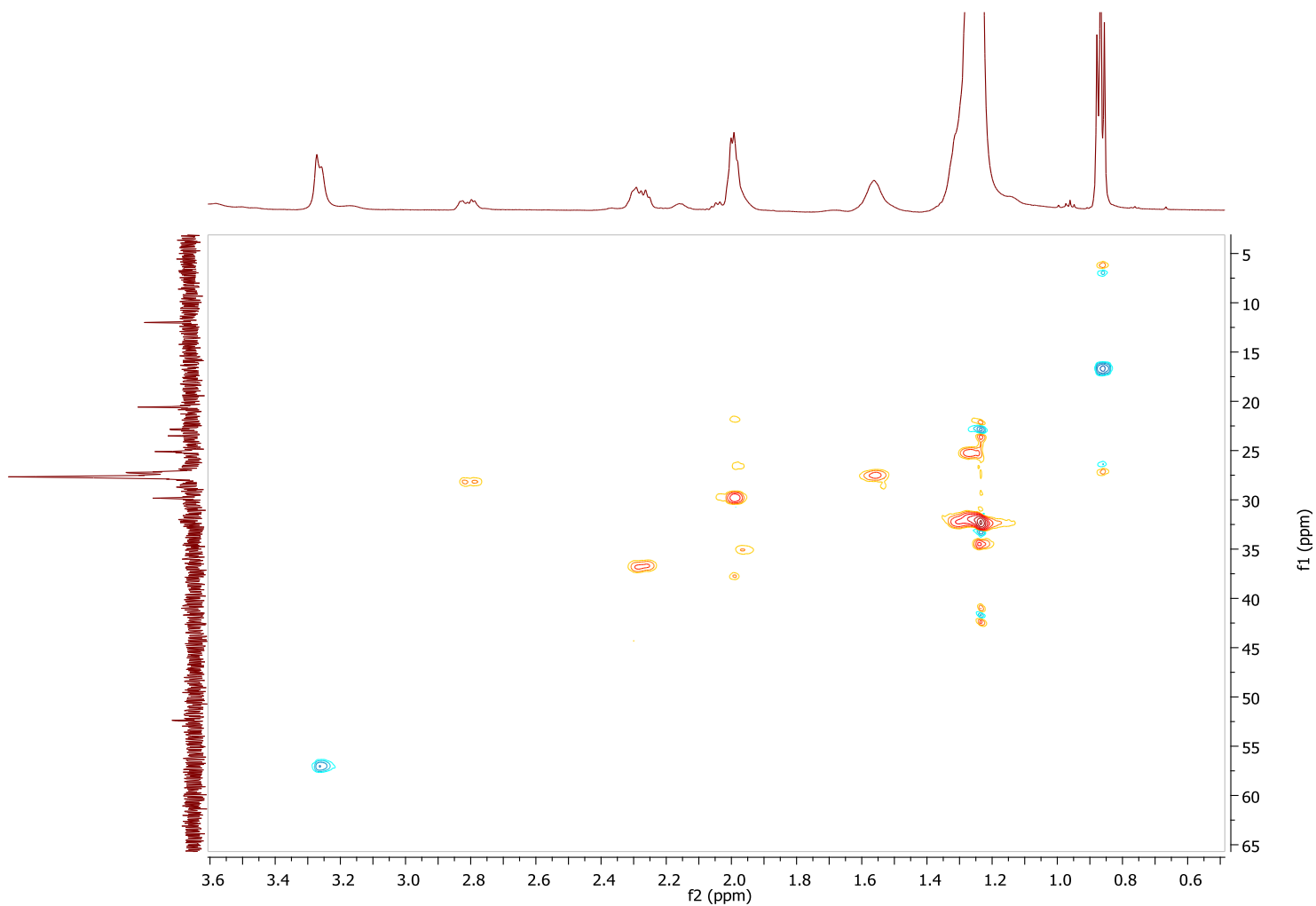
Παράλληλα ελήφθησαν φάσματα NMR ^{31}P (Σχήμα 7.2.6) τόσο στο δείγμα όσο και στο πρότυπο. Η κορυφή στα $-0,4$ ppm είναι χαρακτηριστική της ομάδας της φωσφατυδιλοαιθανολαμίνης. Ωστόσο, η αντίστοιχη κορυφή του δείγματος, είναι αρκετά πιο ευρεία φανερώνοντας την ύπαρξη διαφορετικών δομών (πιθανών πλασμαλογόνων).



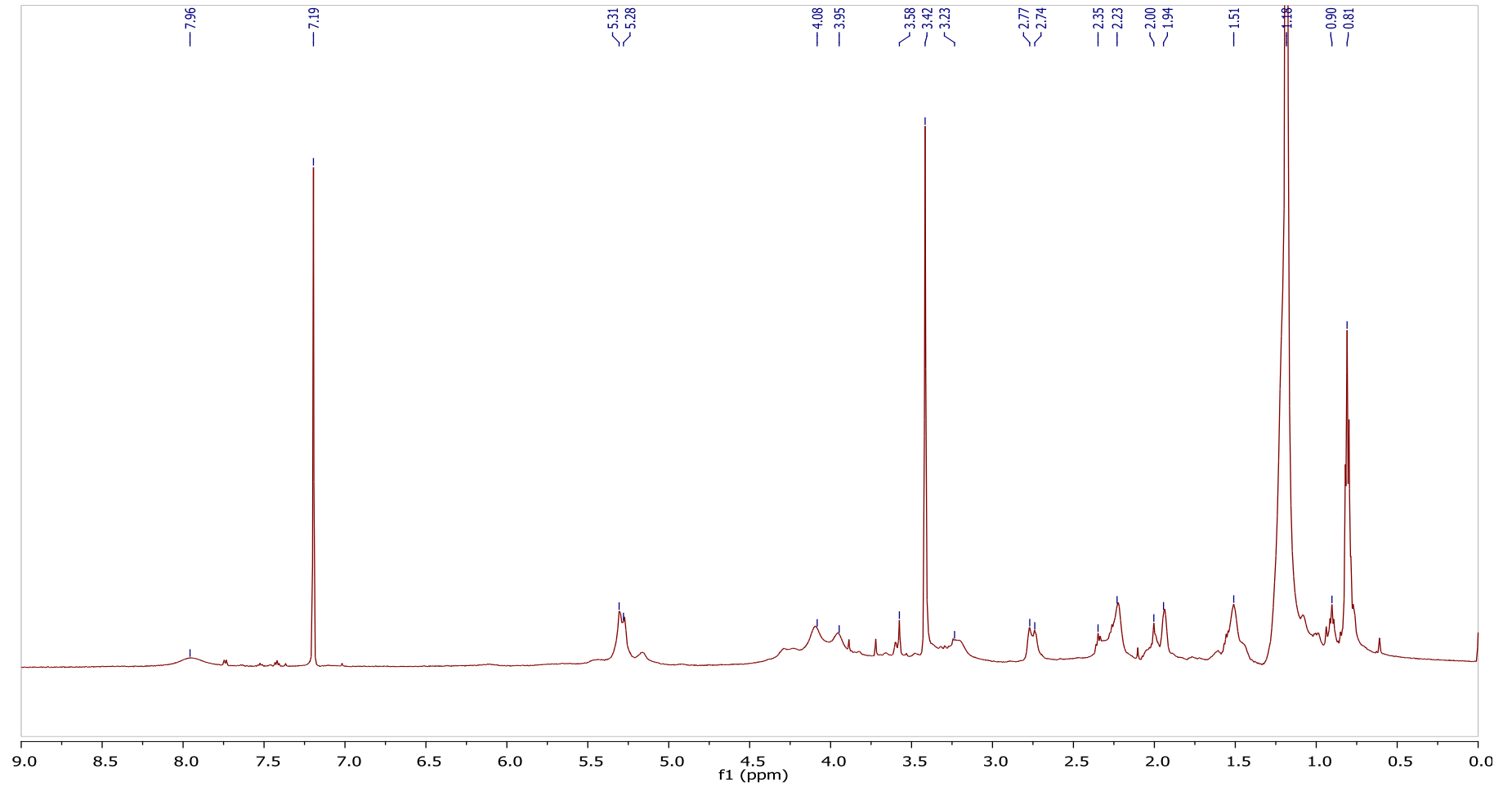
Σχήμα 7.2.2. Φάσμα ^1H NMR της πρότυπης ένωσης PE.



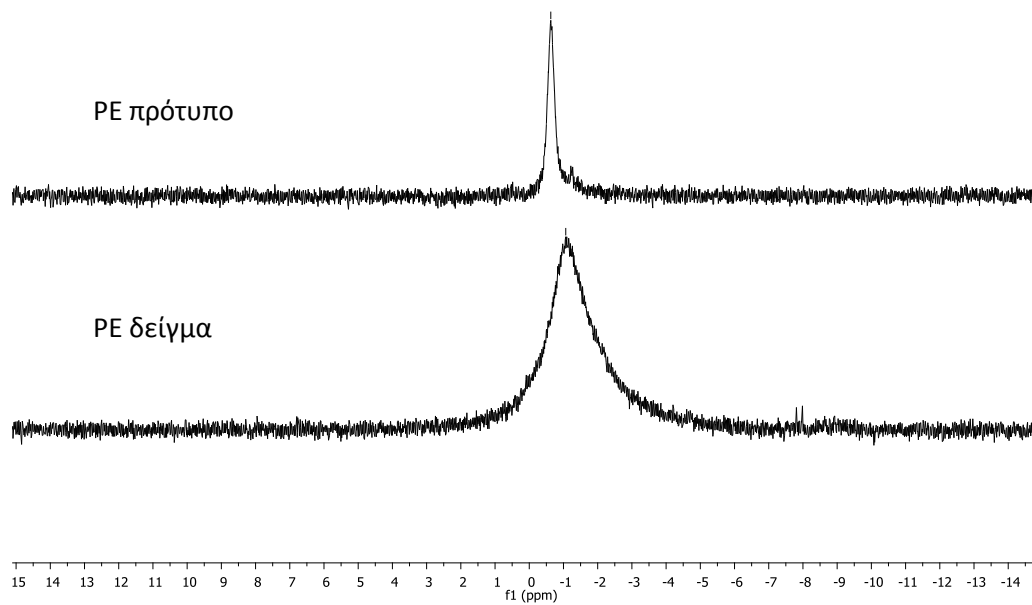
Σχήμα 7.2.3. Φάσμα 2D NMR COSY της πρότυπης ουσίας PE. Τα εκτός διαγωνίου σήματα συσχετίζουν πυρήνες υδρογόνου που βρίσκονται σε γειτονικά άτομα άνθρακα.



Σχήμα 7.2.4. Φάσμα 2D NMR HSQC της πρότυπης ουσίας PE. Τα σήματα δίνουν συσχετίσεις μεταξύ πυρήνων υδρογόνων με τους άνθρακές τους. Τα κόκκινα σήματα αποδίδονται σε πρωτοταγείς και τριτοταγείς άνθρακες ενώ τα μπλε σήματα σε δευτεροταγείς άνθρακες.



Σχήμα 7.2.5. Φάσμα ^1H NMR του δείγματος της PE.



Σχήμα 7.2.6. Σύγκριση φασμάτων ^{31}P του πρότυπου PE, του δείγματος PE καθώς και της προσθήκης πρότυπου PE στο δείγμα.

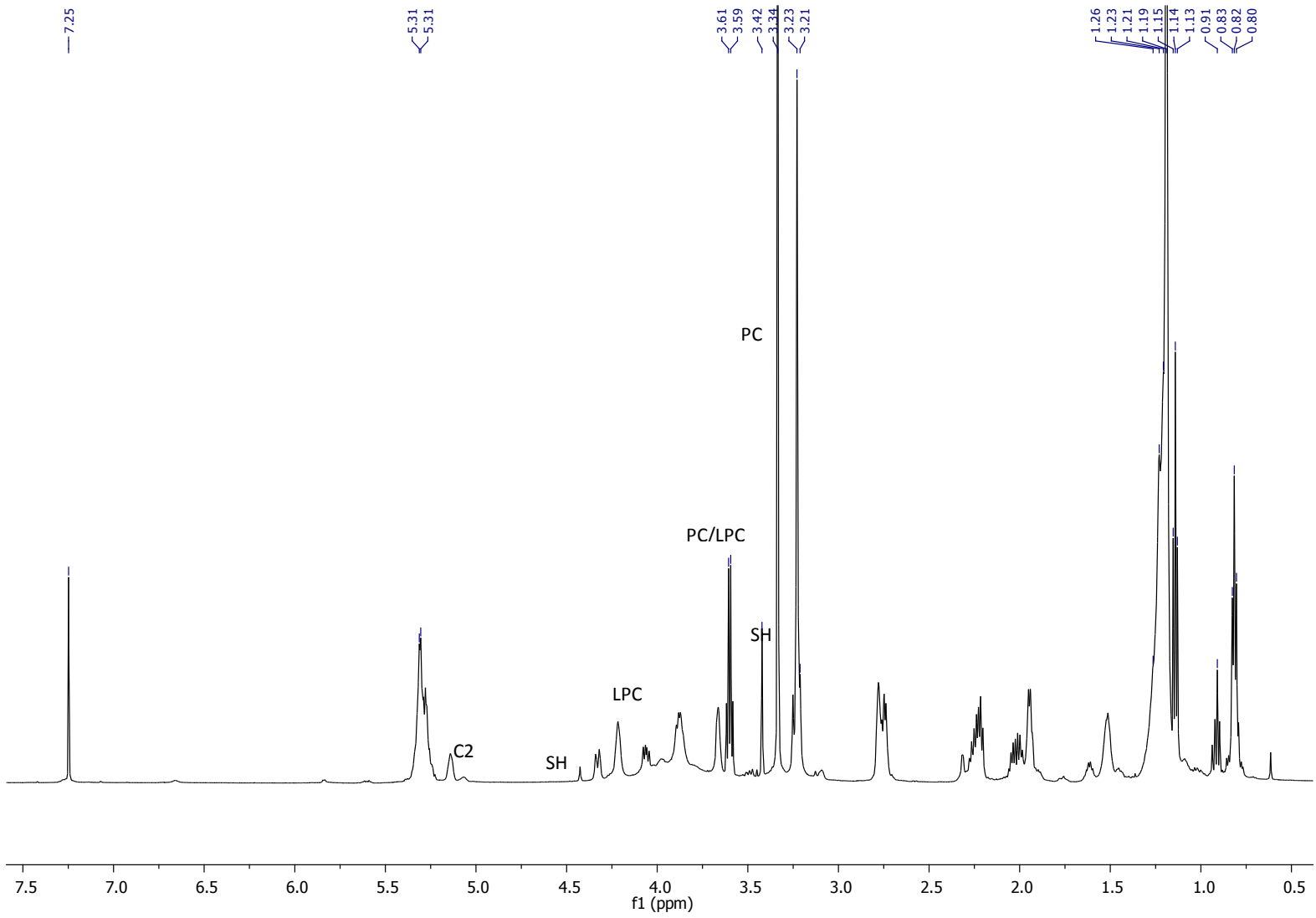
7.3 ^1H NMR των πολικών λιπιδίων που απομονώθηκαν με την τεχνική SPE.

Στη συνέχεια ελήφθησαν φάσματα NMR στο δείγμα των πολικών λιπιδίων που απομονώθηκαν με την τεχνική SPE. Το φάσμα ^1H παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.3.1.

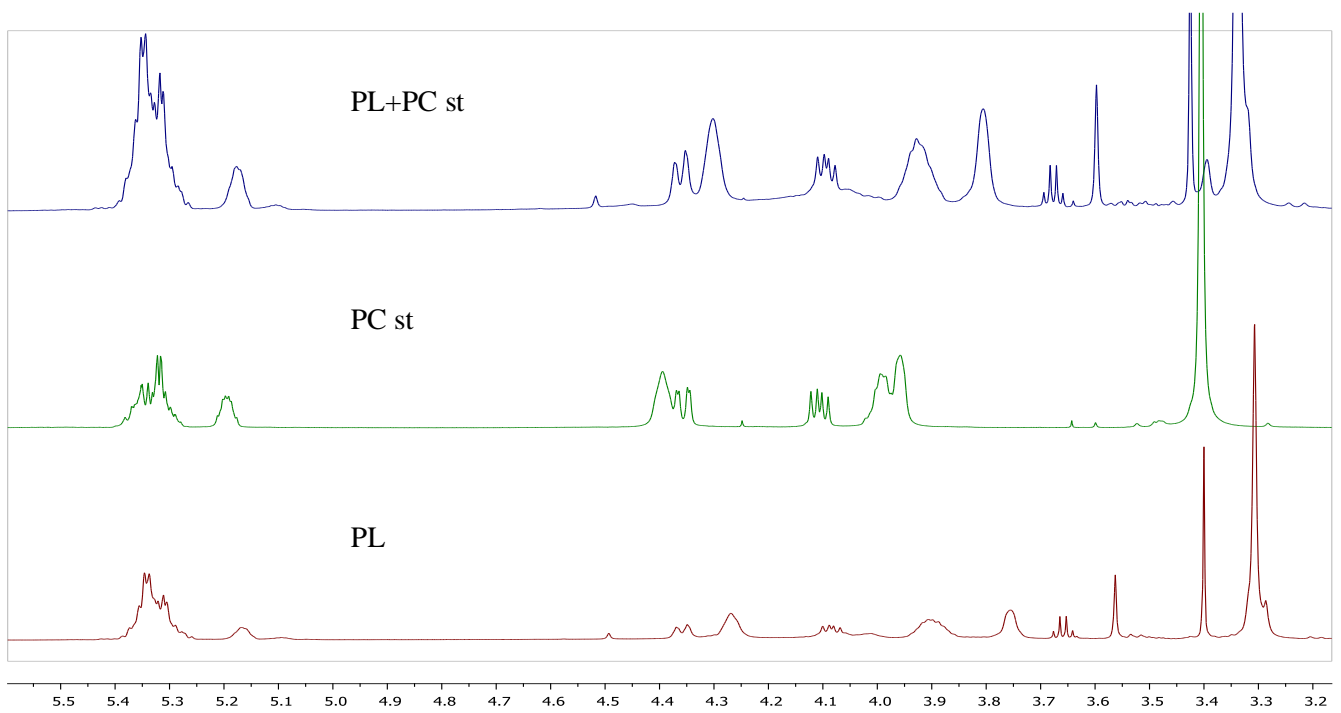
Στόχος είναι ο προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μίγμα (PC, PE) αλλά και η ανίχνευση ενώσεων με μικρότερες συγκεντρώσεις όπως PS, PI, SPH, LPC. Για το σκοπό αυτό ελήφθησαν φάσματα μίας και δύο διαστάσεων, πραγματοποιήθηκαν μελέτες προσθήκης προτύπων διαλυμάτων (Σχήματα 7.3.2.-7.3.5). Στο Πίνακα 7.3.1 παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών ομάδων κάθε επιμέρους ένωσης των πολικών λιπιδίων.

Πίνακας 7.3.1. Χημικές μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών ομάδων των πολικών λιπιδίων

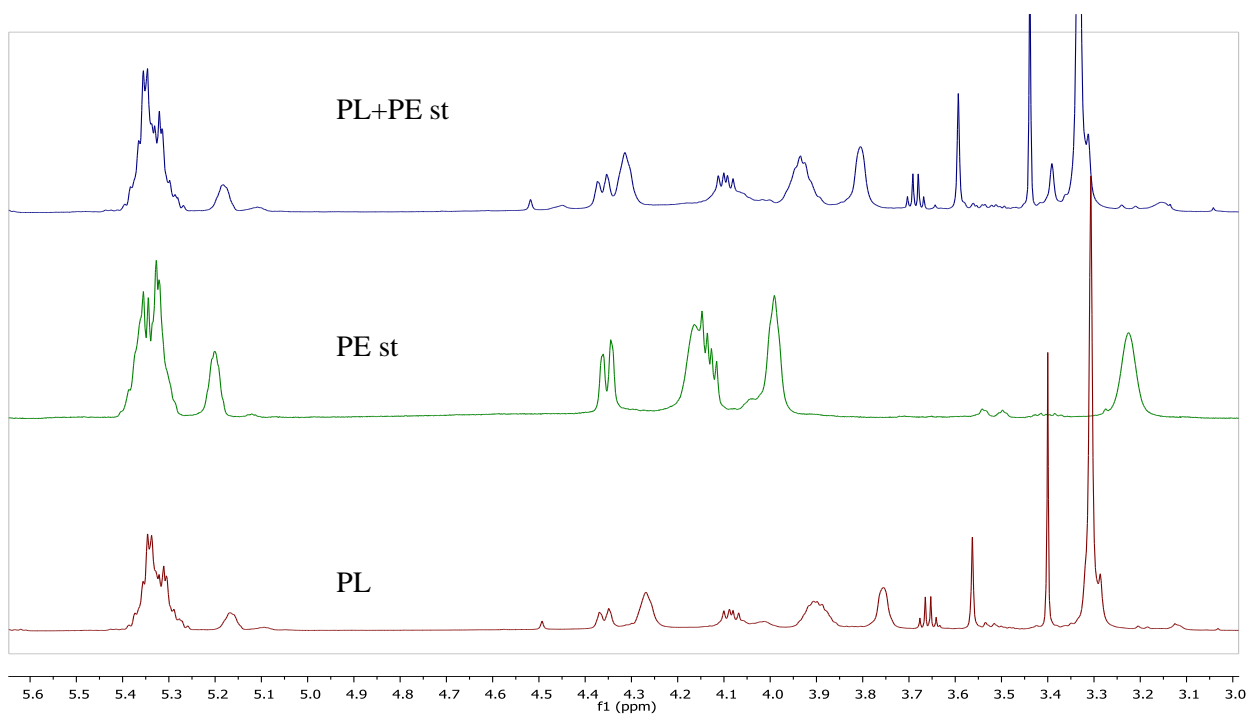
Λιπίδιο	δ (ppm)	Χαρακτηριστική ομάδα
PC/LPC/Sph	3.31	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$
PC	3.90	$\text{N}-\text{CH}_2$
PE	3.23	$\text{N}-\text{CH}_2$
	4.08	$\text{PO}-\text{CH}_2$
SPH	5.65	$\text{HC}=\text{CH}-\text{CHOH}$
	4.10	POCH
	3.88	$\text{HC}-\text{NH}$
LPC	4.04	C_2HOH
	3.61	$\text{N}-\text{CH}_2$



Σχήμα 7.3.1. Φάσμα ^1H του μίγματος των πολικών λιπιδίων.

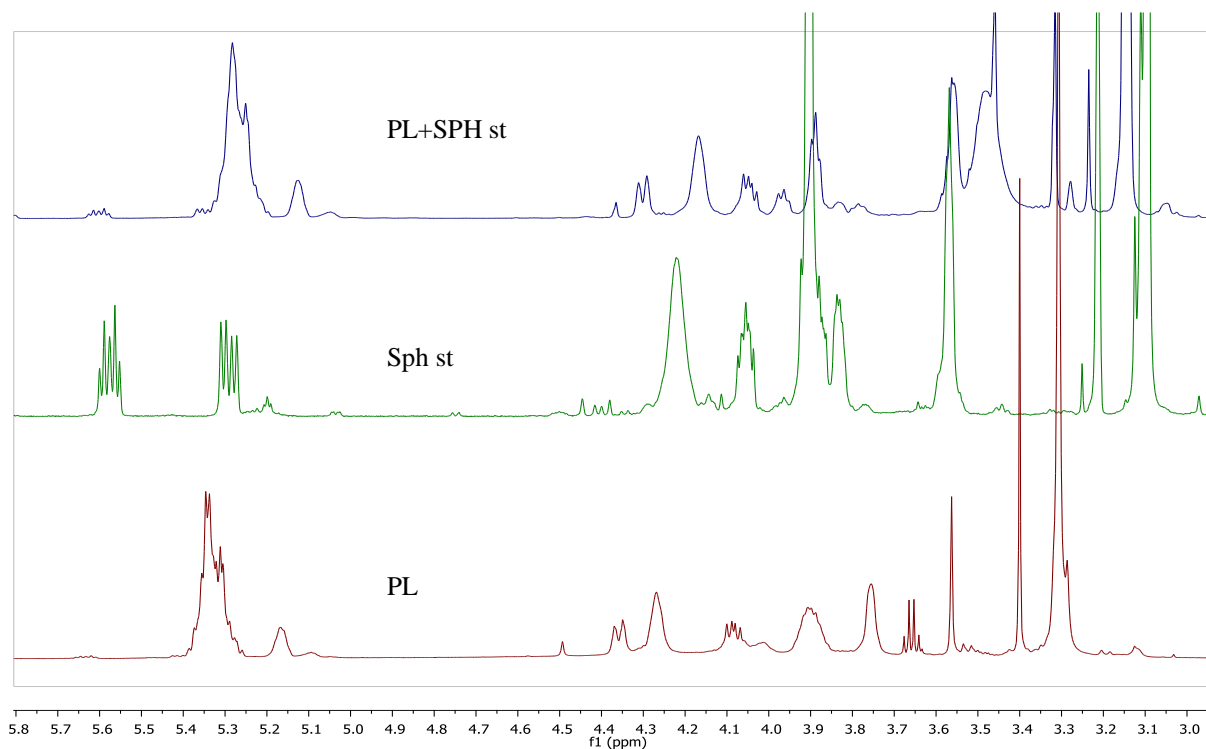


Σχήμα 7.3.2. Φάσμα ^1H του μίγματος των πολικών λιπιδίων (κάτω), του πρότυπου δείγματος της PC (μέση), και μετά την προσθήκη πρότυπου δείγματος PC στο δείγμα PL.

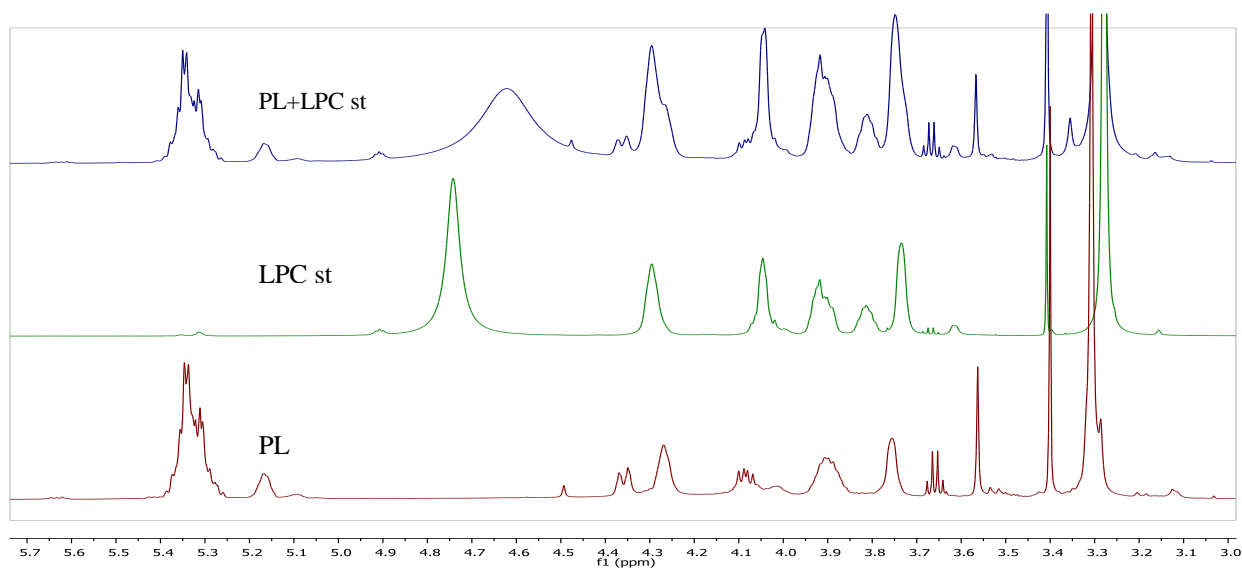


Σχήμα 7.3.3. Φάσμα ^1H του μίγματος των πολικών λιπιδίων (κάτω), του πρότυπου δείγματος της PE (μέση), και μετά την προσθήκη πρότυπου δείγματος PE στο δείγμα PL.

Μετά από την ταυτοποίηση των κύριων φωσφολιπιδίων PC, PE, ελήφθησαν και τα φάσματα των πρότυπων ενώσεων PS, PI, SPH, LPC και πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τον προσδιορισμό τους προσθήκης στο δείγμα των πολικών λιπιδίων.



Σχήμα 7.3.4. Φάσμα ^1H του μίγματος των πολικών λιπιδίων (κάτω), του πρότυπου δείγματος της Sph (μέση), και μετά την προσθήκη πρότυπου δείγματος Sph στο δείγμα PL.



Σχήμα 7.3.5. Φάσμα ^1H του μίγματος των πολικών λιπιδίων (κάτω), του πρότυπου δείγματος της LPC (μέση), και μετά την προσθήκη πρότυπου δείγματος LPC στο δείγμα PL.

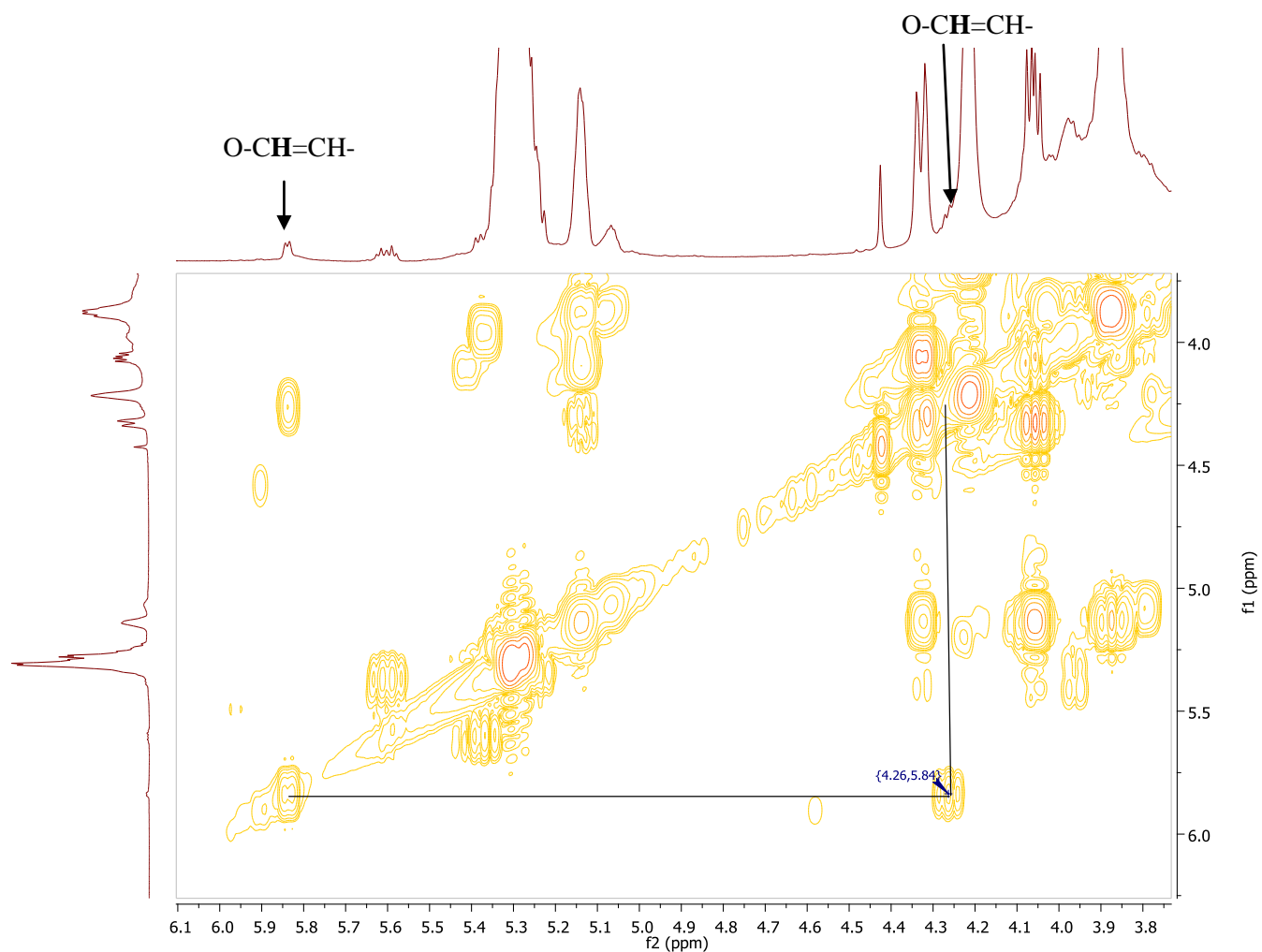
Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η ανίχνευση κορυφών διαφορετικών δομών φωσφολιπιδίων εστιάζοντας τόσο στη μονοακυλο-μονοαλκ-1-ενυλο-αιθερική δομή (πλασμαλογόνο) όσο και στην μονοακυλο-μονοαλκυλοαιθερική δομή (Σχήμα 7.3.6). Επειδή τα παράγωγα αυτά βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση μέσα στο δείγμα των ολικών πολικών λιπιδίων, οι κορυφές τους θα είναι αρκετά μικρότερες σε ένταση. Για το λόγο αυτό το φάσμα μεγενθύνεται και εξετάζονται οι κορυφές που βρίσκονται κοντά στη γραμμή βάσης (Σχήμα 7.3.7).



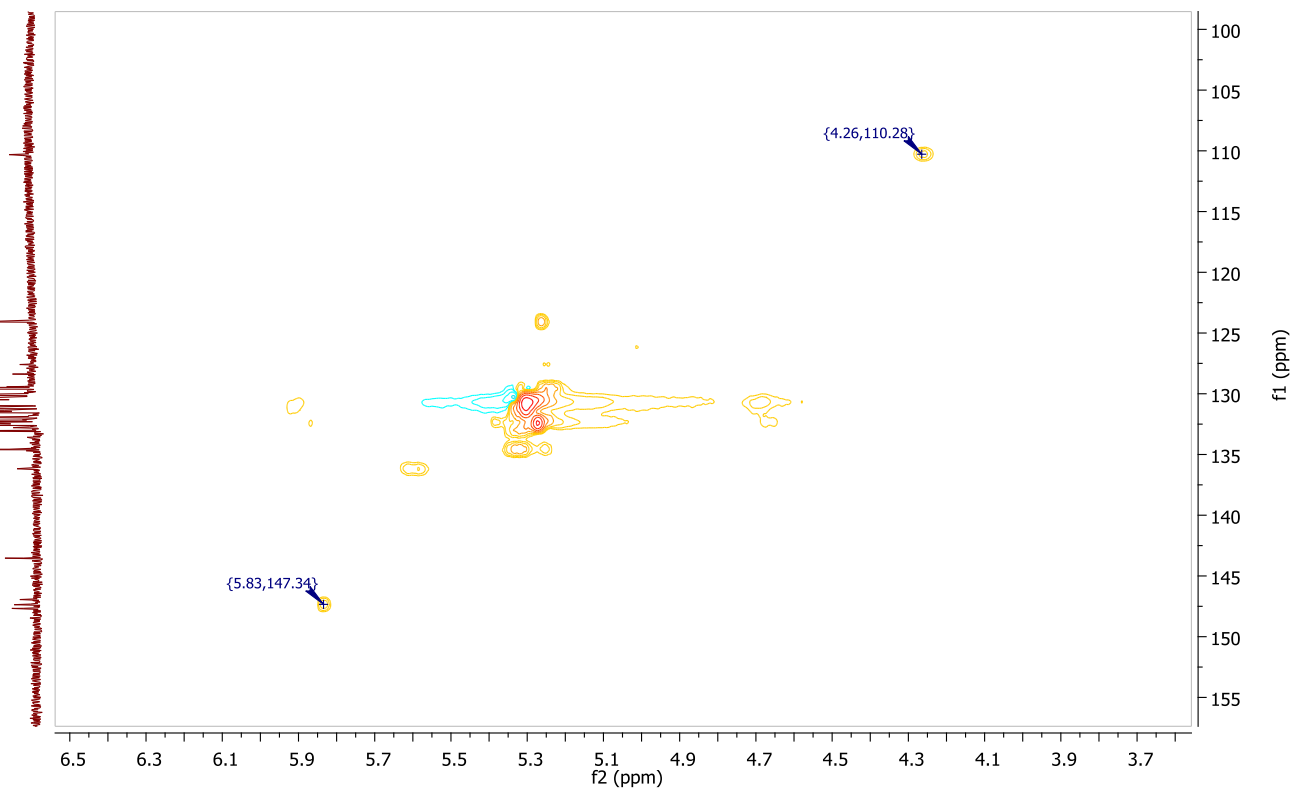
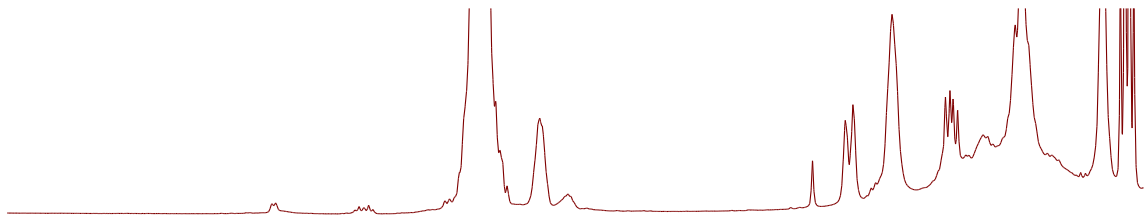
Σχήμα 7.3.6. Φωσφολιπίδιο με δομή πλασμαλογόνο

Η διπλή κορυφή στα 5,84 ppm μπορεί να αποδοθεί στο πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο του διπλού δεσμού στη δομή του πλασμαλογόνο $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$. Σήμα COSY μεταξύ της παραπάνω κορυφής με την κορυφή στα 4,26 ppm αποδίδει την τελευταία στο δεύτερο πρωτόνιο του διπλού δεσμού $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$ (Σχήμα 7.3.7).

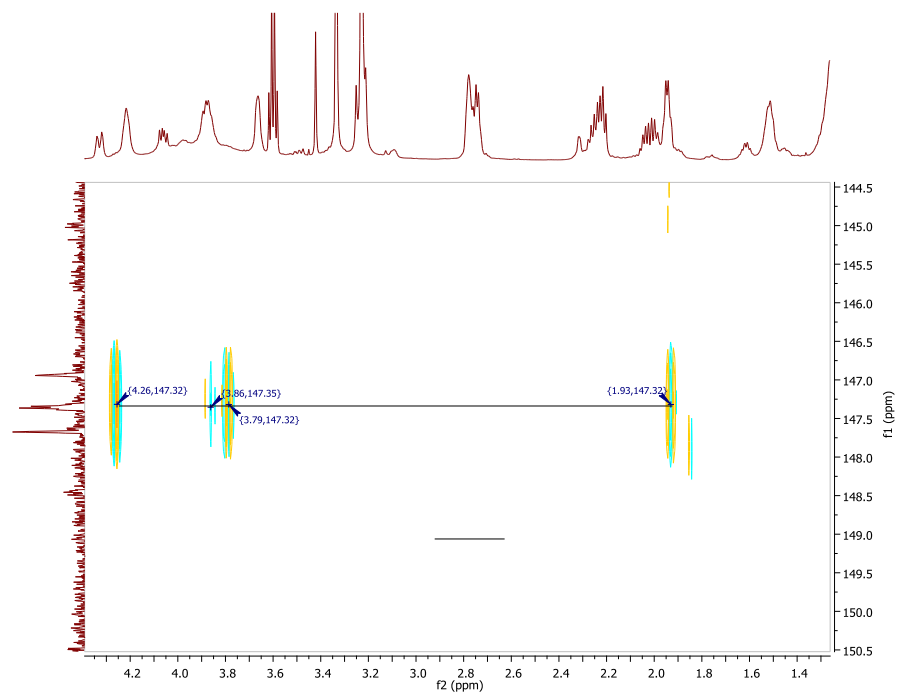
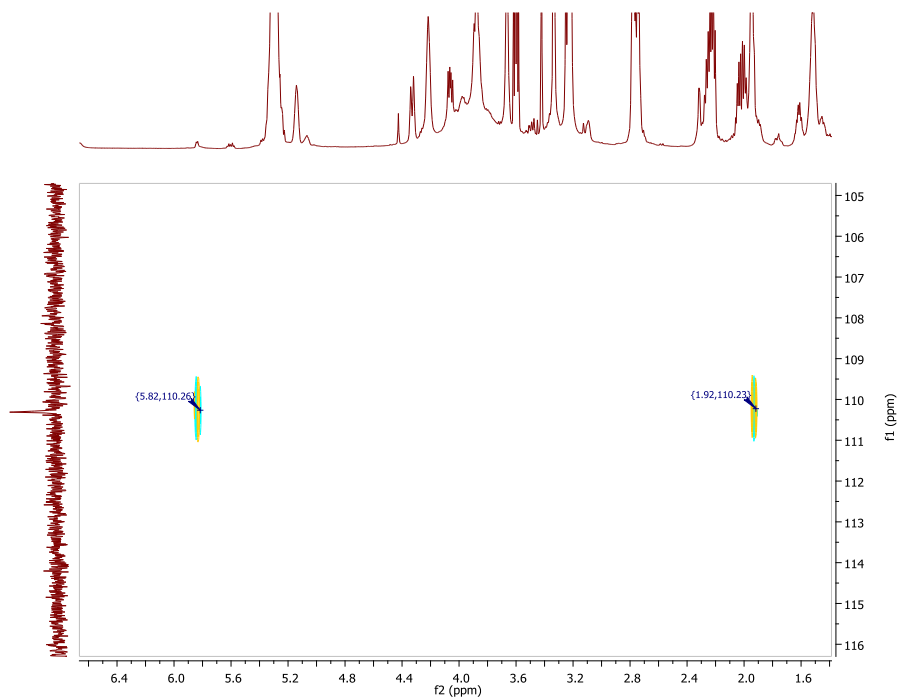
Από το φάσμα HSQC (Σχήμα 7.3.8) υπολογίζονται οι άνθρακες των παραπάνω πρωτονίων στα 147,34 ppm και 110,28 ppm αντίστοιχα. Από το φάσμα HMBC (συσχέτιση άνθρακα με τα πρωτόνια γειτονικών ανθράκων) παρατηρούμε ότι ο άνθρακας στα 147,34 ppm δίνει διαδοχικά σήματα με τις κορυφές των πρωτονίων στα 4,26 ppm ($\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$), 3,86 και 3,79 ppm (πιθανή αποτίμηση στα υδρογόνα του C_1), και στα 1,93 ppm ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$). Αντίστοιχα, ο άνθρακας στα 110,28 ppm δίνει 2 σήματα στο φάσμα HMBC, ένα με την κορυφή του $\text{O}-\text{CH}=\text{CH}$ στα 5,84 ppm και μία με τα μεθυλένια δίπλα στον διπλό δεσμό $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ (Σχήμα 7.3.9).



Σχήμα 7.3.7. Ανίχνευση κορυφών μονοκυκλο-μονοαλκ-1-ενυλο-αιθερική (πλασμαλογόνο)



Σχήμα 7.3.8. Φάσμα HSQC των φωσφολιπιδίων.



Σχήμα 7.3.9. Φάσμα HMBC του μίγματος των πολικών λιπιδίων στο οποίο παρουσιάζονται οι συσχετίσεις των ανθράκων του διπλού δεσμού στα 147,34 ppm και 110,28 ppm με τα πρωτόνια των γειτονικών ανθράκων.

7.4 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων NMR

Τεχνικές φασματοσκοπίας NMR εφαρμόστηκαν με σκοπό την ταυτοποίηση των κύριων φωσφολιπιδίων που απομονώθηκαν με παρασκευαστική TLC από τα ολικά λιπίδια της γαρίδας *P. kerathurus*. Για το σκοπό αυτό ελήφθησαν φάσματα μιας διάστασης, στα οποία περιλαμβάνονται φάσματα πρωτονίου (^1H NMR) και φωσφόρου (^{31}P NMR) και φάσματα δυο διαστάσεων (2D NMR), ομοπυρηνικά ^1H COSY και ετεροπυρηνικά ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. Για τον προσδιορισμό τους στο μείγμα, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ενώσεις φωσφολιπιδίων (PC, PE, PI, Sph, LPC).

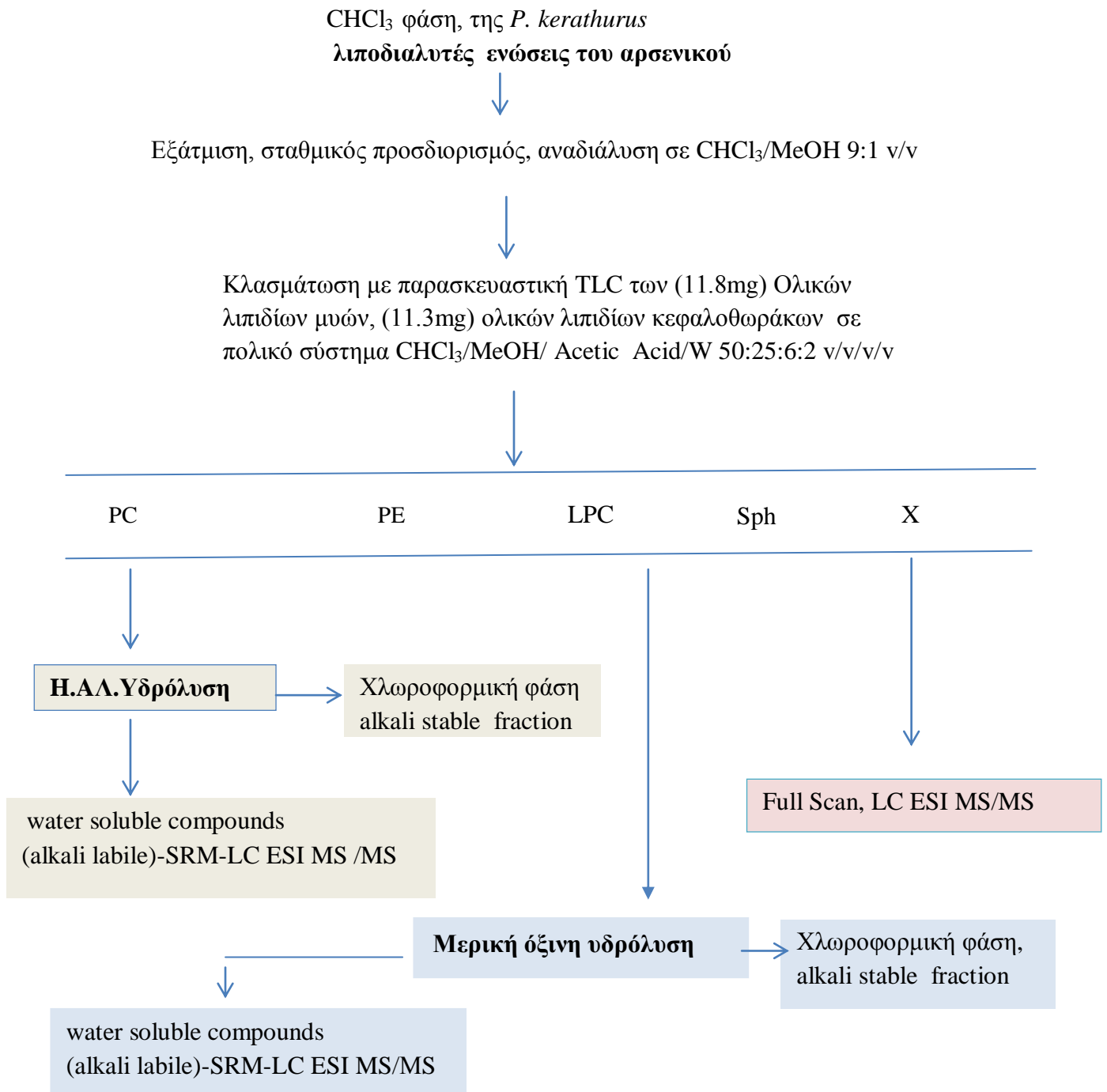
Αρχικά προσδιορίστηκαν οι κορυφές συντονισμού των κυριότερων φωσφολιπιδίων PC και PE σε πρότυπα και απομονωμένα δείγματα. Έμφαση δόθηκε στις χαρακτηριστικές τους ομάδες όπως τα πρωτόνια των φωσφορικών κεφαλών, και τα πρωτόνια των γλυκερολικών σκελετών. Συγκεκριμένα, στο φάσμα του προτύπου της PC διακρίνεται η μοναδική χαρακτηριστική κορυφή των εννέα πρωτονίων των μεθυλο- υποκαταστατών του αζώτου $[\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ στα 3.39 ppm (στα 3.27 ppm στο δείγμα). Αντίστοιχα, στο πρότυπο της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης, τα πρωτόνια της μεθυλενομάδας που βρίσκονται σε α -θέση από την χαρακτηριστική ομάδα της αιθανολαμίνης $\text{CH}_2\text{-N}$ δίνουν μια κορυφή στα 3.23 ppm (στα 3.58 ppm στο δείγμα) και τα πρωτόνια της NH_3 δίνει μια μικρή κορυφή στα 8.28 ppm (στα 7.95 ppm στο δείγμα). Οι κορυφές των ενώσεων αυτών αποτιμήθηκαν με βάση την βιβλιογραφία και ελήφθησαν υπόψη οι ολοκληρώσεις των κορυφών του φάσματος ^1H [96, 97]. Αντίστοιχα, ο συντονισμός των πρωτονίων του γλυκερολικού σκελετού εξαρτάται από την παρουσία της πολικής κεφαλής του φωσφολιπιδίου στο C_1 καθώς και από την ακυλίωση του C_3 και C_2 , η μόνο του C_3 . Όπως φάνηκε από την αποτίμηση του φάσματος, τα πρωτόνια του μεθυλενίου C_1 (στη PE και στη PC) είναι μαγνητικά ανισοδύναμα και οι χημικές μετατοπίσεις τους είναι διαφορετικές στα 4.05, 4.31 ppm για την PC και 3.95, 4.27 ppm για την PE. Η πολλαπλή κορυφή (εξαιτίας σύζευξης του με τέσσερα μη ισοδύναμα πρωτόνια σε C_1 και C_3 του γλυκερολικού σκελετού) στα 5.2 ppm ολοκληρώνεται για 1 υδρογόνο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδρογόνου του C_2 του γλυκερολικού σκελετού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τα δισδιάστατα φάσματα 2D-COSY και HSQC (Σχήματα 7.2.4 και 7.2.5). Όσον αφορά τα πρωτόνια του μεθυλενίου σε C_3 , οι χημικές τους μετατοπίσεις εξαρτώνται από την ύπαρξη εστεροποιημένης ομάδας.

Η λήψη φασμάτων ^{31}P NMR και η ακολουθούμενη προσθήκη πρότυπων ενώσεων στα δείγματα επιβεβαίωσε την ύπαρξη των φωσφολιπιδίων με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Η παρουσία ευρειών κορυφών στο φάσμα ^1H NMR της PE (κυρίως σε σχέση με την PC) με βάση την βιβλιογραφία [98], οφείλεται στην παρουσία πλασμαλογόνων (αλκυλο-1-ενυλο αιθέρας) της PE. Πλασμαλογόνα έχουν βρεθεί και στους μύες και στους κεφαλοθώρακες της γαρίδας *P. kerathurus* [1,2] (βλ Δ. Ειδίκευσης Κόρα, Λ., 2003). Με τη βοήθεια της δισδιάστατης φασματοσκοπίας, και συγκεκριμένα των φασμάτων COSY, HSQC, HMBC, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των κύριων ομάδων της μονοακυλο-μονοαλκ-1-ενυλο-αιθερικής δομής του πλασμαλογόνου στο δείγμα των ολικών πολικών λιπιδίων. Συγκεκριμένα, το περισσότερο αποθωρακισμένο πρωτόνιο του διπλού δεσμού (O-CH=CH) μπορεί να αποδοθεί στη διπλή κορυφή στα 5,84 ppm και η κορυφή στα 4,26 ppm στο δεύτερο πρωτόνιο του διπλού δεσμού (O-CH=CH).



Εικόνα 2. Αρσενολιπίδια στα λιπίδια των ψαριών [42]



Διάγραμμα αναλύσεων των φωσφολιπιδίων και αρσενολιπιδίων με LC- ESI- MS/ MS και SRM

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

LC-ESI-MS/MS με SRM των φωσφολιπιδίων της *P.kerathurus*

Η συγκέντρωση του ολικού αρσενικού στους μύες και κεφαλοθώρακες (μετά από λυοφυλίωση) της γαρίδας είναι $35,05 \pm 0.2$ και $27,4 \pm 0.2$ $\mu\text{g/g}$ ξηρού ιστού (βλ. Πίνακα 11.1.1, κεφάλαιο 11). Επίσης στα ολικά λιπίδια μυών ($40 \mu\text{g/g As}$) και κεφαλοθωράκων ($26 \mu\text{g/g As}$), καθώς και στα επιμέρους συστατικά των φωσφολιπιδίων PE ($0,7 \mu\text{g/g As}$), PC ($1,7 \mu\text{g/g As}$) ανιχνεύτηκε αρσενικό.

Οι υδατοδιαλυτές ενώσεις του αρσενικού έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί ως κύρια συστατικά η αρσενοβεταΐνη σε θαλάσσιους οργανισμούς και τα αρσενοσάκχαρα σε θαλάσσια φύκη [31]. Ως εκ τούτου δόθηκε έμφαση στη μελέτη των λιποδιαλυτών ενώσεων του αρσενικού. Η ανάλυσή τους ως άθικτες μοριακές δομές με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα [29], είναι ιδιαίτερα δυσχερής λόγω της ιδιαίτερως μικρής τους συγκέντρωσης, οπότε επιλέγεται η διάσπαση των ενώσεων αυτών με χρήση χημικών ή ενζυμικών υδρολύσεων [33, 36]. Με βάση τα παραπάνω, τα επιμέρους κλάσματα των φωσφολιπιδίων μυών και κεφαλοθωράκων, αφού υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση, αναλύθηκαν με τεχνική LC-ESI-MS/MS, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο 5.16-A του Πειραματικού Μέρους. Από όλα τα παραπάνω δείγματα που αναλύθηκαν αποτελέσματα ελήφθησαν μόνο για τα κλάσματα PC K, PE K, LPC K, LPC M, SPH K, SPH M μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση. Επίσης μελετήθηκαν και τα χρωματογραφήματα SRM όλων των ενώσεων (προτύπων και δειγμάτων). Επιλέχθηκαν δυο χαρακτηριστικά προϊόντα θραυσματοποίησης για κάθε μια από τις προσδιοριζόμενες ουσίες.

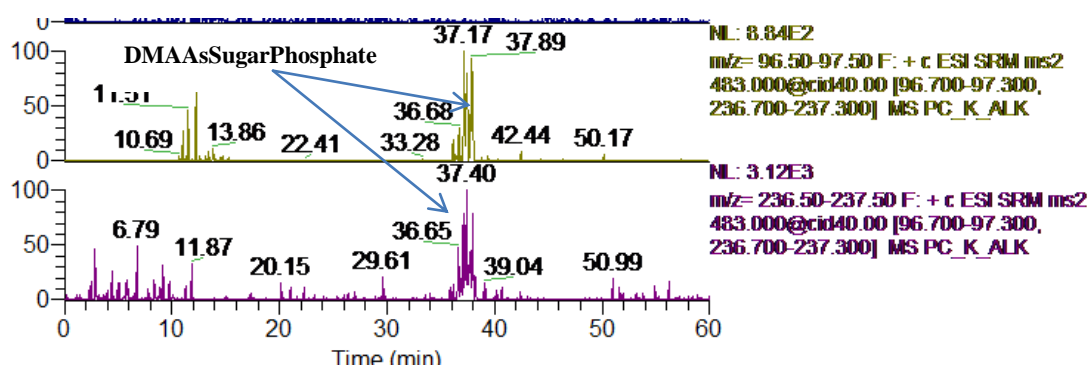
8.1. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PC των κεφαλοθωράκων μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM) .

Τα μοριακά είδη της PC μυών και κεφαλοθωράκων, αφού υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση, αναλύθηκαν με τεχνική LC-ESI-MS/MS, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο 5.16-A του Πειραματικού Μέρους. Από τα παραπάνω δείγματα που αναλύθηκαν ελήφθησαν αποτελέσματα μόνο για το κλάσμα PC K, μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση. Οι χρόνοι ανάλυσης των προϊόντων θραυσματοποίησης των δειγμάτων

συγκρίθηκαν με αυτούς των προτύπων όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.16, Πίνακες 5.16.1 και 5.16.2 και Σχήματα 5.16.1 και 5.16.2 στο Πειραματικό Μέρος.

8.1.1. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού της PC των κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση

Στο SRM χρωματογράφημα της PC K μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση (Σχήμα 8.1.1.1) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση 483>97 μια κορυφή σε χρόνο 37.17 min, και για την μετάπτωση 483 >237 μια άλλη κορυφή σε χρόνο 37.40 min. Σε σύγκριση με τους χρόνους ανάλυσης του προτύπου KELP, το ιόν m/z 483 ταυτοποιείται ως μοριακή δομή DMAAsPhosphate. Το χρωματογράφημα της DMAAsPhosphate περιλαμβάνει δυο χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα, το πρώτο ιόν με m/z 97, και το δεύτερο ιόν με m/z 237.

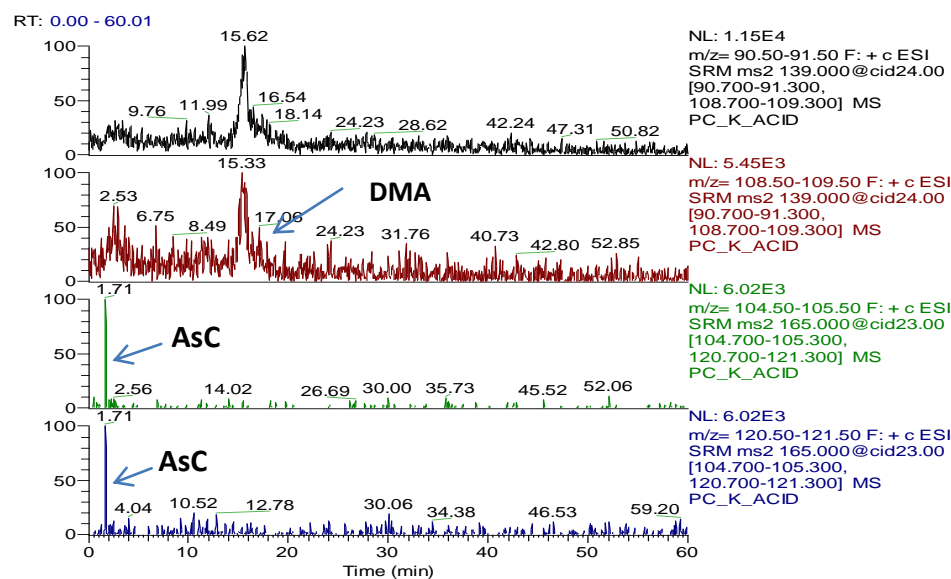


Σχήμα 8.1.1.1. SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της φωσφατιδυλογολίνης κεφαλοθώρακα μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

8.1.2. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PC των κεφαλοθωράκων μετά από μερική όξινη υδρόλυση

Στο SRM χρωματογράφημα της PC K μετά από μερική όξινη υδρόλυση (Σχήμα 8.1.2.1.) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση 139 >109 μια κορυφή σε χρόνο 15.06 min η οποία ταυτοποιήθηκε ως DMA επειδή εκλύεται παρόμοιο χρόνο ανάλυσης με αυτόν του προτύπου, βλέπε Πίνακα 5.16.2, Σχήμα 5.16.1. Για τις μεταπτώσεις 165>105 και 165>121 παρατηρήθηκαν κορυφές σε χρόνο 1.71 min, οι οποίες εκλύονται στο χρόνο

ανάσχεσης του προτύπου της αρσενοχολίνης (AsC). Το μοριακό ιόν με m/z 165 ταυτοποιείται ως AsC και τα ιόντα m/z 105 και 121 είναι προϊόντα ιόντα αυτής.



Σχήμα 8.1.2.1 SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης κεφαλοθώρακα μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

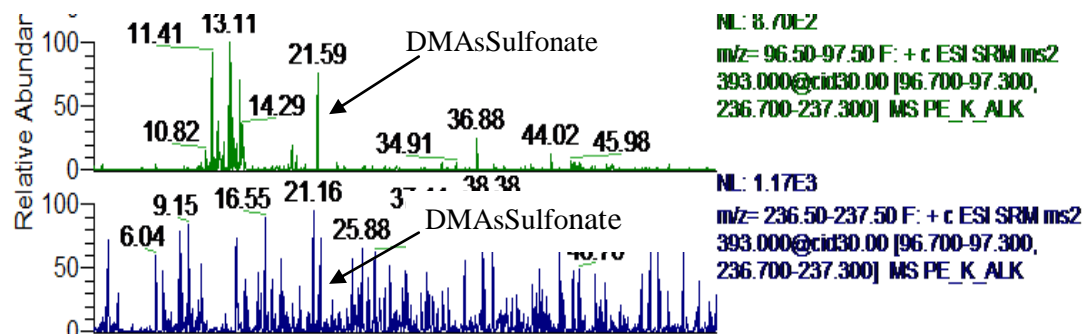
8.2. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PE μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM).

Τα μοριακά είδη της PE μών και κεφαλοθωράκων, αφού υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση, αναλύθηκαν με τεχνική LC-ESI-MS/MS, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο 5.16-A του Πειραματικού Μέρους. Από τα παραπάνω δείγματα που αναλύθηκαν ελήφθηκαν αποτελέσματα μόνο για το κλάσμα PE K, μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση. Οι χρόνοι ανάσχεσης των προϊόντων θραυσματοποίησης των δειγμάτων συγκρίθηκαν με αυτούς των προτύπων όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.16, Πίνακες 5.16.1 και 5.16.2 και Σχήματα 5.16.1 και 5.16.2 στο Πειραματικό Μέρος.

8.2.1. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PE μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση

Στο SRM χρωματογράφημα της PE K μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση (Σχήμα 8.2.1.1.) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση $393 > 97$ μια κορυφή σε χρόνο 21.59 min και

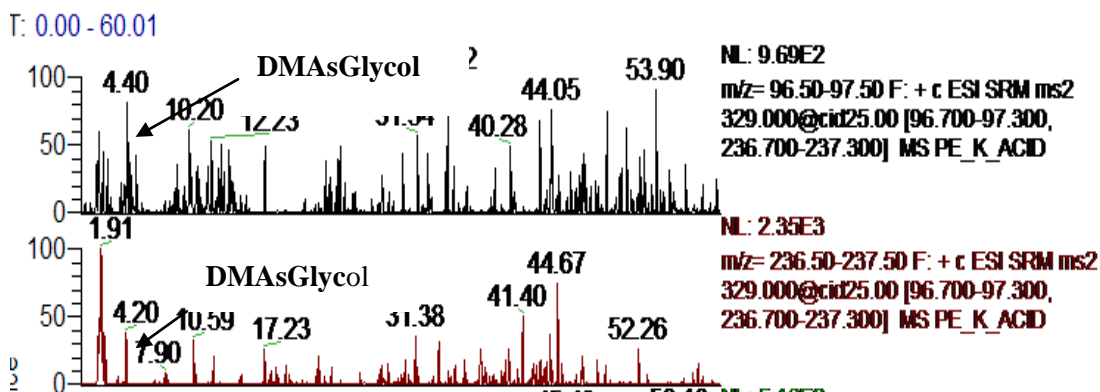
για τη μετάπτωση 393 >237 μια κορυφή σε χρόνο 21.16 min. Σε σύγκριση με τους χρόνους ανάλυσης του προτύπου KELP, το ιόν με m/z 393 ταυτοποιείται ως DMAsSulfonate, η οποία περιλαμβάνει δυο προϊόντα ιόντα, το πρώτο ιόν με m/z 97, και το δεύτερο ιόν με m/z 237.



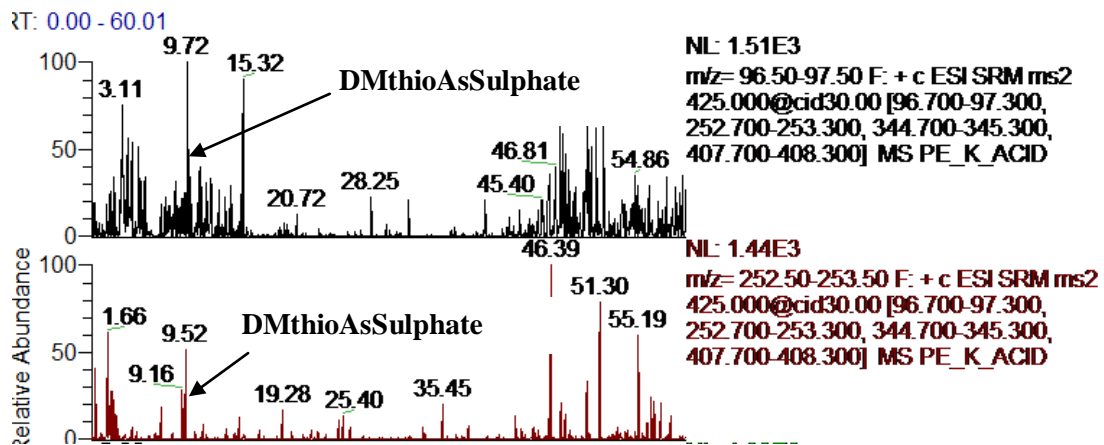
Σχήμα 8.2.1.1 SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της φωσφατιδυεθανολαμίνης κεφαλοθώρακα μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

8.2.2. Ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού στο κλάσμα της PE μετά από μερική όξινη υδρόλυση

Στο SRM χρωματογράφημα της PE K μετά από μερική όξινη υδρόλυση (Σχήμα 8.2.2.1) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση 329 > 97 μια κορυφή σε χρόνο 4.40 min, για την μετάπτωση 329 > 237 μια κορυφή σε χρόνο 4.20 min. Οι κορυφές αυτές ταυτοποιήθηκαν ως DMAsGlycol επειδή εκλύονται στον ίδιο χρόνο ανάλυσης με αυτό του προτύπου (RT 4.37, 4.33 min), βλέπε Πίνακα 5.16.1, Σχήμα 5.16.2. Στο χρωματογράφημα (Σχήμα 8.2.2.2) παρατηρήθηκε και η μετάπτωση 425>97 με κορυφή σε χρόνο 9.72 min και για η μετάπτωση 425 > 253 με κορυφή σε χρόνο 9.52 min. Οι κορυφές αυτές εκλύονται στο ίδιο χρόνο με το DMthioAsSulphate.

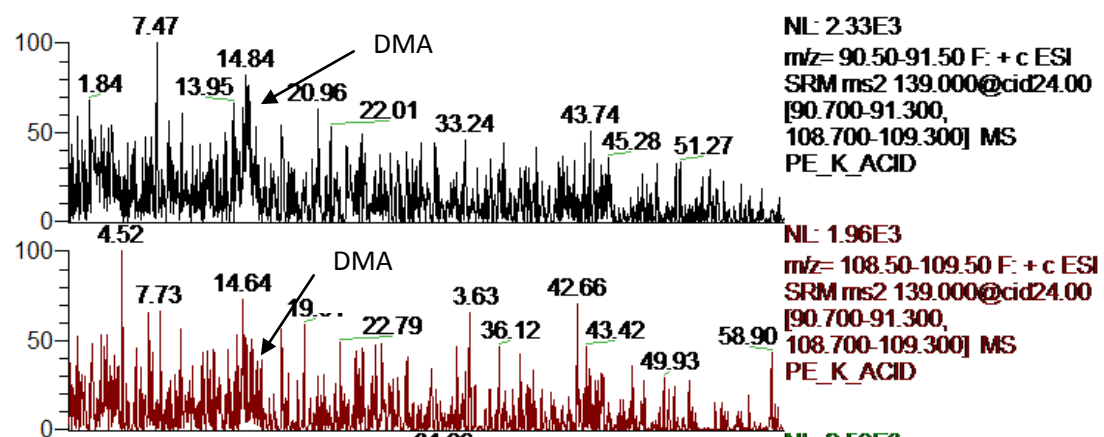


Σχήμα 8.2.2.1 SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης κεφαλοθώρακα μετά από μερική όξινη υδρόλυση.



Σχήμα 8.2.2.2 SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης κεφαλοθώρακα μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

Στο χρωματογράφημα (Σχήμα 8.2.2.3) παρατηρήθηκε και η μετάπτωση 139 >91 και για η μετάπτωση 139 >109 με κορυφή σε χρόνο 14.8 min. Οι κορυφές αυτές εκλούνται στο ίδιο χρόνο με το DMA.



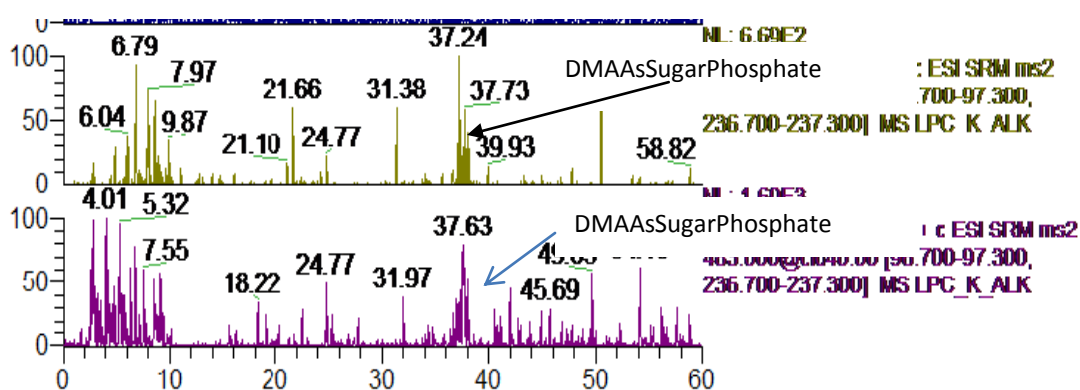
Σχήμα 8.2.2.3 SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης κεφαλοθώρακα μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

8.3. Ταυτοποίηση μοριακών ειδών της LPC μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM).

Τα μοριακά είδη της LPC μυών και κεφαλοθωράκων, αφού υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση, αναλύθηκαν με τεχνική LC-ESI-MS/MS, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο 5.16-A του Πειραματικού Μέρους. Από τα παραπάνω δείγματα που αναλύθηκαν ελήφθησαν αποτελέσματα για όλα τα κλάσματα LPC K και LPC M μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση. Οι χρόνοι ανάσχεσης των προϊόντων θραυσματοποίησης των δειγμάτων συγκρίθηκαν με αυτούς των προτύπων όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.16, Πίνακες 5.16.1 και 5.16.2 και Σχήματα 5.16.1 και 5.16.2 στο Πειραματικό Μέρος.

8.3.1. Ταυτοποίηση ενώσεων της LPC κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση

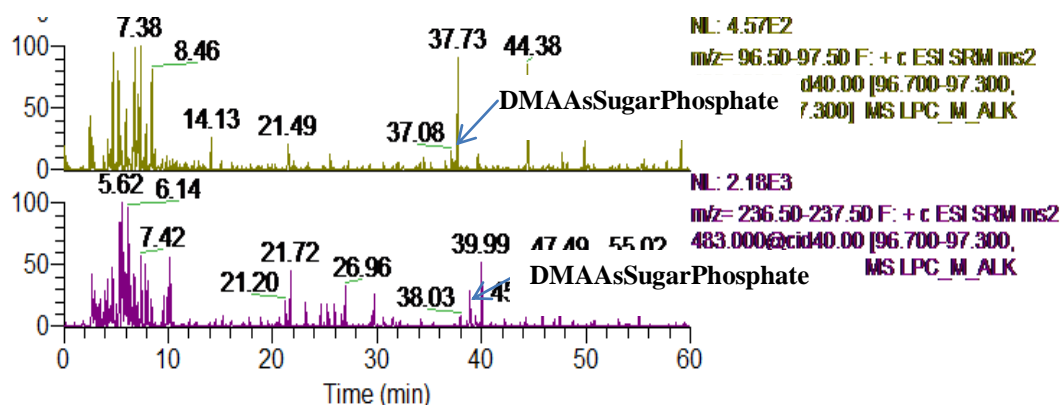
Στο SRM χρωματογράφημα της LPC K μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση (Σχήμα 8.3.1.1.α) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση 483 > 97 μια κορυφή στο χρόνο 37.24 min, και για την μετάπτωση 483 > 237 μια άλλη κορυφή στο χρόνο 37.63 min. Σε σύγκριση με τους χρόνους ανάσχεσης του προτύπου KELP, το ιόν m/z 483 ταυτοποιείται ως DMAAsPhosphate, η οποία περιλαμβάνει δυο προϊόντα ιόντα, το πρώτο ιόν με m/z 97, και το δεύτερο ιόν με m/z 237. Η ίδια ένωση ταυτοποιήθηκε και στο κλάσμα PC K, άρα επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα αυτό (Σχήμα 8.1.1.1).



Σχήμα 8.3.1.1.α SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης κεφαλοθώρακα μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Στο SRM χρωματογράφημα της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης από το τμήμα των μυών (LPC M) μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση (Σχήμα 8.3.1.1.β.), παρατηρήθηκε για την

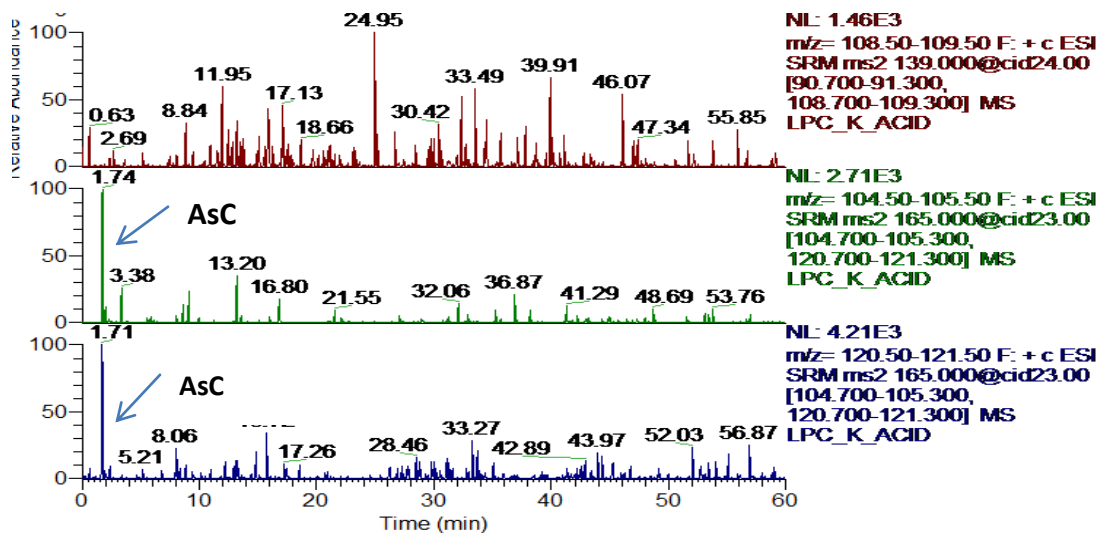
μετάπτωση 483 > 97 μια κορυφή πολύ μικρότερης έντασης σε σύγκρισή με τη LPC K, στο χρόνο 37.08 min, και για την μετάπτωση 483 > 237 μια άλλη κορυφή στο χρόνο 38.03 min. Πιθανόν οι κορυφές αυτές είναι μικρότερης έντασης συγκριτικά με αυτές που ταυτοποιήθηκαν στη LPC K του τμήματος κεφαλοθωράκων, εξαιτίας της χαμηλότερης συγκέντρωσης του DMAAsPhosphate στο κλάσμα αυτό. Επιπλέον υπάρχει μια μικρή διαφοροποίηση στους χρόνους έκλυσης δείγματος έναντι του προτύπου.



Σχήμα 8.3.1.1.β. SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

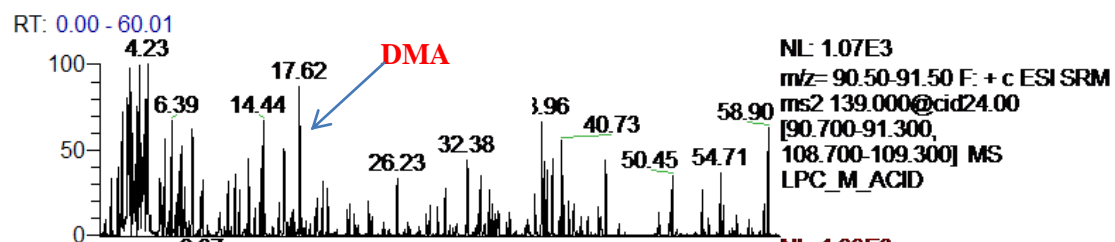
8.3.2. Ταυτοποίηση ενώσεων της LPC κεφαλοθωράκων και μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση

Στο SRM χρωματογράφημα της LPC K μετά από μερική όξινη υδρόλυση (Σχήμα 8.3.2.1.α) παρατηρήθηκαν για τις μεταπτώσεις 165 > 105 και 165 > 121 αντίστοιχα κορυφές που εκλύονται στο χρόνο ανάσχεσης του προτύπου της αρσενοχολίνης (AsC). Η ίδια ένωση ταυτοποιήθηκε και στο κλάσμα PC K, άρα επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα αυτό (Σχήμα 8.1.2.1.).

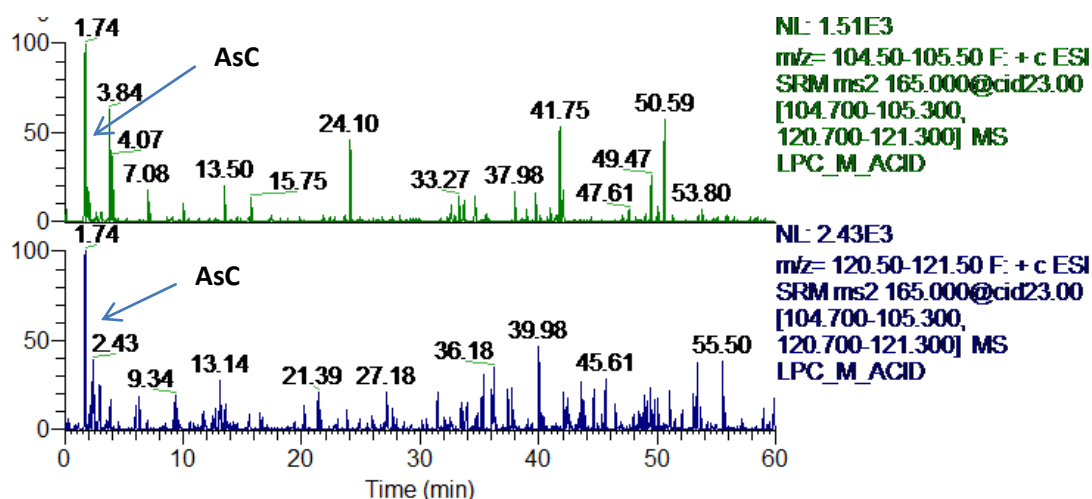


Σχήμα 8.3.2.1.α. SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης κεφαλοθώρακα μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

Στο SRM χρωματογράφημα της LPC M μετά από μερική όξινη υδρόλυση (Σχήμα 8.3.2.1.β) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση $139 > 91$ μια κορυφή σε χρόνο 17.62 min, η οποία επειδή εκλούεται πλησίον του χρόνου ανάσχεσης του DMA, πιθανότατα αντιστοιχεί στην ένωση αυτή. Αντιθέτως οι κορυφές που παρατηρήθηκαν για τις μεταπτώσεις $165 > 105$ και $165 > 121$ εκλούνται ακριβώς στο χρόνο ανάσχεσης του προτύπου της αρσενοχολίνης (AsC), οπότε ταυτοποιούνται ως AsC (Σχήμα 8.3.2.2.β).. Η ίδια ένωση ταυτοποιήθηκε και στο κλάσμα PC K, άρα επιβεβαιώνεται το αποτέλεσμα αυτό.



Σχήμα 8.3.2.1.β. SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.



Σχήμα 8.3.2.2.β. SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της λυσοφωσφατιδυλογολίνης μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

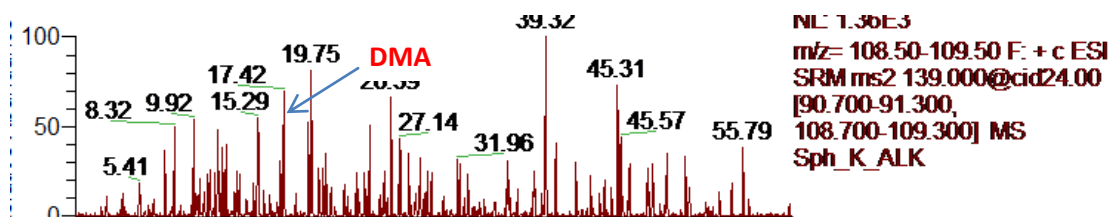
8.4. Ταυτοποίηση μοριακών ειδών της Sph (μετά από Ήπια Αλκαλική και Μερική Όξινη Υδρόλυση με LC ESI MS/MS (SRM))

Τα μοριακά είδη της Sph μυών και κεφαλοθωράκων, αφού υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση, αναλύθηκαν με τεχνική LC-ESI-MS/MS, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναπτύσσεται στο υποκεφάλαιο 5.16-A του Πειραματικού Μέρους. Από τα παραπάνω δείγματα που αναλύθηκαν ελήφθησαν αποτελέσματα για όλα τα κλάσματα Sph K και Sph M μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση. Οι χρόνοι ανάσχεσης των προϊόντων θραυσματοποίησης των δειγμάτων συγκρίθηκαν με αυτούς των προτύπων όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.16, Πίνακες 5.16.1 και 5.16.2 και Σχήματα 5.16.1 και 5.16.2 στο Πειραματικό Μέρος.

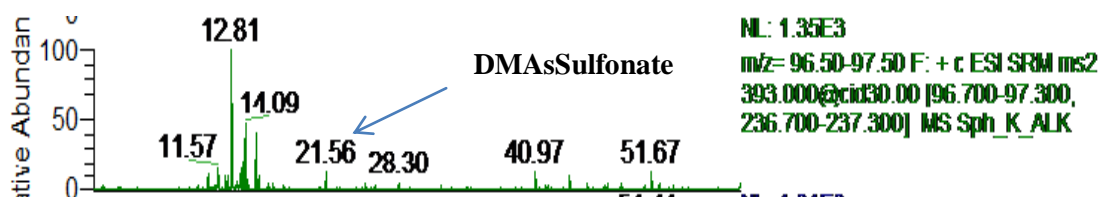
8.4.1. Ταυτοποίηση ενώσεων της Sph των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση

Στο SRM χρωματογράφημα της Sph K μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση (Σχήμα 8.4.1.1) παρατηρήθηκε για την μετάπτωση 139 >109 μια κορυφή στο χρόνο 17.42 min η οποία εκλούεται στο ίδιο χρόνο με αυτό του προτύπου DMA (RT 17.88 min), με μια επιφύλαξη επειδή δεν εμφανίζεται και στις δυο μεταπτώσεις του DMA.

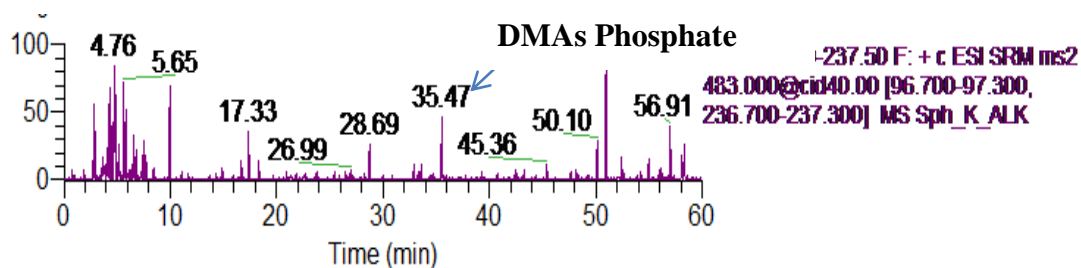
Για την μετάπτωση 393 >97 παρατηρήθηκε η κορυφή στο χρόνο 21.56 min, οποία επειδή εκλούεται πλησίον του χρόνου ανάσχεσης του DMA_sSulfonate (20.97 min), πιθανότατα αντιστοιχεί στην ένωση αυτής (Σχήμα 8.4.1.2.α). Για την μετάπτωση 483>238 παρατηρήθηκε η κορυφή στο χρόνο 35.47 min η οποία εκλούεται στο ίδιο χρόνο με αυτό του προτύπου DMA_s Phosphate, Σχήμα 8.4.1.3.α.



Σχήμα 8.4.1.1.α SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της σφιγγομυελίνης κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.



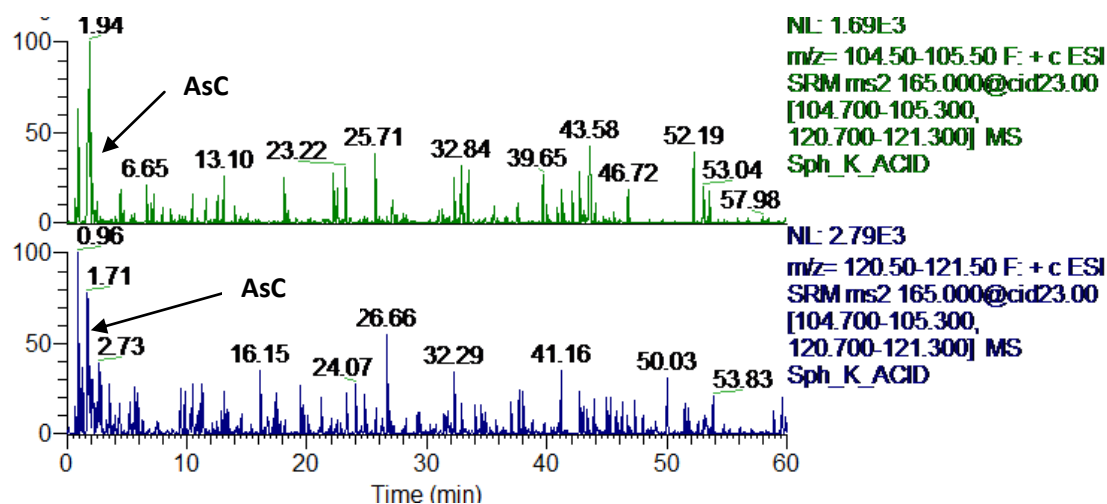
Σχήμα 8.4.1.2.α SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της σφιγγομυελίνης κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.



Σχήμα 8.4.1.3.α SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της σφιγγομυελίνης κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

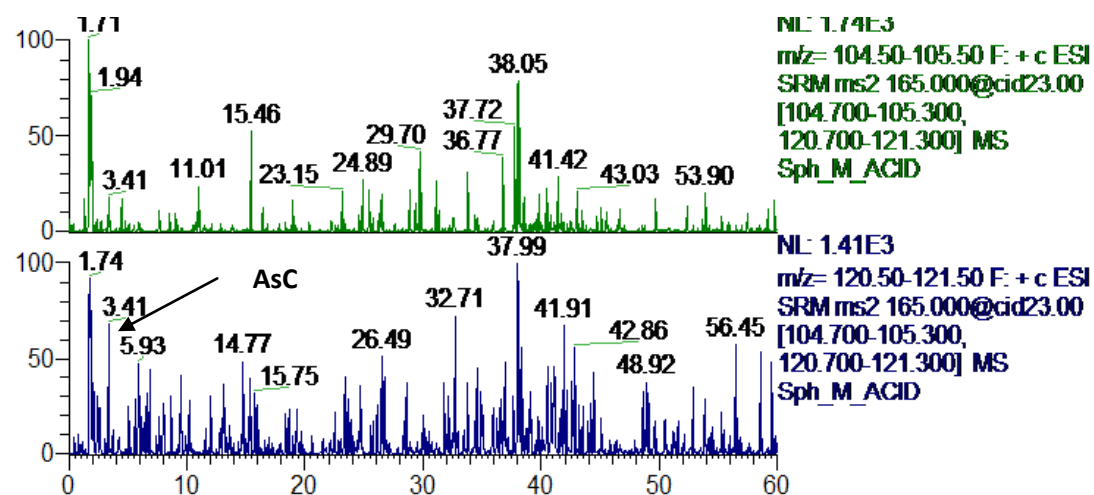
8.4.2. Ταυτοποίηση ενώσεων της Sph των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση

Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν μετά από μερική όξινη υδρόλυση της σφιγγομυελίνης κεφαλοθωράκων στις μεταπτώσεις 165 > 105, είναι η AsC, (Σχήμα 8.4.2.1).



Σχήμα 8.4.2.1.α. SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της σφιγγομυελίνης κεφαλοθωράκων μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

Η ένωση που ταυτοποιήθηκε μετά από μερική όξινη υδρόλυση των μυών στις μεταπτώσεις 165 > 105 και 165 > 121 είναι η AsC (οι κορυφές εκλούθησαν σε χρόνους RT 1.71 και 1.74 min (Σχήμα 8.4.2.1.β).



Σχήμα 8.4.2.1.β SRM χρωματογράφημα με ESI (+) του δείγματος της σφιγγομυελίνης μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

Στους παρακάτω Πίνακες 8.1 έως 8.6 παρουσιάζονται συγκεντρωμένα όλες οι ενώσεις του αρσενικού που ταυτοποιήθηκαν στις απομονωμένες μοριακές δομές των φωσφολιπιδίων.

Πίνακας 8.1. Οργανικές ενώσεις του αρσενικού στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων (PC K) μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση.

Ενώσεις του As στο PC κεφ. μετά από Ήπια ΑΛ.Υδρόλυση	SRM	RT sample min	Ενώσεις του As μετά από μερική Όξινη υδρόλυση	SRM	RT min
DMAsSugarPhosphate	483>97	37.17	AsC	165>105	1.71
	483>237	37.40		165>121	1.71
DMThioAsSugarSulfonate	409>253	12.63	DMA	139>109	15.3-15.6

Πίνακας 8.2. Οργανικές ενώσεις του αρσενικού στο κλάσμα της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης των κεφαλοθωράκων (PE K) μετά από ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση.

Ενώσεις του As στο PE K. μετά από Η. ΑΛ. υδρόλυση	SRM	RT min	Ενώσεις του As στο PE K μετά από μερική Όξινη υδρόλυση	SRM	RT min
DMAsSugar Sulfonate	393>97	21.59	DMA	139>91	14.6-14.8
	393>237	21.16		139>109	
			DMAsGlycol	329>97	4.40
				329>237	4.20
			DMThioAsSulphate	425>97	9.72
				425>253	9.52

Πίνακας 8.3. Οργανικές ενώσεις του αρσενικού στο κλάσμα της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Ενώσεις του As στο LPC Κ μετά από Η. ΑΛ. Υδρόλυση	SRM	RT min	Ενώσεις του As στο LPC Μ μετά από Η. ΑΛ. Υδρόλυση	SRM	RT min
DMAsPhosphate	483>97	37.24	DMAsPhosphate	483>97	37.08
	483>237	37.63		483>237	38.03

Πίνακας 8.4. Οργανικές ενώσεις του αρσενικού στο κλάσμα της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

Ενώσεις του As στο LPC Κ μετά από μερική Όξινη υδρόλυση	SRM	RT min	Ενώσεις του As στο LPC Μ μετά από μερική Όξινη υδρόλυση	SRM	RT min
AsC	165>105	1.71-1.74	DMA	139>91	17.62
	165>121		AsC	165>105	1.74
				165>121	1.74

Πίνακας 8.5 Οργανικές ενώσεις του αρσενικού στο κλάσμα της σφινγγομυελίνης (Sph) των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Ενώσεις του As στο Sph κεφαλοθωράκων μετά από Η. ΑΛ. Υδρόλυση	SRM	RT min	Ενώσεις του As στο Sph Μυών μετά από Η. ΑΛ. Υδρόλυση	SRM	RT min
DMA	139>108	17.42	DMA	139>109	17.26
DMAsSulfonate	393>97	21.56	DMAsGlycol	329>237	4.56
DMAsPhosphate	483>238	35.47	DMSAsGlycol	345>240	21.72
			DMAsSulfate	409>97	17.15

Πίνακας 8.6. Οργανικές ενώσεις του αρσενικού στο κλάσμα της σφιγγομυελίνης (Sph) των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

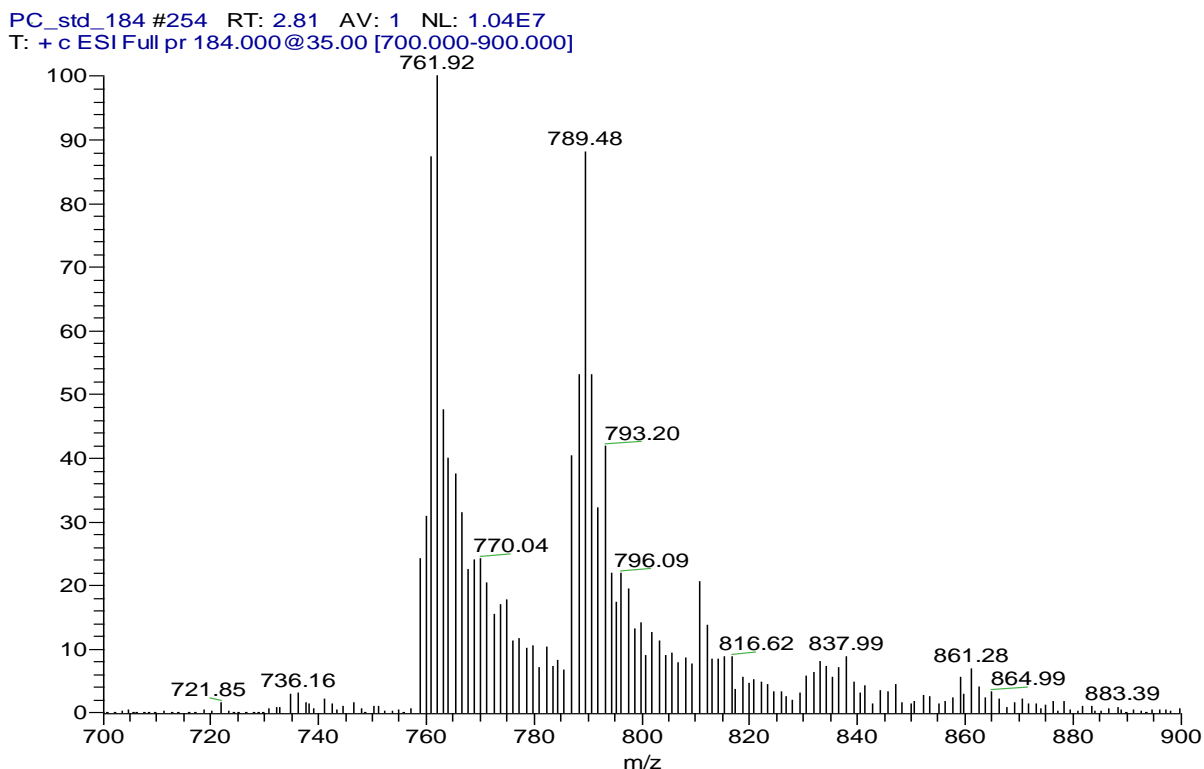
Ενώσεις του As στο Sph κεφαλοθωράκων μετά από μερική Όξινη υδρόλυση	SRM	RT sample	Ενώσεις του As στο Sph μυών μετά από μερική Όξινη υδρόλυση	SRM	RT sample
AsC	165>105	1.71	AsC	165>105	1.74
	165>121	1.71		165>121	1.74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

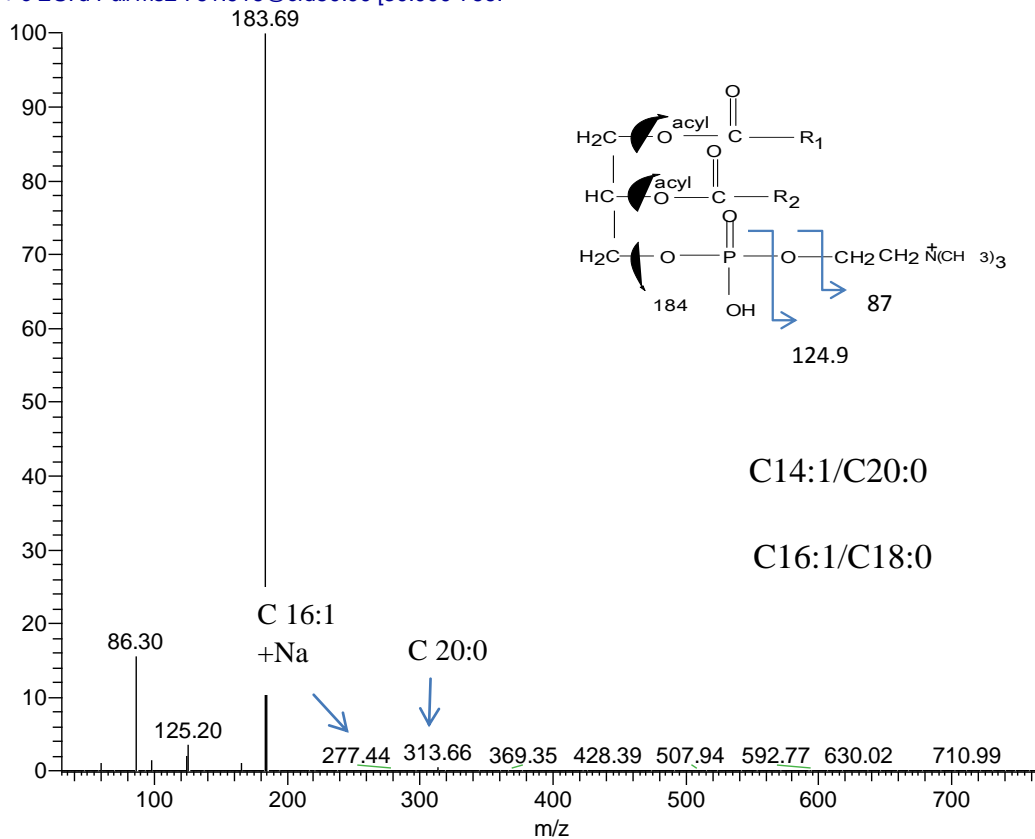
Μελέτη μοριακών δομών φωσφολιπιδίων και αρσενολιπιδίων της γαρίδας *P. Kerathurus* με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος.

9.1 Μελέτη μοριακών δομών της φωσφατιδυλογολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. Kerathurus* με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική πλήρης σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 184.

Αρχικά μελετήθηκε το πρότυπο της φωσφατιδυλογολίνης η οποία βρέθηκε να περιέχει διάφορες μοριακές δομές με m/z 762,770, 792, 796, 816 κ.α. Στο φάσμα προϊόντος ιόντος του προτύπου της φωσφατιδυλογολίνης εκτός από τα βασικά του μοριακά ιόντα (με m/z 184, 125, 87), εμφανίζονται και τα είδη λιπαρών οξέων του (Σχήμα 9.1.1). Συγκεκριμένα, η κορυφή με m/z 762 αντιστοιχεί σε διακυλο- παράγωγα της φωσφατιδυλογολίνης με μοριακές δομές C14:1/C20:0 και C16:1/C18:0.



PC_std_184 #255 RT: 2.83 AV: 1 NL: 3.77E6
 T: + c ESI d Full ms2 761.916@cid50.00 [30.000-766.



Σχήμα 9.1.1 Φάσματα μαζών του προτύπου της φωσφατιδυλοχολίνης κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με πρόδρομο ιόν με m/z 184.

Στα φάσματα μαζών θετικού ιόντος του δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) των κεφαλοθωράκων (PC K) με πρόδρομο ιόν m/z 184 βρέθηκαν περίπου 30 μοριακές δομές με m/z 742, 746, 760 [99], 762, 786 [17], 836 κ.α σε διακυλο, αλκενυλο-ακυλο και αλκυλο-ακυλο (Πίνακα 9.1.1). Επίσης στα φάσματα μαζών προϊόντων ιόντων του δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης εκτός της κορυφής με m/z 184 [99], λήφθηκαν και κορυφές σε m/z 226, 256, 279, 284, 301, 308, 310, 312 και 337 που αντιστοιχούν στα πρωτονιομένα ιόντα καρβοξυλικών οξέων ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$) C14:1, C16:0, C17:1, C18:2, C18:0, C20:5, C20:3, C20:1, C20:0 και C22:1 αντίστοιχα. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα μαζών προδρόμου και προϊόντων ιόντων που αντιστοιχούν σε μοριακές δομές του δείγματος PC K με m/z, 762, 806 (Σχήματα 9.1.2, 9.1.3).

Ο Brügger et al, (1997) [88] προτείνει ότι τα ψευδο-μοριακά ιόντα με m/z 742 (34:2), 794 (38:4) αντιστοιχούν σε μοριακές δομές πλασμένου- PC. Άρα το μοριακό ιόν με m/z 742 (34:2) που δίνεται στον Πίνακα 9.1.1 αντιστοιχεί και σε πλασμένο μορφή με συνδυασμό λιπαρών οξέων C16:1/C18:1 και το μοριακό ιόν με m/z 792 (38:5) αντιστοιχεί και σε πλασμένο μορφή με συνδυασμό λιπαρών οξέων C 18:2/ C20:3.

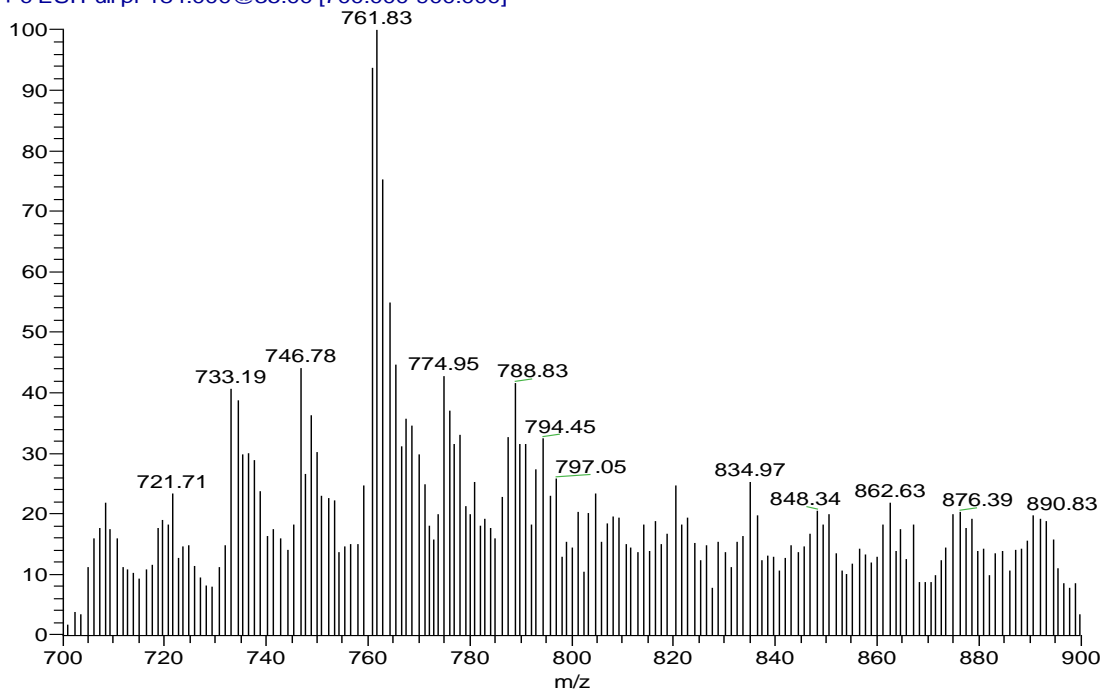
Πίνακας 9.1.1 Ταυτοποίηση μοριακών δομών της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) του κεφαλοθώρακα της γαρίδας *P. kerathurus* με LC-ESI-MS/MS, πλήρης σάρωσης πρόδρομου ιόντος με m/z 184.

M W	m/z (M+H ⁺)	Diacyl PC	Alkenyl-Acyl PC	Alkyl-Acyl PC
741	742	C15:1/C18:2	34:2 C16:1/C18:1	C16:1/C18:2
745	746	C15:0/C18:2 *C15:1/C18:1	16:0/18:1	
759	760	C16:0/C18:1		
761	762	C16:0/C18:0*	-	-
775	776	-	C18:0/C18:0 C20:0/C16:0 *C17:0/C19:0	-
779	780	C18:2/C18:3 C16:0/C20:5 C16:1/C20:4	C17:0/C20:4	C17:0cyclo/C20: 4 C17:0/ C20:5
781	782	C18:2/C18:2 C16:0/C20:4 C18:1/C18:3	C17:0 cyclo/C20:2 C17:0/C20:3	C17:0/C20:4
785	786	C18:0/C18:2 *C20:1/C16:1	C17:0/C20:1	C17:0/20:2
791	792		C18:2/C20:3	C18:2/C20:5
803	804	C18:2/C20:5 C16:1/C22:6	C17:0/C22:6	
805	806	C16:0/C22:6	-	-

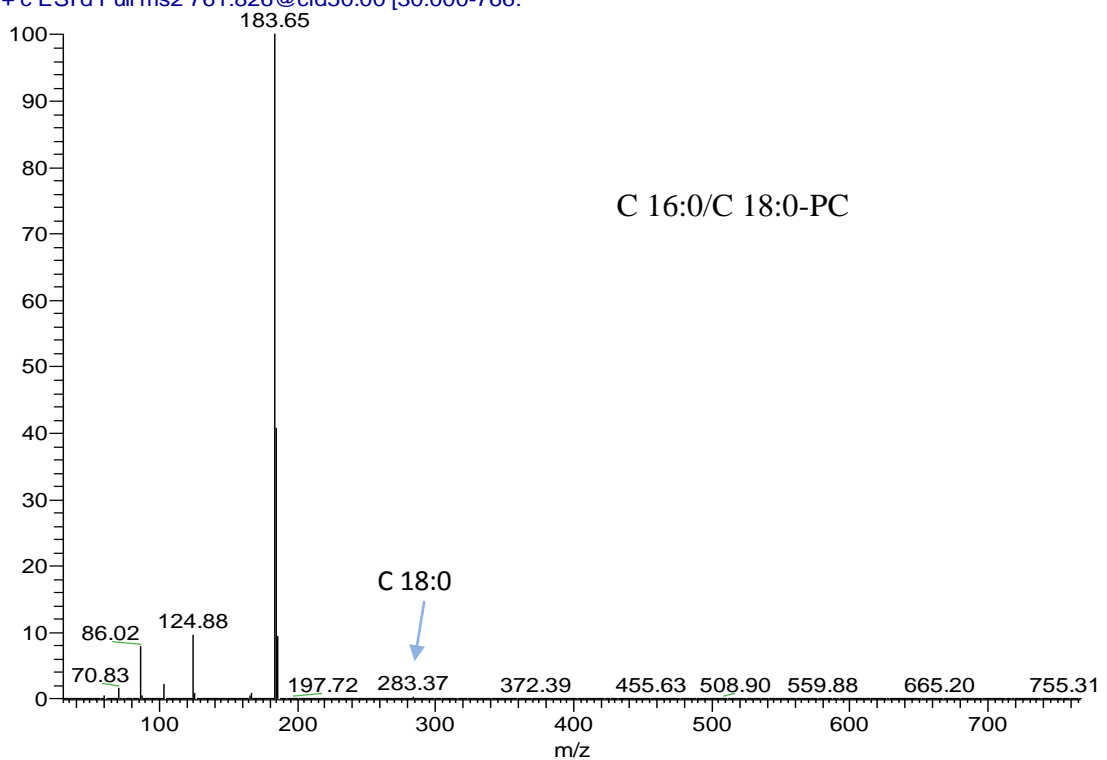
		C18:2/C20:4 C18:1/C20:5		
835	836	C18:0/C22:5 *C20:0/C20:5 C20:1/C20:4	C21:0/C20:4	C21:0/C20:5
837	838	C20:0/C20:4 *C16:1/C24:3 C20:1/C20:3		
839	840	C20:0/C20:3	20:3/22:6*	C20:4/C22:6*
859	860	C20:1/C22:6 *C 20:2/C 22:5	-	-

Το (*) έχει τοποθετηθεί δίπλα στα λιπαρά οξέα τα οποία εμφανίζονται στα φάσματα μαζί.

PC_K_184 #260 RT: 2.73 AV: 1 NL: 1.44E7
T: + c ESI Full pr 184.000@35.00 [700.000-900.000]



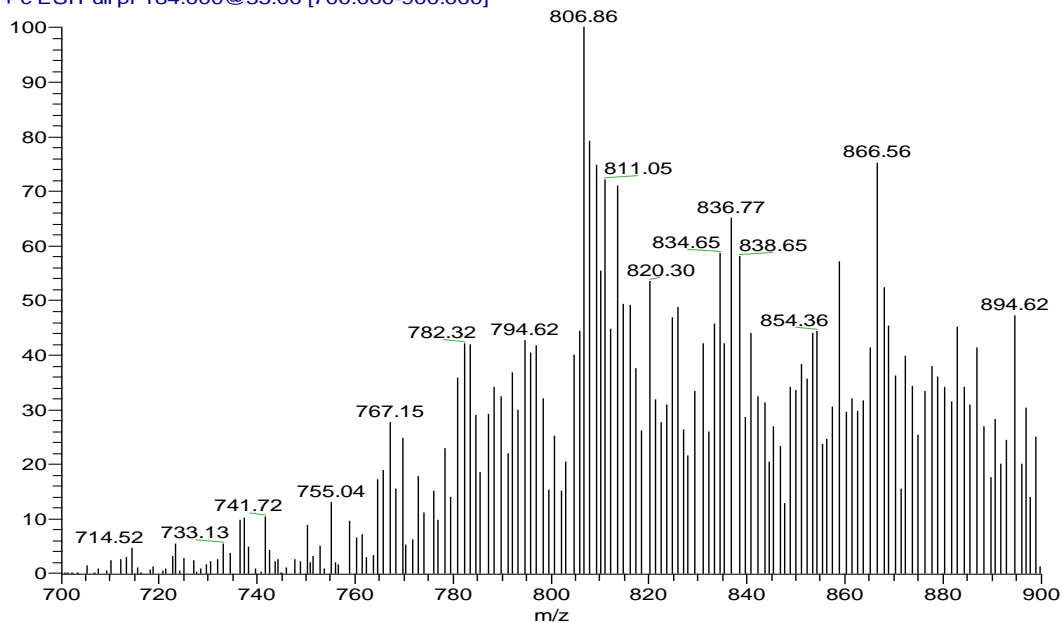
PC_K_184 #261 RT: 2.75 AV: 1 NL: 8.31E6
T: + c ESI d Full ms2 761.826@cid50.00 [30.000-766.



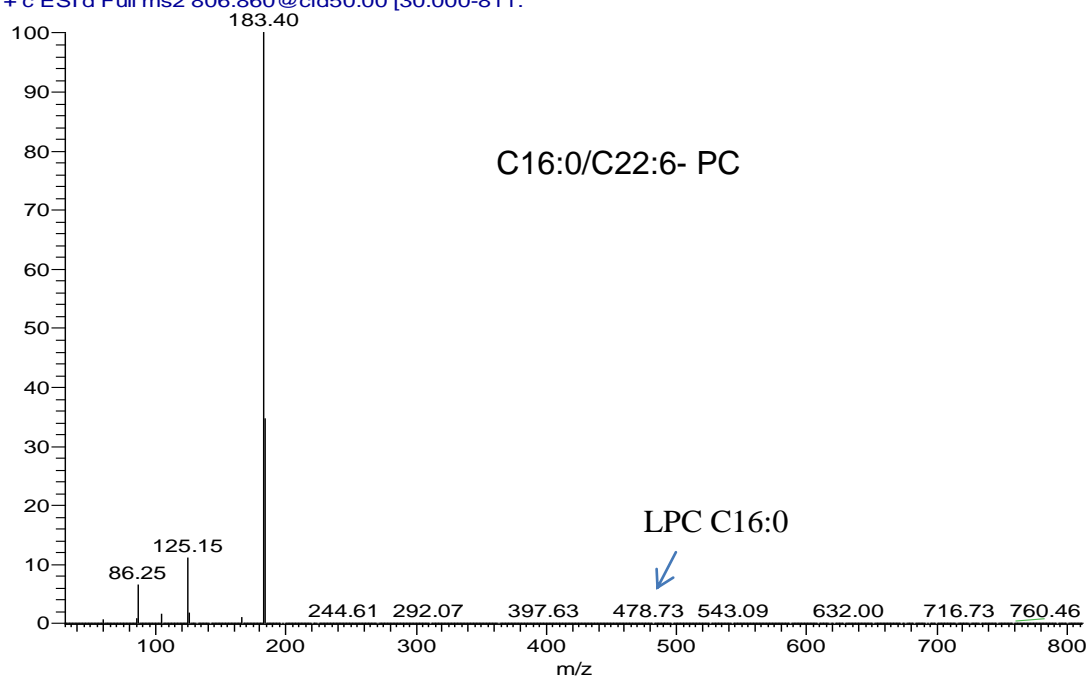
Σχήμα 9.1.2 Φάσμα μαζών δείγματος της φωσφατιδυλογλίνης των κεφαλοθωράκων κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με πρόδρομο ιόν με m/z 184.

Το ψευδο- μοριακό ιόν με m/z 478 αντιστοιχεί στη δομή στο LPC C16:0 [86], άρα το ψευδο-μοριακό ιόν με m/z 806 μπορεί να παραχθεί στη δομή C16:0/C22:6 (Σχήμα 9.1.2).

PC_K_184 #234 RT: 2.40 AV: 1 NL: 1.24E6
T: + c ESI Full pr 184.000@35.00 [700.000-900.000]



PC_K_184 #235 RT: 2.42 AV: 1 NL: 1.56E6
T: + c ESI d Full ms2 806.860@cid50.00 [30.000-811.]



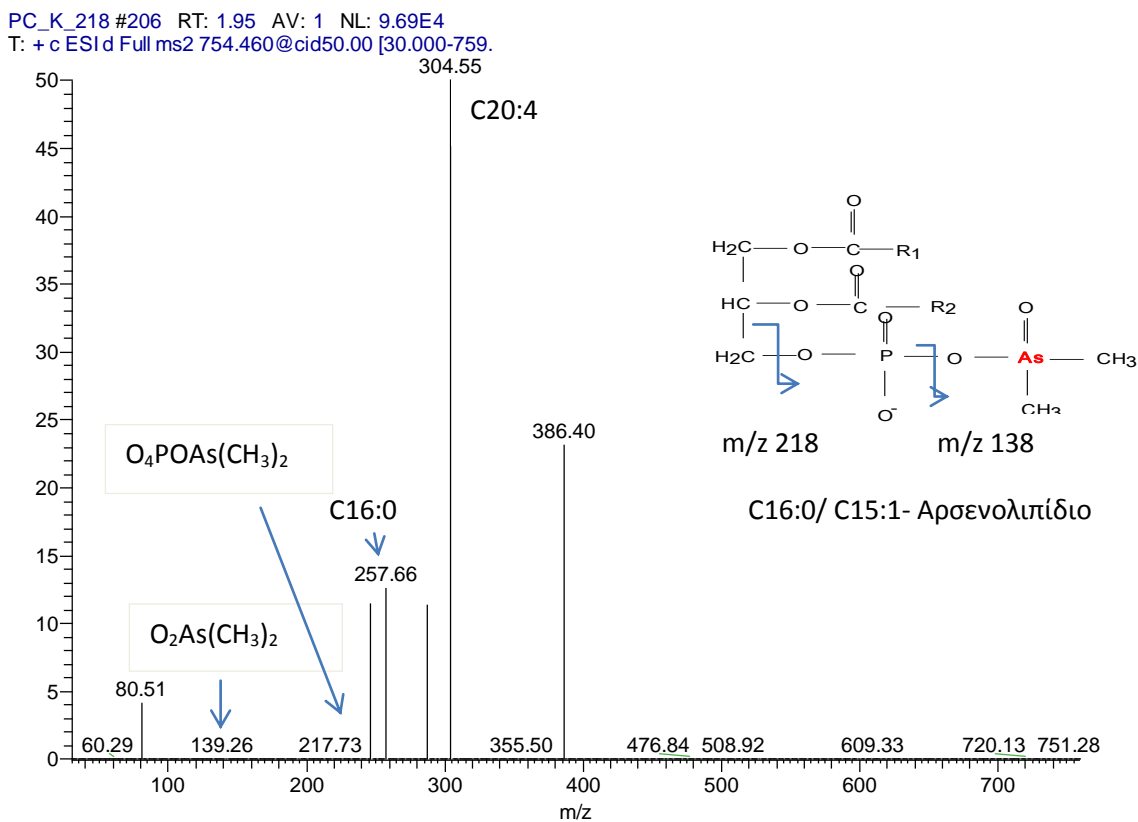
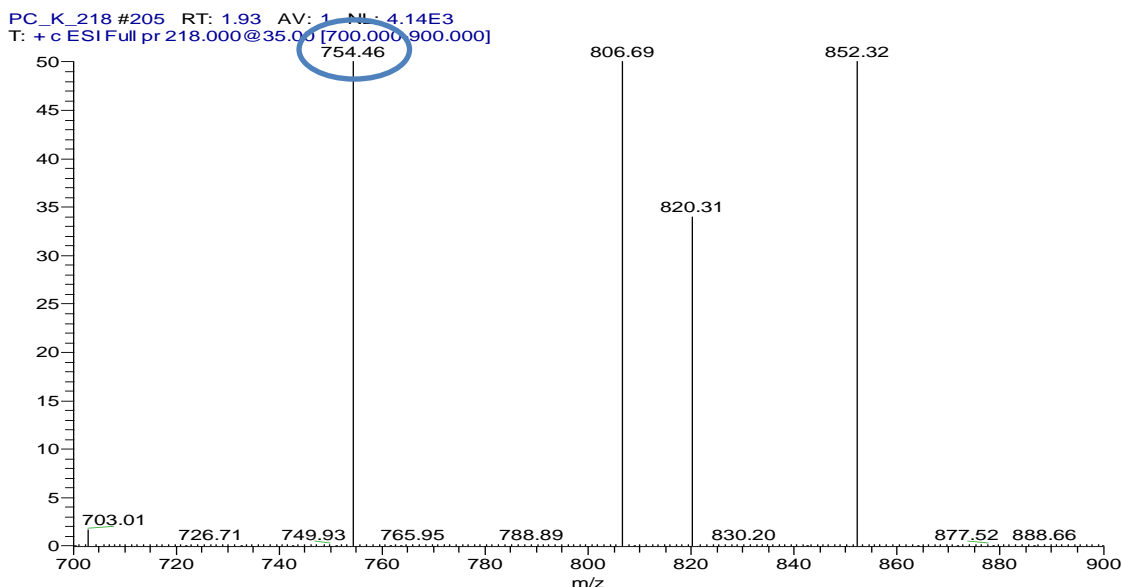
Σχήμα 9.1.3. Φάσματα μαζών δείγματος της φωσφατιδυλογολίνης των κεφαλοθωράκων κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με πρόδρομο ιόν με m/z 184.

9.2 Μελέτη μοριακών δομών της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων και μυών με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 218.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα πειράματα με LC-ESI-MS/MS (SRM) για την ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού μετά από μερική όξινη υδρόλυση φωσφολιπιδίων (Παράγραφο 8.1.2, στα Αποτελέσματα και Συζήτηση) στο κλάσμα της PC των κεφαλοθωράκων και μυών, ανιχνεύθηκε DMA και Αρσενοχολίνη (AsC). Για την επιβεβαίωση της παρουσίας τους στο κλάσμα αυτό, μελετήσαμε α) τις μοριακές δομές των αρσενολιπιδίων με πρόδρομο ιόν με m/z 218 το οποίο προκύπτει από την αντικατάσταση της ομάδας της χολίνης $[-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ με DMA $[-\text{As}(\text{CH}_3)_2\text{O}]$ και β) τις μοριακές δομές των αρσενολιπιδίων με πρόδρομο ιόν με m/z 245 το οποίο προκύπτει από την αντικατάσταση του αζώτου στην ομάδα της χολίνης $[-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ με αρσενικό $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{As}^+(\text{CH}_3)_3]$. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [38,100], αναφέρονται ότι οι ενώσεις αυτές έχουν βρεθεί και σε άλλους θαλάσσιους οργανισμούς.

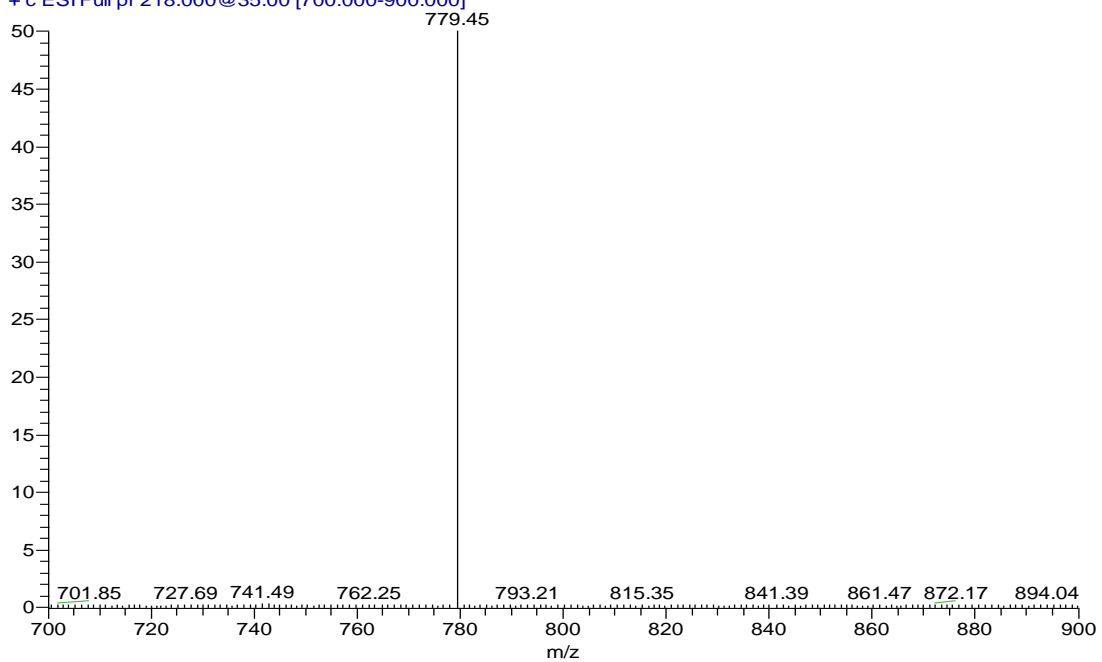
Όπως φαίνεται στο φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της PC K (Σχήμα 9.2.1) του ψευδο-μοριακού ιόντος με m/z 754.4 με RT 1.95 min, παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά θραύσματα (με m/z 139 και 218) του αντίστοιχου αρσενολιπιδίου με δομή γλυκεροφωσφολιπιδίου που αντί για χολίνη είναι προσδεμένο με DMA. Σύμφωνα με το προϊόν ιόν λιπαρού οξέος με m/z 257, η μοριακή δομή του ταυτοποιημένου αρσενολιπιδίου είναι C16:0 / C15:1. Στο Σχήμα 9.2.2 παρουσιάζεται φάσμα μαζών φωσφατιδυλοχολίνης με πρόδρομο ιόν m/z 218, που σημαίνει ότι τα μοριακά ιόντα που βρίσκονται στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης είτε είναι τύπου αρσενολιπιδίου είτε είναι είδος φωσφατιδυλοχολίνης συνεκλούνται. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 9.2.2 ταυτοποιείται το μοριακό ιόν με m/z 780 (διακυλο παράγωγο της φωσφατιδυλοχολίνης με πιθανό συνδυασμό λιπαρών οξέων *C18:2/C18:4, *C16:1/C20:5 και *C22:5/ C14:1) ανεξάρτητα που το φάσμα μαζών είναι με πρόδρομο ιόν με m/z 218 και όχι 184. Επίσης μελετήθηκαν και τα φάσματα μαζών της φωσφατιδυλοχολίνης των μυών (PC M) και ανιχνεύθηκαν δυο ψευδο-μοριακά ιόντα, το πρώτο με m/z 771.4 και RT 4.8 min (Σχήμα 9.2.3) και το δεύτερο με m/z 807 και RT 4.8 min (Σχήμα 9.2.4) . Τα ιόντα αυτά ταυτοποιούνται ως αρσενολιπίδια με δομή γλυκεροφωσφολιπιδίου που αντί για χολίνη είναι προσδεμένο με DMA, επειδή στα φάσματα μαζών προϊόντων τους εμφανίζεται το χαρακτηριστικό ιόν με m/z 218. Οι μοριακές δομές του ψευδο-μοριακού ιόντος με m/z 771.4 πιθανόν είναι C16:0/ C16:0 και με m/z 807 πιθανόν είναι C20:2/ C15:1. Στα

φάσματα μαζών της PC M, τα είδη αρσενολιδίου και φωσφολιπιδίου εμφανίζονται μαζί για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στο φάσμα μαζών θετικού ιόντος του δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης των μυών (PC M) με πρόδρομο ιόν m/z 218 ανιχνεύθηκαν τα εξής μοριακά ιόντα: m/z 750, 766, 806 και 848 (Σχήμα 9.2.5).

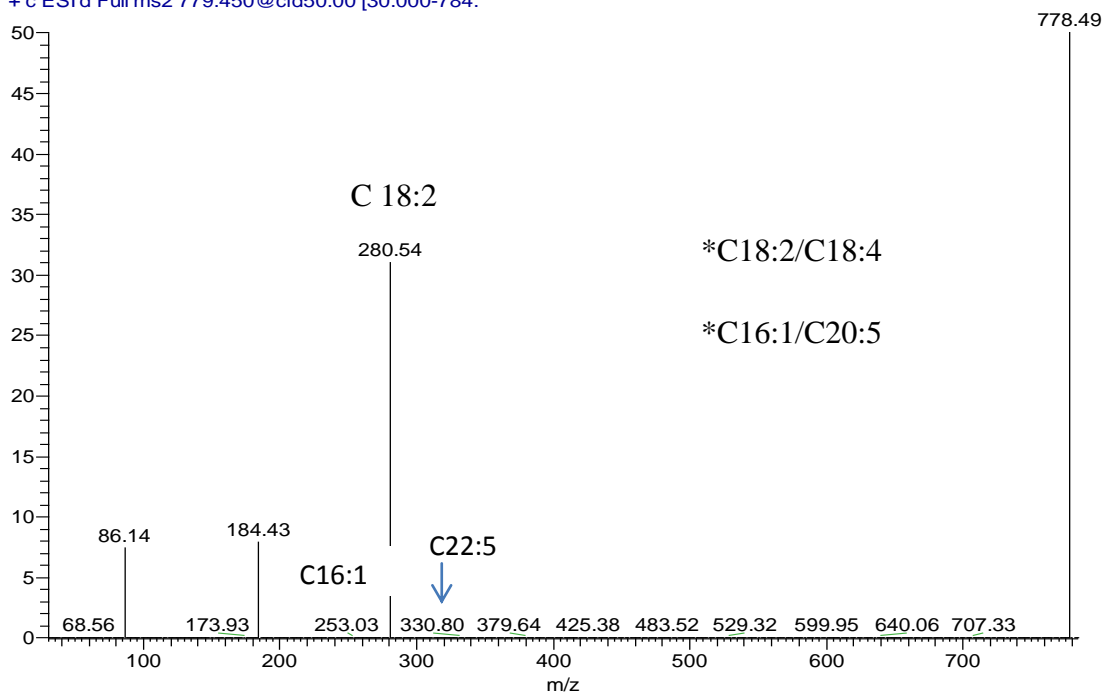


Σχήμα 9.2.1. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων (ESI +), πρόδρομου ιόντος σε m/z 218.

PC_K_218 #228 RT: 2.24 AV: 1 NL: 2.38E3
T: + c ESI Full pr 218.000@35.00 [700.000-900.000]

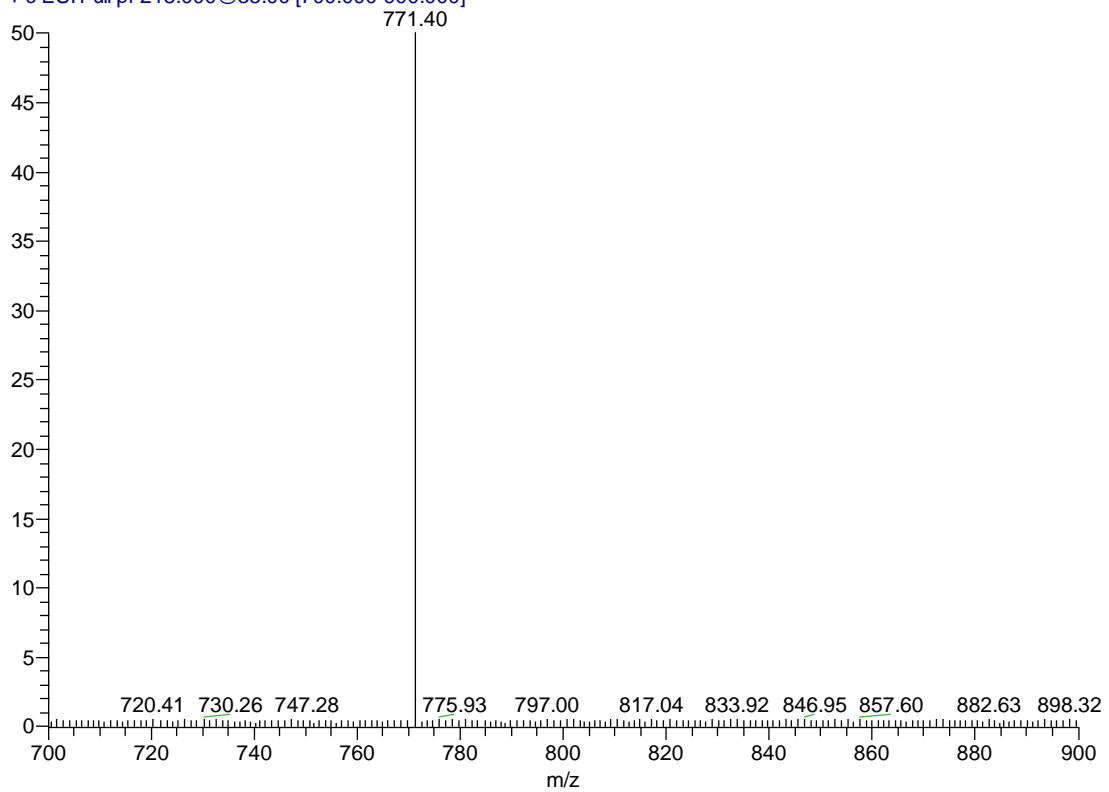


PC_K_218 #229 RT: 2.26 AV: 1 NL: 4.05E4
T: + c ESI d Full ms2 779.450@cid50.00 [30.000-784.

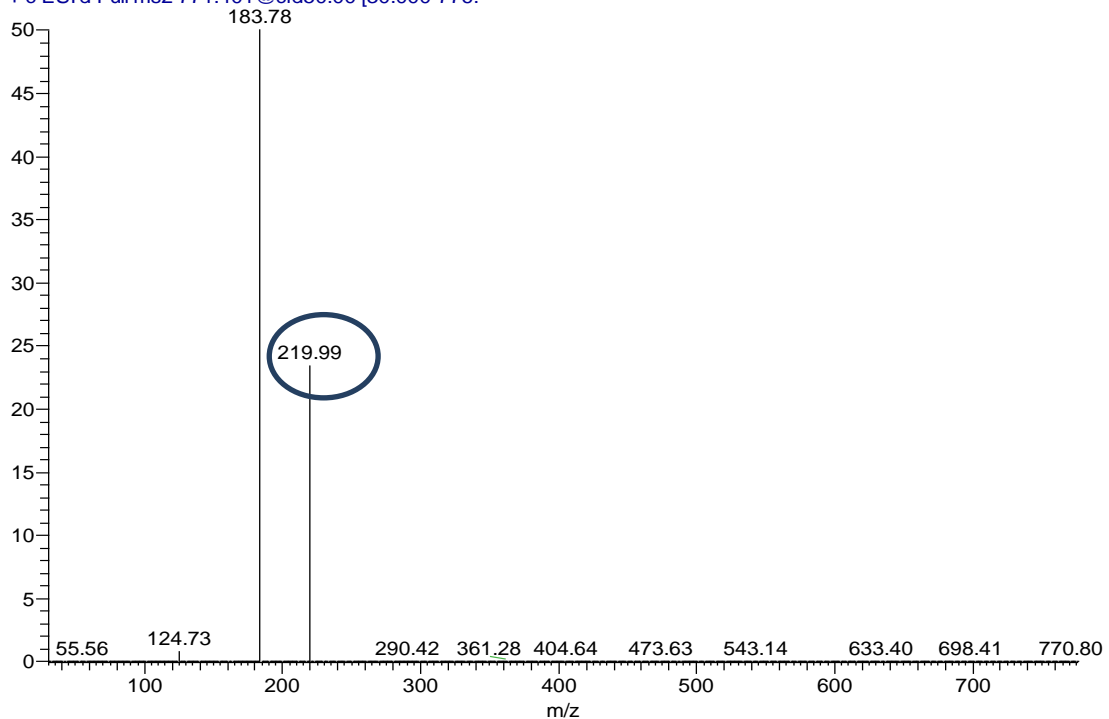


Σχήμα 9.2.2. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλογολίνης των κεφαλοθωράκων (ESI +), πρόδρομου ιόντος σε m/z 218.

PC_M_218 #492 RT: 4.82 AV: 1 NL: 1.32E3
T: + c ESI Full pr 218.000@35.00 [700.000-900.000]

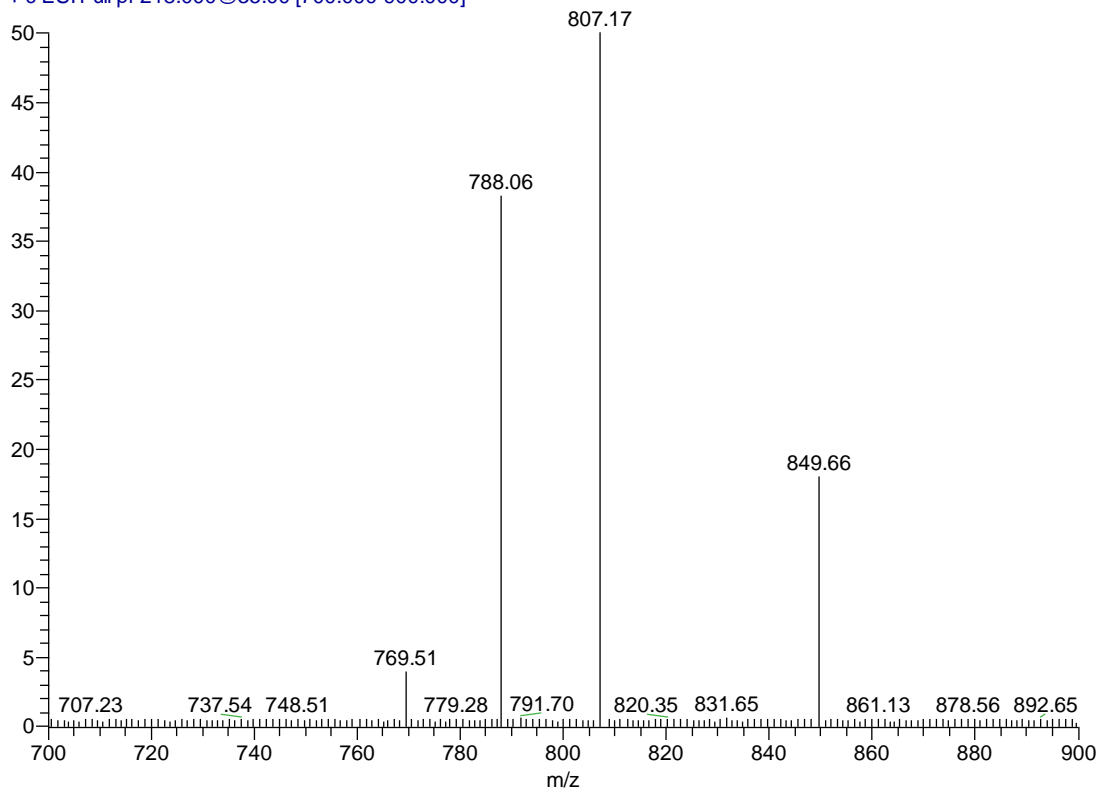


PC_M_218 #493 RT: 4.84 AV: 1 NL: 2.15E5
T: + c ESI d Full ms2 771.401@cid50.00 [30.000-776.

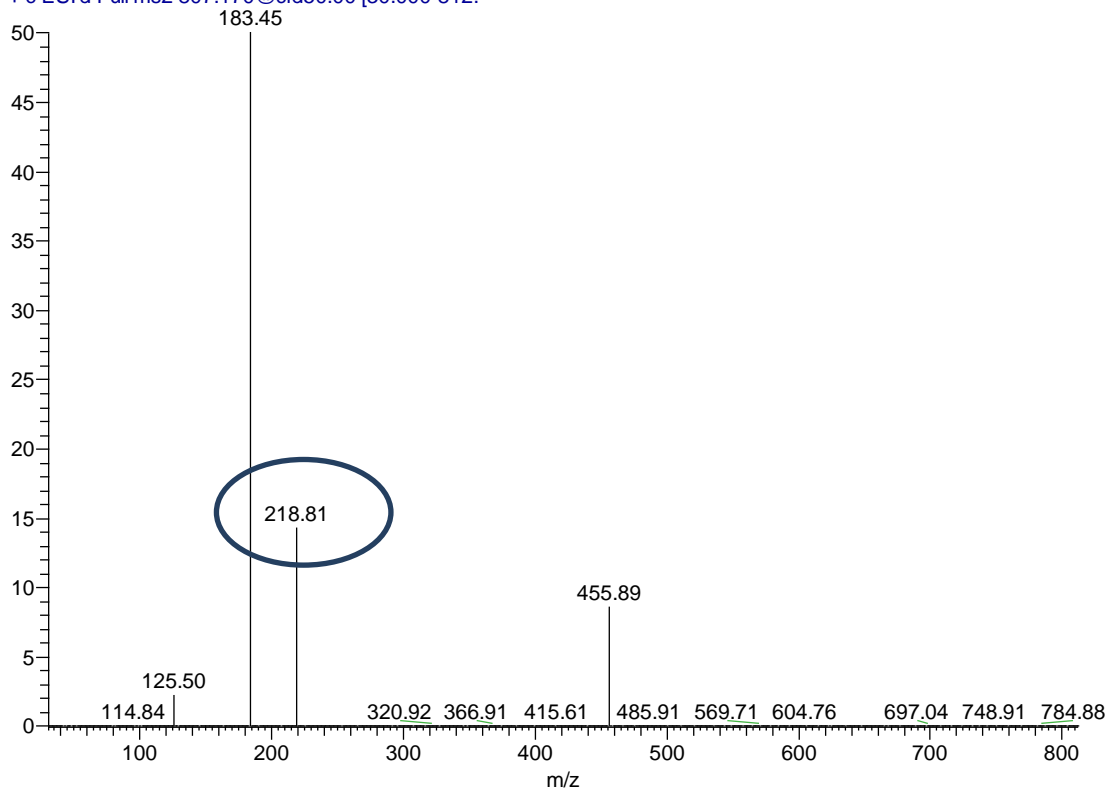


Σχήμα 9.2.3. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλογολίνης των μυών (ESI +), πρόδρομου ιόντος m/z 218.

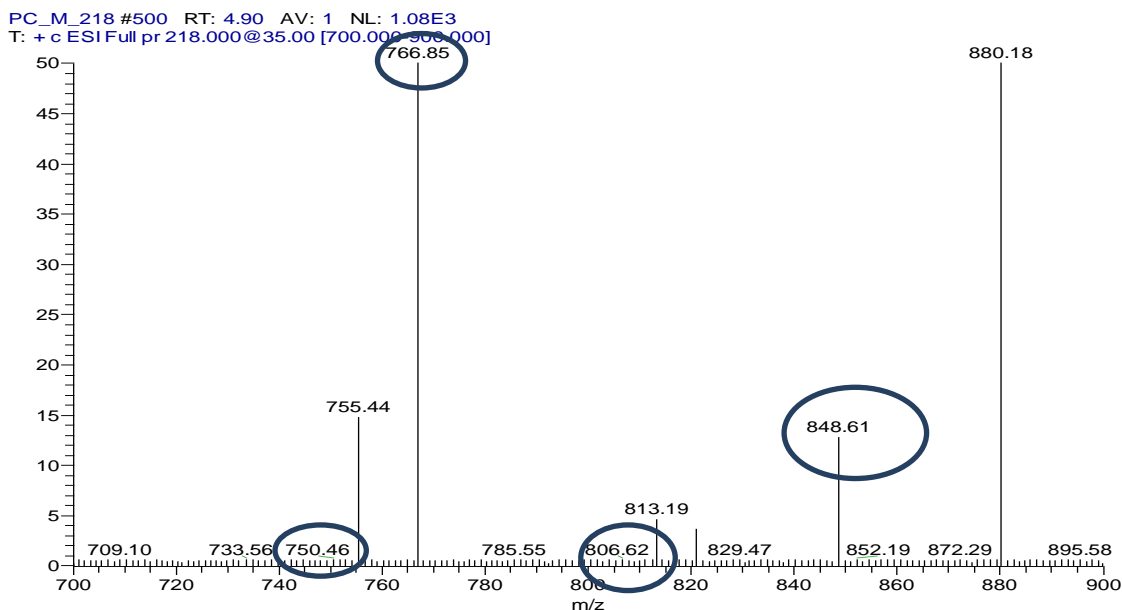
PC_M_218 #490 RT: 4.79 AV: 1 NL: 1.18E3
T: + c ESI Full pr 218.000@35.00 [700.000-900.000]



PC_M_218 #491 RT: 4.81 AV: 1 NL: 2.38E5
T: + c ESI d Full ms2 807.170@cid50.00 [30.000-812.]



Σχήμα 9.2.4. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των μυών, πρόδρομου ιόντος m/z 218.

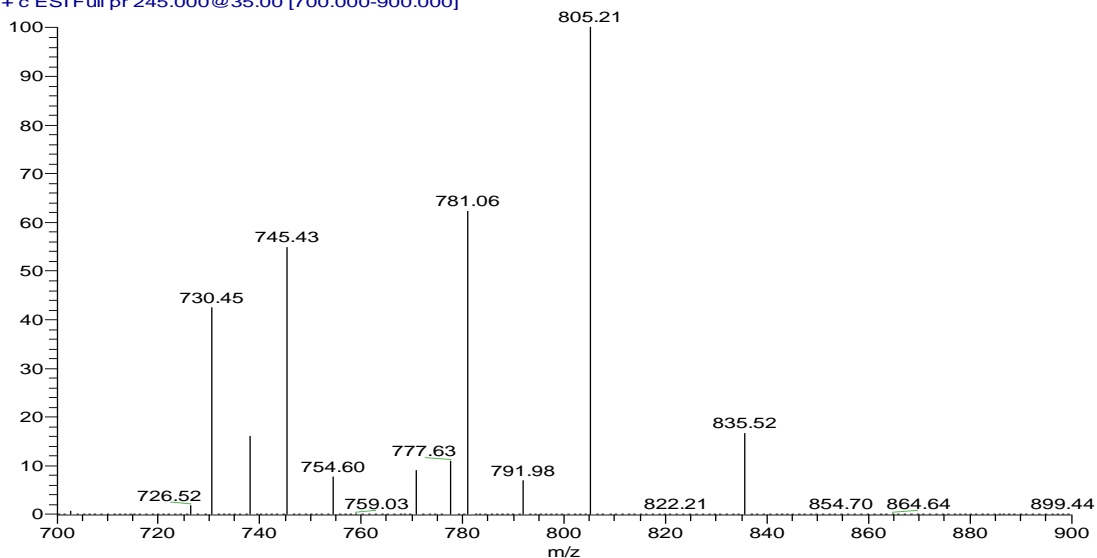


Σχήμα 9.2.5. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των μυών, πρόδρομου ιόντος m/z 218.

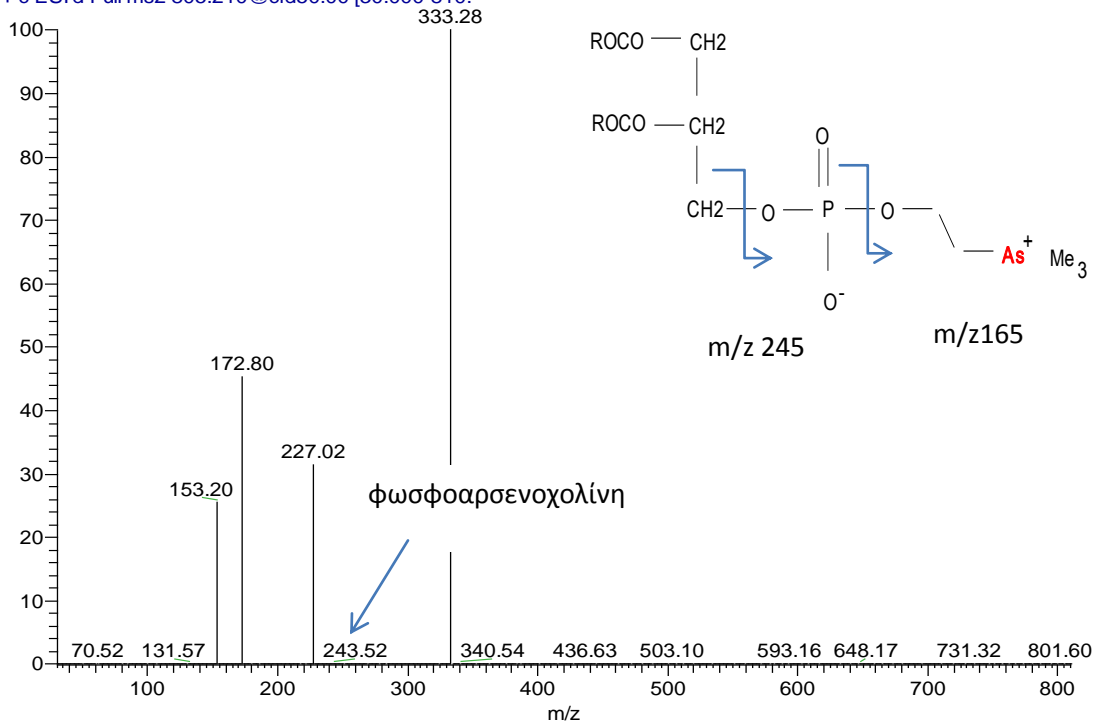
9.3. Μελέτη μοριακών δομών της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus* με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 245.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα πειράματα με LC-ESI-MS/MS (SRM) για την ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού μετά από μερική όξινη υδρόλυση φωσφολιπιδίων (Παράγραφο 8.1.2, στα Αποτελέσματα και Συζήτηση) στο κλάσμα της PC των ταυτοποιήθηκαν ενώσεις της αρσενοχολίνης. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας τους στο κλάσμα αυτό, μελετήσαμε τις μοριακές δομές των αρσενολιπιδίων με πρόδρομο ιόν με m/z 245 το οποίο προκύπτει από την αντικατάσταση του αζώτου στην ομάδα της χολίνης $[-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3]$ με το αρσενικό $[CH_2CH_2As^+(CH_3)_3]$. Τα μοριακά θραύσματα 104,9 $[(CH_3)_2As^+]$, 122,9 $(CH_3)_2AsOH_2^+$ και m/z 165 επιβεβαιώνουν την παρουσία αρσενολιπιδίου [101]. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η ένωση αυτή έχει βρεθεί σε θαλάσσιους οργανισμούς [37, 100] συγκεκριμένα στο αστακό και στη γαρίδα [102]. Στα φάσματα μαζών προϊόντων ιόντων της PC K (Σχήμα 9.2.1) τα ψευδο-μοριακά ιόντα με m/z 805.2 με RT 1.78 min, 852 με RT 3.8 min και 736 με RT 5.4 min ταυτοποιούνται ως αρσενολιπίδια με δομή γλυκεροφωσφολιπιδίου που το N έχει αντικατασταθεί με As (Σχήματα 9.3.1, 9.3.2 και 9.3.3).

PC_K_245 #193 RT: 1.78 AV: 1 NL: 2.54E4
 T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]

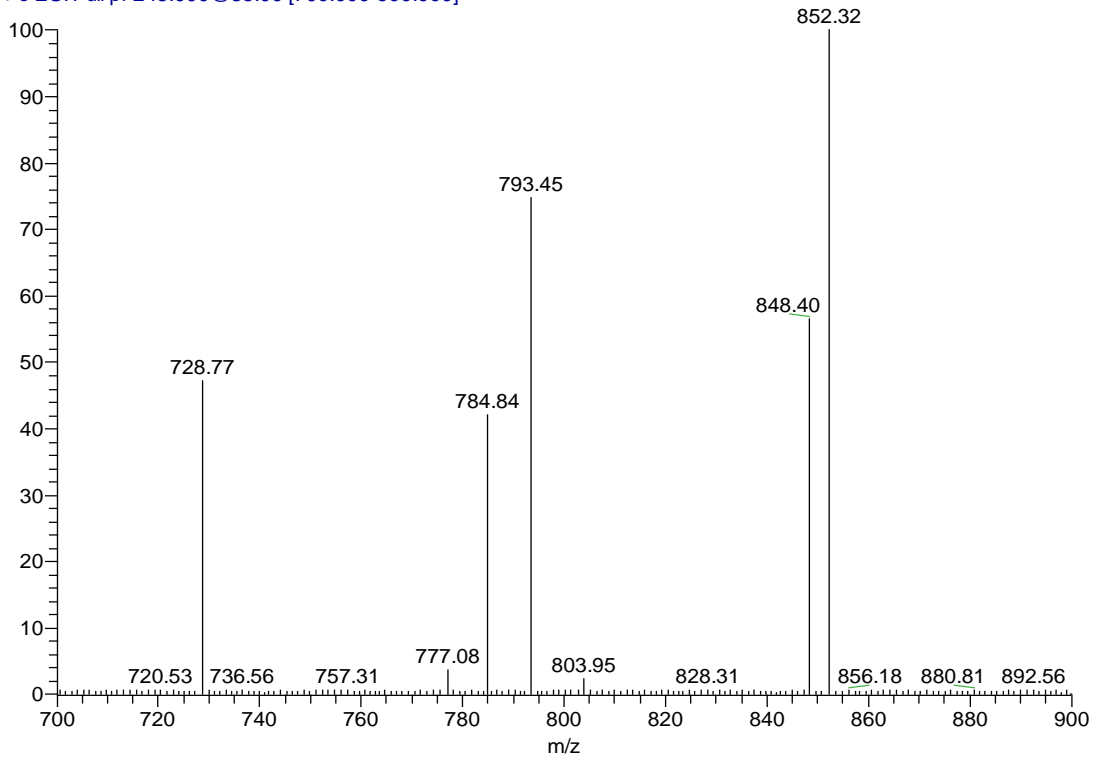


PC_K_245 #194 RT: 1.80 AV: 1 NL: 3.32E4
 T: + c ESI d Full ms2 805.210@cid50.00 [30.000-810.000]

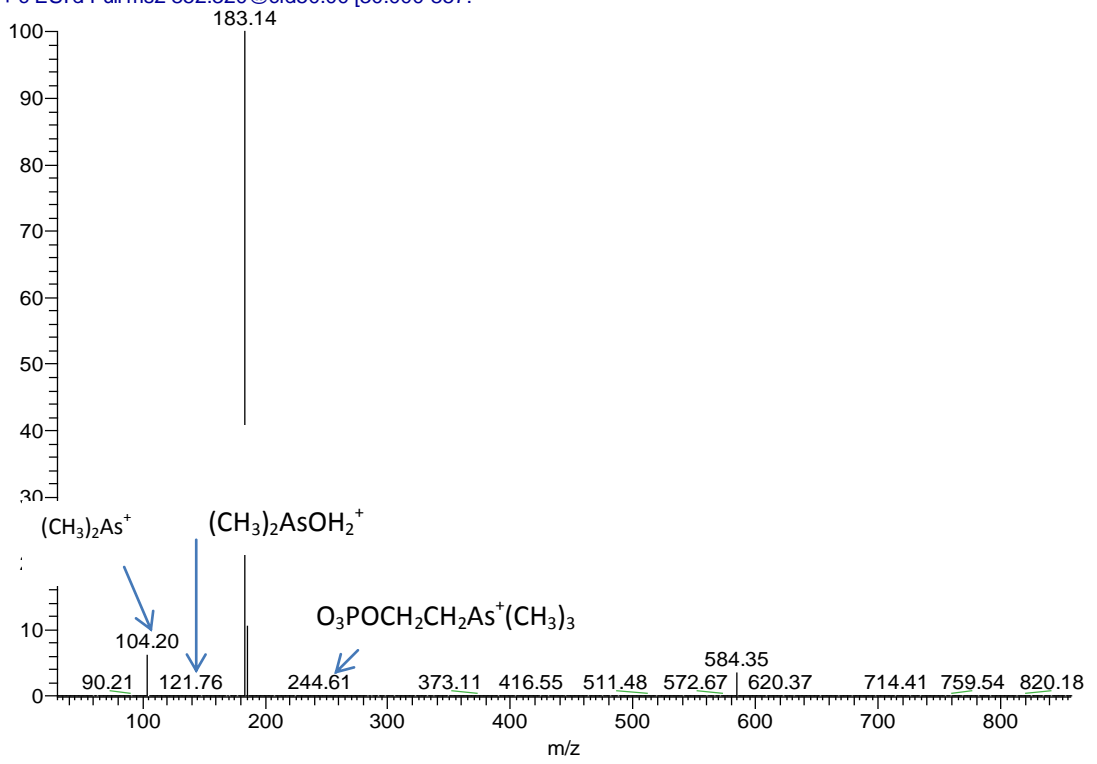


Σχήμα 9.3.1 Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων (ESI +), πρόδρομου ιόντος m/z 245.

PC_K_245 #354 RT: 3.76 AV: 1 NL: 1.08E3
 T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]

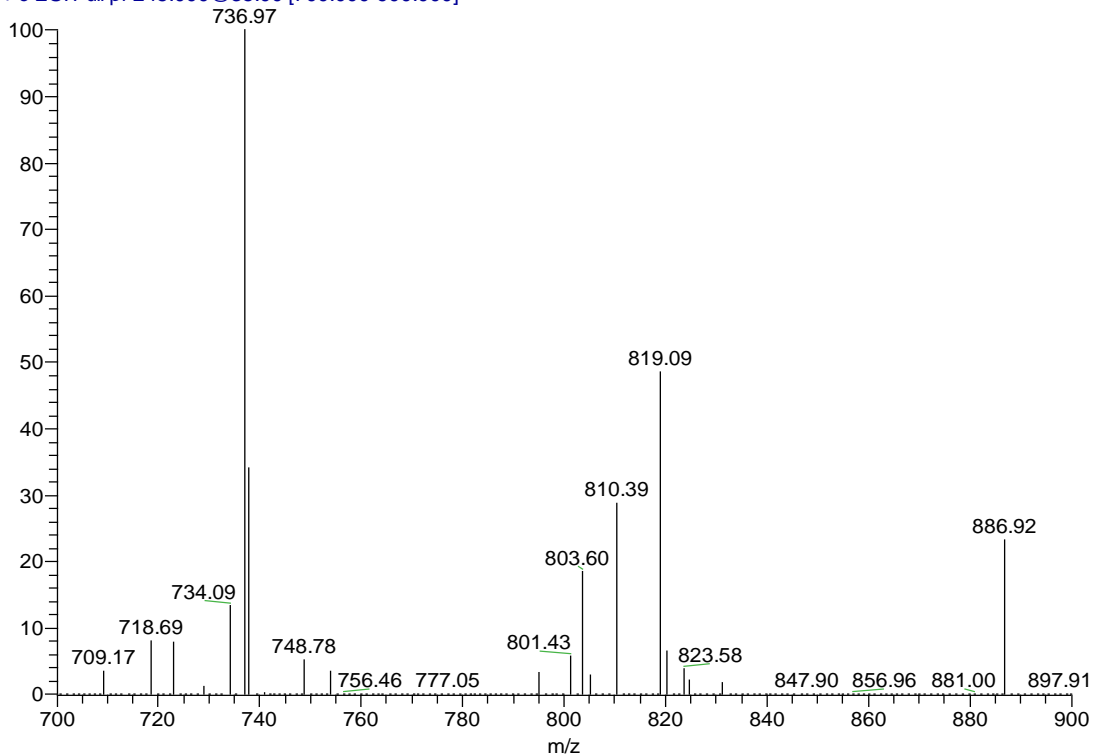


PC_K_245 #355 RT: 3.78 AV: 1 NL: 1.06E5
 T: + c ESI d Full ms2 852.320@cid50.00 [30.000-857.000]

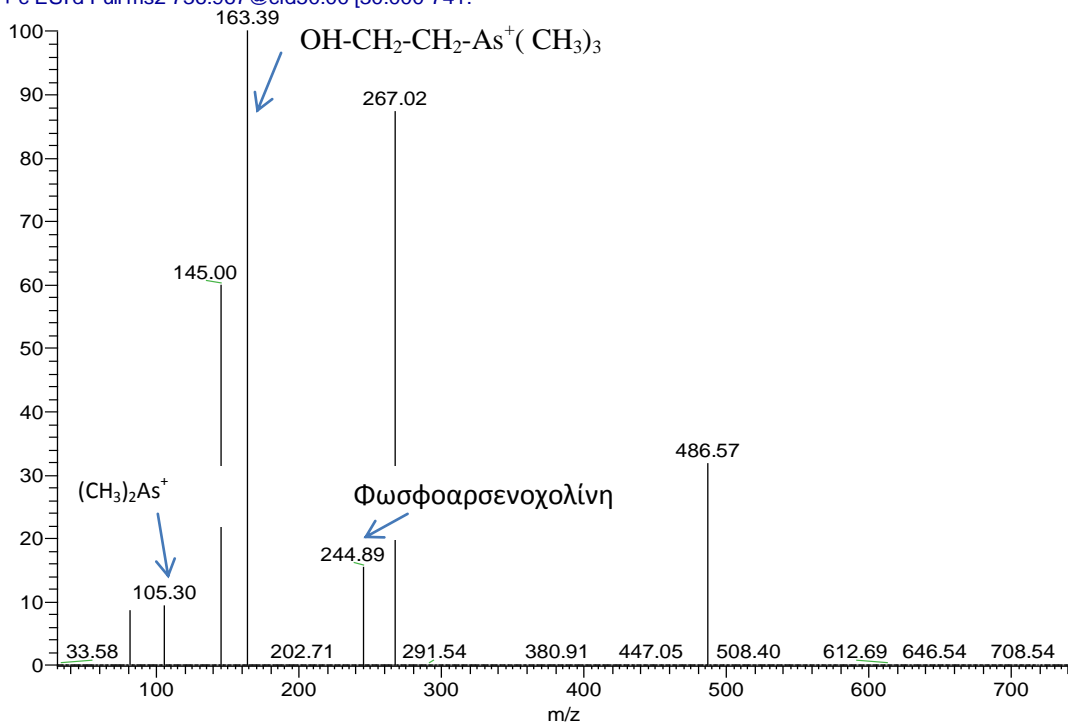


Σχήμα 9.3.2. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων (ESI +), πρόδρομου ιόντος m/z 245.

PC_K_245 #500 RT: 5.37 AV: 1 NL: 5.63E4
 T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]



PC_K_245 #501 RT: 5.39 AV: 1 NL: 4.90E4
 T: + c ESI d Full ms2 736.967@cid50.00 [30.000-741.

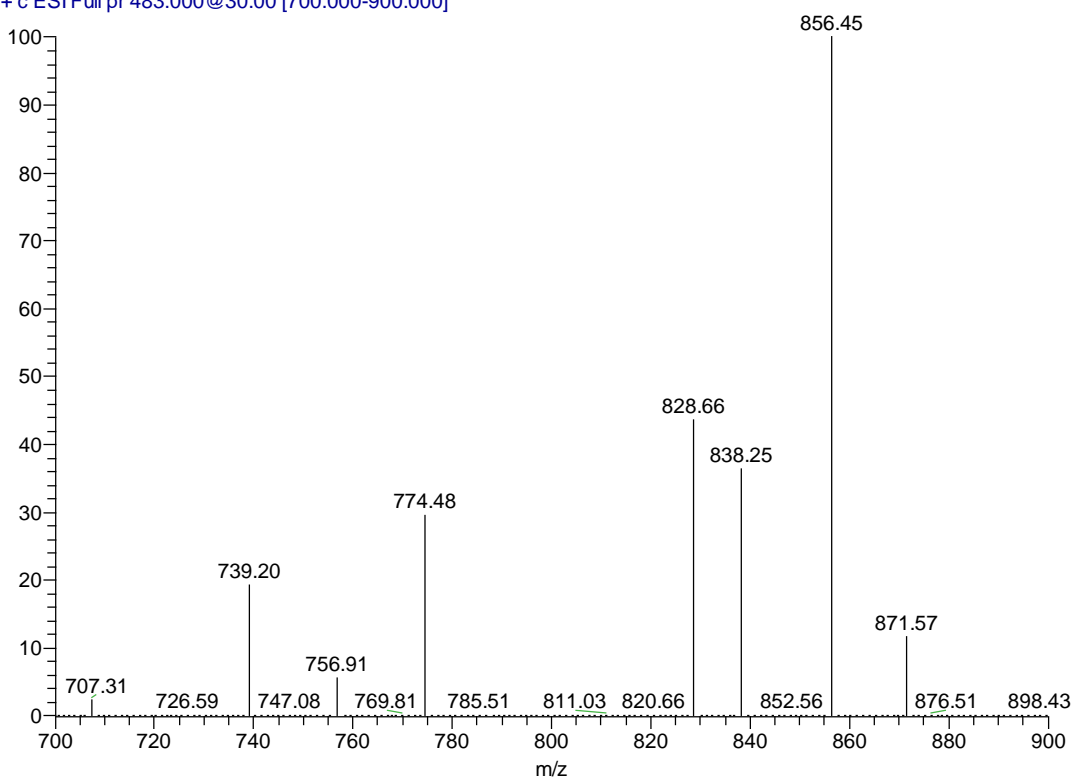


Σχήμα 9.3.3. Φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων (ESI +), πρόδρομο ιόντος m/z 245.

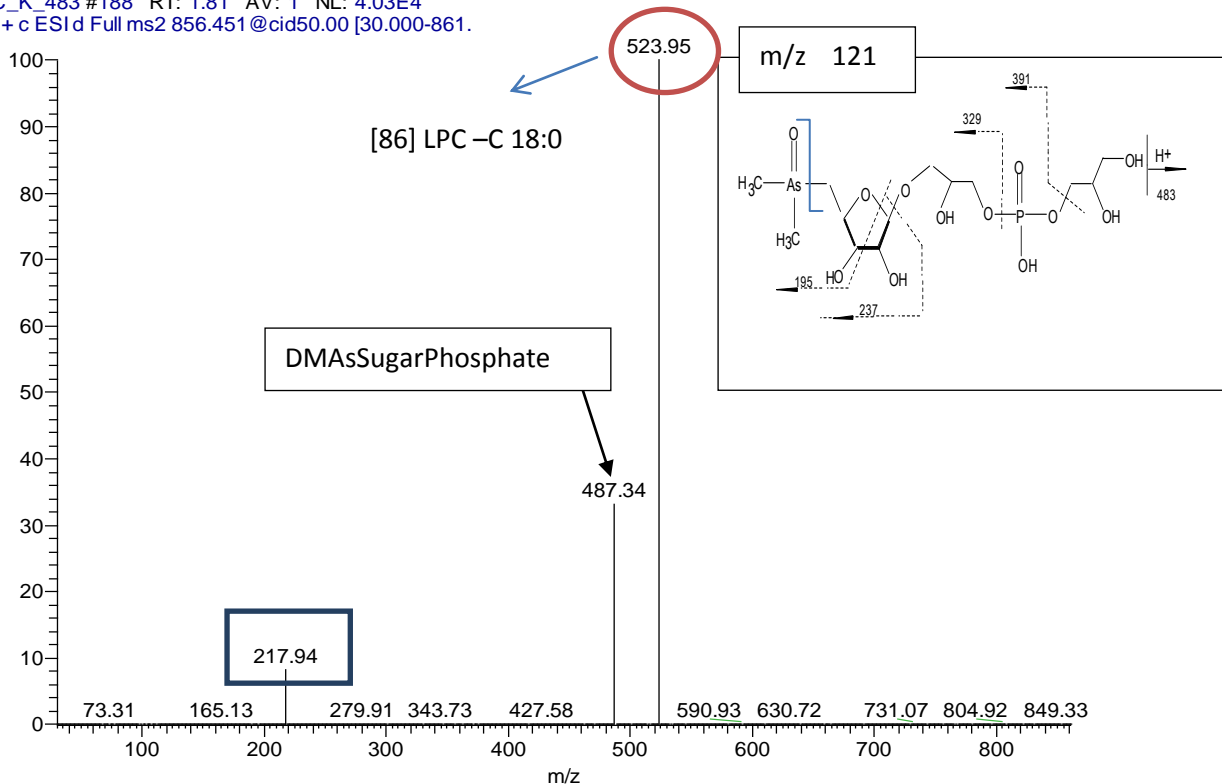
9.4. Μελέτη μοριακών δομών των αρσενοσακχάρων στο κλάσμα της φωσφατιδυλογολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus* με LC-ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 483.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα πειράματα με LC-ESI-MS/MS (SRM) για την ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση φωσφολιπιδίων (Παράγραφο 8.1.1, στα Αποτελέσματα και Συζήτηση) στο κλάσμα της PC K, ταυτοποιήθηκε DMAAsSugarPhosphate. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας της ένωσης του αρσενικού στο κλάσμα αυτό, μελετήσαμε τις μοριακές δομές των αρσενολιπιδίων με πρόδρομο ιόν με m/z 483, δηλαδή διμεθυλοαρσενούλοριβοσίδιο προσδεμένο με φωσφατιδυλογλυκερόλη. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [29] η ένωση αυτή καθώς και παράγωγα της διμεθυλ-αρσενούλοριβοζης ανιχνεύθηκαν σε ψάρια, μαλάκια και ασπόνδυλα. Τα χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα του μοριακού ιόντος με m/z 483 είναι τα θραύσματα με m/z 75, 121, 195, 237, 329, 391 και 483 [29]. Στα φάσματα μαζών προϊόντων ιόντων της PC K τα ψευδο-μοριακά ιόντα με m/z 856 με RT 1.8 min, m/z 765 με RT 3.2 min, m/z 740 με RT 3.2 min και m/z 788 με RT 3.4 min ταυτοποιούνται ως αρσενολιπίδια με δομή DMAAsSugarPhosphate (Σχήματα 9.4.1, 9.4.2, 9.4.3 και 9.4.4.).

PC_K_483 #187 RT: 1.79 AV: 1 NL: 1.89E4
T: + c ESI Full pr 483.000@30.00 [700.000-900.000]

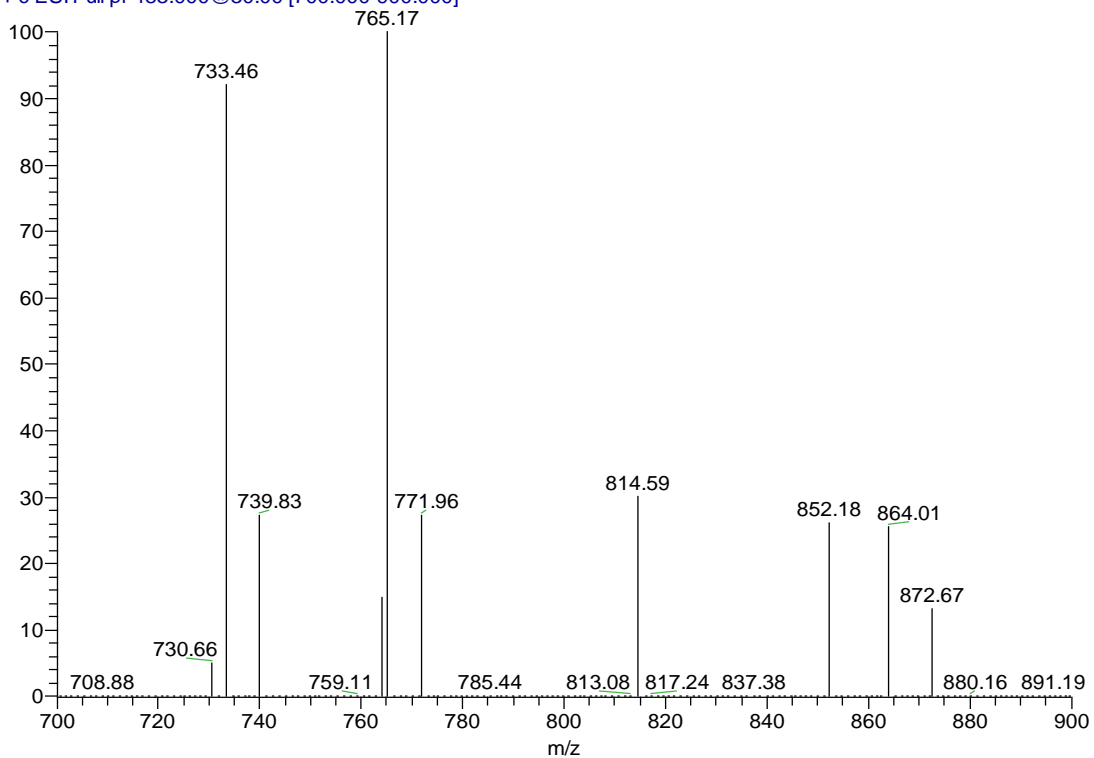


PC_K_483 #188 RT: 1.81 AV: 1 NL: 4.03E4
 T: + c ESI d Full ms2 856.451 @cid50.00 [30.000-861.

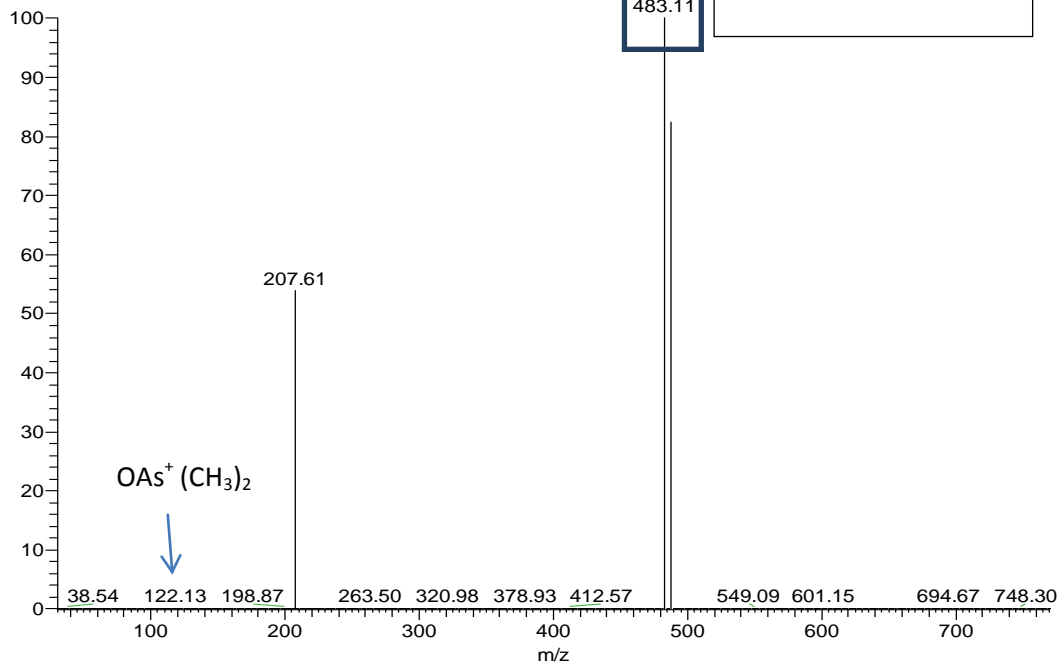


Σχήμα 9.4.1 Φάσμα μαζών με (ESI+) προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθώρακων, πρόδρομου ιόντος m/z 483.

PC_K_483 #295 RT: 3.24 AV: 1 NL: 3.33E4
 T: + c ESI Full pr 483.000 @30.00 [700.000-900.000]

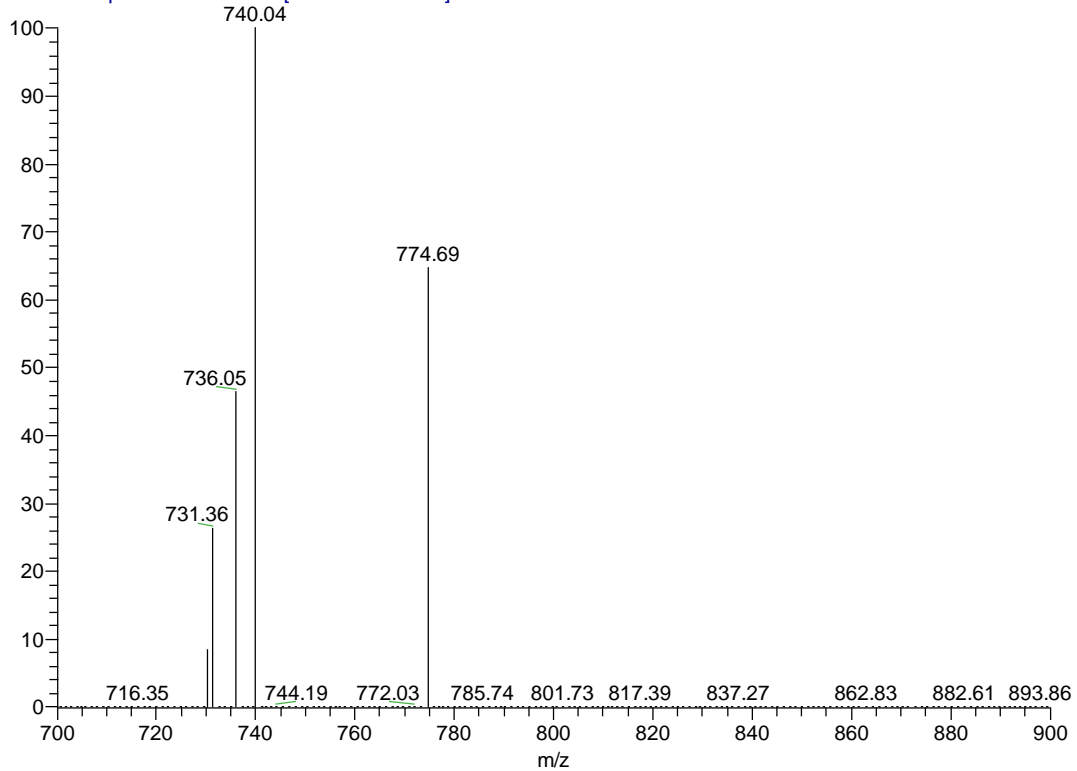


PC_K_483 #296 RT: 3.25 AV: 1 NL: 9.55E3
T: + c ESI d Full ms2 765.170@cid50.00 [30.000-770.

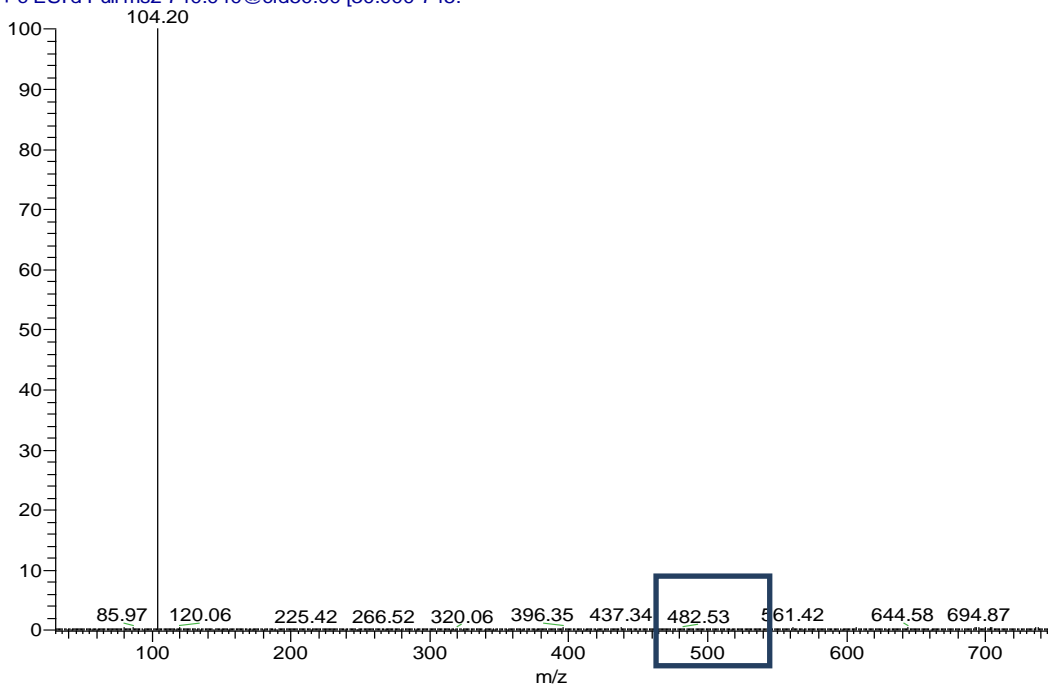


Σχήμα 9.4.2. Φάσμα μαζών με (ESI⁺) προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων, πρόδρομου ιόντος m/z 483.

PC_K_483 #301 RT: 3.32 AV: 1 NL: 7.28E3
T: + c ESI Full pr 483.000@30.00 [700.000-900.000]

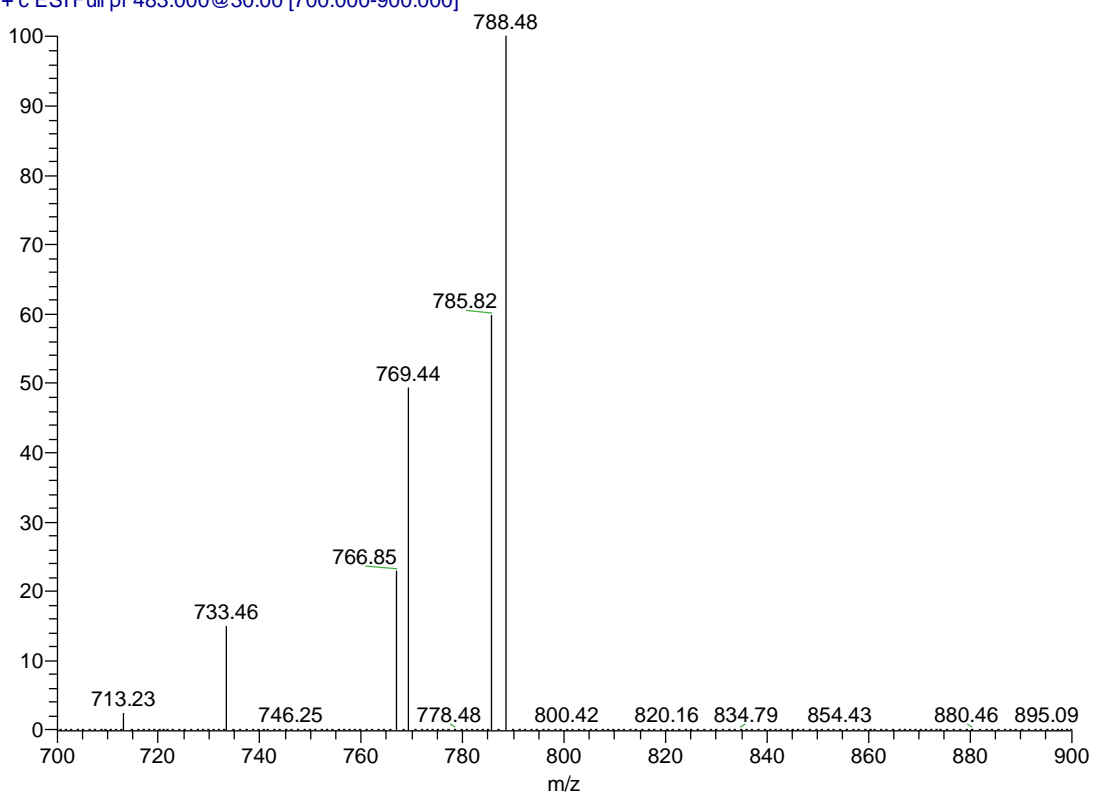


PC_K_483 #302 RT: 3.34 AV: 1 NL: 2.02E3
T: + c ESI d Full ms2 740.040@cid50.00 [30.000-745.

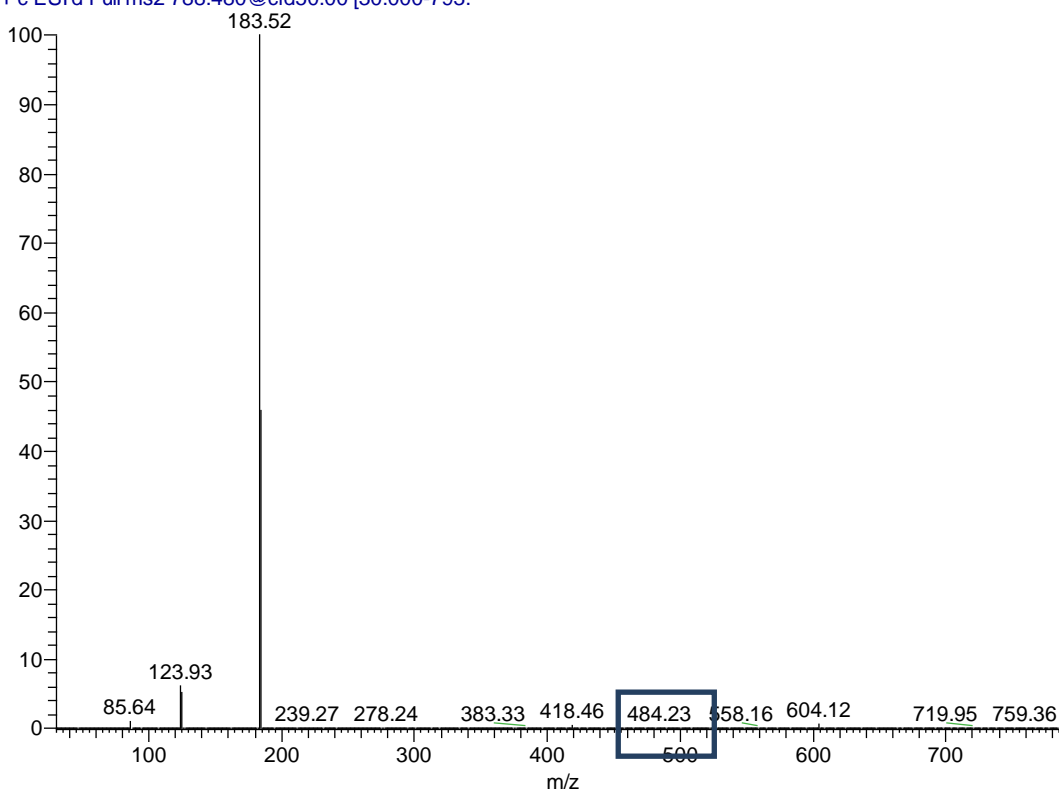


Σχήμα 9.4.3. Φάσμα μαζών με (ESI+) προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλογλίνης των κεφαλοθωράκων, πρόδρομου ιόντος m/z 483.

PC_K_483 #309 RT: 3.43 AV: 1 NL: 1.71E4
T: + c ESI Full pr 483.000@30.00 [700.000-900.000]



PC_K_483 #310 RT: 3.45 AV: 1 NL: 2.05E6
T: + c ESI d Full ms2 788.480@cid50.00 [30.000-793.



Σχήμα 9.4.4 Φάσμα μαζών με (ESI+) προϊόντων ιόντων της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων, πρόδρομου ιόντος m/z 483.

9.5 Μελέτη μοριακών δομών της σφιγγομυελίνης των μυών της γαρίδας *P. kerathurus* με LC- ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης πρόδρομου ιόντος σε m/z 245.

Τα φωσφοσφιγγολιπίδια που περιέχουν στο μόριο τους αμινοαλκοόλες μακριάς αλυσίδας (ομάδες σφιγγοσίνης) ακυλιώνται στην αμινομάδα σχηματίζοντας αμίδια τα οποία είναι γνωστά ως κηραμίδια. Στα φάσματα μαζών θετικού ιόντος του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών με πρόδρομο ιόν σε m/z 245 βρέθηκαν περίπου 22 μοριακές δομές με m/z 705, 707, 749, 725, 819, (Πίνακα 9.5.1). Επίσης στα φάσματα μαζών προϊόντων ιόντων του δείγματος της σφιγγομυελίνης έδωσαν την χαρακτηριστική κορυφή σε m/z 86 και 124 (Σχήματα 9.5.4 και 9.5.7).

Πίνακας 9.5.1 Ταυτοποίηση μοριακών δομών της σφιγγομυελίνης στους μύες της γαρίδας με LC-ESI-MS/MS προδρόμου ιόντος m/z 245.

M W	m/z (M+H⁺)	Μοριακές δομές
704	705	*C15:0/dC16:1
706	707	C 31:0 C15:0/dC16:0
712	713	C14:1/dC18:3
714	715	C32:3 C14:0/dC18:3
726	727	C33 :4 C15:1/dC18:3
	AsC, As->N	
722	723	C16:0/C16:0
724	725	C 18:3
726	727	C18:2
730	731	C 33:2 dC18:1/C15:1 or C16:0
734	735	C 33:0 dC18:0/C15:0
740	741	dC18:2/C16:1
744	745	dC18:2/C16:0
748	749	C 34:1 dC18:1/C16:0
760	761	C 35:0 C17:0/dC18:0
802	803	C38:1
807	807	C18:0/20:0
810	811	C20:0/C20:4
812	813	C20:0/C20:3
818	819	C 39:0 C18:0/C21:0
820	821	C20:2/C20:5
822	823	C18:0/C16:1

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα μαζών προδρόμου και προϊόντων ιόντων που αντιστοιχούν σε μοριακές δομές του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών (Σχήματα 9.5.1 έως 9.5.8).

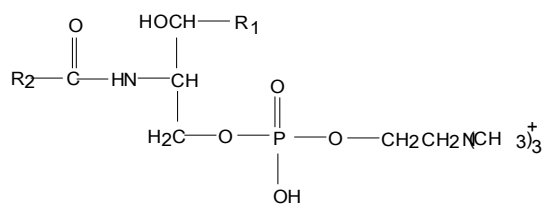
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα πειράματα με LC-ESI-MS/MS (SRM) για την ταυτοποίηση ενώσεων του αρσενικού μετά από μερική όξινη υδρόλυση στο κλάσμα της σφιγγομυελίνης των μυών (Παράγραφος 8.4.2, στα Αποτελέσματα και Συζήτηση) ταυτοποιήθηκαν ενώσεις της αρσενοχολίνης. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας τους στο κλάσμα αυτό, μελετήθηκαν οι μοριακές δομές των αρσενολιπιδίων με πρόδρομο ιόν με m/z 245 το οποίο προκύπτει από την αντικατάσταση του αζώτου στην ομάδα της χολίνης $[-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3]$ με αρσενικό $[CH_2CH_2As^+(CH_3)_3]$. Τα μοριακά θραύσματα και m/z 165 $[OCH_2CH_2N(CH_3)_3]$ m/z 245 επιβεβαιώνουν την παρουσία αρσενολιπιδίου [101]. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η ένωση αυτή έχει βρεθεί σε θαλάσσιους οργανισμούς [37, 100] συγκεκριμένα στο αστακό και στη γαρίδα [102]. Στο φάσμα μαζών προϊόντων ιόντων της Sph M (Σχήμα 9.5.9) το ψευδο-μοριακό ιόν με m/z 727.8 σε RT 47 min ταυτοποιείται ως αρσενολιπίδιο όπου το N έχει αντικατασταθεί με As.

Από τις μελέτες που έχουν γίνει στα σφιγγοφωσφολιπίδια [88] με LC-ESI-MS/MS θετικού ιόντος ταυτοποιήθηκαν οι εξής μοριακές δομές:

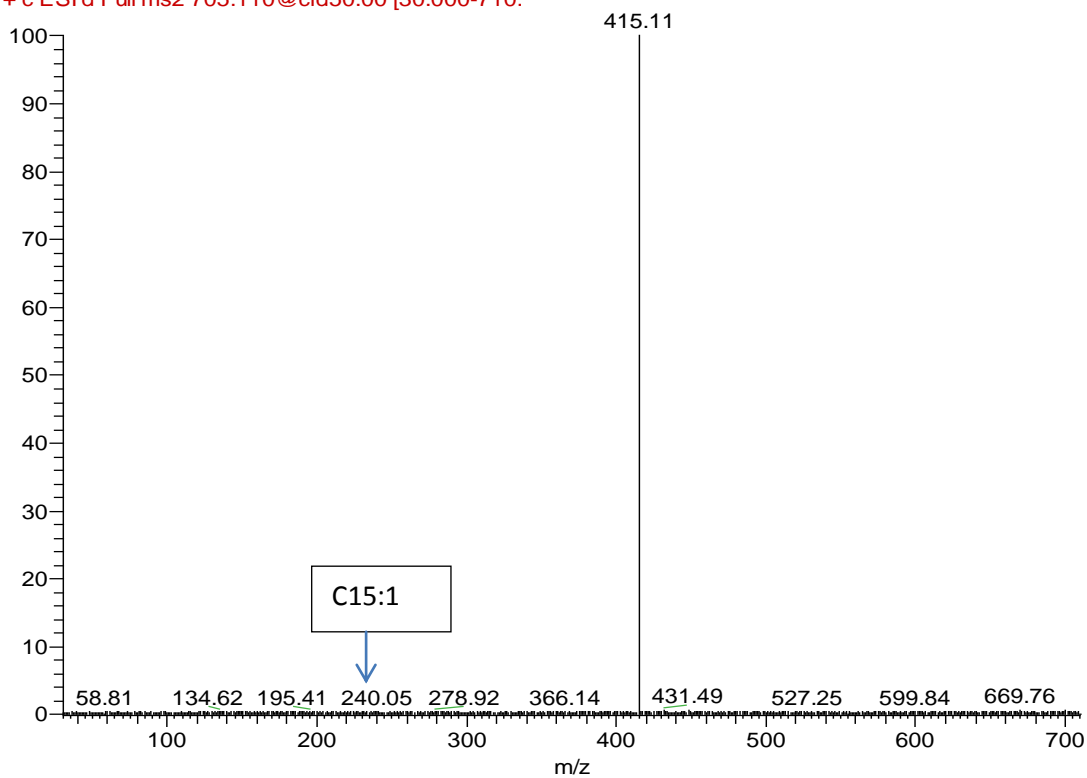
$[M+H^+]$ με m/z 703 με C 16 :0, m/z 731 με C18:0, m/z 787 με 22:0, m/z 813 με C 24:1

Ενώ σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει στα σφιγγοφωσφολιπίδια με LC-ESI-MS αρνητικού ιόντος ταυτοποιήθηκαν οι εξής μοριακές δομές:

m/z 733,5 με 33:1, m/z 745,7 με 34:2, m/z 747,7 με dC 18:1/C16:0, m/z 775,7 με dC18:1/C18:0, m/z 801,7 με C38:2, m/z 845 με dC18:1/C23:0 [87].

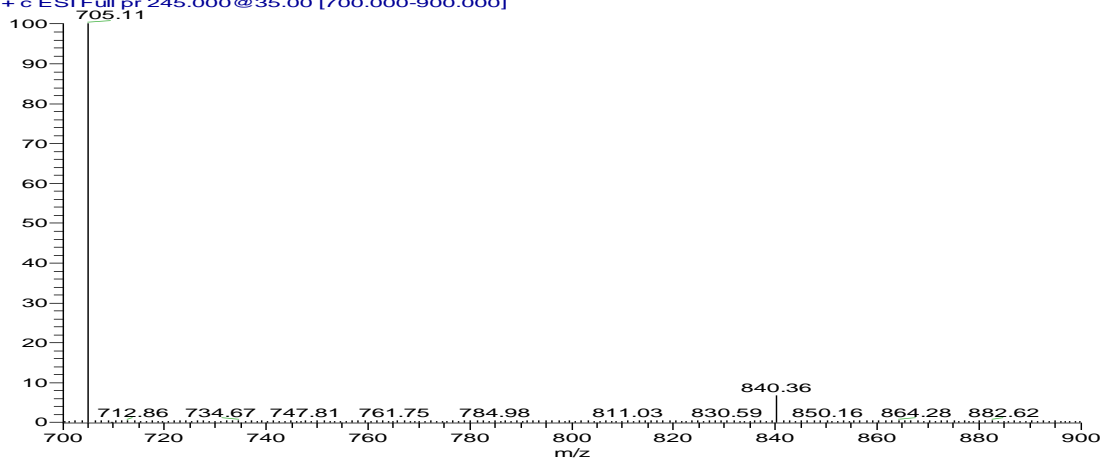


Sph_M_245 #4016 RT: 35.61 AV: 1 NL: 1.36E3
 F: + c ESI d Full ms2 705.110@cid50.00 [30.000-710.



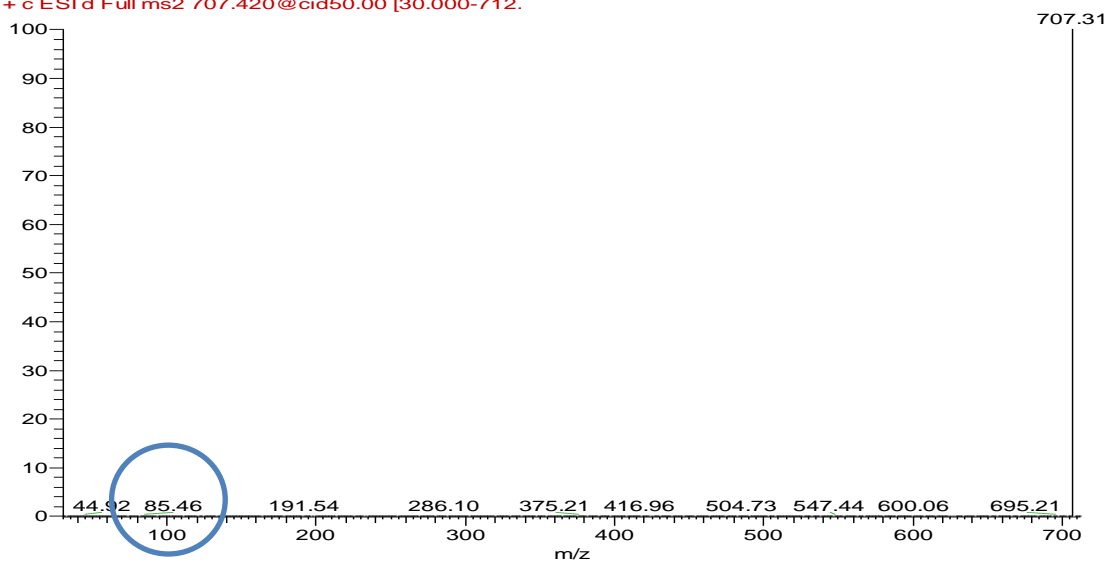
Σχήμα 9.5.1 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

Sph_M_245 #4015 RT: 35.59 AV: 1 NL: 1.56E3
 T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]



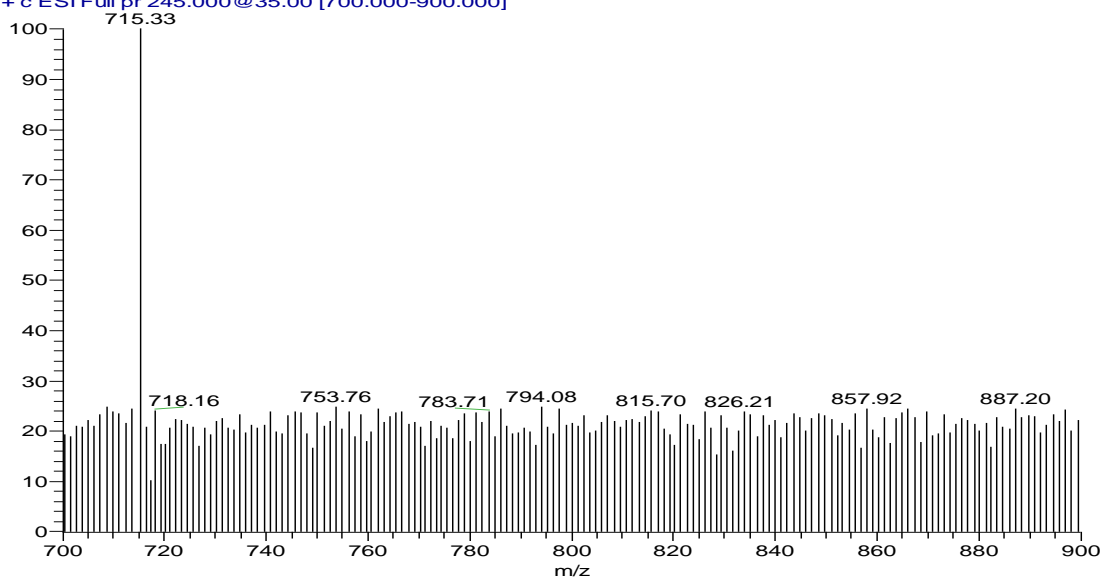
Σχήμα 9.5.2 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

Sph_M_245 #2695 RT: 23.80 AV: 1 NL: 1.49E4
F: + c ESI d Full ms2 707.420@cid50.00 [30.000-712.



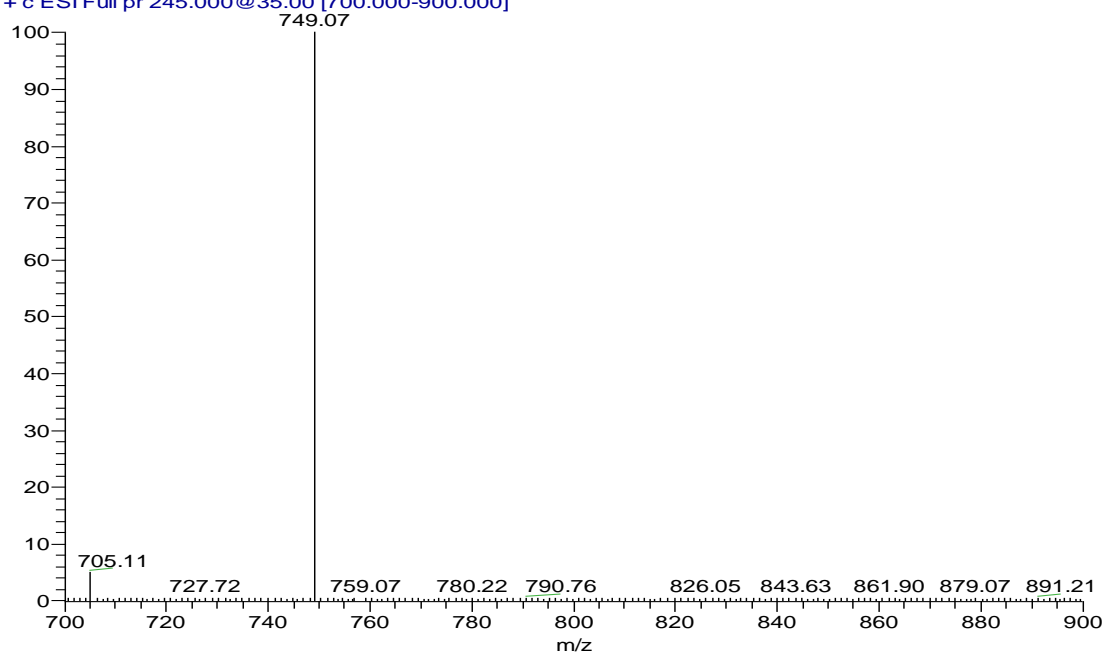
Σχήμα 9.5.4 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

Sph_M_245 #4080 RT: 36.17 AV: 1 NL: 2.69E1
T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]



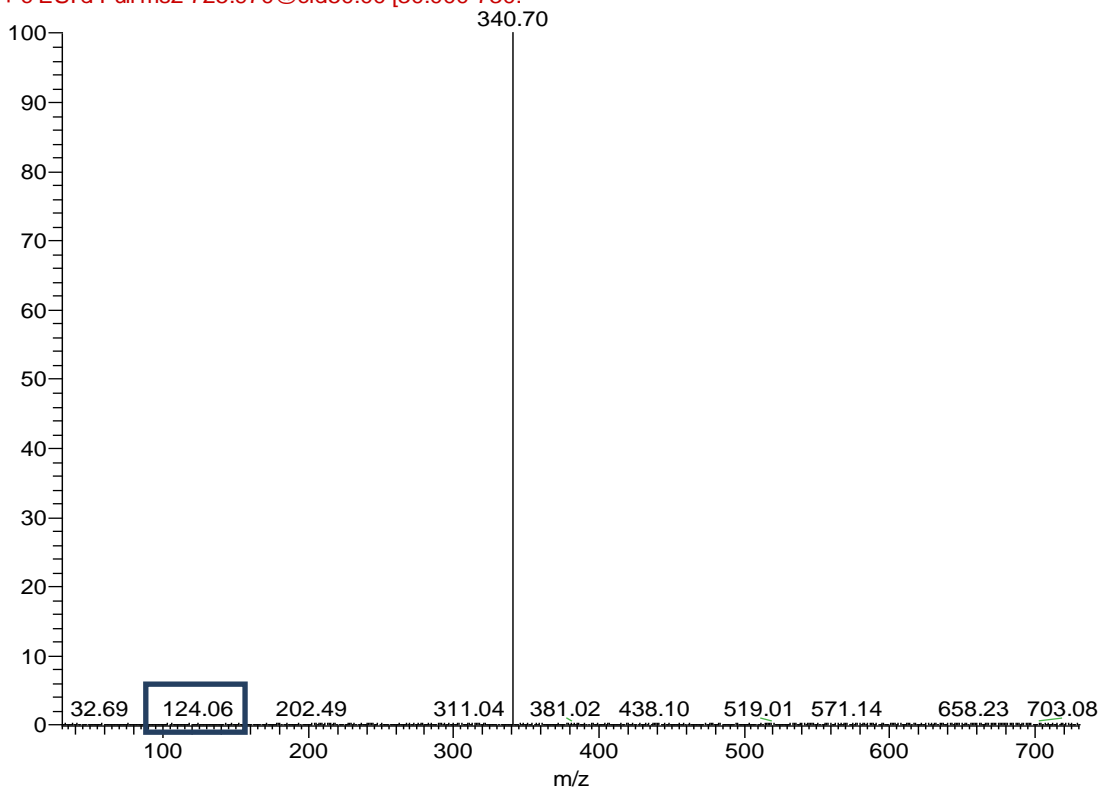
Σχήμα 9.5.5 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

Sph_M_245 #4096 RT: 36.31 AV: 1 NL: 1.36E3
T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]



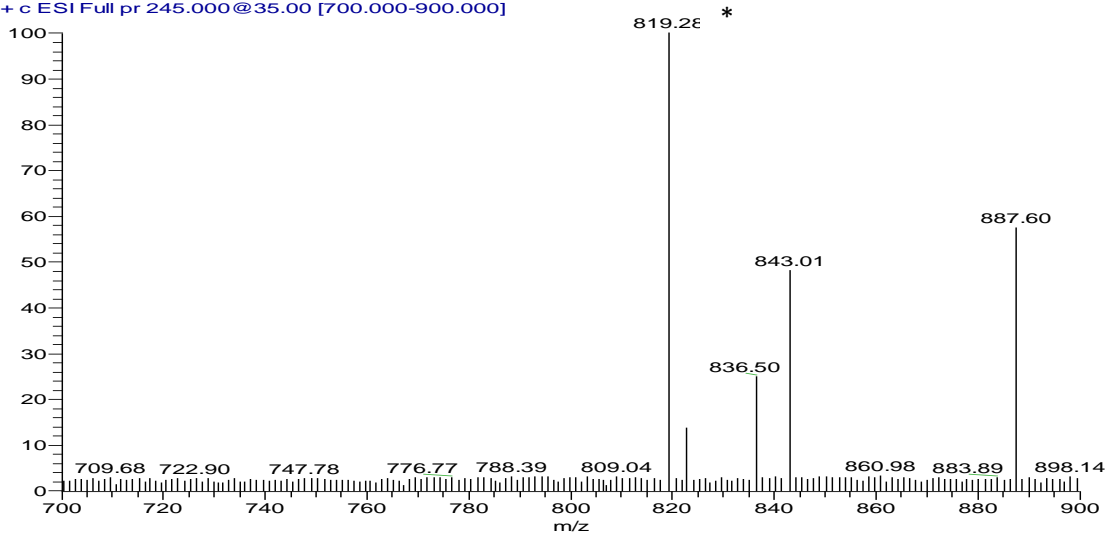
Σχήμα 9.5.6 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

Sph_M_245 #203 RT: 2.01 AV: 1 NL: 2.92E3
F: + c ESI d Full ms2 725.970@cid50.00 [30.000-730.

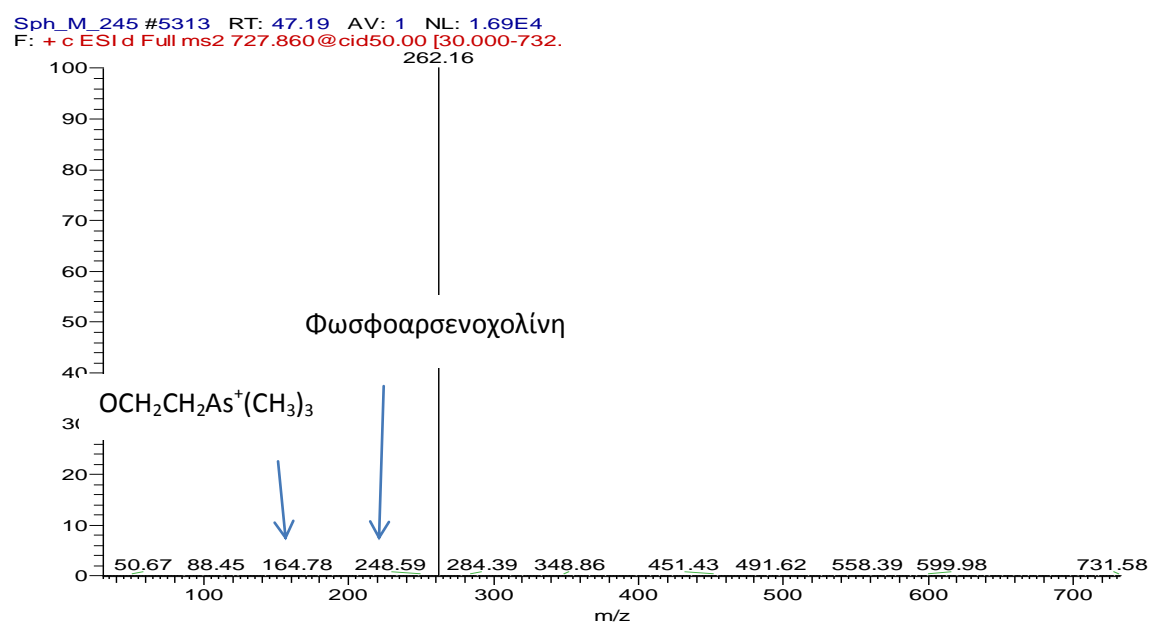


Σχήμα 9.5.7 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

Sph_M_245 #4004 RT: 35.50 AV: 1 NL: 2.28E2
T: + c ESI Full pr 245.000@35.00 [700.000-900.000]



Σχήμα 9.5.8 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.



Σχήμα 9.5.9 Φάσμα μαζών του δείγματος της σφιγγομυελίνης των μυών κατά τον ιοντισμό με ESI (+), με m/z 245.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

10.1 Μελέτη των καροτενοειδών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Τα καροτενοειδή της γαρίδας τα οποία είναι οι κύριες χρωστικές τους, μελετήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με τεχνική HPLC-DAD (Κεφάλαιο 5-Παράγραφος 5.12). Παρακάτω παρατίθενται τα HPLC χρωματογραφήματα καθώς και πίνακας με την ποσοστιαία σύσταση των καροτενοειδών.

Πίνακας 10.1.1 Ολική περιεκτικότητα των καροτενοειδών στους μύες και κεφαλοθώρακες της γαρίδας *P. kerathurus*

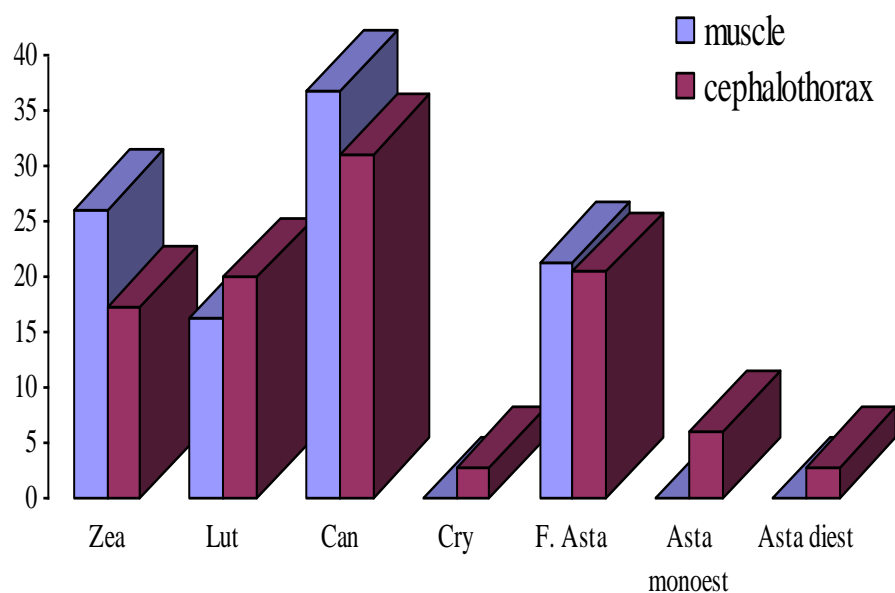
Ολικά καροτενοειδή	μύες	κεφαλοθώρακες
mg / g λίπους	3.33±0.07	9.30±0.10
mg / 100 g νωπού ιστού	2.20±0.04	13.50±0.15

Από τον Πίνακα 10.1.1 φαίνεται ότι η περιεκτικότητα των ολικών καροτενοειδών στους μύες (3.33±0.07 mg/g ολικών λιπιδίων) της *P. kerathurus* είναι μικρότερη από τη περιεκτικότητά των καροτενοειδών στους κεφαλοθώρακες (9.30±0.10 mg/g ολικών λιπιδίων). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία για το καβούρι της θάλασσας (*C. cruciata*) και του γλυκού νερού (*P. potamon*) στα οποία η περιεκτικότητα των ολικών καροτενοειδών ήταν επίσης μικρότερη στους μύες σε σχέση με αυτήν των κεφαλοθωράκων και των δυο ειδών [47].

Όσο αφορά την σύσταση των καροτενοειδών που προσδιορίστηκαν στο λίπος των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus* (Πίνακας 10.1.2) φαίνεται ότι η κανθαξανθίνη είναι το κύριο συστατικό τόσο στους μύες (0.73±0.03 mg/ 100 g νωπού ιστού) όσο και στους κεφαλοθώρακες (4.12±0.07 mg/100 g νωπού ιστού νωπού). Ακολουθούν η ζεαξανθίνη (0.52±0.03 mg/100 g νωπού ιστού), ελεύθερη ασταξανθίνη (0.42±0.02 mg/100 g νωπού ιστού) και *all-trans*- λουτεΐνη (0.32±0.02 mg/100 g νωπού ιστού) στους μύες και ελεύθερη ασταξανθίνη (2.70±0.05 mg/100 g νωπού ιστού), *all-trans*- λουτεΐνη (2.65±0.05 mg/g νωπού ιστού) και ζεαξανθίνη (2.29±0.06 mg/100 g νωπού ιστού) στους κεφαλοθώρακες (Σχήμα 10.1.1). Σε μικρότερες ποσότητες προσδιορίστηκαν μονοεστέρες και διεστέρες της ασταξανθίνης στους μύες και κεφαλοθώρακες, ενώ κρυπτοξανθίνη βρέθηκε μόνο στους κεφαλοθώρακες.

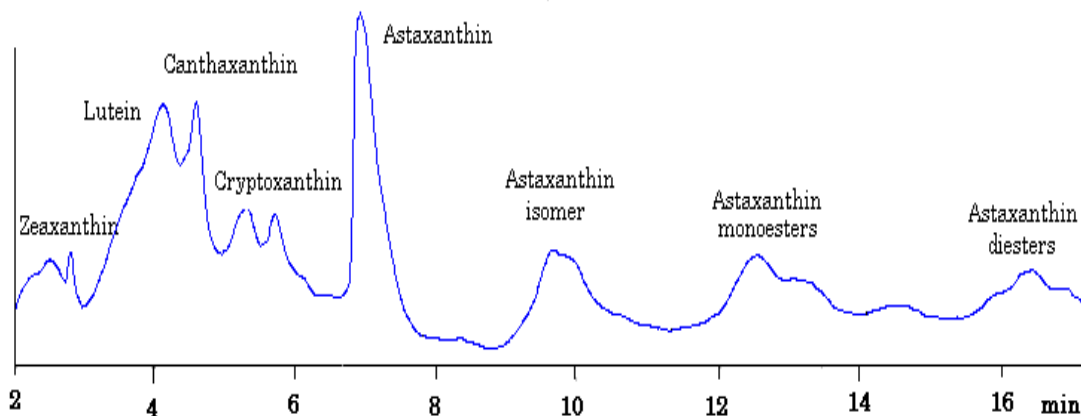
Πίνακας 10.1.2. Σύσταση των καροτενοειδών του λίπους των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*.

Καροτενοειδή	Χρόνος εκλούσεως (min)	Μύες		Κεφαλοθώρακες	
		% των ολικών καροτενοειδών	mg/ 100 g νοπού ιστού	% των ολικών καροτενοειδών	mg/ 100 g νοπού ιστού
Ζεαξανθίνη	2.75	23.64±0.46	0.52±0.03	17.19±0.22	2.29±0.06
<i>All-trans</i> -λουτεΐνη	3.36	14.54±0.31	0.32±0.02	19.86±0.19	2.65±0.05
Κανθαξανθίνη	4.07	33.18±0.53	0.73±0.03	30.96±0.26	4.12±0.07
Κρυπτοξανθίνη	5.24-6.15	-	-	2.76±0.10	0.37±0.02
Ελεύθερη ασταξανθίνη	6.56-13.10	19.09±0.27	0.42±0.02	20.35±0.17	2.70±0.05
Μονοεστέρες ασταξανθίνης	13.30-16.50	6.36±0.07	0.14±0.01	6.06±0.11	0.80±0.05
Διεστέρες ασταξανθίνης	17.90-20.50	3.18±0.05	0.07±0.01	2.82±0.09	0.37±0.03



Σχήμα 10.1.1 Σύσταση (% of TL) των καροτενοειδών των μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*.

Σύμφωνα με δεδομένα από την διεθνή βιβλιογραφία, στα καροτενοειδή διαφορετικών ειδών γαρίδας (*Crangon crangon*, *Solonocera indica*, *Aristeus alcocki* και *Penaeus monodon*), είχαν ταυτοποιηθεί ασταξανθίνη και οι εστέρες της, β-καροτένιο, κανθαξανθίνη, λουτεΐνη σε ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή, ζεαξανθίνη και άγνωστη μορφή ξανθοφύλλης [103]. Συγκριτικά με τα παραπάνω στοιχεία, εκτός από το β-καροτένιο, τα υπόλοιπα καροτενοειδή ταυτοποιήθηκαν και στα λιπίδια της γαρίδας *P.kerathurus* (κανθαξανθίνη, ζεαξανθίνη, ελεύθερη ασταξανθίνη, μονοεστέρες και διεστέρες ασταξανθίνης, λουτεΐνη και κρυπτοξανθίνη) (Σχήμα 10.1.2). Η ποιοτική και ποσοτική διαφορά στη σύσταση των καροτενοειδών στα διαφορετικά είδη των γαρίδων οφείλεται κυρίως στο περιβάλλον στο οποίο ζουν, αφού λαμβάνουν τα καροτενοειδή μέσω της τροφής τους, καθώς δεν μπορούν να τα συνθέσουν de novo. Επίσης συστατικά καροτενοειδών όπως ελεύθερη ασταξανθίνη, μονοεστέρες και διεστέρες ασταξανθίνης έχουν βρεθεί και σε άλλα είδη καρκινοειδών όπως στην *Fafantepenaeus paulensis* [46] (γαρίδα), το *Charybdis cruciate* (θαλάσσιο καβούρι) [47], την *Euphasia superba* (γαρίδα) [48], και τις κόκκινες γαρίδες *A. antennatus* και *A.foliacea* [6]. Ωστόσο, στα περισσότερα είδη γαρίδων τα κύρια καροτενοειδή είναι οι εστέρες της ασταξανθίνης και κατά δεύτερο λόγο η ελεύθερη μορφή της ασταξανθίνης, η παρουσία των οποίων οφείλεται στη μετατροπή του β-καροτενίου σε ασταξανθίνη μέσω οξειδωτικής μετατροπής [6,49]. Σημειώνεται ότι ο χρωματισμός του σώματος της γαρίδας οφείλεται στα υψηλά επίπεδα της ασταξανθίνης και κανθαξανθίνης. Η ασταξανθίνη η οποία έχει βρεθεί στη γαρίδα, στο σολομό και σε άλλα είδη θαλάσσιας τροφής έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες [104].



Σχήμα 10.1.2. Χρωματογράφημα HPLC των καροτενοειδών του λιπιδικού εκχυλίσματος της γαρίδας *P. kerathurus*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

11.1 Προσδιορισμός μετάλλων και μεταλλοειδών

Τα αποτελέσματα από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των Cu, Zn, Mn, Se, Mg, Ni, Cr, Cd, As, Pb, Hg, στους μύες και στους κεφαλοθώρακες της *P. kerathurus* χωριστά, με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης, δίνονται επί ξηρού και επί νωπού ιστού (ο υπολογισμός έγινε βάσει της υγρασίας κάθε ιστού) στον Πίνακα 11.1.1. Η συγκέντρωση των μετάλλων εκφράζεται επί ξηρού ιστού ώστε να είναι δυνατόν να συγκριθούν με δεδομένα από την διεθνή βιβλιογραφία (στην οποία τα αποτελέσματα δίνονται κυρίως επί του ξηρού ιστού), και επί νωπού για διατροφικούς σκοπούς (δηλαδή για να μπορεί αξιολογηθεί η διατροφική τους αξία).

Πίνακας 11.1.1 Συγκέντρωση των μετάλλων στους μύες και κεφαλοθώρακες της *P. kerathurus* (μg/g νωπού ιστού και μg/g ξηρού ιστού).

Μέταλλα	Μύες		Μύες	
	κεφα/ρακα	ξηρού ιστού	κεφ/ρακα	νωπού ιστού
Mg	1795±3,1*	3157,5±3,1	979,73±3,1	2232,0±3.1
Zn	110,38±0,09	142,15±0,09	62,64±0,09	102,27±0.09
Fe	33,20±0,2	98,33±0,1	17,07±0.1	68,60±0.1
Cu	13,08±0,02	120,68±0,02	7,44±0,02	87,43±0.02
Mn	0,21±0,1	1,18±0,1	0,14±0,1	0,77±0.1
Se	0,27±0,4	0,07±0,4	<LOD	<LOD
As	35,05± 0,2	27,4±0,2	19,94±0,2	19,94±0.2
Cr	-	-	-	-
Ni	0,03±0,02	0,17±0,02	0,02±0,02	0,13±0.02
Cd	0,03±0,01	0,46±0,01	0,02±0,01	0,33±0.01
Pb	1,57±0,1	1,65±0,1	0,58±0,1	1,20±0.1
Hg	<LOD	0,07±3,1	<LOD	0,05±3.1

*Οι τιμές ±SD, είναι μέσος όρος τριών αναλύσεων δείγματος (N=3)

Από τον παραπάνω Πίνακα (11.1.1) φαίνεται ότι:

α) ο κεφαλοθώρακας είναι πλουσιότερος σε μέταλλα από τον μυϊκό ιστό

β) ότι τα μέταλλα κατανέμονται στους ιστούς, με βάση τις συγκεντρώσεις τους, με διαφορετική σειρά όπως φαίνεται παρακάτω:

γ) Στους μύες, Mg>Zn>As>Fe>Cu>Pb>Se>Mn>Ni >Cd

δ) στους κεφαλοθώρακες, Mg>Zn>Cu>Fe>As>Pb>Mn>Cd>Ni>Se

από την οποία προκύπτει ότι η περιεκτικότητα των μυών σε Fe είναι μεγαλύτερη από αυτή σε Cu, και του Se μεγαλύτερη από την περιεκτικότητα σε Ni, αντίθετα από ότι συμβαίνει στους κεφαλοθώρακες.

Η αυξημένη συγκέντρωση χαλκού στο ηπατοπάγκρεας μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο χαλκός αποθηκεύεται σε αυτό για να σχηματίσει τετραεδρική μεταλλοθειονίνη και μέταλλο-ενζυμα [105].

Όσον αφορά το Ni, αυτό συσσωρεύεται περισσότερο στους κεφαλοθώρακες- στους οποίους η διάρκεια ημίσειας ζωής παραμονής του είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα όργανα και ιστούς [106] επομένως και από τους μύες. Η Ελλάδα είναι μια από τις πρώτες χώρες σε ετήσια παραγωγή νικελίου (κατέχει το 2% της παγκόσμιας παραγωγής, ποσοστό ανάλογο με αυτό των Η.Π.Α), η εξόρυξή του είναι ο κύριος παράγοντας για την εμφάνιση υψηλών συγκεντρώσεων νικελίου στα ύδατα, από τα οποία το παραλαμβάνουν τα θαλασσινά (όπως και από την τροφή) και πιθανόν σε αυτό να οφείλεται η μεγαλύτερη συγκέντρωσή νικελίου γενικά στους κεφαλοθώρακες [54]. Μεγάλη συγκέντρωση νικελίου εμποδίζει την συσσώρευση του μαγγανίου στους ιστούς της γαρίδας και αντίστροφα, ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση η περιεκτικότητα και των δύο ιστών σε Ni δεν ήταν μεγάλη και η περιεκτικότητα σε Mn είναι μεγαλύτερη από αυτή του Ni. Η συγκέντρωση του μαγγανίου στο ηπατοπάγκρεας και τους μύες οφείλεται στην ικανότητα του στοιχείου να προσκολλάται σε υποδοχείς (binding sites) που υπάρχουν στα μιτοχόνδρια [107]. Όπως φαίνεται (Πίνακας 15.1.1) σε κανένα από τους δύο ιστούς δεν προσδιορίστηκε Cr.

As βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στους μύες από αυτή στους κεφαλοθώρακες. Το αρσενικό απαντάται στους οργανισμούς είτε σε οργανική μορφή είτε σε ανόργανη ως τρισθενές ή πεντασθενές αρσενικό. Σύμφωνα με μελέτες σε θαλασσινά, το αρσενικό στους θαλάσσιους οργανισμούς βρίσκεται κυρίως σε οργανική μορφή, η οποία δεν έχει αποδειχθεί επικίνδυνη για τον άνθρωπο. Αντιθέτως, η ανόργανη μορφή του αρσενικού,

κυρίως η πεντασθενής, είναι αποδεδειγμένα δηλητηριώδης με δυσμενείς συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό [108].

Το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb) και ο υδράργυρος (Hg), είναι τοξικά ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 11.1.1, τόσο στους μύες όσο και στους κεφαλοθώρακες της υπό εξέταση γαρίδας, οι συγκεντρώσεις μολύβδου (Pb) ξεπερνούν τα αντίστοιχα Μέγιστα Όρια Ανοχής (MRL) σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1881/2006 που καθορίζονται για τα καρκινοειδή [58], ενώ στους κεφαλοθώρακες υδράργυρος (Hg) βρέθηκε κάτω από τα Μέγιστα Όρια Ανοχής, αντίθετα από τους μύες στους οποίους δεν βρέθηκε Hg.

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μετάλλων στους κεφαλοθώρακες σε σχέση με τους μύες οφείλεται αφενός στην παρουσία των βραγχίων στον κεφαλοθώρακα της γαρίδας, τα οποία αποτελούν το αναπνευστικό της όργανο, ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση και απορροφούν τα μέταλλα και αφετέρου ότι εκεί βρίσκεται και το ήπατοπάγκρεας στο οποίο γίνονται οι κυριότερες μεταβολικές πορείες [105,107].

Πίνακας 11.1.2. Συγκέντρωση μετάλλων στους μύες και κεφαλοθώρακες των ειδών *P. kerathurus*, *Aristeus antennatus* και *Aristaeomorpha foliacea* εκφρασμένες σε $\mu\text{g/g}$ ξηρού ιστού.

μg μετάλλου / g ξηρού ιστού	Μύες <i>P.</i> <i>kerathurus</i>	Κεφ/κες <i>P. kerathurus</i>	Μύες <i>A. foliacea</i>	Κεφ/κες <i>A. foliacea</i>	Κεφ/κες <i>A. antennatus</i>
μαγνήσιο, Mg	1795 \pm 3,1	3157,5 \pm 3,1	2084,74	2667,72	4329,80
σίδηρος, Fe	33,2 \pm 0,2	98,33 \pm 0,1	10,60	201,35	34,23
μαγγάνιο, Mn	0,21 \pm 0,1	1,18 \pm 0,1	0,35	5,99	2,67
χαλκός, Cu	13,08 \pm 0,02	120,68 \pm 0,02	24,28	120,23	71,90
ψευδάργυρος, Zn	110,38 \pm 0,09	142,15 \pm 0,09	210,61	145,73	201,26
σελήνιο, Se	0,27 \pm 0,4	0,07 \pm 0,4	0,50	0,14	0,15
χρώμιο, Cr (III, VI)	-	-	0,38	-	-

νικέλιο, Ni	0,03±0,02	0,17±0,02	0,20	1,07	0,63
κάδμιο, Cd	0,03±0,01	0,46±0,01	0,30	0,45	0,39
μόλυβδος, Pb	1,57±0,1	1,65±0,1	1,57	1,02	0,99
υδράργυρος, Hg	<LOD	0,07±3,1	2,98	1,08	0,45
αρσενικό, As	35,05± 0,2	27,4±0,2	60,39	42,04	79,54

Από τα δεδομένα του Πίνακα 11.1.2. φαίνεται ότι οι μύες της *P. kerathurus* περιείχαν μικρότερες ποσότητες μαγνησίου, χαλκού, ψευδάργυρου, μαγγανίου, σεληνίου, νικελίου και αρσενικού, συγκρινόμενοι με τους μύες της *A. foliacea* η οποία προέρχεται από το Ιόνιο Πέλαγος ήταν παρόμοιου μεγέθους και μελετήθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων [6]. Επίσης στους μύες της *P. kerathurus*, αντίθετα από ότι βρέθηκε στους μύες τη *A. foliacea*, δεν βρέθηκε χρώμιο και υδράργυρος, όσον αφορά τη συγκέντρωση σε κάδμιο είναι μικρότερη από τις μέγιστες τιμές ανοχής που ορίζονται για τα καρκινοειδή από τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1881/2006 [(Οδηγία 2001/22/EC, MRL για το κάδμιο (Cd) και το μόλυβδο (Pb) 0.5 mg/kg] [58], ενώ η συγκέντρωση σε μόλυβδο βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερη. Όσον αφορά τους κεφαλοθώρακες της υπό μελέτη γαρίδας, βρέθηκε ότι είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση μαγνησίου και σιδήρου, μικρότερη μαγγανίου, σεληνίου και νικελίου και παρόμοια χαλκού και ψευδαργύρου συγκρινόμενη με τους κεφαλοθώρακες της *A. foliacea* [6]. Ενώ βρέθηκε ότι είχαν μικρότερη περιεκτικότητα σε μαγνήσιο, ψευδάργυρο, μαγγάνιο, σελήνιο, νικέλιο και αρσενικό και μεγαλύτερη σε σίδηρο και χαλκό από τους κεφαλοθώρακες της *A. antennatus* [6]. Επί πλέον στους κεφαλοθώρακες βρέθηκε ότι η συγκέντρωση υδραργύρου ήταν κάτω από τις MRL του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 1881/2006 [(Οδηγία 2001/22/EC)] ενώ βρέθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση μολύβδου και παρόμοια καδμίου με αυτή στους κεφαλοθώρακες των δύο άλλων ειδών *A. antennatus* και *A. foliacea* [6] οι οποίες ήταν μεγαλύτερες από τις MRL του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 1881/2006 [(Οδηγία 2001/22/EC)] .

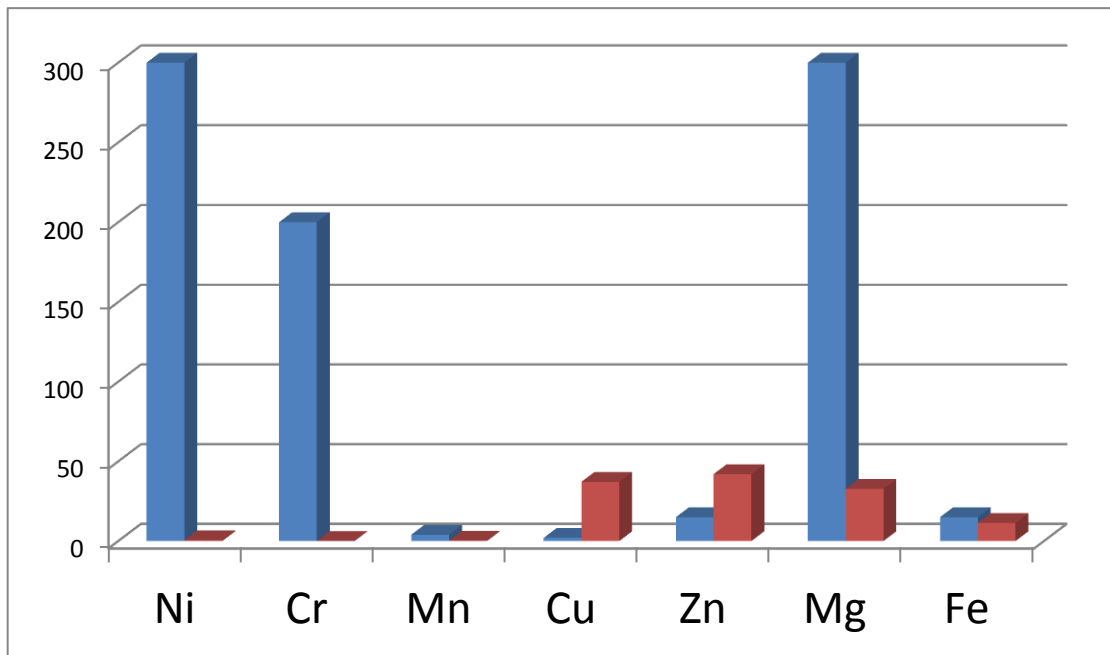
Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των μετάλλων στους ιστούς των διαφορετικών ειδών γαρίδας, εξαρτώνται όχι μόνο από το είδος της γαρίδας αλλά και από το γένος, το είδος της τροφής τους, την εποχή του χρόνου καθώς και από τα επίπεδα μόλυνσης (όταν πρόκειται για τα τοξικά μέταλλα) της περιοχής από όπου αλιεύθηκαν. Τα νερά

μολύνονται από βιομηχανικές και γεωργικές δραστηριότητες, με αποτέλεσμα οι υδρόβιοι οργανισμοί που διαβιούν σε αυτά συσσωρεύουν στους ιστούς τους υψηλά επίπεδα βαρέων μετάλλων. Για το λόγο αυτό οι γαρίδες θεωρούνται ότι αποτελούν βιο-ένδειξη (bioindicator) της μόλυνσης του περιβάλλοντος από βαρέα μέταλλα [57]. Επομένως τα συγκεκριμένα αποτελέσματα όσον αφορά την συγκέντρωση τοξικών μετάλλων και μεταλλοειδών αφορούν μόνο το υπό μελέτη δείγμα γαρίδων το οποίο εξετάστηκε και το οποίο αλιεύθηκε στην περιοχή του Αιγαίου (Πλαταμόνα-Κατερίνης) την συγκεκριμένη χρονική περίοδο.

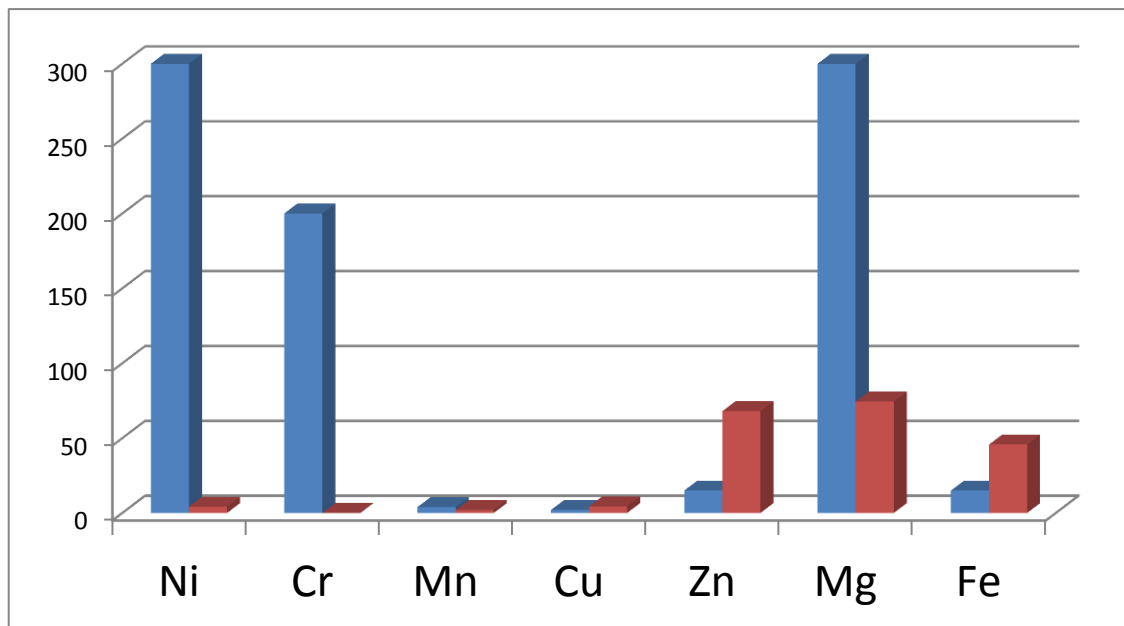
Γνωρίζοντας την Σ.Η.Δ. (Συνιστώμενη Ημερήσια Δόση) για κάθε ένα από τα απαραίτητα μέταλλα, μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό κάλυψης της, από την κατανάλωση 100 g νωπού ιστού γαρίδας μυών και κεφαλοθωράκων. Στον Πίνακα 11.1.3 φαίνονται οι τιμές της Σ.Η.Δ (για ενήλικες) για κάθε μέταλλο, ενώ στα Σχήματα 11.1.1 και 11.1.2 φαίνεται το ποσοστό κάλυψης της Σ.Η.Δ του κάθε μετάλλου με την πρόσληψη 100 g από τους μύες και κεφαλοθώρακες της γαρίδας που μελετήθηκε.

Πίνακας 11.1.3 Συνιστώμενη Ημερήσια Δόση (Σ.Η.Δ) για τα μέταλλα που αναλύθηκαν

Μέταλλα	Σ.Η.Δ
Νικέλιο (Ni)	300-700 μg
Χρώμιο (Cr)	200 μg
Μαγγάνιο (Mn)	4 mg -10 mg
Χαλκός (Cu)	2 mg – 3 mg
Ψευδάργυρος (Zn)	15 mg
Μαγνήσιο (Mg)	300 mg – 400 mg
Σίδηρος (Fe)	10-18 mg



Σχήμα 11.1.1. *Επι τοις εκατό κάλυψη της ΣΗΔ για τα απαραίτητα μέταλλα (■) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, μετά την κατανάλωση 100g νωπών μωών γαρίδας (■).*



Σχήμα 11.1.2 *Επι τοις εκατό κάλυψη της ΣΗΔ για τα απαραίτητα μέταλλα(■) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία μετά την κατανάλωση 100 g νωπών κεφαλοθωράκων γαρίδας (■).*

Από τα Σχήματα 11.1.1. και 11.1.2. προκύπτει ότι από την κατανάλωση μιας μερίδας (περίπου 250 g) μυών και κεφαλοθωράκων της γαρίδας καλύπτεται (και από τα δύο) σε ικανοποιητικό ποσοστό η ΣΗΔ για Cu, Zn και Fe και σε μικρότερο ποσοστό για Mg και Mn, ενώ η συνεισφορά τους σε Ni είναι αμελητέα.

Συνολική εκτίμηση αποτελεσμάτων

Για τον προσδιορισμό των λιπιδικών ενώσεων, το χημικό χαρακτηρισμό των αρσενολιπιδίων και φωσφολιπιδίων καθώς και τον προσδιορισμό μετάλλων και μεταλλοειδών στους μύες και κεφαλοθώρακες της *P.kerathurus*, εφαρμόστηκε συνδυασμένη μεθοδολογία η οποία περιελάμβανε χρωματογραφικές (GC-FID, Iatroskan TLC-FID, HPLC-DAD, TLC, HPTLC) και φασματοσκοπικές (NMR) τεχνικές όπως και φασματομετρία μαζών (LC- ESI-MS/MS).

Από τον προσδιορισμό της γενικής χημικής σύστασης (Πίνακας 6.4.1.1. Κεφάλαιο 6) βρέθηκε ότι α) οι μύες περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας από τους κεφαλοθώρακες β) μικρότερο ποσοστό τέφρας (αυτό οφείλεται στο ότι από τους μύες έχει αφαιρεθεί το κέλυφος, πριν από τον προσδιορισμό της τέφρας, ενώ στους κεφαλοθώρακες παραμένει) γ) και το ποσοστό της περιεχόμενης πρωτεΐνης στους μύες της *P. kerathurus* βρέθηκε ιδιαίτερος υψηλό συγκρινόμενο με αυτό άλλων ειδών γαρίδων που έχουν ήδη μελετηθεί από την ίδια ερευνητική ομάδα στο Εργαστήριο της Χημείας Τροφίμων. Από τον προσδιορισμό των ολικών λιπιδίων βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus* ήταν 0.60 ± 0.02 % και 1.43 ± 0.04 % του νωπού ιστού αντίστοιχα, δηλαδή οι κεφαλοθώρακες είχαν υπερδιπλάσιο ποσοστό λίπους από τους μύες. Γενικά οι κεφαλοθώρακες των καρκινοειδών περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό λιπιδίων από τους μύες διότι σε αυτούς περιέχεται το ηπατοπάγκρεας, το οποίο είναι το κύριο όργανο αποθήκευσης των λιπιδίων τους [1]. Η περιεκτικότητα των καρκινοειδών σε ολικά λιπίδια επηρεάζεται από παράγοντες όπως, το φύλο, το στάδιο ανάπτυξης, η διαθεσιμότητα της τροφής και η εποχή αλίευσης [90].

Τα πολικά λιπίδια βρέθηκε ότι αποτελούσαν το 68.02 ± 0.51 % των ολικών λιπιδίων των μυών της *P. kerathurus* ενώ μόνο το 46.5 ± 0.7 % των κεφαλοθωράκων. Επίσης βρέθηκε ότι τα πολικά λιπίδια των μυών και των κεφαλοθωράκων αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια (> 94% των πολικών λιπιδίων).

Η μελέτη της σύστασης των επιμέρους τάξεων των πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων έδειξε ότι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) αποτελεί το κύριο φωσφολιπίδιο (55.6 % και 46.4 % αντίστοιχα) ενώ ακολουθεί η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) (29.3 % και 25.7 % αντίστοιχα). Η σφιγγομυελίνη (Sph), η καρδιολιπίνη (CL), η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC), η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI) προσδιορίστηκαν σε μικρότερα ποσοστά.

Η αναγνώριση των κύριων τάξεων των φωσφολιπιδίων πραγματοποιήθηκε επίσης με χρήση τεχνικών φασματοσκοπίας NMR. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν αρχικά οι κορυφές των φασμάτων ^1H των προτύπων ενώσεων PC και PE και στη συνέχεια των αντίστοιχων δειγμάτων. Ανίχνευση των φωσφολιπιδίων PC, PE, SPE, PI πραγματοποιήθηκε και στο δείγμα με τα ολικά πολικά λιπίδια, ταυτοποιώντας τις κορυφές των χαρακτηριστικών τους ομάδων, όσον αφορά την PC, διακρίθηκε η χαρακτηριστική κορυφή των εννέα πρωτονίων των μεθυλο-υποκαταστατών του αζώτου $[\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$. Αντίστοιχα, διακρίθηκαν οι κορυφές των πρωτονίων της μεθυλενομάδας της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης που βρίσκονται σε α-θέση από την χαρακτηριστική ομάδα της αιθανολαμίνης $\text{CH}_2\text{-N}$ και τα πρωτόνια της χαρακτηριστικής ομάδας της $-\text{NH}_3$. Τέλος, με χρήση τεχνικών δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR (COSY, HSQC, HMBC) επιβεβαιώθηκε η παρουσία πλασμαλογόνων (αλκυλο-1-ενυλο ether) στο κλάσμα των πολικών λιπιδίων, ταυτοποιώντας τα χαρακτηριστικά πρωτόνια του διπλού δεσμού (O-CH=CH-). Στα ουδέτερα λιπίδια των μυών βρέθηκε ότι οι στερόλες αποτελούσαν το κύριο συστατικό (84.9 % των ολικών ουδετέρων λιπιδίων) ενώ στα ουδέτερα λιπίδια των κεφαλοθωράκων, το κύριο συστατικό ήταν τα τριγλυκερίδια (67.2 % των ολικών ουδετέρων λιπιδίων).

Από την μελέτη της σύστασης των λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων βρέθηκε ότι τα κυριότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα στους μύες και κεφαλοθώρακες ήταν το C16:0 (παλμιτικό) σε ποσότητες 127.24 ± 2.77 , 343.78 ± 12.71 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα, και το C18:0 (στεατικό) σε ποσότητες 62.99 ± 1.52 και 128.85 ± 8.20 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα, τα κύρια μονοακόρεστα το C16:1 ω -9 cis (παλμιτελαϊκό) σε ποσότητες 54.05 ± 0.33 και 103.29 ± 4.06 mg /100 g νωπού ιστού αντίστοιχα και το C18:1 ω -9 cis (ελαϊκό) σε ποσότητες 106.97 ± 2.47 και 188.7 ± 17.83 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα. Στα κύρια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα βρέθηκε το C20:5 ω -3 cis (EPA) σε ποσότητες 166.87 ± 2.57 και 214.49 ± 20.36 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα όπως και το C22:6 ω -3 cis (DHA) σε ποσότητες 125.31 ± 1.67 και 208.62 ± 30.27 mg/100 g νωπού ιστού αντίστοιχα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι μύες και οι κεφαλοθώρακες ήταν πλουσιότεροι σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδιαιτέρως σε ω -3 (EPA και DHA) έναντι των μονοακόρεστων. Οι κεφαλοθώρακες επειδή δεν θεωρούνται βρώσιμοι και συνήθως απορρίπτονται μπορεί να αποτελέσουν πρώτη ύλη για την παραγωγή ω -3 και ω -6 λιπαρών οξέων σε συμπληρώματα διατροφής.

Όσο αφορά τον προσδιορισμό των περιεχόμενων λιπαρών οξέων στα πολικά λιπίδια και σε επιμέρους τάξεις φωσφολιπιδίων, το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus* ήταν παρόμοιο, ενώ το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων PC και PE των μυών της γαρίδας ήταν μεγαλύτερο από αυτό των κεφαλοθωράκων. Το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων των μυών καθώς και των επιμέρους τάξεων των φωσφολιπιδίων PC και PE βρέθηκε μεγαλύτερο συγκριτικά με αυτό στα αντίστοιχα κλάσματα των κεφαλοθωράκων. Η αναλογία ω-3/ω-6 βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερη στα πολικά λιπίδια, στην φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) των μυών (2.49 ± 0.005 , 1.66 ± 0.02 και 1.76 ± 0.05) συγκριτικά με την ίδια αναλογία στους κεφαλοθώρακες. Ο λόγος EPA/DHA βρέθηκε μεγαλύτερος της μονάδας στην φωσφατιδυλοχολίνη (3.52 ± 0.002) και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (2.74 ± 0.01) τόσο των μυών όσο και των κεφαλοθωράκων. Στους μύες και κεφαλοθώρακες της γαρίδας (μετά από λυοφυλίωση) βρέθηκε αρσενικό $35,0 \pm 0.2$ μg/g και $27,4 \pm 0.2$ μg/g ξηρού ιστού αντίστοιχα. Αρσενικό επίσης προσδιορίστηκε στα ολικά, πολικά καθώς και στα επιμέρους συστατικά των φωσφολιπιδίων (όπως PE, PC, σφιγγομυελίνη, lyso-PC) των μυών και κεφαλοθωράκων της *P. kerathurus*, το οποίο μας οδήγησε στη υπόθεση της παρουσίας λιποδιαλυτών ενώσεων του αρσενικού σε αυτά τα λιπιδικά κλάσματα. Για τη ταυτοποίηση των αρσενολιπιδίων, τα επιμέρους κλάσματα των φωσφολιπιδίων (PC, PE, LPC και Sph) των μυών και κεφαλοθωράκων της μελετούμενης γαρίδας υποβλήθηκαν σε ήπια αλκαλική και μερική όξινη υδρόλυση και στη συνέχεια αναλύθηκαν με την τεχνική LC-ESI-MS/MS με SRM. Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση ήταν η DMAsPhosphate (σε μεταπτώσεις $483 > 97$ και $483 > 237$ και σε χρόνο έκλουσης 37.1-37.4 min). Οι ενώσεις που βρέθηκαν στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων μετά από μερική όξινη υδρόλυση ήταν το DMA (σε μεταπτώσεις $139 > 91$ και $139 > 109$ σε χρόνο έκλουσης 15.3-15.6 min) και η αρσενοχολίνη AsC (σε μεταπτώσεις $165 > 104$ και $165 > 121$ σε χρόνο έκλουσης 1.71 min). Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο κλάσμα της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης των κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση ήταν το DMAsSulfonate (σε μεταπτώσεις $393 > 97$ και $393 > 237$ και χρόνους έκλουσης 21.1-21.5 min) ενώ μετά την μερική όξινη υδρόλυση ήταν το DMAsGlycol (σε μεταπτώσεις $329 > 97$ και $329 > 236$ και χρόνους έκλουσης 4.2-

4.4 min) το DMA^{ThioAsSulphate} (σε μεταπτώσεις 425>97 και 425>253 και σε χρόνο έκλυσης 9.5-9.7 min) και το DMA (σε μεταπτώσεις 139>91 και 139>109 σε χρόνο έκλυσης 14.8 min). Τις ενώσεις DMA^{AsGlycol}, DMA^{ThioAsSulphate} και DMA^{Sulfonate} τις αναφέρουμε με μια επιφύλαξη.

Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο κλάσμα της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων και μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση ήταν η DMA^{AsPhosphate} (στις μεταπτώσεις 483>97 και 483>237 σε χρόνο έκλυσης για τους κεφαλοθώρακες 37.2-37.6 min και για τους μύες 37-38 min). Η ίδια ένωση ταυτοποιήθηκε και στη στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση.

Οι ενώσεις που βρέθηκαν στο κλάσμα της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων και των μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση ήταν η αρσενοχολίνη AsC (στις μεταπτώσεις 165>105 και 165>121 σε χρόνο έκλυσης 1.71-1.74 min) και το DMA (στη μετάπτωση 139>91 και σε χρόνο έκλυσης 17.6 min). Οι ίδιες ενώσεις (δηλαδή το DMA και η AsC) ταυτοποιήθηκαν και στη φωσφατιδυλοχολίνη μετά από μερική όξινη υδρόλυση.

Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο κλάσμα της σφιγγομυελίνης των κεφαλοθωράκων μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση ήταν το DMA^{Sulfonate} (στη μετάπτωση 393>97 και σε χρόνο έκλυσης 21.5 min) και το DMA^{AsPhosphate} (στη μετάπτωση 483>237 σε χρόνο έκλυσης 35.4 min). Την ένωση DMA^{Sulfonate} την αναφέρουμε με μια επιφύλαξη.

Οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο κλάσμα της σφιγγομυελίνης των μυών μετά από ήπια αλκαλική υδρόλυση ήταν το DMA^{AsGlycol}, το DMA^{SAsGlycol} και το DMA^{Sulfate} (στις μεταπτώσεις 329>237, 345>240 και 409>97 και σε χρόνους ανάλυσης 4.5 min, 21.7 min και 17.1 min, αντίστοιχα). Η ένωση που προσδιορίστηκε στο κλάσμα της σφιγγομυελίνης των κεφαλοθωράκων και των μυών μετά από μερική όξινη υδρόλυση ήταν η αρσενοχολίνη (AsC). Όλες τις ενώσεις όπως DMA^{AsGlycol}, το DMA^{SAsGlycol} και το DMA^{Sulfate} τις αναφέρουμε με μια επιφύλαξη, η συγκέντρωσή τους είναι τόσο χαμηλή ώστε μπορεί να είναι θόρυβος.

Επίσης μελετήθηκαν οι μοριακές δομές της φωσφατιδυλοχολίνης και των αρσενολιπιδίων της γαρίδας *P. Kerathurus* με LC-ESI-MS/MS με την τεχνική σάρωσης επιλεγμένου πρόδρομου ιόντος. Αρχικά μελετήθηκαν τα φάσματα μαζών θετικού ιόντος του δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων με πλήρη σάρωση πρόδρομου ιόντος με m/z 184. Στα αντίστοιχα φάσματα μαζών προϊόντων ιόντων του δείγματος της φωσφατιδυλοχολίνης της γαρίδας *P. kerathurus* εμφανίστηκαν τα χαρακτηριστικά

θραύσματα της χολίνης [88] με m/z 87, 184, 125, καθώς και χαρακτηριστικά θραύσματα των κυριότερων λιπαρών οξέων (C14:1, C16:0, C17:1, C18:2, C18:0, C20:5, C20:3, C20:1, C20:0 και C22:1). Συνδυάζοντας τα μοριακά βάρη από τα φάσματα μαζών προϊόντων ιόντων και τα περιεχόμενα λιπαρά οξέα στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης από τη ανάλυσή τους με GC/FID, προτάθηκαν 30 περίπου μοριακές δομές, που αντιστοιχούν σε διακυλο-, αλκυλο-ακυλο- και αλκενυλο-ακυλο- παράγωγα της PC. Με σκοπό την μελέτη των μοριακών δομών των αρσενολιπιδίων στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης επιλέχτηκαν φάσματα MS/MS για την εύρεση προϊόντων ιόντων επιλεγμένων προδρόμων ιόντων με m/z 218, 245 και 483. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φασμάτων μαζών της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων ταυτοποιήθηκε το μοριακό ιόν με m/z 754.4 σε RT 1.95 min ως αρσενολιπίδιο (C16:0/15:1) με δομή γλυκεροφωσφολιπιδίου που αντί για χολίνη είναι συνδεδεμένο με DMA (m/z 218). Στα φάσματα μαζών της φωσφατιδυλοχολίνης των μυών ταυτοποιήθηκε το ψευδο-μοριακό ιόν με m/z 741.2 σε RT 56.77 min ως αρσενολιπίδιο (C15:1/15:1) και το ψευδο-μοριακό ιόν με m/z 771.4 (C16:0/16:0) με δομή γλυκεροφωσφολιπιδίου.

Επίσης μελετήθηκαν μοριακές δομές αρσενολιπιδίων με πρόδρομο ιόν με m/z 245 (δηλαδή αντικατάσταση του αζώτου (N) με το αρσενικό (As)). Με βάση την βιβλιογραφία η ταυτοποίηση της αρσενοχολίνης συνδέεται με την παρουσία χαρακτηριστικών θραυσμάτων της που είναι το m/z 165, 147 και 121 [101]. Το μοριακό ιόν με m/z 736.9 σε RT 5.39 min πιθανόν να αντιστοιχεί στην φωσφατιδυλοαρσενοχολίνη επειδή εκτός του χαρακτηριστικού ιόντος της αρσενοχολίνης σε m/z 245 εμφανίζονται και τα m/z 165 και 147. Επίσης τα μοριακά θραύσματα (ή τα θυγατρικά ιόντα) 104,9 [(CH₃)₂As⁺] και 122.9 (CH₃)₂ AsOH₂⁺ επιβεβαιώνουν την παρουσία αρσενολιπιδίου [101].

Τέλος μελετήθηκαν οι μοριακές δομές των αρσενοσακχάρων με m/z 483, στο κλάσμα της φωσφατιδυλοχολίνης των κεφαλοθωράκων της γαρίδας *P. kerathurus*. Ταυτοποιήθηκε το ψευδο-μοριακό ιόν με m/z 856.4 σε RT 1.81 min. Με βάση τα δεδομένα από τη βιβλιογραφία τα χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα του μοριακού ιόντος με m/z 483 είναι τα θραύσματα με m/z 75, 121, 195, 218, 237, 329, 391 και 483 [29].

Από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των καρροτενοειδών βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα των ολικών καρροτενοειδών στους μύες της *P. kerathurus* (3.33±0.07 mg/g ολικών λιπιδίων) ήταν μικρότερη από την περιεκτικότητά τους στους κεφαλοθώρακες (9.30±0.10 mg/g ολικών λιπιδίων). Όσο αφορά την σύσταση των καρροτενοειδών που προσδιορίστηκαν στο λίπος των μυών και των κεφαλοθωράκων της

γαρίδας *P. kerathurus* (Πίνακας 10.1.2) φαίνεται ότι η κανθαξανθίνη είναι το κύριο συστατικό τόσο στους μύες (0.73 ± 0.03 mg/100 g νωπού ιστού) όσο και στους κεφαλοθώρακες (4.12 ± 0.07 mg/100 g νωπού ιστού νωπού). Ακολουθούν η ζεαξανθίνη (0.52 ± 0.03 mg/100 g νωπού ιστού), η ελεύθερη ασταξανθίνη (0.42 ± 0.02 mg/100 g νωπού ιστού) και η *all-trans*- λουτεΐνη (0.32 ± 0.02 mg/100 g νωπού ιστού) στους μύες καθώς και η ελεύθερη ασταξανθίνη (2.70 ± 0.05 mg/100 g νωπού ιστού), η *all-trans*- λουτεΐνη (2.65 ± 0.05 mg/g νωπού ιστού) και η ζεαξανθίνη (2.29 ± 0.06 mg/100 g νωπού ιστού) στους κεφαλοθώρακες (Σχήμα 10.1.1). Σε μικρότερες ποσότητες προσδιορίστηκαν μονοεστέρες και διεστέρες της ασταξανθίνης στους μύες και κεφαλοθώρακες, ενώ η κρυπτοξανθίνη ανιχνεύθηκε μόνο στους κεφαλοθώρακες. Η ποιοτική και ποσοτική διαφορά στη σύσταση των καροτενοειδών στα διαφορετικά είδη των γαρίδων οφείλεται κυρίως στο περιβάλλον στο οποίο ζουν, αφού λαμβάνουν τα καροτενοειδή μέσω της τροφής τους, καθώς δεν μπορούν να τα συνθέσουν *de novo* [103].

Το χρώμα του σώματος της γαρίδας οφείλεται κυρίως στα υψηλά επίπεδα της ασταξανθίνης και κανθαξανθίνης. Η ασταξανθίνη η οποία έχει βρεθεί στη γαρίδα, στο σολομό και σε άλλα είδη θαλάσσιας τροφής έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες [104]. Από τον προσδιορισμό μετάλλων και μεταλλοειδών στους μύες και κεφαλοθώρακες της *P. kerathurus* φαίνεται ότι οι κεφαλοθώρακες είναι πλουσιότεροι σε μέταλλα συγκριτικά με τους μύες. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μετάλλων στους κεφαλοθώρακες σε σχέση με τους μύες οφείλεται αφενός στην παρουσία των βραγχίων στον κεφαλοθώρακα της γαρίδας, τα οποία αποτελούν το αναπνευστικό της όργανο, ρυθμίζουν την ωσμωτική πίεση και απορροφούν τα μέταλλα και αφετέρου στο ότι εκεί βρίσκεται και το ήπατοπάγκρεας στο οποίο γίνονται οι κυριότερες μεταβολικές πορείες [105,107]. Η συγκέντρωσή των μετάλλων που προσδιορίστηκαν στην *P. kerathurus* βρέθηκε ότι μειώνονταν κατά την σειρά: Mg>Zn>As>Fe>Cu>Pb>Se>Mn>Ni>Cd στους μύες ενώ στους κεφαλοθώρακες σύμφωνα με τη σειρά: Mg>Zn>Cu>Fe>As>Pb>Mn>Cd>Ni>Se. Σε κανένα από τους δύο ιστούς δεν προσδιορίστηκε Cr. As βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στους μύες.

Επομένως στους μύες και τους κεφαλοθώρακες της μελετούμενης γαρίδας, προσδιορίστηκαν συστατικά με σημαντικές βιολογικές δράσεις όπως φωσφολιπίδια, αρσενολιπίδια, πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα και καροτενοειδή καθώς και ορισμένα απαραίτητα για την ανθρώπινη διατροφή μέταλλα σε σημαντικές συγκεντρώσεις.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Σύντμηση ή ακρωνύμιο	Αγγλική ονομασία	Ελληνική απόδοση
AsS	Arsenosugars	αρσενοσάκχαρο
AsB	Arsenobetaine	αρσενοβεταΐνη
AsC	Arsenocholine	Αρσενοχολίνη
Arsenolipid	Arsenolipid	Αρσενολιπίδιο
CE	Collision energy	ενέργεια θραυσματοποίησης
SRM	Selected Reaction Monitoring	Επιλεκτική Παρακολούθηση Αντίδρασης (μετάπτωσης ιόντος)
ESI	Electrospray ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	Υγροχρωματογραφία –δίδυμη φασματομετρία μαζών
PI	phosphatidylinositol	φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PS	phosphatidylserine	φωσφατιδυλοσερίνη
Car, CL	cardiolipine	καρδιολιπίνη
PC	phosphatidylcholine	φωσφατιδυλοχολίνη
PE	phosphatidylethanolamine	φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
LPC M, SM M, SPH M	LPC..... ,muscle	μυών
PC K PE K, LPC K,	PC.....cephalothorax	κεφαλοθωράκων
Lyso-PC, LPC	Lyso- phosphatidylcholine	λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
SM, Sph	sphingomyelin	σφιγγομυελίνη
MMA	Methylarsonic acid	Μεθυλοαρσονικό οξύ
DMA	Dimethylarsonic acid	Διμεθυλο αρσονικό οξύ
TMAO	Trimethylarsine oxide	Οξειδίο της τριμεθυλαρσίνης
TETRA		Ιόν τετραμεθυλαρσωνίου
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1,2-διπαλμιτουλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη
FS	Full scan	Πλήρης σάρωση φασμάτων μαζών
LOD	Limit Of Detection	Όριο ανίχνευσης
CDOD ₃	Chloroform- <i>d</i>	Δευτεριωμενο χλωροφόρμιο
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i>	Δευτεριωμένη μεθανόλη
LCB	long chain base	βάση μακρίας αλυσίδας
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
1D NMR	One dimensional	Φάσματα μίας διάστασης
2D NMR	Two dimensional	Φάσματα δύο διαστάσεων
dimethylarsinoylribosides	dimethylarsinoylribosides	διμεθυλο-αρσινουλ-ριβοζίτες
SPE	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
PhL	Phospholipids	Φωσφολιποειδή
FAME	Fatty acid methyl ester	Μεθελεστέρας λιπαρού οξέος
TFA	Total Fatty Acids	Ολικά Λιπαρά Οξέα
SUFA	Saturated fatty acids	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
MUFA	Monounsaturated fatty acids	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα

PUFA	Polyunsaturated fatty acids	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
FA	Fatty acid	Λιπαρό οξύ
PL	Polar lipids	Πολικά λιπίδια
TL	Total lipids	Όλικά λιπίδια
^1H NMR	Proton NMR	NMR πρωτονίου

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Α. Τσαπέ, *Ποιοτική και ποσοτική σύσταση των λιπαρών οξέων στα ολικά και πολικά λιπίδια του κεφαλοθώρακα μεσογειακού είδους γαρίδας (Penaeus kerathurus). Μελέτη με GC και με ESI-MS των κυριότερων φωσφολιπιδίων του*, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2003.
2. Λ. Κόρα, *Μελέτη της μοριακής δομής της PE, PC, PS, και PI με αναλυτικούς προσδιορισμούς, με GC και Electrospray Mass Spectrometry στους μύες της γαρίδας Penaeus kerathurus*, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2003.
3. W. Fischer, M. Bauchot and M. Schneider, *Fisches FAO d'identification des espece pour les besoin de la peche. (revision 1). Mediterranee et mer Noir Zone de peche 37. Vol.I. Vegetaux et invertebre. Publication par la FAO, resultat d'un accord entre la FAO et la Commission des Communautes Europeennes (Project GCP/INT/EEC) financee conjointement par ces deux organizations. Rome, FAO, Vol. I (37), 1987, pp. 760.*
4. W. Promwikorn, P. Kirirat, and P. Thaweethamsewee, *Index of molt staging in the black tiger shrimp (Penaeus monodon). Journal of Science and Technology, vol. 26(5), 2004, pp. 765-772.*
5. T.H. Waterman, (ed.), *The Physiology of Crustacean, Vol. 1: Metabolism and Growth. New York and London: Academic Press 1960.*
6. Δ. Λαντζουράκη, και Ε. Μαλιδέλη, *Προσδιορισμός λιπιδικών συστατικών, μετάλλων και μεταλλοειδών σε μύες και κεφαλοθώρακες των γαρίδων Aristeus antennatus και Aristaeomorpha foliacea*, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
7. J.A Gulland and B.J. Rothschild, *Penaeid Shrimps-Their Biology and Management. Published by fishing Neus Books, A. Limited, Fargham Surrey, England, 1991.*
8. R.J. Hamilton and S. Hamilton, *Lipid Analysis, A practical approach, 1st edition, Oxford University Press, 1992, ch. 3, pp. 1-12.*
9. W.W. Christie, *Lipid Analysis, 2nd edition, Pergamon Press, 1982, ch. 1, pp. 1-15.*

10. Biochemistry of lipids, *Journal of Medical Biochemistry*, 1999.
11. Ε. Φραγκίσκος, *Στερόλες και τριγλυκερίδια εδωδιμών καρκινοειδών της Μεσογείου*, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδικευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2001.
12. D.J. Hanahan, *Guide to phospholipid chemistry*. New York: Oxford University Press, 1997.
13. D.E. Vance and J. Vance, *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, 4th Edition, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science 2002.
14. D.M. Small, *The physical chemistry of lipids: From alkanes to phospholipids*, New York: Plenum Press, 1986.
15. P.M. Henson, R.C. Murphy, *Mediators of the inflammatory process*. Amsterdam: Elsevier Science, 1989.
16. M. Pulfer, and R. C. Murphy, Electrospray Mass Spectrometry of Phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 22, 2003, pp. 332-364.
17. C. Wang, J. Yang, G. Peng, L. Xin and X. Guowang, Identification of phospholipid structure in human blood by direct-injection quadrupole-linear ion-trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2005, 2443-2453.
18. H.W. Mueller, J.T. O'Flaherty, D.G. Greene, M.P. Samuel, R.L. Wykle, 1-O-alkyl-linked glycerophospholipids of human neutrophils: Distribution of a arachidonate and other acyl residues in the ether- linked and diacyl species. *J Lipid Res*, vol. 25, 1984, pp. 383-388.
19. L.A. Scherrer, R.W. Gross, Subcellular distribution, molecular dynamics and catabolism of plasmalogens in myocardium, *Mol. Cell Biochem*, vol. 88 1989, pp. 97-105.
20. A.A. Farooqui, L.A. Harrick's, Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *Neuroscientist*, vol. 7, 2001, pp. 232-245.
21. Β. Σινάνογλου, *Μελέτη της σύστασης των ολικών λιπιδίων, απομόνωση και ταυτοποίηση των φωσφολιπιδίων των κεφαλοπόδων μαλακίων Eledone moschata, Sepia officinalis και Todarodes sagitatus της Μεσογείου*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1998.
22. J.M. Clark, and R.L. Switzer, *Πειραματική Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο. Ενότητα IV, Λιπίδια και Μεμβράνες, 1992, σελ. 165-177.

23. P. Karlson, Βιοχημεία. Κεφάλαιο 14, *Φωσφολιπίδια, Γλυκολιπίδια και Γλυκοπρωτεΐνες*, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1984, σελ. 287-299.
24. J.L. Harwood, The lipid handbook. *Lipid structure*. Chapman & Hall, London, 1992.
25. Carrier, J. Parent, and S. Dupuis, Quantitation and characterization of phospholipids in pharmaceutical formulations by liquid chromatography – mass spectrometry. *J.A. Chromatogr.*, vol. 876, 2000, pp. 97-109.
26. C. Niegel, and F.M. Matysik, Analytical methods for the determination of arsenosugars-A review of recent trends and developments, *Analytica Chimica Acta*, 2010, 657, 83-89.
27. T. Gebel, Geneotoxicity of arsenical compounds. *Int J. Hyg. Environ. Health*, vol. 203, 2001, pp. 249-262.
28. V.M. Dembitsky, and T. Rezanca, Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms, *Plant Science*, 165, 2003, pp. 1177-1192.
29. V.M. Dembitsky, and D.O. Levitsky, Arsenolipids, *Progress in Lipid Research*, vol. 43, 2004, pp. 403-448.
30. D. Fattorini and F. Regoli, *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 23, 2004, pp. 1881-1887.
31. K.A. Francesconi and J.S. Edmonds, Arsenic and marine organisms. *Adv. Organomet. Chem.*, vol. 44, 1997, pp. 147-189.
32. V. Nischwitz, K. Kanaki, and S. Pergantis, Mass spectrometric identification of novel of arsinothieryl-sugars in marine bivalves and algae, *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 21, 2006, pp. 33-40.
33. S. Fukuda, M. Teresawa, and K. Shiomi, Phosphatidylarsenocholine, one of the major Arsenolipids in marine organisms: Synthesis and metabolism in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 2011.
34. M. Morita, and Y. Shibata, Isolation and identification of Arsenolipids from a brown alga, *Undaria pinnatifida* (Wakeme), *Chemosphere*, vol. 17, 1988, pp. 1147-1152.
35. K. Hanaoka, W. Goessler, K. Yoshiba, Y. Fujitaka, T. Kaise, K.J. Irgolic, Arsenocholine- and dimethylated arsenic – containing lipids in star-spotted shark *Mustelus manazo*, *Appl. Organomet. Chem.*, vol. 13, 1999, pp. 765-770.

36. K. Hanaoka, Y. Tanaka, Y. Nagata, K. Yoshida, and T. Kaise, Water soluble arsenic residues from several Arsenolipids occurring in the tissues of the starspotted shark *Mustelus manazo*, *Appl. Organomet. Chem.*, vol. 15, 2001, pp. 299-305.
37. J.S. Edmonds, Y. Shibata, K.A. Francesconi, J. Yoshinaga, and M. Morita, Arsenic lipids in the digestive gland of the western rock lobster *Panulirus Cygnus*: an investigation by HPLC ICP-MS, *Sci. Total. Environ*, vol. 122, 1992, pp. 321-335.
38. T.D. Ninh, Y. Nagashima, and K. Shiomi, Water-soluble and lipid soluble arsenic compounds in Japanese flying squid *Todarodes pacificus*. *J. Agric. Food. Chem.* vol. 55, 2007, pp. 3196-3202.
39. K. Ebisuda, T. Kunito, J. Fujihara, R. Kubota, Y. Shibata and S. Tanabe, Lipid-soluble and water-soluble arsenic compounds in blubber of ringed seal (*Pusa hispida*), *Talanta*, vol. 61, 2003, pp. 779-787.
40. S. Devalla and J. Feldmann, Determination of lipid-soluble arsenic species in seaweed-eating sheep from Orkney, *Appl. Organomet. Chem.*, vol. 17, 2003, pp. 906-912.
41. Rumpfer, J.S. Edmonds, M. Katsu, K.B. Jensen, W. Goessler, G. Raber, H. Gunnlaugsdottir and K.V. Francesconi, Arsenic –containing long- chain fatty acids in cod liver oil: a result of biosynthetic infidelity? *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, 2008, pp. 2665-2667.
42. M.S. Taleshi, K.B. Jensen, G. Raber, J.S. Edmonds, H. Gunnlaugsdottir, and K.A. Francesconi, Arsenic-containing hydrocarbons: natural compounds in oil from the fish capelin, *Mallotus villosus*, *Chem. Commun.*, vol. 39, 2008, pp. 4706-4707.
43. A.S. Pergantis, and V. Nischwitz, Improved Arsenic Speciation Analysis for Extracts of Commercially Available Edible Marine Algae Using HPLC-ES-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54(18), 2006, pp. 6507-6519.
44. Β. Ιγνατιάδου- Ραγκούση, *Χημεία Φυσικών Προϊόντων*, Αθήνα 1996.
45. C. Zhu, S. Naqvi, T. Capell and P. Christou, Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 483,182-190.
46. Sanchez-Camargo, M.A.A. Meireles, B.L.F. Lopes, and F.A. Cabral, Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted

- shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*), *J. of food engineering*, vol. 102, 2011, pp. 87-93.
47. N.M. Sachindra, N. Bhaskar, and N.S. Mahendrakar, Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, vol. 38, 2005b, pp. 221-225.
48. K. Yamaguchi, M. Murakami, H. Nakano, S. Konosu, T. Kokura, H. Yamamoto, M. Kosaka, and K. Hata, Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic krill, *J. Agric. Food Chem*, vol. 34(5), 1986, pp. 904-907.
49. T. Katayama, and T. Katama, The biosynthesis of astaxanthin. The carotenoids in the Prawn, *Penaeus japonicus* bate, *Int. J. Biochem.*, vol. 3, 1972, pp. 363-368.
50. F. Shahidi, and J. Synowiecki, Isolation and Characterization of Nutrients and Value- Added Products from Snow Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 39, 1991, pp. 1527-1532.
51. Tavani, Beta Carotene intake and risk of nonfatal acute myocardial infarction in women, *Eur. J. Epidemiol.* vol. 13, 1997, pp. 631-637.
52. Χ. Δημιζας, *P. pagrus* (Φαγκρί) κατεψυγμένο και ιχθυοκαλλιέργειας: Μελέτη της χημικής σύστασης των λιπιδίων και προσδιορισμός *Fe, Mg, Zn, Mn, Cu, Cr, Ni, Cd, Pb* και *Hg*, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2006.
53. Μηνιάδου-Μειμάρογλου, Σ. Ανόργανα συστατικά, βιταμίνες, νερό. Σημειώσεις στο μάθημα χημεία τροφίμων. Αθήνα, 1986.
54. Α. Ψαρουδάκη, Μ. Παξινού, Ι. Παπαγιαννοπούλου, και Ο. Τσαγκαράκη, Ο ρόλος των αλιευμάτων στη διατροφή και έρευνα επιπολασμού ως προς την κατανάλωση τους σε τρεις περιοχές: Ηράκλειο, Ιθάκη, Κόρινθος, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, ΤΕΙ Κρήτης, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, 2008.
55. 37-SCOOP 3.2.2011, Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States, Directorate- General Health and Consumer Protection, EU, 2004.

56. F. Paez-Osuna, and L. Tron- Mayen Concentration and distribution of heavy metals in tissues of wild and farmed shrimp *Penaeus vannamei* from the Northwest coast of Mexico. *Environ. International*, vol. 22, No. 4, 1996, pp.443-450.
57. B.A. Yilmaz, and L. Yilmaz, Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green shrimp (*Penaeus semisulcatus*), *Food Chemistry*, vol. 101, 2007, pp. 1664-1669.
58. Commission Regulation (EC) No 1881/2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff, Oj No. L 364, 20.12.06, pp. 00005-00214. EC (2006).
59. E.D. Bligh, and W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. and Physiol.* vol. 37, 1959, pp. 911-917.
60. W. Horwitz (Ed.), Official methods of analysis (17th ed.). Suite, MD: Association of Official Methods of Analysis Chemists (AOAC), 2002.
61. Δ.Γ. Μπόσκου, Μέθοδοι Ξήρανσης, Στοιχεία Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, κεφ. XVI Συντήρηση, 2002, σελ. 294-361.
62. Ε. Κωμαίτης, Λυοφυλίωση, Ειδικά Κεφάλαια Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, Αθήνα, 1998, σελ. 5-11.
63. Official Methods of Analysis of AOAC. Washington DC, USA: AOAC International, 1998.
64. A.H. Bou-Olayan, S. Al-Mattar, S. Al-Yakoob, and S. Al-Hazeem, Accumulation of lead, cadmium, copper, and nickel by pearl oyster *Pinctada radiata*, from Kuwait marine environment. *Marine Pollution Bulletin.*, vol. 30, 1995, pp. 211-214.
65. Perkin-Elmer Corp., SIMAA 6000 Atomic Absorption Spectrometer manual 1994.
66. Perkin-Elmer Corp., PE 2380 Atomic Absorption Spectrometer manual 1981.
67. R.J. Henderson, and D.R. Tocher, Thin Layer Chromatography in Lipid Analysis, A Practical Approach, edited by Hamilton R. J. and Hamilton S., Oxford University Press, 1992.
68. D.A. Skoog, Principles of instrumental Analysis. Saunders College Publishing International Edition, Third Edition. Chapter 26, Gas Chromatography, 1985, pp. 757-783.
69. P.P.A. Sims, and J.A. Larose, The use of iodine vapor as general detecting agent in the thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 39, 1962, p. 232.

70. D.S. Privett, and M.L. Black, Charring conditions for the quantitative analysis of mono-, di- and triglycerides by thin layer chromatography. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, vol. 39, 1962, p. 520.
71. J.C. Dittmer, and R.L. Lester, A simple specific spray for the detection of phospholipids on the thin layer chromatograms. *J. Lipid. Res.*, vol. 5(1), 1964, pp. 126-127
72. C. Long, and D.A. Staples, Chromatographic separation of brain lipids cerebroside and sulphatide, *J. Biochem.*, vol. 78, 1961, pp 179-185.
73. G. Simon, and G. Rouser, Species of variations in phospholipid class distribution of organs. Heart and skeletal muscle, *Lipids*, vol. 4 (6), 1969, pp. 607.
74. G. Rouser, A.N. Siakotos, and S. Fleisher, Quantitative analysis of phospholipids by thin- layer chromatography and phosphorus analysis of spots, *Lipids*, vol. 1(1), 1966, pp. 85-86.
75. S.K. Mastronicolis, J.B. German, and G.M. Smith, Isolation and fatty acid analysis of neutral and polar lipids of the food bacterium *Listeria monocytogenes*, *Food Chemistry*, vol. 57, 1996, pp. 451-456.
76. V.J. Sinanoglou, G. Papadas, D. Meimaroglou and S. Miniadis-Meimaroglou, Separation and quantification of marine lipids by modified Iatroscan-TLC- FID and GC-FID analysis. Application to total, neutral and polar lipids and their fatty acids extracted from raw and fried *Spicara smaridis*, 2009b. In Proceedings of the 6th International Conference “Instrumental Methods of analysis- IMA 2009”.
77. V.J. Sinanoglou, I.F. Strati, and S. Miniadis-Meimaroglou, Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study, *Food Chemistry*, vol. 124, 2011, pp. 971-977.
78. M.A. Wells, and J.C. Dittmer, *Biochemistry*, vol. 5, 1966, pp. 3405.
79. F. Matsuura, Phosphosphingoglycolipids, a novel sphingolipid from the viscera of *Turbo cornutus*, *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 19, 1977, pp. 223-242.
80. Θ. Μαυρομούστακος, Ι., Ματσούκας. NMR, Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Αθήνα: Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, 2006.
81. N. Culeddu, M. Bosco, and R. Toffanin, *Magn. Reson. Chem*, 36, 1998, pp. 907-912.

82. J.V. Greiner, T. Glonek, and S.L. Townsend, Hearn, Arch. Dermatol. Res., vol. 290, 1998, pp. 298-305
83. Θ. Μαυρομούστακος και Π. Ζουμπουλάκης, Μοριακή Μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία, εκδόσεις Γ. Β. Παρισιανός, Αθήνα 2008.
84. Γ. Καλαμανός, Προσδιορισμός στεροειδών αναβολικών με Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών (LC-MS/MS) σε ιστό κρέατος, Επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/EC, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2006.
85. Ν. Μαραγκού, Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ενώσεων που προκαλούν ορμονικές διαταραχές με Υγροχρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.
86. B. Barroso and R. Bischoff, LC-MS analysis of phospholipids and lysophospholipids in human bronchoalveolar lavage fluid, *Journal of Chromatogr. B*, 814, 2005, 21-28.
87. L. Pang, J. Yang, Q. Liang, Y. Wang L. Ping and G. Luo, Simultaneous determination and quantification of seven major phospholipids classes in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry and the application in diabetes nephropathy, *J. Chromatogr. B* 869, 2008, 118-125.
88. B. Brügger, G. Erben, R. Sandhoff, F.T. Wieland and W. D. Lehmann, Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, 1997, pp 2339-2344.
89. Κ. Χρυσόστομος, Προσδιορισμός ιχνοστοιχείων σε βολβούς από την περιφέρεια Ασωπού και στη γαρίδα *Parapenaeus longirostris* από την θαλάσσια περιοχή Νοτίου Ευβοϊκού, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2011.
90. P. Sriket, S. Benjakul, W. Visessanguan, and K. Kijroongrojana, Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food Chemistry*, vol 103, 2006, pp 1199-1207.

91. V. Loukas, Ch. Dimizas, V. Sinanoglou, S. Miniadis-Meimaroglou, EPA, DHA, cholesterol and phospholipid content in *Pagrus pagrus* (cultured and wild), *Trachinus draco* and *Trigla lyra* from Mediterranean Sea, *Chem. Phys. Lipids*, vol 163(3), 2010, pp 292-299.
92. Kolakowska, et. al., Winterseason krill (*Euphausia superba* D) as a source of polyunsaturated fatty acids. *Die Nahrung*, vol. 38 (2), 1994, pp. 128-134.
93. K. Gopakumar, and M.R. Nair, Lipid composition of five species of Indian Prawns, *J. Sci. Fd. Agric.*, vol. 26, 1993, pp. 319-325.
94. C.D. O'Leary, and A.D. Mathews, Lipid classes distribution and fatty acid composition of wild and farmed prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, vol. 89, 1990, pp. 65-81.
95. S. Chapelle, Lipid composition of tissues of marine crustaceans, *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 5, 1997, pp. 241-248.
96. L.M. Sparling, R. Zidovetzki, L. Muller, and I.S. Chany, Analysis of Membrane Lipids by 500 MHz ¹H NMR, *Analytical Biochemistry*, vol. 178, 1989, pp. 67-76.
97. P.A. Cheung, and L.L. Olson, ¹H- NMR assay of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in AL721, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, vol. 8, No 8-12, 1990, pp 729-734.
98. R. Sacchi, I. Medina, and L. Paolillo, One- and two- dimensional NMR studies of plasmalogens (alk-1-enyl-phosphatidylethanolamine), *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 76, 1995, pp. 201-209.
99. S. Wagner and E. Richling, LC-ESI-MS Determination of Phospholipids and Lysophospholipids, *Chromatographia*, 72, 2010, 659-664.
100. Norin. H and A. Christakopoulos, Evidence for the presence of arsenobetaine and another organoarsenical in shrimps, *Chemosphere*, vol. 11, No. 3, 1982, pp 287-298.
101. O.K. Amayo, A. Petursdottir, C. Newcombe, H. Gunnlaugsdottir, A. Raab, M.E. Krupp, and J. Feldmann, Identification and Quantification of Arsenolipids Using reversed-Phase HPLC Coupled Simultaneously to High- Resolution ICPMS and High-Resolution Electrospray MS without Species –Specific Standards, *Anal. Chem*, vol. 83, 2011, pp. 3589-3595.

102. X. Cao, C. Hao, G. Wang, H. Yang, D. Chen, and X. Wang, Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products, *Food Chemistry*, vol.113, 2009, pp. 720-726.
103. S. N. Manjabhat, B. Narayan and M. N. Subbanna, Carotenoids in *Solonocera indica* and *Aristeus alcocki*, deep-sea shrimp from Indian waters. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 15(2), 2006, 5-16.
- 104.R. Armenta, and I. Guerrero-Legarreta, Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins, *Food Chemistry*, vol. 112(2), 2009, pp. 310–315.
- 105.L. Yousuf, M.H, E.I. Sahawi, and Al-Ghais, S.M, Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex, *The science of the Total Environment*, 256, 2000, 87-94.
- 106.H. Jia, H. Kim, S. Maita, M. Sato, S. Yasui, M. Endo, and T. Hayashi, Effect of Chinese parsley *Coriandrum sativum* and chitosan on inhibiting the accumulation of cadmium in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Fisheries Science*, 72, 2006, 263-269.
- 107.G.G. Pyle, J.W. Rajotte and P. Couture, Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 2005, 287-312.
- 108.Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, Washington, D.C.: National Academy Press, 2001.

