

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

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 3^η : Ποιότητα σφαγίου και κρέατος ορνίθων

Παραδοτέο: D3_P1α1

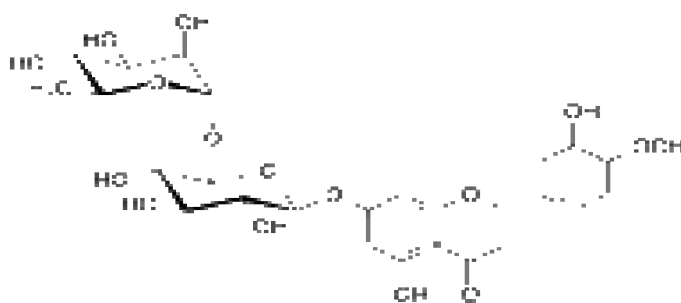
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΝΑΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΙΤΙΝΗΣ, ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΟΡΝΙΘΩΝ (ΤΡΙΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ)



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΙΤΙΝΗΣ, ΝΑΡΙΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΟΡΝΙΘΩΝ

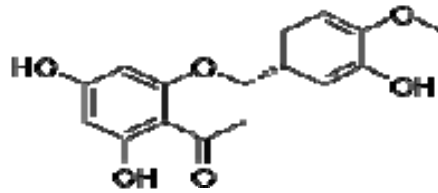
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΡΙΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ, ΕΣΠΕΡΙΤΙΝΗΣ, ΝΑΡΙΓΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΓΕΝΙΝΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΟΡΝΙΘΩΝ

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

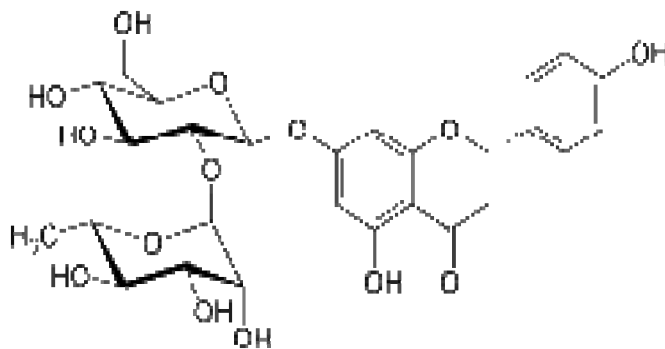


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

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

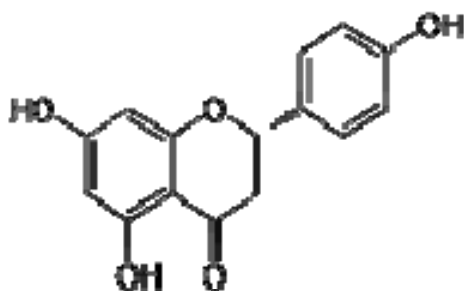


Σχήμα 2. Χημική δομή Εσπεριτίνης ($C_{16}H_{14}O_6$) με Μοριακό Βάρος, $MW=302,27$ g/mol.



Σχήμα 3. Χημική δομή Ναριγίνης ($C_{27}H_{32}O_{14}$) με Μοριακό Βάρος, $MW=580,54$ g/mol.





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

Φύλαξη Δειγμάτων

Τα δείγματα φυλάχθηκαν σε καταψύκτες βαθείας κατάψυξης ($-85^{\circ}C$). Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, τα δείγματα ξεπαγώναν σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τη μεταφορά της απαιτούμενης ποσότητας σε φιαλίδια αποθήκευσης δειγμάτων (Eppendorf tubes) μεταφέρονταν ξανά στους καταψύκτες βαθείας κατάψυξης ($-85^{\circ}C$).

Προετοιμασία Δειγμάτων

Για την επικύρωση της προτεινόμενης μεθοδολογίας κατασκευάστηκαν τρεις (3) καμπύλες αναφοράς εύρους από 5 ng/mL έως 1 μg/mL τόσο με δείγματα προ-



εκχυλίσεως (pre-spike calibration curves) όσο και με δείγματα μετα- της εκχυλίσεως (post-spike calibration curves). Παράλληλα, προετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας σε 5 επίπεδα (Quality Control Samples), επί 6 φορές σε κάθε επίπεδο. Τέλος, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς εύρους από 5 ng/mL έως 1 µg/mL σε διαλύτη μεθανόλη:νερό 1:1 (v/v).

A. Προετοιμασία Αγνώστων Δειγμάτων προς Ανάλυση: Σε 50 µl δείγματος πλάσμα προστέθηκαν 100 µl εσωτερικού προτύπου 4-iodophenol (2 µg/mL) διαλυμένο σε διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v). Ακολούθησε κατακρήμνιση με 400 µl ακετόνης, έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση στις 13.500 rpm 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Eppendorf tube) και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 50 µl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

B. Προετοιμασία Δειγμάτων προ- της Εκχυλίσεως (pre-spike): Σε 50 µl πλάσματος από μάρτυρα προστέθηκαν 10 µl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη-νερό (1:1 v/v) σε εύρος συγκεντρώσεων από 5 ng/mL έως 1 µg/mL. Ακολούθησε κατακρήμνιση με προσθήκη 400 µl ακετόνης. Μετά την κατακρήμνιση έγινε έντονη ανάδευση (vortex) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Eppendorf tube) και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 50 µl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).



Γ. Προετοιμασία Δειγμάτων μετά- της Εκχυλίσσεως (post-spike): Σε 50 μl πλάσματος από μάρτυρα προστέθηκαν 10 μl νερό. Ακολούθησε κατακρήμνιση με 400 ul ακετόνης. Μετά την κατακρήμνιση έγινε έντονη ανάδευση (vortex) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Eppendorf tube) όπου και προστέθηκαν 10 ul από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v), σε εύρος συγκεντρώσεων από 5 ng/mL έως 1 μg/mL. Ακολούθησε εξάτμιση ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac και επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 50 μl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

Δ. Προετοιμασία Δειγμάτων Ελέγχου Ποιότητας (Quality Control Samples): Σε 50 μl πλάσματος από μάρτυρα προστέθηκαν 10 μl από διάλυμα και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη-νερό (1:1 v/v). Συνολικά προετοιμάστηκαν 6 επαναλήψεις για τις συγκεντρώσεις των 15 ng/mL (LQC), 130 ng/mL (MQC), 450 ng/mL (HQC), 5 ng/mL (LLOQ) και 5 μg/mL (ULOQ). Ακολούθησε κατακρήμνιση με προσθήκη 400 ul ακετόνης. Μετά την κατακρήμνιση έγινε έντονη ανάδευση (vortex) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13.500 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ξεχωριστό φιαλίδιο (Eppendorf tube) και εξατμίστηκε ήπια μέχρι ξηρού με φυγοκέντρηση υπό ελαττωμένη πίεση σε μηχανήμα Lyospeed HT-4X GenVac. Ακολούθησε επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε 50 μl διαλύτη μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).

Ε. Προετοιμασία Καμπύλης Αναφοράς σε Διαλύτη Μεθανόλη:Νερό 1:1 (v/v): Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφορά εύρους 5 ng/mL έως 1 μg/mL και των τεσσάρων μορίων σε διαλύτη μεθανόλη:νερό σε αναλογία 1:1 (v/v).



Αλληλουχία Ανάλυσης Δειγμάτων

Τα δείγματα αναλύθηκαν στο μηχάνημα UHPLC-LTQ Orbitrap Velos. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στα δυο φασματόμετρα μάζας, Linear Ion Trap και Orbitrap. Σκοπός ήταν η σύγκριση των σταδίων επικύρωσης της μεθοδολογίας στα δυο φασματόμετρα. Η σειρά με την οποία αναλύθηκαν τα δείγματα περιγράφεται στον πίνακα 1.

Sample Type	File Name	Position
Unknown	BLANK_1_IT	C:1
Unknown	BLANK_2_IT	C:1
Unknown	BLANK_3_IT	C:1
Unknown	70NG_QC_1_IT	C:2
Unknown	BLANK_4_IT	C:1
Unknown	70NG_QC_2_IT	C:2
Unknown	BLANK_5_IT	C:1
Unknown	70NG_QC_3_IT	C:2
Unknown	BLANK_6_IT	C:1
Unknown	70NG_QC_3a_IT	C:2
Unknown	BLANK_6a	C:1
Unknown	BLANK_7_IT	C:1
Unknown	5NG_MEOH_H2O_IT	C:3
Unknown	10NG_MEOH_H2O_IT	C:4
Unknown	20NG_MEOH_H2O_IT	C:5
Unknown	50NG_MEOH_H2O_IT	C:6
Unknown	70NG_MEOH_H2O_IT	C:7
Unknown	70NG_QC_4_IT	C:2
Unknown	BLANK_8_IT	C:1
Unknown	100NG_MEOH_H2O_IT	C:8

Καμπύλη Αναφοράς:

MeOH:H₂O 1:1 (v/v) η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap



Unknown	250NG_MEOH_H2O_IT	C:9
Unknown	400NG_MEOH_H2O_IT	C:10
Unknown	500NG_MEOH_H2O_IT	C:11
Unknown	700NG_MEOH_H2O_IT	C:12
Unknown	1UG_MEOH_H2O_IT	C:13
Unknown	70NG_QC_5_IT	C:2
Unknown	BLANK_9_IT	C:1
Unknown	BLANK_10_IT	C:1
Unknown	5NG_PRE_1_IT	C:14
Unknown	10NG_PRE_1_IT	C:15
Unknown	20NG_PRE_1_IT	C:16
Unknown	50NG_PRE_1_IT	C:17
Unknown	70NG_PRE_1_IT	C:18
Unknown	70NG_QC_6_IT	C:2
Unknown	BLANK_11_IT	C:1
Unknown	100NG_PRE_1_IT	C:19
Unknown	250NG_PRE_1_IT	C:20
Unknown	400NG_PRE_1_IT	C:21
Unknown	500NG_PRE_1_IT	C:22
Unknown	700NG_PRE_1_IT	C:23
Unknown	1UG_PRE_1_IT	C:24
Unknown	70NG_QC_7_IT	C:2
Unknown	BLANK_12_IT	C:1
Unknown	BLANK_13_IT	C:1
Unknown	5NG_PRE_2_IT	C:25
Unknown	10NG_PRE_2_IT	C:26

Καμπύλη Αναφοράς:

1 pre-spike η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Unknown	20NG_PRE_2_IT	C:27
Unknown	50NG_PRE_2_IT	C:28
Unknown	70NG_PRE_2_IT	C:29
Unknown	70NG_QC_8_IT	C:2
Unknown	BLANK_14_IT	C:1
Unknown	100NG_PRE_2_IT	C:30
Unknown	250NG_PRE_2_IT	C:31
Unknown	400NG_PRE_2_IT	C:32
Unknown	500NG_PRE_2_IT	C:33
Unknown	700NG_PRE_2_IT	C:34
Unknown	1UG_PRE_2_IT	C:35
Unknown	70NG_QC_9_IT	C:2
Unknown	BLANK_15_IT	C:1
Unknown	BLANK_16_IT	C:1
Unknown	5NG_PRE_3_IT	C:36
Unknown	10NG_PRE_3_IT	C:37
Unknown	20NG_PRE_3_IT	C:38
Unknown	50NG_PRE_3_IT	C:39
Unknown	70NG_PRE_3_IT	C:40
Unknown	70NG_QC_10_IT	C:2
Unknown	BLANK_17_IT	C:1
Unknown	100NG_PRE_3_IT	D:1
Unknown	250NG_PRE_3_IT	D:2
Unknown	400NG_PRE_3_IT	D:3
Unknown	500NG_PRE_3_IT	D:4
Unknown	700NG_PRE_3_IT	D:5
Unknown	1UG_PRE_3_IT	D:6
Unknown	70NG_QC_11_IT	C:2
Unknown	BLANK_18_IT	C:1
Unknown	BLANK_19_IT	C:1
Unknown	5NG_POST_1_IT	D:7
Unknown	10NG_POST_1_IT	D:8

Καμπύλη Αναφοράς:

2 pre-spike η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap

Καμπύλη Αναφοράς:

3 pre-spike η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap



Unknown	20NG_POST_1_IT	D:9
Unknown	50NG_POST_1_IT	D:10
Unknown	70NG_POST_1_IT	D:11
Unknown	70NG_QC_12_IT	C:2
Unknown	BLANK_20_IT	C:1
Unknown	100NG_POST_1_IT	D:12
Unknown	250NG_POST_1_IT	D:13
Unknown	400NG_POST_1_IT	D:14
Unknown	500NG_POST_1_IT	D:15
Unknown	700NG_POST_1_IT	D:16
Unknown	1UG_POST_1_IT	D:17
Unknown	70NG_QC_13_IT	C:2
Unknown	BLANK_21_IT	C:1
Unknown	BLANK_22_IT	C:1
Unknown	5NG_POST_2_IT	D:18
Unknown	10NG_POST_2_IT	D:19
Unknown	20NG_POST_2_IT	D:20
Unknown	50NG_POST_2_IT	D:21
Unknown	70NG_POST_2_IT	D:22
Unknown	70NG_QC_14_IT	C:2
Unknown	BLANK_23_IT	C:1
Unknown	100NG_POST_2_IT	D:23
Unknown	250NG_POST_2_IT	D:24
Unknown	400NG_POST_2_IT	D:25
Unknown	500NG_POST_2_IT	D:26
Unknown	700NG_POST_2_IT	D:27
Unknown	1UG_POST_2_IT	D:28
Unknown	70NG_QC_15_IT	C:2
Unknown	BLANK_24_IT	C:1
Unknown	BLANK_25_IT	C:1
Unknown	5NG_POST_3_IT	D:29
Unknown	10NG_POST_3_IT	D:30

Καμπύλη Αναφοράς:

1 post-spike η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap

Καμπύλη Αναφοράς:

2 post-spike η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap



Unknown	20NG_POST_3_IT	D:31
Unknown	50NG_POST_3_IT	D:32
Unknown	70NG_POST_3_IT	D:33
Unknown	70NG_QC_16_IT	C:2
Unknown	BLANK_26_IT	C:1
Unknown	100NG_POST_3_IT	D:34
Unknown	250NG_POST_3_IT	D:35
Unknown	400NG_POST_3_IT	D:36
Unknown	500NG_POST_3_IT	D:37
Unknown	700NG_POST_3_IT	D:38
Unknown	1UG_POST_3_IT	D:39
Unknown	70NG_QC_17_IT	C:2
Unknown	BLANK_27_IT	C:1
Unknown	BLANK_28_IT	C:1
Unknown	LQC_1_IT	E:1
Unknown	LQC_2_IT	E:2
Unknown	LQC_3_IT	E:3
Unknown	LQC_4_IT	E:4
Unknown	LQC_5_IT	E:5
Unknown	LQC_6_IT	E:6
Unknown	70NG_QC_18_IT	C:2
Unknown	BLANK_29_IT	C:1
Unknown	MQC_1_IT	E:7
Unknown	MQC_2_IT	E:8
Unknown	MQC_3_IT	E:9
Unknown	MQC_4_IT	E:10
Unknown	MQC_5_IT	E:11
Unknown	MQC_6_IT	E:12
Unknown	70NG_QC_19_IT	C:2
Unknown	BLANK_30_IT	C:1
Unknown	HQC_1_IT	E:13
Unknown	HQC_2_IT	E:14

Καμπύλη Αναφοράς:

3 post-spike η οποία αναλύθηκε στο Linear Ion Trap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Χαμηλής Συγκέντρωσης (LQC) στο Linear Ion Trap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Μέσης Συγκέντρωσης (MQC) στο Linear Ion Trap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Υψηλής Συγκέντρωσης (HQC) στο Linear Ion Trap



Unknown	HQC_3_IT	E:15
Unknown	HQC_4_IT	E:16
Unknown	HQC_5_IT	E:17
Unknown	HQC_6_IT	E:18
Unknown	70NG_QC_20_IT	C:2
Unknown	BLANK_31_IT	C:1
Unknown	BLANK_32_IT	C:1
Unknown	LLQC_1_IT	E:19
Unknown	LLQC_2_IT	E:20
Unknown	LLQC_3_IT	E:21
Unknown	LLQC_4_IT	E:22
Unknown	LLQC_5_IT	E:23
Unknown	LLQC_6_IT	E:24
Unknown	70NG_QC_21_IT	C:2
Unknown	BLANK_33_IT	C:1
Unknown	ULQC_1_IT	E:25
Unknown	ULQC_2_IT	E:26
Unknown	ULQC_3_IT	E:27
Unknown	ULQC_4_IT	E:28
Unknown	ULQC_5_IT	E:29
Unknown	ULQC_6_IT	E:30
Unknown	70NG_QC_22_IT	C:2
Unknown	BLANK_34_IT	C:1
Unknown	BLANK_35_IT	C:1
Unknown	BLANK_36_FT	C:1
Unknown	BLANK_2_FT	C:1
Unknown	70NG_QC_1_FT	C:2
Unknown	BLANK_3_FT	C:1
Unknown	BLANK_4_FT	C:1
Unknown	70NG_QC_2_FT	C:2
Unknown	BLANK_5_FT	C:1
Unknown	70NG_QC_3_FT	C:2

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας
Εγγυημένου ορίου
Ποσοτικοποίησης (LLOQ) στο
Linear Ion Trap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας
Υψηλότερου Σημείου
Καμπύλης Αναφοράς (ULOQ)
στο Linear Ion Trap

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

Unknown	BLANK_6_FT	C:1
Unknown	BLANK_7_FT	C:1
Unknown	5NG_MEOH_H2O_FT	C:3
Unknown	10NG_MEOH_H2O_FT	C:4
Unknown	20NG_MEOH_H2O_FT	C:5
Unknown	50NG_MEOH_H2O_FT	C:6
Unknown	70NG_MEOH_H2O_FT	C:7
Unknown	70NG_QC_4_FT	C:2
Unknown	BLANK_8_FT	C:1
Unknown	100NG_MEOH_H2O_FT	C:8
Unknown	250NG_MEOH_H2O_FT	C:9
Unknown	400NG_MEOH_H2O_FT	C:10
Unknown	500NG_MEOH_H2O_FT	C:11
Unknown	700NG_MEOH_H2O_FT	C:12
Unknown	1UG_MEOH_H2O_FT	C:13
Unknown	70NG_QC_5_FT	C:2
Unknown	BLANK_9_FT	C:1
Unknown	BLANK_10_FT	C:1
Unknown	5NG_PRE_1_FT	C:14
Unknown	10NG_PRE_1_FT	C:15
Unknown	20NG_PRE_1_FT	C:16
Unknown	50NG_PRE_1_FT	C:17
Unknown	70NG_PRE_1_FT	C:18
Unknown	70NG_QC_6_FT	E:32
Unknown	BLANK_11_FT	E:31
Unknown	100NG_PRE_1_FT	C:19
Unknown	250NG_PRE_1_FT	C:20
Unknown	400NG_PRE_1_FT	C:21
Unknown	500NG_PRE_1_FT	C:22
Unknown	700NG_PRE_1_FT	C:23
Unknown	1UG_PRE_1_FT	C:24
Unknown	70NG_QC_7_FT	E:32

Καμπύλη Αναφοράς:

MeOH:H₂O 1:1 (v/v) η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap

Καμπύλη Αναφοράς:

1 pre-spike η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap



Unknown	BLANK_12_FT	E:31
Unknown	BLANK_13_FT	E:31
Unknown	5NG_PRE_2_FT	C:25
Unknown	10NG_PRE_2_FT	C:26
Unknown	20NG_PRE_2_FT	C:27
Unknown	50NG_PRE_2_FT	C:28
Unknown	70NG_PRE_2_FT	C:29
Unknown	70NG_QC_8_FT	E:32
Unknown	BLANK_14_FT	E:31
Unknown	100NG_PRE_2_FT	C:30
Unknown	250NG_PRE_2_FT	C:31
Unknown	400NG_PRE_2_FT	C:32
Unknown	500NG_PRE_2_FT	C:33
Unknown	700NG_PRE_2_FT	C:34
Unknown	1UG_PRE_2_FT	C:35
Unknown	70NG_QC_9_FT	E:32
Unknown	BLANK_15_FT	E:31
Unknown	BLANK_16_FT	E:31
Unknown	5NG_PRE_3_FT	C:36
Unknown	10NG_PRE_3_FT	C:37
Unknown	20NG_PRE_3_FT	C:38
Unknown	50NG_PRE_3_FT	C:39
Unknown	70NG_PRE_3_FT	C:40
Unknown	70NG_QC_10_FT	E:32
Unknown	BLANK_17_FT	E:31
Unknown	100NG_PRE_3_FT	D:1
Unknown	250NG_PRE_3_FT	D:2
Unknown	400NG_PRE_3_FT	D:3
Unknown	500NG_PRE_3_FT	D:4
Unknown	700NG_PRE_3_FT	D:5
Unknown	1UG_PRE_3_FT	D:6
Unknown	70NG_QC_11_FT	E:32

Καμπύλη Αναφοράς:

2 pre-spike η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap

Καμπύλη Αναφοράς:

3 pre-spike η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap



Unknown	BLANK_18_FT	E:31
Unknown	BLANK_19_FT	E:31
Unknown	5NG_POST_1_FT	D:7
Unknown	10NG_POST_1_FT	D:8
Unknown	20NG_POST_1_FT	D:9
Unknown	50NG_POST_1_FT	D:10
Unknown	70NG_POST_1_FT	D:11
Unknown	70NG_QC_12_FT	E:32
Unknown	BLANK_20_FT	E:31
Unknown	100NG_POST_1_FT	D:12
Unknown	250NG_POST_1_FT	D:13
Unknown	400NG_POST_1_FT	D:14
Unknown	500NG_POST_1_FT	D:15
Unknown	700NG_POST_1_FT	D:16
Unknown	1UG_POST_1_FT	D:17
Unknown	70NG_QC_13_FT	E:32
Unknown	BLANK_21_FT	E:31
Unknown	BLANK_22_FT	E:31
Unknown	5NG_POST_2_FT	D:18
Unknown	10NG_POST_2_FT	D:19
Unknown	20NG_POST_2_FT	D:20
Unknown	50NG_POST_2_FT	D:21
Unknown	70NG_POST_2_FT	D:22
Unknown	70NG_QC_14_FT	E:32
Unknown	BLANK_23_FT	E:31
Unknown	100NG_POST_2_FT	D:23
Unknown	250NG_POST_2_FT	D:24
Unknown	400NG_POST_2_FT	D:25
Unknown	500NG_POST_2_FT	D:26
Unknown	700NG_POST_2_FT	D:27
Unknown	1UG_POST_2_FT	D:28
Unknown	70NG_QC_15_FT	E:32

Καμπύλη Αναφοράς:
1 post-spike η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap

Καμπύλη Αναφοράς:
2 post-spike η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Unknown	BLANK_24_FT	E:31
Unknown	BLANK_25_FT	E:31
Unknown	5NG_POST_3_FT	D:29
Unknown	10NG_POST_3_FT	D:30
Unknown	20NG_POST_3_FT	D:31
Unknown	50NG_POST_3_FT	D:32
Unknown	70NG_POST_3_FT	D:33
Unknown	70NG_QC_16_FT	E:32
Unknown	BLANK_26_FT	E:31
Unknown	100NG_POST_3_FT	D:34
Unknown	250NG_POST_3_FT	D:35
Unknown	400NG_POST_3_FT	D:36
Unknown	500NG_POST_3_FT	D:37
Unknown	700NG_POST_3_FT	D:38
Unknown	1UG_POST_3_FT	D:39
Unknown	70NG_QC_17_FT	E:32
Unknown	BLANK_27_FT	E:31
Unknown	BLANK_28_FT	E:31
Unknown	BLANK_29_FT	E:31
Unknown	LQC_1_FT	E:1
Unknown	LQC_2_FT	E:2
Unknown	LQC_3_FT	E:3
Unknown	LQC_4_FT	E:4
Unknown	LQC_5_FT	E:5
Unknown	LQC_6_FT	E:6
Unknown	70NG_QC_18_FT	E:32
Unknown	BLANK_30_FT	E:31
Unknown	MQC_1_FT	E:7
Unknown	MQC_2_FT	E:8
Unknown	MQC_3_FT	E:9
Unknown	MQC_4_FT	E:10

Καμπύλη Αναφοράς:
3 post-spike η οποία αναλύθηκε στο Orbitrap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Χαμηλής Συγκέντρωσης (LQC) στο Orbitrap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Μέσης Συγκέντρωσης (MQC) στο Orbitrap

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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Unknown	MQC_5_FT	E:11
Unknown	MQC_6_FT	E:12
Unknown	70NG_QC_19_FT	E:32
Unknown	BLANK_31_FT	E:31
Unknown	HQC_1_FT	E:13
Unknown	HQC_2_FT	E:14
Unknown	HQC_3_FT	E:15
Unknown	HQC_4_FT	E:16
Unknown	HQC_5_FT	E:17
Unknown	HQC_6_FT	E:18
Unknown	70NG_QC_20_FT	E:32
Unknown	BLANK_32_FT	E:31
Unknown	BLANK_33_FT	E:31
Unknown	LLQC_1_FT	E:19
Unknown	LLQC_2_FT	E:20
Unknown	LLQC_3_FT	E:21
Unknown	LLQC_4_FT	E:22
Unknown	LLQC_5_FT	E:23
Unknown	LLQC_6_FT	E:24
Unknown	70NG_QC_21_FT	E:32
Unknown	BLANK_34_FT	E:31
Unknown	ULQC_1_FT	E:25
Unknown	ULQC_2_FT	E:26
Unknown	ULQC_3_FT	E:27
Unknown	ULQC_4_FT	E:28
Unknown	ULQC_5_FT	E:29
Unknown	ULQC_6_FT	E:30
Unknown	70NG_QC_22_FT	E:32
Unknown	BLANK_35_FT	E:31
Unknown	BLANK_36_FT	E:31
Unknown	BLANK_37_FT	E:31

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Υψηλής Συγκέντρωσης (HQC) στο Orbitrap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Εγγυημένου Ορίου Ποσοτικοποίησης (LLOQ) στο Orbitrap

Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας Υψηλότερου Σημείου Καμπύλης Αναφοράς (ULOQ) στο Orbitrap



Πίνακας 1. Αλληλουχία ανάλυσης των δειγμάτων επικύρωσης της μεθοδολογίας στα φασματόμετρα μάζας Orbitrap και στο Linear Ion Trap.

Μεθοδολογία

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε αρνητικό ιονισμό. Η αναλογία των διαλυτών ήταν η κάτωθεν:

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

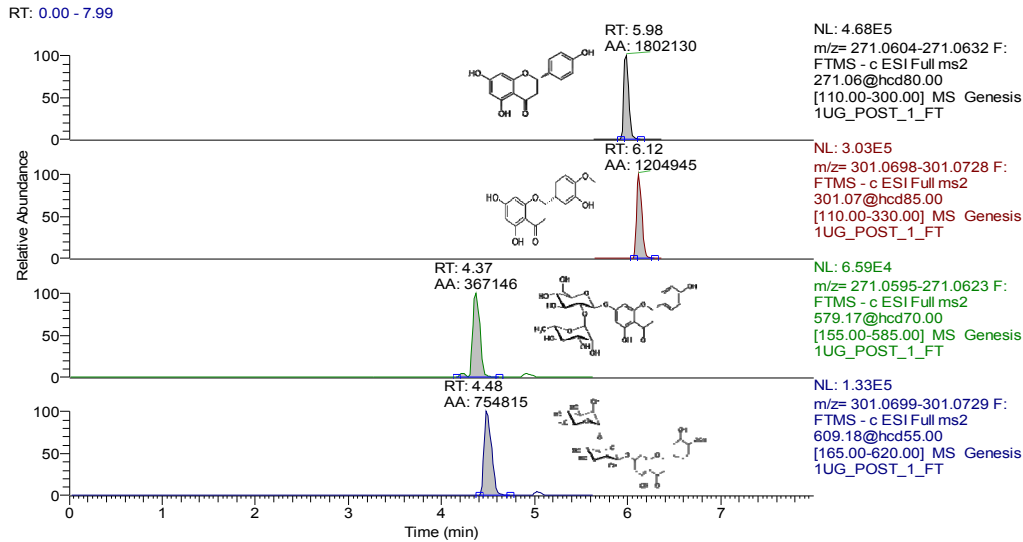
όπου, A: H₂O, 0.1% acetic acid

B: Acetonitrile

C: Ipro:ACN:Acetone 58:40:2

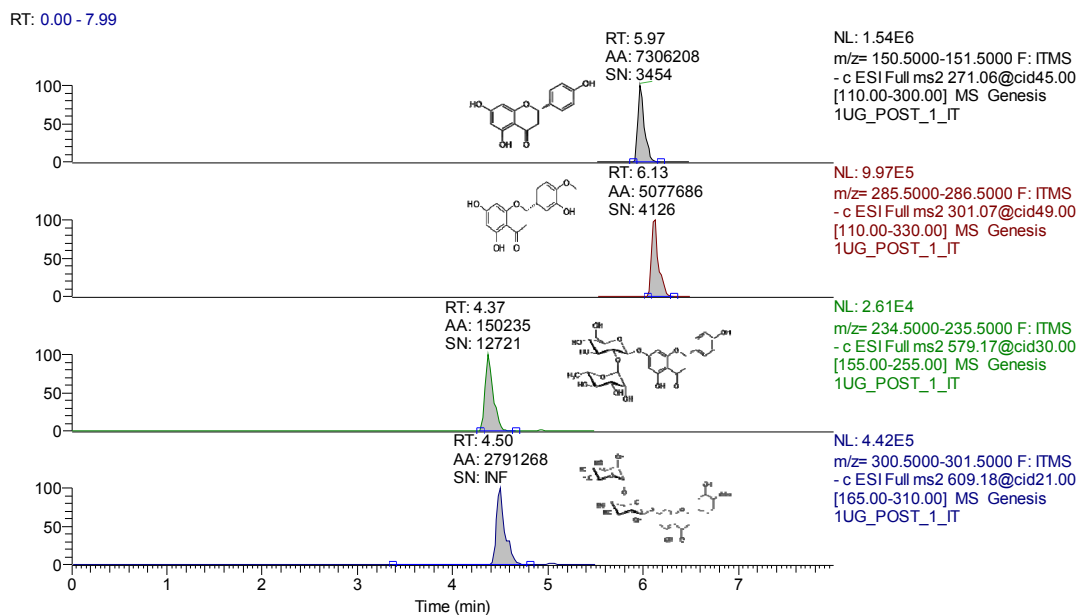


Τα 4 μόρια ανιχνεύονταν και στα δυο φασματόμετρα μάζας Orbitrap (Σχήμα 5) και Linear Ion Trap (Σχήμα 6).



Σχήμα 5. Χρωματογράφημα των τεσσάρων υπό ανάλυση μορίων στο Orbitrap.





Σχήμα 6. Χρωματογράφημα των τεσσάρων υπό ανάλυση μορίων στο Linear Ion Trap.

Επικύρωση Μεθοδολογίας

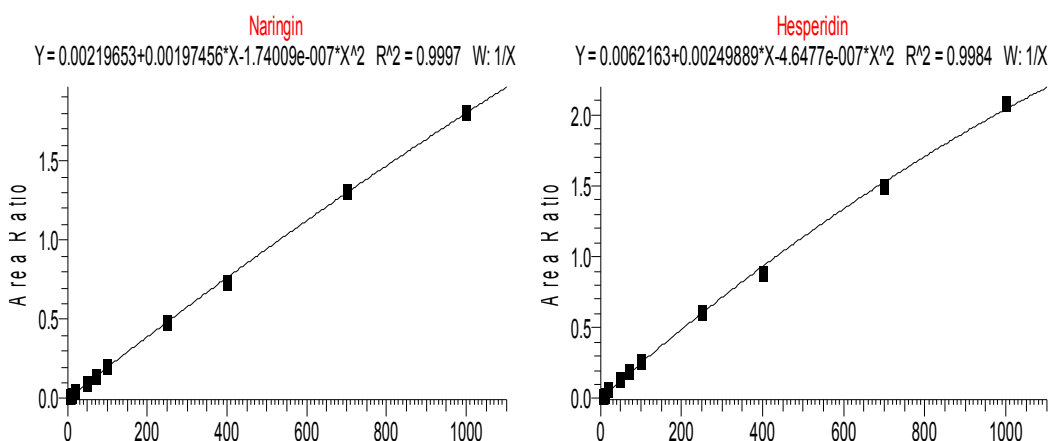
Η επικύρωση της προτεινόμενης μεθοδολογίας περιλάμβανε την ανάλυση και επεξεργασία των κάτωθεν σταδίων:

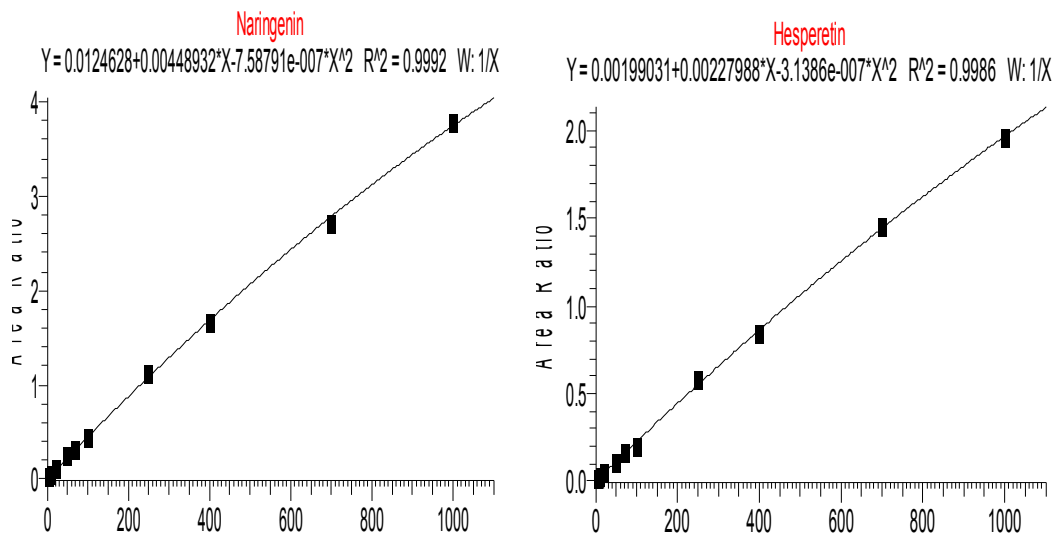
- Γραμμικότητα
- Ακρίβεια
- Επαναληψιμότητα
- Ποσοστό Ανάκτησης



Τα δείγματα αναλύθηκαν στα φασματομέτρα μάζας Orbitrap και Linear Ion Trap. Σκοπός ήταν η σύγκριση των αποτελεσμάτων για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων με το φασματομέτρο που θα εξασφάλιζε τη μέγιστη επαναληψιμότητα, ακρίβεια και ευαισθησία.

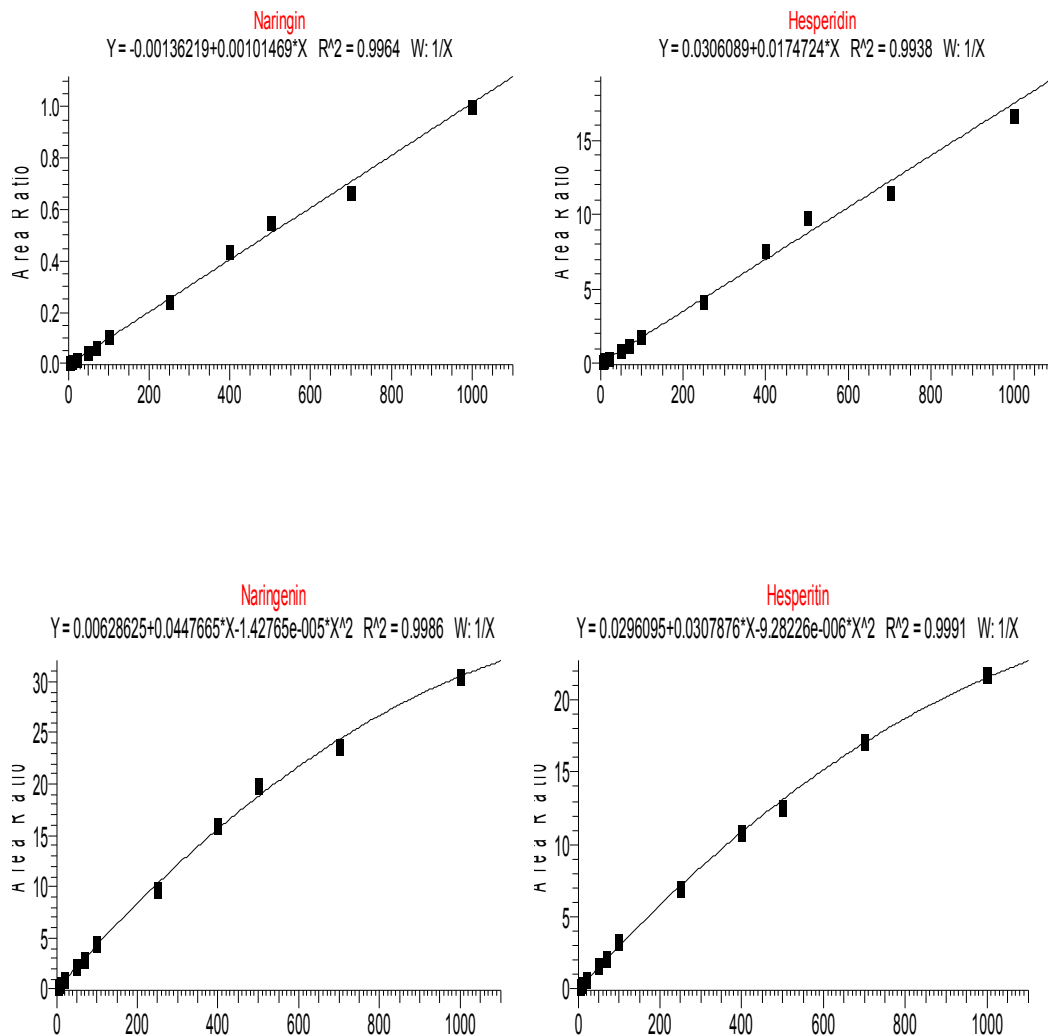
Γραμμικότητα: Μελετήσαμε τη γραμμικότητα και των τεσσάρων ουσιών σε εύρος από 5 ng/mL έως 1 μg/mL και στα δυο φασματομέτρα (Orbitrap, Linear Ion Trap) παρατηρώντας παρόμοια αποτελέσματα (Σχήμα 7,8).





Σχήμα 7. Καμπύλη αναφοράς σε διαλύτη μεθανόλη:νερό 1:1 (v/v) εύρους 5 ng/mL έως 1 μg/mL για τα μόρια Ναργινίνη, Εσπεριδίνη, Ναργενίνη και Εσπεριτίνη χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο μάζας Orbitrap.





Σχήμα 8. Καμπύλη αναφοράς σε διαλύτη μεθανόλη:νερό 1:1 (v/v) εύρους 5 ng/mL έως 1 µg/mL για τα μόρια Ναργινίνη, Εσπεριδίνη, Ναργενίνη και Εσπεριτίνη χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο μάζας Linear Ion Trap.



Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα: Η ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθοδολογίας περιγράφει την εγγύτητα των επαναλαμβανόμενων ανεξάρτητων μετρήσεων ενός διαλύτη. Ο έλεγχος της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων ποιότητας (Quality Control Samples) σε 5 επίπεδα (ULOQ, LLOQ, low, medium, high QC samples) επί 6 φορές σε κάθε επίπεδο με τη χρήση και των δυο φασματομέτρων μάζας (Πίνακας 2,3).

	LLOQ (5ng/mL)	Low Quality Control (15 ng/mL)	Medium Quality Control (130 ng/mL)	High Quality Control (450 ng/mL)	ULOQ (5μg/mL)
Hesperidin	15.20%	-	4.26%	11.38%	5.84%
Naringin	14.13%	8.73%	4.65%	9.74%	6.97%
Hesperetin	20.09%	13.93%	6.38%	6.41%	11.23%
Naringenin	18.21%	10.05%	3.77%	7.01%	8.69%

Πίνακας 2. Ανάλυση δειγμάτων ποιότητας (Quality Control Samples) στο Orbitrap σε 5 επίπεδα (ULOQ, LLOQ, low, medium and high QC samples) εκφραζόμενα σε % RSD. Οι τιμές δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 15% για τα δείγματα ποιότητας, με εξαίρεση το LLOQ το οποίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20%.



	LLOQ (5ng/mL)	Low Quality Control (15 ng/mL)	Medium Quality Control (130 ng/mL)	High Quality Control (450 ng/mL)	ULOQ (5μg/mL)
Hesperidin	9.55%	12.29%	7.00%	10.02%	5.46%
Naringin	15.85%	11.06%	7.48%	8.31%	4.55%
Hesperetin	20.17%	6.09%	8.40%	11.03%	4.10%
Naringenin	17.45%	7.55%	8.40%	11.87%	4.10%

Πίνακας 3. Ανάλυση δειγμάτων ποιότητας (Quality Control Samples) στο Linear Ion Trap σε 5 επίπεδα (ULOQ, LLOQ, low, medium and high QC samples) εκφραζόμενα σε % RSD. Οι τιμές δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 15% για τα δείγματα ποιότητας, με εξαίρεση το LLOQ το οποίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20%.

Ποσοστό Ανάκτησης: Για την εύρεση του ποσοστού ανάκτησης και των τεσσάρων μορίων, έγινε σύγκριση τριών καμπυλών αναφοράς δειγμάτων προ- της εκχυλίσεως (pre-spike calibration curves) και μετα- της εκχυλίσεως (post-spike calibration curves) $\{R\% = (\text{average area pre-spike} / \text{average area post-spike}) \times 100\}$ σε 3 επίπεδα ελέγχου. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στα δυο φασματόμετρα μάζας (Πίνακας 4, 5).

	Ποσοστό Ανάκτησης (%)			
Συγκέντρωση (ng/ml)	Narigin	Hesperidin	Naringenin	Hesperetin
10	72.12	88.99	79.11	81.10



250	102.28	90.74	85.85	88.72
700	107.35	104.98	86.35	107.55

Πίνακας 4. Ποσοστό ανάκτησης των τεσσάρων μορίων ύστερα από σύγκριση τριών καμπυλών αναφοράς δειγμάτων προ- της εκχυλίσεως (pre-spike calibration curves) και μετα- της εκχυλίσεως (post-spike calibration curves), χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο μάζας Orbitrap. Οι τιμές εκφράζονται ως $R\% = (\text{average area pre-spike} / \text{average area post-spike}) \times 100$.

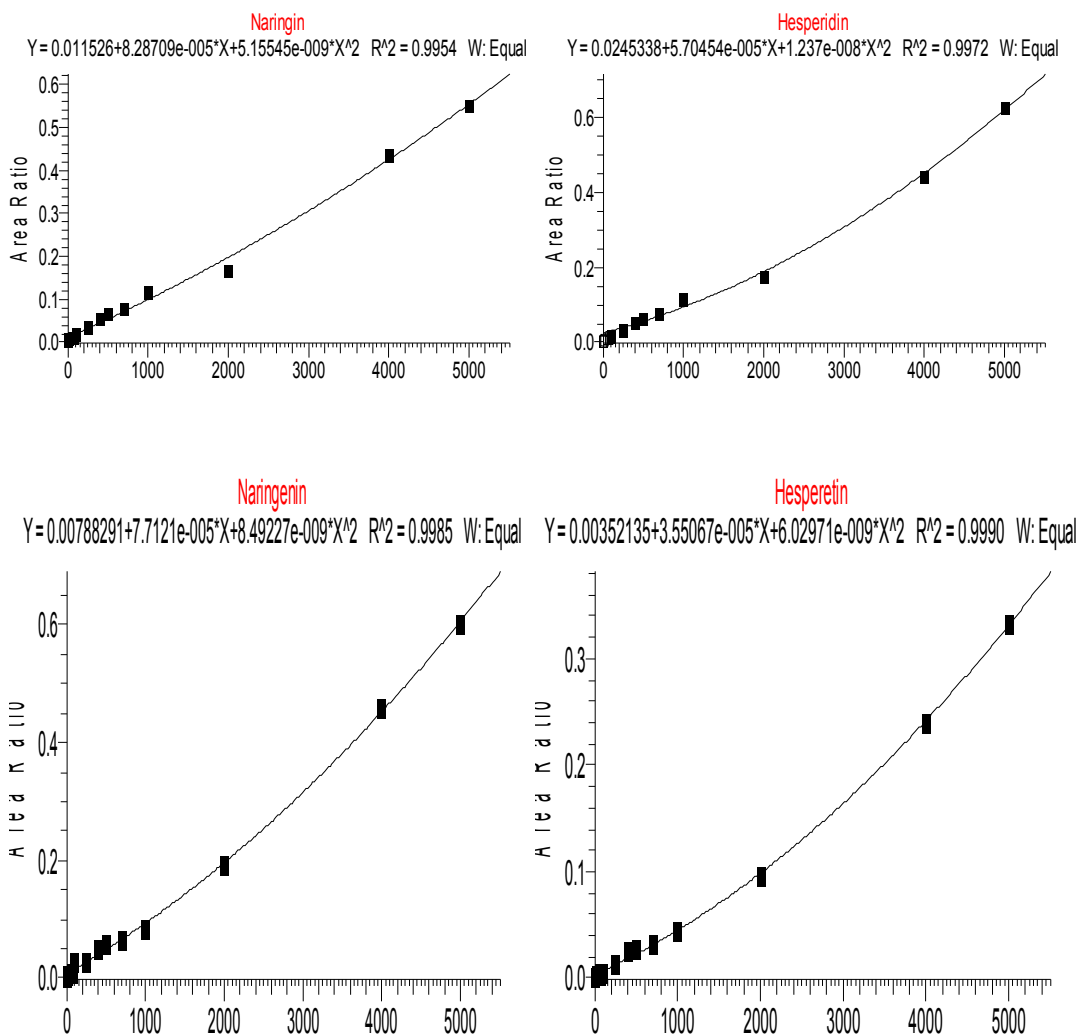
	Ποσοστό Ανάκτησης (%)			
Συγκέντρωση (ng/ml)	Narigin	Hesperidin	Naringenin	Hesperetin
10	88.97	117.32	72.44	76.39
250	94.87	81.25	84.46	86.11
700	115.43	110.16	115.43	115.30

Πίνακας 5. Ποσοστό ανάκτησης των τεσσάρων μορίων ύστερα από σύγκριση τριών καμπυλών αναφοράς δειγμάτων προ- της εκχυλίσεως (pre-spike calibration curves) και μετα- της εκχυλίσεως (post-spike calibration curves), χρησιμοποιώντας το φασματόμετρο μάζας Linear Ion Trap. Οι τιμές εκφράζονται ως $R\% = (\text{average area pre-spike} / \text{average area post-spike}) \times 100$.

Αποτελέσματα

Τα δείγματα πλάσματος της τρίτης δειγματοληψίας αναλύθηκαν στο φασματόμετρο μάζας Linear Ion Trap. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με καμπύλη αναφοράς εύρους 5 ng/ml έως 5 µg/mL (Σχήμα 9). Οι συγκεντρώσεις (ng/mL) των τεσσάρων μορίων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.





Σχήμα 9.

Καμπύλη αναφοράς των τεσσάρων μορίων εύρους 5 ng/ml έως 5μg/mL στο Linear Ion Trap φασματόμετρο μάζας.



Κωδικός	Συγκεντρώσεις (ng/mL)			
	<i>Naringin</i>	<i>Hesperidin</i>	<i>Naringenin</i>	<i>Hesperetin</i>
101	ND	ND	ND	ND
102	13.865	ND	DETECTED	292.789
111	ND	ND	ND	ND
112	ND	ND	ND	ND
126	86.027	ND	DETECTED	ND
128	ND	ND	ND	ND
138	ND	ND	ND	ND
139	ND	149.709	7.731	ND
140	ND	ND	ND	ND
151	1114.440	47.820	18.045	ND
153	27.017	ND	DETECTED	ND
15	ND	ND	DETECTED	ND
161	4416.173	356.776	89.439	ND
162	13.037	ND	DETECTED	ND
163	61.556	ND	DETECTED	ND
176	61.038	ND	DETECTED	ND
177	3969.818	1106.527	433.063	42.776
178	520.394	ND	5.858	ND
187	25.427	ND	DETECTED	ND



188	166.394	24.907	DETECTED	ND
19	ND	315.336	18.578	DETECTED
201	1071.704	11.001	6.326	ND
202	53.498	ND	ND	ND
203	56.982	ND	DETECTED	ND
211	73.920	ND	DETECTED	ND
212	41.933	ND	DETECTED	ND
21	ND	269.749	11.403	DETECTED
226	230.975	ND	12.051	ND
229	15.844	ND	ND	ND
231	164.174	ND	DETECTED	ND
237	ND	ND	ND	ND
238	472.522	ND	10.415	ND
240	41.084	ND	DETECTED	ND
251	17.493	389.571	19.469	30.228
252	ND	ND	ND	ND
253	DETECTED	ND	ND	ND
261	11.066	259.110	13.385	ND
263	ND	ND	ND	ND
276	11.323	433.954	24.881	20.147
277	DETECTED	ND	ND	ND



27	ND	ND	ND	ND
286	27.470	1396.724	258.505	228.411
287	39.144	223.221	23.401	21.301
28	ND	268.894	8.504	ND
29	ND	709.020	41.737	34.751
2	ND	17.416	ND	DETECTED
38	ND	331.254	21.954	DETECTED
39	ND	140.369	DETECTED	ND
3	ND	ND	ND	ND
51	ND	ND	ND	ND
52	ND	ND	ND	ND
62	ND	240.971	9.058	ND
63	28.081	945.575	19.142	20.965
64	ND	ND	ND	ND
76	DETECTED	ND	ND	ND
77	ND	474.380	18.889	20.225
78	ND	ND	ND	ND
91	ND	211.330	ND	ND

Naringin: Detected: 3.3-10 ng/mL

Hesperidin: Detected: 3.3-10 ng/mL

Naringenin: Detected: 1.5-5 ng/mL

Hesperetin: Detected: 13.3-20 ng/mL

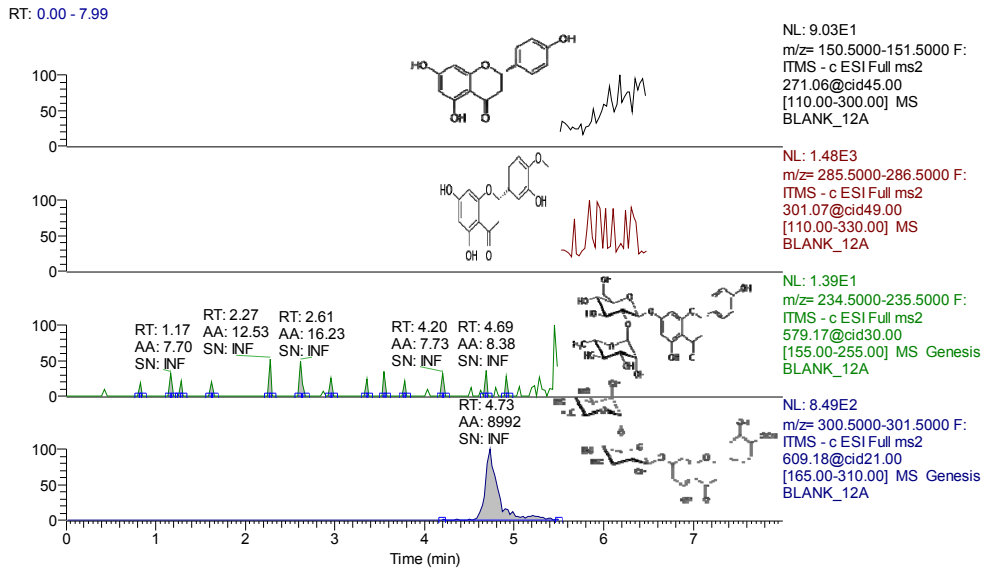


ND:No Detected

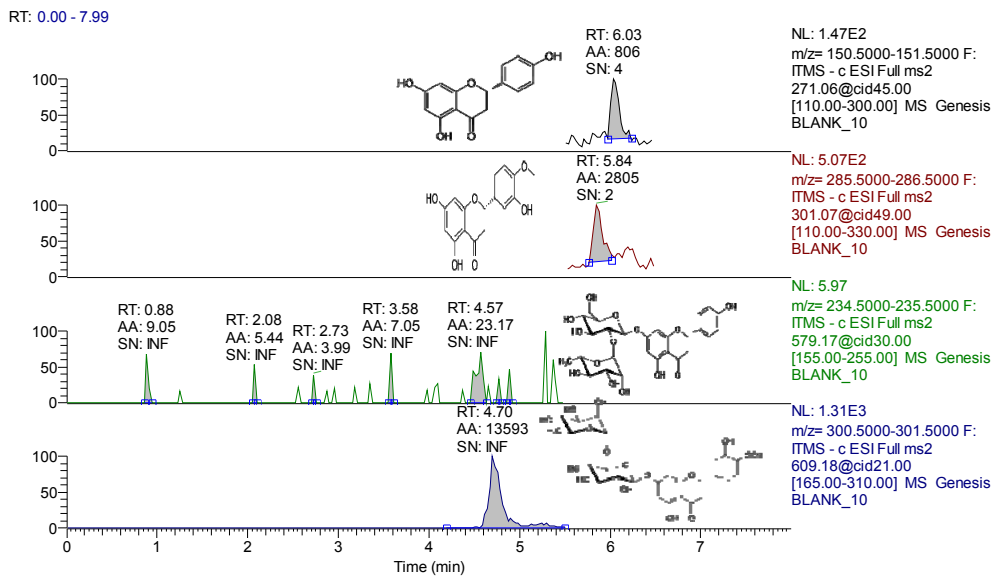
Πίνακας 6. Συγκεντώσεις (ng/mL) των δειγμάτων πλάσματος της τρίτης δειγματοληψίας ύστερα από την ανάλυση στο φασματόμετρο μάζας Linear Ion Trap.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται 5 χρωματογραφήματα, δυο δειγμάτων blank (Σχήμα 10,11), ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας μέσης συγκέντρωσης (MQC) (Σχήμα 12), ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας που αντιστοιχεί στο εγγυημένο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) (Σχήμα 13) και ενός δείγματος προς ανάλυση με τον κωδικό 251 (Σχήμα 14).





Σχήμα 10. Χρωματογράφημα δείγματος blank.



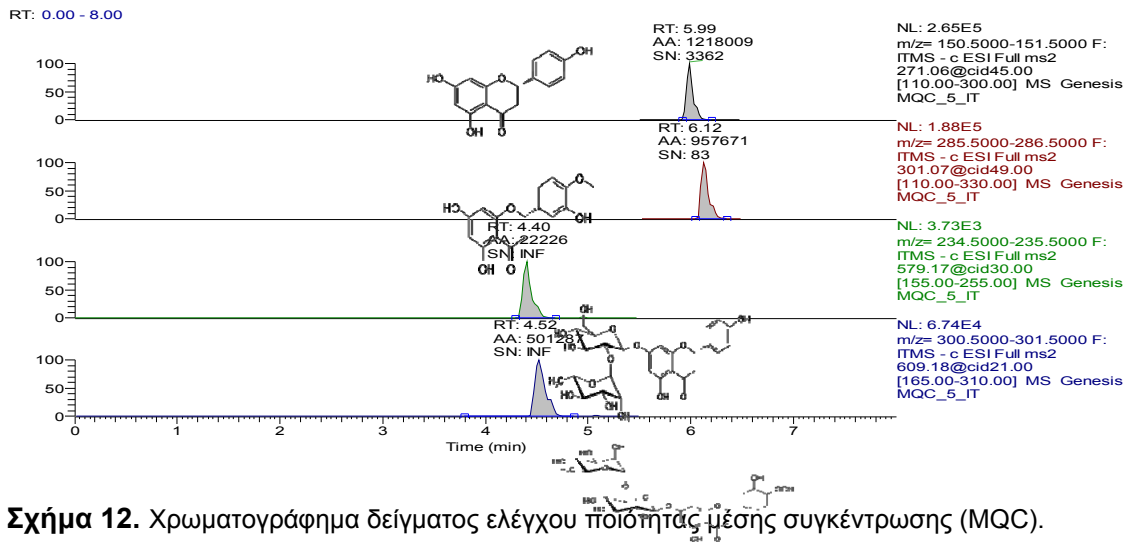
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

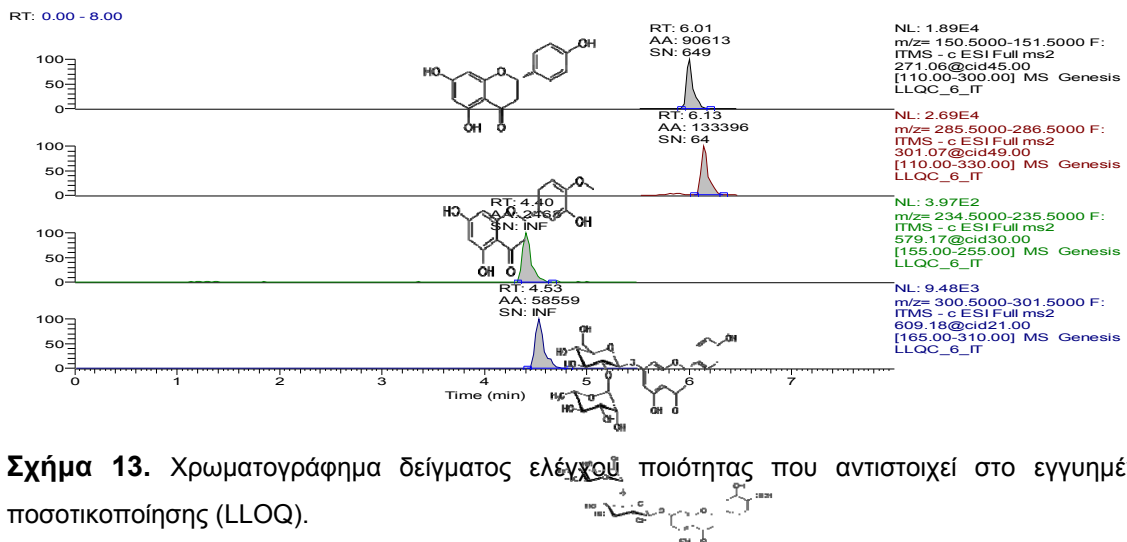
ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Σχήμα 11. Χρωματογράφημα δείγματος blank.



Σχήμα 12. Χρωματογράφημα δείγματος ελέγχου ποιότητας μέσης συγκέντρωσης (MQC).



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα δείγματος ελέγχου ποιότητας που αντιστοιχεί στο εγγυημένο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ).

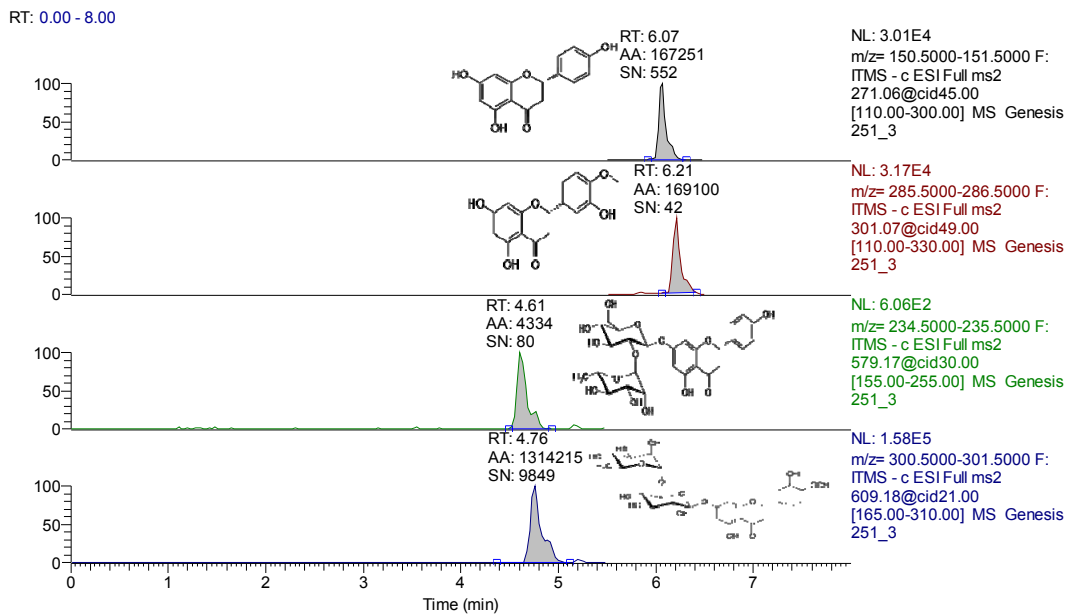
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ
2007-2013
Πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Σχήμα 14. Χρωματογράφημα δείγματος προς ανάλυση με τον κωδικό 251.

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Π. Σιμιτζής
Λέκτορας

Μ. Χαρισμάδου
Λέκτορας

Π. Ζουμπουλάκης
Ερευνητής

