

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ  
ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΑ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΤΟΥ ΑΙΓΑΙΟΥ»**

**ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΩ – ΜΑΡΙΑ ΔΡΑΚΩΝΑΚΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΠΥΡΙΔΩΝ Α. ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2024**

**UNIVERSITY OF CRETE**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

MASTER IN CHEMISTRY SCIENCE PROGRAMME

ENVIRONMENTAL CHEMICAL PROCESSES LABORATORY

ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY



MASTER THESIS

**«DETERMINATION OF ARSENOLIPIDS  
IN FOUR FISH SPECIES OF THE AEGEAN SEA»**

**CHRYSOVALANTO – MARIA DRAKONAKI**

MASTER THESIS SUPERVISOR: PROF. SPIROS A. PERGANTIS

**HERAKLION 2024**

*Στην οικογένεια και στους αγαπημένους μου, που είναι τα θεμέλιά μου.  
Στη γιαγιά μου, που πάντα χαιρόταν να με ακούει να μιλάω για την επιστήμη που αγαπώ.  
Στο Νίκο, που είναι πάντα δίπλα μου.  
Σε όσους πίστεψαν σε μένα.*

## **Εξεταστική Επιτροπή**

### **Σπυρίδων Α. Περγαντής**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης  
(Επιβλέπων Καθηγητής)

### **Ιωάννα Καλαντζή**

Ερευνήτρια Ινστιτούτου Ωκεανογραφίας,  
Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ.)

### **Απόστολος Σπύρος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την επιλογή και συμμετοχή μου στο Γενικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Ακολουθώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Σπύρο Α. Περγαντή, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για τη βοήθεια που μου παρείχε, για την πολύτιμη καθοδήγησή του και για την προθυμία του να με δεχτεί στην ομάδα του, ως μέλος του εργαστηρίου του.

Δε θα μπορούσα φυσικά να μην ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα και μέλος του εργαστηρίου, Τζορτζίνα Πανάγου, που στο πρόσωπό της βρήκα έναν άνθρωπο που ήταν πάντα δίπλα μου για οτιδήποτε χρειαζόμουν. Επίσης καθοριστικής σημασίας ήταν η παρουσία της Δρ. Μαργαρίτας Καψή, με τη συνεργασία της οποίας κατέστησαν εφικτά αρκετά μέρη αυτής της εργασίας. Εξίσου σημαντική ήταν και η συμβολή της Δρ. Ιωάννας Καλαντζή, που αποτελεί και μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής. Ως ερευνήτρια του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών, συνεργάτιδα του Τμήματος Χημείας και συντονίστρια του Προγράμματος MetaFRisks (στα πλαίσια του οποίου πραγματοποιήθηκε η Μεταπτυχιακή μου Εργασία), παρείχε πολύτιμη βοήθεια για την πραγμάτωση των στόχων που είχα θέσει. Ακόμη θα ήθελα εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, αλλά και σε όλη την Επιστημονική και Ερευνητική Κοινότητα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την παροχή βοήθειας σε οποιοδήποτε επίπεδο χρειάστηκε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά και τον κ. Απόστολο Σπύρο, αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Χημείας και μέλος της Εξεταστικής Επιτροπής μου, που δέχτηκε να αξιολογήσει την εργασία μου και να με βοηθήσει στη διάρκεια αυτής, παρέχοντάς μου εργαστηριακό εξοπλισμό, αλλά και γνώσεις.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένεια και τους φίλους μου. Η στήριξη που μου παρείχαν αποτέλεσε ουσιαστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

## ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Για τη συλλογή και ανάλυση των δειγμάτων, η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία υποστηρίχθηκε από τον Ελληνικό Ερευνητικό Στόλο – Ανακατασκευή του Ερευνητικού Σκάφους «ΦΙΛΙΑ» (REPHIL), που χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα (Ε.Π.) «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΣΠΑ) Περιόδου 2014 – 2020 και το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ). Επίσης, η εν λόγω μεταπτυχιακή εργασία υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.), στο πλαίσιο της Δράσης «2<sup>η</sup> Προκήρυξη Ερευνητικών Έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ για την ενίσχυση Μεταδιδακτορικών Ερευνητών/-ριών» (ΜΕΤΑFRISKS, αρ. έργου 692).

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ψάρια και τα θαλασσινά αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της διατροφής. Πρόκειται για τροφή που συστήνεται προς σχετικά συχνή κατανάλωση λόγω των πολλαπλών οφελών της, μέρος των οποίων αποτελεί και η πρόσληψη λιπαρών οξέων που συμβάλλουν στην υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος. Ωστόσο, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ορισμένων μετάλλων και μεταλλοειδών μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη ψαριών η παρουσία λιπαρών ενώσεων που περιέχουν ένα άτομο αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) στο μόριό τους. Αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται ως αρσενολιπίδια. Η πρόσφατη ανακάλυψή τους και η απουσία εκτεταμένων ερευνών ως προς την τοξικότητα των ειδών αυτών δημιουργεί την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη τους.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται χρωματογραφική μέθοδος (υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης – RPLC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας Orbitrap (ESI-Orbitrap-MS) για τον προσδιορισμό των αρσενολιπιδίων των δύο κύριων κατηγοριών που έχουν εντοπιστεί σε δείγματα ψαριών, υδρογονάνθρακες και λιπαρά οξέα που περιέχουν αρσενικό (AsHCs και AsFAs, αντίστοιχα). Η μέθοδος εφαρμόζεται για τέσσερα διαφορετικά είδη ψαριών του Αιγαίου (κουτσομούρα, λυθρίνι, μπακαλιάρος και γαύρος) αλιευμένα από τα Στενά του Αρτεμισίου και την έξοδο του Παγασητικού Κόλπου. Αρσενολιπίδια των δύο κύριων κατηγοριών AsHCs και AsFAs εντοπίζονται σε όλα τα δείγματα, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε είδος ψαριού και σε εύρος ολικών συγκεντρώσεων εκφρασμένες ως προς το αρσενικό από  $18.1 \pm 1.1$  ppb έως  $84.0 \pm 25.1$  ppb.

Πέραν του προσδιορισμού των αρσενολιπιδίων, στόχο αποτελεί και η εξέταση του επιπέδου διαφοροποίησης της παρουσίας των αρσενολιπιδίων σε τρεις βασικούς άξονες. Σε πρώτο επίπεδο εξετάζεται η επίδραση του φύλου (κουτσομούρα, λυθρίνι), σε δεύτερο επίπεδο η επίδραση του ιστού (σάρκα, στομαχικό περιεχόμενο, γονάδες και βράγχια μπακαλιάρου) και σε τρίτο επίπεδο η επίδραση του είδους των ψαριών. Παρατηρούνται διαφοροποιήσεις ως προς το φύλο, οι οποίες οφείλονται κυρίως στο λιπιδικό περιεχόμενο και στις διαφορετικές μεταβολικές διεργασίες που προκύπτουν από ορμονολογικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στη διάρκεια της ωοτοκίας. Επίσης παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιστών, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στις διαφορετικές λειτουργίες κάθε ιστού, σε μεταβολικές διεργασίες, στο λιπιδικό περιεχόμενο και στη σύσταση των ιστών. Τέλος, παρατηρούνται διαφοροποιήσεις ως προς τα αρσενολιπίδια μεταξύ των ειδών, γεγονός που οφείλεται εν μέρει

σε περιβαλλοντικούς – βιοτικούς και διατροφικούς παράγοντες και εν μέρει στο λιπιδικό περιεχόμενο και στις μεταβολικές διεργασίες του κάθε οργανισμού.

### Λέξεις Κλειδιά:

- Αρσενικό
- Αρσενολίπια
- Κουτσομούρα – *Mullus barbatus*
- Λυθρίνι – *Pagellus erythrinus*
- Μπακαλιάρος – *Merluccius merluccius*
- Γάυρος – *Engraulis encrasicolus*
- Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης
- Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας
- Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος



## ABSTRACT

Fish and seafood are an integral part of the human diet. It is recommended as a food source due to its multiple benefits, part of which is the intake of fatty acids that contribute to a healthy cardiovascular system. However, the presence of high concentrations of some metals and metalloids can negatively affect the lipid content of fish. Specifically, the presence of lipid compounds containing an arsenic atom ( $^{75}\text{As}$ ) in their molecule have been observed in various fish species. These compounds are referred to as arsenolipids. Their recent discovery and the absence of extensive research on the toxicity of these species creates the need for their further investigation.

In this work, a chromatographic method (reversed-phase liquid chromatography – RPLC) coupled with Orbitrap mass spectrometry (ESI-Orbitrap-MS) is applied for the determination of arsenolipids of the two main categories that have been detected in fish samples, hydrocarbons and fatty acids containing arsenic (AsHCs and AsFAs, respectively). The method is applied to four different fish species from the Aegean Sea (red mullet, common pandora, European hake, and anchovy) caught from the Straits of Artemisium and the exit of the Pagasitic Gulf. Arsenolipids of the two main categories, AsHCs and AsFAs, are detected in all samples, at different concentrations for each fish species and in a range of total concentrations expressed as arsenic from  $18.1 \pm 1.1$  ppb to  $84.0 \pm 25.1$  ppb.

Apart from the determination of arsenolipids, the aim is to examine the level of differentiation of the presence of arsenolipids on three basic axes. Firstly, the effect of gender (red mullet, common pandora) is examined, secondly the effect of the tissue (muscle, stomach content, gonads, and gills of hake) and lastly the effect of the fish species. Differentiations are observed in terms of gender, which are mainly due to fat content and different metabolic processes resulting from hormonal differences between the two genders during the oviparity period. Differentiations are also observed between tissues, which is probably due to metabolic processes, fat content and tissue composition, as well as due to the different blood supply of each tissue. Finally, differentiations are observed in arsenolipid content between species, which is partly due to environmental and dietary factors and partly to fat content and metabolic processes.

### **Keywords:**

- Arsenic
- Arsenolipids
- Red mullet - *Mullus barbatus*
- Common Pandora - *Pagellus erythrinus*
- European hake - *Merluccius merluccius*
- Anchovy - *Engraulis encrasicolus*
- Reversed Phase Chromatography
- High Resolution Mass Spectrometry
- Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>13</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>14</b>
1.1 Γενικές Πληροφορίες .....	14
1.2 Τα αρσενολιπίδια.....	15
1.3 Μεταβολικές οδοί δημιουργίας αρσενολιπιδίων.....	19
1.4 Τοξικότητα αρσενολιπιδίων .....	21
1.5 Χαρακτηριστικά των ψαριών .....	22
1.5.1 Η κουτσομούρα ( <i>Mullus barbatus</i> ) .....	22
1.5.2 Το λυθρίνι ( <i>Pagellus erythrinus</i> ).....	24
1.5.3 Ο μπακαλιάρος ( <i>Merluccius merluccius</i> ) .....	25
1.5.4 Ο γαύρος ( <i>Engraulis encrasicolus</i> ) .....	26
1.6 Σκοπός Μελέτης.....	27
<b>2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>29</b>
2.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης (RPLC) .....	29
2.2 Φασματομετρία Μάζας – Βασικές Έννοιες.....	31
2.3 Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού με Orbitrap (ESI-Orbitrap-MS/MS).....	33
2.4 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) .....	38
<b>3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>43</b>
3.1 Χημικά – Αντιδραστήρια .....	43
3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	43
3.3 Δειγματοληψία.....	44
3.4 Προεργασία δειγμάτων προς ανάλυση.....	45
3.4 Σύνθεση αρσενολιπιδίου AsHC <sub>374</sub> .....	47
3.5 Εκχύλιση αρσενολιπιδίων και προετοιμασία για ανάλυση με HPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS.....	48
3.6 Χώνευση στερεού υπολείμματος και προετοιμασία για ανάλυση με ICP-MS .....	49
3.7 Προετοιμασία δειγμάτων υπερκείμενου υγρού για ανάλυση με ICP-MS.....	49
3.8 Πρότυπα διαλύματα.....	50
3.8.1 Μονοστοιχειακά διαλύματα αρσενικού ( <sup>75</sup> As) .....	50
3.8.2 Πρότυπα διαλύματα διμεθυλαρσενικού (V) οξέος (DMA(V)) .....	50
3.9 Ανάλυση δειγμάτων με HPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS .....	50
3.10 Ανάλυση δειγμάτων με ICP-MS .....	53
3.10.1 Δείγματα υπερκείμενου υγρού.....	53

3.10.2 Δείγματα χωνευμένου pellet .....	55
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>56</b>
4.1 Ποσοτικοποίηση του εσωτερικού προτύπου AsHC <sub>374</sub> .....	56
4.2 Αποτελέσματα για μορφές αρσενικού στο στερεό υπόλειμμα (pellet) .....	58
4.4 Αποτελέσματα αναλύσεων για μορφές αρσενικού του υπερκείμενου υγρού με χρήση ICP-MS .....	62
4.5 Αποτελέσματα για το υλικό αναφοράς BCR-627 .....	64
4.6 Αποτελέσματα για την κουτσομούρα – επίδραση του φύλου των ψαριών στην παρουσία αρσενολιπιδίων .....	65
4.7 Αποτελέσματα για το λυθρίνι – επίδραση του φύλου των ψαριών στην παρουσία αρσενολιπιδίων .....	70
4.8 Αποτελέσματα για τον μπακαλιάρο – επίδραση του ιστού στην παρουσία αρσενολιπιδίων .....	77
4.9 Αποτελέσματα για το γαύρο .....	84
4.10 Επίδραση του είδους των ψαριών στην παρουσία αρσενολιπιδίων .....	86
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>91</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>92</b>
<b>7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>101</b>
7.1 Χρωματογράφημα για το υλικό αναφοράς BCR-627 .....	102
7.2 Χρωματογράφημα για την κουτσομούρα .....	106
7.3 Χρωματογράφημα για το λυθρίνι .....	113
7.4 Χρωματογράφημα για το μπακαλιάρο .....	123
7.5 Χρωματογράφημα για το γαύρο .....	137

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

(με αλφαβητική σειρά)

- As: αρσενικό
- AsFA: λιπαρό οξύ που περιέχει αρσενικό
- AsHC: υδρογονάνθρακας που περιέχει αρσενικό
- AsPL: φωσφολιπίδιο που περιέχει αρσενικό
- BDMAO: δις-διμεθυλαρσενικό οξύ
- DMA(V): διμεθυλαρσενικό οξύ
- ESI: ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
- HCl: υδροχλωρικό οξύ
- HPLC: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- ICP-MS: φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος
- In: ίνδιο
- MS: φασματομετρία μάζας
- Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>: θειώδες νάτριο
- NaHSO<sub>3</sub>: όξινο θειώδες νάτριο
- ppb: μέρη ουσίας ανά δισεκατομμύριο (μg ουσίας / Kg ξηρού βάρους για τα δείγματα ή μg ουσίας / L για τα διαλύματα)
- ppm: μέρη ουσίας ανά εκατομμύριο (mg ουσίας / Kg ξηρού βάρους για τα δείγματα ή mg ουσίας / L για τα διαλύματα)
- KI: ιωδιούχο κάλιο

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικές Πληροφορίες

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί αποτελούσαν και συνεχίζουν να αποτελούν μέρος των διατροφικών συνηθειών του ανθρώπου. Ιδιαίτερα οι Έλληνες, έχοντας αναπτύξει την τέχνη της αλιείας από αρχαιοτάτων χρόνων, βασίζουν σημαντικά το διαιτολόγιό τους στην κατανάλωση ψαριών, οστρακοειδών και μαλακίων.<sup>1</sup> Συγκεκριμένα, σε εικοσαετή έρευνα που διεξήχθη για περιοχές της Θεσσαλίας, το 62.5% των κατοίκων φάνηκε να καταναλώνει αυτά τα είδη 1-2 φορές την εβδομάδα, ενώ η συχνότητα κατανάλωσης ανέρχεται στις 3-4 φορές την εβδομάδα για ποσοστό κατοίκων της τάξης του 19.6%.<sup>2</sup> Κατά μέσο όρο, οι Έλληνες ενήλικες άνδρες καταναλώνουν 24-35 g ψαριών και θαλασσινών ημερησίως, για τις γυναίκες οι αντίστοιχες τιμές ανέρχονται στα 26-38 gr.<sup>3</sup>

Τα ψάρια και τα θαλασσινά συγκαταλέγονται στις τροφές υψηλής διατροφικής αξίας, έχοντας ταυτόχρονα θετική επίδραση και σε συγκεκριμένες πτυχές της υγείας του ανθρώπου.<sup>4</sup> Η παρατήρηση αυτή αφορά κυρίως τα n-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που περιέχονται σε μεγάλο βαθμό σε αυτές τις τροφές. Δεν είναι λίγες δε οι περιπτώσεις που συμπληρώματα διατροφής με βάση τα ψάρια χορηγούνται σε συνδυασμό με φαρμακευτική αγωγή για τη θεραπεία νοσημάτων του καρδιαγγειακού συστήματος, της ελκώδους κολίτιδας, αλλά και της υπερλιπιδαιμίας, λόγω της παρουσίας μεγάλων ποσοτήτων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε αυτά.<sup>5-8</sup> Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), τα θαλασσινά αποτελούν επίσης πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας και συμβάλλουν στην πρόσληψη απαραίτητων διατροφικών συστατικών, όπως ιώδιο, σελήνιο, ασβέστιο, και βιταμίνες A και D. Η συνιστώμενη κατανάλωση είναι κατ' ελάχιστο δύο μερίδες των 150 g ανά εβδομάδα για μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά, εφήβους και ενήλικες. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην κατανάλωση ψαριών από μικρά παιδιά και εγκύους (συγκεκριμένη συνιστώμενη κατανάλωση και ανά είδος ψαριού), λόγω της πιθανής παρουσίας τοξικών ουσιών σε τροφές προερχόμενες από τη θάλασσα.<sup>9</sup>

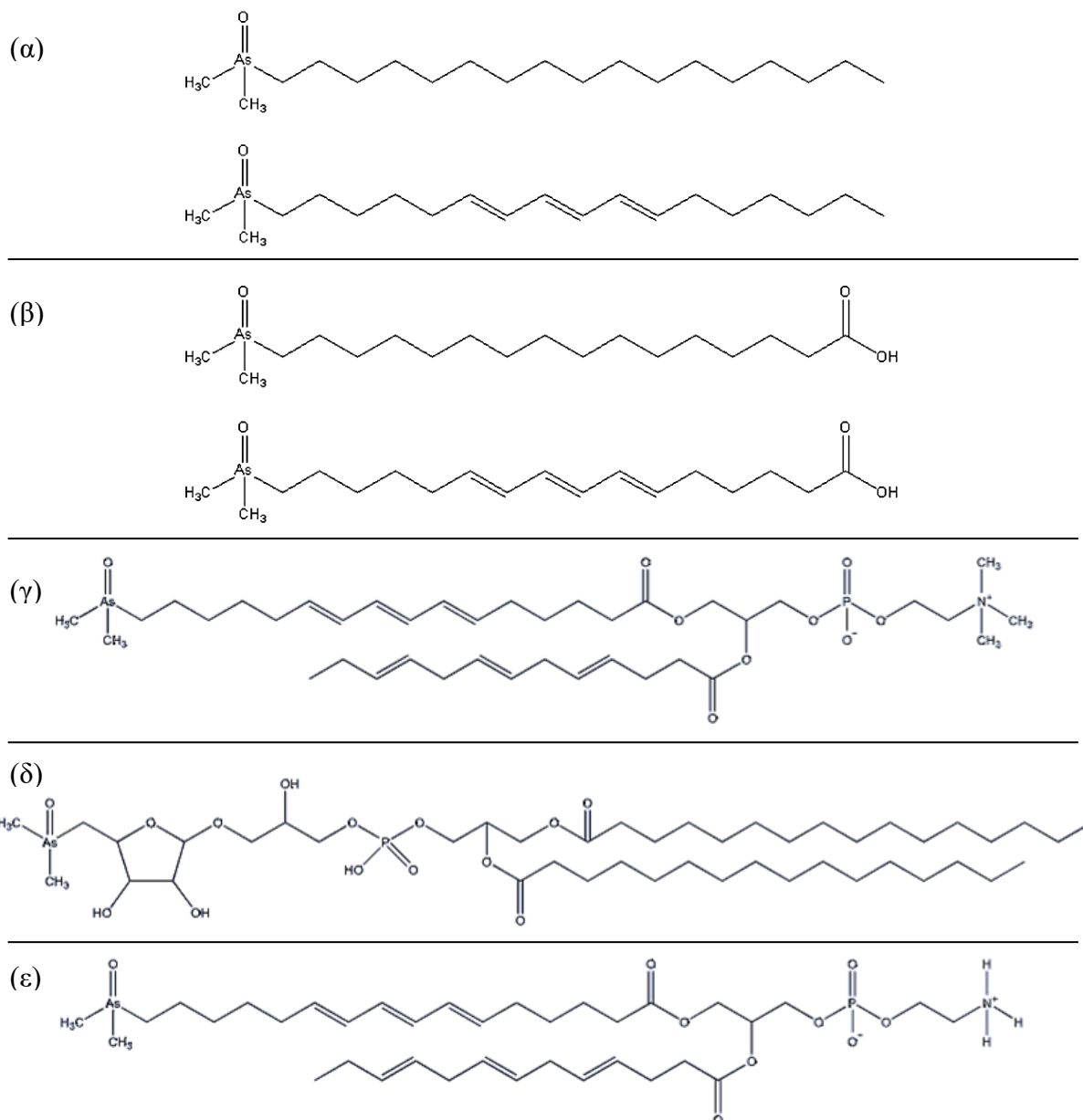
Τέτοιου είδους ουσίες είναι και κάποιες ενώσεις του αρσενικού (<sup>75</sup>As).<sup>10</sup> Το όνομα «αρσενικό» θεωρείται ότι προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό «αρσενικόν», που χαρακτήριζε την κίτρινη βαφή από σανδαράχη. Ανήκει στα μεταλλοειδή και στον περιοδικό πίνακα εντοπίζεται στην 15<sup>η</sup> ομάδα και 4<sup>η</sup> περίοδο, ενώ μπορεί να βρεθεί σε τρεις αλλοτροπικές μορφές, μαύρη, κίτρινη και γκρι. Δύναται με ευκολία να σχηματίσει ενώσεις με ποικίλα άλλα στοιχεία και σπάνια εντοπίζεται αυτούσιο ως μέταλλο. Το ατμοσφαιρικό αρσενικό είναι ένα μίγμα τρισθενούς και πεντασθενούς αρσενικού που μπορεί να προέρχεται από φυσικές πηγές, όπως τα ηφαίστεια και

οι μικροοργανισμοί (παραγωγή πτητικών μεθυλαρσινών).<sup>10,11</sup> Ως προς τις ανθρωπογενείς διεργασίες, η μεταλλευτική βιομηχανία, η χρήση φυτοφαρμάκων, η καύση άνθρακα και ξύλου και η αποτέφρωση των απορριμμάτων αποτελούν πηγές σχηματισμού σωματιδίων οξειδίου του αρσενικού, το οποίο εισέρχεται στα εδάφη ως αρσενικόδες (III) και αρσενικό (V) οξύ.<sup>12</sup> Η συγκέντρωση του αρσενικού στο έδαφος ποικίλλει από 0.1 έως 50 mg/kg, ενώ κατά μέσο όρο στο φλοιό της γης το αρσενικό εντοπίζεται σε συγκέντρωση 2.5 mg/kg.<sup>10,11</sup> Το αρσενικό προσκολλάται στα σωματίδια και κατανέμεται στα διάφορα τμήματα του εδάφους, αλλά μπορεί να διεισδύσει και στο βρόχινο νερό, με πιθανή κατάληξη σε σώματα νερού (υπόγεια ύδατα, λίμνες, ποτάμια, θάλασσες). Σε περιοχές όπου οι συγκεντρώσεις του αρσενικού είναι αρκετά υψηλές, λόγω ανθρωπογενών ή μη δραστηριοτήτων, παρατηρείται βιοσυσσώρευση του και σε ορισμένα φυτά. Λογικό συμπέρασμα και τελικά αποτέλεσμα αυτού αποτελεί και πιθανότητα βιοσυσσώρευσης του σε θαλάσσιους οργανισμούς, όπως τα ψάρια, μέσω της τροφικής αλυσίδας, αλλά και μέσω των υδάτινων σωμάτων.<sup>12</sup>

Δεδομένης της διατροφικής αξίας των ψαριών και των λιπαρών οξέων που περιέχουν, αλλά και της ύπαρξης του αρσενικού σε διάφορες μορφές στο περιβάλλον, αξίζει να εστιάσει κανείς σε μια πιθανή σύνδεση αυτών των δύο παραγόντων. Γενικά, τα αρσενολιπίδια θεωρούνταν μη τοξικά και επιβλαβή για τον άνθρωπο, αλλά πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα αρσενολιπίδια και οι μεταβολίτες τους παρουσιάζουν νευροτοξική και κυτταροτοξική συμπεριφορά και συγκαταλέγονται στα πιθανώς τοξικά για τον άνθρωπο είδη του αρσενικού.<sup>13,14</sup> Συνεπώς, η μελέτη τους σε είδη ψαριών που καταναλώνονται άφθονα στην Ελλάδα θεωρείται επιτακτική.

## 1.2 Τα αρσενολιπίδια

Τα αρσενολιπίδια είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα φυσικώς απαντώμενων οργανοαρσενικών ενώσεων με δομές ανάλογες των ουδέτερων λιπιδίων, όπως τα μονογλυκερίδια, τα γλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια. Πρόκειται για είδη που έχουν βρεθεί σε μικροοργανισμούς, μύκητες, φυτά, λειχήνες, θαλάσσια μαλάκια, σφουγγάρια, ασπόνδυλα, άλγη, καρκινοειδή και τέλος σε ιστούς ψαριών.<sup>15</sup>



**Εικόνα 1:** Χαρακτηριστικές δομές των διαφορετικών κατηγοριών αρσενολιπιδίων. Στην εικόνα φαίνονται οι (α) AsHCs, (β) AsFAs, (γ) AsPC, (δ) AsSugPL, (ε) AsPE. <sup>14,16-18</sup>

Οι μέχρι σήμερα γνωστότερες μορφές αρσενικού στο θαλάσσιο περιβάλλον και ιδίως στα ψάρια είναι οι υδατοδιαλυτές μορφές του αρσενικού, που άλλωστε αποτελούν την πλειοψηφία των μορφών του. Οι κυριότερες υδατοδιαλυτές μορφές του αρσενικού είναι το αρσενοβιτάνιο (AsB) που αντιπροσωπεύει πάνω από το 50% των ενώσεων του αρσενικού στα ψάρια, το διμεθυλαρσινώδες οξύ (DMA), το μονομεθυλαρσινώδες οξύ (MMA), το τριμεθυλαρσινώδες ιόν (TMA) και τέλος οι ανόργανες μορφές αρσενικού που είναι η τρισθενής και η πεντασθενής (As(III), As(V)). Μέσα στην τελευταία δεκαετία, όμως, έχουν ανακαλυφθεί περίπου 70 νέα είδη αρσενολιπιδίων, τα οποία ανήκουν στις κατηγορίες των As – υδρογονανθράκων (AsHCs), των As – λιπαρών οξέων (AsFAs), των As – φωσφατιδυλογολινών (AsPCs), των



φωσφολιπιδίων αρσενোসακχάρων (AsSugPLs), των As – φωσφατιδυλαιθανολαμινών (AsPEs), και των αντίστοιχων μορφών που περιέχουν θείο αντί οξυγόνου στη διμεθυλαρσινώδη ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sup>-</sup>) ομάδα. Για πρακτικούς λόγους, κάθε αρσενολιπίδιο έχει μία «κωδική ονομασία», συνήθως της μορφής «AsLIPID<sub>mass</sub>» ή «AsLIPID-mass», όπου το «AsLIPID» δηλώνει την κατηγορία του αρσενολιπιδίου και το «mass», αναφέρεται στη μάζα του. Έτσι για παράδειγμα, το AsFA<sub>390</sub> ή AsFA-390 είναι ένα λιπαρό οξύ που περιέχει αρσενικό και ουδέτερα φορτισμένο (μη πρωτονιωμένο) έχει μάζα 390 g/mol. Η ανθρακική αλυσίδα των αρσενολιπιδίων μπορεί να είναι είτε κορεσμένη είτε ακόρεστη. Στα παραπάνω αναφερόμενα είδη των αρσενολιπιδίων μπορεί να εντοπιστεί ως κοινή ομάδα η διμεθυλαρσινώδης ομάδα ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sup>-</sup>). Κατά την ανίχνευση των αρσενολιπιδίων με φασματομετρία μάζας, το ιόν που σχηματίζεται από αυτήν την ομάδα ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As<sup>+</sup>O) είναι ένα από τα κύρια διαγνωστικά ιόντα που παρακολουθούνται για να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη αρσενολιπιδίων κατά τη διαδικασία της διαδοχικής φασματομετρίας (MS/MS). Σε αρκετούς θαλάσσιους οργανισμούς έχει υπολογιστεί ότι το αρσενικό που βρίσκεται δεσμευμένο σε λιπιδικές δομές αποτελεί μέχρι και το 30% του ολικού αρσενικού.<sup>14,16-18</sup>

Οι περισσότερες μορφές αρσενολιπιδίων που έχουν ανιχνευθεί σε ψάρια μέχρι σήμερα αφορούν την παρουσία AsFAs και AsHCs. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία εστιάζει σε αυτές τις δύο κατηγορίες αρσενολιπιδίων. Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1**) αναφέρονται τα αρσενολιπίδια αυτών των κατηγοριών που έχουν παρατηρηθεί μέχρι σήμερα.<sup>18</sup>

**Πίνακας 1:** Συνοπτική παρουσίαση των μέχρι σήμερα γνωστών AsHCs και AsFAs, των μοριακών τύπων και των μοριακών βαρών των αντίστοιχων πρωτονιωμένων μορφών τους.<sup>18</sup>

Κωδική Ονομασία Αρσενολιπιδίου (AsLp)	Μοριακός τύπος πρωτονιωμένου ιόντος της ένωσης	Μοριακό βάρος πρωτονιωμένου ιόντος της ένωσης
AsHC <sub>164</sub>	[C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> AsO] <sup>+</sup>	165.02551
AsHC <sub>304</sub>	[C <sub>15</sub> H <sub>33</sub> AsO] <sup>+</sup>	305.18201
AsHC <sub>330</sub>	[C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> AsO] <sup>+</sup>	331.19766
AsHC <sub>332</sub>	[C <sub>17</sub> H <sub>37</sub> AsO] <sup>+</sup>	333.21331
AsHC <sub>346</sub>	[C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> AsO] <sup>+</sup>	347.22896
AsHC <sub>358</sub>	[C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> AsO] <sup>+</sup>	359.22896
AsHC <sub>360</sub>	[C <sub>19</sub> H <sub>41</sub> AsO] <sup>+</sup>	361.24461
AsHC <sub>374</sub>	[C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> AsO] <sup>+</sup>	375.26026
AsHC <sub>386</sub>	[C <sub>21</sub> H <sub>45</sub> AsO] <sup>+</sup>	387.26026
AsHC <sub>388</sub>	[C <sub>21</sub> H <sub>45</sub> AsO] <sup>+</sup>	389.27591



AsFA <sub>486</sub>	[C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> AsO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	487.31269
AsFA <sub>502</sub>	[C <sub>27</sub> H <sub>55</sub> AsO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	503.34399
AsFA <sub>528</sub>	[C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> AsO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	529.26574

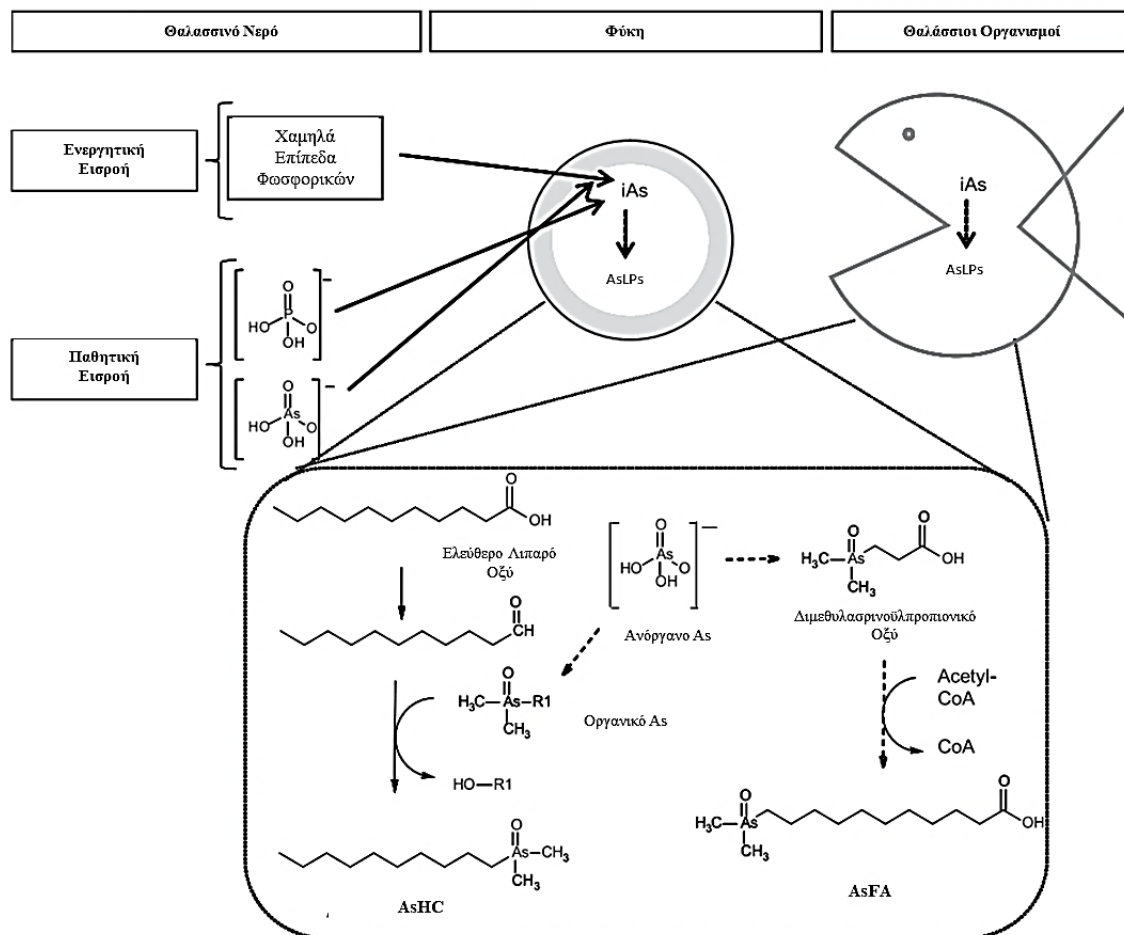
Το αρσενικό έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να ενσωματωθεί σε λιπίδια που βρίσκονται στον ιστό των ψαριών, σχηματίζοντας λιποδιαλυτές ενώσεις, τα λεγόμενα αρσενολιπίδια. Οι αναλυτικές προκλήσεις που σχετίζονται με την ανίχνευση των αρσενολιπιδίων έχουν εμποδίσει τη μελέτη τους. Προηγμένες τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με τεχνικές φασματομετρίας μάζας (MS) έχουν συμβάλει καθοριστικά στην ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση αυτών των ενώσεων. Επιπλέον, νέες προσεγγίσεις, όπως η φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HR-MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) διευρύνουν το συγκεκριμένο πεδίο, επιτρέποντας την αναγνώριση και κατανόηση των σύνθετων δομών και της συμπεριφοράς των αρσενολιπιδίων. Οι συνεχιζόμενες εξελίξεις στις αναλυτικές μεθοδολογίες είναι απαραίτητες για την ακριβή αξιολόγηση της παρουσίας, της συγκέντρωσης, αλλά και για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των αρσενολιπιδίων σε θαλάσσια και μη είδη.<sup>19</sup>

### 1.3 Μεταβολικές οδοί δημιουργίας αρσενολιπιδίων

Θεωρείται ότι τα αρσενολιπίδια είναι τα τελικά προϊόντα μιας διαδικασίας αποτοξίνωσης από το πεντασθενές ανόργανο αρσενικό As(V), η οποία περιλαμβάνει μεταξύ άλλων αναγωγή, οξειδωτική μεθυλίωση και αδενосуλίωση. Το αρσενικό, δεδομένου ότι ανήκει στην 15<sup>η</sup> ομάδα του περιοδικού πίνακα, θεωρείται ότι ενσωματώνεται στους θαλάσσιους οργανισμούς ως αποτέλεσμα της ομοιότητάς του στη χημεία των αντιδράσεών του με το άζωτο (N) και το φώσφορο (P), στοιχεία που επίσης ανήκουν στη 15<sup>η</sup> ομάδα.

Στο θαλασσινό νερό, το αρσενικό οξύ υπάρχει κυρίως στην αποπρωτονιωμένη του μορφή ως οξοανιόν (H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>)<sup>-</sup>, παρόμοια με το αποπρωτονιωμένο ανιόν (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>-</sup>. Τα θαλάσσια άλγη διαθέτουν συστήματα μεταφοράς στις μεμβράνες τους, τα οποία μεταξύ άλλων συμβάλλουν στην απορρόφηση αυτού του απαραίτητου φωσφορικού ανιόντος. Ωστόσο, τα συστήματα αυτά δεν έχουν την ικανότητα να διακρίνουν παρόμοιες δομές, όπως είναι τα προαναφερόμενα ανιόντα αρσενικού και φωσφόρου, με αποτέλεσμα αντί του φωσφορικού να πραγματοποιείται η παθητική πρόσληψη του αρσενικού ανιόντος από τα κύτταρα των αλγών.<sup>20</sup> Έχει βρεθεί ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις φωσφορικού στο θαλασσινό νερό αποτελούν παράγοντα ρύθμισης

της ροής του αρσενικού προς τα κύτταρα, καθώς και το μετασχηματισμό του αρσενικού ανιόντος από τα άλγη. Σε τέτοιες περιπτώσεις, φαίνεται ότι το αρσενικό χρησιμοποιείται ενεργά από τους οργανισμούς με παρόμοιο τρόπο, όπως το άζωτο, ο φώσφορος και το θείο, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό νέων μορίων αρσενικού εντός του κυττάρου.<sup>19</sup> Η προτεινόμενη βιογένεση των αρσενολιπιδίων βασίζεται στην εκ φύσεως εμφάνιση μεταβολιτών του αρσενικού και όλα τα ενδιάμεσα στην προτεινόμενη οδό έχουν ταυτοποιηθεί ως φυσικά προϊόντα, τα οποία προέρχονται από φύκη. Η παρουσία οργανικών οξέων, όπως τα  $\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2$  και  $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{OH})$ , όπου το αρσενικό βρίσκεται σε οξειδωτική κατάσταση As(III) ήταν αρχικά υπό αμφισβήτηση. Όμως φαίνεται ότι τελικά αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα για την αναγωγή του ανόργανου As(V) σε ανόργανο As(III) από τη γλουταθειόνη ή άλλες θειόλες και έπειτα τη μετατροπή του σε μονομεθυλαρσενικόδες (V) οξύ μέσω της αρσενώδους μεθυλοτρανσφεράσης S-αδενοσυλ-μεθειονίνης. Κατά τη μετατροπή αυτή, η S-αδενοσυλ-μεθειονίνη μετατρέπεται σε S-αδενοϋλ-ομοκυστεΐνη. Για περαιτέρω μεθυλίωση, το μονομεθυλαρσενικόδες (V) οξύ ανάγεται σε μονομεθυλαρσενικόδες (III) οξύ, το οποίο μετατρέπεται σε διμεθυλαρσενικόδες (V) οξύ μέσω της μεθυλοτρανσφεράσης S-αδενοϋλ-ομοκυστεΐνης. Το τελευταίο, με μια τελική μετατροπή του σε διμεθυλαρσενικόδες οξύ (DMAO) αποτελεί το υπόστρωμα μικροοργανισμών για την μικροβιακά υποβοηθούμενη μετατροπή των μόνο- και δι- μεθυλιωμένων ειδών του αρσενικού σε αρσενοβιτάνιο και αρσενολιπίδια, τα οποία εντοπίζονται σε άλγη και ασπόνδυλα γλυκού και θαλασσινού νερού.<sup>15</sup> Εστιάζοντας στη δημιουργία AsHCs και AsFAs από τις πρώτες μεθυλίωσεις κι έπειτα, προτείνονται δύο διαφορετικές συνθετικές οδοί για τις δύο αυτές κατηγορίες αρσενολιπιδίων. Τα AsFAs επιμηκύνονται κατά δύο μονάδες άνθρακα παρουσία του ακετυλοσυνενζύμου A, με τρόπο όμοιο με τα κλασσικά λιπαρά οξέα.<sup>21</sup> Οι AsHCs προτάθηκε ότι είναι προϊόντα βιομετατροπής των ελεύθερων λιπαρών οξέων, με την αναγωγή των λιπαρών οξέων σε υδρογονάνθρακες μέσω αλκοολών και χωρίς απώλειες σε άνθρακες. Οι παραπάνω μηχανισμοί ωστόσο έχει επιβεβαιωθεί ότι συμβαίνουν μόνο σε βακτήρια και όχι σε άλγη ή θαλάσσιους οργανισμούς.<sup>22</sup>



**Εικόνα 2:** Προτεινόμενες βιοσυνθετικές οδοί για τη δημιουργία AsHCs και AsFAs σε βακτήρια και η πιθανή εφαρμογή τους σε θαλάσσιους οργανισμούς. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν παρουσία πολλαπλών βημάτων.<sup>21</sup>

Η παρουσία των αρσενολιπιδίων στο θαλάσσιο περιβάλλον αποδίδεται σε μεταβολικές διαδικασίες των θαλάσσιων οργανισμών, παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται παραπάνω. Τα άλγη αποτελούν συχνά την πηγή παραγωγής αρσενολιπιδίων και τα ανώτερα είδη συνήθως τα προσλαμβάνουν μέσω της τροφής, χωρίς αυτό να αποκλείει τη δυνατότητα να τα συνθέσουν. Έχει προταθεί ότι τα αρσενολιπίδια, βάσει των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν με τα κοινά λιπαρά των ψαριών, είναι αποτέλεσμα ελλιπούς πιστότητας στους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς, στην αδυναμία τους δηλαδή να εντοπίσουν τη διαφοροποίηση των ενώσεων που περιέχουν αρσενικό από τις ενώσεις τους που δεν περιέχουν αρσενικό.<sup>19</sup>

#### 1.4 Τοξικότητα αρσενολιπιδίων

Η ανακάλυψη των αρσενολιπιδίων έχει προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω της ιδιαίτερης δομής τους και των πιθανών επιπτώσεών τους στην υγεία. Η πρόσληψή τους από τον άνθρωπο δια μέσου της τροφής του πιθανολογείται ότι μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό τοξικών ειδών του αρσενικού. Αυτή η βιομετατροπή δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αλλά μελέτες έχουν

δείξει ότι ένζυμα όπως το κυτόχρωμα P450 αποτελούν δομές ιδιάζουσας σημασίας για τον οξειδωτικό μεταβολισμό των αρσενολιπιδίων και εν τέλει την απελευθέρωση αρσενικού. Έχει ερευνηθεί η κυτταροτοξικότητα τριών AsHC σε σχέση με την τοξικότητα του As (III) για ουροθηλιακά και ηπατικά κύτταρα και φαίνεται ότι για συγκεντρώσεις άνω των 3 ppm, τα αρσενολιπίδια αυτά αρχίζουν να παρουσιάζουν τοξικότητα παρόμοια με εκείνη του As (III).<sup>13,14</sup> Πρόσφατη έρευνα έχει επίσης εξερευνήσει τις οικολογικές και εξελικτικές πτυχές πίσω από την παρουσία των αρσενολιπιδίων στη φύση. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να έχουν ρόλο σε χημικούς αμυντικούς μηχανισμούς θαλάσσιων οργανισμών, προσφέροντας προστασία έναντι των θηρευτών και παθογόνων μικροοργανισμών. Πιθανολογείται ότι τα αρσενολιπίδια συμμετέχουν επίσης στο σχηματισμό λιπιδικών δομών, όπως η κυτταρική μεμβράνη, με τρόπο όμοιο με τα φυσικώς απαντώμενα λιπίδια των κυττάρων. Η παρουσία τους, όμως μπορεί να έχει επίδραση στη μορφολογία των δομών αυτών, αλλάζοντας για παράδειγμα τη ρευστότητα της μεμβράνης. Τέτοιες φαινομενικά μικρές αλλαγές μπορεί να είναι μείζονος σημασίας για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς η μεταβολή στη δυναμική διάταξη των λιπιδίων στη μεμβράνη μπορεί να επηρεάσει λειτουργίες που εξαρτώνται από τη μεμβράνη (π.χ. κυτταρική σηματοδότηση και αλληλεπίδραση υποδοχέων-υποκαταστατών).<sup>22</sup> Επιπλέον, η εξελικτική προσαρμογή των θαλάσσιων ειδών σε περιβάλλον πλούσιο σε αρσενικό, μέσω της ανάπτυξης οδών μεταβολισμού προς αρσενολιπίδια, επιβεβαιώνει τη σύνθετη αλληλεπίδραση των οργανισμών με τους οικοτόπους τους.<sup>19,23</sup>

## 1.5 Χαρακτηριστικά των ψαριών

Τα ψάρια που συλλέχθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης ανήκουν σε τέσσερα διαφορετικά είδη. Τα είδη αυτά είναι η κουτσομούρα, το λυθρίνι, ο μπακαλιάρος και ο γαύρος. Ακολουθούν ορισμένες πληροφορίες σε σχέση με τα χαρακτηριστικά και τις διατροφικές συνήθειες των ειδών αυτών.

### 1.5.1 Η κουτσομούρα (*Mullus barbatus*)

Η κουτσομούρα είναι ένα είδος βενθικού ψαριού που εντοπίζεται κυρίως στη Μεσόγειο και στη Μαύρη Θάλασσα, αλλά και στο βορειοανατολικό τμήμα του Ατλαντικού Ωκεανού.





**Εικόνα 3:** Οι κουτσομούρες που αλιεύθηκαν και συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Τρέφεται ρουφώντας και κοσκινίζοντας λάσπη του βυθού, καθώς κολυμπά πάνω σε αυτόν. Αναλύσεις που έχουν γίνει υποδεικνύουν ότι οι κουτσομούρες τρέφονται με βενθικά ασπόνδυλα, μαλάκια, τελεόστεους και φύκια. Ωστόσο, κυρίαρχες στη διατροφή τους παρατηρούνται τρεις κατηγορίες από βενθικά ασπόνδυλα, οι πολύχαιτοι, τα δεκάποδα και τα μικρά καρκινοειδή, αναφερόμενα κατά φθίνουσα σειρά προτίμησης ως τροφή, ακολουθούμενα από τα μαλάκια. Οι διατροφικές συνήθειες αυτού του είδους επηρεάζονται από το μέγεθος, δηλαδή τη φάση ανάπτυξης του ψαριού. Συγκεκριμένα, μόνο σε ψάρια μικρότερου μεγέθους (κάτω από 10 cm) βρέθηκαν τελεόστεοι στο στομαχικό περιεχόμενο, ενώ μόνο σε μεγαλύτερα ψάρια βρέθηκαν φύκια. Οι κουτσομούρες ακολουθούν ένα μοντέλο τακτικής κατανάλωσης τροφής κατά την περίοδο φθινοπώρου-χειμώνα και περιορισμού της σίτισης κατά την περίοδο άνοιξη-καλοκαίρι. Επιπλέον, παρατηρείται διαφοροποίηση στις διατροφικές συνήθειες μεταξύ θηλυκών και αρσενικών, με τα θηλυκά να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες τροφής και συνεπώς να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και γρηγορότερη ανάπτυξη.<sup>24-26</sup> Η αναπαραγωγική περίοδος της κουτσομούρας ξεκινάει το Μάρτιο και τελειώνει τον Ιούνιο.<sup>27</sup> Ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο, η κουτσομούρα παρουσιάζει εποχικές διακυμάνσεις, με μεγαλύτερα ποσοστά λιπιδίων το φθινόπωρο (7.28-8.72%) και μικρότερα την άνοιξη (0.96-1.48%). Σε σχέση με το συνολικό λιπιδικό περιεχόμενο, η παρουσία λιπαρών οξέων αντιστοιχεί στο 34-39% του λιπιδικού περιεχομένου, αλλά παρατηρούνται διαφοροποιήσεις ανάλογα με την εποχή ως προς το είδος των λιπαρών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, την άνοιξη, όπου το ψάρι έχει μικρότερο γενικά μέγεθος, κυριαρχούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (30-40% των ολικών λιπαρών οξέων), ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα βρίσκονται σε χαμηλότερα ποσοστά (18-29% των ολικών λιπαρών οξέων). Το αντίστροφο παρατηρείται το φθινόπωρο, όπου εντοπίζονται

περισσότερα κορεσμένα (34-39% των ολικών λιπαρών οξέων) και λιγότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα (περίπου 20%).<sup>28</sup>

### 1.5.2 Το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*)

Το λυθρίνι, όπως και η κουτσομούρα, είναι ένα βενθικό ψάρι που εντοπίζεται κυρίως στο ανατολικό τμήμα του Ατλαντικού Ωκεανού και στη Μεσόγειο Θάλασσα. Πρόκειται για ψάρια που φτάνουν σε μεγέθη της τάξης των 16-28 cm για τα αρσενικά και 13-19 cm για τα θηλυκά. Οι διατροφικές τους συνήθειες συμπεριλαμβάνουν την κατανάλωση δεκάποδων, δίθυρων, πολύχαιτων, τελεόστεων, κεφαλόποδων, ευφασωδών και μυσιδωδών, με τα δύο πρώτα να εντοπίζονται ως κοινή τροφή για λυθρίνια σε κάθε στάδιο ανάπτυξης.



**Εικόνα 4:** Τα λυθρίνια που αλιεύθηκαν και συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Ωστόσο, για το λυθρίνι οι διατροφικές συνήθειες επηρεάζονται από το μέγεθος των ψαριών, με τα μικρότερα σε μέγεθος ψάρια (κάτω από 13 cm) να τρέφονται κυρίως με πολύχαιτους ακολουθούμενους από δεκάποδα, τα μεσαίου μεγέθους (13 cm έως 21 cm) να τρέφονται με δεκάποδα ακολουθούμενα από δίθυρα και τα μεγαλύτερα σε μέγεθος (πάνω από 21 cm) να τρέφονται με δεκάποδα ακολουθούμενα από τελεόστεους. Το ποσοστό κατανάλωσης δεκάποδων σε σχέση με άλλες τροφές των λυθρινιών αυξάνει αναλογικά με το μέγεθός τους. Τα λυθρίνια κατά την περίοδο καλοκαίρι-φθινόπωρο τρέφονται κυρίως με δεκάποδα και τελεόστεους, ενώ κατά την περίοδο του χειμώνα, κύρια τροφή αποτελούν οι τελεόστεοι. Επίσης, η συχνότητα σίτισης μειώνεται το χειμώνα, πιθανόν λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών του νερού, ενώ είναι μέγιστη το καλοκαίρι, γεγονός που μπορεί να σχετιστεί με την περίοδο της φωτοκίας και της αναπαραγωγής (άνοιξη-καλοκαίρι). Αξιοσημείωτη παρατήρηση για τα λυθρίνια αποτελεί και η αλλαγή φύλου, που πραγματοποιείται για αναπαραγωγικούς σκοπούς



κατά την προαναφερθείσα περίοδο. Η μεταβολή αυτή πραγματοποιείται για θηλυκά μήκους 17-18 cm, τα οποία αλλάζουν φύλο προς αρσενικά. Σε αυτή τη φάση, τα λυθρίνια παρατηρούνται ως ερμαφρόδιτα, με κυρίαρχη την παρουσία του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος και εκφυλισμένα υπολείμματα του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος.<sup>29,30</sup> Ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο, έχει βρεθεί ότι το λυθρίνι έχει περιεχόμενο σε λιπαρά περίπου 1.7%, με την πλειονότητα αυτών να αποτελούν τα λιπαρά οξέα (περίπου 80%) σε ποσοστό 32.3% ως κορεσμένα, 27% ως μονοακόρεστα και 27.5% ως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.<sup>31</sup>

### 1.5.3 Ο μπακαλιάρος (*Merluccius merluccius*)

Ο μπακαλιάρος ανήκει στα βενθικά ψάρια και τη διατροφή του συνήθως αποτελούν ταχέως κινούμενα πελαγικά είδη, όπως ο γαύρος.



Εικόνα 5: Οι μπακαλιάροι που αλιεύθηκαν και συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Τα μεγέθη των δύο φύλων είναι όμοια για τα τρία πρώτα χρόνια της ζωής τους, ενώ έπειτα τα θηλυκά αναπτύσσονται περισσότερο φτάνοντας σε μήκος και βάρος μεγαλύτερο από αυτό των αρσενικών. Από μελέτες έχει προκύψει ότι οι μπακαλιάροι τρέφονται κατά τη διάρκεια της νύχτας, με θηράματα στη μέση και κοντά στην επιφάνεια του νερού, ενώ τα μικρότερα ψάρια του είδους τρέφονται με τον ίδιο τρόπο με πλαγκτονικά καρκινοειδή στη διάρκεια της μέρας. Κατά τη διάρκεια της νύχτας, ωστόσο, οι μπακαλιάροι επιστρέφουν σε βάθος μεταξύ 50-800 m. Δεδομένου ότι βάσει του σταδίου ανάπτυξης των μπακαλιάρων επηρεάζεται και ο τρόπος

σίτισής τους, είναι δεδομένο ότι ανάλογα του μεγέθους τους θα αλλάζουν και οι διατροφικές συνήθειες. Πιο συγκεκριμένα, για τα μικρότερα μεγέθη (5 cm έως 11 cm) η κύρια τροφή είναι τα ευφασεώδη και τα μυσιδώδη ακολουθούμενα από τα δεκάποδα. Οι αμέσως μεγαλύτεροι μπακαλιάροι (11 cm έως 16 cm) τρέφονται κυρίως με ευφασεώδη και δεκάποδα ακολουθούμενα από ιχθύες και μυσιδώδη. Τα άτομα του επόμενου μεγαλύτερου μεγέθους (16 cm έως 36 cm) τρέφονται ως επί το πλείστον με τελεόστεους, ιδιαίτερα με γαύρους και σαρδέλες. Σε αυτή τη φάση της ανάπτυξης ξεκινάει και η σεξουαλική ωρίμανση, η οποία στα αρσενικά ολοκληρώνεται όταν φτάσουν σε μέγεθος 36 cm (στα 2.5 έτη ζωής), ενώ στα θηλυκά ολοκληρώνεται όταν φτάσουν σε μέγεθος 38.5 cm (στα 4.4 έτη ζωής). Οι μεγαλύτερου μεγέθους και πλέον κυρίως σεξουαλικά ώριμοι μπακαλιάροι (πάνω από 36cm) τρέφονται σχεδόν αποκλειστικά με ιχθύες και καθόλου με ευφασεώδη και μυσιδώδη, ενώ δε, παρατηρούνται και περιπτώσεις κανιβαλισμού σε ποσοστά 12-17% του συνόλου της διατροφής. Η παρουσία ιχθύων στο στομαχικό περιεχόμενο των μπακαλιάρων αυξάνει σταδιακά από το καλοκαίρι και παρουσιάζει μέγιστο στη διάρκεια του χειμώνα, ενώ η παρουσία ευφασεωδών, μυσιδωδών και δεκάποδων παρουσιάζει μέγιστο το φθινόπωρο και την άνοιξη. Με την επίτευξη της σεξουαλικής ωριμότητας, τα άτομα των μπακαλιάρων παρουσιάζουν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, δεδομένου ότι ο οργανισμός τους και οι μεταβολικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε αυτόν εστιάζουν στην αναπαραγωγή. Η ωοτοκία λαμβάνει χώρα την περίοδο χειμώνα-άνοιξης, με μέγιστο κατά τον Φεβρουάριο, ενώ ο αριθμός των ώριμων αρσενικών μεγιστοποιείται από τον Φεβρουάριο έως και τον Απρίλιο, χωρίς να φτάνει σε μηδενικά επίπεδα στη διάρκεια των υπόλοιπων μηνών.<sup>32-36</sup> Ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο, έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό των λιπαρών οξέων αντιστοιχεί περίπου στο 0.6-1.0%. Από αυτά τα λιπαρά οξέα, το 39.8% είναι πολυακόρεστα, το 25.6% είναι μονοακόρεστα και το 32% είναι κορεσμένα.<sup>37,38</sup>

#### 1.5.4 Ο γαύρος (*Engraulis encrasicolus*)

Ο γαύρος αποτελεί ένα από τα πιο συχνά παρατηρούμενα πελαγικά ψάρια στις παράκτιες περιοχές, με το μέγεθός του να φτάνει τα 10 cm έως 20 cm. Σχηματίζει κοπάδια και ζει κάτω από το θερμοκλινές κατά τη διάρκεια της ημέρας, οπότε και τρέφεται, ενώ εμφανίζεται σποραδικά πάνω από το θερμοκλινές κατά τη διάρκεια της νύχτας.



Εικόνα 6: Οι γαύροι που αλιεύθηκαν και συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Το μέγεθος και το φύλο δεν επιδρούν στις διατροφικές του συνήθειες, ενώ η ωρίμανσή του ολοκληρώνεται στο 1<sup>ο</sup> έτος ζωής του, όπου αρχίζει και η αναπαραγωγή. Παρατηρείται, ωστόσο, μεταβολή του μεγέθους των γαύρων στη διάρκεια του έτους, η οποία σχετίζεται με την αυξημένη κατανάλωση τροφής στη διάρκεια του χειμώνα. Πιο συγκεκριμένα, το Σεπτέμβριο φτάνουν σε ένα μέγιστο μέγεθος (μήκος και βάρος), το οποίο μειώνεται μέχρι το Δεκέμβριο και αυξάνεται πάλι από το Δεκέμβριο μέχρι και τον Μάρτιο.<sup>32,34-36,39-41</sup> Ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο, στο γαύρο παρατηρείται εποχική διακύμανση, με τα μεγαλύτερα ποσοστά λιπαρών να εντοπίζονται το μήνα Φεβρουάριο (5.67-5.75%), έπειτα ακολουθούν πτωτική τάση μέχρι τον Αύγουστο (0.92-0.96%). Σε σχέση με τα λιπαρά οξέα, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα αποτελούν το 29.13-46.57%, με μέγιστο τους μήνες Φεβρουάριο και Αύγουστο, ελάχιστο το μήνα Απρίλιο και ενδιάμεσα ποσοστά τους υπόλοιπους μήνες. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν το 11.90-22.97%, με μέγιστο το μήνα Αύγουστο, ελάχιστο το μήνα Ιούνιο και ενδιάμεσα ποσοστά τους υπόλοιπους μήνες. Τέλος, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν το 32.36-42.94%, με μέγιστα τους μήνες Φεβρουάριο και Δεκέμβριο, ελάχιστο το μήνα Ιούνιο και ενδιάμεσα ποσοστά τους υπόλοιπους μήνες. Παρατηρείται αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ολικού λιπιδικού περιεχομένου και των ακόρεστων λιπαρών οξέων, αντίθετα με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, που αυξάνουν με την αύξηση του λίπους.<sup>42</sup>

## 1.6 Σκοπός Μελέτης

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί σε γενικό επίπεδο ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αρσενολιπιδίων σε τέσσερα είδη ψαριών (κουτσομούρα, λυθρίνι, μπακαλιάρος, γαύρος), καθώς και των παραγόντων που επηρεάζουν το προφίλ των αρσενολιπιδίων. Συγκεκριμένα εξετάζονται τρεις διαφορετικοί παράγοντες επίδρασης στο

προφίλ των αρσενολιπιδίων, οι οποίοι είναι το φύλο (κουτσομούρα, λυθρίνι), το είδος του ιστού (διαφορετικοί ιστοί μπακαλιάρου) και το είδος των ψαριών. Για την πραγμάτωση των παραπάνω αξιοποιείται η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, συζευγμένη με φασματομετρία μάζας με αναλυτή Orbitrap. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται σε εκχυλίσματα των παραπάνω ψαριών και ιστών. Παράλληλα πραγματοποιείται προσδιορισμός των ολικών συγκεντρώσεων αρσενικού στα παραπάνω εκχυλίσματα και σε αντίστοιχα ιζήματα που προκύπτουν από τη διαδικασία εκχύλισης με χρήση φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, με σκοπό τη μετέπειτα σύγκριση αυτών των συγκεντρώσεων με τις συγκεντρώσεις που προκύπτουν από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων κατά τον προσδιορισμό των αρσενολιπιδίων. Οι συγκεντρώσεις που αφορούν στα δείγματα προσδιορίζονται ως ppb ή ppm As ( $\mu\text{g}$  ή  $\text{mg}$  As ανά Kg ξηρού δείγματος). Οι παραπάνω προσδιορισμοί κρίνονται απαραίτητοι για την αξιολόγηση της τοξικότητας και της διαφοροποίησης που υπάρχει μεταξύ φύλων, ιστών και ειδών των ψαριών.

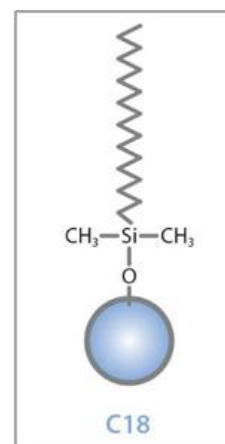


## 2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

### 2.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης (RPLC)

Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης αποτελεί μία από τις πιο ευρέως γνωστές αναλυτικές τεχνικές για το διαχωρισμό και την ανάλυση ποικίλων ενώσεων.<sup>43</sup> Στην εργασία αυτή δίνεται έμφαση στη σημασία της για το διαχωρισμό λιπιδικών δομών.

Η στατική φάση, δηλαδή το υλικό με το οποίο πληρώνεται μία χρωματογραφική στήλη, αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά σημεία για έναν χρωματογραφικό διαχωρισμό. Για την RPLC, η στατική φάση συνήθως αποτελείται από σωματίδια πυριτίας διαμέτρου έως 5 μm, χημικά τροποποιημένα ώστε να διαθέτουν μακριές αλκυλικές αλυσίδες (π.χ. C8, C18) προσδεμένες στην επιφάνειά τους μέσω σιλοξανικών δεσμών. Τα σωματίδια αυτά παραμένουν πολύ καλά πακεταρισμένα στο εσωτερικό της στήλης. Δεδομένων των χημικών χαρακτηριστικών της, η στατική φάση που προκύπτει είναι μη πολική και υδρόφοβη.<sup>44</sup> Στήλες με μικρότερου μεγέθους σωματίδια (π.χ. διαμέτρου 1.7-3 μm) είναι λειτουργικές σε μεγαλύτερη πίεση, αλλά παρέχουν αυξημένη διαχωριστική ικανότητα και μικρότερο χρόνο ανάλυσης σε σχέση με μεγαλύτερα σωματίδια.<sup>45</sup>



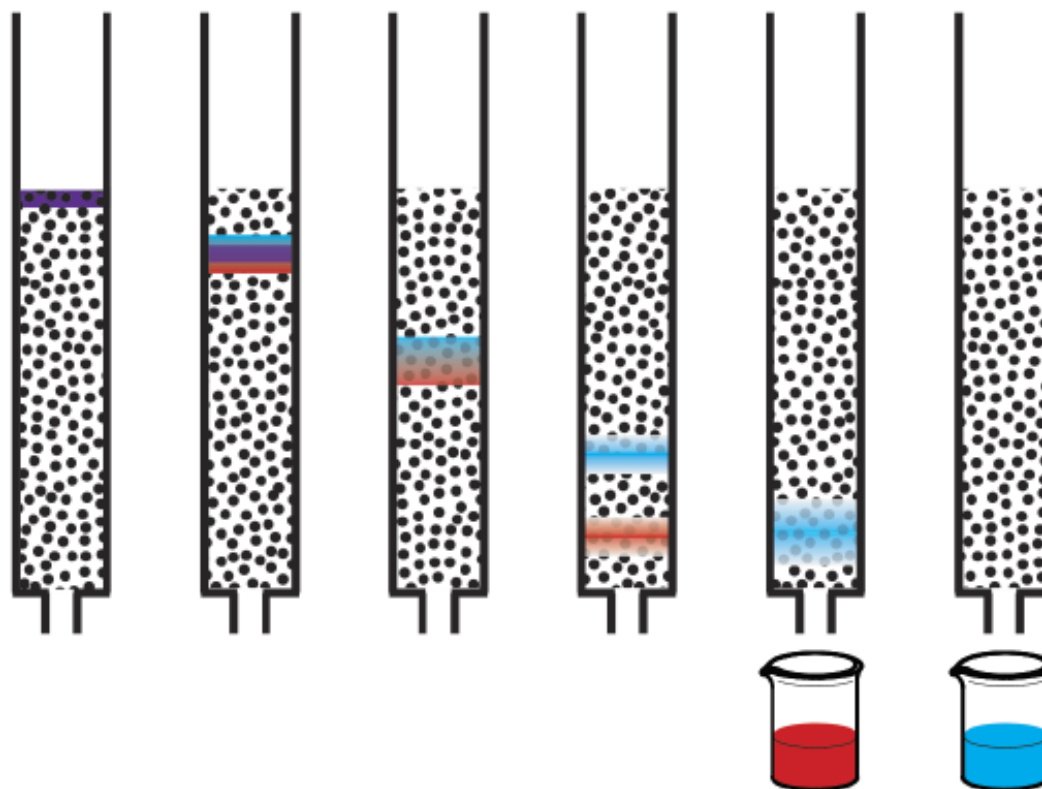
**Εικόνα 7:** Μια τυπική χρωματογραφική στήλη για RPLC, η στήλη Hypersil™ BDS C18 της Thermo Scientific™. (αριστερά) και η τυπική δομή των σωματιδίων μιας στήλης C18 (σχήμα στο πλαίσιο, δεξιά).<sup>1</sup>

Το δεύτερο σημαντικό στοιχείο για τη χρωματογραφία αποτελεί η κινητή φάση. Η κινητή φάση για τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι ένας ή περισσότεροι πολικοί διαλύτες (π.χ. νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο), που ρέει δια μέσου των σωματιδίων της στήλης, δημιουργώντας υψηλές πιέσεις. Καθώς η κινητή φάση ρέει από το ένα προς το άλλο άκρο της στήλης, παρασύρει τις πιο πολικές ενώσεις, οι οποίες εκλύονται γρηγορότερα. Αντιθέτως, οι

<sup>1</sup> Εικόνα από τη Fisher Scientific (<https://www.fishersci.se/shop/products/hypersil-bds-c18-hplc-columns-5-m-particle-size/p-4523225>)

λιγότερο πολικές ενώσεις έχουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση και κατακρατούνται περισσότερο από τη στήλη, γεγονός που σημαίνει ότι εκλούνται σε μεγαλύτερους χρόνους.<sup>45-47</sup> Η κινητή φάση μπορεί να έχει ίδια σύσταση καθ'όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας, οπότε η έκλυση χαρακτηρίζεται ως ισοκρατική ή να μεταβάλλεται με το χρόνο για μείωση της χρονικής διάρκειας της χρωματογραφίας, οπότε η έκλυση χαρακτηρίζεται ως βαθμιδωτή.<sup>45-47</sup>

Ο διαχωρισμός των λιπιδίων προκύπτει λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεών τους με τη στατική φάση, που οφείλονται ακόμα και σε μικρές διαφοροποιήσεις στη δομή και στην πολικότητά τους. Η υδρόφοβη αλληλεπίδραση που προκύπτει μεταξύ της στατικής φάσης και των λιπιδίων αποτελεί την κινητήριου δύναμη για το διαχωρισμό τους μέσω της RPLC. Το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, η παρουσία πολικών ομάδων, ο βαθμός κορεσμού, αλλά και η θέση των δεσμών στα λιπιδικά μόρια αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την αλληλεπίδραση αυτή. Με βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης, τα λιπίδια κατακρατούνται, διαχωρίζονται και τελικά εκλούνται βάσει του είδους και των συγκεκριμένων ιδιοτήτων του καθενός.<sup>45</sup>



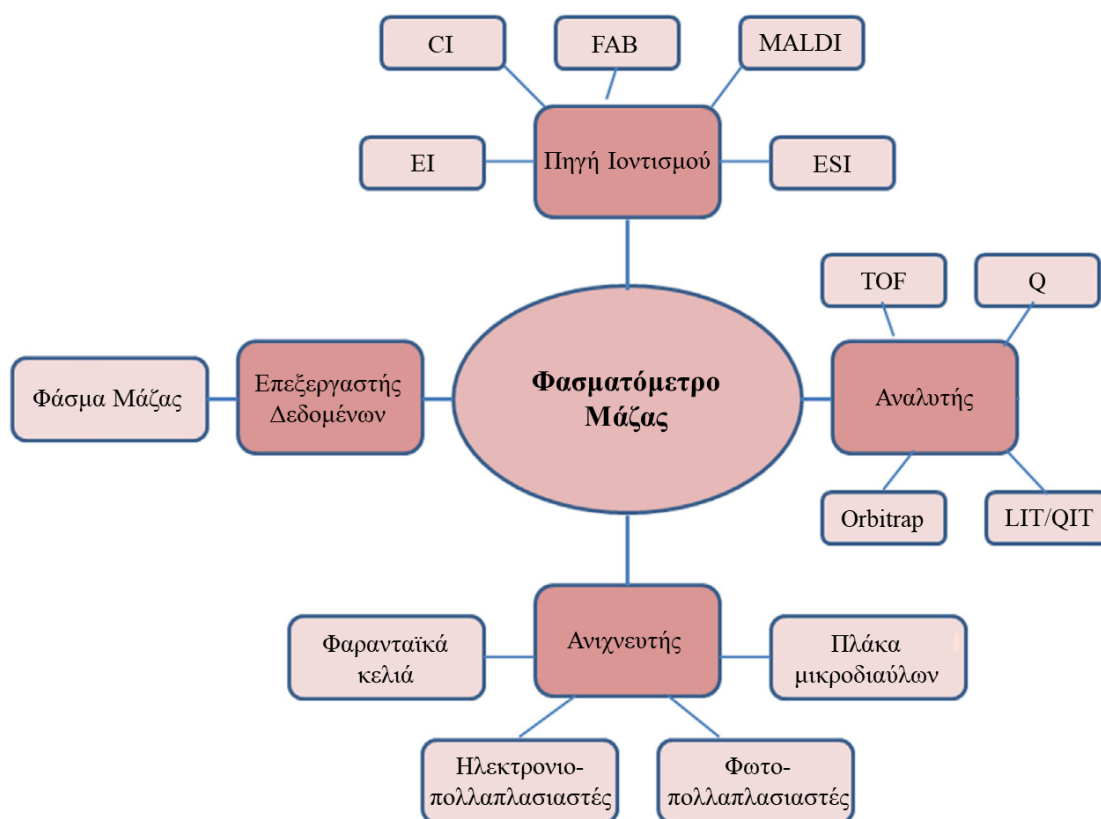
**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση του χρωματογραφικού διαχωρισμού ενός μίγματος δύο ενώσεων. Με τη μεταφορά τους διαμέσου της στήλης, οι ουσίες διαχωρίζονται, καθώς η μπλε αλληλοεπιδρά ισχυρότερα με τη στατική φάση κι επομένως εκλύεται σε μεγαλύτερο χρόνο.<sup>48</sup>

Μετά την έκλουση, η ανίχνευση των λιπιδίων μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους φασματομετρίας μάζας (MS), όπως η φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) και η φασματομετρία μάζας χημικού ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI-MS).<sup>44,49-51</sup> Οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και πληθώρα προσφερόμενων πληροφοριών ως προς τη δομή των μορίων. Σε γενικές γραμμές, η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας αποτελεί την πιο συνηθισμένη και εύχρηστη αναλυτική μέθοδο για τη συστηματική ανάλυση των λιπιδίων, ακόμη και σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Καθιστά δυνατό το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, ακόμη και την ποσοτικοποίηση εκατοντάδων λιπιδικών δομών διαφορετικών τάξεων (π.χ. λιπαρά οξέα, γλυκερολιπίδια, φωσφολιπίδια κ.α.) με εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα, επαναληψιμότητα και υψηλή ευαισθησία.<sup>45</sup>

Παρά τη δεδομένη πρόοδο στις τεχνικές που αφορούν τη λιπιδομική, συνεχίζει να επιδιώκεται περαιτέρω ανάπτυξη των μεθόδων. Ο σημαντικός βιολογικός ρόλος των λιπιδίων στους διάφορους οργανισμούς καθιστά επιτακτική την ανάγκη για αμεσότερη, ακριβέστερη και πιο διευρυμένη γνώση. Συνεπώς, η παρουσία ειδικά σχεδιασμένων στατικών φάσεων, λογισμικού για αποδοτικότερη ανάλυση, και ο εμπλουτισμός των βάσεων δεδομένων που αφορούν τα λιπίδια αποτελούν κρίσιμα σημεία για την εξέλιξη του τομέα.<sup>46</sup>

## 2.2 Φασματομετρία Μάζας – Βασικές Έννοιες

Η απαρχή της φασματομετρίας μάζας ταυτίζεται με την εφεύρεση του πρώτου φασματόμετρου μάζας από τον J.J. Thomson, αποτέλεσμα του οποίου ήταν ο προσδιορισμός μάζας προς φορτίο παραγόμενων ιόντων, ενώ ο σκοπός της εφεύρεσής του ήταν ο προσδιορισμός της ύπαρξης του ηλεκτρονίου.<sup>52</sup> Η παραγωγή και έπειτα ανίχνευση ιόντων διαφόρων μορίων και ατόμων αποτελεί βασική προϋπόθεση για οποιαδήποτε ανάλυση σε αναλυτές μάζας (πρωτεομική, μεταβολομική). Μέσω της τεχνικής αυτής επιδιώκεται η ποιοτική ή και ποσοτική ανάλυση τόσο μεμονωμένων ιόντων των στοιχείων (ατομική φασματομετρία μάζας), όσο και ιόντων ενός ποικίλου εύρους μοριακών ενώσεων (μοριακή φασματομετρία μάζας).<sup>53-56</sup> Η φασματομετρία μάζας πλέον αποτελεί μία συνήθη τεχνική που βρίσκει εφαρμογή σε πολλαπλά πεδία, συμπεριλαμβανομένης της χημείας, της βιολογίας, της φυσικής και των περιβαλλοντικών επιστημών. Τα βασικά τμήματα ενός φασματομέτρου μάζας, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, είναι η πηγή ιοντισμού, ο αναλυτής, ο ανιχνευτής και τέλος ο επεξεργαστής δεδομένων.



Εικόνα 9: Διαγραμματική απεικόνιση των διαφορετικών χαρακτηριστικών των φασματόμετρων μάζας.<sup>57</sup>

Για τη δημιουργία των ιόντων υπάρχουν διάφοροι τύποι πηγών ιοντισμού, μεταξύ των οποίων βρίσκονται ο ηλεκτροψεκασμός (ESI), ο χημικός ιοντισμός (CI), ο ιοντισμός από δέσμη ηλεκτρονίων (EI), ο ιοντισμός με βομβαρδισμό από άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB) και ο ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από τη μήτρα (MALDI). Ο διαχωρισμός των ιόντων σε ένα φασματόμετρο μάζας πραγματοποιείται με τη βοήθεια μαγνητικών και ηλεκτρικών πεδίων. Το αποτέλεσμα είναι η καταγραφή φασμάτων μάζας όπου αναγράφεται ο λόγος  $m/z$  για τα ιόντα που ανιχνεύονται καθώς και η ποσότητά τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο δύνανται να αναγνωριστούν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των ιόντων, όπως το ατομικό/μοριακό βάρος, το φορτίο και εάν πρόκειται για μόρια, η στοιχειακή τους σύσταση και η ταυτοποίηση της δομής τους.<sup>55-59</sup> Τη διαδικασία αυτή πραγματοποιεί ο εκάστοτε αναλυτής μάζας, από τον οποίο προσδιορίζεται αρκετές φορές και το είδος του φασματομέτρου μάζας. Κάποια είδη αναλυτών μάζας που συναντώνται συχνά είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης (TOF), ο τετραπολικός αναλυτής (Q), ο αναλυτής παγίδας ιόντων (LIT/QIT) και ο αναλυτής Orbitrap.<sup>57</sup> Τα είδη των ανιχνευτών ποικίλουν από φαρανταϊκά κελιά, ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές, φωτοπολλαπλασιαστές μέχρι και πλάκες μικροδιαύλων, με τα δύο πρώτα να είναι τα συνηθέστερα απαντώμενα. Τέλος, ο επεξεργαστής δεδομένων είναι το



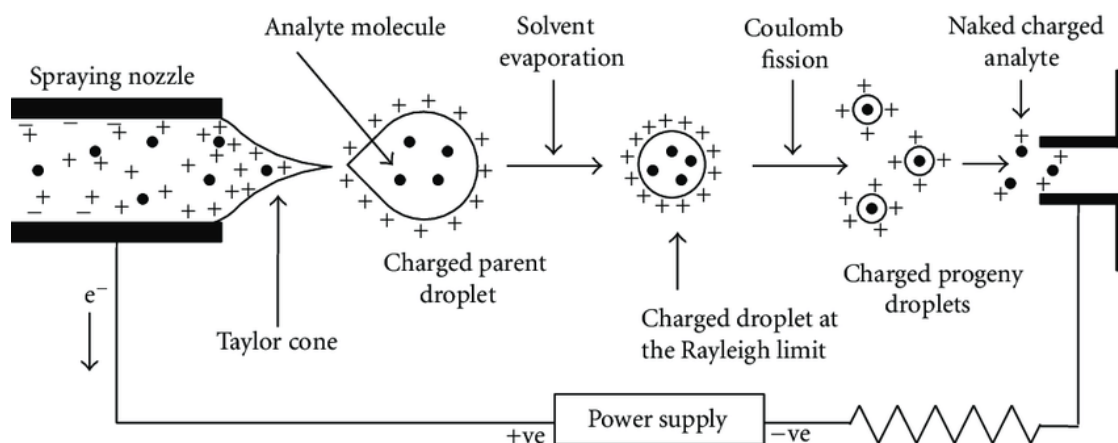
σύστημα υπολογιστή και λογισμικού μέσω των οποίων πραγματοποιείται η καταγραφή των φασμάτων και η μετέπειτα επεξεργασία τους.<sup>57,59</sup>

### 2.3 Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού με Orbitrap (ESI-Orbitrap-MS/MS)

Η φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού με Orbitrap αποτελεί μια τεχνική φασματομετρίας μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HR-MS), της οποίας την απαρχή έθεσε ο A. Makarov στα τέλη της δεκαετίας του 1990 με αρχές της δεκαετίας του 2000. Οι τεχνικές HR-MS παρέχουν αυξημένη ακρίβεια προσδιορισμού μάζας και διακριτικής ικανότητας στις αναλύσεις, παρέχοντας τη δυνατότητα ικανοποιητικής διάκρισης και διαχωρισμού ιόντων με ανεπαίσθητη διαφορά μαζών. Από την εμφάνισή του στην αγορά το 2005 μέχρι και σήμερα, το φασματόμετρο μάζας αναλυτή Orbitrap έχει βρει εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεομικής, της μεταβολομικής, των περιβαλλοντικών αναλύσεων, της φαρμακευτικής και των διαγνώσεων. Η ικανότητά του να προσδιορίζει με ακρίβεια τη μάζα και να προσφέρει φάσματα υψηλής διακριτικότητας το καθιστούν αναπόσπαστο εργαλείο για τον προσδιορισμό, την ποσοτικοποίηση και τον προσδιορισμό της δομής ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα, ακόμη και σε βιομόρια.<sup>60</sup> Στη συγκεκριμένη εργασία αξιοποιείται το φασματόμετρο μάζας Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole - Orbitrap™ της Thermo Scientific.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό περιεγράφηκε αρχικά το 1984, ενώ σήμερα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές για αναλύσεις που αφορούν βιομόρια. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό λαμβάνει χώρα στην πηγή ιοντισμού (πηγή API) και δεν απαιτεί την ύπαρξη υψηλής πίεσης ή ακραίων θερμοκρασιών και λαμβάνει χώρα υπό ατμοσφαιρική πίεση. Το διάλυμα προς ανάλυση μεταφέρεται με ταχύτητες της τάξης των  $\mu\text{L}/\text{min}$  μέσω μια ανοξειδωτής τριχοειδούς βελόνας, το άκρο της οποίας βρίσκεται σε δυναμικό 3-5 kV σε σχέση με την είσοδο του φασματόμετρου μάζας. Το άκρο του υγρού δείγματος σχηματίζει κώνο, ο οποίος ονομάζεται κώνος Taylor, και σχηματίζεται ως αποτέλεσμα του διαχωρισμού των φορτίων εντός του υγρού με την εφαρμογή του προαναφερόμενου δυναμικού. Κατά τη συνεχή έλξη του κώνου Taylor από το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργούνται φορτισμένες σταγόνες διαμέτρου μερικών μικρομέτρων. Η διαδικασία δημιουργίας σταγόνων υποβοηθείται από ομοαξονική ροή αερίου, συνήθως αζώτου ( $\text{N}_2$ ). Οι φορτισμένες σταγόνες που δημιουργούνται υφίστανται ταχεία εξάτμιση του διαλύτη, συνήθως και με θέρμανση. Όσο εξατμίζεται ποσότητα του διαλύτη από την κάθε σταγόνα, η πυκνότητα του φορτίου αυξάνεται μέχρι ενός ορίου, του λεγόμενου ορίου Rayleigh, οπότε οι δυνάμεις που συγκρατούν την επιφάνεια της κάθε σταγόνας δεν μπορούν πλέον να αντισταθμίσουν τις απωστικές δυνάμεις Coulomb μεταξύ των

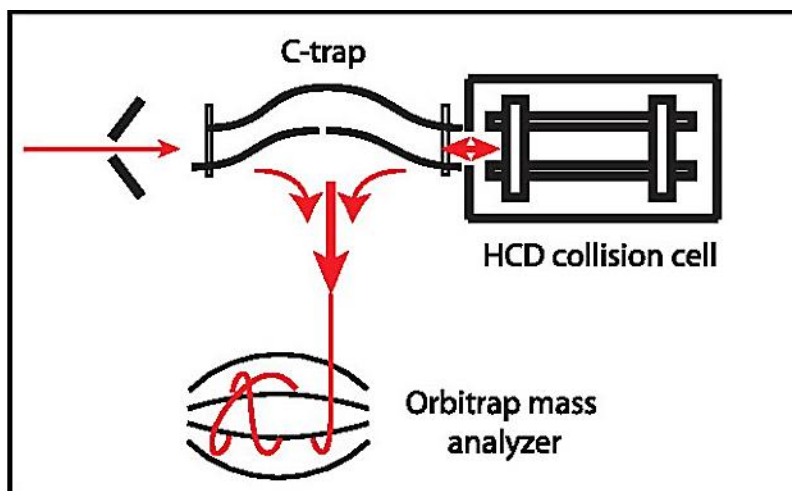
φορτίων (τα οποία φορτία είναι τα εντός του υγρού διαλύματος μοριακά ιόντα). Τότε η σταγόνα διασπάται (υφίσταται σχάση), συμβαίνει δηλαδή μία κουλομβική έκρηξη (Coulomb fission), με αποτέλεσμα να παράγονται ακόμα μικρότερα φορτισμένα σταγονίδια διαμέτρου μερικών μικρομέτρων και σταδιακά νανομέτρων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα ολοένα μικρότερα σταγονίδια έως ότου παραμείνουν μόνο φορτισμένα μόρια του αναλύτη, τα οποία και εισέρχονται στο φασματόμετρο μέσω του κώνου εισαγωγής δείγματος (sampler cone) κι έπειτα μέσω ενός θερμαινόμενου τριχοειδούς σωλήνα (heated capillary).<sup>61</sup>



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο.<sup>62</sup>

Με την εισαγωγή των ιόντων στο όργανο, ακολουθεί εστίασή τους μέσω φακών εστίασης. Ο φακός εστίασης (S-lens) είναι μια συσκευή μετάδοσης ιόντων αποτελούμενη από φύλλα ανοξειδωτού χάλυβα. Για την εστίαση των ιόντων ο φακός εστίασης αξιοποιεί ραδιοσυχνότητες, για τις οποίες όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές, τόσο μεγαλύτερου λόγου  $m/z$  ιόντα εστιάζονται και κινούνται προς την έξοδο. Εκεί πραγματοποιείται ξανά εστίαση από έναν επίπεδο πόλο ενίσχυσης (injection flatpole). Έπειτα τα ιόντα μεταφέρονται σε έναν κυρτό πόλο ενίσχυσης (bend flatpole), όπου ενισχύεται η μεταφορά τους και απομακρύνονται τα οι μη φορτισμένες δομές, αφού αυτά δεν έχουν τη δυνατότητα να ακολουθήσουν τη γωνία  $90^\circ$  στην οποία βρίσκεται ο κυρτός πόλος ενίσχυσης. Ένα τετράπολο (Quadrupole) μεταδίδει τα ιόντα με χρήση ραδιοσυχνότητας, οπότε παύει η ροή αερίου  $N_2$  και τα κατευθύνει προς μια κυρτή γραμμική παγίδα (C-Trap), η οποία είναι γεμάτη με αέριο  $N_2$ . Από εκεί, τα ιόντα μπορούν να ακολουθήσουν δύο πορείες. Στην πρώτη περίπτωση, τα ιόντα, καθώς συγκρούονται με τα μόρια του αερίου χάνουν την κινητική τους ενέργεια και συλλέγονται στο κεντρικό τμήμα της κυρτής γραμμικής παγίδας και οι φακοί Z (Z-Lens) στην έξοδο αυτής εστιάζουν τα ιόντα προς την είσοδο του αναλυτή Orbitrap (Orbitrap Analyzer). Από εκεί περνούν ως «πακέτο» προς τον αναλυτή. Στη δεύτερη περίπτωση κατευθύνονται προς την κυψέλη HCD (HCD Collision Cell – Higher Energy Collisional Dissociation). Η κυψέλη HCD

αποτελείται από ένα πολύπολο εντός ενός μεταλλικού σωλήνα, τροφοδοτείται με αέριο σύγκρουσης και έχει σκοπό τη θραυσματοποίηση των ιόντων, που πραγματοποιείται λόγω της παρουσίας υψηλών πιέσεων αερίου σύγκρουσης. Τα ιόντα των θραυσμάτων κατευθύνονται έπειτα προς την κυρτή γραμμική παγίδα και ακολουθούν την πορεία που περιγράφεται παραπάνω.



**Εικόνα 11:** Σχηματική απεικόνιση των δύο διαφορετικών πορειών των ιόντων (κόκκινα βέλη) από το την κυρτή γραμμική παγίδα (C-Trap) προς τον αναλυτή Orbitrap (Orbitrap Analyzer) ή προς την κυψέλη HCD (HCD Collision Cell).<sup>63</sup>

Ο αναλυτής μαζών Orbitrap βασίζεται στην αρχή της ηλεκτροστατικής παγίδευσης ιόντων με την κίνηση αυτών γύρω από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο. Όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα, ο αναλυτής Orbitrap αποτελείται από δύο βασικά μέρη, δύο εξωτερικά ηλεκτρόδια ατρακτοειδούς μορφής και ένα κεντρικό αξονικό ηλεκτρόδιο, τα οποία βρίσκονται σε κενό κάτω από  $10^{-9}$  mbar. Τα δύο εξωτερικά ηλεκτρόδια απομονώνονται ηλεκτρικά μέσω ενός κενού, πάχους μόλις μερικών μικρομέτρων, ασφαλισμένου από έναν κεντρικό δακτύλιο κατασκευασμένο από διηλεκτρικό υλικό. Το κεντρικό αξονικό ηλεκτρόδιο συγκρατεί τη διάταξη και την ευθυγραμμίζει μέσω δύο ακραίων διηλεκτρικών αποστατών. Με την εφαρμογή τάσης μεταξύ των εξωτερικών και του αξονικού ηλεκτροδίου και λόγω της ατρακτοειδούς μορφής δημιουργείται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του κεντρικού άξονα, το οποίο προκαλεί τρεις διαφορετικές κινήσεις στα ιόντα:

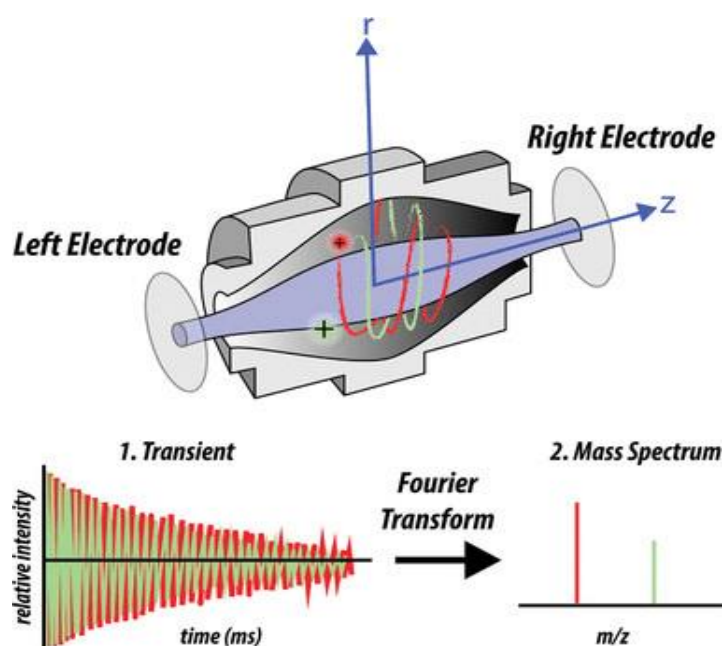
1. την περιστροφή γύρω από το αξονικό ηλεκτρόδιο
2. ακτινικές ταλαντώσεις κατά μήκος του άξονα z
3. αξονικές ταλαντώσεις κατά μήκος του άξονα z.

Δηλαδή, τα ιόντα που εγγέονται στην περιοχή μεταξύ των εξωτερικών και του αξονικού ηλεκτροδίου ταλαντώνονται στη διεύθυνση του αξονικού ηλεκτροδίου, ενώ ταυτόχρονα περιστρέφονται γύρω από αυτό. Δεδομένου ότι τα ιόντα είναι φορτισμένα, τα εξωτερικά

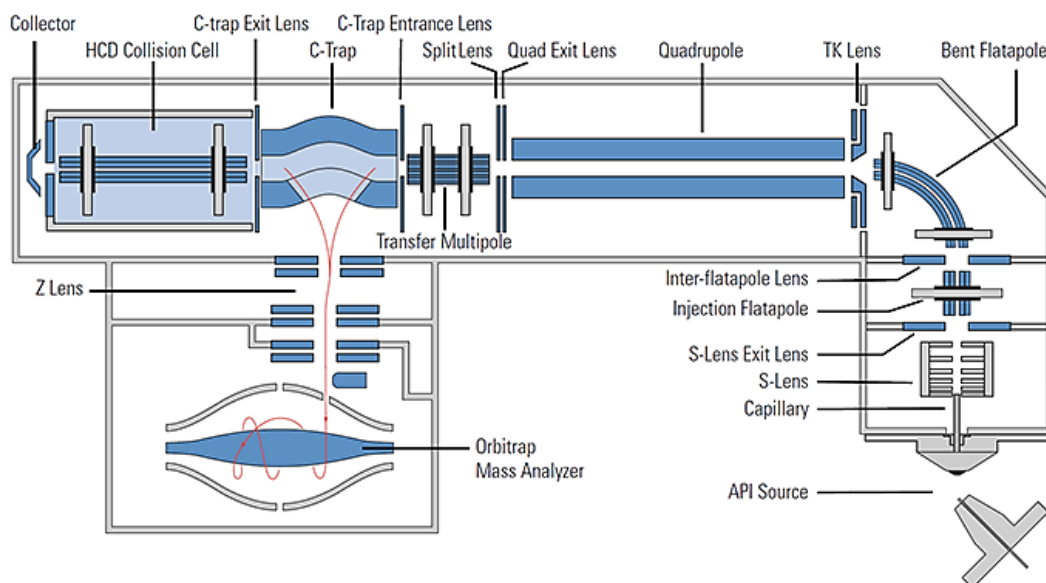
ηλεκτρόδια αντιλαμβάνονται το κινούμενο φορτίο. Η γωνιακή συχνότητα  $\omega$  των ταλαντευόμενων ιόντων είναι αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) του εκάστοτε ιόντος και πιο συγκεκριμένα δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\omega = \sqrt{\frac{e \times k}{m/z}}$$

όπου  $\omega$  είναι η γωνιακή συχνότητα ταλάντωσης,  $e$  είναι το στοιχειώδες φορτίο του ηλεκτρονίου ( $1.602 \times 10^{-19}$  C),  $k$  είναι το πεδίο καμπυλότητας, σταθερά που εξαρτάται από τη γεωμετρία του οργάνου, και  $m/z$  ο λόγος μάζας προς φορτίο του ιόντος.<sup>60</sup> Η συχνότητα αυτή τελικά μετατρέπεται μέσω μετασχηματισμού Fourier σε φασματικά δεδομένα.<sup>57,59,60,64</sup>



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της κίνησης των ιόντων στον αναλυτή Orbitrap και στην τελική μετατροπή Fourier του σήματος σε φάσμα μάζας.<sup>65</sup>



**Εικόνα 13:** Σχηματική αναπαράσταση της εσωτερικής διάταξης του φασματομέτρου Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole - Orbitrap™ της Thermo Scientific.<sup>2</sup>

Το φασματόμετρο μάζας είναι συνδεδεμένο με ένα σύστημα οθόνης και υπολογιστή και μέσω ειδικού λογισμικού γίνεται εφικτή η παρακολούθηση των πραγματοποιούμενων διεργασιών, αλλά και η ρύθμιση παραμέτρων για την καταγραφή και για την επεξεργασία των ληφθέντων φασμάτων. Τα φασματόμετρα μάζας τύπου Fourier Transform, ένα από τα οποία είναι και το Orbitrap, έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια μάζας και διακριτική ισχύ κατά περίπου 100-1000 φορές σε σχέση με άλλους τύπους φασματομέτρων, δίνοντας έτσι μεγάλο πλεονέκτημα ως προς τις αναλύσεις. Η διακριτική ικανότητα (R) ενός φασματομέτρου μάζας αναφέρεται στην ικανότητά του να διαχωρίζει μάζες. Στην περίπτωση ενός φασματομέτρου με αναλυτή Orbitrap, η διακριτική ικανότητα προσδιορίζεται κυρίως από τον χρόνο καταγραφής του παροδικού σήματος, δηλαδή του σήματος πριν τη μετατροπή Fourier. Μεγαλύτεροι χρόνοι καταγραφής επιτρέπουν την καταγραφή περισσότερων κύκλων ταλάντωσης των ιόντων, άρα η ακρίβεια της γωνιακής συχνότητας ταλάντωσης  $\omega$  είναι υψηλότερη και συνεπώς υψηλότερη είναι και η διακριτική ικανότητα του οργάνου. Η σχέση που θεωρητικά ορίζει τη διακριτική ικανότητα είναι

$$R = \frac{\omega \times T}{2\pi}$$

όπου  $\omega$  είναι η γωνιακή συχνότητα ταλάντωσης των ιόντων και T είναι ο χρόνος καταγραφής.  
 60,63,66,67

<sup>2</sup> Εικόνα από την Creative Proteomics, <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>

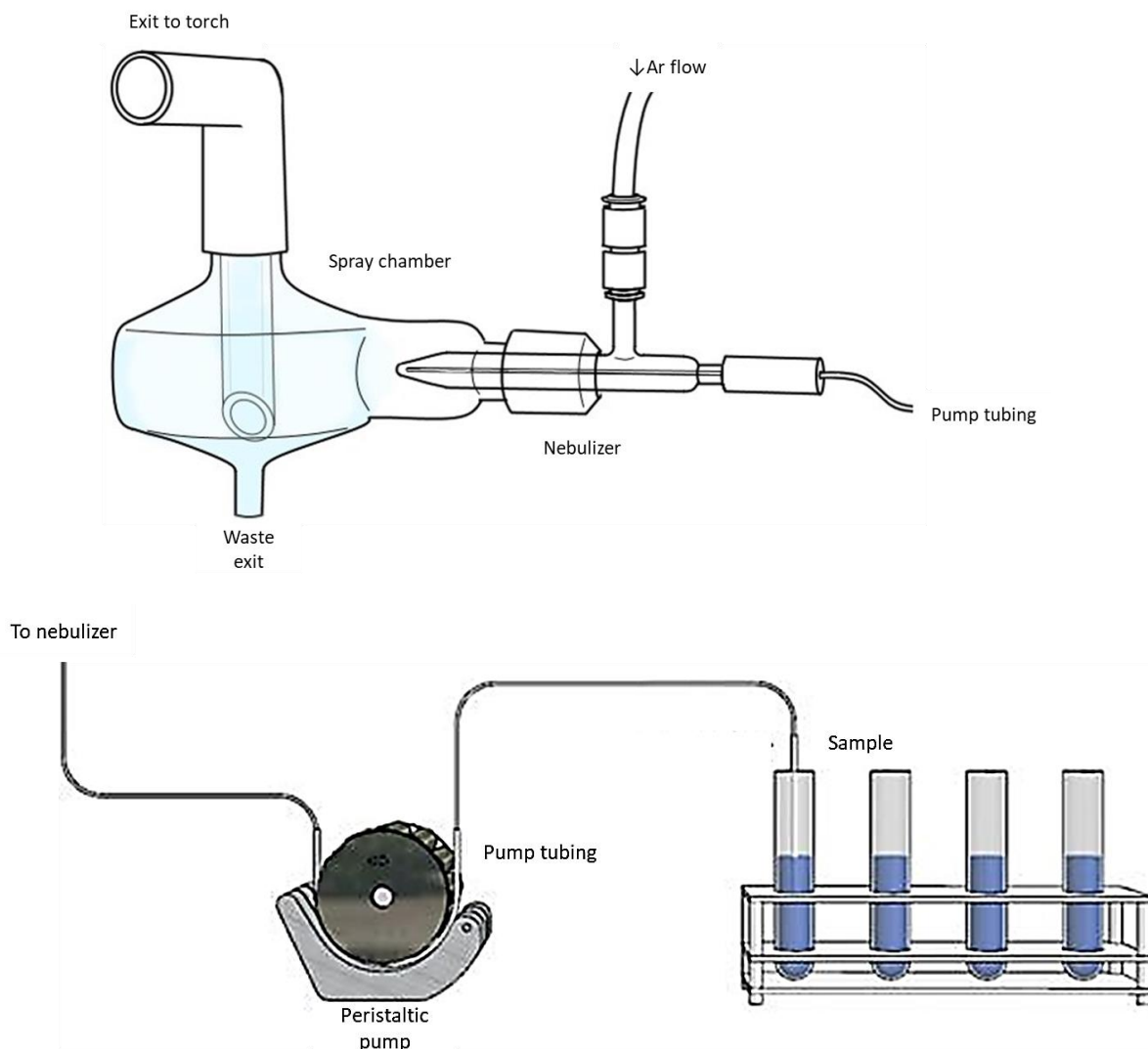
## 2.4 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS)

Η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στη μονοστοιχειακή και στην πολυστοιχειακή ανάλυση. Βασίζεται στην ατομοποίηση και στον ιοντισμό των στοιχείων εντός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma – ICP) θερμοκρασιών 6000-10000 K. Τα ιόντα στη συνέχεια διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) σε έναν τετραπολικό αναλυτή μάζας και ανιχνεύονται μέσω ενός ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος NexION 350X ICP-MS με λογισμικό Syngistix της Perkin Elmer.

Κατά τη διαδικασία της ανάλυσης, το δείγμα σε υγρή μορφή αρχικά εισέρχεται στο σύστημα εισαγωγής δείγματος, που αποτελείται από μια περισταλτική αντλία (peristaltic pump), έναν πνευματικό εκνεφωτή (pneumatic nebulizer) και έναν θάλαμο ψεκασμού (spray chamber). Με την εφαρμογή ροής αερίου αργού (Ar), το υγρό δείγμα εξερχόμενο από έναν πνευματικό εκνεφωτή και στην πορεία εντός ενός κυκλωνικού (cyclonic) θαλάμου ψεκασμού παίρνει τη μορφή λεπτόκοκκου αερολύματος (aerosol) σταγονιδίων διαμέτρου μερικών μικρομέτρων.

Στην πορεία προς τη έξοδο του θαλάμου ψεκασμού, εξομαλύνονται οι παλμοί που οφείλονται στην περισταλτική αντλία, βήμα απαραίτητο για την αποτελεσματικότητα και τη σταθερότητα του πλάσματος και πραγματοποιούνται σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό σε έναν κυκλωνικό (cyclonic) θάλαμο ψεκασμού. Ο κυκλωνικός θάλαμος ψεκασμού ενισχύει τη δημιουργία μιας σπειροειδούς ροής στο εσωτερικό του, η οποία λόγω της δημιουργίας φυγόκεντρου δύναμης ενισχύει το διαχωρισμό των μεγαλύτερων από τα μικρότερα σταγονίδια. Τα μεγαλύτερα σταγονίδια προσκρούουν στα τοιχώματα του θαλάμου και κατευθύνονται προς τα απόβλητα, ενώ τα μικρότερα διέρχονται μέσω ενός κεντρικού σωλήνα προς την έξοδο του θαλάμου και τελικά προς το πλάσμα.<sup>68-72</sup>

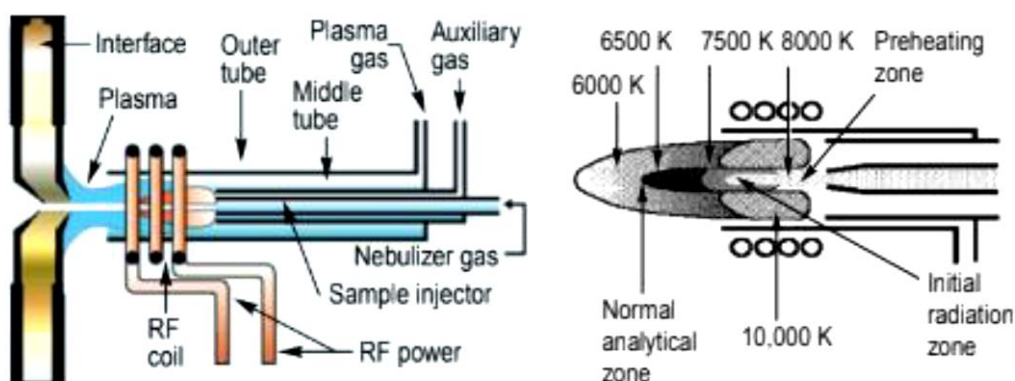




**Εικόνα 14:** Σχηματική απεικόνιση του συστήματος εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS. Κάτω απεικονίζεται το υγρό δείγμα και η περισταλτική αντλία και πάνω ο εκνεφωτής προσαρμοσμένος σε κυκλωνικό θάλαμο ψεκασμού.

Σε γενικές γραμμές το πλάσμα περιγράφεται ως ένα αέριο που περιέχει θετικά ιόντα και ελεύθερα ηλεκτρόνια και προσεγγιστικά είναι ουδέτερα φορτισμένο. Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αποτελεί μια ειδική κατηγορία πλάσματος παραγόμενου και τροφοδοτούμενου με ισχύ από μια γεννήτρια ραδιοσυχνότητας. Το πλάσμα δημιουργείται εντός ενός πυρσού αποτελούμενου από τρεις ομόκεντρους σωλήνες χαλαζία, τον εξωτερικό σωλήνα, το μεσαίο σωλήνα και το σωλήνα έγχυσης δείγματος. Στο άκρο του πυρσού εντοπίζεται εξωτερικά μια σπείρα επαγωγικού πηνίου συνδεδεμένου με μια γεννήτρια ραδιοσυχνότητας. Αέριο αργό (Ar) διαπερνάει το μεσαίο και τον εξωτερικό σωλήνα, διαμορφώνοντας το πλάσμα. Ένα δεύτερο αέριο, το λεγόμενο βοηθητικό αέριο, διαπερνάει το μεσαίο σωλήνα και το σωλήνα έγχυσης δείγματος. Το αέριο του εκνεφωτή, φέροντας το δείγμα ως αερόλυμα, διαπερνά ένα κανάλι μέσω του κέντρου του πλάσματος. Όταν το αργό περάσει διαμέσου του μεσαίου σωλήνα παρουσία ενός σπινθήρα δημιουργούνται κατιόντα αργού και

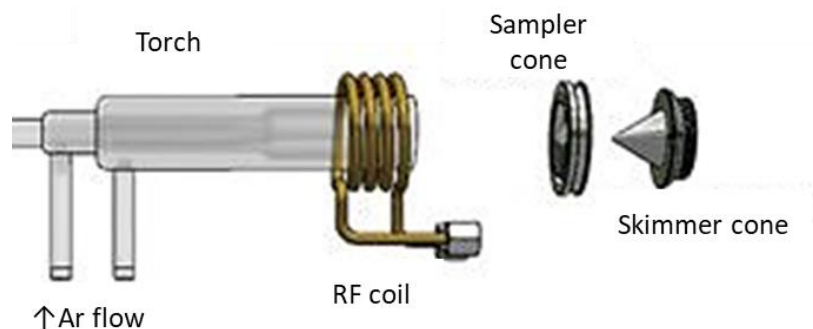
ελεύθερα ηλεκτρόνια, τα οποία επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και συγκρούονται με άτομα αργού. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται περισσότερα ελεύθερα ηλεκτρόνια και ιόντα αργού και προκύπτουν συνθήκες κατάλληλες για ατομοποίηση, διέγερση και ιοντισμό στην περιοχή συνήθους αναλυτικής ζώνης (Normal Analytical Zone – NAZ) του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.<sup>67,71</sup>



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του πυρσού (αριστερά) και της μορφής του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (δεξιά).<sup>71</sup>

Το πλάσμα κατευθύνεται στη συνέχεια προς την περιοχή διασύνδεσης (interface), ώστε τα ιόντα να μεταφερθούν ομαλά προς τον αναλυτή μάζας (mass analyzer), καθώς η περιοχή που σχηματίζεται το πλάσμα είναι σε ατμοσφαιρική πίεση, ενώ ο τετραπολικός αναλυτής μάζας (quadrupole) βρίσκεται σε συνθήκες υψηλού κενού (πίεση κάτω από  $10^{-4}$  Torr). Στην περιοχή διασύνδεσης εντοπίζονται τρεις μεταλλικοί κώνοι, ο κώνος δειγματοληψίας (sample cone), ο αποκορυφωτής (skimmer) και ο υπεραποκορυφωτής (hyperskimmer). Μετά τον αποκορυφωτή εντοπίζονται και φακοί εστίασης ιόντων, που σκοπό έχουν τη λήψη και εστίαση των ιόντων προς τον τετραπολικό αναλυτή μάζας με αξιοποίηση ηλεκτροστατικών δυνάμεων και αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον λειτουργία των φακών εστίασης αποτελεί η παρεμπόδιση εισόδου σωματιδίων, ουδέτερων ειδών και φωτονίων προς το τετράπολο. Παρουσία τέτοιων ειδών προκαλεί αστάθεια στο σήμα και επηρεάζει ισχυρά το σήμα υποβάθρου, συνεπώς και την ανάλυση.

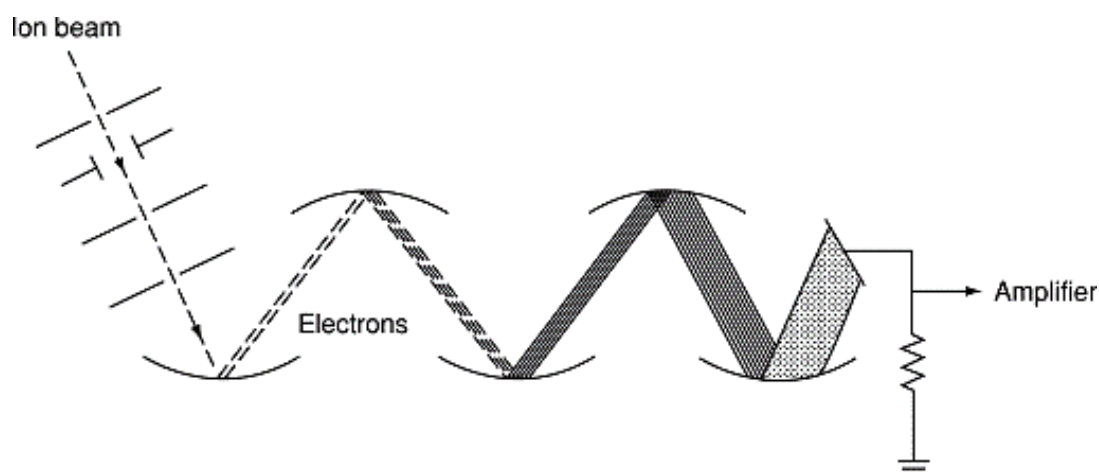




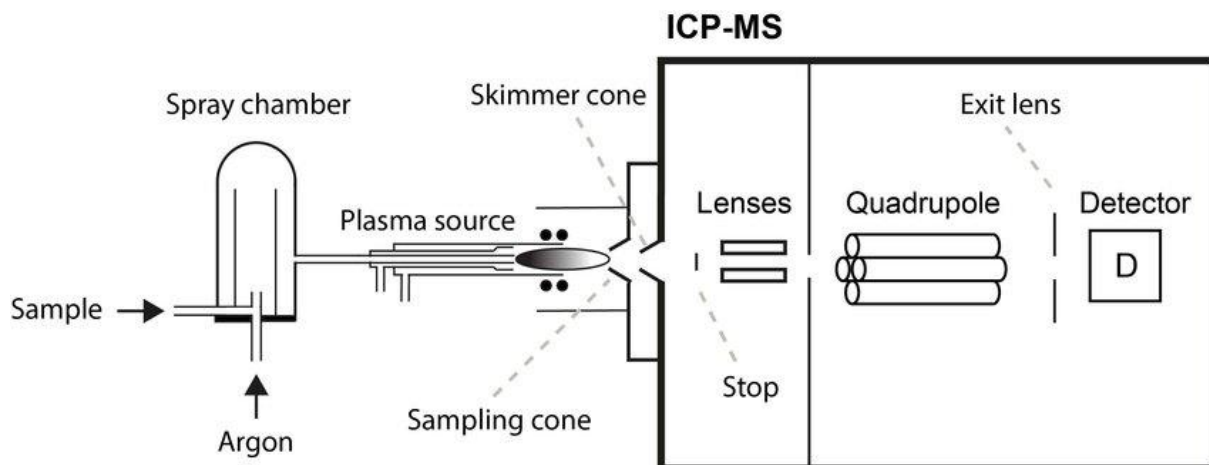
**Εικόνα 16:** Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του πυρσού, του κώνου εισαγωγής δείγματος και του αποκορυφωτή.

Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας ή τετράπολο (quadrupole) αποτελείται από τέσσερις μεταλλικές ράβδους, ανά δύο παράλληλες και συνδεδεμένες μεταξύ τους, στις οποίες εφαρμόζονται σταθερού λόγου συνεχή και εναλλασσόμενα δυναμικά. Με την είσοδό τους στον τετραπολικό αναλυτή μάζας και αναλόγως των εφαρμοζόμενων δυναμικών, μόνο τα ιόντα συγκεκριμένου λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) καταφέρνουν να τον διαπεράσουν και να κατευθυνθούν προς έναν ανιχνευτή. Η δυνατότητα του τετράπολου να σαρώνει ένα μεγάλο εύρος  $m/z$  σε πολύ μικρούς χρόνους (msec) αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα που κάνει την πολυστοιχειακή ανάλυση εφικτή για το ICP-MS.

Ο ανιχνευτής των συστημάτων αυτών είναι συνήθως ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνόδων. Οι πολλαπλές δύνοδοι αποτελούνται από επιφάνειες χαλκού/βηρυλλίου (Cu/Be). Όταν προσκρούσουν θετικά φορτισμένα ιόντα ή ηλεκτρόνια υψηλών ενεργειών πάνω τους, απελευθερώνονται ριπές ηλεκτρονίων. Τα απελευθερωμένα ηλεκτρόνια έλκονται και προσκρούουν στην επόμενη δύνοδο δημιουργώντας ακόμα μεγαλύτερες ριπές ηλεκτρονίων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αλυσιδωτά, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ηλεκτρικού σήματος υψηλής έντασης ακόμα και για πολύ μικρές ποσότητες ιόντων.



**Εικόνα 17:** Σχηματική απεικόνιση ενός ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή διακριτών δυνόδων.<sup>73</sup>



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ενός φασματομέτρου μάζας ICP-MS.<sup>74</sup>

Τέλος, το αναλογικό σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό και καταγράφεται με τη βοήθεια ενός υπολογιστή που είναι συνδεδεμένο το όργανο και κατάλληλου λογισμικού.<sup>69-71</sup>

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Χημικά – Αντιδραστήρια

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- BCR-627 Certified Reference Material
- Πυριδίνη (Honeywell, βαθμού HPLC,  $\geq 99.9\%$ )
- Μεθανόλη (Supelco, βαθμωτού τύπου για υγρή χρωματογραφία)
- Φορμικό οξύ (Fisher Chemical, βαθμού LC/MS)
- Νιτρικό οξύ (Fisher Chemical, βαθμού ανάλυσης ίχνους,  $\geq 68\%$ )
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (Sigma Aldrich, βαθμού ανάλυσης ίχνους,  $\geq 30\%$ )
- Υπερκάθαρο νερό (18.2 ΜΩ/cm, 25°C)
- Μονοστοιχειακό πρότυπο διάλυμα αρσενικού (CPI International, Peak Performance Certified Reference Materials, 10000 $\pm$ 30μg As/L σε HNO<sub>3</sub> 4% v/v)
- Διμεθυλαρσενικό οξύ (Fluka Chemica,  $\geq 99\%$ )
- Ιωδιούχο κάλιο (Supelco)
- Οξίνο θειώδες νάτριο (Sigma Aldrich)
- Υδροχλωρικό οξύ (Supelco, 37%)
- Χλωροφόρμιο (Sigma Aldrich, άνυδρο,  $\geq 99\%$ )
- Θεϊκό νάτριο (Sigma Aldrich, άνυδρο, κόκκοι,  $\geq 99.0\%$ )
- Υδροξείδιο του νατρίου (Fluka BioChemica, σφαιρίδια,  $\geq 98.0\%$ )
- 1-βρωμοοκταδεκάνιο (Sigma Aldrich,  $\geq 97\%$ )
- Αιθανόλη (Fisher Chemical,  $\geq 99.8\%$ )
- Διαίθυλ-αιθέρας (Riedel-de Haën)
- Οξικός αιθυλεστέρας (Honeywell, βαθμού HPLC,  $\geq 99.7\%$ )

#### 3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Φασματοόμετρο μάζας Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole - Orbitrap™ της Thermo Scientific με λογισμικό Exactive Plus Tune, Thermo Scientific™ Xcalibur™ Software και Thermo Scientific™ Xcalibur™ Qual Browser
- Φασματοόμετρο μάζας NexION 350X ICP-MS με λογισμικό Syngistix της Perkin Elmer
- Χρωματογραφική στήλη Hypersil™ BDS C18, 100 $\times$ 2.1μm, 5 μm της Thermo Scientific™
- Σύστημα χρωματογραφίας ThermoQuest Synevor της ThermoQuest™ Finnigan με λογισμικό ThermoQuest™ Xcalibur

- Γεννήτρια αζώτου Peak Scientific NM32LA καθαρότητας 99.5% για χρήση στην πηγή ιοντισμού
- Περισταλτική αντλία PERIMAX® 12της SPETEC®
- Πνευματικός εκνεφωτής Type K της Meinhard
- Θάλαμος ψεκασμού Cyclonic Spray Chamber της Perkin Elmer
- Φιάλη αργού υπό πίεση ή dewar υγρού αργού
- Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ( $0.0001 \pm 0.0002$  g) ABS120-4M της Kern & Sohn GmbH
- Αναλυτικός ζυγός δύο δεκαδικών ψηφίων ( $0.01 \pm 0.005$  g) 572-32 της Kern & Sohn GmbH
- Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου Gilson και πιπέτες Pasteur
- Λουτρό υπερήχων Elmasonic S 30 H της Elma Schmidbauer GmbH
- Αναδευτήρας vortex Reax 2000 της Heidolph
- Λουτρό ανάδευσης SBS40 της Stuart®
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος Multifuge x Pro 4R 220V/50Hz της ThermoFisher Scientific™
- Σύστημα μικροκυμάτων Speedwave® ENTRY της BERGHOF
- Φίλτρα διήθησης PTFE εσωτερικής διαμέτρου 0.20μm
- Freeze Dryer Telstar
- Σύριγγα Hamilton 50μL
- Εξαρτήματα χρωματογραφίας και βρόγχοι (loops) PEEK fittings

### 3.3 Δειγματοληψία

Η παρούσα μελέτη, ωστόσο, εστιάζει σε τέσσερα ευρέως διαδεδομένα είδη ψαριών, την κουτσομούρα (*Mullus barbatus*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), το μπακαλιάρo (*Merluccius merluccius*) και το γαύρο (*Engraulis encrasicolus*). Τα δείγματα ψαριών συλλέχθηκαν στα πλαίσια της δειγματοληψίας του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) από την έξοδο του Παγασητικού Κόλπου και τα Στενά του Αρτεμισίου κοντά στη Βόρεια Εύβοια. Οι κουτσομούρες, τα λυθρίνια και οι μπακαλιάροι είναι βενθικά ψάρια, ενώ οι γαύροι είναι πελαγικά ψάρια. Τα βενθικά ψάρια αλιεύθηκαν στις 04/04/2022 με βενθική τράτα κατά μήκος της πορτοκαλί γραμμής της παρακάτω εικόνας (**Εικόνα 19**), ενώ τα πελαγικά ψάρια αλιεύθηκαν στις 05/04/2022 με πελαγική τράτα κατά μήκος της μπλε γραμμής της παρακάτω εικόνας. Μετά την αλίευση, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε πλαστικές σακούλες στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας τους.



**Εικόνα 19:** Περιοχές δειγματοληψίας για βενθικά (πορτοκαλί γραμμή) και πελαγικά (μπλε γραμμή) ψάρια.

### 3.4 Προεργασία δειγμάτων προς ανάλυση

Τα δείγματα των ψαριών αρχικά αποψύχονται βαθμιαία στο ψυγείο, δηλαδή αποψύχονται καθημερινά μόνο τα δείγματα στα οποία γίνεται περεταιίρω κατεργασία, με σκοπό την κατά το δυνατόν καλύτερη διατήρησή τους προς αποφυγή αλλοιώσεων. Μετά την απόψυξη πραγματοποιείται μέτρηση και καταγραφή του μήκους και του βάρους των ψαριών και ακολουθεί προσεκτική συλλογή των επιθυμητών ιστών. Σε κάθε ψάρι πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός βάσει φύλου με κριτήριο τις γονάδες των ψαριών. Οι κουτσομούρες διαχωρίστηκαν σε αρσενικές και θηλυκές, τα λυθρίνια σε αρσενικά, θηλυκά και ερμαφρόδιτα, οι μπακαλιάροι ήταν μόνο θηλυκού φύλου, ενώ δεν ήταν δυνατός ο οπτικός προσδιορισμός του φύλου για το γαύρο. Κατόπιν, συλλέχθηκε ιστός από τη σάρκα όλων των ψαριών και επιπρόσθετα συλλέχθηκαν ιστοί από στομαχικό περιεχόμενο, γονάδες, βράγχια και συκώτι από τους μπακαλιάρους. Τα δείγματα ιστών τοποθετούνται σε πλαστικά σακουλάκια στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνει η διαδικασία της ξήρανσης. Για την ξήρανση – λυοφιλοποίηση τα δείγματα τοποθετούνται παγωμένα σε freeze dryer για 72 ώρες με τα σακουλάκια τους ημιανοιγμένα για αποφυγή επιμολύνσεων. Μετά από την ξήρανση, τα σακουλάκια κλείνουν και πάλι. Τα δείγματα ομογενοποιούνται με γουδί έως ότου αποκτήσουν μορφή σκόνης, παραμένοντας, όμως, στα σακουλάκια προς αποφυγή επιμολύνσεων. Οι πληροφορίες των δειγμάτων αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2**).

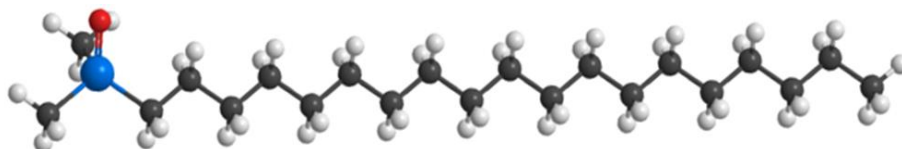
Πίνακας 2: Ονομασίες, κωδικοί ομάδων και μορφολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ψαριών.

Είδος Ψαριού	Φύλο	Ιστός	Κωδικός Ομάδας	Μέσο Μήκος (cm)	Μέσο Βάρος (g)
Κουτσομούρα	Θηλυκό	Σάρκα	F-2	17.5 ± 2.9	62.0 ± 26.5
			F-3	18.6 ± 2.1	75.2 ± 27.0
			F-4	18.1 ± 1.1	66.2 ± 17.6
	Αρσενικό	Σάρκα	M-1	16.1 ± 0.8	43.9 ± 6.8
			M-2	15.9 ± 1.0	44.0 ± 8.7
			M-4	16.2 ± 0.9	45.5 ± 9.6
Λυθρίνι	Θηλυκό	Σάρκα	F-2	21.4 ± 1.9	127.0 ± 38.5
			F-3	21.1 ± 1.0	121.4 ± 20.8
			F-5	21.6 ± 2.2	126.1 ± 35.8
	Αρσενικό	Σάρκα	M-3	23.1 ± 1.3	150.6 ± 29.3
			M-4	22.7 ± 0.9	147.4 ± 28.3
			M-5	23.7 ± 2.4	133.5 ± 18.9
	Ερμαφρόδιτο	Σάρκα	R-1	22.3 ± 0.4	139.3 ± 16.6
			R-2	21.9 ± 0.4	137.1 ± 12.9
			R-3	22.5 ± 0.9	138.3 ± 16.7
Γαύρος	Απροσδιόριστο	Σάρκα	2	8.3 ± 0.4	3.5 ± 0.5
			4	8.4 ± 0.6	3.6 ± 0.7
			5	8.5 ± 0.5	3.7 ± 0.6
Μπακαλιάρος	Θηλυκό	Σάρκα	Mu-2	29.5 ± 4.5	231.1 ± 106.7
			Mu-3	32.4 ± 5.3	258.1 ± 90.8
			Mu-4	31.3 ± 0.5	253.0 ± 29.6
			St-2	29.5 ± 4.5	231.1 ± 106.7
			St-3	32.4 ± 5.3	258.1 ± 90.8
			St-4	31.3 ± 0.5	253.0 ± 29.6
	Γονάδες	Στομαχικό Περιεχόμενο	Go-1	30.0 ± 5.0	220.5 ± 95.9
			Go-2	32.4 ± 5.3	231.1 ± 106.7
			Go-3	31.3 ± 0.5	258.1 ± 90.8
			Gi-2	29.5 ± 4.5	231.1 ± 106.7
			Gi-3	32.4 ± 5.3	258.1 ± 90.8
			Gi-4	31.3 ± 0.5	253.0 ± 29.6
Βράγχια	Στομαχικό Περιεχόμενο	Go-1	30.0 ± 5.0	220.5 ± 95.9	
		Go-2	32.4 ± 5.3	231.1 ± 106.7	
		Go-3	31.3 ± 0.5	258.1 ± 90.8	
		Gi-2	29.5 ± 4.5	231.1 ± 106.7	
		Gi-3	32.4 ± 5.3	258.1 ± 90.8	
		Gi-4	31.3 ± 0.5	253.0 ± 29.6	



### 3.4 Σύνθεση αρσενολιπιδίου AsHC<sub>374</sub>

Για τη σύνθεση του αρσενολιπιδίου AsHC<sub>374</sub> ακολουθείται διαδικασία που περιγράφεται βιβλιογραφικά<sup>75</sup>, αλλά σε μικρότερη κλίμακα, η οποία αντιστοιχεί στο ένα τέταρτο της κλίμακας της βιβλιογραφίας.



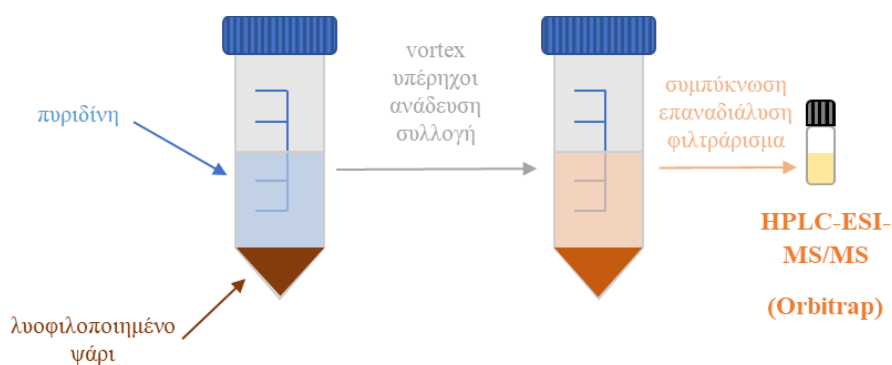
Εικόνα 20: Δομή του εσωτερικού προτύπου AsHC<sub>374</sub>.

Πιο συγκεκριμένα, σε υπερκάθαρο νερό όγκου 2.5 mL διαλύονται 0.5 g DMA(V), 1.65 g KI και 0.25 g NaHSO<sub>3</sub>. Όταν τα στερεά έχουν διαλυθεί πλήρως, προστίθενται στάγδην 2.5 mL πυκνού HCl (37%) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για τέσσερις ώρες. Στο τέλος της διαδικασίας σχηματίζεται καφέ οργανική φάση βαρύτερη από την υδατική, η οποία συλλέγεται, διαχωρίζεται και καθαρίζεται σε διφασικό διάλυμα χλωροφορμίου-υπερκάθαρου νερού αναλογίας 2:3 και συνολικού όγκου 25 mL. Η οργανική φάση (χλωροφόρμιο) συλλέγεται, ξεπλένεται και ξηραίνεται με χρήση επαρκούς ποσότητας Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, διαυγές κίτρινο έλαιο, το οποίο συμπυκνώνεται, ώστε να προκύψει τελικά ποσότητα διμεθυλαρσενικού ιωδιδίου. Ακολούθως, σε περιβάλλον αργού και θερμοκρασία 2°C, όγκος 0.2-0.5mL του μόλις παρασκευασμένου διμεθυλαρσενικού ιωδιδίου προστίθενται στάγδην υπό συνεχή ανάδευση σε δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος NaOH 10M. Στην επιφάνεια του διαλύματος σχηματίζεται μια δεύτερη φάση, το BDMAO (δισ-διμεθυλαρσενικό οξύ). Όταν σταματήσει να παρατηρείται σχηματισμός επιπλέον ποσότητας αυτού, προστίθενται διάλυμα 1-βρωμο-οκταδεκανίνου, παρασκευασμένου με διάλυση 0.425 g 1-βρωμο-οκταδεκανίνου σε 2.5 mL αιθανόλη. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε περιβάλλον αργού για 12 ώρες σε θερμοκρασία 78°C, έπειτα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με όγκο υπερκάθαρου νερού και πραγματοποιούνται πλύσεις του με διαιθυλ-αιθέρα. Στη συνέχεια, στην υδατική φάση του διαλύματος προστίθεται όγκος HCl 6M με σκοπό την εξουδετέρωση και πραγματοποιείται εκχύλιση του προϊόντος με χλωροφόρμιο. Στην οργανική φάση πραγματοποιούνται πλύσεις και εξάτμιση υπό κενό. Το υπόλειμμα αυτής καθαρίζεται χρωματογραφικά με χρήση πιπετοκολώνας πληρωμένης με Silica gel, όπου πραγματοποιείται βαθμιδωτή έκλυση από 100% οξικό αιθυλεστέρα σε 100% μεθανόλη (6 κλάσματα, βήμα βαθμίδωσης 20%) με όγκο εκλουστικών μέσων για κάθε κλάσμα περίπου 10mL. Για την επιβεβαίωση του κλάσματος που περιέχει το προϊόν, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία TLC πριν την εισαγωγή του αρχικού δείγματος στην πιπετοκολώνα, αλλά και σε κάθε κλάσμα

χωριστά, μετά από την εκάστοτε έκλυση. Από τη διαδικασία προέκυψε ότι το προϊόν AsHC<sub>374</sub> παραλήφθηκε με το κλάσμα αναλογιών 40% οξικού αιθυλεστέρα – 60% μεθανόλης με καθαρότητα 98.9%, όπως προέκυψε από ανάλυση φάσματος μάζας. Ακολούθησε συμπύκνωση του δείγματος μέχρι ξηρού και επαναδιάλυσή του σε μεθανόλη σε όγκο 5mL.

### 3.5 Εκχύλιση αρσενολιπιδίων και προετοιμασία για ανάλυση με HPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS

Για την εκχύλιση των αρσενολιπιδίων από δείγματα ψαριών ακολουθείται διαδικασία που περιγράφεται στη βιβλιογραφία για δείγματα τόνου<sup>76</sup>, με ορισμένες τροποποιήσεις. Αρχικά, σε περίπου 0.25 g δείγματος λυοφιλοποιημένου ψαριού ή υλικού αναφοράς (BCR-627) προστίθενται 5.0±0.05 mL πυριδίνης. Το μίγμα υποβάλλεται σε ισχυρή μηχανική ανάδευση (vortex) για 1 λεπτό κι έπειτα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων (≤30°C) για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αφήνεται σε ήπια ανάδευση (skaker) για περίπου 1 ώρα με τρόπο τέτοιο ώστε η πυριδίνη να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή επαφή με το στερεό δείγμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (10000×g, 20 λεπτά) και συλλογή όσο το δυνατόν μεγαλύτερου όγκου του υπερκείμενου υγρού (πάνω από 3 mL) σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα (δείγμα Orbitrap), από το οποίο 0.5 mL μεταφέρονται σε ξεχωριστό πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα (δείγμα ICP-MS). Το ίζημα (pellet) και τα δύο μέρη του υπερκείμενου συμπυκνώνονται υπό ροή αζώτου μέχρι ξηρού και παραμένουν σφραγισμένα στους -30°C έως ότου αναλυθούν. Την ημέρα της ανάλυσης, το «δείγμα Orbitrap» επαναδιαλύεται σε 400 μL μεθανόλη, φιλτράρεται, και δύο μέρη του φιλτραρισμένου δείγματος, όγκου 80 μL έκαστο, λαμβάνονται σε γυάλινα δοχεία όγκου 1.5 mL. Στο πρώτο προστίθενται 10 μL μεθανόλης και στο δεύτερο προστίθενται 10μL από το διάλυμα μεθανόλης του AsHC<sub>374</sub> ως εσωτερικό πρότυπο (internal standard – i.s.), οπότε και παρασκευάζονται τα τελικά προς ανάλυση δείγματα. Κατ' αυτόν τον τρόπο τα δύο δείγματα έχουν ίδιο βαθμό αραίωσης και τα αποτελέσματά από τις αναλύσεις τους είναι άμεσα συγκρίσιμα.



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης των αρσενολιπιδίων από τα δείγματα ψαριών.



### 3.6 Χώνευση στερεού υπολείμματος και προετοιμασία για ανάλυση με ICP-MS

Για τη χώνευση του pellet πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές από βιβλιογραφικές μεθόδους<sup>76-80</sup>, καθώς και παραλλαγές τους μέχρι την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου χώνευσης, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω. Πιο συγκεκριμένα, pellet μάζας μέχρι 0.25 g ζυγίζεται και μεταφέρεται στα δοχεία του συστήματος μικροκυμάτων, προστίθενται 5 mL υπερκάθαρου HNO<sub>3</sub> 69% v/v, τα δοχεία πωματίζονται αεροστεγώς και αφήνονται προς προχώνευση για 12 – 14 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθενται 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, τα δοχεία πωματίζονται αεροστεγώς και τοποθετούνται στο σύστημα μικροκυμάτων για την έναρξη της χώνευσης. Το πρόγραμμα της χώνευσης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3**).

**Πίνακας 3:** Πρόγραμμα χώνευσης για τα pellets στο σύστημα μικροκυμάτων speedwave® ENTRY της BERGHOF. Στην πρώτη σειρά φαίνεται ο αριθμός του κάθε βήματος (Step). Στη δεύτερη σειρά φαίνεται ο χρόνος αύξησης ή μείωσης της θερμοκρασίας (Ramp) σε λεπτά (min.) και στην τρίτη σειρά ο χρόνος (Time) σε λεπτά (min.) που η θερμοκρασία παραμένει σταθερή. Στην τέταρτη σειρά απεικονίζεται η θερμοκρασία (Temperature) του συστήματος σε βαθμούς Κελσίου (°C). Στην πέμπτη σειρά υποδηλώνεται εάν το σύστημα είναι ενεργό (Active) προς θέρμανση ή όχι (yes/no). Τέλος φαίνεται το ποσοστό της μέγιστης ισχύος του συστήματος (Max. Power %) που χρησιμοποιείται για το συγκεκριμένο πρόγραμμα.

Step		1	2	3	4	5
Ramp	min.	15	0	0	15	0
Time	min.	5	20	20	5	0
Temperature	°C	230	230	230	100	75
Active	yes/no	yes	yes	yes	yes	no
Max. Power	%	100				

Μετά από τη χώνευση, το περιεχόμενο των δοχείων του φούρνου μεταφέρεται σε προζυγισμένους σωλήνες τύπου Falcon και αραιώνεται μέχρι τελικού όγκου 50 mL. Για διευκόλυνση, στα δείγματα δίνεται η κωδική ονομασία «δείγμα pellet».

### 3.7 Προετοιμασία δειγμάτων υπερκείμενου υγρού για ανάλυση με ICP-MS

Για την ανάλυση των δειγμάτων υπερκείμενου υγρού στο ICP-MS, το συμπυκνωμένο «δείγμα ICP-MS» αρχικά αφήνεται για περίπου 10 λεπτά εκτός κατάψυξης. Στη συνέχεια, επαναδιαλύεται σε 200 μL μεθανόλης και φιλτράρεται με φίλτρο PTFE 0.20 μm. Το φιλτραρισμένο δείγμα παραμένει σε Eppendorf 1.5 mL μέχρι την ανάλυση, η οποία πραγματοποιείται την ίδια μέρα και όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την παρασκευή των δειγμάτων.

### 3.8 Πρότυπα διαλύματα

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από το ICP-MS είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης. Η καμπύλη βαθμονόμησης βασίζεται στην ύπαρξη και ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων, όπως αυτά που περιγράφονται ακολούθως.

#### 3.8.1 Μονοστοιχειακά διαλύματα αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ )

Βάσει του δείγματος προς ανάλυση στο ICP-MS (pellet ή υπερκείμενο υγρό) παρασκευάζονται δύο σειρές πρότυπων μονοστοιχειακών διαλυμάτων αρσενικού με σκοπό την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης. Ο λόγος ύπαρξης δύο σειρών αφορά στην επίδραση του εκάστοτε διαλύτη του δείγματος, καθώς στην περίπτωση του υπερκείμενου υγρού χρησιμοποιείται η μεθανόλη για αραιώση, ενώ στην περίπτωση του pellet έχουμε διάλυμα σε κυρίως  $\text{HNO}_3$  10% v/v., γεγονός που συνεπάγεται την αντιστοίχιση της εκάστοτε μήτρας με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των προτύπων. Συγκεκριμένα παρασκευάζεται ένα αρχικό διάλυμα (1 ppm) από αραιώση του πρότυπου μονοστοιχειακού διαλύματος αρσενικού 10000 ppm για την κάθε σειρά και έπειτα, με χρήση του αρχικού διαλύματος παρασκευάζονται διαλύματα 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb σε διαλύτη μεθανόλη 100% v/v και 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb, 100 ppb, 200 ppb και 600 ppb σε διαλύτη  $\text{HNO}_3$  10% v/v .

#### 3.8.2 Πρότυπα διαλύματα διμεθυλαρσενικού (V) οξέος (DMA(V))

Τα πρότυπα διαλύματα DMA(V) παρασκευάζονται με σκοπό την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση του εσωτερικού προτύπου  $\text{AsHC}_{374}$ . Για την παρασκευή αυτών ζυγίζεται ποσότητα 0,0041 g στερεού DMA(V) και διαλύεται σε 10.2 mL μεθανόλης, οπότε προκύπτει αρχικό διάλυμα 356ppm. Με αραιώσεις του αρχικού διαλύματος προκύπτουν διαλύματα 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb και 40 ppb σε μεθανόλη 100% v/v εκφρασμένα ως συγκεντρώσεις αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ).

### 3.9 Ανάλυση δειγμάτων με HPLC-ESI-Orbitrap-MS/MS

Για την ανάλυση των δειγμάτων υπερκείμενου («δείγμα Orbitrap») για αρσενολιπίδια χρησιμοποιείται το φασματόμετρο μάζας Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole - Orbitrap™ της Thermo Scientific με λογισμικό Exactive Plus Tune, Thermo Scientific™ Xcalibur™ Software και Thermo Scientific™ Xcalibur™ Qual Browser σε σύνδεση με το σύστημα χρωματογραφίας ThermoQuest™ Synergy της ThermoQuest™ Finnigan με λογισμικό ThermoQuest™ Xcalibur.

Αρχικά παρασκευάζονται οι κινητές φάσεις, οι οποίες είναι H<sub>2</sub>O με 0.1% v/v φορμικό οξύ (A) και μεθανόλη με 0.1% v/v φορμικό οξύ (B). Οι κινητές φάσεις απαερώνονται σε λουτρό υπερήχων και συνδέονται στο σύστημα χρωματογραφίας, αφού συνδεθεί και η χρωματογραφική στήλη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έλεγχος των σωληνώσεων του χρωματογραφικού συστήματος για φυσαλίδες και απομάκρυνσή τους, με απομόνωση της χρωματογραφικής στήλης και εφαρμογή ροής 2000 μL/min για σύσταση κινητής φάσης 50% A – 50% B. Με την ολοκλήρωση του παραπάνω, η στήλη αφήνεται να εξισορροπηθεί για περίπου 30-45 λεπτά σε κινητή φάση σύστασης 95% A – 5% B και ροή 200 μL/min. Παράλληλα, εκκινείται το φασματομέτρο μάζας και πραγματοποιείται έλεγχος και βαθμονόμηση αυτού με διάλυμα προτύπου τριφθοροοξικού νατρίου (STFA).

Κατόπιν, το σύστημα χρωματογραφίας συνδέεται με την πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου, αφήνεται για λίγα λεπτά προς εξισορρόπηση και ξεκινάει η διαδικασία καταγραφής των φασμάτων. Λόγω δυσλειτουργίας του αυτόματου δειγματολήπτη του συστήματος χρωματογραφίας, οι εγχύσεις των δειγμάτων πραγματοποιούνται χειροκίνητα και λόγω μη συνδεσιμότητάς του με τον υπολογιστή του φασματομέτρου μάζας, η έναρξη των καταγραφών εκκινείται επίσης χειροκίνητα βάσει ενός χαρακτηριστικού ήχου που σηματοδοτεί ότι η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος είναι σε θέση έγχυσης. Η χρωματογραφική έκλυση είναι βαθμιδωτή και ο χρόνος καταγραφής κάθε χρωματογραφήματος είναι 55 λεπτά. Πραγματοποιείται σάρωση και καταγραφή χωρίς και με θραυσματοποίηση σε δύο διαφορετικές ενέργειες. Τα θραύσματα που παρακολουθούνται είναι τέσσερα βασικά συν ένα δευτερεύον και συγκεκριμένα είναι:

1. [AsO]<sup>+</sup> → 90.91596 m/z
2. [AsOH]<sup>+</sup> → 91.92379 m/z
3. [As(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> → 102.95235 m/z
4. [As(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> → 104.96800 m/z
5. [C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>AsO]<sup>+</sup> → 122.97856 m/z

Απαιτείται η παρουσία όλων των θραυσμάτων για την επιβεβαίωση ότι το εκάστοτε παρακολουθούμενο μοριακό ιόν αφορά αρσενολιπίδιο. Η σειρά που ακολουθείται μεταξύ των δειγμάτων περιλαμβάνει αρχικά την καταγραφή ενός τυφλού δείγματος (Blank), ενός υλικού αναφοράς πιστοποιημένου για υδατοδιαλυτές μορφές αρσενικού (BCR-627) για το οποίο έχουν γίνει αναφορές για παρουσία αρσενολιπιδίων, του δείγματος απουσία εσωτερικού προτύπου και του δείγματος παρουσία εσωτερικού προτύπου. Μεταξύ των εγχύσεων των δειγμάτων πραγματοποιούνται τουλάχιστον 20 πλύσεις με μεθανόλη στη σύριγγα και στο βρόγχο

εισαγωγής του δείγματος στη στήλη, με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων από δείγμα σε δείγμα. Στο τέλος της ημέρας των αναλύσεων πραγματοποιείται καθαρισμός του συστήματος με κινητή φάση 95% A – 5% B και ροή 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  για 30-45 λεπτά. Οι συνθήκες του πειράματος αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4**).

**Πίνακας 4:** Αναλυτική παρουσίαση των συνθηκών της χρωματογραφίας, του προγράμματος έκλουσης και των παραμέτρων του φασματομέτρου μάζας Orbitrap κατά τη διαδικασία την ανάλυσης των δειγμάτων για διαχωρισμό και ανίχνευση αρσενολιπιδίων.

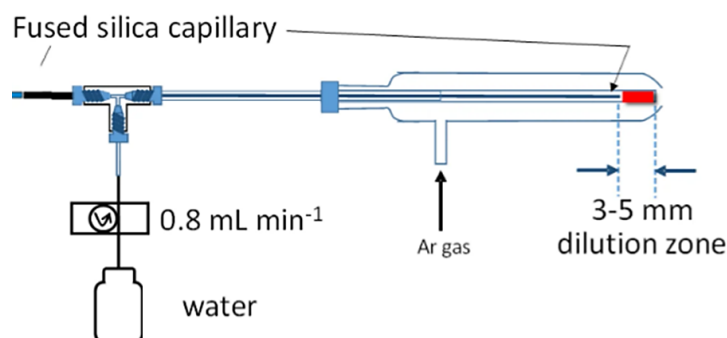
<b>Χρωματογραφία</b>		
<b>Στήλη</b>	Hypersil™ BDS C18 100×2.1mm, 5 $\mu\text{m}$ , Thermo Scientific™	
<b>Θερμοκρασία στήλης</b>	40°C	
<b>Ροή</b>	200 $\mu\text{L}/\text{min}$	
<b>Βρόγχος</b>	10 $\mu\text{L}$	
<b>Κινητές φάσεις</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
	H <sub>2</sub> O 0.1% v/v φορμικό οξύ	Μεθανόλη 0.1% v/v φορμικό οξύ
<b>Πρόγραμμα έκλουσης</b>		
<b>Χρόνος (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0	95	5
40.0	5	95
45.0	5	95
45.1	95	5
55.0	95	5
<b>Παράμετροι φασματομέτρου μάζας Orbitrap</b>		
<b>ESI Voltage</b>	4.00kV	
<b>Capillary Temperature</b>	250°C	
<b>Sheath gas</b>	45 psi	
<b>S-lens</b>	100.0	
<b>Auxiliary gas flow rate</b>	20 units	
<b>Auxiliary gas temperature</b>	400°C	
<b>Sweep gas flow rate</b>	0	
<b>Scan Type</b>	FMS – 2AIF (@hd 35 and @hd 120)	
<b>Scan Range</b>	80 – 1010 m/z	
<b>Resolution</b>	140000	
<b>Polarity</b>	Positive (+)	
<b>Microscans</b>	3	

### 3.10 Ανάλυση δειγμάτων με ICP-MS

#### 3.10.1 Δείγματα υπερκείμενου υγρού

Για την ανάλυση των δειγμάτων υπερκείμενου («δείγμα ICP-MS») για το ολικό αρσενικό ( $^{75}\text{As}$ ) που εντοπίζεται στα αρσενολιπίδια χρησιμοποιείται το φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος NexION 350X ICP-MS με λογισμικό Syngistix της Perkin Elmer σε σύνδεση με το σύστημα χρωματογραφίας ThermoQuest<sup>TM</sup> Syrnveyor της ThermoQuest<sup>TM</sup> Finnigan με λογισμικό ThermoQuest<sup>TM</sup> Xcalibur.

Αρχικά παρασκευάζονται οι κινητές φάσεις, οι οποίες είναι  $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$  v/v φορμικό οξύ (A) και μεθανόλη/ $0.1\%$  v/v φορμικό οξύ (B). Οι κινητές φάσεις απαερώνονται σε λουτρό υπερήχων και συνδέονται στο σύστημα χρωματογραφίας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έλεγχος των σωληνώσεων του χρωματογραφικού συστήματος για φυσαλίδες και απομάκρυνσή τους, με απομόνωση της χρωματογραφικής στήλης και εφαρμογή ροής  $2000\mu\text{L}/\text{min}$  για σύσταση κινητής φάσης  $50\% \text{ A} - 50\% \text{ B}$ . Με την ολοκλήρωση του παραπάνω, το σύστημα επανέρχεται σε κινητή φάση σύστασης  $95\% \text{ A} - 5\% \text{ B}$  και ροή  $200 \mu\text{L}/\text{min}$  και στην έξοδο της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος που θα κατέληγε κανονικά στη στήλη προσαρμόζεται τριχοειδής σωλήνας από τηγμένη πυριτία. Το άκρο του τριχοειδούς καταλήγει εντός του εκνεφωτή στο εσωτερικό ενός σωλήνα δειγματοληψίας για το ICP-MS, ο οποίος έχει συνεχή παροχή υπερκάθαρου νερού με χρήση περισταλτικής αντλίας. Ο σκοπός αυτής της συνδεσμολογίας (ανάλυση έγχυσης σε ροή, flow injection analysis) είναι η αραίωση του προερχόμενου από τη χρωματογραφία δείγματος, καθώς η περιεκτικότητά του σε οργανικό διαλύτη (μεθανόλη) άνω του  $5\%$  μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την καλή κατάσταση των κώνων του ICP-MS, αλλά και του πλάσματος.<sup>73,81</sup>



**Εικόνα 22:** Σχηματική απεικόνιση της διάταξης για την ανάλυση έγχυσης σε ροή (flow injection analysis) των δειγμάτων υπερκείμενου υγρού με ICP-MS.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Εικόνα από την AZO Cleantech, <https://www.azocleantech.com/article.aspx?ArticleID=1301>

Πριν από τη σύνδεση αυτού του συστήματος με το ICP-MS πραγματοποιείται έλεγχος της εύρυθμης λειτουργίας του οργάνου. Ο έλεγχος επιτυγχάνεται μέσω της ανάλυσης ενός προτύπου διαλύματος (tune solution)  $\text{HNO}_3$  1% v/v και συγκέντρωσης 1  $\mu\text{g/L}$  σε ίνδιο (In), βηρύλλιο (Be), δημήτριο (Ce), μόλυβδο (Pb), ουράνιο (U), σίδηρο (Fe), λίθιο (Li) και μαγνήσιο (Mg), οπότε παρατηρούνται συγκεκριμένες παράμετροι ως προς την ένταση του σήματος και γίνονται κατάλληλες βελτιστοποιήσεις προς την επίτευξη των επιθυμητών στόχων αυτών των παραμέτρων, σύμφωνα με τις οδηγίες του οργάνου. Επιπλέον στόχο αποτελεί η ένταση του σήματος για το αρσενικό ( $\text{As}^+$ , m/z 74.9) να είναι κάτω από 1000 cps (counts per second).

Πίνακας 5: Επιθυμητοί στόχοι παραμέτρων ελέγχου εύρυθμης λειτουργίας του ICP-MS.

Παράμετρος	Επιθυμητός Στόχος
Ένταση $\text{In}^+$ (m/z 114.9)	>40000 cps
Ένταση $\text{U}^+$ (m/z 238.1)	>30000 cps
Ένταση $\text{Be}^+$ (m/z 9.0)	>2000 cps
Λόγος εντάσεων $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+$	$\leq 0.02$

Εφόσον ο παραπάνω έλεγχος είναι ικανοποιητικός, η διάταξη τριχοειδούς – εκνεφωτή συνδέεται στον θάλαμο ψεκασμού και ξεκινά η καταγραφή. Στη διάρκεια μίας καταγραφής πραγματοποιούνται πολλαπλές εγχύσεις με μεταξύ τους διαφορά χρόνου 2 λεπτά. Σε πρώτη φάση πραγματοποιούνται εγχύσεις και καταγραφή των κατάλληλων προτύπων βαθμονόμησης και ακολουθούν τα υπόλοιπα δείγματα. Στη διάρκεια των καταγραφών παρακολουθείται η ένταση του σήματος για το αρσενικό ( $\text{As}^+$ , m/z 74.9) ως αναλύτη και για το ίνδιο ( $\text{In}^+$  m/z 114.9) ως παράμετρο παρακολούθησης της ευαισθησίας του οργάνου. Με το τέλος των αναλύσεων αποσυνδέεται ο τριχοειδής από το σύστημα και με χρήση του κλασσικού σωλήνα δειγματοληψίας του ICP-MS πραγματοποιείται καθαρισμός του αρχικά με  $\text{HNO}_3$  2% v/v κι έπειτα με υπερκάθαρο νερό για λίγα λεπτά.

Ελαφρώς διαφοροποιημένη διαδικασία απαιτείται για την ποσοτικοποίηση του προτύπου  $\text{AsHC}_{374}$ , όπου η χρωματογραφική στήλη δεν παρακάμπτεται, αλλά χρησιμοποιείται όμοια με τις αναλύσεις των δειγμάτων Orbitrap, με σκοπό τον προσδιορισμό του χρόνου έκλουσης του εσωτερικού προτύπου  $\text{AsHC}_{374}$  και το διαχωρισμό του από πιθανά υπολείμματα της διαδικασίας σύνθεσης.

Οι παράμετροι λειτουργίας του ICP-MS παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6:** Παράμετροι λειτουργίας του ICP-MS και οι τιμές τους.

Παράμετρος	Τιμή
Nebulizer gas flow	0.89 L/min
Auxiliary gas flow	1.2 L/min
Plasma gas flow	18 L/min
RF power	1400 kW
ICP-MS peristaltic pump speed	15 rpm
External peristaltic pump speed	20 rpm

### 3.10.2 Δείγματα χωνευμένου pellet

Η διαδικασία για την ανάλυση των δειγμάτων pellet με ICP-MS είναι παρόμοια με την παραπάνω διαδικασία. Η διαφορές εστιάζουν στη μη χρήση του συστήματος χρωματογραφίας και αραιώσης του δείγματος, αλλά στην απευθείας εισαγωγή του δείγματος προς τον εκνεφωτή με χρήση σωλήνα δειγματοληψίας. Ο σωλήνας αυτός μετά από την καταγραφή του σήματος για κάθε δείγμα εισάγεται σε υπερκάθαρο νερό και HNO<sub>3</sub> 2% v/v με σκοπό την έκπλυση του οργάνου πριν από την επόμενη ανάλυση για αποφυγή επιμολύνσεων.

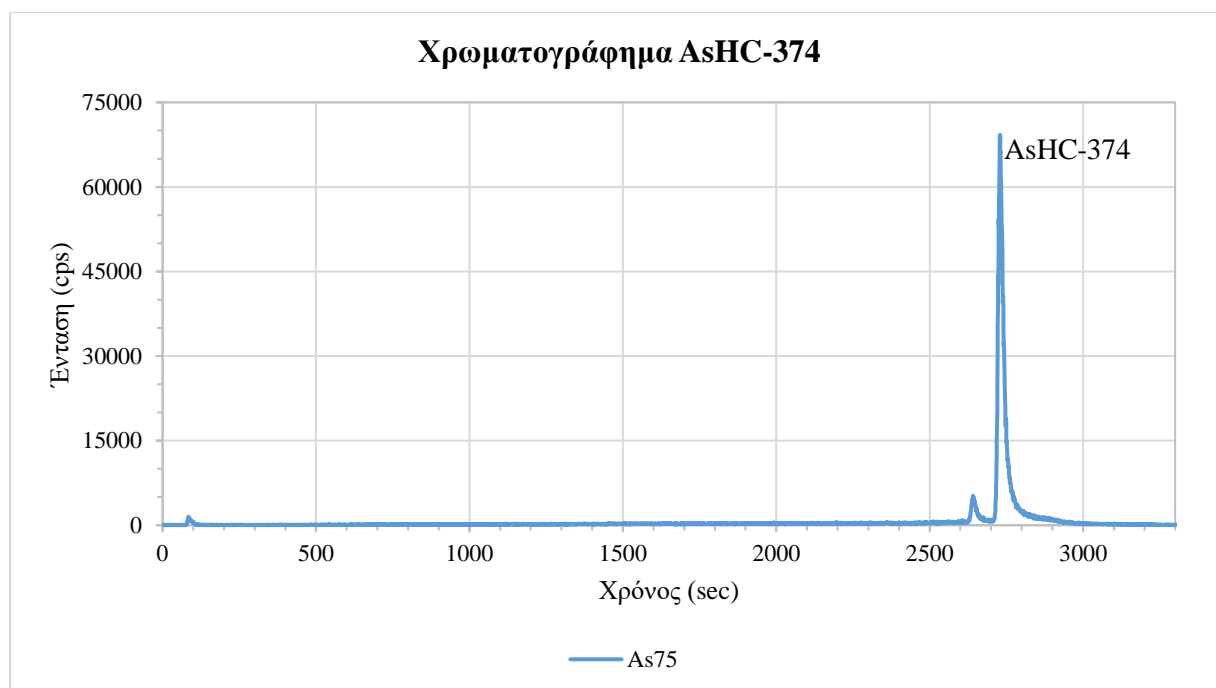


## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

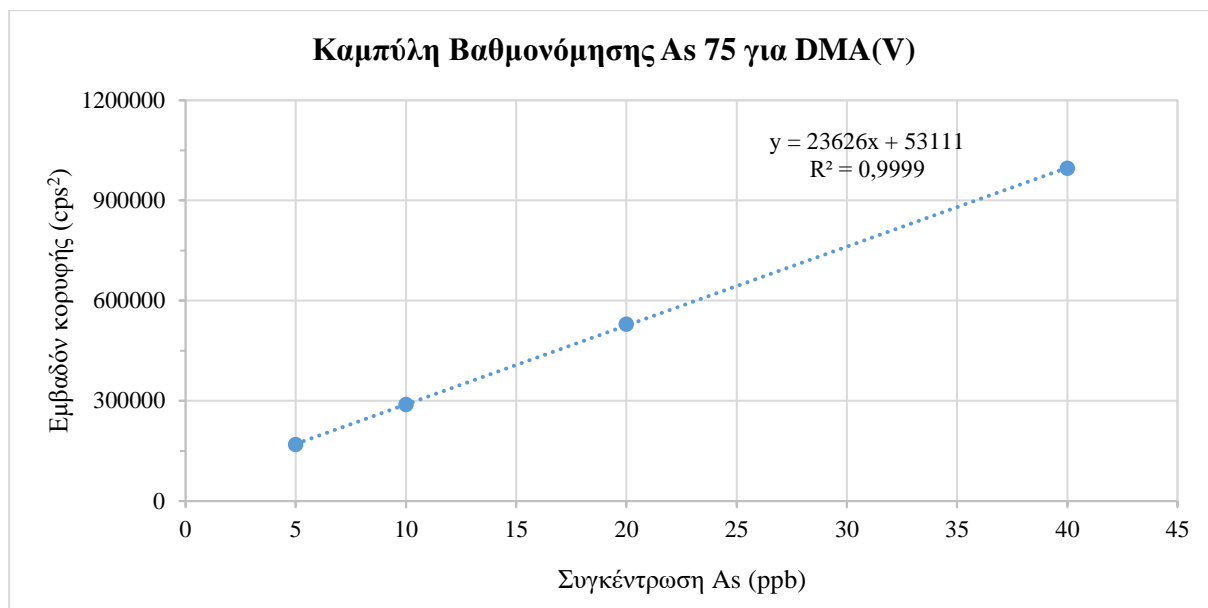
### 4.1 Ποσοτικοποίηση του εσωτερικού προτύπου AsHC<sub>374</sub>

Για την ποσοτικοποίηση του εσωτερικού προτύπου AsHC<sub>374</sub> στο αρχικό πυκνό διάλυμα πραγματοποιείται αρχικά μια επιβεβαίωση της ύπαρξης της μάζας του αρεσνολιπιδίου (375.2603 m/z) με χρήση φασματομετρίας μάζας με αναλυτή Orbitrap. Πραγματοποιείται απευθείας έγχυση του δείγματος στο φασματόμετρο μάζας, καταγραφή Full MS και παρακολουθείται η ένταση της κορυφής  $375.2603 \pm 0.0015$  m/z, οπότε επιβεβαιώνεται ότι η συγκεκριμένη ένωση βρίσκεται σε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στο διάλυμα σε σχέση με τυχόν υπολείμματα από τη διαδικασία σύνθεσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται αναλύσεις με flow injection στο ICP-MS. Αρχικά κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης, με ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων αρσενικού (<sup>75</sup>As) και διαλυμάτων DMA(V). Για να είναι ακριβέστερος ο υπολογισμός, χρησιμοποιείται καμπύλη βαθμονόμησης του AsHC<sub>374</sub> από τα διαλύματα DMA, των οποίων η συγκέντρωση υπολογίζεται με ακρίβεια βάσει καμπύλης βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων αρσενικού (<sup>75</sup>As). Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από το ICP-MS, δηλαδή το χρωματογράφημα του εσωτερικού προτύπου (Εικόνα 23) και οι αντίστοιχοι υπολογισμοί από τις καμπύλες βαθμονόμησης (Εικόνα 24, Εικόνα 25) αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα HPLC/ICP-MS του εσωτερικού προτύπου AsHC<sub>374</sub>.



**Εικόνα 24:** Καμπύλη βαθμονόμησης από πρότυπα αρσενικού (<sup>75</sup>As) σε συγκεντρώσεις 5ppb, 10ppb, 20ppb και 40ppb σε διαλύτη μεθανόλη.

Η εξίσωση της παραπάνω καμπύλης, βάσει της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων είναι

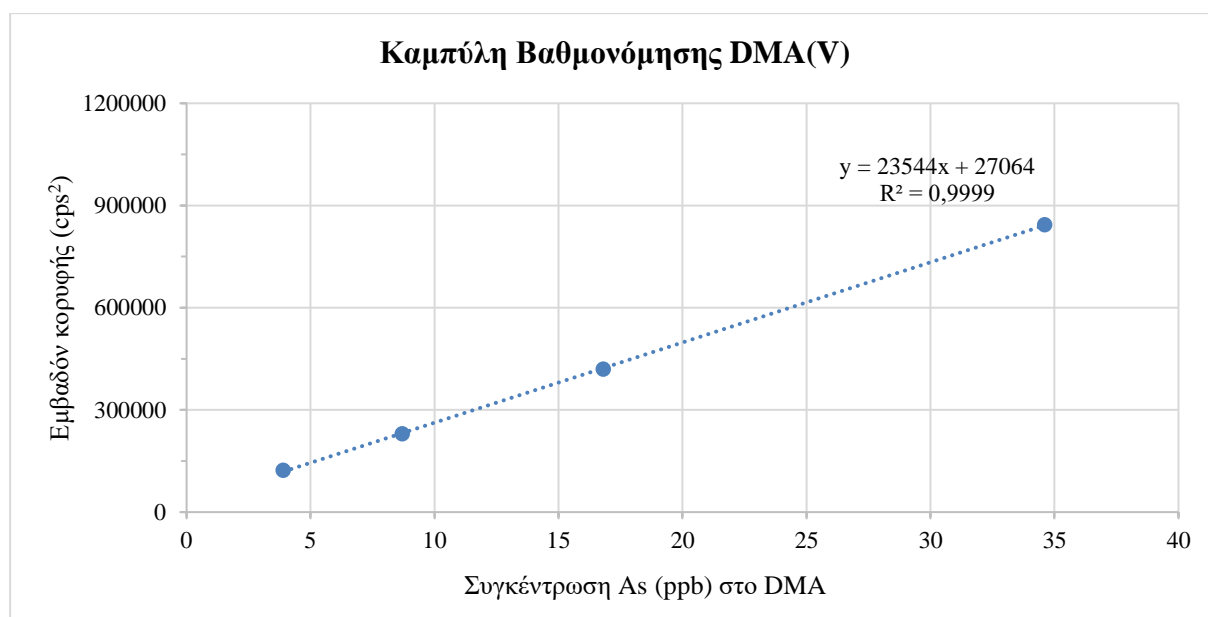
$$y = 23623 \times x + 53111$$

Από την παραπάνω καμπύλη βαθμονόμησης (**Εικόνα 24**) προκύπτει ότι η πραγματική συγκέντρωση των προτύπων DMA, ως προς το αρσενικό που περιέχουν, διαφέρει από τη θεωρητικά υπολογισμένη, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Ο υπολογισμός των πραγματικών συγκεντρώσεων πραγματοποιείται βάσει των τιμών της κλίσης και της τεταγμένης της καμπύλης βαθμονόμησης του αρσενικού (<sup>75</sup>As), και της εκάστοτε τιμής του εμβαδού κορυφής του διαλύματος DMA(V) (**Πίνακας 7**).

**Πίνακας 7:** Θεωρητικές και πραγματικές τιμές των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων DMA(V) εκφρασμένες ως συγκέντρωση αρσενικού (<sup>75</sup>As).

Θεωρητική συγκέντρωση <sup>75</sup> As στα πρότυπα διαλύματα DMA(V)	Πραγματική συγκέντρωση <sup>75</sup> As στα πρότυπα διαλύματα DMA(V)
5 ppb	3.9 ppb
10 ppb	8.7 ppb
20 ppb	16.8 ppb
40 ppb	34.6 ppb

Βάσει των πραγματικών συγκεντρώσεων κατασκευάζεται νέα καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω της οποίας πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση του προτύπου. Η καμπύλη βαθμονόμησης από τα διαλύματα DMA(V) φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 25**).



**Εικόνα 25:** Καμπύλη βαθμονόμησης από πρότυπα DMA ως προς τη συγκέντρωση του αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) σε διαλύτη μεθανόλη.

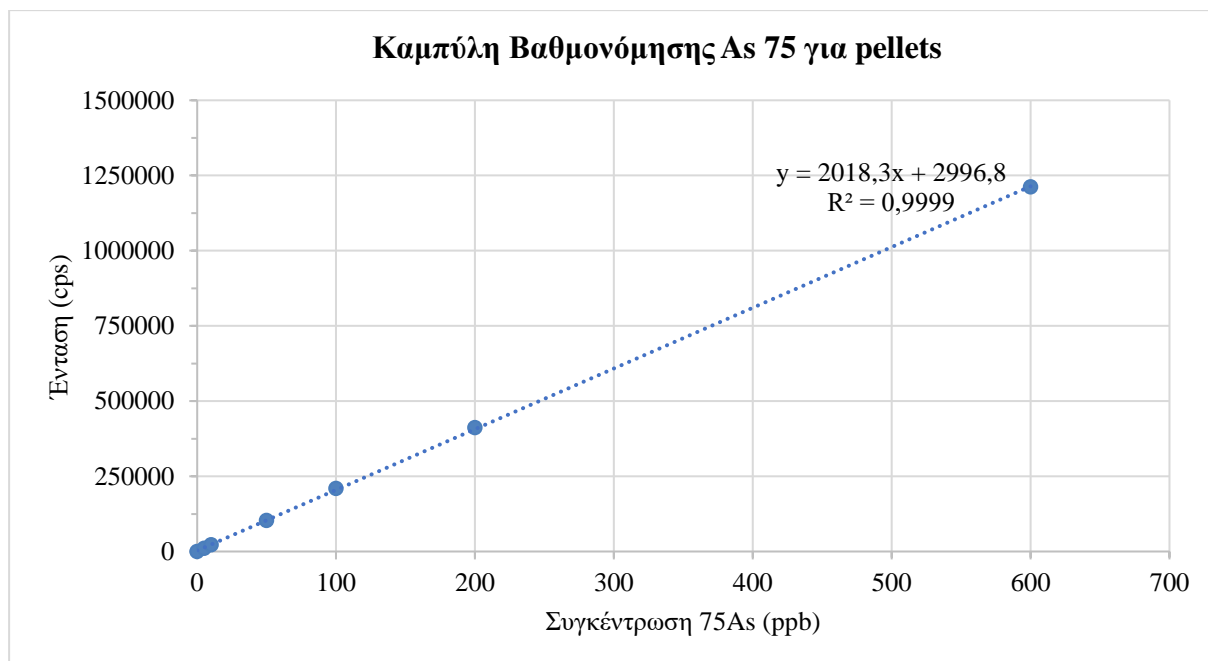
Η εξίσωση της παραπάνω καμπύλης, βάσει της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων είναι

$$y = 23544 \times x + 27064$$

Βάσει της τιμής του εμβαδού της κορυφής που αντιστοιχεί στο  $\text{AsHC}_{374}$ , και των τιμών της κλίσης και της τεταγμένης της καμπύλης βαθμονόμησης του  $\text{DMA(V)}$ , προκύπτει ότι η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος  $\text{AsHC}_{374}$  είναι 70.03 ppb. Επίσης, κατά την προσθήκη αυτού στα δείγματα Orbitrap πραγματοποιείται αραιώση όγκου 10 $\mu\text{L}$  σε τελικό όγκο 90 $\mu\text{L}$  κι επομένως η συγκέντρωση του  $\text{AsHC}_{374}$  στα δείγματα είναι 7.78ppb.

#### 4.2 Αποτελέσματα για μορφές αρσενικού στο στερεό υπόλειμμα (pellet)

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων του αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) στα pellets, δηλαδή του αρσενικού στα είδη που δεν έχουν εκχυλιστεί, είναι απαραίτητη η κατασκευή αντίστοιχης καμπύλης βαθμονόμησης πρότυπων μονοστοιχειακών διαλυμάτων αρσενικού. Τα είδη αρσενικού που παραμένουν στο pellet αναμένεται να είναι κυρίως τα υδατοδιαλυτά. Η καμπύλη βαθμονόμησης φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 26**).



**Εικόνα 26:** Καμπύλη βαθμονόμησης από πρότυπα αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) σε συγκεντρώσεις 5ppb, 10ppb, 20ppb, 40ppb, 100ppb, 200ppb και 600ppb σε διαλύτη  $\text{HNO}_3$  10% v/v.

Η εξίσωση της παραπάνω καμπύλης, βάσει της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων είναι

$$y = 2018.3 \times x + 2996.8$$

Βάσει των τιμών των εντάσεων που προκύπτουν από το ICP-MS για τα διαλύματα χωνευμένου pellet και της παραπάνω εξίσωσης γίνεται υπολογισμός των συγκεντρώσεων του αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) στα pellets. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και για το υλικό αναφοράς BCR-627, προκειμένου να πιστοποιηθεί η ικανοποιητική χώνευση των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα ψάρια που μελετήθηκαν αναγράφονται σε παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 9**), με τα αποτελέσματα για το BCR-627 να αναγράφονται μεμονωμένα (**Πίνακας 8**). Η συγκέντρωση του αρσενικού για τις κύριες υδατοδιαλυτές μορφές του υλικού αναφοράς BCR-627 (αρσενοβιτάνιο και  $\text{DMA(V)}$ ) έχει πιστοποιηθεί ότι είναι 4.05 ppm. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η μέση συγκέντρωση αρσενικού στα είδη που παραμένουν στο pellet για το υλικό αναφοράς BCR-627 υπολογίζεται στα  $3.7 \pm 0.1$  ppm. Συνεπώς, μέρος των υδατοδιαλυτών ειδών εκχυλίζεται στο κλάσμα πυριδίνης και δεν παραμένει στο pellet.

**Πίνακας 8:** Συγκεντρώσεις As στις υδατοδιαλυτές μορφές που παραμένουν στο pellet (μέση συγκέντρωση) και ποσοστό αυτών σε σχέση με την ολική συγκέντρωση As στο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς BCR-627.

Δείγμα	Κωδικός Δείγματος	Συγκέντρωση As (ppm) - pellet	Μέση συγκέντρωση As $\pm$ STD (ppm)	Συγκέντρωση ολικού As $\pm$ STD(ppm)	% As στο pellet ως προς το ολικό $\pm$ STD
BCR-627	3	3.6	$3.7 \pm 0.1$	$4.8 \pm 0.3$	$76.4 \pm 2.4$
	4	3.6			
	5	3.8			

**Πίνακας 9:** Συγκέντρωση ολικού αρσενικού σε κάθε δείγμα, συγκέντρωση αρσενικού στο pellet, μέση συγκέντρωση των συγκεντρώσεων αρσενικού στα pellets και ποσοστό αυτών σε σχέση με την ολική συγκέντρωση As στα δείγματα (% Ανάκτηση).

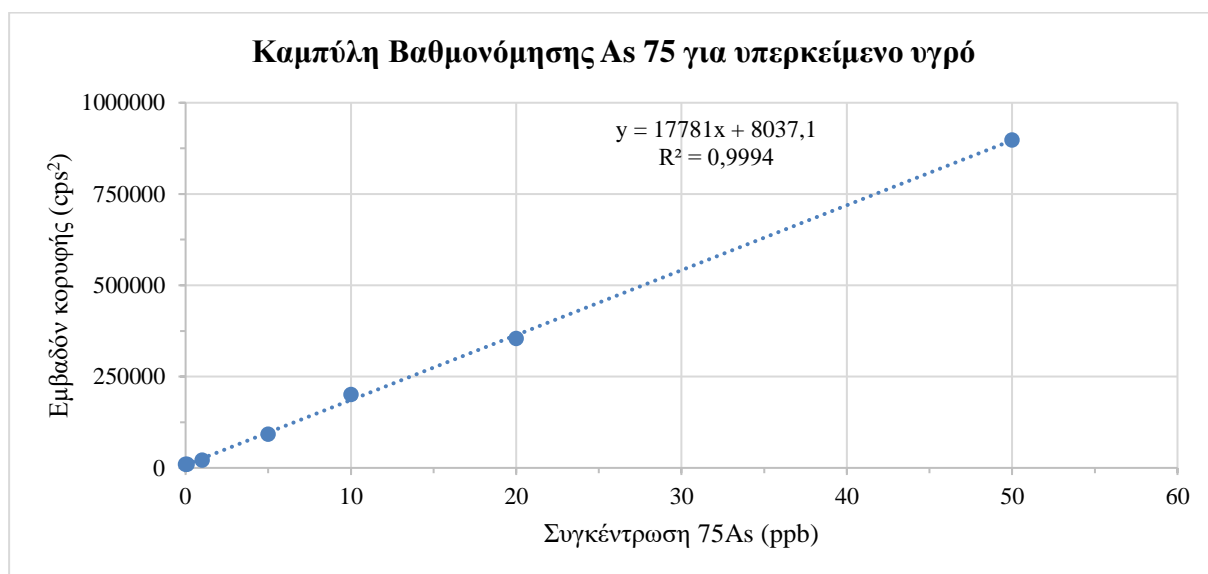
Είδος Ψαριού	Φύλο	Ιστός	Κωδικός Ομάδας	Συγκέντρωση ολικού As (ppm)	Συγκέντρωση As pellet (ppm)	Μέση συγκέντρωση As pellet ± STD (ppm)	% As στο pellet ως προς το ολικό ± STD
Κουτσομούρα	Θηλυκό	Σάρκα	F-2	70.1	57.5	56.4 ± 1.4	77.9 ± 7.2
			F-3	81.6	56.8		
			F-4	66.8	54.8		
	Αρσενικό	Σάρκα	M-1	109.5	79.5	75.8 ± 3.5	79.1 ± 6.0
			M-2	93.5	75.1		
			M-4	86.1	72.7		
Λυθρίνι	Θηλυκό	Σάρκα	F-2	20.5	12.2	12.8 ± 2.1	57.9 ± 6.2
			F-3	24.0	15.2		
			F-5	21.6	11.0		
	Αρσενικό	Σάρκα	M-3	50.6	21.6	35.1 ± 11.7	55.8 ± 12.1
			M-4	73.6	42.9		
			M-5	61.3	40.8		
	Ερμαφρόδιτο	Σάρκα	R-1	48.5	29.6	22.8 ± 7.3	59.0 ± 6.5
			R-2	45.7	23.6		
			R-3	23.5	15.0		

Γαύρος	Απροσδιόριστο	Σάρκα	2	35.1	21.4	23.7 ± 1.9	68.5 ± 6.5
			4	34.0	24.9		
			5	34.7	24.8		
Μπακαλιάρος	Θηλυκό	Σάρκα	Mu-2	49.0	25.6	27.1 ± 2.8	59.8 ± 13.9
			Mu-3	49.4	25.4		
			Mu-4	40.0	30.4		
		Στομαχικό Περιεχόμενο	St-2	22.3	15.4	14.0 ± 2.4	66.3 ± 2.6
			St-3	24.3	15.4		
			St-4	16.8	11.1		
		Γονάδες	Go-1	13.0	9.5	8.2 ± 1.4	71.3 ± 4.4
			Go-2	10.1	6.7		
			Go-3	11.3	8.4		
		Βράγχια	Gi-2	15.9	10.2	9.5 ± 1.7	62.3 ± 12.0
			Gi-3	15.3	7.6		
			Gi-4	14.6	10.8		



#### 4.4 Αποτελέσματα αναλύσεων για μορφές αρσενικού του υπερκείμενου υγρού με χρήση ICP-MS

Για τη διαπίστωση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων της ποσοτικοποίησης που πραγματοποιείται με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου στα δείγματα Orbitrap, κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός του ολικού αρσενικού του υπερκείμενου υγρού σε κάθε δείγμα. Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατός ο προσδιορισμός ανάκτησης από τη χρωματογραφία. Η διαδικασία πραγματοποιείται με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης πρότυπων μονοστοιχειακών διαλυμάτων  $^{75}\text{As}$  σε συγκεντρώσεις 0.1 – 50 ppb (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Καμπύλη βαθμονόμησης από πρότυπα αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) σε συγκεντρώσεις 0.1ppb, 1ppb, 5ppb, 10ppb, 20ppb και 50ppb σε διαλύτη μεθανόλη.

Η εξίσωση της παραπάνω καμπύλης, βάσει της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων είναι

$$y = 17781 \times x + 8037.1$$

Βάσει των τιμών των εμβαδών των κορυφών που προκύπτουν από το ICP-MS για τα διαλύματα υπερκείμενου υγρού και της παραπάνω εξίσωσης γίνεται υπολογισμός των συγκεντρώσεων του αρσενικού ( $^{75}\text{As}$ ) στο υπερκείμενο υγρό. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και για το πιστοποιημένο για υδατοδιαλυτές μορφές αρσενικού (αρσενοβιτάνιο, DMA(V)) υλικό αναφοράς BCR-627 (σάρκα τόνου). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10). Τα δείγματα της κουτσομούρας δεν ήταν δυνατό να εισαχθούν στο όργανο, καθώς σχεδόν αμέσως μετά την προετοιμασία τους σχηματίστηκε λευκό ίζημα που καταλάμβανε τον μεγαλύτερο όγκο του δείγματος.

**Πίνακας 10:** Αποτελέσματα για την ολική συγκέντρωση αρσενικού στα δείγματα υπερκείμενου για το ICP-MS και προσδιορισμός της ποσοστιαίας χρωματογραφικής ανάκτησης (λόγος των συγκεντρώσεων από το ICP-MS προς τις συγκεντρώσεις από τα χρωματογραφήματα). Δεν προκύπτει τιμή για το στομαχικό περιεχόμενο του μπακαλιάρου λόγω προβλήματος χρωματογραφίας

Είδος Ψαριού	Φύλο	Ιστός	Κωδικός Ομάδας	Συγκέντρωση As υπερκείμενου (ppb)	Μέση συγκέντρωση As υπερκείμενου ± STD (ppb)	% Χρωματογραφική ανάκτηση As ± STD (ppb)
Λυθρίνι	Θηλυκό	Σάρκα	F-2	10.7	12.2 ± 1.3	94.2 ± 6.6
			F-3	13.1		
			F-5	12.7		
	Αρσενικό	Σάρκα	M-3	26.7	25.8 ± 4.3	95.9 ± 6.8
			M-4	21.1		
			M-5	29.5		
	Ερμαφρόδιτο	Σάρκα	R-1	21.8	22.2 ± 2.2	82.3 ± 4.3
			R-2	20.3		
			R-3	24.7		
Γαύρος	Απροσδιόριστο	Σάρκα	2	69.9	78.4 ± 16.8	90.5 ± 5.5
			4	67.6		
			5	97.7		
Μπακαλιάρος	Θηλυκό	Σάρκα	Mu-2	27.2	25.4 ± 4.0	92.3 ± 4.0
			Mu-3	28.3		
			Mu-4	20.8		
		Στομαχικό Περιεχόμενο	St-2	64.4	61.8 ± 2.9	-
			St-3	62.3		
			St-4	58.7		
		Γονάδες	Go-1	21.8	34.2 ± 14.6	92.0 ± 9.2
			Go-2	30.5		
			Go-3	50.0		
		Βράγχια	Gi-2	31.0	25.7 ± 4.8	93.7 ± 8.7
			Gi-3	21.9		
			Gi-4	24.3		
BCR-627			3	76.0	71.9 ± 3.7	92.9 ± 5.4
			4	68.8		
			5	70.8		

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν καλές χρωματογραφικές ανακτήσεις, δηλαδή ποσοστό των αρσενολιπιδίων που εκλούνται ως προς την ολική τους συγκέντρωση βάσει των αποτελεσμάτων του ICP-MS για τις λιπιδικές μορφές του αρσενικού (πάνω από 80%), επομένως θεωρείται ότι αρσενολιπίδια δεν κατακρατούνται σε αξιόλογο βαθμό στη στήλη και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη χρωματογραφία είναι βάσιμα. Τέλος, η παρουσία και ταυτόχρονη έκλυση ενώσεων πέραν των αρσενολιπιδίων με αυτά κατά τη χρωματογραφία για τα δείγματα στομαχικού περιεχομένου του μπακαλιάρου καθιστά αδύνατη τη λήψη δεδομένων. Δηλαδή, είναι πρακτικά αδύνατη η ανίχνευση των αρσενολιπιδίων στα δείγματα αυτά, λόγω θορύβου υποβάθρου που προκαλείται από άλλες ενώσεις που εκλούνται σε όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας, αλλά και ταυτόχρονα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Πιθανόν για αυτά τα δείγματα να είναι απαραίτητη μια διαδικασία καθαρισμού τους μετά την εκχύλιση.

#### **4.5 Αποτελέσματα για το υλικό αναφοράς BCR-627**

Για τη διαπίστωση της επαναληψιμότητας των πειραμάτων και της ευαισθησίας του οργάνου σε κάθε εργαστηριακή μέρα αναλύσεων, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε εκχυλίσματα του πιστοποιημένου για υδατοδιαλυτές μορφές αρσενικού (αρσενοβιτάνιο, DMA) υλικού αναφοράς BCR-627 (σάρκα τόνου). Τα αρσενολιπίδια που ανιχνεύθηκαν, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους βάσει του εσωτερικού προτύπου AsHC<sub>374</sub> αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11). Η παρουσία της πλειονότητας των παρακάτω ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων για το συγκεκριμένο υλικό έχει διαπιστωθεί από διάφορες μελέτες, και ο διαχωρισμός τους με χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου που αναπτύχθηκε είναι ικανοποιητικός. Επομένως, προτείνεται ότι η χρωματογραφική μέθοδος σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας Orbitrap είναι κατάλληλη για την ανάλυση των δειγμάτων για αρσενολιπίδια. Από μετρήσεις σε έξι τυφλά δείγματα προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου στα 0.08 ppb As βάσει του τύπου

$$LOD = 3 \times STD$$

όπου LOD είναι το όριο ανίχνευσης και STD το τυπικό σφάλμα για το τυφλό δείγμα στο χρόνο έκλυσης του εσωτερικού προτύπου.<sup>82</sup>

**Πίνακας 11:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα 2, 3 και 4 του υλικού BCR-627 που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Στην δεξιά στήλη αναγράφεται ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών δειγμάτων για κάθε αρσενολιπίδιο.

Κωδική Ονομασία AsLp	BCR-627 / 3 (ppb As)	BCR-627 / 4 (ppb As)	BCR-627 / 5 (ppb As)	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
AsHC 332	31.0	25.8	27.6	28.2 ± 2.7
AsHC 358	0.4	0.3	0.2	0.3 ± 0.1
AsHC 360	1.6	1.4	1.7	1.5 ± 0.1
AsHC 404	2.8	2.1	2.6	2.5 ± 0.4
<b>AsFAs</b>				
AsFA 334	3.2	2.6	2.7	2.8 ± 0.4
AsFA 348	0.6	0.5	0.6	0.6 ± 0.1
AsFA 362	8.3	6.5	7.0	7.2 ± 0.9
AsFA 376	0.8	0.6	0.7	0.7 ± 0.1
AsFA 382	1.2	1.0	1.1	1.1 ± 0.1
AsFA 390	7.1	5.4	6.2	6.2 ± 0.8
AsFA 404	0.4	0.3	0.2	0.3 ± 0.1
AsFA 408	2.7	2.0	2.5	2.4 ± 0.3
AsFA 418	4.1	3.0	3.3	3.5 ± 0.6
AsFA 422	1.7	1.4	1.5	1.5 ± 0.2
AsFA 436	0.9	0.7	0.8	0.8 ± 0.1
AsFA 446	3.5	2.7	2.6	2.9 ± 0.5
AsFA 448	0.2	0.1	0.1	0.1 ± 0.1
AsFA 474	3.2	3.2	3.1	3.2 ± 0.1
AsFA 528	1.1	0.8	0.9	9.0 ± 0.1
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>74.9</b>	<b>60.4</b>	<b>65.4</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>66.9 ± 7.3</b>			

#### 4.6 Αποτελέσματα για την κουτσομούρα – επίδραση του φύλου των ψαριών στην παρουσία αρσενολιπιδίων

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για την κουτσομούρα προκύπτει ότι στην αριθμητική πλειοψηφία τους τα αρσενολιπίδια που απαντώνται σε αυτό το είδος και στα δύο φύλα ανήκουν στην κατηγορία των AsFAs. Μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται σε κάθε περίπτωση για το AsFA<sub>390</sub>, ακολουθούμενο από το AsFA<sub>418</sub> και το AsFA<sub>362</sub>. Η ολική

συγκέντρωση αρσενολιπιδίων, εκφρασμένη ως προς το αρσενικό που περιέχεται σε αυτά, είναι  $28.9 \pm 7.8$  ppb για τα θηλυκά και  $139.0 \pm 43.3$  ppb. Τα αποτελέσματα αναγράφονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες, μεμονωμένα για τη σάρκα των θηλυκών (Πίνακας 12) και των αρσενικών (Πίνακας 13) ατόμων.

**Πίνακας 12:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων θηλυκών κουτσομούρων που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη. Με μωβ χρώμα αναγράφονται τα δεδομένα του μοναδικού αρσενολιπιδίου που υπήρχε στα θηλυκά, αλλά όχι στα αρσενικά δείγματα.

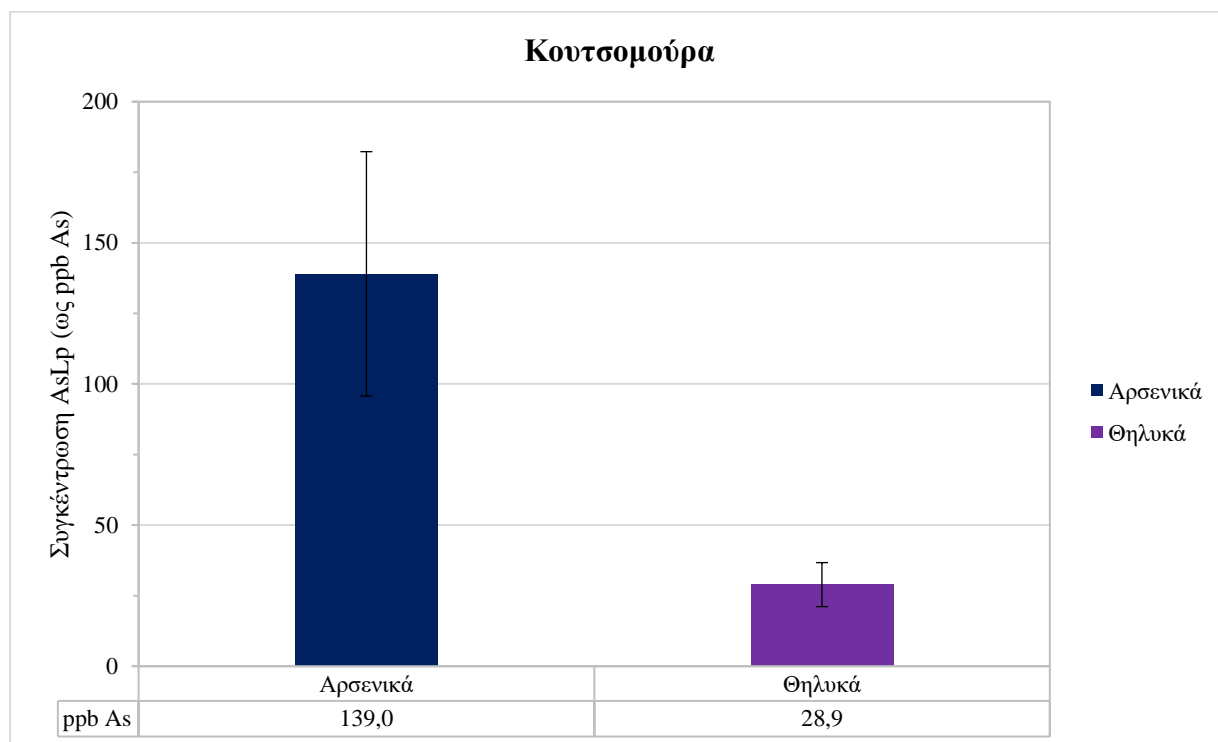
Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα F-2 (ppb As)	Σάρκα F-3 (ppb As)	Σάρκα F-4 (ppb As)	Μέσος όρος $\pm$ STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
AsHC 440	0.5	0.4	0.3	$0.4 \pm 0.1$
<b>AsFAs</b>				
AsFA 334	0.2	0.3	0.1	$0.2 \pm 0.1$
AsFA 348	0.3	0.7	0.3	$0.5 \pm 0.2$
AsFA 362	4.6	4.1	2.4	$3.7 \pm 1.1$
AsFA 376	1.2	1.3	0.9	$1.1 \pm 0.2$
AsFA 388	0.8	0.9	2.1	$1.3 \pm 0.7$
AsFA 390	15.4	14.6	8.5	$12.8 \pm 3.7$
AsFA 404	1.0	1.9	1.1	$1.3 \pm 0.5$
AsFA 408	0.3	0.7	0.2	$0.4 \pm 0.3$
AsFA 418	3.7	5.2	3.0	$4.0 \pm 1.2$
AsFA 436	1.0	3.2	0.6	$1.6 \pm 1.4$
AsFA 446	n.d.	1.1	0.5	$0.6 \pm 0.5$
AsFA 448	1.0	1.4	0.4	$0.9 \pm 0.5$
<b>AsFA 486</b>	<b>0.4</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	$0.2 \pm 0.2$
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>30.4</b>	<b>35.7</b>	<b>20.5</b>	
<b>Μέσος Όρος <math>\pm</math> STD (ppb As)</b>	<b><math>28.9 \pm 7.8</math></b>			

**Πίνακας 13:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων αρσενικών κουτσομούρων που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη. Με μπλε χρώμα αναγράφονται τα δεδομένα του μοναδικού αρσενολιπιδίου που υπήρχε στα αρσενικά, αλλά όχι στα θηλυκά δείγματα.

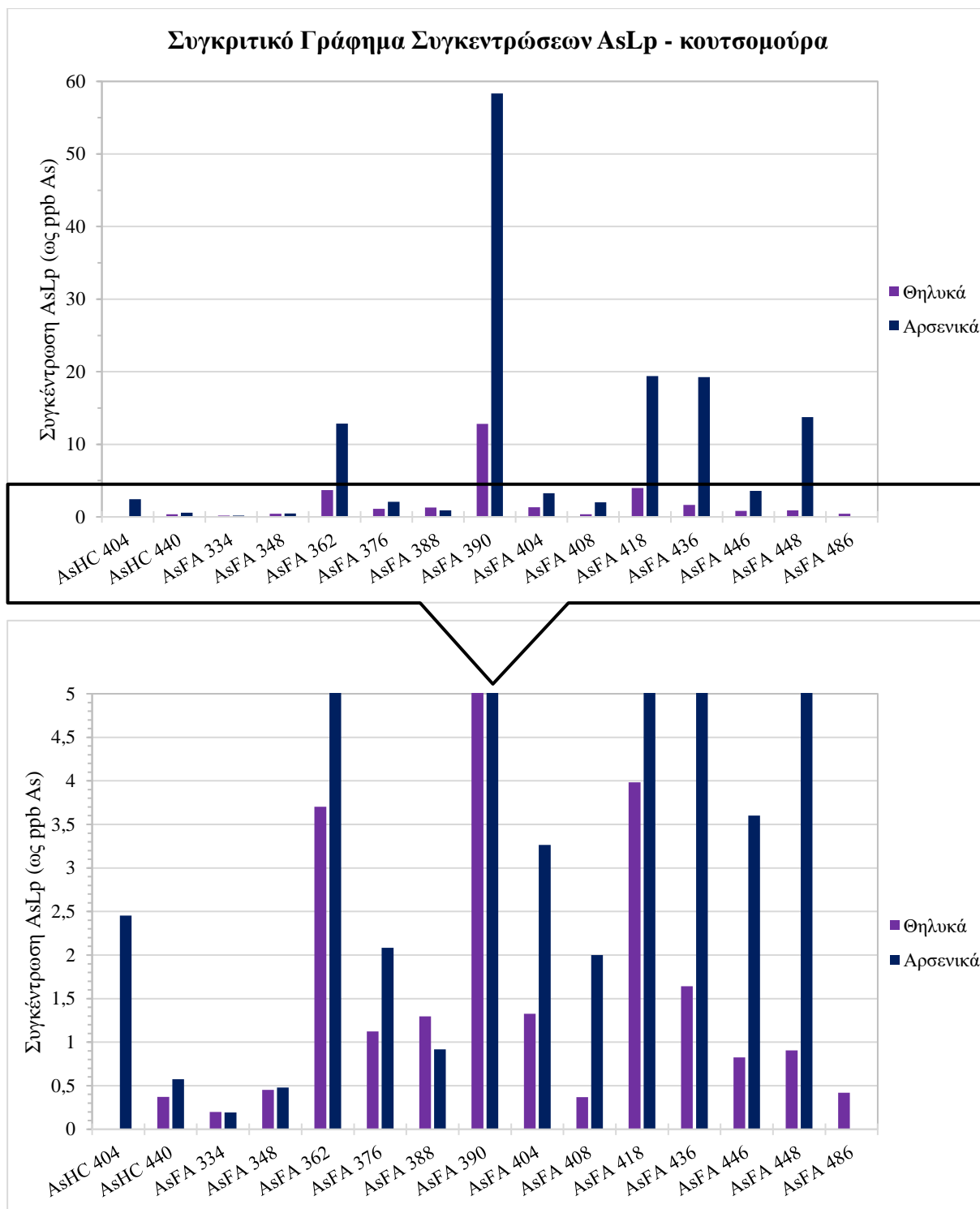
Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα M-1 (ppb As)	Σάρκα M-2 (ppb As)	Σάρκα M-4 (ppb As)	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
<b>AsHC 404</b>	<b>1.0</b>	<b>3.1</b>	<b>3.2</b>	2.5 ± 1.3
AsHC 440	0.3	0.8	n.d.	0.4 ± 0.4
<b>AsFAs</b>				
AsFA 334	0.1	0.2	0.2	0.2 ± 0.1
AsFA 348	0.4	0.5	0.5	0.5 ± 0.1
AsFA 362	8.6	18.1	11.9	12.9 ± 4.9
AsFA 376	1.4	2.4	2.5	2.1 ± 0.6
AsFA 388	0.6	1.2	0.9	0.9 ± 0.3
AsFA 390	39.3	76.7	59.0	58.3 ± 18.7
AsFA 404	2.5	4.0	3.3	3.3 ± 0.7
AsFA 408	1.2	1.9	2.9	2.0 ± 0.9
AsFA 418	11.7	19.5	27.1	19.4 ± 7.7
AsFA 436	10.6	22.0	25.2	19.2 ± 7.7
AsFA 446	2.0	3.8	5.1	3.6 ± 1.6
AsFA 448	9.9	16.2	15.0	13.7 ± 3.3
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>89.6</b>	<b>170.4</b>	<b>156.9</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>139.0 ± 43.3</b>			



Σε γενικές γραμμές δεν φαίνεται να υπάρχει ουσιαστική ποιοτική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων, με εξαίρεση τα αρσενολιπίδια AsFA<sub>486</sub> και AsHC<sub>404</sub>. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική διαφορά όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των αρσενολιπιδίων, τόσο συνολικά όσο και μεμονωμένα σε ορισμένες ενώσεις, όπως φαίνεται και από τα δεδομένα στους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 12, Πίνακας 13). Με οπτική απεικόνιση αυτών των διαφορών, προκύπτουν τα παρακάτω γραφήματα για την ολική συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων, αλλά και μεμονωμένα για τη συγκέντρωση κάθε ανιχνευμένου αρσενολιπιδίου σε αρσενικά και θηλυκά άτομα κουτσομούρας (Εικόνα 28, Εικόνα 29).



**Εικόνα 28:** Διαγραμματική απεικόνιση της ολικής συγκέντρωσης αρσενολιπιδίων στις κουτσομούρες εκφρασμένη ως ppb As.



**Εικόνα 29:** Συγκριτικό γράφημα των συγκεντρώσεων του αρσενικού των ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων στις αρσενικές και θηλυκές κουτσομούρες. Πάνω φαίνεται το πλήρες γράφημα, ενώ κάτω φαίνεται μεγεθυμένο ως προς τον άξονα y μέρος του πάνω γραφήματος.

Δεδομένων των παρόμοιων φυσικών χαρακτηριστικών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών (μέγεθος, μήκος, βάρος), θα ήταν αναμενόμενο, όπως οι συγκεντρώσεις ολικού αρσενικού μεταξύ τους δεν έχουν σημαντική διαφοροποίηση, αντίστοιχα να μην υπάρχει και διαφοροποίηση ως προς τη συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων.<sup>19,30,31,40</sup> Ωστόσο, η

συγκεκριμένη διαπίστωση δεν ισχύει στην παρούσα περίπτωση, καθώς εντοπίζονται αρκετά σημαντικές διαφορές ως προς το περιεχόμενο σε αρσενολιπίδια στα δύο φύλα, για τις οποίες μπορούν να δοθούν κάποιες πιθανές εξηγήσεις.

Διαφορές μπορούν να εντοπιστούν μεταξύ των δύο φύλων, σε επίπεδο λιπιδικού περιεχομένου και μεταβολικών διεργασιών κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου. Στα θηλυκά ψάρια παρατηρείται η διαδικασία της βιτελλογένεσης, μέσω της οποίας παράγεται η βιτελλογενάση. Η βιτελλογενάση είναι μία πρωτεΐνη απαραίτητη για την ωρίμανση των ωαρίων στα θηλυκά ψάρια και η παραγωγή της απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας, τα οποία προέρχονται κυρίως από το μεταβολισμό των λιπιδίων. Επιπλέον, κατά την ωοτοκία παράγονται γενικότερα πρωτεΐνες, για τη δημιουργία των οποίων είναι απαραίτητη η ύπαρξη φωσφολιπιδικών δομών στα ωάρια.<sup>83</sup> Τα αρσενολιπίδια αποτελούν ενώσεις που η εξ'αρχής σύνθεσή τους μπορεί να οφείλεται στη μη διάκριση φωσφόρου και αρσενικού. Δεν θα ήταν παράλογο να μη διακρίνονται αντίστοιχα και τα αρσενολιπίδια από τα φωσφολιπίδια ή τα λιπαρά οξέα κατά την εκτέλεση μεταβολικών και βιοσυνθετικών διεργασιών στα ψάρια, οπότε αυτά να αποτελούν εν τέλει μέρος των λιπιδίων εκείνων που είτε καταλήγουν στις γονάδες των θηλυκών ψαριών, είτε αξιοποιούνται για το ενεργειακό τους περιεχόμενο. Η παρουσία τους, μάλιστα, σύμφωνα με τα παραπάνω θα ήταν αναμενόμενο να είναι μικρότερη στον ιστό των θηλυκών ψαριών, ειδικά δεδομένου ότι η κουτσιμούρα βρίσκεται στην αρχή της αναπαραγωγικής της περιόδου.<sup>83-89</sup>

Προηγούμενη μελέτη υποδεικνύει την παρουσία των ειδών AsFA<sub>362</sub>, AsFA<sub>390</sub> και AsHC<sub>404</sub> ως απαντώμενα για την κουτσομούρα αρσενολιπίδια.<sup>78</sup> Ως προς την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού AsFAs σε σχέση με AsHCs, πρόκειται για μια παρατήρηση που αφορά γενικότερα τα βενθικά ψάρια.<sup>90</sup> Αυτή η παρατήρηση πιθανόν σχετίζεται τόσο με τις μεταβολικές οδούς που έχουν αναπτύξει οι βενθικοί οργανισμοί προκειμένου να προσαρμοστούν στο περιβάλλον τους, όσο και με τις μορφές του αρσενικού που εντοπίζονται στο βένθος με το οποίο τρέφονται.<sup>91</sup> Τα παραπάνω χρήζουν διερεύνησης σε μεταβολικό επίπεδο για την ακριβή διαπίστωσή τους.

#### **4.7 Αποτελέσματα για το λυθρίνι – επίδραση του φύλου των ψαριών στην παρουσία αρσενολιπιδίων**

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για το λυθρίνι προκύπτει ότι στην αριθμητική πλειοψηφία τους τα αρσενολιπίδια που απαντώνται σε αυτό το είδος και στα τρία φύλα ανήκουν στην κατηγορία των AsFAs. Μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται σε κάθε περίπτωση για το AsFA<sub>390</sub>, ακολουθούμενο από το AsFA<sub>418</sub>. Η ολική συγκέντρωση αρσενολιπιδίων εκφρασμένη ως προς το αρσενικό που περιέχεται σε αυτά είναι  $11.5 \pm 0.7$  ppb,

24.6±2.8 ppb και 18.2±1.2 ppb για τα θηλυκά, τα αρσενικά και τα ερμαφρόδιτα, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναγράφονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες, μεμονωμένα για τη σάρκα των θηλυκών (Πίνακας 14), των αρσενικών (Πίνακας 15) και των ερμαφρόδιτων (Πίνακας 16) ατόμων.

**Πίνακας 14:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων θηλυκών λυθρινιών που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα F-2 (ppb As)	Σάρκα F-3 (ppb As)	Σάρκα F-5 (ppb As)	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
AsHC 440	2.1	1.3	1.5	1.6 ± 0.4
AsHC 442	n.d.	n.d.	0.4	0.2 ± 0.2
AsHC 444	0.6	0.5	n.d.	0.5 ± 0.3
<b>AsFAs</b>				
AsFA 348	n.d.	0.1	n.d.	0.1 ± 0.1
AsFA 362	0.7	0.8	0.6	0.7 ± 0.1
AsFA 376	0.3	0.3	0.2	0.3 ± 0.1
AsFA 390	3.8	3.7	3.8	3.8 ± 0.0
AsFA 404	0.6	0.5	0.5	0.5 ± 0.1
AsFA 408	n.d.	n.d.	0.2	0.2 ± 0.1
AsFA 418	2.3	2.4	3.2	2.7 ± 0.5
AsFA 436	n.d.	1.7	1.8	1.8 ± 1.0
AsFA 528	0.3	n.d.	n.d.	0.3 ± 0.1
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>10.7</b>	<b>11.4</b>	<b>12.2</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>11.5 ± 0.7</b>			

**Πίνακας 15:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων αρσενικών λυθρινιών που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα M-3 (ppb As)	Σάρκα M-4 (ppb As)	Σάρκα M-5 (ppb As)	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
AsHC 388	1.0	n.d.	n.d.	1.0 ± 0.6
AsHC 404	1.6	n.d.	n.d.	1.6 ± 0.9
AsHC 440	n.d.	2.3	1.4	1.8 ± 1.1
AsHC 444	n.d.	0.9	0.7	0.8 ± 0.4
<b>AsFAs</b>				
AsFA 362	1.7	n.d.	1.2	1.4 ± 0.8
AsFA 376	0.5	0.4	0.5	0.4 ± 0.1
AsFA 390	9.3	5.8	9.2	8.1 ± 2.0
AsFA 404	1.4	1.2	1.7	1.4 ± 0.3
AsFA 408	n.d.	0.3	n.d.	0.3 ± 0.2
AsFA 418	8.0	6.8	6.7	7.2 ± 0.7
AsFA 436	n.d.	2.4	n.d.	2.4 ± 1.4
AsFA 446	2.9	1.3	1.7	2.0 ± 0.8
AsFA 528	n.d.	n.d.	2.9	2.9 ± 1.7
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>26.4</b>	<b>21.3</b>	<b>26.0</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>24.6 ± 2.8</b>			

**Πίνακας 16:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων ερμαφρόδιτων λυθρινιών που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα R-1 (ppb As)	Σάρκα R-2 (ppb As)	Σάρκα R-3 (ppb As)	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
AsHC 404	n.d.	n.d.	0.3	0.3 ± 0.2
AsHC 440	1.0	1.7	n.d.	1.4 ± 0.8
AsHC 444	n.d.	0.6	n.d.	0.2 ± 0.3
<b>AsFAs</b>				
AsFA 348	0.1	0.1	0.1	0.1 ± 0.0
AsFA 362	0.4	0.4	1.1	0.6 ± 0.4
AsFA 376	0.3	0.3	0.3	0.3 ± 0.0
AsFA 388	0.1	n.d.	0.2	0.1 ± 0.1
AsFA 390	5.1	3.9	5.5	4.9 ± 0.8
AsFA 404	1.1	0.9	0.9	1.0 ± 0.1
AsFA 408	0.2	0.2	0.4	0.3 ± 0.1
AsFA 418	4.3	4.5	4.6	4.4 ± 0.1
AsFA 436	1.2	1.9	2.3	1.8 ± 0.6
AsFA 446	1.4	1.5	1.5	1.5 ± 0.0
AsFA 448	n.d.	n.d.	2.5	0.9 ± 1.4
AsFA 474	1.0	0.8	n.d.	0.6 ± 0.5
AsFA 528	1.1	0.9	n.d.	0.7 ± 0.6
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>17.4</b>	<b>17.7</b>	<b>19.7</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>18.2 ± 1.2</b>			

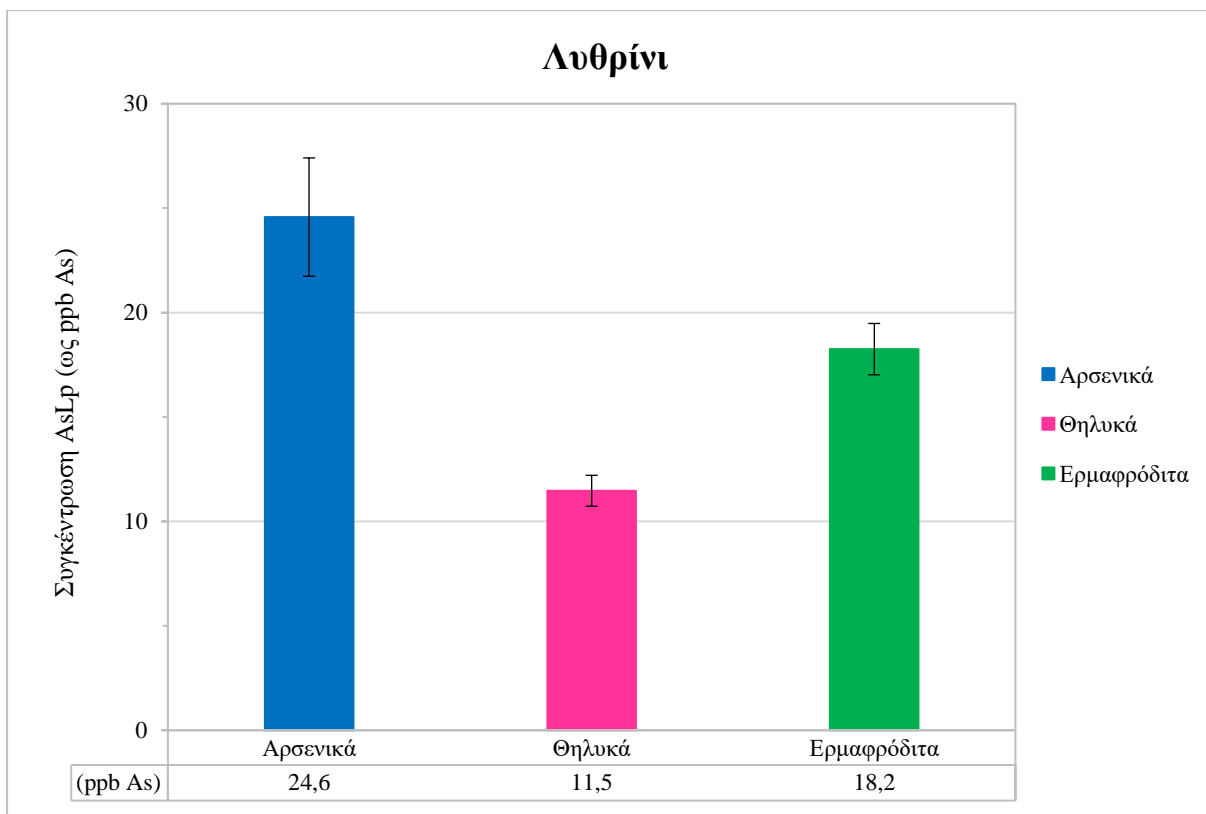
Με σύγκριση των ολικών συγκεντρώσεων για τα αρσενολιπίδια του κάθε φύλου προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα. Στον πίνακα (**Πίνακας 17**) φαίνονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των αρσενολιπιδίων για τα τρία φύλα του λυθρινιού. Με οπτική απεικόνιση αυτών των διαφορών, προκύπτουν τα παρακάτω γραφήματα για την ολική συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων (**Εικόνα 30**), αλλά και μεμονωμένα για τη συγκέντρωση κάθε ανιχνευμένου

αρσενολιπιδίου (Εικόνα 31) σε θηλυκά, αρσενικά και ερμαφρόδιτα άτομα κουτσομούρας λυθρινιού.

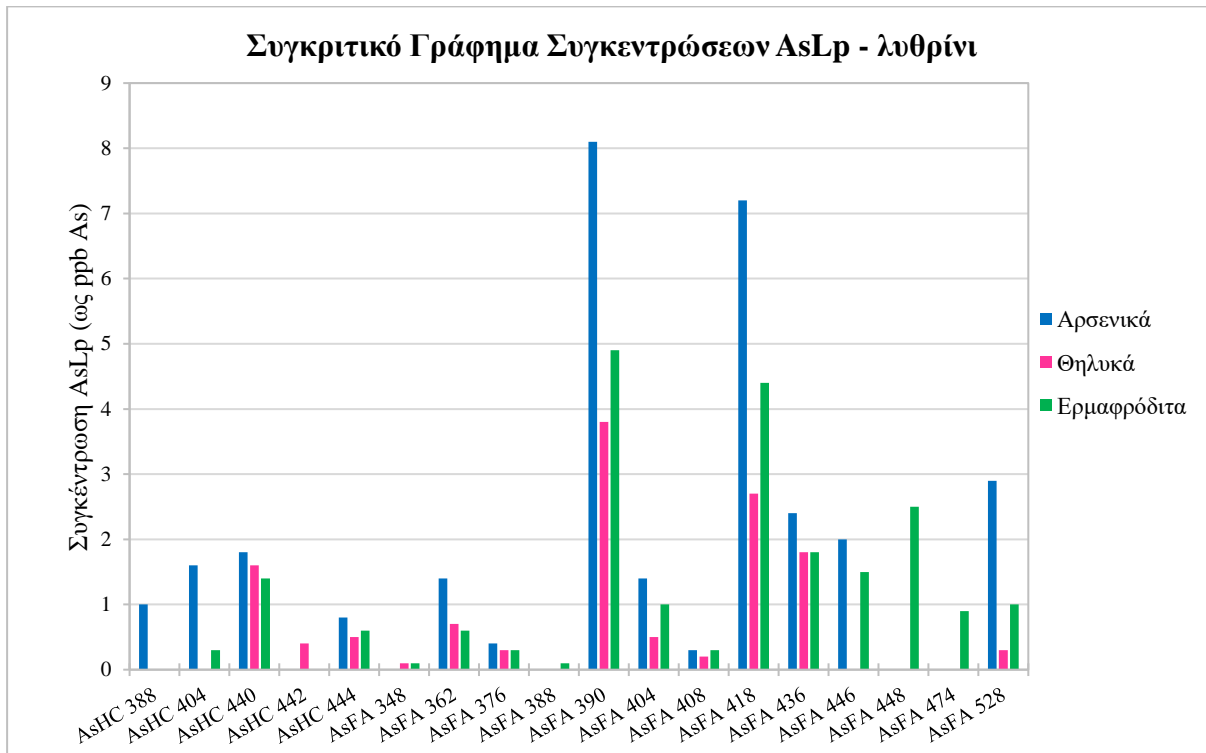
**Πίνακας 17:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα αρσενικών, θηλυκών κα ερμαφρόδιτων λυθρινιών, σε τουλάχιστον δύο εκ των τριών δειγμάτων κάθε φύλου. Με μπλε χρώμα τονίζονται οι διαφορές που εντοπίζονται στα αρσενικά, με ροζ οι διαφορές που εντοπίζονται στα θηλυκά, με πράσινο οι διαφορές που εντοπίζονται στα ερμαφρόδιτα και με μαύρο τα κοινά μεταξύ των φύλων αρσενολιπίδια. Στην τελευταία γραμμή αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε φύλο. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Αρσενικά (ppb As)	Θηλυκά (ppb As)	Ερμαφρόδιτα (ppb As)
AsHC 388	1.0	n.d.	n.d.
AsHC 404	1.6	n.d.	0.3
AsHC 440	1.8	1.6	1.4
AsHC 442	n.d.	0.4	n.d.
AsHC 444	0.8	0.5	0.6
AsFA 348	n.d.	0.1	0.1
AsFA 362	1.4	0.7	0.6
AsFA 376	0.4	0.3	0.3
AsFA 388	n.d.	n.d.	0.1
AsFA 390	8.1	3.8	4.9
AsFA 404	1.4	0.5	1.0
AsFA 408	0.3	0.2	0.3
AsFA 418	7.2	2.7	4.4
AsFA 436	2.4	1.8	1.8
AsFA 446	2.0	n.d.	1.5
AsFA 448	n.d.	n.d.	2.5
AsFA 474	n.d.	n.d.	0.9
AsFA 528	2.9	0.3	1.0
<b>Μέση συγκέντρωση ± STD (ppb As)</b>	<b>24.6 ± 2.8</b>	<b>11.5 ± 0.7</b>	<b>18.2 ± 1.2</b>





**Εικόνα 30:** Διαγραμματική απεικόνιση της ολικής συγκέντρωσης αρσενολιπιδίων στα λυθρίνια εκφρασμένη ως ppb As.



**Εικόνα 31:** Συγκριτικό γράφημα των συγκεντρώσεων του αρσενικού των ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων στα τρία φύλα (αρσενικό, θηλυκό, ερμαφρόδιτο) του λυθρινιού.

Από τα παραπάνω παρατηρείται ότι η ολική συγκέντρωση του αρσενικού που αφορά σε αρσενολιπίδια είναι σημαντικά υψηλότερη για τα αρσενικά απ' ότι για τα θηλυκά λυθρίνια. Τα ερμαφρόδιτα λυθρίνια εμφανίζουν ενδιάμεση συγκέντρωση με τάση προς αυτήν των αρσενικών λυθρινιών ως προς το ολικό αρσενικό που υπάρχει σε λιπιδικές δομές. Με εξέταση των αρσενολιπιδίων μεμονωμένα παρατηρείται ότι τα θηλυκά περιέχουν λιγότερα σε αριθμό αρσενολιπίδια σε σχέση με τα άλλα δύο φύλα, ενώ τα ερμαφρόδιτα περιέχουν περισσότερα. Επιπλέον, ως προς τις συγκεντρώσεις των αρσενολιπιδίων που είναι κοινά για τα τρία φύλα, παρατηρείται ότι ως επί το πλείστον στα αρσενικά είναι μεγαλύτερες, ενώ στα ερμαφρόδιτα πιο χαμηλές και πιο κοντά σε αυτές των θηλυκών.

Μπορούν να δοθούν κάποιες πιθανές εξηγήσεις ως προς τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των τριών φύλων. Το μέγεθος αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει τις ποσότητες του προσλαμβανόμενου αρσενικού από τα λυθρίνια. Τα αρσενικά τείνουν θεωρητικά να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα θηλυκά, επομένως θα ήταν αναμενόμενη η παρουσία μεγαλύτερων συγκεντρώσεων αρσενικού και αρσενολιπιδίων.<sup>19,30,31,40</sup> Ωστόσο, η συγκεκριμένη διαπίστωση δεν ισχύει στην παρούσα περίπτωση, καθώς δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεγεθών των ψαριών αυτού του είδους.

Όμοια με τις κουτσομούρες, διαφορές μπορούν να εντοπιστούν, σε επίπεδο λιπιδικού περιεχομένου και μεταβολικών διεργασιών κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου. Η αύξηση του ποσοστού λίπους στις γονάδες των θηλυκών ψαριών και η μείωση του λίπους στον ιστό τους, διαδικασίες που βασίζονται σε ορμονολογικές αλλαγές και σηματοδοτήσεις, πιθανόν συντελούν στις μειωμένες συγκεντρώσεις αρσενολιπιδίων στη σάρκα των θηλυκών σε σχέση με τη σάρκα των αρσενικών ψαριών.<sup>83-89</sup> Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, τα ερμαφρόδιτα ψάρια είχαν χαρακτηριστικά πιο κοντινά σε αρσενικά (από άποψη αναπαραγωγικού συστήματος), καθώς και περιορισμένης έκτασης και ποσότητας γονάδες θηλυκών ατόμων. Συνεπώς, είναι λογικό οι συγκεντρώσεις που εμφανίζουν για τα αρσενολιπίδια να είναι ενδιάμεσες των αρσενικών και των θηλυκών, αλλά με ελαφρώς περισσότερες ομοιότητες με τα αρσενικά.

Ως προς την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού AsFAs σε σχέση με AsHCs, πρόκειται για μια παρατήρηση που αφορά γενικότερα τα βενθικά ψάρια, κατά λογική όμοια με τις παρατηρήσεις που αφορούν την κουτσομούρα.<sup>90</sup> Το περιβάλλον, ο μεταβολισμός και οι διατροφικές συνήθειες δύνανται να αποτελέσουν παράγοντες που επιδρούν στην αναλογία AsFAs με AsHCs για τους βενθικούς οργανισμούς.<sup>91</sup> Τα παραπάνω χρήζουν διερεύνησης σε μεταβολικό επίπεδο για την ακριβή διαπίστωσή τους.

#### 4.8 Αποτελέσματα για τον μπακαλιάρο – επίδραση του ιστού στην παρουσία αρσενολιπιδίων

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για το μπακαλιάρο προκύπτει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση αρσενολιπιδίων εντοπίζεται στις γονάδες ( $124.5 \pm 56.5$  ppb As), ακολουθούν τα βράγχια ( $55.6 \pm 11.5$  ppb As), ενώ η μικρότερη συγκέντρωση παρατηρείται στη σάρκα των ψαριών ( $11.0 \pm 1.4$  ppb As). Στη σάρκα ο αριθμός των AsHCs είναι σχεδόν ίδιος με τον αριθμό των AsFAs, με τα αρσενολιπίδια που εντοπίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να είναι τα AsFA<sub>390</sub>, AsHC<sub>360</sub> και AsHC<sub>440</sub>. Στις γονάδες, ο αριθμός των AsFAs είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των AsHCs, με τη μεγαλύτερη σε συγκέντρωση ένωση να είναι το AsFA<sub>390</sub>. Τέλος, στα βράγχια ο αριθμός των AsFAs είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των AsHCs και το αρσενολιπίδιο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι το AsFA<sub>390</sub>. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται παρουσία και φυσικώς απαντώμενου AsHC<sub>374</sub>. Τα παραπάνω αναγράφονται σε πίνακες που ακολουθούν, ξεχωριστά για τα δείγματα σάρκας (**Πίνακας 18**), γονάδων (**Πίνακας 19**) και βράγχιων (**Πίνακας 20**).

**Πίνακας 18:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων μπακαλιάρου που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα Mu-2	Σάρκα Mu-3	Σάρκα Mu-4	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
<b>AsHC 374</b>	0.9	0.6	0.6	0.7 ± 0.1
<b>AsHC 332</b>	2.6	1.0	3.5	2.4 ± 1.3
<b>AsHC 358</b>	0.5	0.2	0.4	0.3 ± 0.1
<b>AsHC 360</b>	2.9	1.0	1.7	1.9 ± 1.0
<b>AsHC 440</b>	1.5	1.7	1.4	1.5 ± 0.1
<b>AsHC 444</b>	0.1	0.2	0.2	0.2 ± 0.1
<b>AsFAs</b>				
<b>AsFA 362</b>	0.8	1.0	0.8	0.8 ± 0.1
<b>AsFA 376</b>	0.1	0.1	n.d.	0.1 ± 0.0
<b>AsFA 388</b>	0.1	0.1	n.d.	0.1 ± 0.0
<b>AsFA 390</b>	2.6	3.1	2.1	2.6 ± 0.5
<b>AsFA 436</b>	n.d.	0.2	0.2	0.1 ± 0.1
<b>AsFA 448</b>	0.2	0.2	0.1	0.2 ± 0.0
<b>AsFA 528</b>	0.2	0.2	0.1	0.2 ± 0.1
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>12.3</b>	<b>9.6</b>	<b>11.2</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>11.0 ± 1.4</b>			

**Πίνακας 19:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στις γονάδες των τριών δειγμάτων μπακαλιάρου που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Γονάδες Go-1	Γονάδες Go-2	Γονάδες Go-3	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
<b>AsHC 374</b>	0.5	0.7	0.4	0.5 ± 0.1
<b>AsHC 358</b>	0.3	1.6	0.2	0.7 ± 0.7
<b>AsHC 360</b>	2.4	13.8	3.9	6.7 ± 6.2
<b>AsHC 388</b>	0.7	0.6	0.6	0.6 ± 0.1
<b>AsFAs</b>				
<b>AsFA 334</b>	0.3	0.4	1.2	0.6 ± 0.5
<b>AsFA 348</b>	0.3	0.4	0.9	0.5 ± 0.5
<b>AsFA 362</b>	3.9	6.1	12.9	7.6 ± 0.4
<b>AsFA 376</b>	1.4	0.8	2.1	1.4 ± 4.7
<b>AsFA 382</b>	0.6	1.2	4.6	2.1 ± 0.7
<b>AsFA 388</b>	1.9	2.6	6.9	3.8 ± 2.2
<b>AsFA 390</b>	75.2	40.4	107.0	74.2 ± 2.7
<b>AsFA 404</b>	1.0	0.3	1.3	0.9 ± 33.3
<b>AsFA 408</b>	0.6	1.0	7.9	3.2 ± 0.5
<b>AsFA 418</b>	5.1	1.6	7.3	4.6 ± 4.1
<b>AsFA 446</b>	2.3	0.7	1.8	1.6 ± 2.9
<b>AsFA 448</b>	3.3	4.4	24.8	10.8 ± 0.8
<b>AsFA 474</b>	0.8	0.5	0.9	0.8 ± 12.1
<b>AsFA 528</b>	4.8	2.9	3.2	3.6 ± 0.2
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>105.5</b>	<b>79.9</b>	<b>188.0</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>124.5 ± 56.5</b>			

**Πίνακας 20:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στα βράγχια των τριών δειγμάτων μπακαλιάρου που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

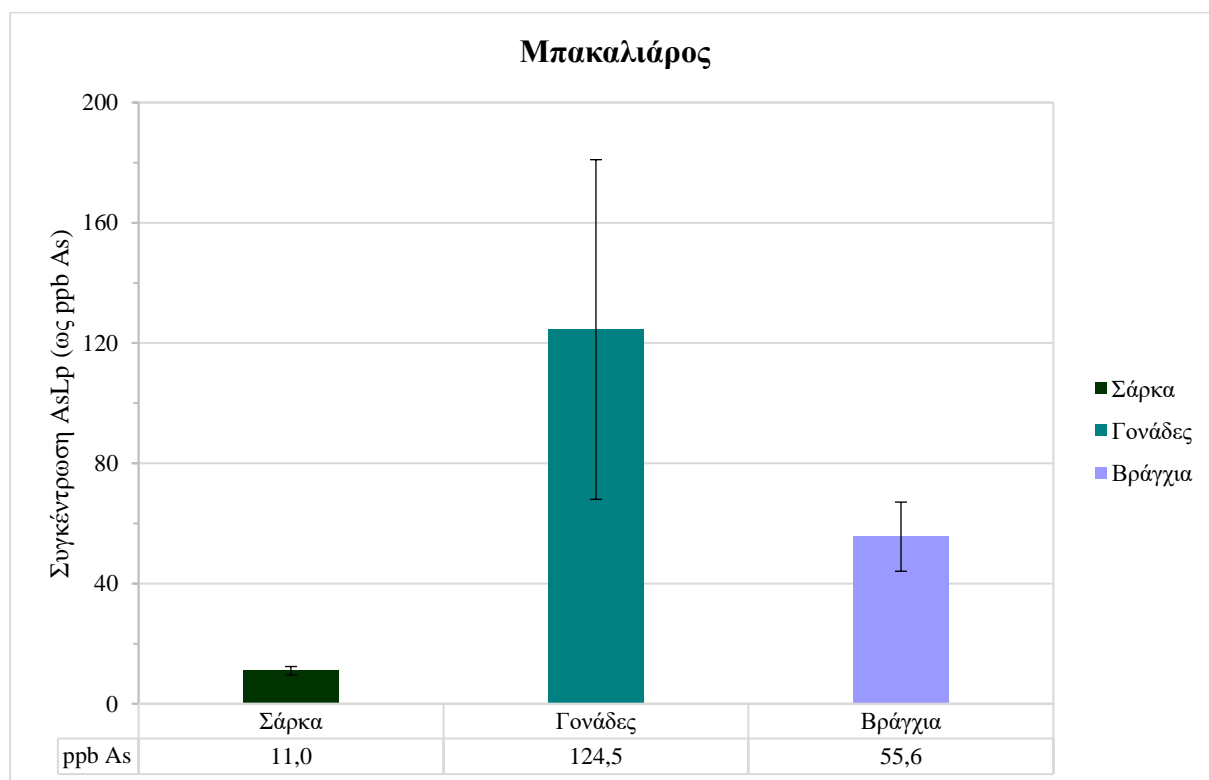
Κωδική Ονομασία AsLp	Βράγχια Gi-2	Βράγχια Gi-3	Βράγχια Gi-4	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
AsHC 374	0.4	0.6	0.4	0.5 ± 0.1
AsHC 332	2.4	0.9	1.5	1.6 ± 0.7
AsHC 360	2.1	1.4	1.0	1.5 ± 0.6
AsHC 404	0.3	0.2	0.2	0.2 ± 0.1
AsHC 440	1.2	1.2	0.7	1.1 ± 0.3
AsHC 444	0.5	0.8	0.2	0.5 ± 0.3
<b>AsFAs</b>				
AsFA 334	0.1	0.1	0.1	0.1 ± 0.0
AsFA 348	0.2	0.2	0.1	0.2 ± 0.0
AsFA 362	2.3	2.4	1.3	2.0 ± 0.6
AsFA 376	0.8	0.6	0.4	0.6 ± 0.2
AsFA 382	0.3	0.4	0.3	0.3 ± 0.0
AsFA 388	1.7	1.5	1.0	1.4 ± 0.3
AsFA 390	41.7	33.8	25.4	33.6 ± 8.2
AsFA 418	1.8	2.0	1.5	1.8 ± 0.3
AsFA 436	5.0	3.8	3.6	4.1 ± 0.8
AsFA 446	0.9	0.8	1.2	1.0 ± 0.2
AsFA 448	2.1	3.2	2.1	2.5 ± 0.7
AsFA 474	n.d.	0.4	0.4	0.3 ± 0.2
AsFA 528	2.3	2.6	2.1	2.3 ± 0.2
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>66.2</b>	<b>57.3</b>	<b>43.4</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>55.6 ± 11.5</b>			

**Πίνακας 21:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα, στις γονάδες και στα βράγχια θηλυκών μπακαλιάρων δύο εκ των τριών δειγμάτων κάθε ιστού. Με σκούρο πράσινο χρώμα τονίζονται οι διαφορές που εντοπίζονται στη σάρκα, με γαλάζιο οι διαφορές που εντοπίζονται στις γονάδες, με ανοιχτό μωβ οι διαφορές που εντοπίζονται στα βράγχια και με μαύρο τα κοινά μεταξύ των ιστών αρσενολιπίδια. Στην τελευταία γραμμή αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για τον κάθε ιστό. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα	Γονάδες	Βράγχια
<b>AsHC 374</b>	0.7	0.5	0.5
<b>AsHC 332</b>	2.4	n.d.	1.6
<b>AsHC 358</b>	0.3	0.7	n.d.
<b>AsHC 360</b>	1.9	6.7	1.5
<b>AsHC 404</b>	n.d.	n.d.	0.2
<b>AsHC 440</b>	1.5	n.d.	1.1
<b>AsHC 444</b>	0.2	n.d.	0.5
<b>AsFA 334</b>	n.d.	0.1	0.1
<b>AsFA 348</b>	n.d.	0.5	0.2
<b>AsFA 362</b>	0.8	7.6	2.0
<b>AsFA 376</b>	0.1	1.4	0.6
<b>AsFA 382</b>	n.d.	2.1	0.3
<b>AsFA 388</b>	0.1	3.8	1.4
<b>AsFA 390</b>	2.6	74.2	33.6
<b>AsFA 418</b>	n.d.	4.6	1.8
<b>AsFA 436</b>	0.2	n.d.	4.1
<b>AsFA 446</b>	n.d.	1.6	1.0
<b>AsFA 448</b>	0.2	10.8	2.5
<b>AsFA 474</b>	n.d.	0.8	0.2
<b>AsFA 528</b>	0.2	2.6	2.1
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>11.0 ± 1.4</b>	<b>124.5 ± 56.5</b>	<b>55.6 ± 11.5</b>

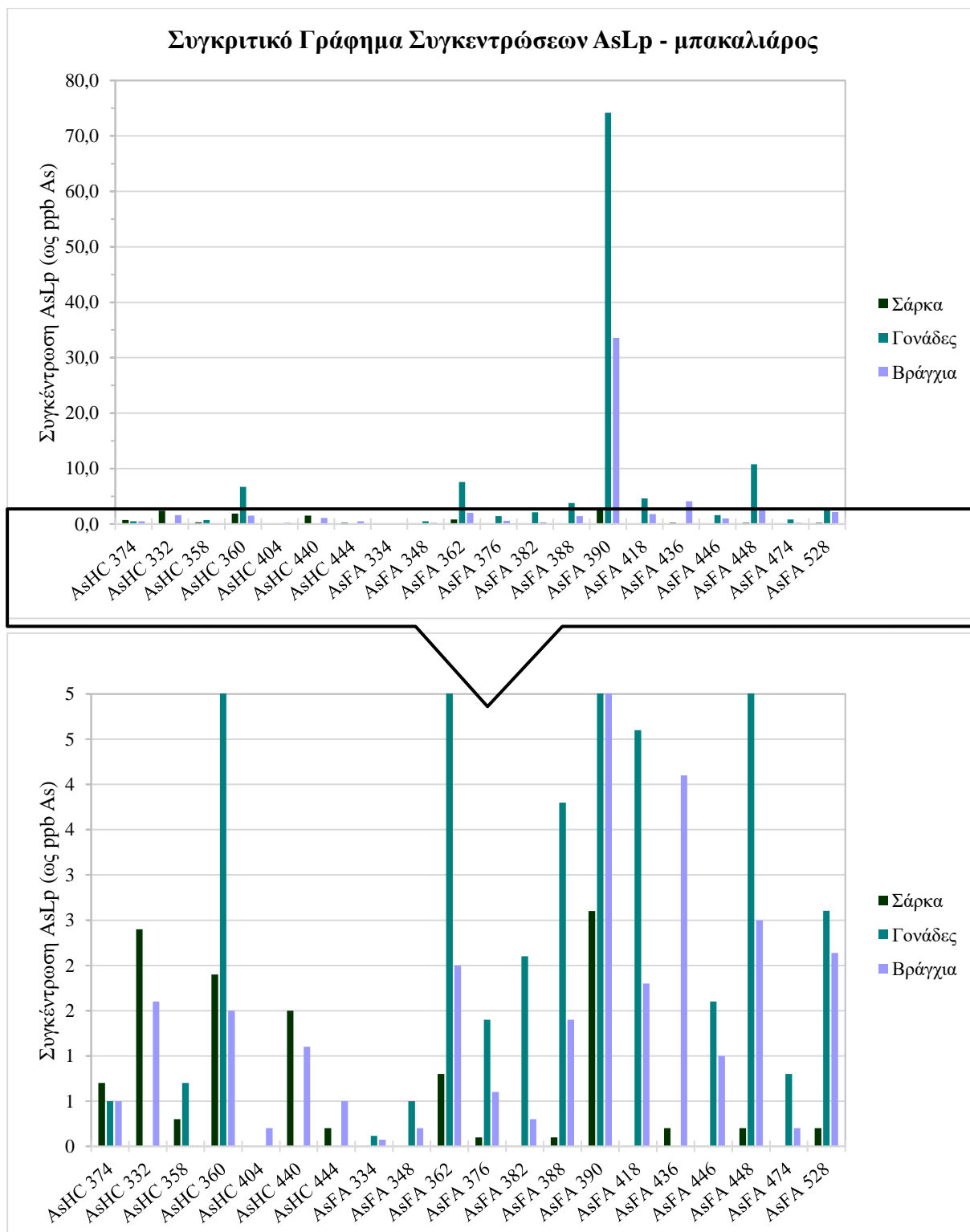


Με απεικόνιση των πληροφοριών που αφορούν τις ολικές συγκεντρώσεις αρσενολιπιδίων στους διαφορετικούς ιστούς προκύπτει το ακόλουθο γράφημα (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Διαγραμματική απεικόνιση της ολικής συγκέντρωσης αρσενολιπιδίων στους ιστούς μπακαλιάρου εκφρασμένη ως ppb As.

Με μεμονωμένη απεικόνιση του μέσου όρου της συγκέντρωσης του κάθε αρσενολιπιδίου για τον κάθε ιστό προκύπτει το ακόλουθο συγκριτικό γράφημα (Εικόνα 33).



**Εικόνα 33:** Συγκριτικό γράφημα των συγκεντρώσεων του αρσενικού των ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων στους ιστούς των μπακαλιάρων. Πάνω φαίνεται το πλήρες γράφημα, ενώ κάτω φαίνεται μεγεθυμένο ως προς τον άξονα y μέρος του πάνω γραφήματος.

Από το σύνολο των παραπάνω δεδομένων εξάγονται ορισμένες παρατηρήσεις. Αρχικά, παρατηρείται ότι η παρουσία των αρσενολιπιδίων διαφέρει σημαντικά τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά από ιστό σε ιστό. Διαφορές μπορούν να εντοπιστούν, όμως, σε επίπεδο λιπιδικού περιεχομένου και μεταβολικών διεργασιών κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου, σύμφωνα με όσα έχουν ήδη αναφερθεί για τα θηλυκά ψάρια. Δεδομένου ότι οι μπακαλιάροι που αναλύθηκαν ήταν θηλυκού φύλου και ότι το λιπιδικό περιεχόμενο των θηλυκών στη διάρκεια της ωοτοκίας είναι αυξημένο στις γονάδες και μειωμένο στη σάρκα, προκύπτει ως λογικό αποτέλεσμα η αυξημένη συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων στις γονάδες σε σχέση με τη σάρκα.<sup>83-89</sup>

Τα βράγχια αποτελούν συχνά δείκτη περιβαλλοντικής ρύπανσης, λόγω της άμεσης επαφής που έχουν με το περιβάλλον διαβίωσης των ψαριών, φιλτράροντας μάλιστα επιβλαβείς ουσίες. Ως προς το περιεχόμενο αρσενολιπιδίων στα βράγχια, μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ακριβώς αυτό το φιλτράρισμα, μέσω του οποίου οι μορφές του αρσενικού μπορούν να συγκεντρώνονται στο ψάρι. Αυτή η παρατήρηση πιθανόν εξηγεί το γεγονός ότι η παρουσία των αρσενολιπιδίων είναι αυξημένη στα βράγχια σε σχέση με τη σάρκα.<sup>92</sup>

#### 4.9 Αποτελέσματα για το γαύρο

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για το γαύρο προκύπτει ότι στην πλειοψηφία τους τα αρσενολιπίδια που απαντώνται σε αυτό το είδος ανήκουν στην κατηγορία των AsHCs. Μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται σε κάθε δείγμα για τον AsHC<sub>332</sub>, ακολουθούμενο από τον AsHC<sub>360</sub>. Η ολική συγκέντρωση αρσενολιπιδίων εκφρασμένη ως προς το αρσενικό που περιέχεται σε αυτά είναι 61.2 ppb, 58.9 ppb και 94.6 ppb για κάθε δείγμα σάρκας γαύρου ξεχωριστά. Ο μέσος όρος που προκύπτει για αυτές τις συγκεντρώσεις είναι  $71.5 \pm 20.0$  ppb As. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρείται παρουσία και φυσικώς απαντώμενου AsHC<sub>374</sub>. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 22) αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των αρσενολιπιδίων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα σάρκας γαύρου.

**Πίνακας 22:** Συγκεντρώσεις μεμονωμένων αρσενολιπιδίων ως ppb As που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα των τριών δειγμάτων γαύρου που αναλύθηκαν. Στις τελευταίες γραμμές αναγράφονται και οι ολικές συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα και η μέση συγκέντρωση των τριών δειγμάτων. Στην δεξιά στήλη αναγράφεται το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών δειγμάτων για κάθε αρσενολιπίδιο. Η έκφραση n.d. αφορά στα μη ανιχνευμένα είδη.

Κωδική Ονομασία AsLp	Σάρκα 2 (ppb As)	Σάρκα 4 (ppb As)	Σάρκα 5 (ppb As)	Μέσος όρος ± STD (ppb As)
<b>AsHCs</b>				
<b>AsHC 374</b>	0.3	0.5	0.5	0.4 ± 0.1
<b>AsHC 330</b>	n.d.	n.d.	0.2	0.1 ± 0.1
<b>AsHC 332</b>	37.3	35.0	48.7	40.3 ± 7.3
<b>AsHC 346</b>	0.8	0.6	1.1	0.8 ± 0.3
<b>AsHC 358</b>	3.1	2.7	3.1	3.0 ± 0.2
<b>AsHC 360</b>	17.9	17.5	27.6	21.0 ± 5.7
<b>AsHC 388</b>	n.d.	0.9	1.0	0.6 ± 0.5
<b>AsHC 404</b>	n.d.	n.d.	9.9	3.3 ± 5.7
<b>AsHC 440</b>	0.7	0.7	1.2	0.9 ± 0.3
<b>AsFAs</b>				
<b>AsFA 362</b>	0.3	0.2	0.3	0.3 ± 0.1
<b>AsFA 390</b>	0.5	0.6	0.8	0.6 ± 0.1
<b>AsFA 528</b>	0.2	0.2	0.2	0.2 ± 0.0
<b>Συνολική Συγκέντρωση (ppb As)</b>	<b>61.2</b>	<b>58.9</b>	<b>94.6</b>	
<b>Μέσος Όρος ± STD (ppb As)</b>	<b>71.5 ± 20.0</b>			

Ως προς την παρουσία μεγαλύτερου αριθμού AsHCs σε σχέση με AsFAs, πρόκειται για μια παρατήρηση που αφορά γενικότερα τα πελαγικά ψάρια.<sup>90</sup> Αυτή η παρατήρηση πιθανόν σχετίζεται τόσο με τις μεταβολικές οδούς που έχουν αναπτύξει οι πελαγικοί οργανισμοί προκειμένου να προσαρμοστούν στο περιβάλλον τους, όσο και με τις μορφές του αρσενικού που εντοπίζονται στη στήλη του νερού.<sup>42,91</sup> Επιπλέον, η παρουσία ιδιαίτερα αυξημένου αριθμού λιπαρών οξέων για το γαύρο ίσως να αποτελεί καταλυτικό παράγοντα για τον σχηματισμό AsHCs, σύμφωνα με τις προτεινόμενες μεταβολικές διεργασίες σχηματισμού αρσενολιπιδίων.<sup>21</sup> Τα παραπάνω χρήζουν διερεύνησης σε μεταβολικό επίπεδο για την ακριβή διαπίστωσή τους.

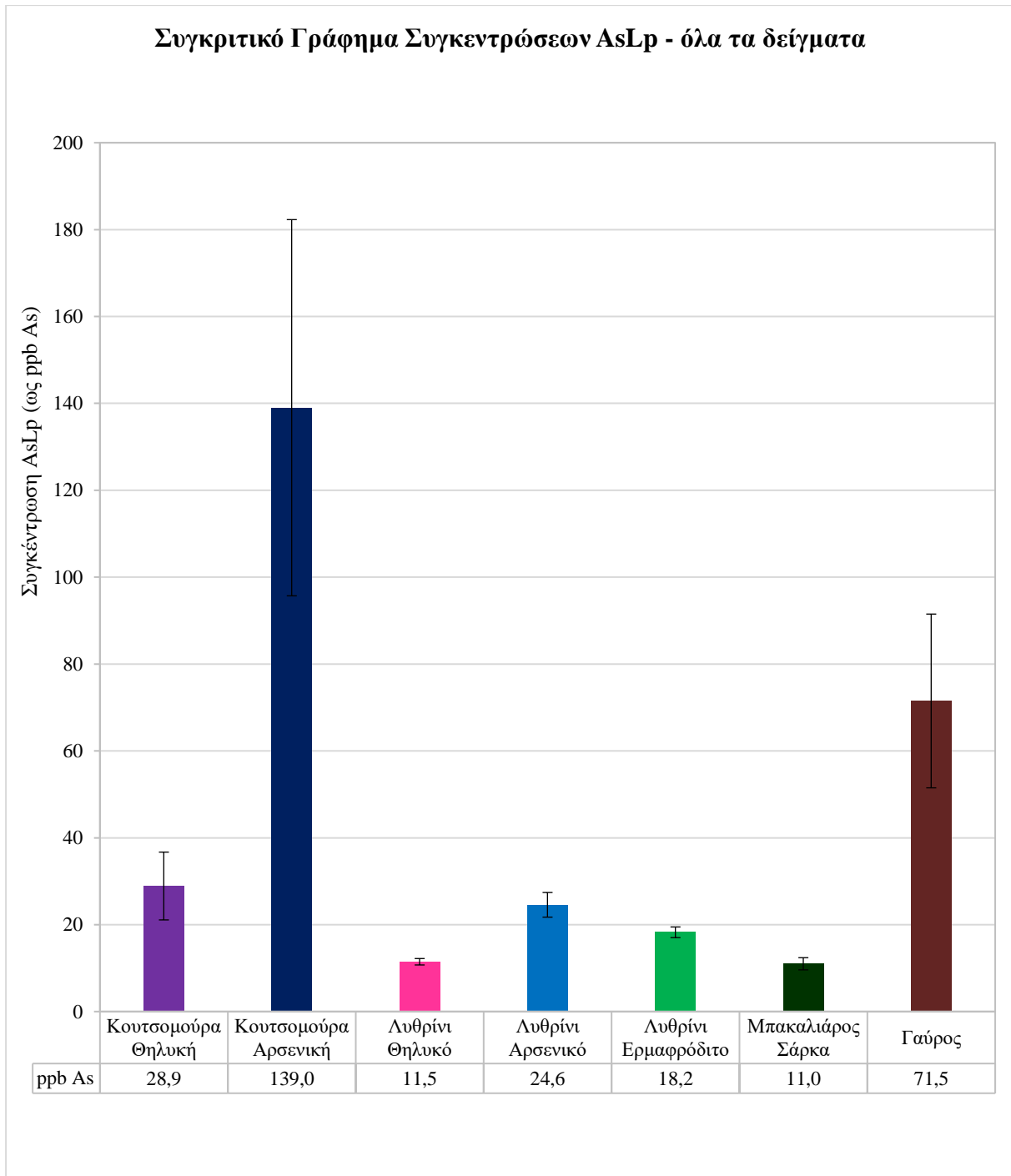
#### 4.10 Επίδραση του είδους των ψαριών στην παρουσία αρσενολιπιδίων

Τελευταίο στόχο στην παρούσα μελέτη αποτελεί η εξέταση της επίδρασης του είδους των ψαριών στην παρουσία των αρσενολιπιδίων. Από το σύνολο όσων έχουν προαναφερθεί υπολογίζεται ότι οι ολικές συγκεντρώσεις των αρσενολιπιδίων εκφρασμένες ως προς το αρσενικό που περιέχουν για τη σάρκα από όλα τα δείγματα αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 23:** Ολικές συγκεντρώσεις αρσενολιπιδίων εκφρασμένες ως προς το αρσενικό που περιέχουν για τα δείγματα σάρκας.

Κουτσομούρα Θηλυκή	$28.9 \pm 7.8$ ppb
Κουτσομούρα Αρσενική	$139.0 \pm 43.3$ ppb
Λυθρίνι Θηλυκό	$11.5 \pm 0.7$ ppb
Λυθρίνι Αρσενικό	$24.6 \pm 2.8$ ppb
Λυθρίνι Ερμαφρόδιτο	$18.2 \pm 1.2$ ppb
Μπακαλιάρος Σάρκα	$11.0 \pm 1.4$ ppb
Μπακαλιάρος Γονάδες	$124.5 \pm 56.5$ ppb
Μπακαλιάρος Βράγχια	$55.6 \pm 11.5$ ppb
Γαύρος	$71.5 \pm 20$ ppb

Από την απεικόνιση των τιμών αυτών προκύπτει το αντίστοιχο συγκριτικό γράφημα (**Εικόνα 34**). Επιπλέον, στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 24**) αναγράφονται οι συγκεντρώσεις όλων των ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων για τα διαφορετικά δείγματα.



**Εικόνα 34:** Συγκριτικό γράφημα των ολικών συγκεντρώσεων αρσενικού των ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων για τη σάρκα όλων των δειγμάτων ψαριών.

Πίνακας 24: Συνολικός πίνακας συγκεντρώσεων ανιχνευμένων αρσενολιπιδίων όλων των δειγμάτων εκφρασμένες ως ppb As.

Κωδική Ονομασία AsLPs	Κουτσομούρα Θηλυκό Σαρκα (ppb As)	Κουτσομούρα Αρσενικό Σαρκα (ppb As)	Λυθρίνι Θηλυκό Σαρκα (ppb As)	Λυθρίνι Αρσενικό Σαρκα (ppb As)	Λυθρίνι Ερμαφρόδιτο Σαρκα (ppb As)	Μπακαλιάρος			Γάυρος Απροσδιόριστο Σάρκα (ppb As)
						Σαρκα (ppb As)	Θηλυκό Γονάδες (ppb As)	Βράγχια (ppb As)	
AsHCs									
AsHC 374	-	-	-	-	-	0.7	0.5	0.5	0.4
AsHC 330	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
AsHC 332	-	-	-	-	-	2.4	-	1.6	40.3
AsHC 346	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8
AsHC 358	-	-	-	-	-	0.3	0.7	-	3.0
AsHC 360	-	-	-	-	-	1.9	6.7	1.5	21.0
AsHC 388	-	-	-	1.0	-	-	-	-	0.9
AsHC 404	-	2.5	-	1.6	0.3	-	-	0.2	9.9
AsHC 440	0.4	0.6	1.6	1.8	1.4	1.5	-	1.4	0.9
AsHC 442	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
AsHC 444	-	-	0.5	0.8	0.6	0.2	-	0.5	-
AsFAs									
AsFA 334	0.2	0.2	-	-	-	-	0.1	0.1	-



<b>AsFA 348</b>	0.5	0.5	0.1	-	0.1	-	0.5	0.2	-
<b>AsFA 362</b>	3.7	12.9	0.7	1.4	0.6	0.8	7.6	2	0.3
<b>AsFA 376</b>	1.1	2.1	0.3	0.4	0.3	0.1	1.4	0.6	-
<b>AsFA 382</b>	-	-	-	-	-	-	2.1	0.3	-
<b>AsFA 388</b>	1.3	0.9	-	-	0.1	0.1	3.8	1.4	-
<b>AsFA 390</b>	12.8	58.3	3.8	8.1	4.9	2.6	74.2	33.6	0.6
<b>AsFA 404</b>	1.3	3.3	0.5	1.4	1.0	-	-	-	-
<b>AsFA 408</b>	0.4	2.00	0.2	0.3	0.3	-	-	-	-
<b>AsFA 418</b>	4.0	19.4	2.7	7.2	4.4	-	4.6	1.8	-
<b>AsFA 436</b>	1.6	19.2	1.8	2.4	1.8	0.2	-	4.1	-
<b>AsFA 446</b>	0.8	3.6	-	2.0	1.5	-	1.6	1.0	-
<b>AsFA 448</b>	0.9	13.7	-	-	2.5	0.2	10.8	2.5	-
<b>AsFA 474</b>	-	-	-	-	0.9	-	0.8	0.2	-
<b>AsFA 486</b>	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AsFA 528</b>	-	-	0.3	2.9	1.0	0.2	2.6	2.1	0.2
<b>Ολική συγκέντρωση AsLp (ppb As)</b>	<b>28.9 ± 7.8</b>	<b>139.0 ± 43.3</b>	<b>11.5 ± 0.7</b>	<b>24.6 ± 2.8</b>	<b>18.2 ± 1.2</b>	<b>11.0 ± 1.4</b>	<b>124.5 ± 56.5</b>	<b>55.6 ± 11.5</b>	<b>71.5 ± 20.0</b>

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αρσενολιπιδίων εντοπίζονται στην αρσενική κουτσομούρα, στις γονάδες μπακαλιάρου και στο γαύρο. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί και με ήδη υπάρχουσες παρατηρήσεις, παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός AsFAs στα βενθικά ψάρια και μεγαλύτερος αριθμός AsHCs στα πελαγικά ψάρια, με τις ολικές συγκεντρώσεις σε αρσενολιπίδια των τελευταίων να έχουν πιο αυξημένες τιμές.<sup>90</sup> Αυτή η παρατήρηση πιθανόν σχετίζεται τόσο με τις μεταβολικές οδούς που έχουν αναπτύξει οι οργανισμοί προκειμένου να προσαρμοστούν στο περιβάλλον τους (για παράδειγμα διαδικασίες αποτοξίνωσης από το αρσενικό ή αξιοποίησης των αρσενολιπιδίων σε βιολογικές διεργασίες), όσο και με τις μορφές του αρσενικού που εντοπίζονται στις διαφορετικές πηγές σίτισης κάθε είδους.<sup>91</sup>

Όσο για τους πελαγικούς οργανισμούς όπως ο γαύρος, το υψηλό λιπιδικό τους περιεχόμενο, ιδιαίτερα σε λιπαρά οξέα, ίσως να αποτελεί καταλυτικό παράγοντα για τον σχηματισμό AsHCs και την συνολικά αυξημένη συγκέντρωση αρσενολιπιδίων, σύμφωνα με τις προτεινόμενες μεταβολικές διεργασίες σχηματισμού αρσενολιπιδίων.<sup>21</sup> Κοινό γνώρισμα μεταξύ των όλων των ψαριών αποτελεί επίσης η υψηλή συγκέντρωση που παρουσιάζουν για τα AsFA<sub>362</sub>, AsFA<sub>390</sub> και AsFA<sub>418</sub>. Αυτά τα αρσενολιπίδια ενδέχεται να αξιοποιούνται από τους οργανισμούς στη θέση ελεύθερων λιπαρών οξέων, μεμβρανικών λιπιδίων ή για μεταβολικές διεργασίες και για το λόγο αυτό να εντοπίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το ίδιο θα μπορούσε πιθανόν να ειπωθεί και για τα είδη AsHC<sub>332</sub> και AsHC<sub>360</sub> στο γαύρο, παρότι δεν μπορεί με τα υπάρχοντα δεδομένα να γίνει σύγκριση με άλλο πελαγικό ψάρι.<sup>19</sup>

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι περίπου οι μισοί AsHCs που εντοπίζονται στο μπακαλιάρο, εντοπίζονται και στο γαύρο. Επιπλέον, φυσικά απαντώμενο AsHC<sub>374</sub> (όμοιο με εσωτερικό πρότυπο) εντοπίζεται μόνο σε αυτά τα δύο είδη. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μπακαλιάρος τρέφεται με γαύρους και το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την παρουσία γενικότερα κοινών μεταξύ των ειδών αρσενολιπιδίων ενισχύει την υπόθεση της άμεσης πρόσληψης και συσσώρευσης αρσενολιπιδίων στην τροφική αλυσίδα, χωρίς όμως να την επιβεβαιώνει.<sup>32-36</sup>

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε χρωματογραφική μέθοδος (υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης – RPLC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας Orbitrap (ESI-Orbitrap-MS) για τον προσδιορισμό των αρσενολιπιδίων των δύο κύριων κατηγοριών που έχουν εντοπιστεί σε δείγματα ψαριών. Τα αρσενολιπίδια αυτά ήταν υδρογονάνθρακες και λιπαρά οξέα που περιέχουν αρσενικό (AsHCs και AsFAs, αντίστοιχα). Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τέσσερα διαφορετικά είδη ψαριών του Αιγαίου (κουτσομούρα, λυθρίνι, μπακαλιάρος και γάυρος) αλιευμένα από τα Στενά του Αρτεμισίου και την έξοδο του Παγασητικού Κόλπου. Τα AsHCs και AsFAs εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε είδος ψαριού και σε εύρος ολικών συγκεντρώσεων εκφρασμένες ως προς το αρσενικό από  $18.1 \pm 1.1$  ppb έως  $84.0 \pm 25.1$  ppb. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν από το κάθε είδος ψαριού και βάσει φύλου ήταν  $28.9 \pm 7.8$  ppb για τη θηλυκή και  $139.0 \pm 43.3$  ppb για την αρσενική κουτσομούρα,  $11.5 \pm 0.7$  ppb για το θηλυκό,  $24.6 \pm 2.8$  ppb για το αρσενικό και  $18.2 \pm 1.2$  ppb για το ερμαφρόδιτο λυθρίνι,  $11.0 \pm 1.4$  ppb για τη σάρκα μπακαλιάρου και  $71.5 \pm 20$  ppb για τη σάρκα γάυρου.

Επιπλέον εξετάστηκε το επίπεδο διαφοροποίησης της παρουσίας των αρσενολιπιδίων και ως προς τον ιστό των ψαριών με δείγμα το μπακαλιάρo (σάρκα –  $11.0 \pm 1.4$  ppb, βράγχια –  $55.6 \pm 11.5$  ppb, γονάδες –  $124.5 \pm 56.5$  ppb). Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν ως προς το είδος και το φύλο δύνανται να οφείλονται κυρίως στις διατροφικές συνήθειες και στο λιπιδικό περιεχόμενο των ψαριών. Επιπλέον διαφοροποιητικός παράγοντας του φύλου ενδέχεται να αποτελούν και οι διαφορετικές μεταβολικές διεργασίες που προκύπτουν από ορμονολογικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων στη διάρκεια της αναπαραγωγής (οι κουτσομούρες και τα λυθρίνια βρίσκονται σε πρώτα στάδια της αναπαραγωγικής τους περιόδου), μέσω των οποίων πιθανόν μειώνεται η συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων στη σάρκα των θηλυκών ψαριών σε σχέση με τα αρσενικά, αλλά αυξάνεται στις γονάδες των θηλυκών ψαριών.. Τέλος παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιστών, γεγονός που μάλλον οφείλεται στις μεταβολικές διεργασίες, στο λιπιδικό περιεχόμενο και στη σύσταση των ιστών, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την αυξημένη παρουσία αρσενολιπιδίων στις γονάδες, όπου το λιπιδικό περιεχόμενο αυξάνει με στην ωτοκία.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Vika, E.; Theodoropoulou, T. Re-Investigating Fish Consumption in Greek Antiquity: Results from  $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$  Analysis from Fish Bone Collagen. *J Archaeol Sci* **2012**, *39* (5), 1618–1627. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.01.016>.
- (2) Malissiova, E.; Soutani, G.; Kogia, P.; Koureas, M.; Hadjichristodoulou, C. Analysis of 20 Year Data for the Assessment of Dietary Exposure to Chemical Contaminants in the Region of Thessaly, Greece. *Food Control* **2022**, *136* (November 2021), 108838. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108838>.
- (3) Martimianaki, G.; Peppas, E.; Valanou, E.; Papatesta, E. M.; Klinaki, E.; Trichopoulou, A. Today's Mediterranean Diet in Greece: Findings from the National Health and Nutrition Survey—HYDRIA (2013–2014). *Nutrients* **2022**, *14* (6). <https://doi.org/10.3390/nu14061193>.
- (4) Chen, J.; Jayachandran, M.; Bai, W.; Xu, B. A Critical Review on the Health Benefits of Fish Consumption and Its Bioactive Constituents. *Food Chem* **2022**, *369*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130874>.
- (5) Stenson, W. F.; Cort, D.; Rodgers, J.; Burakoff, R.; DeSchryver-Kecskemeti, K.; Gramlich, T. L.; Beeken, W. Dietary Supplementation with Fish Oil in Ulcerative Colitis. *Ann Intern Med* **1992**, *116* (8), 609–619.
- (6) Wang, C.; Harris, W. S.; Chung, M.; Lichtenstein, A. H.; Balk, E. M.; Kupelnick, B.; Jordan, H. S.; Lau, J. N-3 Fatty Acids from Fish or Fish-Oil Supplements, but Not  $\alpha$ -Linolenic Acid, Benefit Cardiovascular Disease Outcomes in Primary- and Secondary-Prevention Studies: A Systematic Review. *Am J Clin Nutr* **2006**, *84* (1), 5–17.
- (7) Eslick, G. D.; Howe, P. R. C.; Smith, C.; Priest, R.; Bensoussan, A. Benefits of Fish Oil Supplementation in Hyperlipidemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Cardiol* **2009**, *136* (1), 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.03.092>.
- (8) Siscovick, D. S.; Barringer, T. A.; Fretts, A. M.; Wu, J. H. Y.; Lichtenstein, A. H.; Costello, R. B.; Kris-Etherton, P. M.; Jacobson, T. A.; Engler, M. B.; Alger, H. M.; Appel, L. J.; Mozaffarian, D. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory from the American Heart Association. *Circulation* **2017**, *135* (15), e867–e884. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000482>.
- (9) Committee, E. S. Statement on the Benefits of Fish/Seafood Consumption Compared to the Risks of Methylmercury in Fish/Seafood. *EFSA Journal* **2015**, *13* (1), 1–36. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3982>.
- (10) Emsley, J. *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*, 2nd ed.; Oxford University Press, 2011.

- (11) Kapp, R. W. Arsenic Toxicology. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.62151-7>.
- (12) Kumar, N. *Arsenic Toxicity: Challenges and Solutions*; 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-6068-6>.
- (13) Sultani, G.; Sele, V.; Rasmussen, R. R.; Pasiyas, I.; Stathopoulou, E.; Thomaidis, N. S.; Sinanoglou, V. J.; Sloth, J. J. Elements of Toxicological Concern and the Arsenolipids' Profile in the Giant-Red Mediterranean Shrimp, *Aristaeomorpha Foliacea*. *Journal of Food Composition and Analysis* **2021**, 97 (March 2020), 103786. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103786>.
- (14) Tibon, J.; Amlund, H.; Gomez-Delgado, A. I.; Berntssen, M. H. G.; Silva, M. S.; Wiech, M.; Sloth, J. J.; Sele, V. Arsenic Species in Mesopelagic Organisms and Their Fate during Aquafeed Processing. *Chemosphere* **2022**, 302 (5817), 134906. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134906>.
- (15) Dembitsky, V. M.; Levitsky, D. O. Arsenolipids. *Progress in Lipid Research*. Pergamon September 1, 2004, pp 403–448. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.07.001>.
- (16) Freitas, A. C.; Gomes, A. M. *Analytical Approaches for Proteomics and Lipidomics of Arsenic in Algae*, 1st ed.; Elsevier B.V., 2019; Vol. 85. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.03.002>.
- (17) Yu, X.; Xiong, C.; Jensen, K. B.; Glabonjat, R. A.; Stiboller, M.; Raber, G.; Francesconi, K. A. Mono-Acyl Arsenosugar Phospholipids in the Edible Brown Alga Kombu (*Saccharina Japonica*). *Food Chem* **2018**, 240 (May 2017), 817–821. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.024>.
- (18) Liu, Q.; Huang, C.; Li, W.; Fang, Z.; Le, X. C. Discovery and Identification of Arsenolipids Using a Precursor-Finder Strategy and Data-Independent Mass Spectrometry. *Cite This: Environ. Sci. Technol* **2021**, 55, 3844. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07175>.
- (19) Sele, V.; Sloth, J. J.; Lundebye, A. K.; Larsen, E. H.; Berntssen, M. H. G.; Amlund, H. Arsenolipids in Marine Oils and Fats: A Review of Occurrence, Chemistry and Future Research Needs. *Food Chemistry*. August 1, 2012, pp 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.004>.
- (20) Francesconi, K. A. Arsenic Species in Seafood: Origin and Human Health Implications. *Pure and Applied Chemistry* **2010**, 82 (2), 373–381. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-07-01>.
- (21) Stryer, L. *Biochemistry*, 4th ed.; Freeman and Company: New York, 1995.
- (22) Taleshi, M. S.; Jensen, K. B.; Raber, G.; Edmonds, J. S.; Gunnlaugsdottir, H.; Francesconi, K. A. Arsenic-Containing Hydrocarbons: Natural Compounds in Oil from

- the Fish Capelin, *Mallotus Villosus*. *Chemical Communications* **2008**, No. 39, 4706–4707. <https://doi.org/10.1039/b808049f>.
- (23) Edmonds, J. S.; Shibata, Y.; Francesconi, K. A.; Yoshinaga, J.; Morita, M. *Arsenic Lipids in the Digestive Gland of the Western Rock Lobster *Panulirus Cygnus*: An Investigation by HPLC ICP-MS*; 1992; Vol. 122.
- (24) Vassilopoulou, V.; Papaconstantinou, C. *Feeding Habits of Red Mullet (*Mullus Barbatius*) in a Gulf in Western Greece*; 1993; Vol. 16.
- (25) Machias, A.; Labropoulou, M. Intra-Specific Variation in Resource Use by Red Mullet, *Mullus Barbatius*. *Estuar Coast Shelf Sci* **2002**, 55 (4), 565–578. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0924>.
- (26) Chérif, M.; Ben Amor, M. M.; Selmi, S.; Gharbi, H.; Missaoui, H.; Capapé, C. Food and Feeding Habits of the Red Mullet, *Mullus Barbatius* (Actinopterygii: Perciformes: Mullidae), off the Northern Tunisian Coast (Central Mediterranean). *Acta Ichthyol Piscat* **2011**, 41 (2), 109–116. <https://doi.org/10.3750/AIP2011.41.2.06>.
- (27) Tsikliras, A. C.; Antonopoulou, E.; Stergiou, K. I. Spawning Period of Mediterranean Marine Fishes. *Rev Fish Biol Fish* **2010**, 20 (4), 499–538. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9158-6>.
- (28) Di Lena, G.; Navigato, T.; Rampacci, M.; Casini, I.; Caproni, R.; Orban, E. Proximate Composition and Lipid Profile of Red Mullet (*Mullus Barbatius*) from Two Sites of the Tyrrhenian and Adriatic Seas (Italy): A Seasonal Differentiation. *Journal of Food Composition and Analysis* **2016**, 45, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.10.003>.
- (29) Šantić, M.; Paladin, A.; Rađa, B. *Feeding Habits of Common Pandora *Pagellus Erythrinus* (Sparidae) from Eastern Central Adriatic Sea*; 2011; Vol. 35.
- (30) Ali, M.; Smida, B.; Cafsi, M. El; Rafika, F. *Reproductive Cycle and Size at First Sexual Maturity of Common Pandora *Pagellus Erythrinus* (Sparidae) from the Bay of Monastir (Tunisia, Central Mediterranean)*; 2014. <https://www.researchgate.net/publication/292250466>.
- (31) Özogul, Y.; Özogul, F. Fatty Acid Profiles of Commercially Important Fish Species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chem* **2007**, 100 (4), 1634–1638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.047>.
- (32) Colloca, F.; Zoologica, S.; Dohrn, A.; Belluscio, A. *Feeding Habits of European Hake *Merluccius Merluccius* in the Central Mediterranean Sea*. <https://www.researchgate.net/publication/228513928>.
- (33) Kucuksezgin, F.; Gonul, L. T.; Tasel, D. Total and Inorganic Arsenic Levels in Some Marine Organisms from Izmir Bay (Eastern Aegean Sea): A Risk Assessment. *Chemosphere* **2014**, 112, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.071>.

- (34) Piñeiro, C.; Sainza, M. Age Estimation, Growth and Maturity of the European Hake (*Merluccius Merluccius* (Linnaeus, 1758)) from Iberian Atlantic Waters. *ICES Journal of Marine Science* **2003**, *60* (5), 1086–1102. [https://doi.org/10.1016/S1054-3139\(03\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S1054-3139(03)00086-9).
- (35) Philips, A. E. Feeding Behavior of the European Hake *Merluccius Merluccius* Linnaeus, 1758 (Family: Gadidae) from Egyptian Mediterranean Waters off Alexandria. *Egypt J Aquat Res* **2012**, *38* (1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.09.002>.
- (36) Quemener, L. *Growth of European Hake (Merluccius Merluccius) in the Gulf of Lions Based on Conventional Tagging*; 2010; Vol. 67. <http://icesjms.oxfordjournals.org/>.
- (37) Candela, M.; Astiasarén, I.; Bello, J. Effects on Frying and Warmholding on Fatty Acids and Cholesterol of Sole (*Solea Solea*), Codfish (*Gadus Morrhu*) and Hake (*Merluccius Merluccius*). *Food Chem* **1997**, *58* (3), 227–231.
- (38) Sánchez-Alonso, I.; Carmona, P.; Careche, M. Vibrational Spectroscopic Analysis of Hake (*Merluccius Merluccius* L.) Lipids during Frozen Storage. *Food Chem* **2012**, *132* (1), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.047>.
- (39) Basilone, G.; Patti, B.; Bonanno, A.; Cuttitta, A.; Basilone, G.; Patti, B.; Bonanno, A.; Cuttitta, A.; Vergara, A. R.; Garcia, A.; Mazzola, S.; Buscaino, G. *Reproductive Aspects of the European Anchovy (Engraulis Encrasicolus): Six Years of Observations in the Strait of Sicily*; 2004. <https://www.researchgate.net/publication/237336927>.
- (40) Jureša, D.; Blanuša, M. Mercury, Arsenic, Lead and Cadmium in Fish and Shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* **2003**, *20* (3), 241–246. <https://doi.org/10.1080/0265203021000055379>.
- (41) Storelli, M. M.; Marcotrigiano, G. O. Organic and Inorganic Arsenic and Lead in Fish from the South Adriatic Sea, Italy. *Food Addit Contam* **2000**, *17* (9), 763–768. <https://doi.org/10.1080/026520300415309>.
- (42) Zlatanov, S.; Laskaridis, K. Seasonal Variation in the Fatty Acid Composition of Three Mediterranean Fish - Sardine (*Sardina Pilchardus*), Anchovy (*Engraulis Encrasicolus*) and Picarel (*Spicara Smaris*). *Food Chem* **2007**, *103* (3), 725–728. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.013>.
- (43) Christie, W. W. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Methods for Structural Analysis of Fatty Acids. *Lipids* **1998**, *33* (4), 343–353.
- (44) Duffin, K. L.; Henion, J. D.; Shieh, J. J. *Electrospray and Tandem Mass Spectrometric of Acylglycerol Mixtures That Are Dissolved in Solvents Characterization Nonpolar*; 1991; Vol. 83.



- (45) Yang, K.; Han, X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd November 1, 2016, pp 954–969. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.010>.
- (46) Holčápek, M.; Lisa, M.; Jandera, P.; Kabátová, N. Quantitation of Triacylglycerols in Plant Oils Using HPLC with APCI-MS, Evaporative Light-Scattering, and UV Detection. *J Sep Sci* **2005**, 28 (12), 1315–1333. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500088>.
- (47) Avelano, M. I.; VanRollins, M.; Horrocks, L. A. Separation and Quantitation of Free Fatty Acids and Fatty Acid Methyl Esters by Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *J Lipid Res* **1983**, 24 (1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)38027-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)38027-5).
- (48) Harvey, D. A General Description of Chromatography. In *Instrumental Analysis (LibreTexts)*.
- (49) Byrdwell, W. C.; Emken, E. A.; Neff, W. E.; Adlof, R. O. Quantitative Analysis of Triglycerides Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Lipids* **1996**, 31 (9), 919–935.
- (50) Byrdwell, W. C. Atmospheric Pressure Chemical Ionization Spectrometry for Analysis of Lipids. *Lipids* **2001**, 36 (4), 327–346.
- (51) Laakso, P. Mass Spectrometry of Triacylglycerols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104, 43–49.
- (52) Thomson J., J. *Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analyses*, 2nd ed.; Longmans, Green and CO.: London, 1921.
- (53) Evans, E. H. *ATOMIC MASS SPECTROMETRY Inductively Coupled Plasma*.
- (54) Zubarev, R. A.; Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2013**, 85 (11), 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>.
- (55) Smith, R. W. Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition*; Elsevier Inc., 2013; pp 603–608. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00250-6>.
- (56) Schermann Jean-Pierre. *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks*; Elsevier B.V., 2008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52708-0.X5001-1>.
- (57) Rajawat, J.; Jhingan, G. Mass Spectroscopy. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*; Elsevier, 2019; pp 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00001-0>.
- (58) Römpf, A.; Spengler, B. Mass Spectrometry Imaging with High Resolution in Mass and Space. *Histochemistry and Cell Biology*. June 2013, pp 759–783. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1097-6>.

- (59) Thomas, S. N. Mass Spectrometry. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*; Elsevier, 2019; pp 171–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7>.
- (60) Makarov, A.; Denisov, E.; Lange, O. Performance Evaluation of a High-Field Orbitrap Mass Analyzer. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20* (8), 1391–1396. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.01.005>.
- (61) Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; Holler, F. J. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed.; Thomson Brooks/Cole: Belmont, 2007.
- (62) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, *2012*, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- (63) Geiger, T.; Cox, J.; Mann, M. Proteomics on an Orbitrap Benchtop Mass Spectrometer Using All-Ion Fragmentation. *Molecular and Cellular Proteomics* **2010**, *9* (10), 2252–2261. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.001537>.
- (64) Makarov, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal Chem* **2000**, *72* (6), 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- (65) Savaryn, J. P.; Toby, T. K.; Kelleher, N. L. A Researcher's Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteomics* **2016**, *16* (18), 2435–2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600113>.
- (66) Olsen, J. V.; de Godoy, L. M. F.; Li, G.; Macek, B.; Mortensen, P.; Pesch, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S.; Mann, M. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-Trap. *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, *4* (12), 2010–2021. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200>.
- (67) de Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 3rd ed.; John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- (68) Tanner, S. D.; Baranov, V. I.; Bandura, D. R. Reaction Cells and Collision Cells for ICP-MS: A Tutorial Review. *Spectrochimica Acta Part B* **2002**, *57*, 1361–1452.
- (69) Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E. Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion Source for Mass Spectrometric Determination of Trace Elements. *Anal Chem* **1980**, *52* (14), 2283–2289.
- (70) Broekaert, J. A. C. Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **1992**, *21* (6), 327–328.
- (71) Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2013.

- (72) *Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS*; Vanhaecke, F., Degryse, R., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- (73) Mellon, F. A. *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation*; Elsevier Science Ltd., 2003.
- (74) Östman, M. *Antimicrobials in Sewage Treatment Plants*. Dissertation for PhD, Umea, 2018. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30958.87367>.
- (75) Reemtsma, T.; Piechotta, C. Synthesis of Two New Arsenolipids and Their Identification in Fish. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, *118*, 445–452. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400502>.
- (76) Stiboller, M.; Freitas, F. P.; Francesconi, K. A.; Schwerdtle, T.; Nogueira, A. J. A.; Raber, G. Lipid-Soluble Arsenic Species Identified in the Brain of the Marine Fish Skipjack Tuna (*Katsuwonus Pelamis*) Using a Sequential Extraction and HPLC/Mass Spectrometry. *J Anal At Spectrom* **2019**, *34* (12), 2440–2450. <https://doi.org/10.1039/c9ja00249a>.
- (77) Zachariadis, G. A.; Stratis, J. A.; Kaniou, I.; Kalligas, G. Critical Comparison of Wet and Dry Digestion Procedures for Trace Metal Analysis of Meat and Fish Tissues. *Mikrochim Acta* **1995**, *119* (3–4), 191–198. <https://doi.org/10.1007/BF01243998>.
- (78) Amayo, K. O.; Raab, A.; Krupp, E. M.; Marschall, T.; Horsfall, M.; Feldmann, J. Arsenolipids Show Different Profiles in Muscle Tissues of Four Commercial Fish Species. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2014**, *28* (2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.11.004>.
- (79) Ashoka, S.; Peake, B. M.; Bremner, G.; Hageman, K. J.; Reid, M. R. Comparison of Digestion Methods for ICP-MS Determination of Trace Elements in Fish Tissues. *Anal Chim Acta* **2009**, *653* (2), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.025>.
- (80) Chapter 5 Microwave-Assisted Solid Sample Treatment. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Elsevier, 2002; Vol. 24, pp 179–232. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(02\)80007-5](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(02)80007-5).
- (81) Amayo, K. O.; Raab, A.; Krupp, E. M.; Gunnlaugsdottir, H.; Feldmann, J. Novel Identification of Arsenolipids Using Chemical Derivatizations in Conjunction with RP-HPLC-ICPMS/ESMS. *Anal Chem* **2013**, *85* (19), 9321–9327. <https://doi.org/10.1021/ac4020935>.
- (82) Indrayanto, G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Academic Press Inc., 2018; Vol. 43, pp 359–392. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.01.003>.
- (83) Sardenne, F.; Millot, R.; Bessis, E.; Puccinelli, E.; Bideau, A.; Le Grand, F.; Durieux, É. D. H.; Soudant, P. Changes in Lipid and Fatty Acid Contents of Gonad during the

- Reproductive Cycle of the Mediterranean Swordfish *Xiphias Gladius*. *Mar Environ Res* **2022**, *179*. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105668>.
- (84) Ladisa, C. *UNIVERSITY OF CALGARY Seasonally Related Metabolic Profile and Regulation during Growth and Reproduction in Goldfish*; 2022.
- (85) Saoudi, H.; Saoudi, A.; Mimar, C. E.; Aoun, L. *Analysis of Hermaphroditism in Pagellus Erythrinus (Linnaeus, 1758) Fished in the Gulf of Annaba, Algeria, Mediterranean Sea*; 2017; Vol. 10. <http://www.bioflux.com.ro/aacl>.
- (86) Mahdi, A.; Talet, B. Reproductive Biology of the Common Pandora *Pagellus Erythrinus (Linnaeus, 1758)* of Oran Bay (Algerian West Coasts). *Turk J Fish Aquat Sci* **2018**, *18*, 1–7. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v1>.
- (87) Craig, S. R.; MacKenzie, D. S.; Jones, G.; Gatlin III, D. M. *Seasonal Changes in the Reproductive Condition and Body Composition of Free-Ranging Red Drum, Sciaenops Ocellatus*; 2000; Vol. 190. [www.elsevier.nl/locate/aqua-online](http://www.elsevier.nl/locate/aqua-online).
- (88) Saborido-Rey, F.; Kjesbu, O. S. *Growth and Maturation Dynamics*; 2005. <http://hdl.handle.net/10261/47150>.
- (89) Reading, B. J.; Sullivan, C. V. The Reproductive Organs and Processes | Vitellogenesis in Fishes. In *Encyclopedia of Fish Physiology*; Elsevier Inc., 2011; Vol. 1, pp 635–646. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00257-4>.
- (90) Taylor, V.; Goodale, B.; Raab, A.; Schwerdtle, T.; Reimer, K.; Conklin, S.; Karagas, M. R.; Francesconi, K. A. Human Exposure to Organic Arsenic Species from Seafood. *Science of the Total Environment* **2017**, *580*, 266–282. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.113>.
- (91) García-de-Vinuesa, A.; Demestre, M.; Lloret, J. Fatty Acids as Trophic Markers and Indicators of the Quality of Benthic Habitats: The Example of Maerl and Crinoid Beds in the Northwestern Mediterranean. *J Sea Res* **2022**, *187*. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2022.102254>.
- (92) Salvaggio, A.; Pecoraro, R.; Copat, C.; Ferrante, M.; Grasso, A.; Scalisi, E. M.; Ignoto, S.; Bonaccorsi, V. S.; Messina, G.; Lombardo, B. M.; Tiralongo, F.; Brundo, M. V. Bioaccumulation of Metals/Metalloids and Histological and Immunohistochemical Changes in the Tissue of the European Hake, *Merluccius Merluccius (Linnaeus, 1758)* (Pisces: Gadiformes: Merlucciidae), for Environmental Pollution Assessment. *J Mar Sci Eng* **2020**, *8* (9). <https://doi.org/10.3390/jmse8090712>.



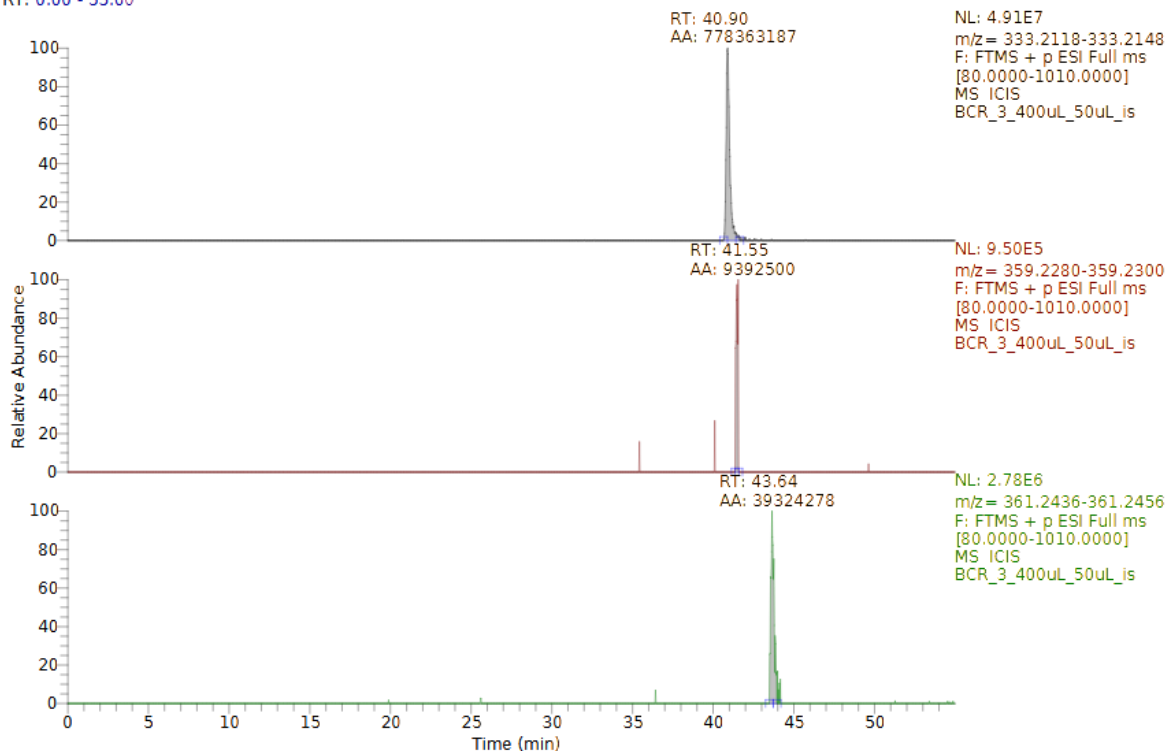
## 7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## 7.1 Χρωματογράφημα για το υλικό αναφοράς BCR-627

C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

11/15/23 12:01:04

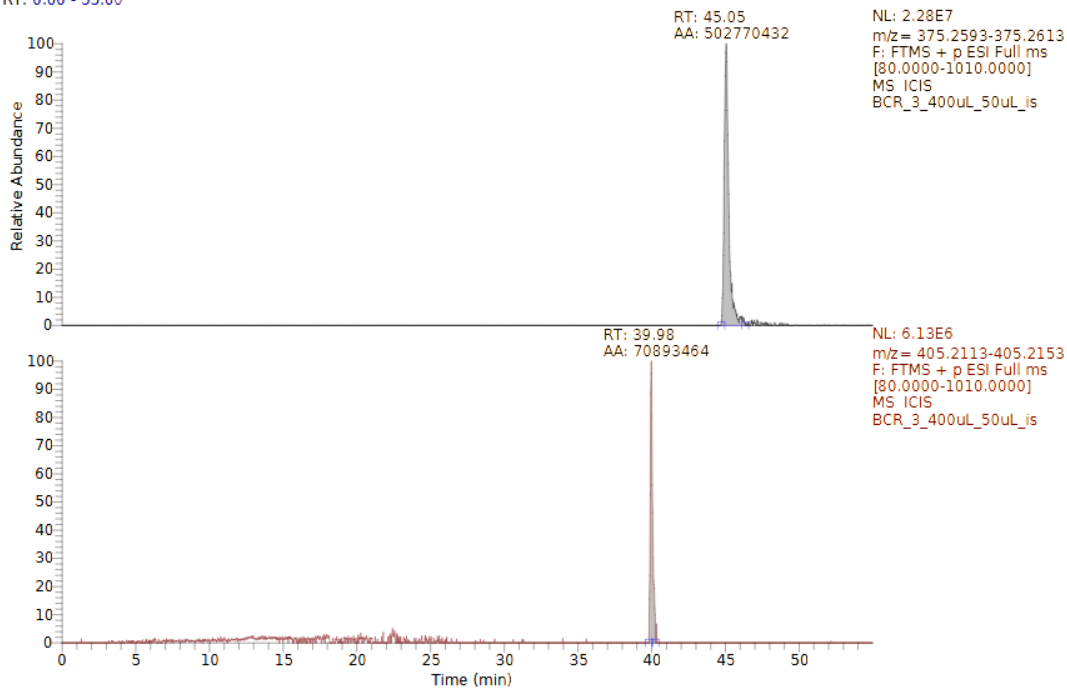
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

11/15/23 12:01:04

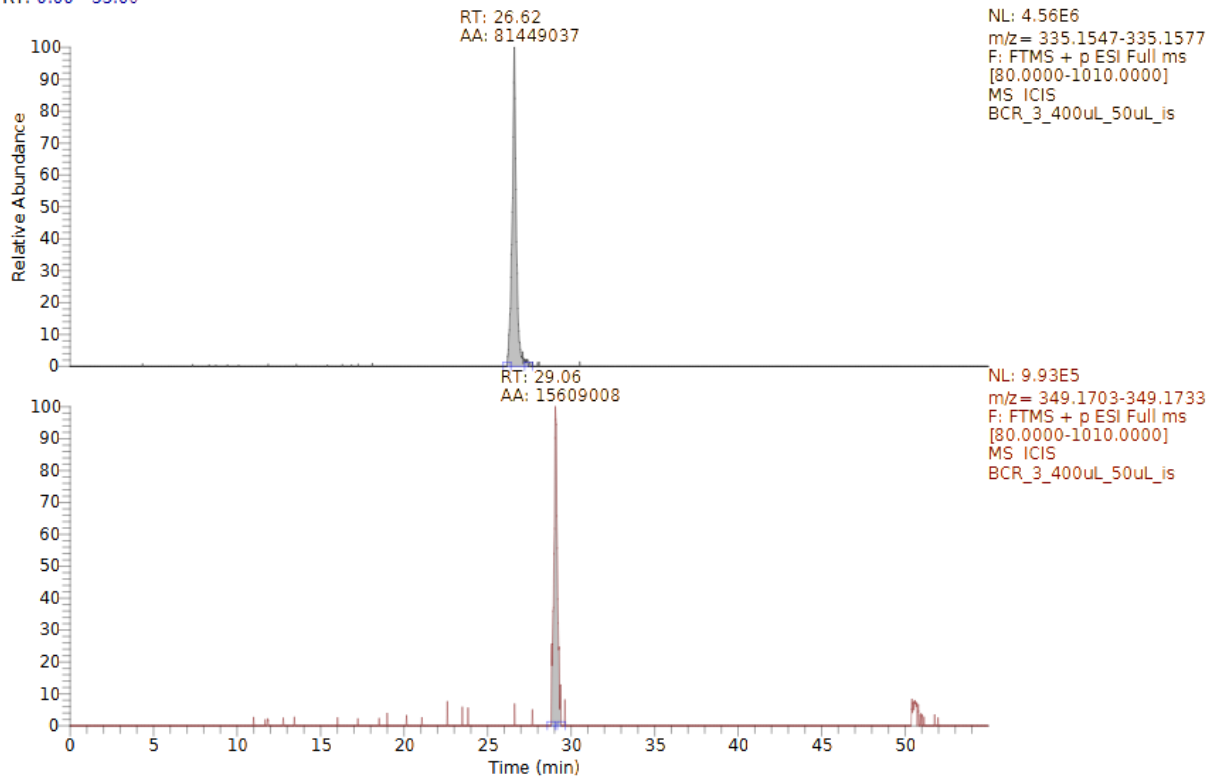
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

11/15/23 12:01:04

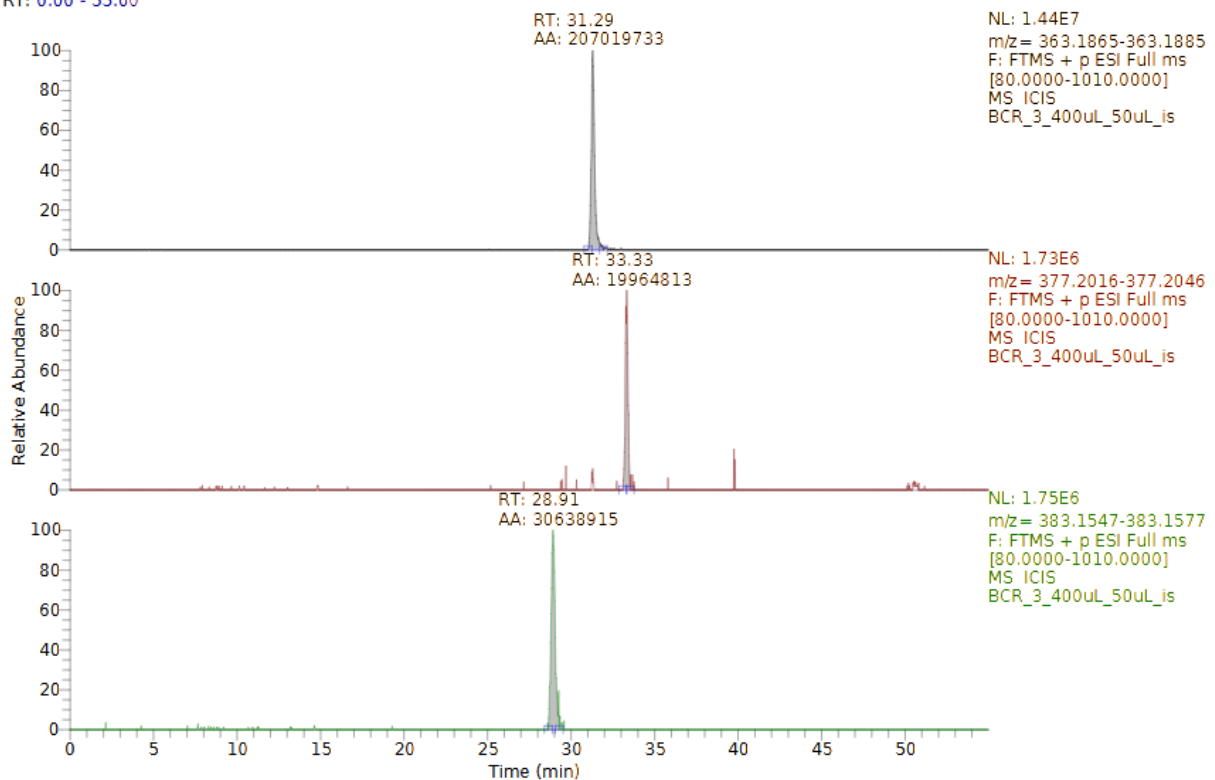
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

11/15/23 12:01:04

RT: 0.00 - 55.00

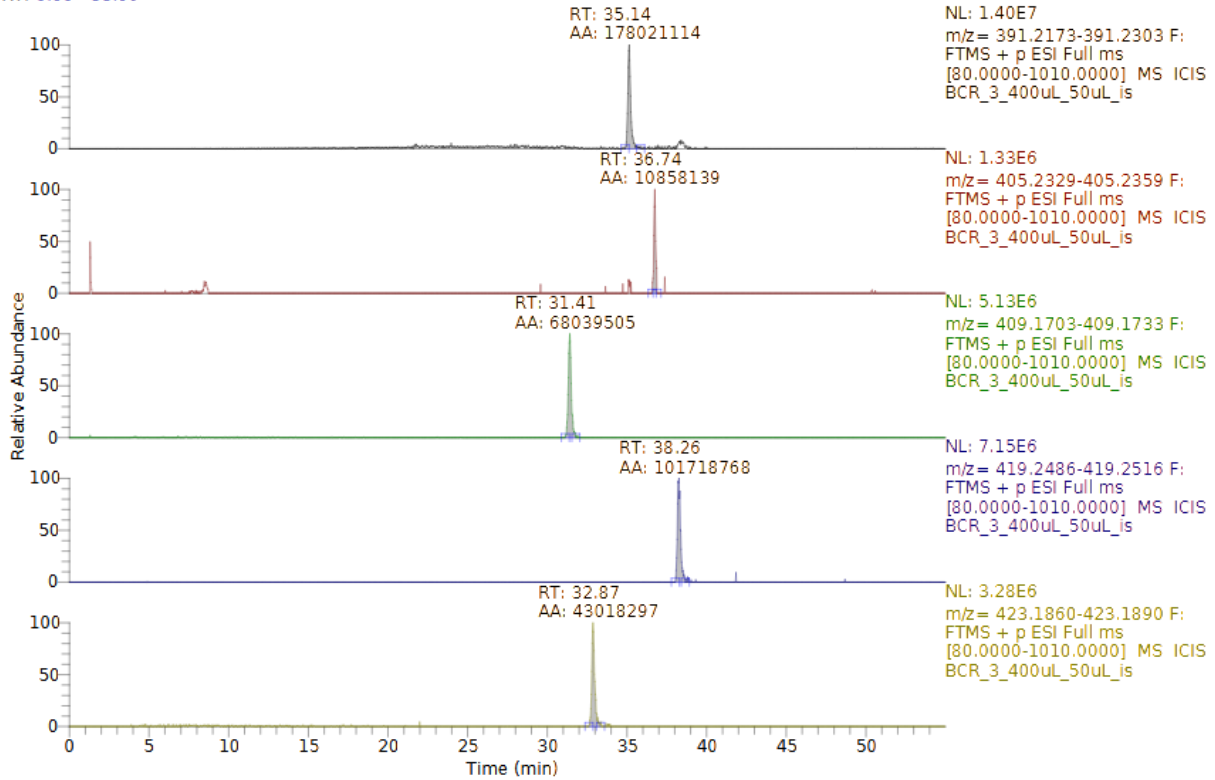




C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

11/15/23 12:01:04

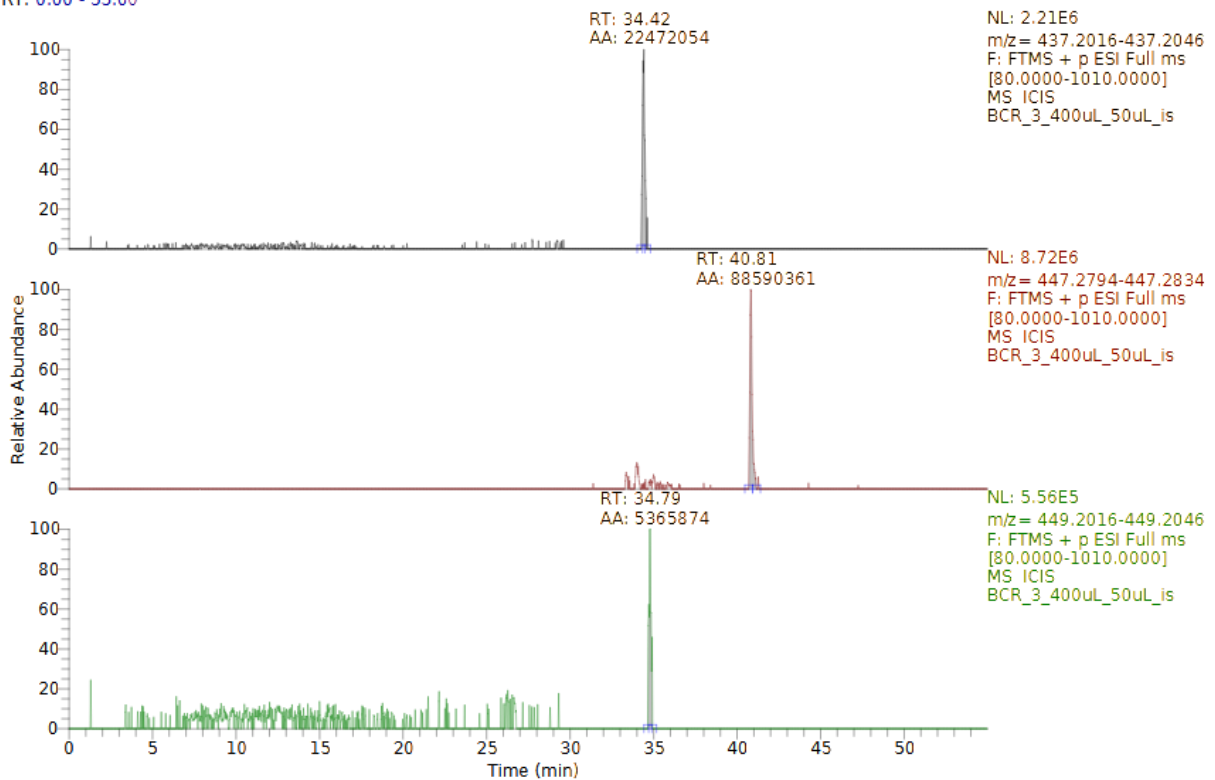
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

11/15/23 12:01:04

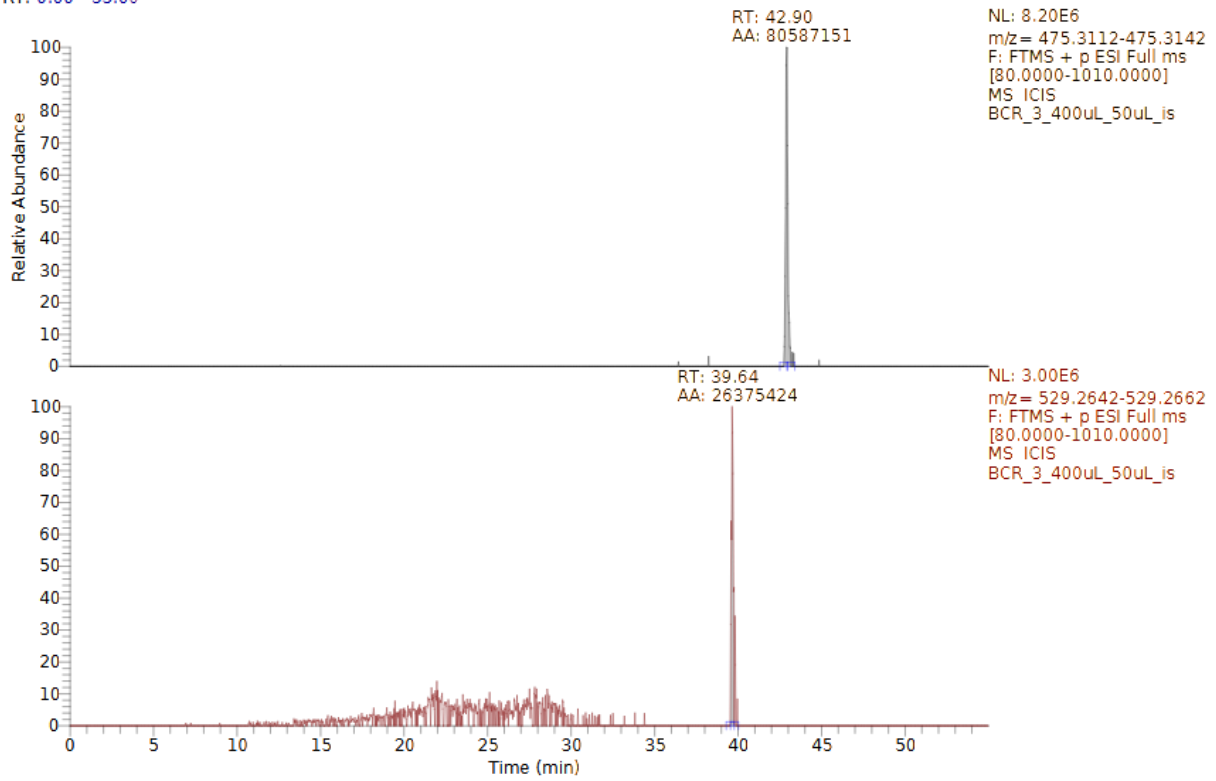
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...\BCR\_3\_400uL\_50uL\_is

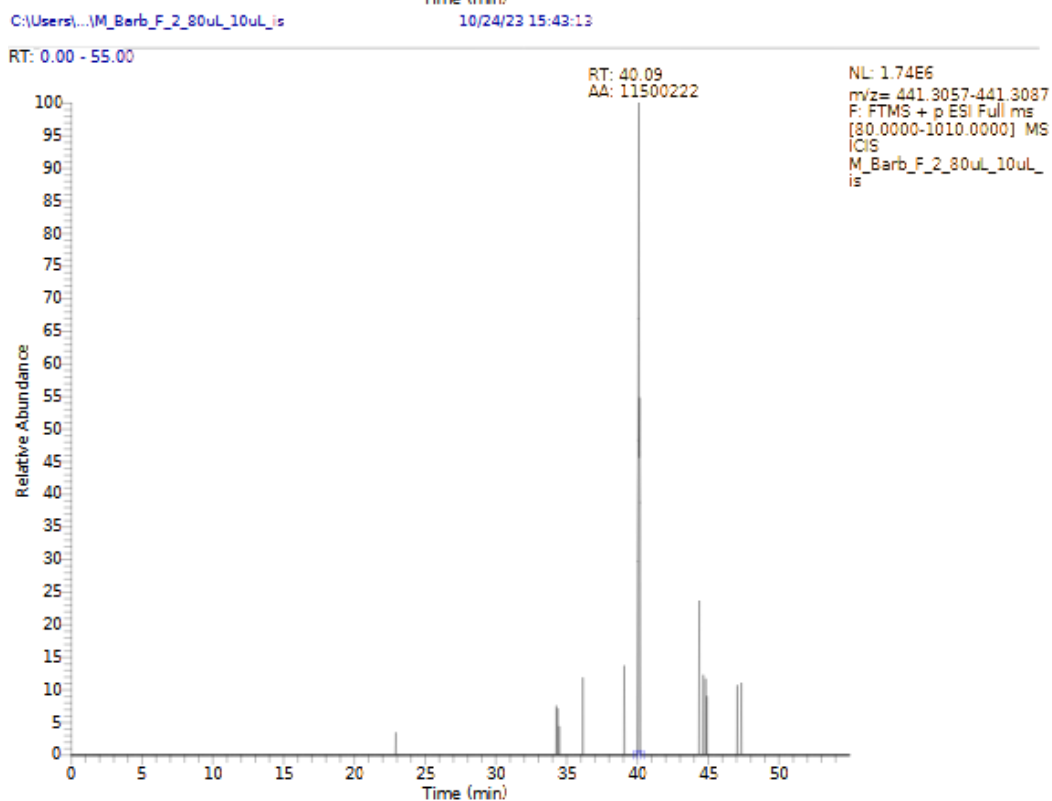
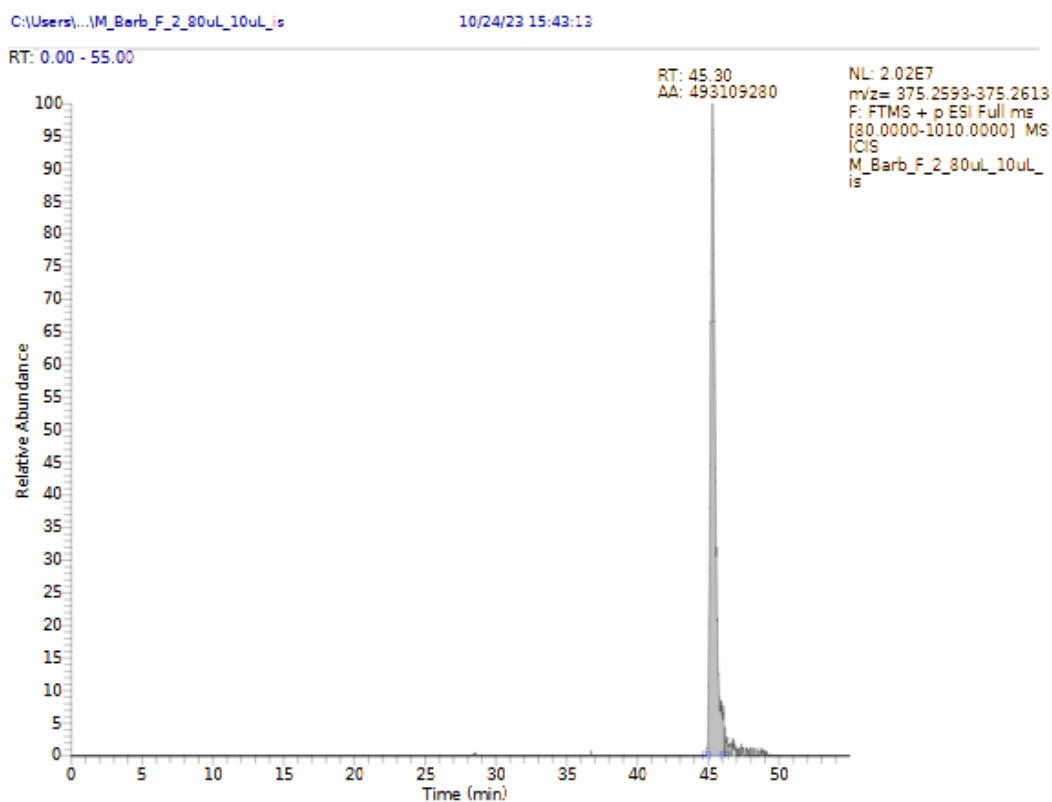
11/15/23 12:01:04

RT: 0.00 - 55.00



## 7.2 Χρωματογράφημα για την κουτσομούρα

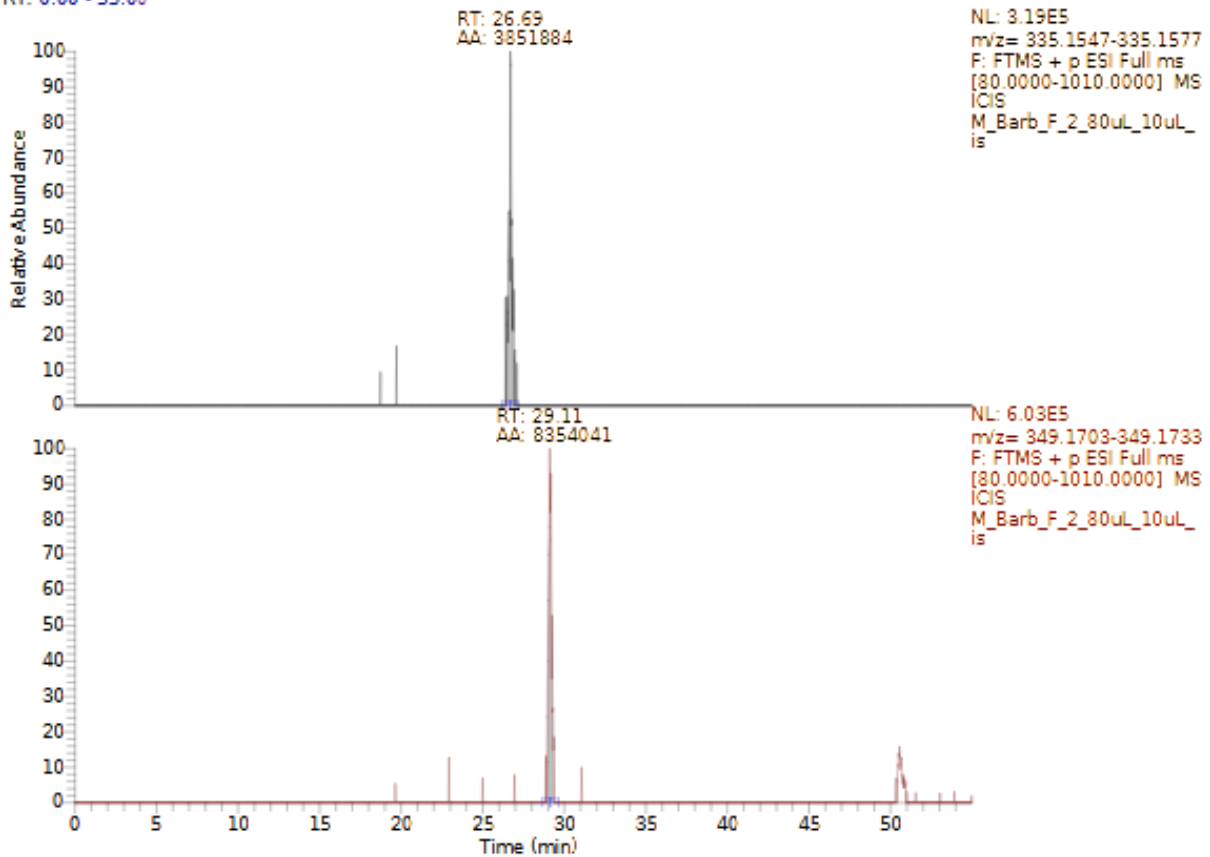
### Θηλυκή κουτσομούρα F-2



C:\Users\...M\_Barb\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

10/24/23 15:43:13

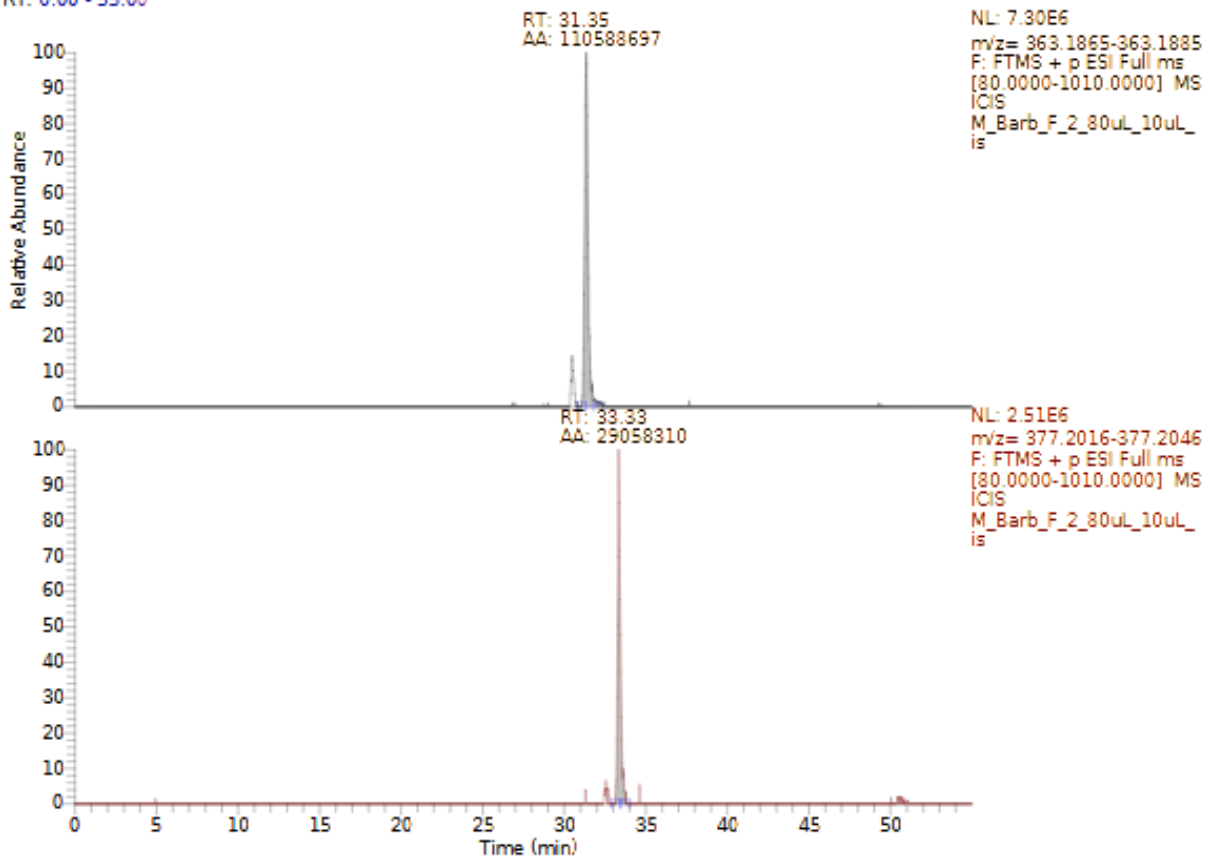
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Barb\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

10/24/23 15:43:13

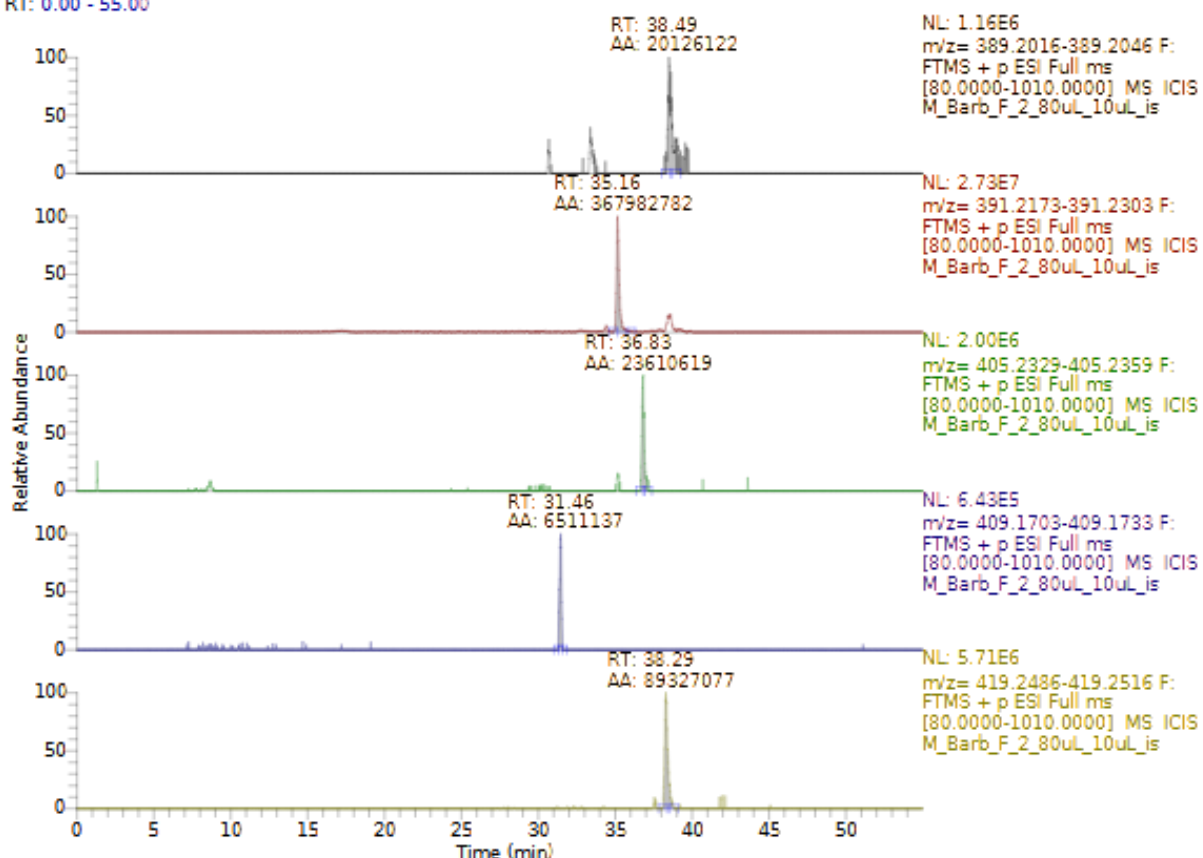
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Barb\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

10/24/23 15:43:13

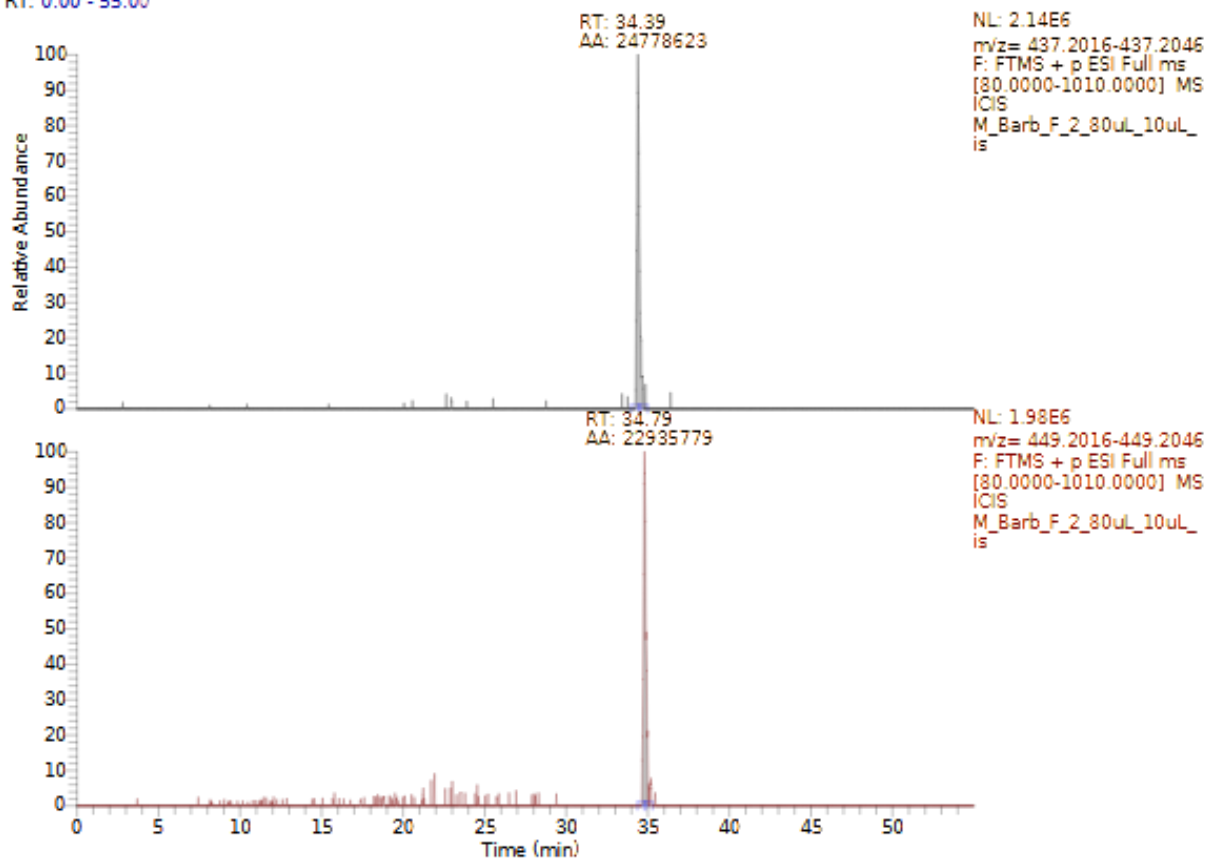
RT: 0.00 - 55.00

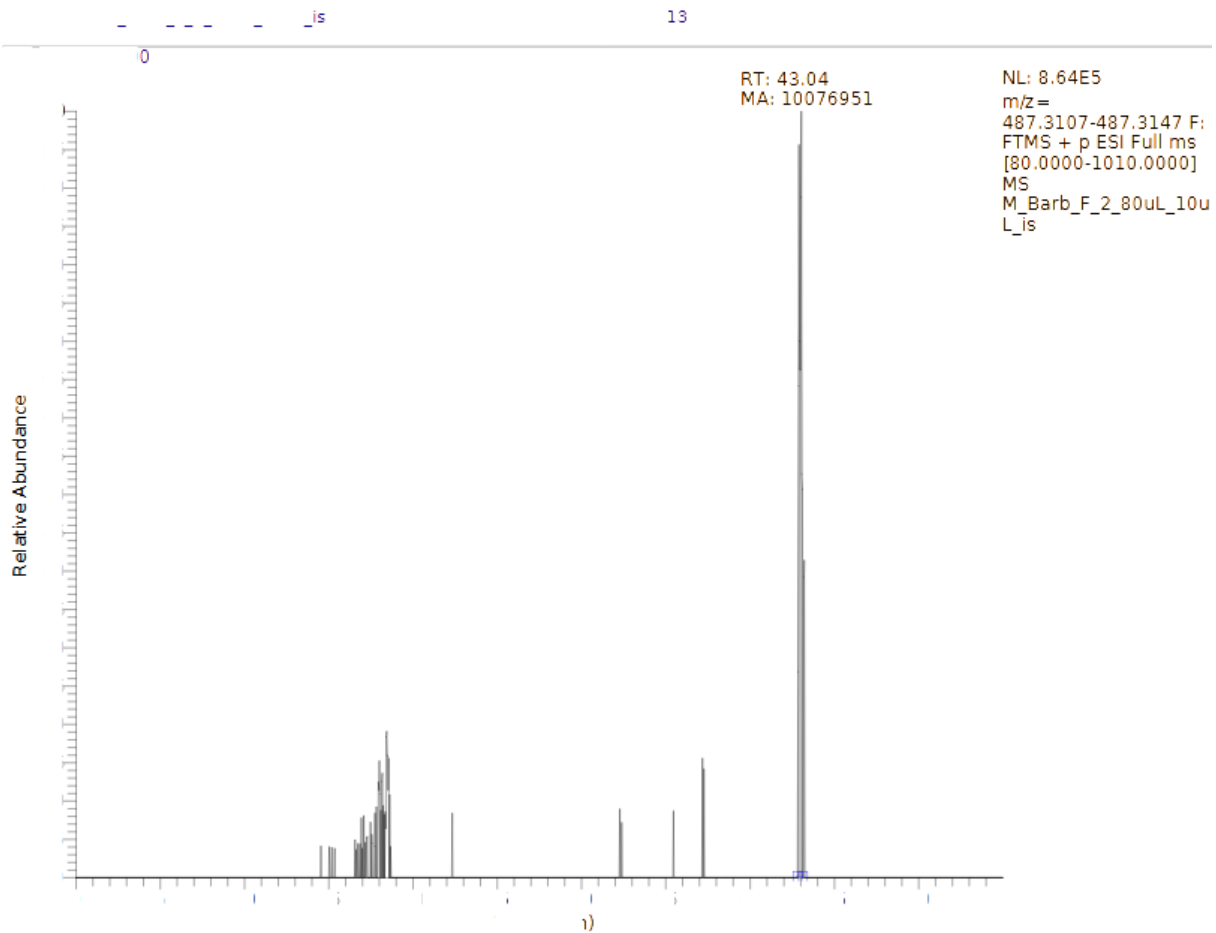


C:\Users\...M\_Barb\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

10/24/23 15:43:13

RT: 0.00 - 55.00



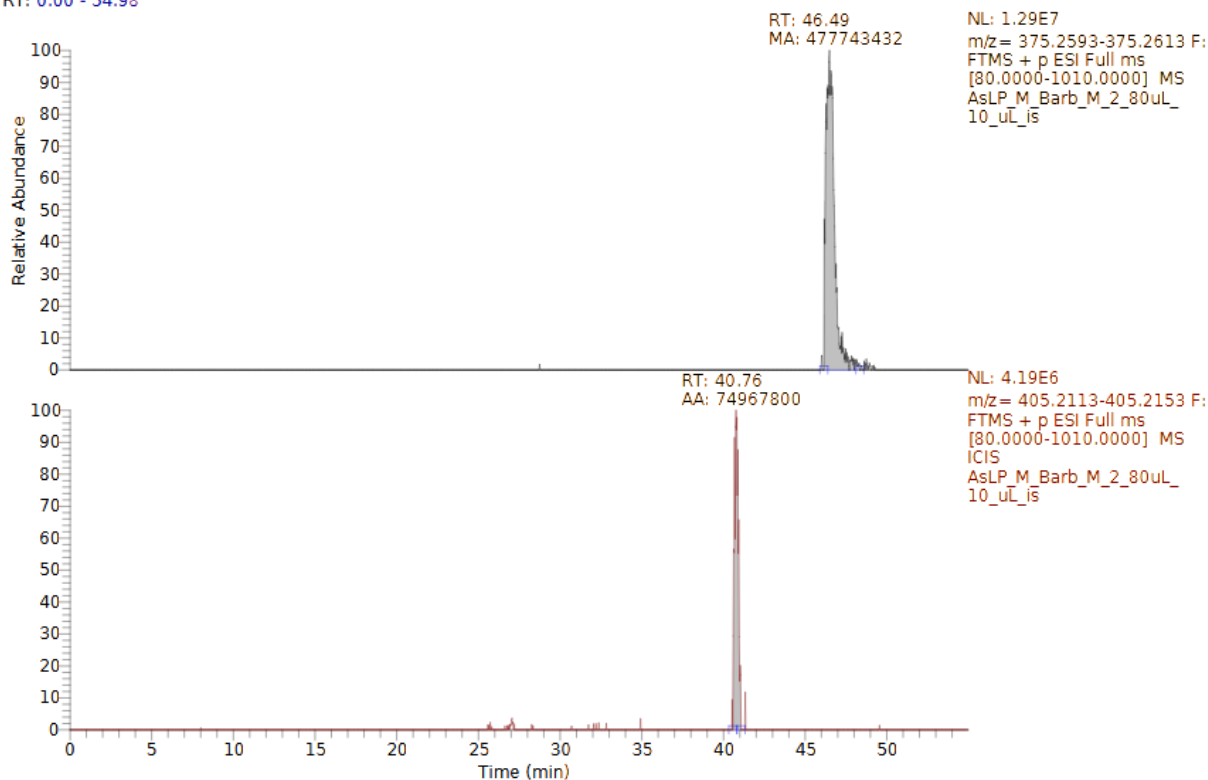


## Αρσενική κουτσομούρα Μ-2

AsLP\_M\_Barb\_M\_2\_80uL\_10\_uL\_is

10/25/23 17:01:38

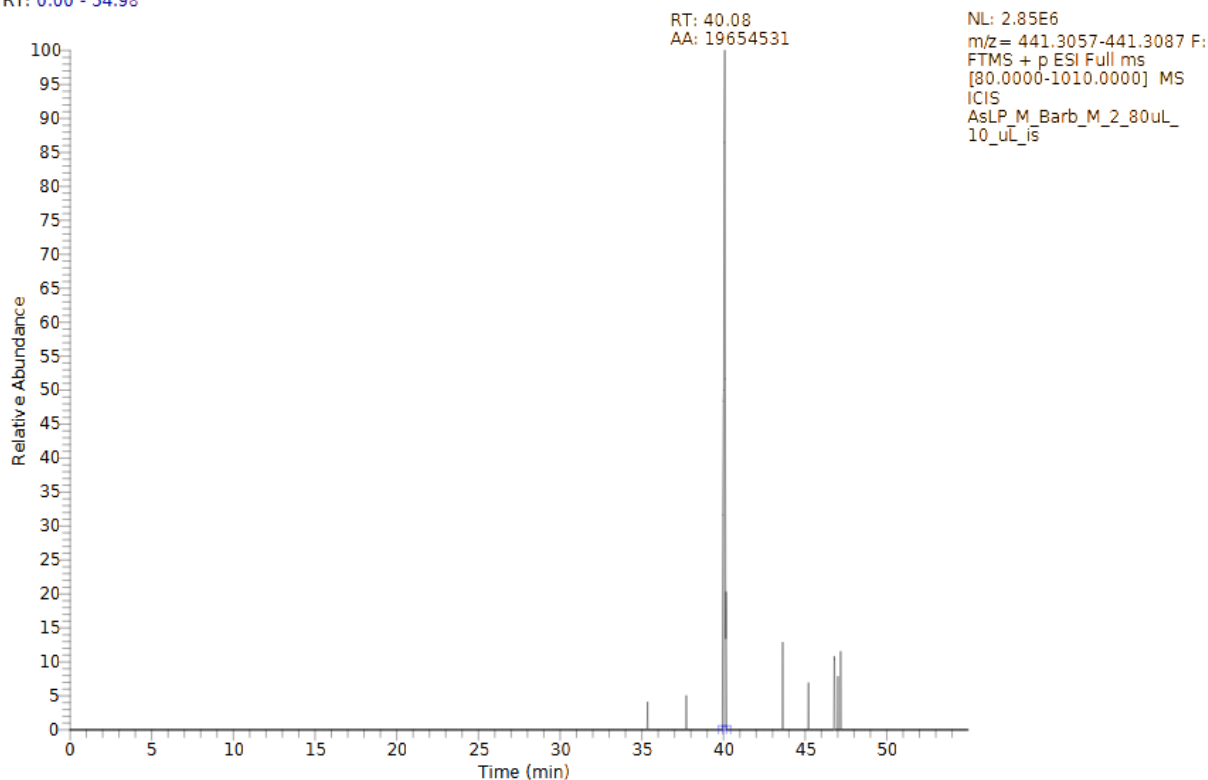
RT: 0.00 - 54.98



AsLP\_M\_Barb\_M\_2\_80uL\_10\_uL\_is

10/25/23 17:01:38

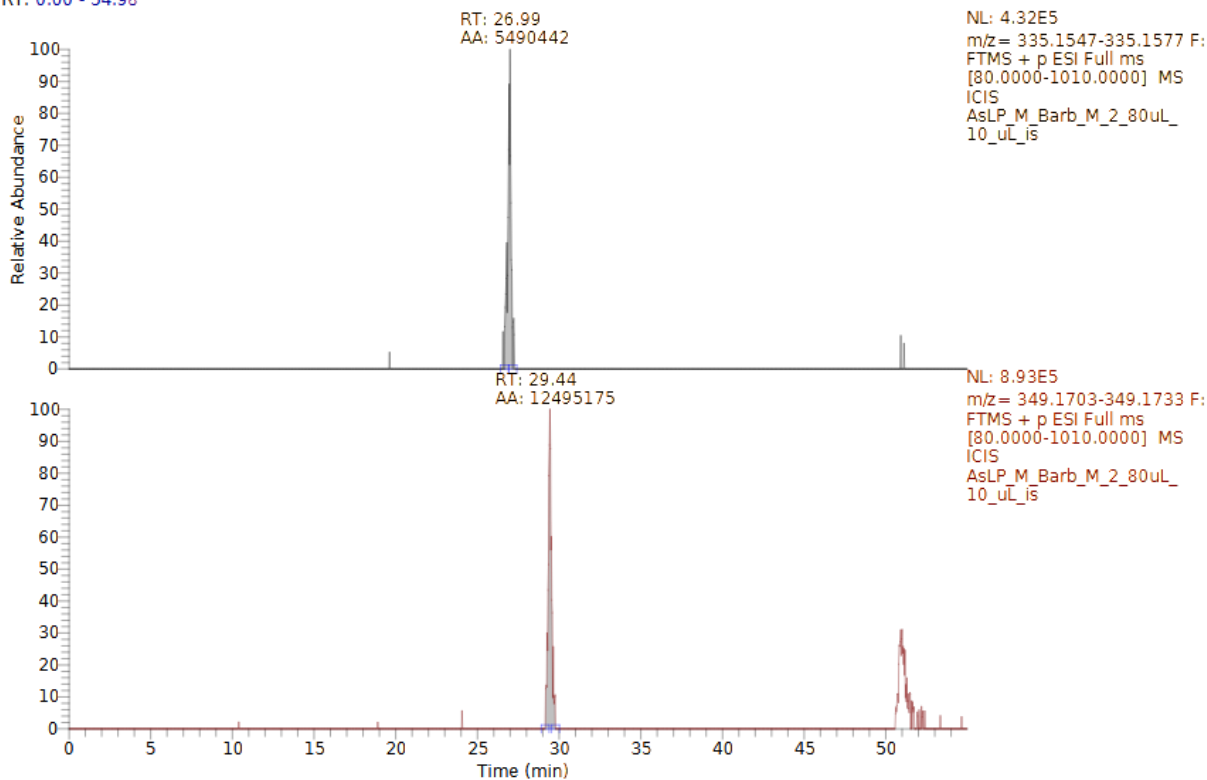
RT: 0.00 - 54.98



AsLP\_M\_Barb\_M\_2\_80uL\_10\_uL\_is

10/25/23 17:01:38

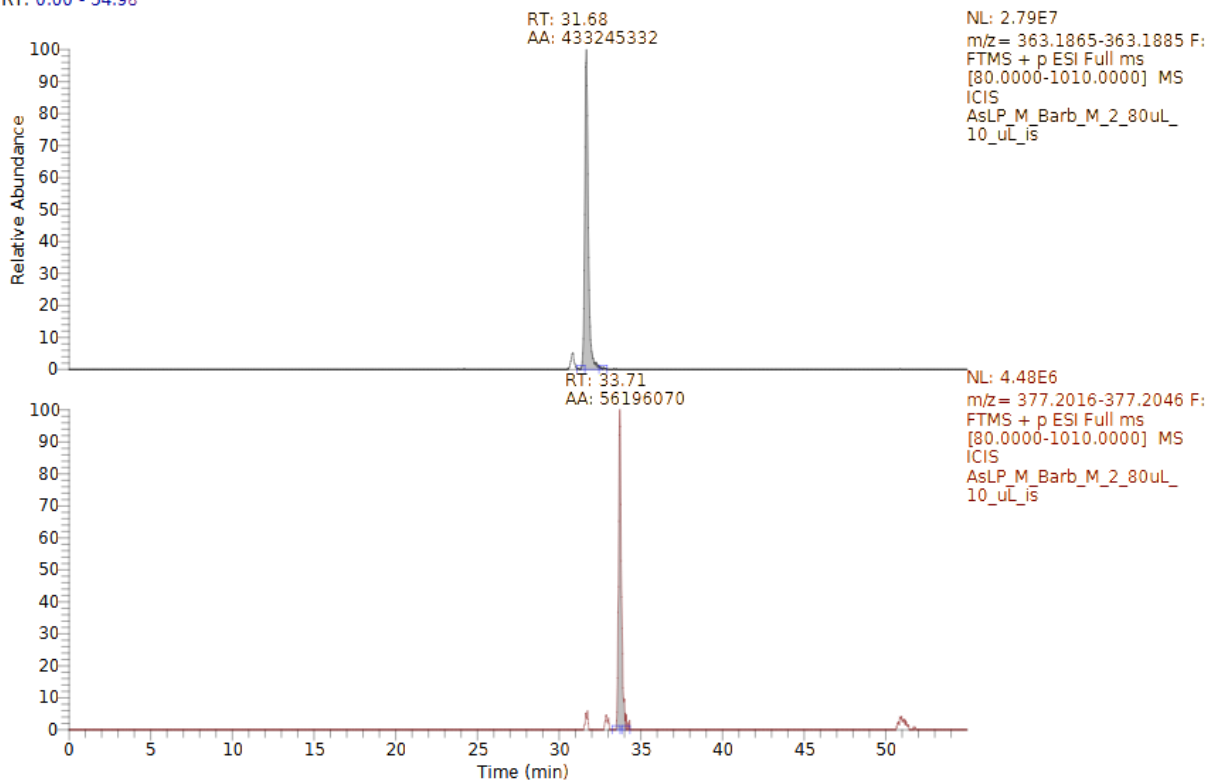
RT: 0.00 - 54.98



AsLP\_M\_Barb\_M\_2\_80uL\_10\_uL\_is

10/25/23 17:01:38

RT: 0.00 - 54.98

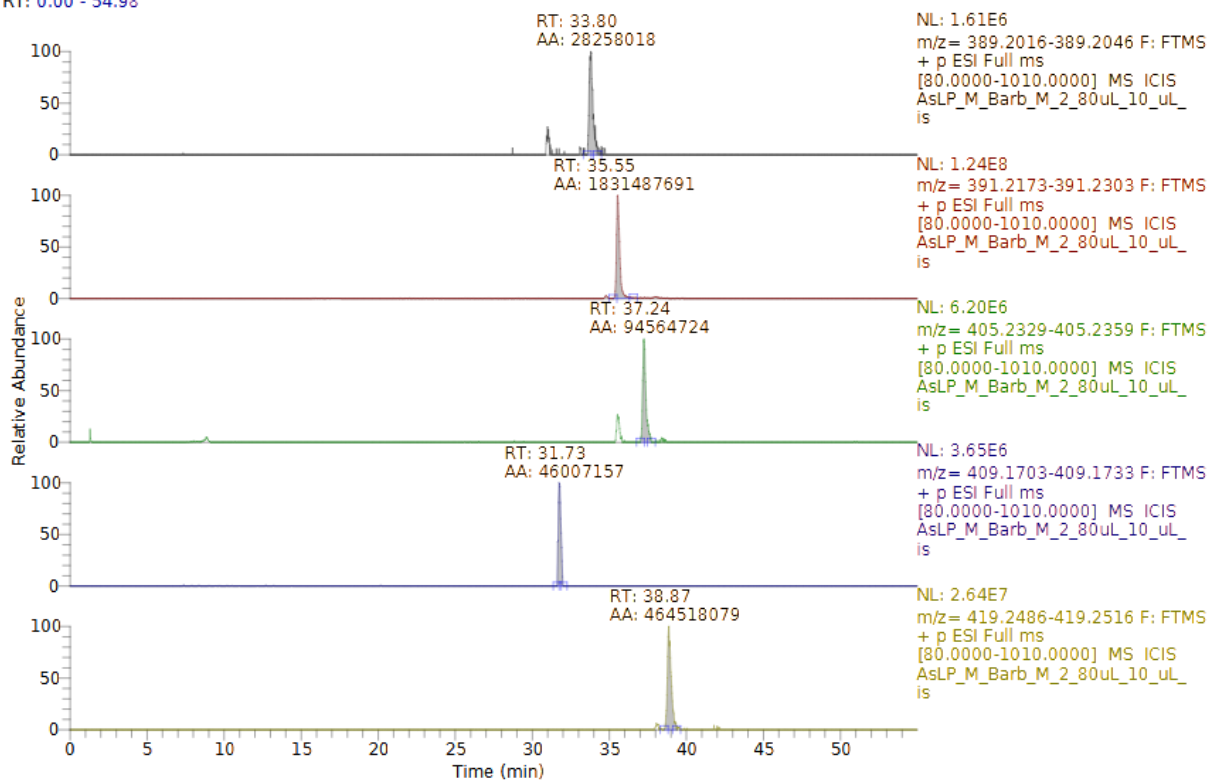




AsLP\_M\_Barb\_M\_2\_80uL\_10\_uL\_is

10/25/23 17:01:38

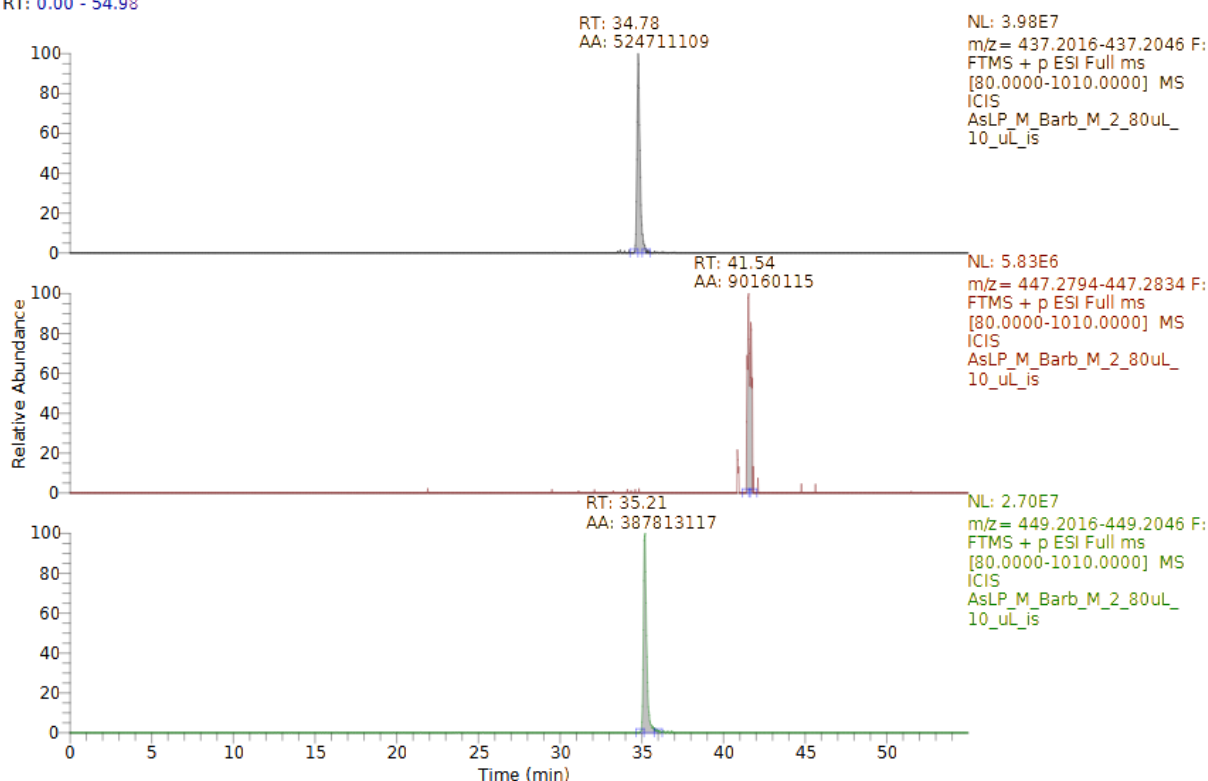
RT: 0.00 - 54.98



AsLP\_M\_Barb\_M\_2\_80uL\_10\_uL\_is

10/25/23 17:01:38

RT: 0.00 - 54.98



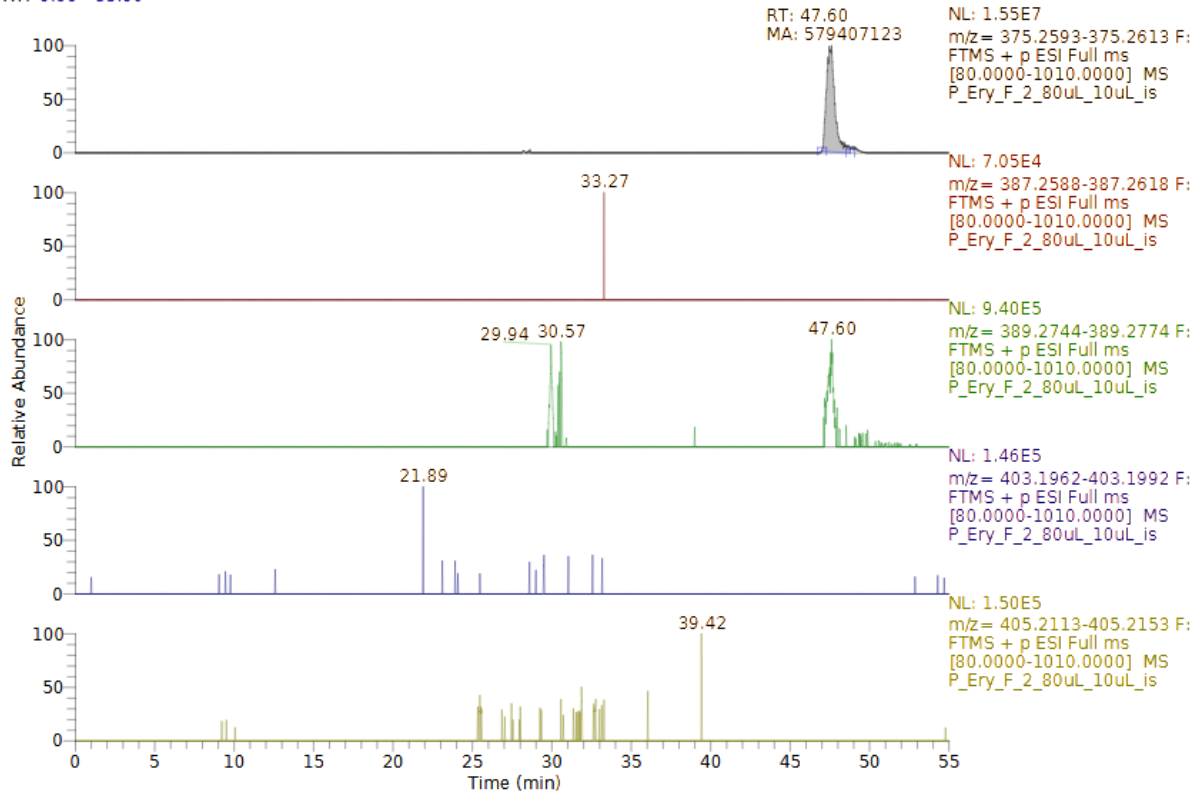
## 7.3 Χρωματογράφημα για το λυθρίνι

### Θηλυκό λυθρίνι F-2

P\_Ery\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

11/10/23 11:54:33

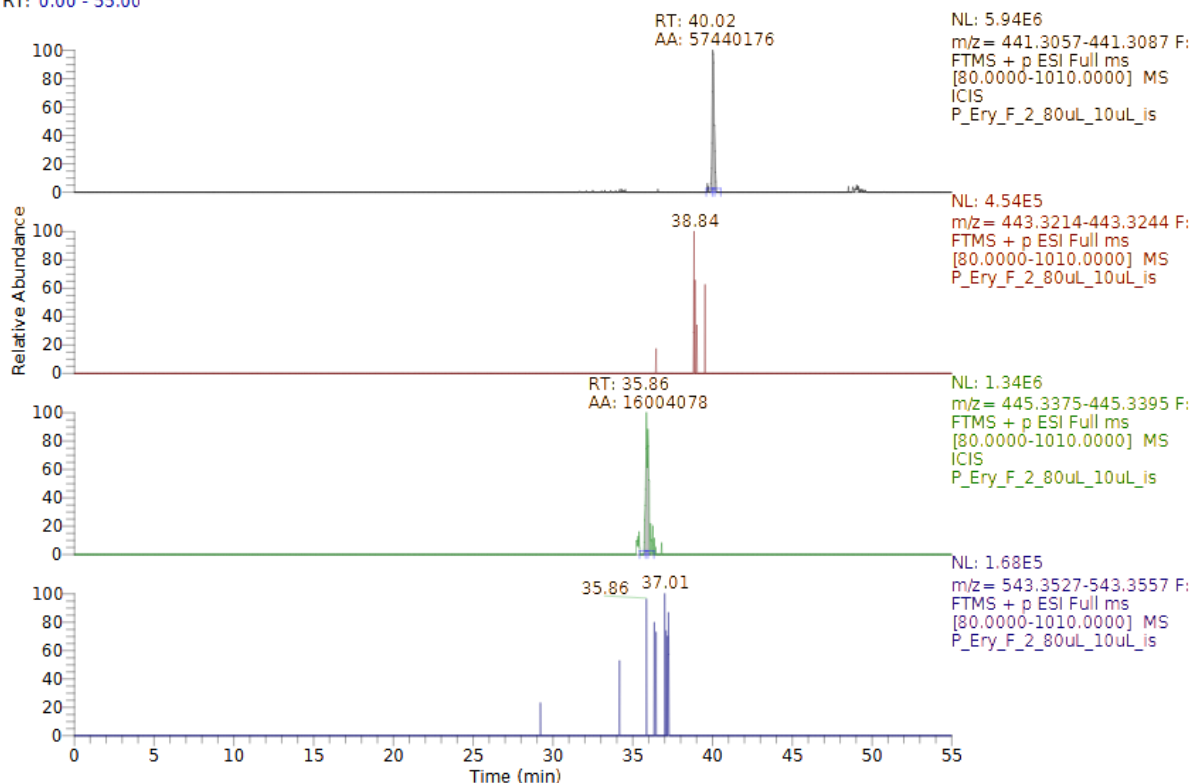
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

11/10/23 11:54:33

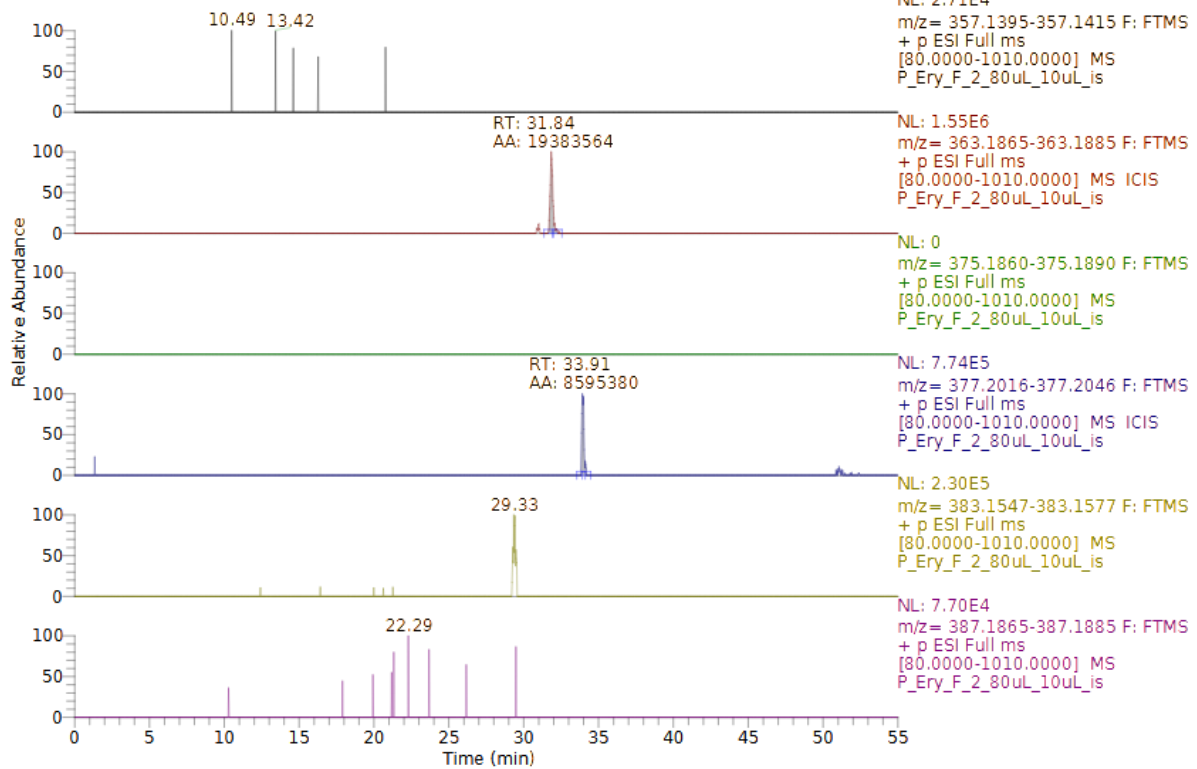
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

11/10/23 11:54:33

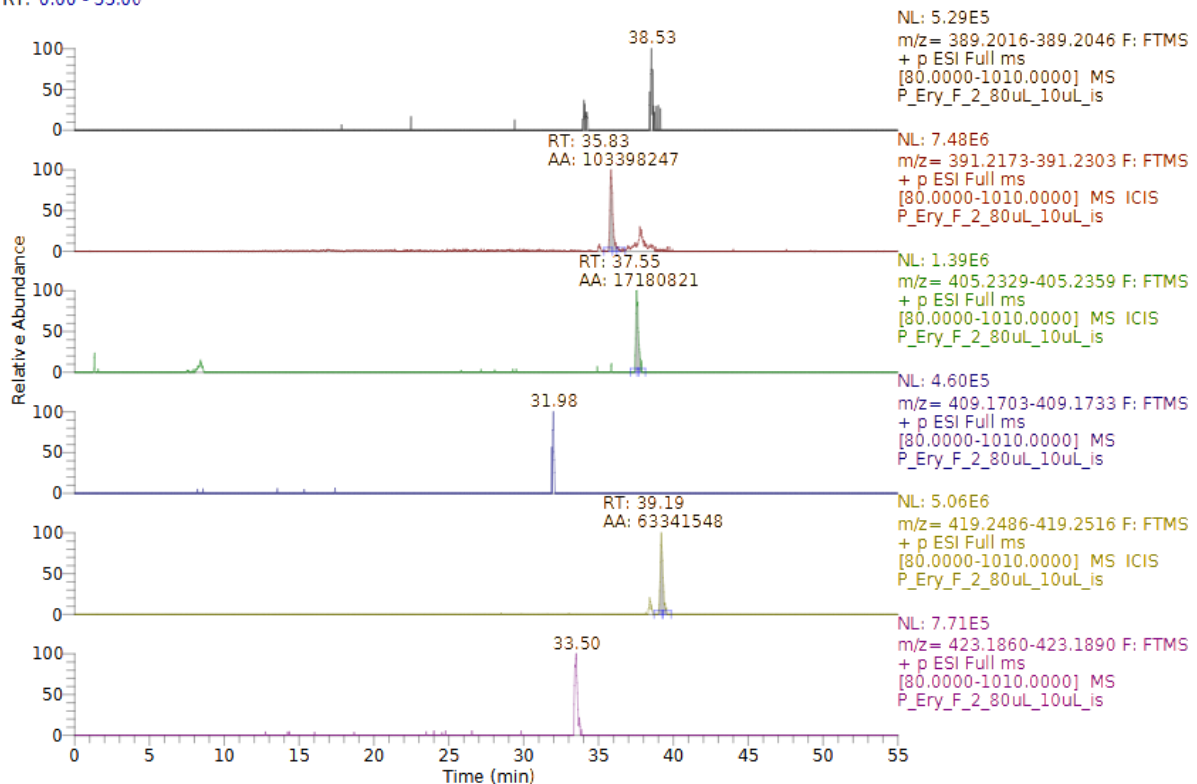
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

11/10/23 11:54:33

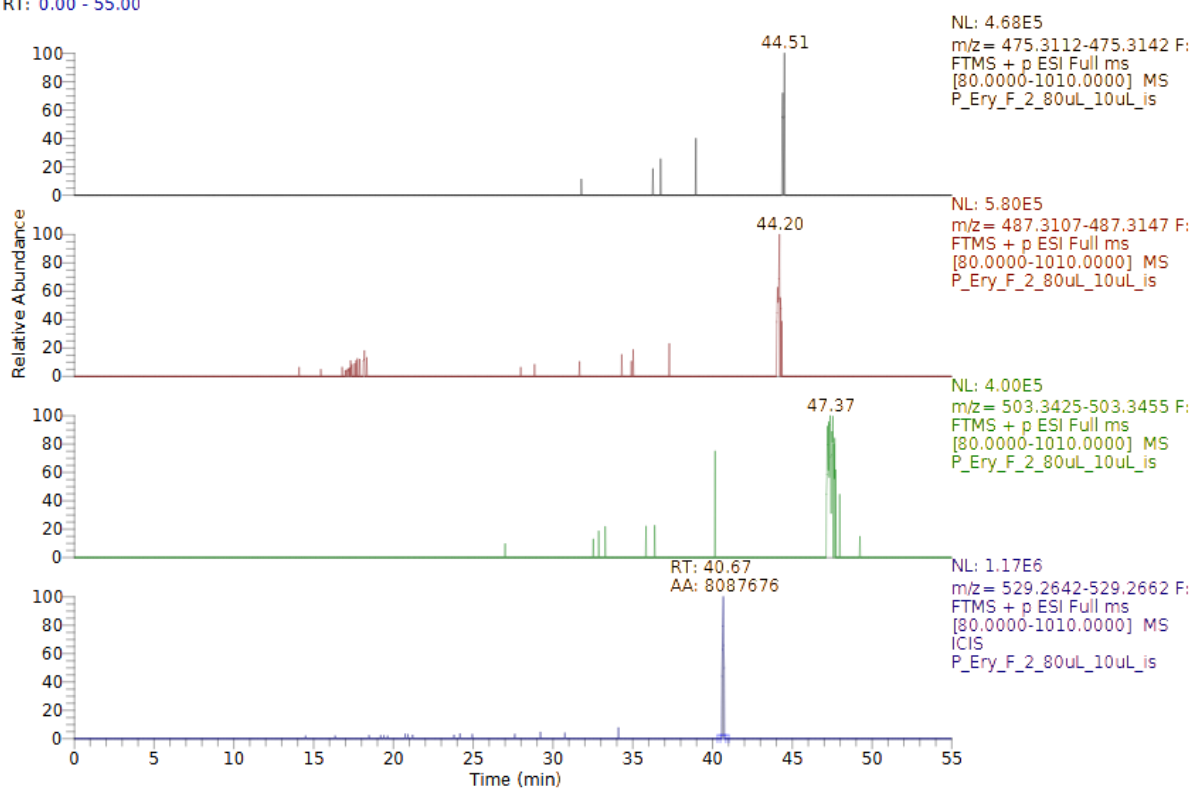
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_F\_2\_80uL\_10uL\_is

11/10/23 11:54:33

RT: 0.00 - 55.00

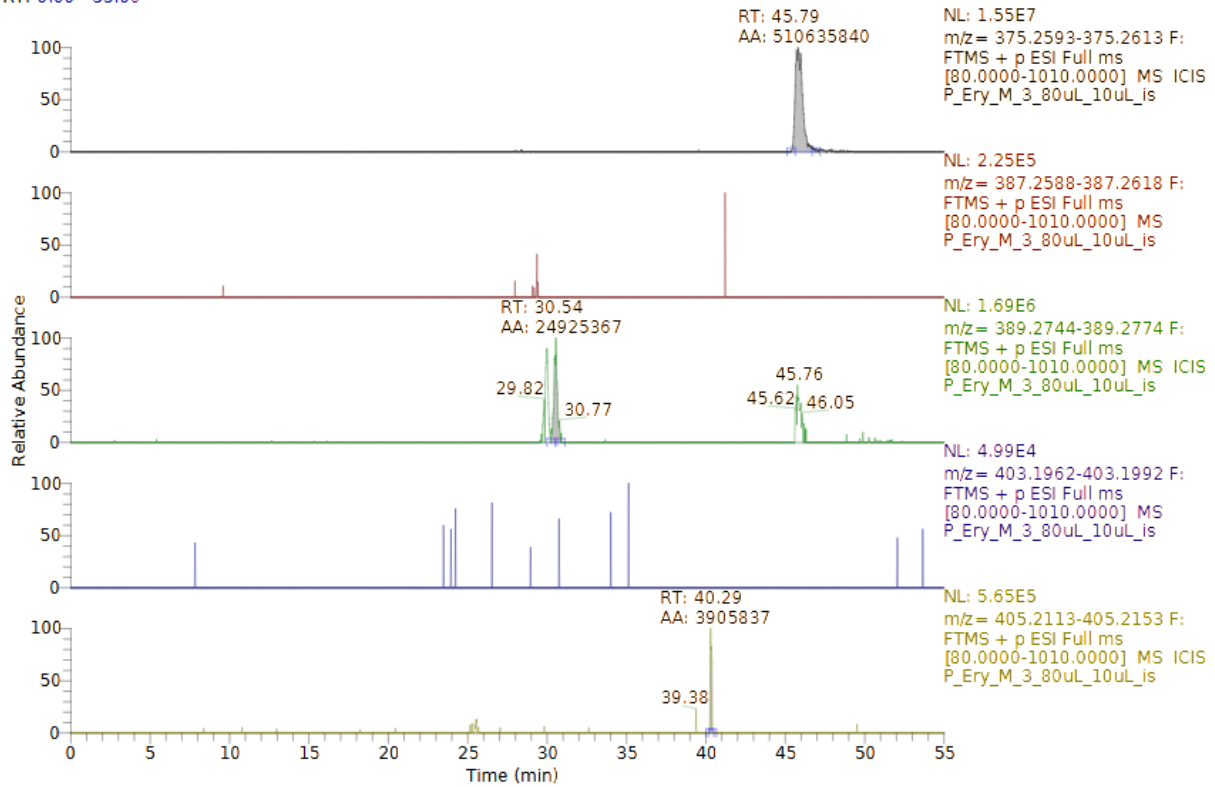


### Αρσενικό λυθρίνι M-3

P\_Ery\_M\_3\_80uL\_10uL\_is

11/06/23 16:23:50

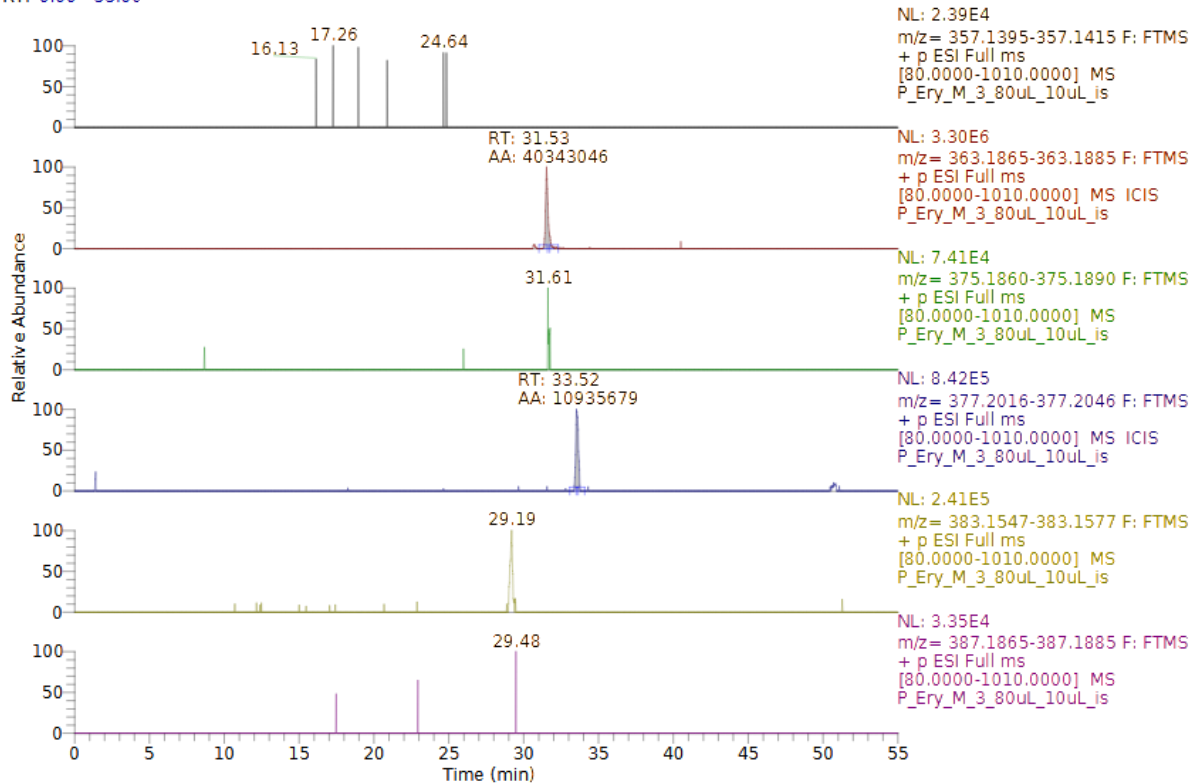
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_M\_3\_80uL\_10uL\_is

11/06/23 16:23:50

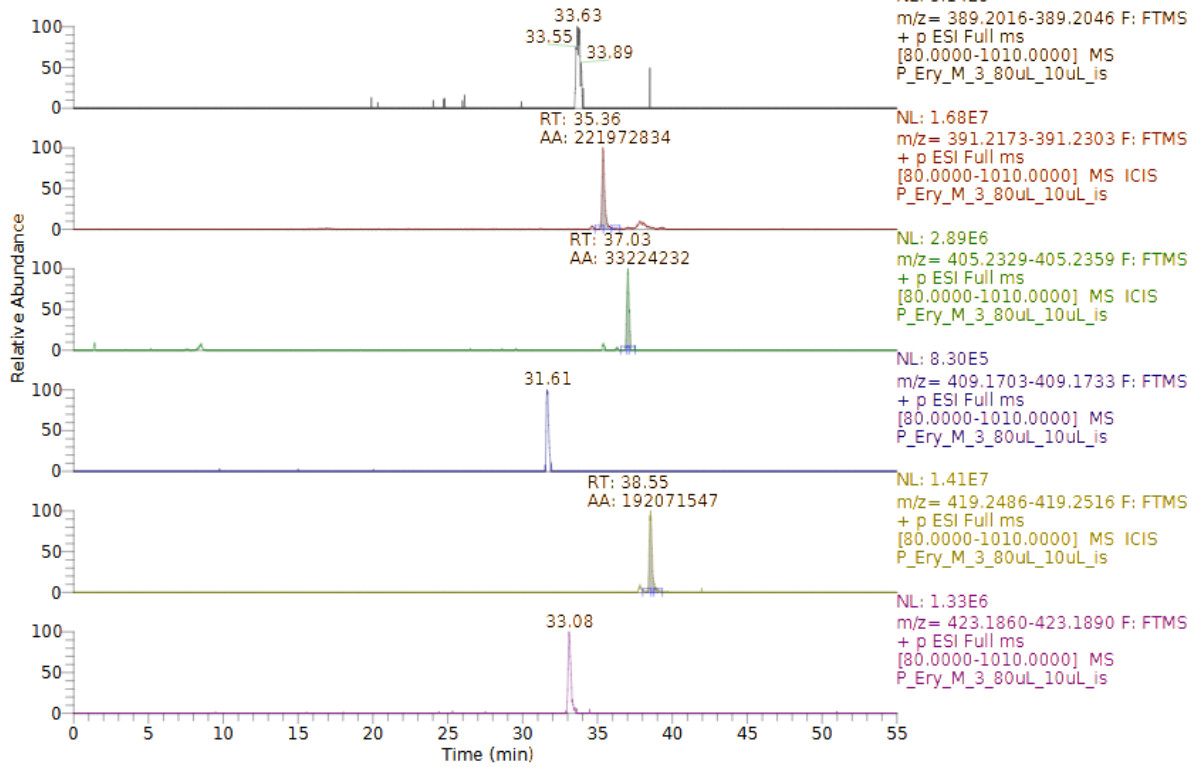
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_M\_3\_80uL\_10uL\_is

11/06/23 16:23:50

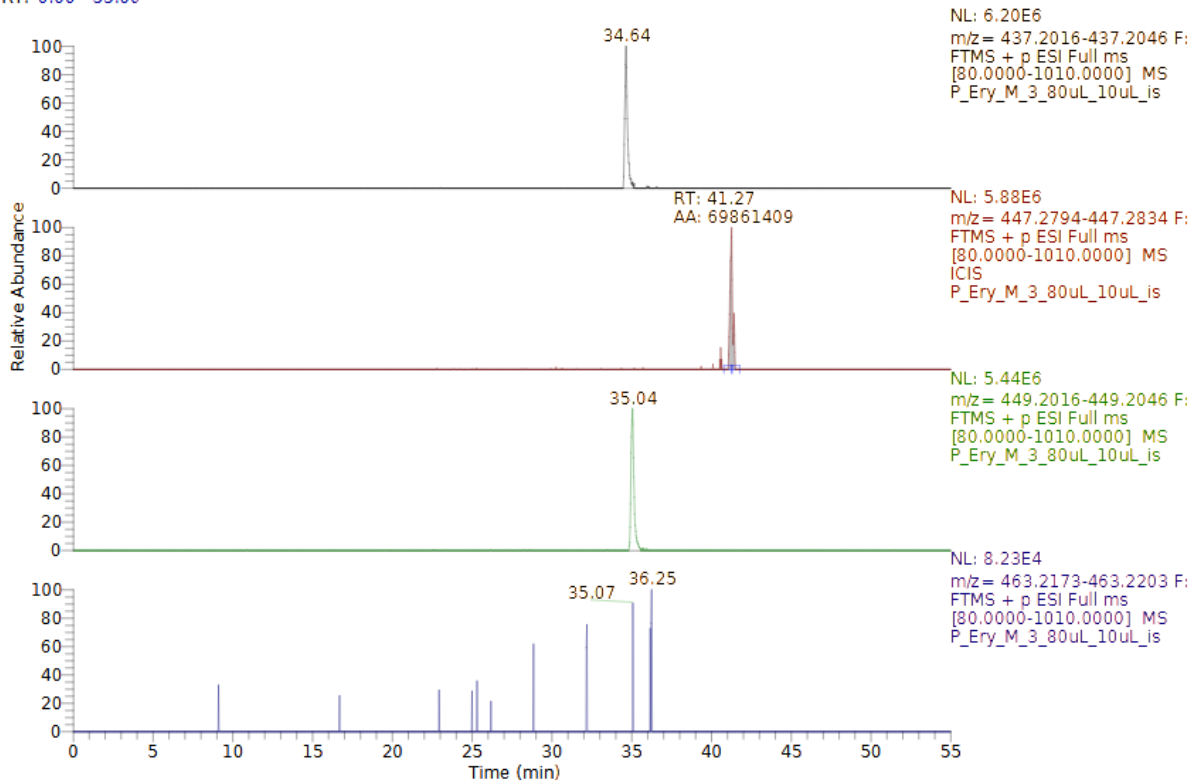
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_M\_3\_80uL\_10uL\_is

11/06/23 16:23:50

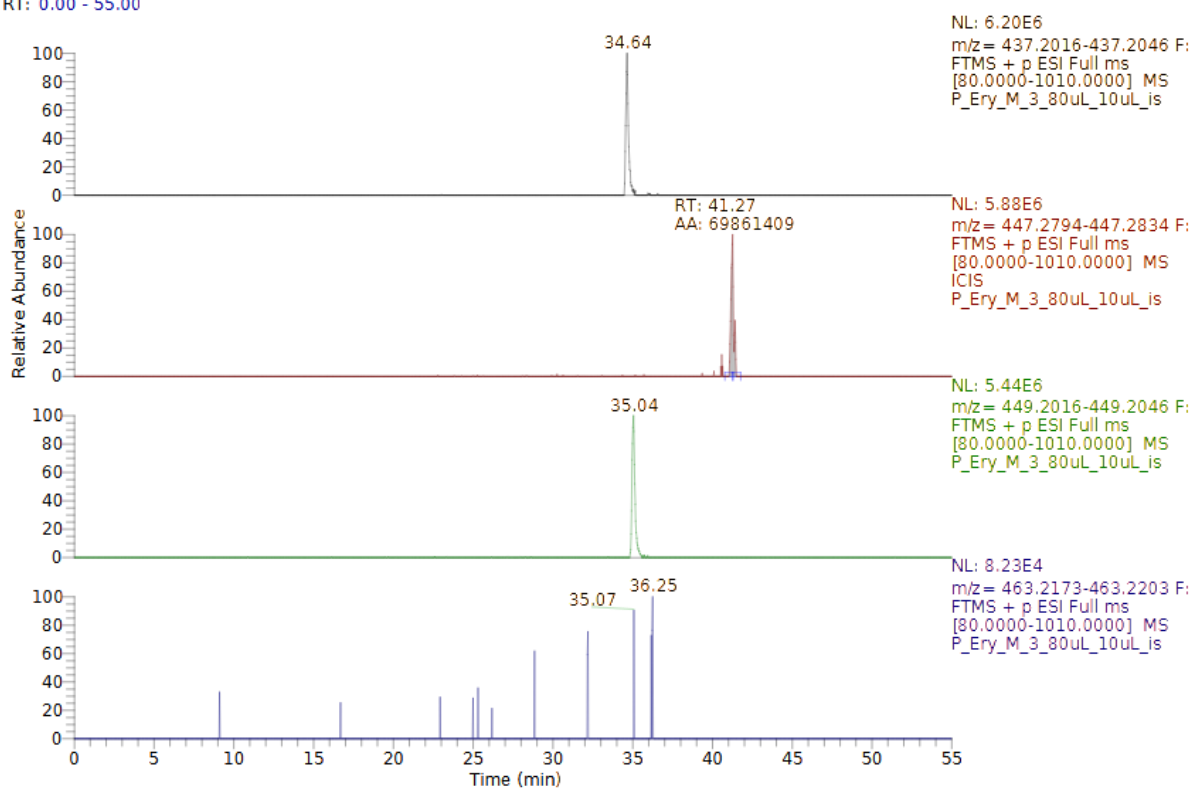
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_M\_3\_80uL\_10uL\_is

11/06/23 16:23:50

RT: 0.00 - 55.00

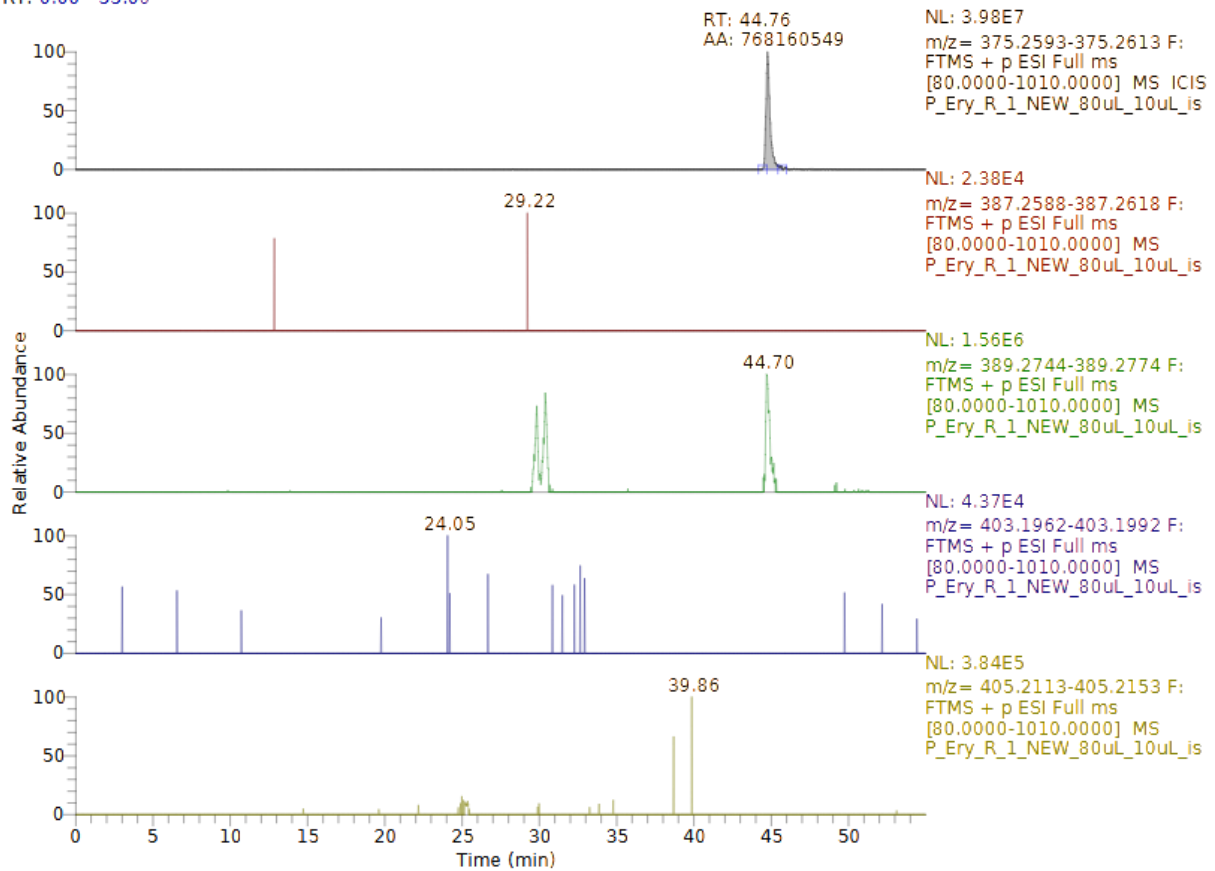


## Ερμαφρόδιτο λυθρίνι R-1

P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

RT: 0.00 - 55.00

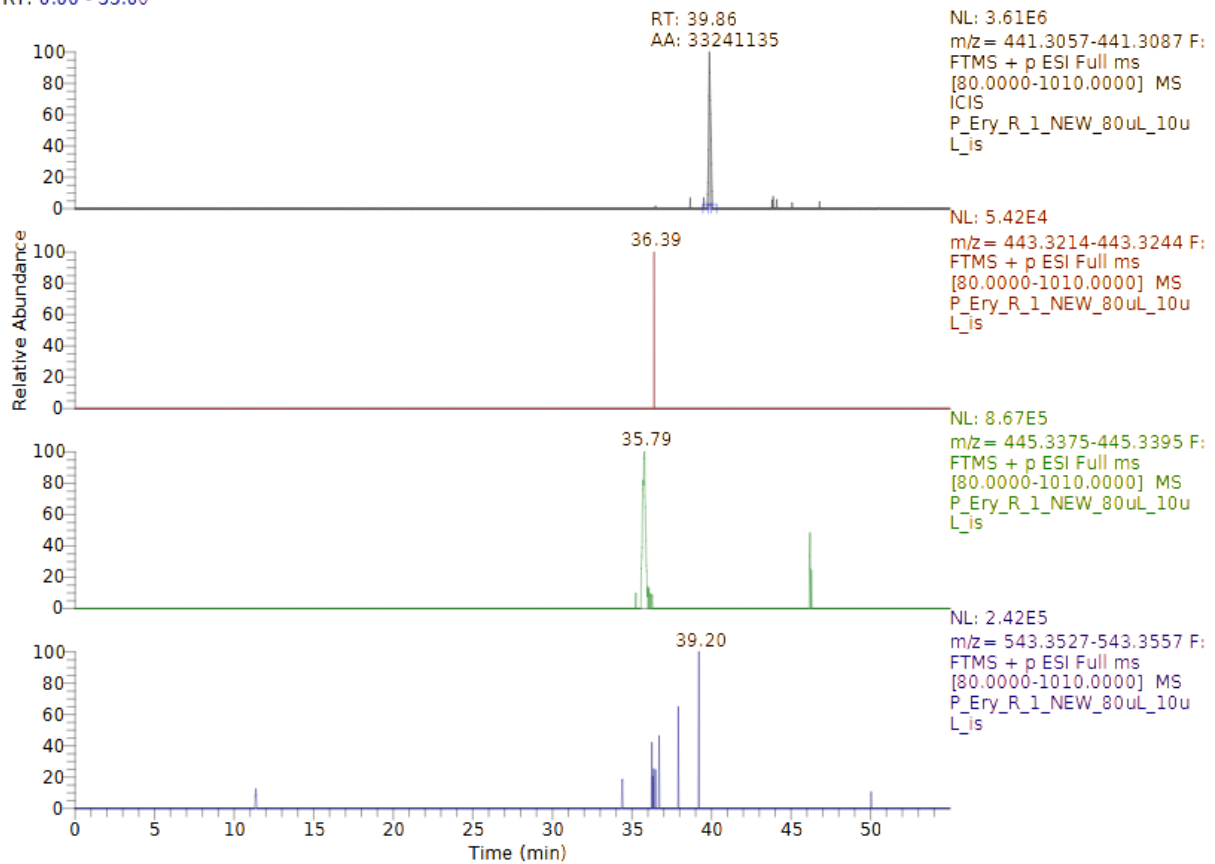




P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

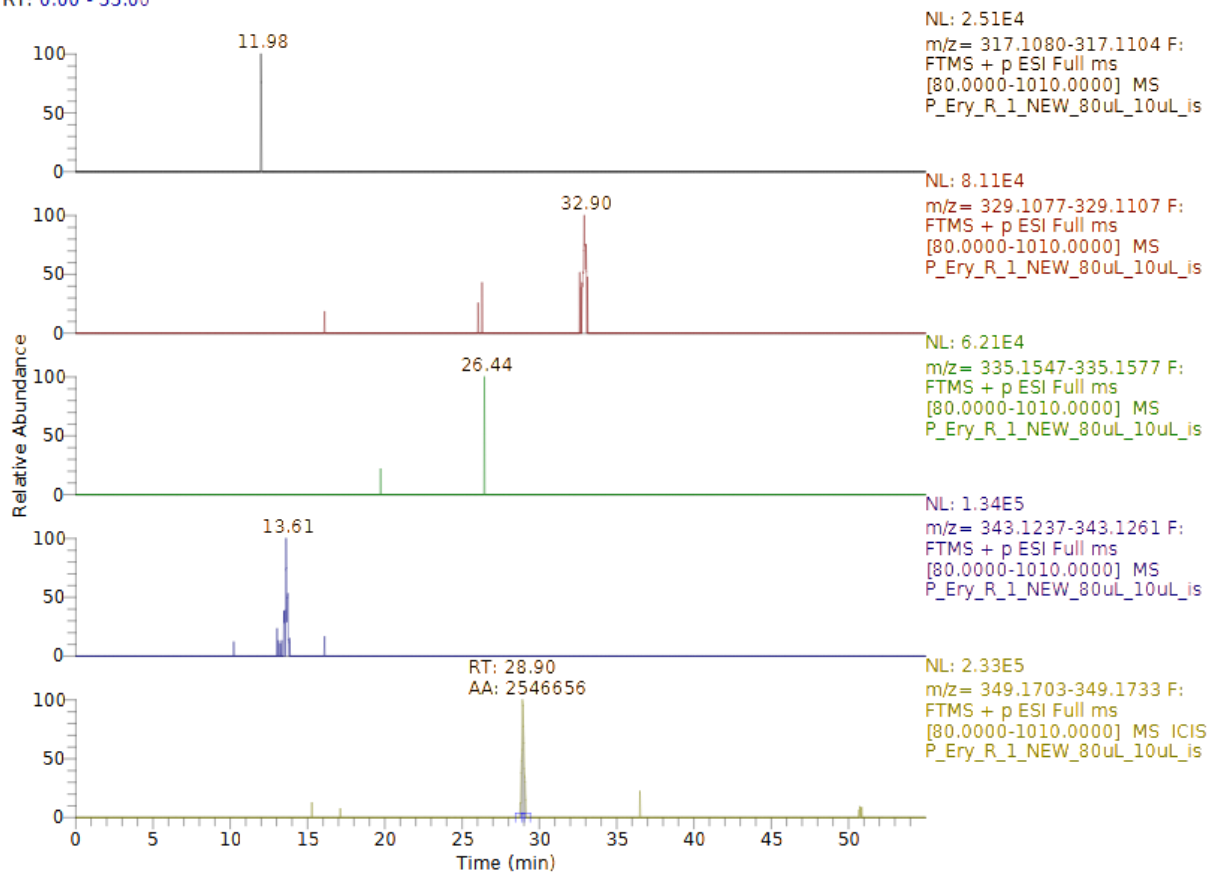
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

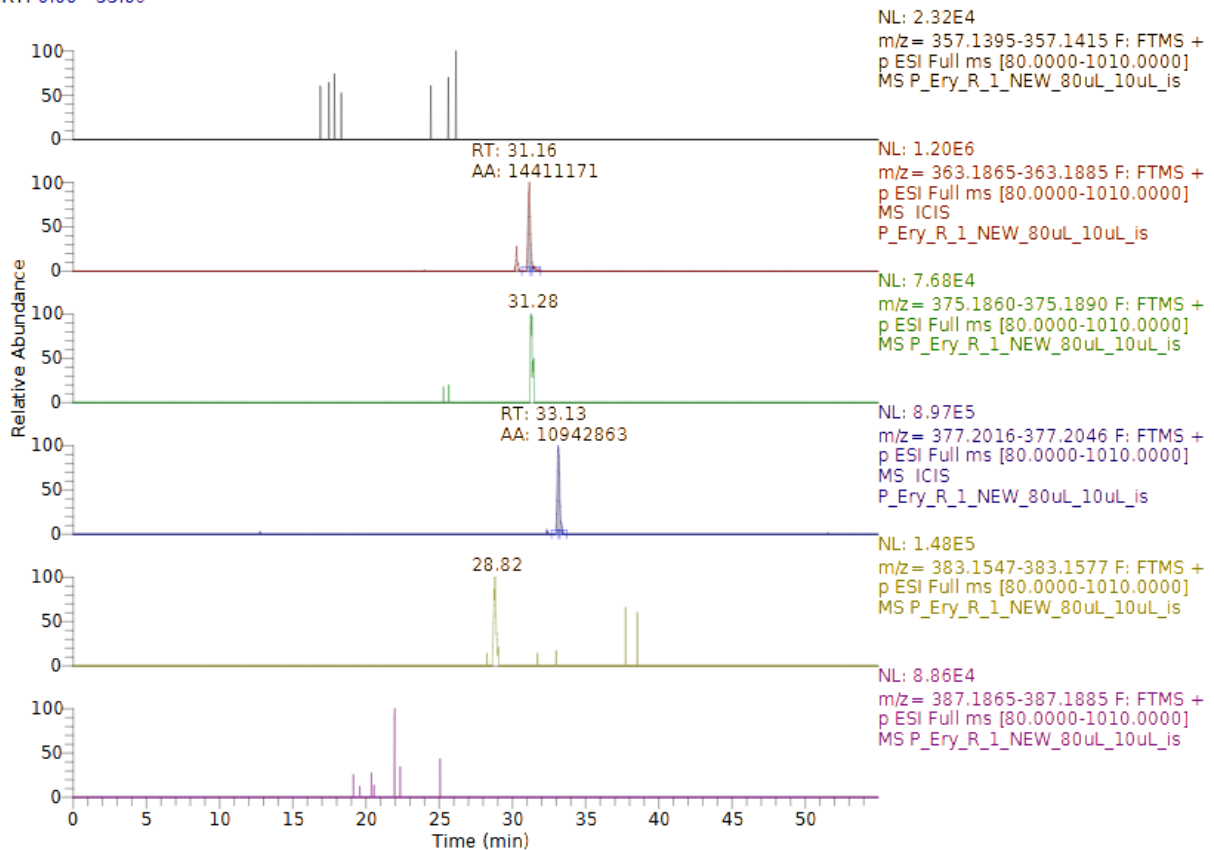
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

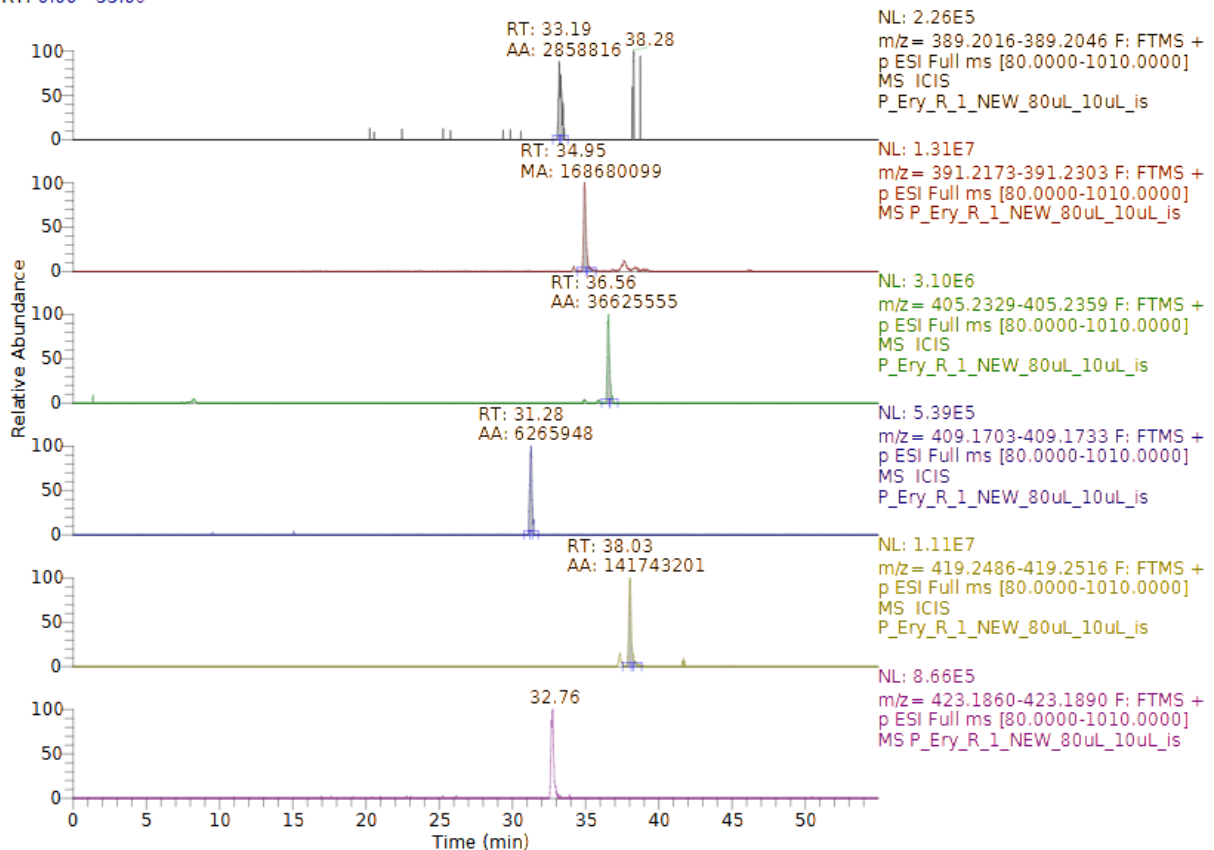
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

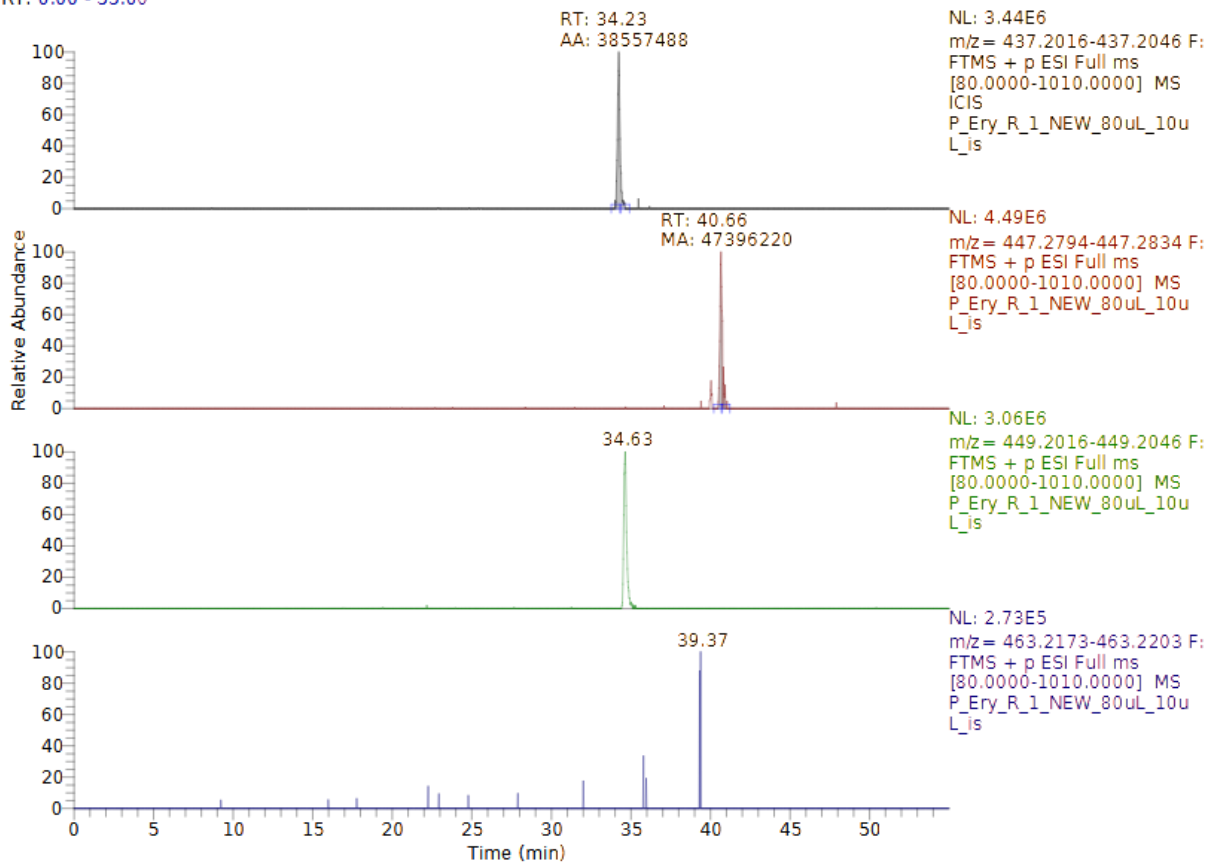
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

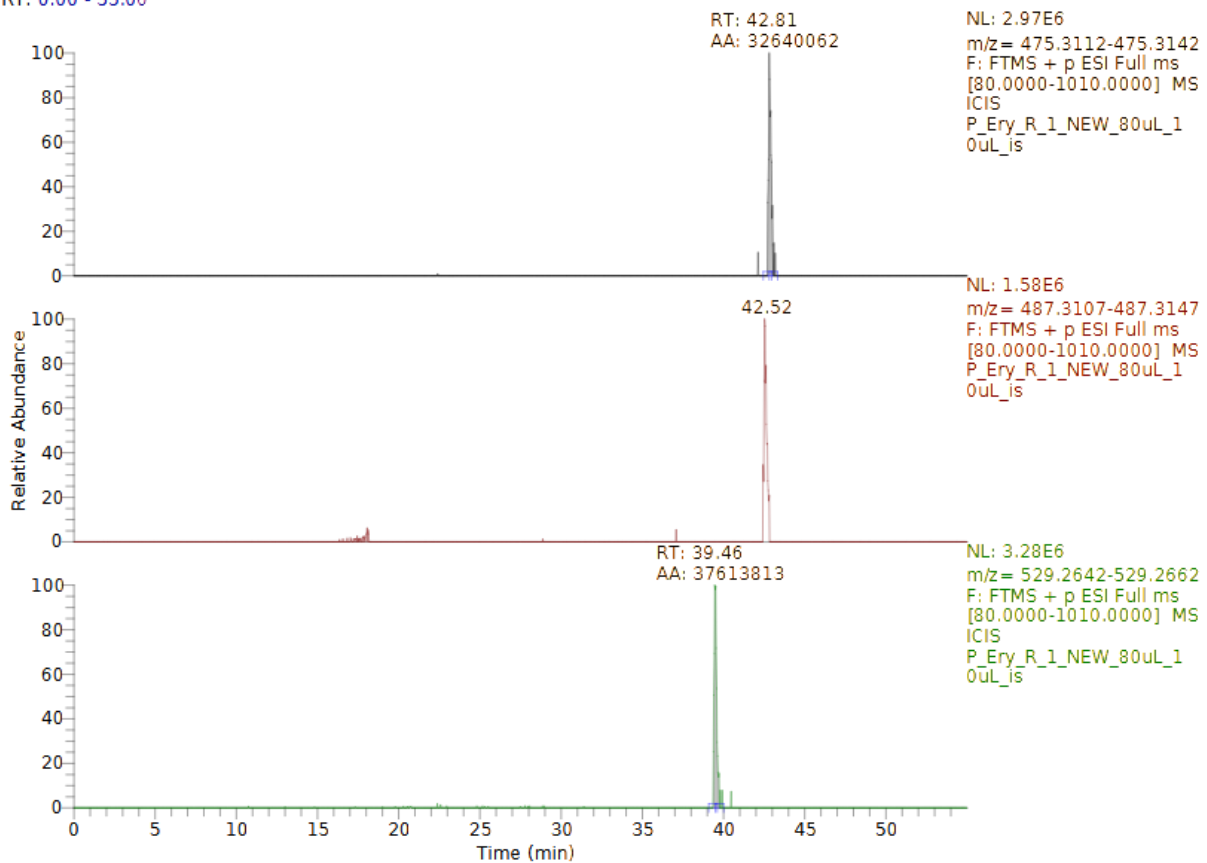
RT: 0.00 - 55.00



P\_Ery\_R\_1\_NEW\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 12:33:54

RT: 0.00 - 55.00



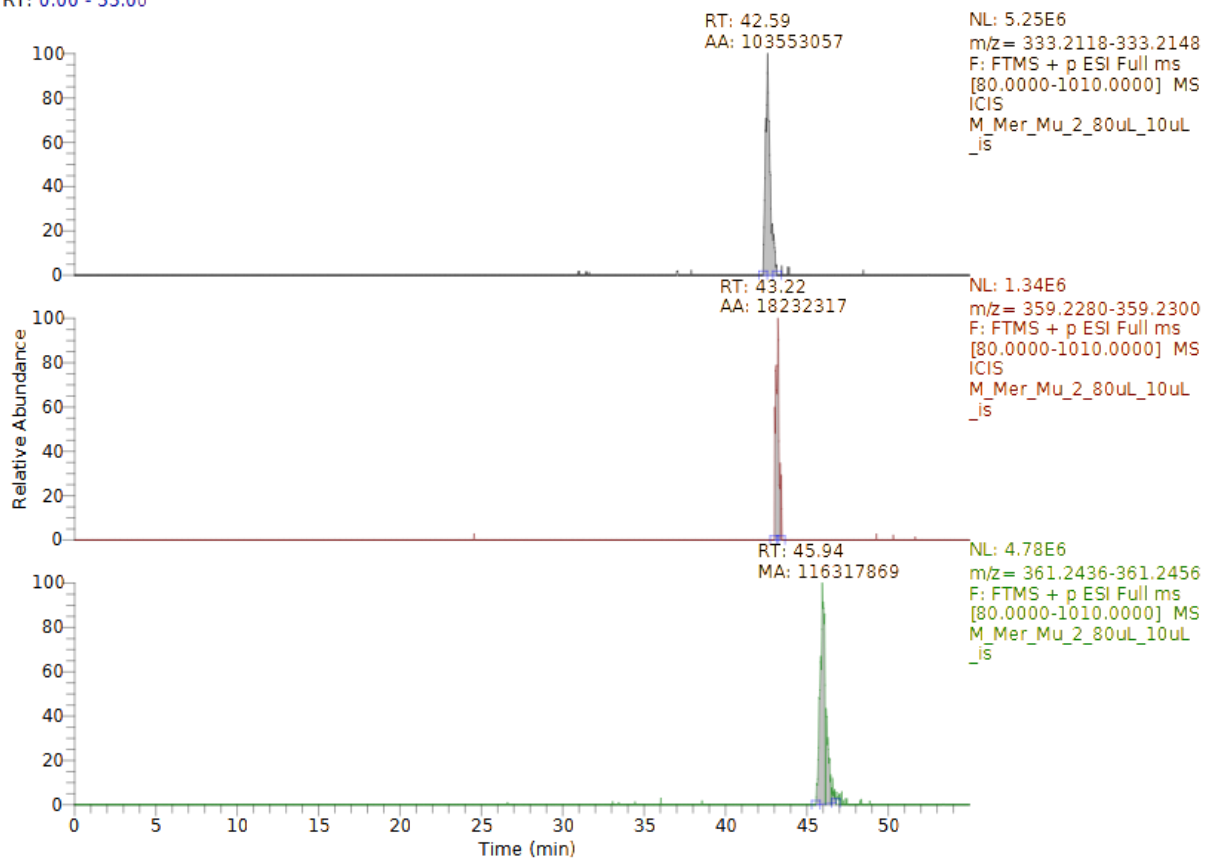
## 7.4 Χρωματογράφημα για το μπακαλιάρo

### Σάρκα Μu-2

C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

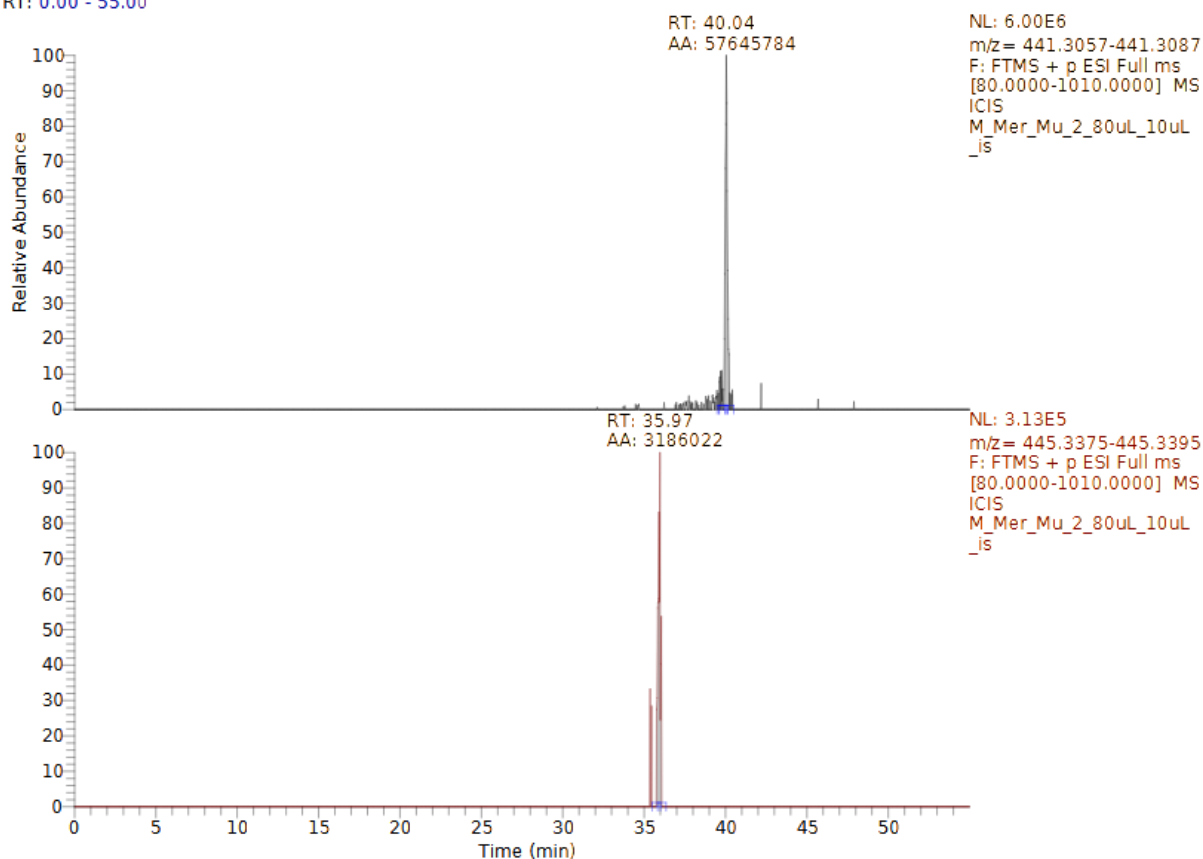
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

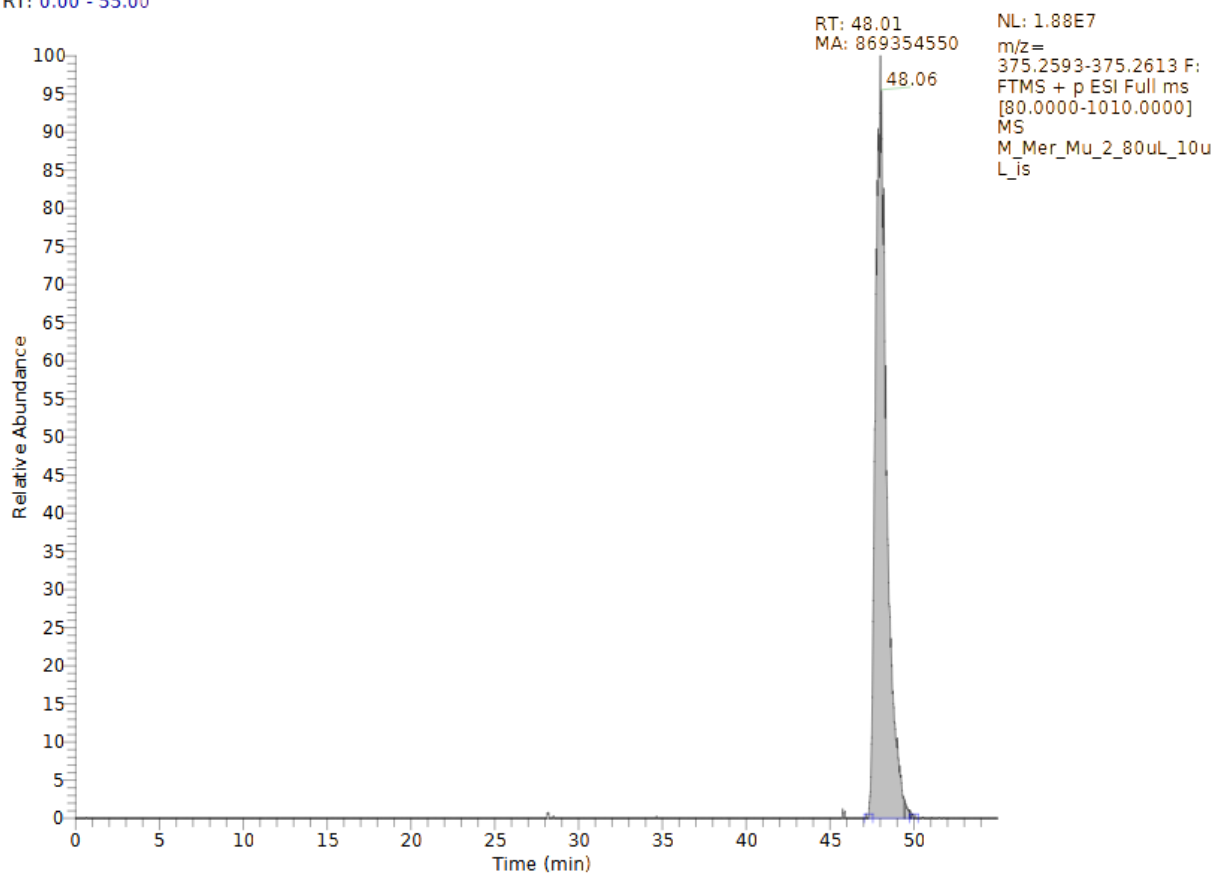
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

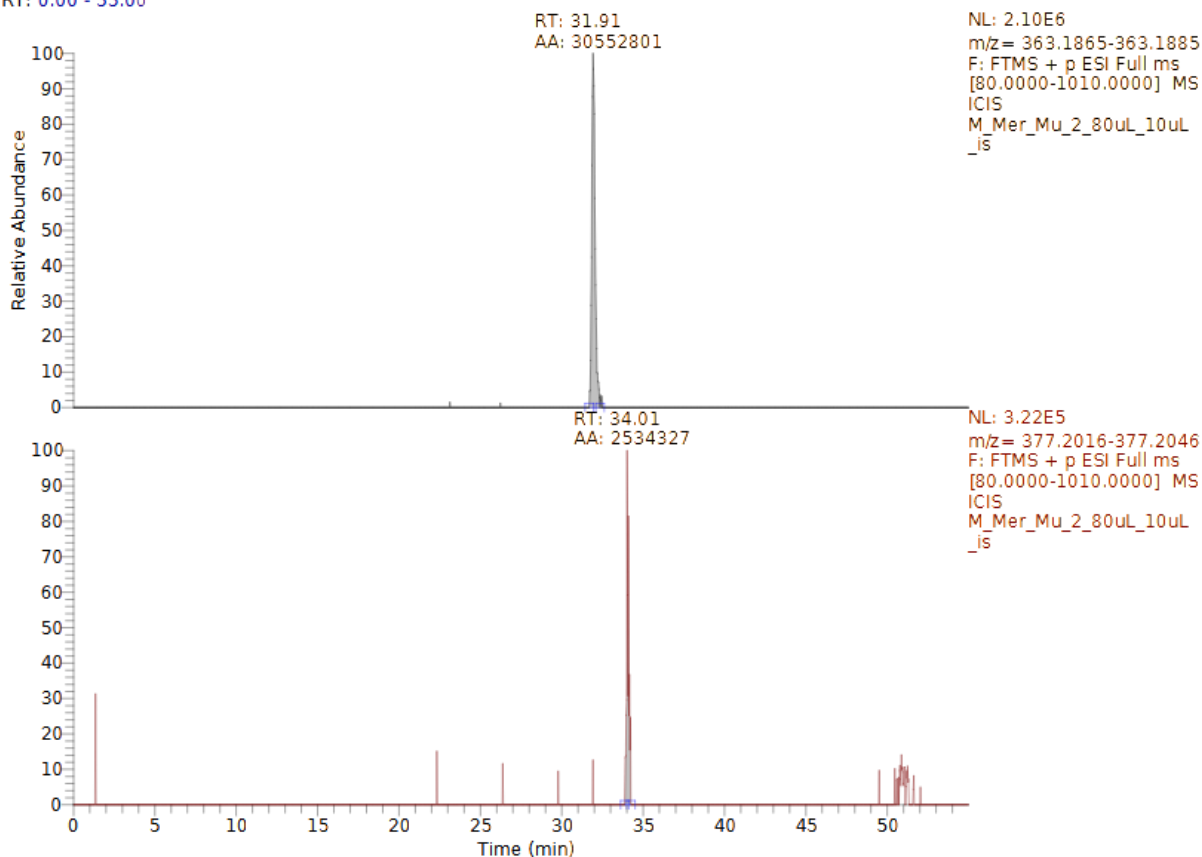
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

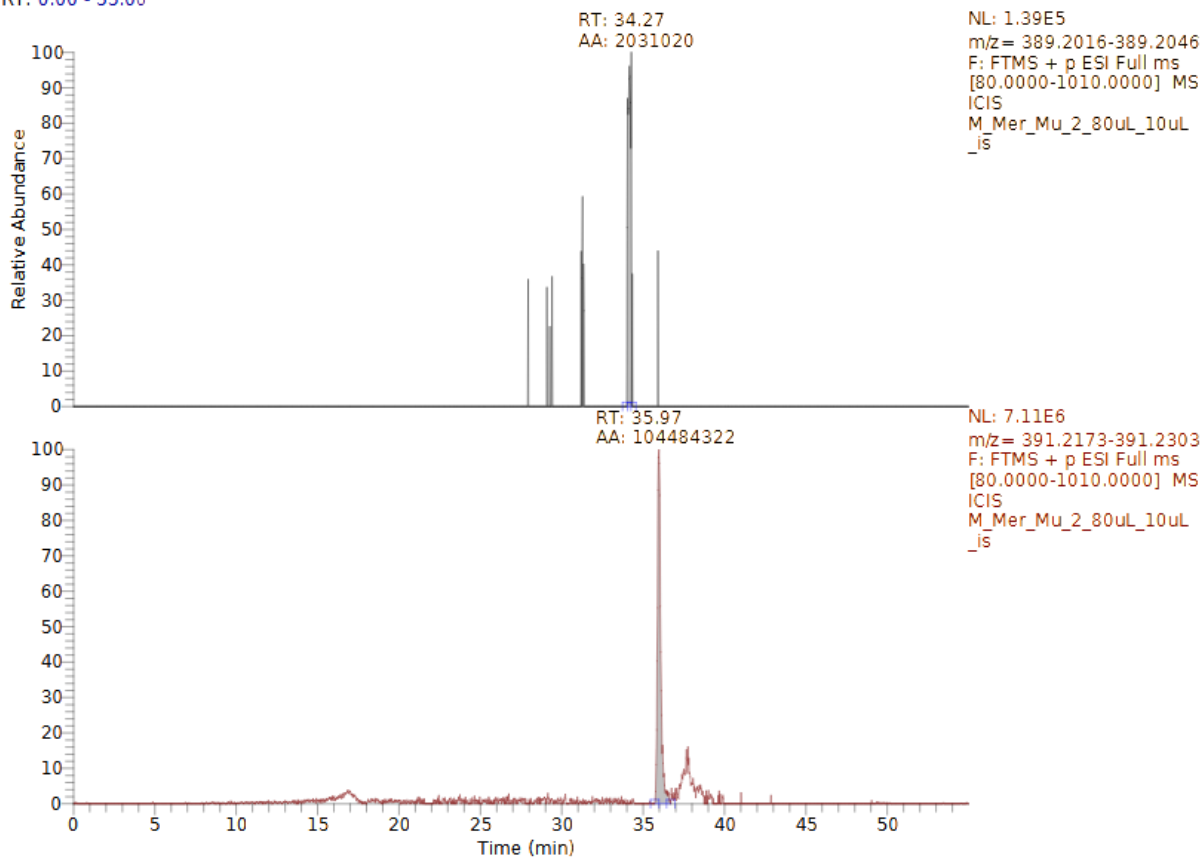
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

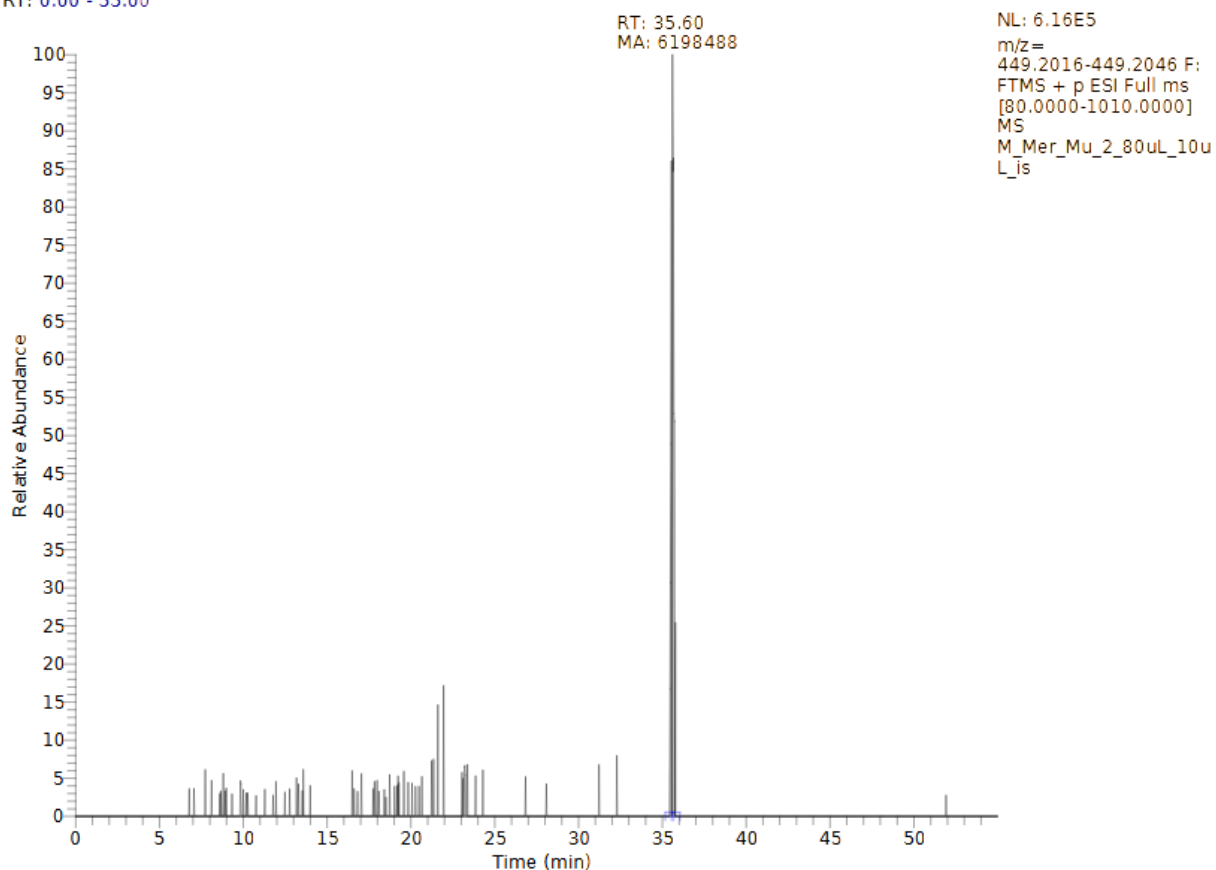
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

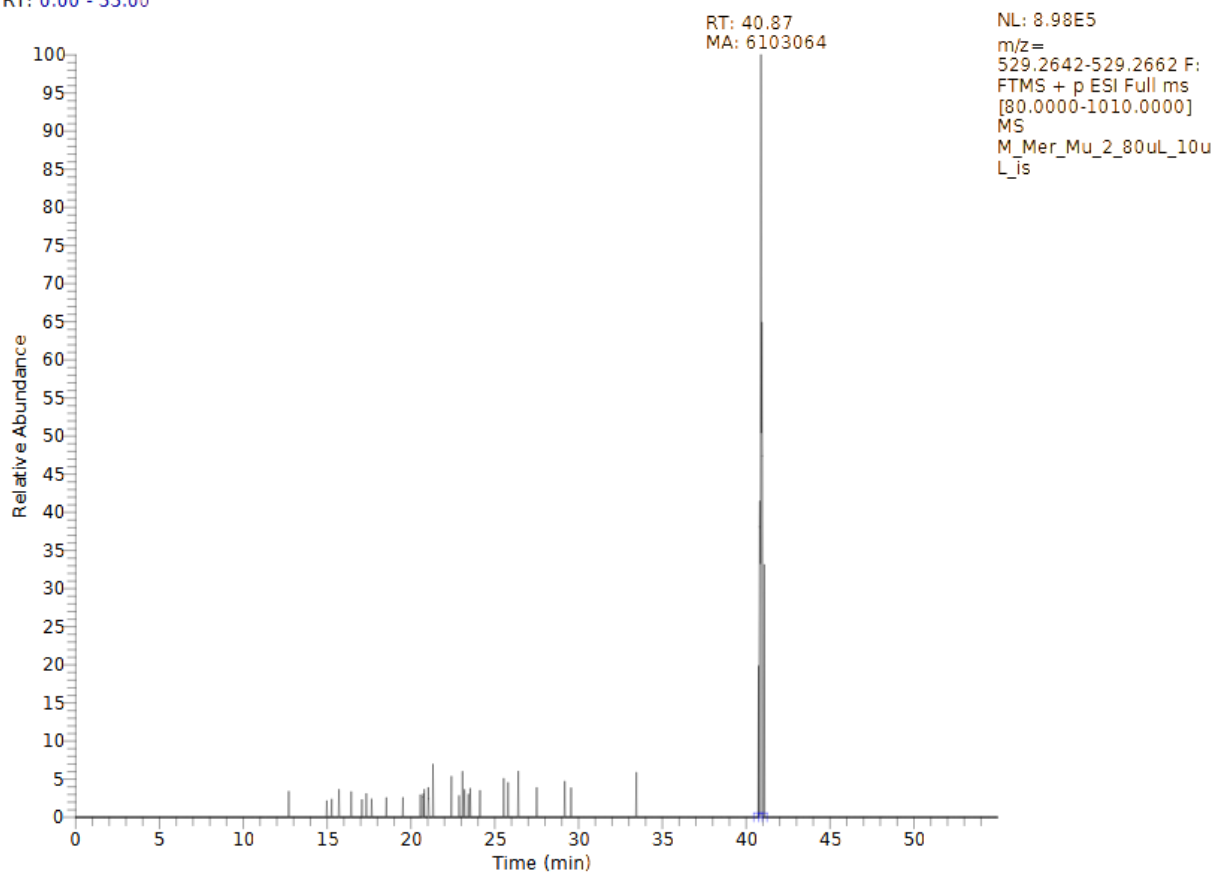
RT: 0.00 - 55.00



C:\Users\...M\_Mer\_Mu\_2\_80uL\_10uL\_is

11/20/23 12:50:21

RT: 0.00 - 55.00

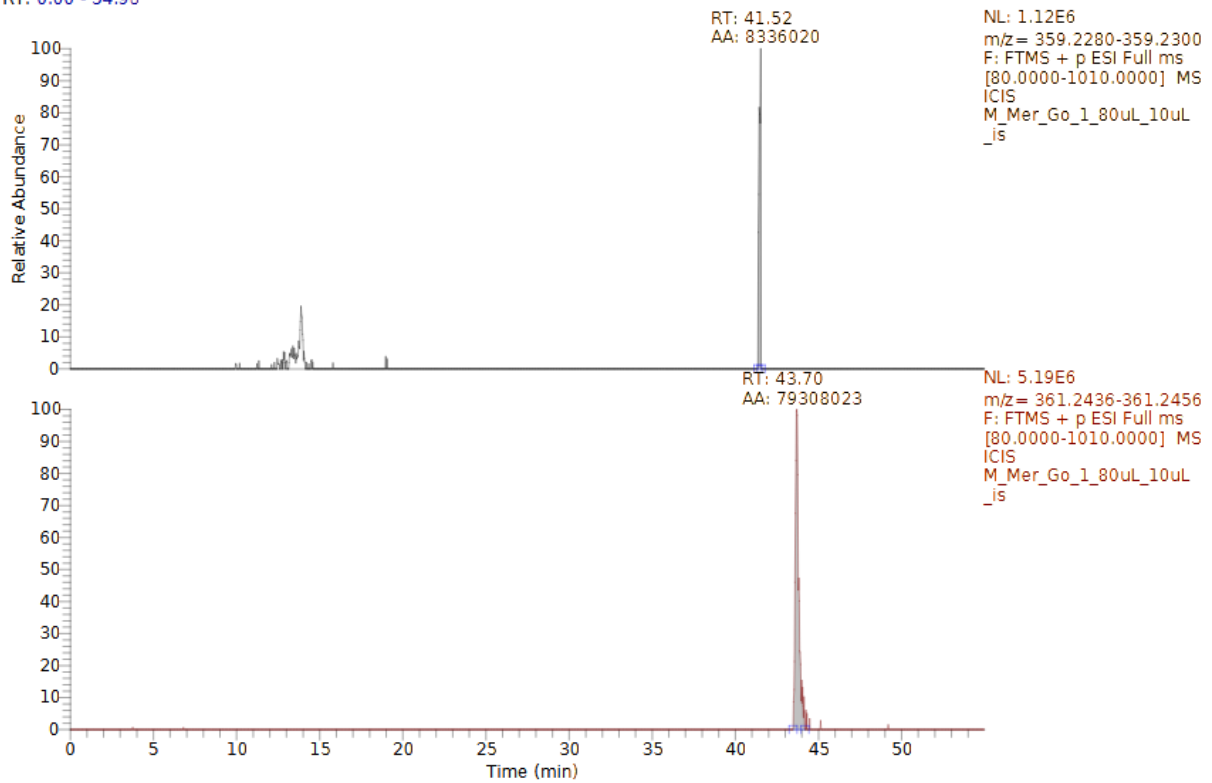


## Γονάδες Go-1

C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

RT: 0.00 - 54.98

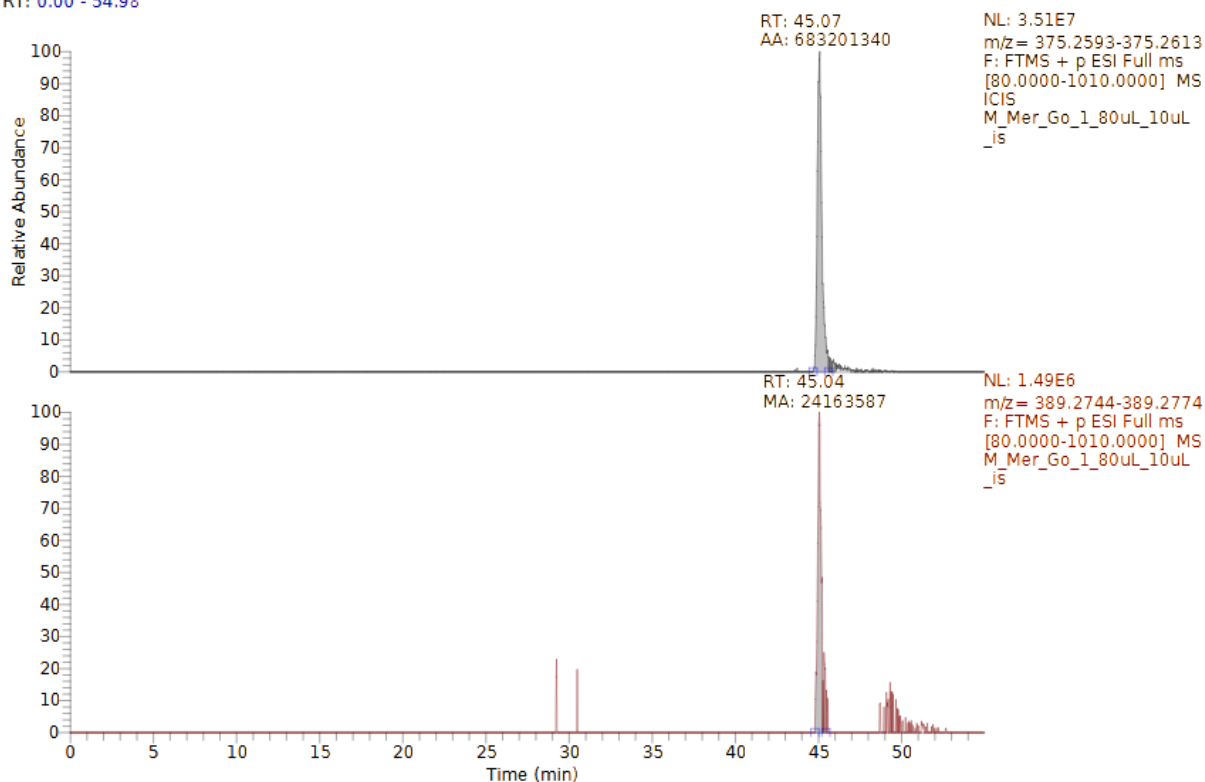




C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

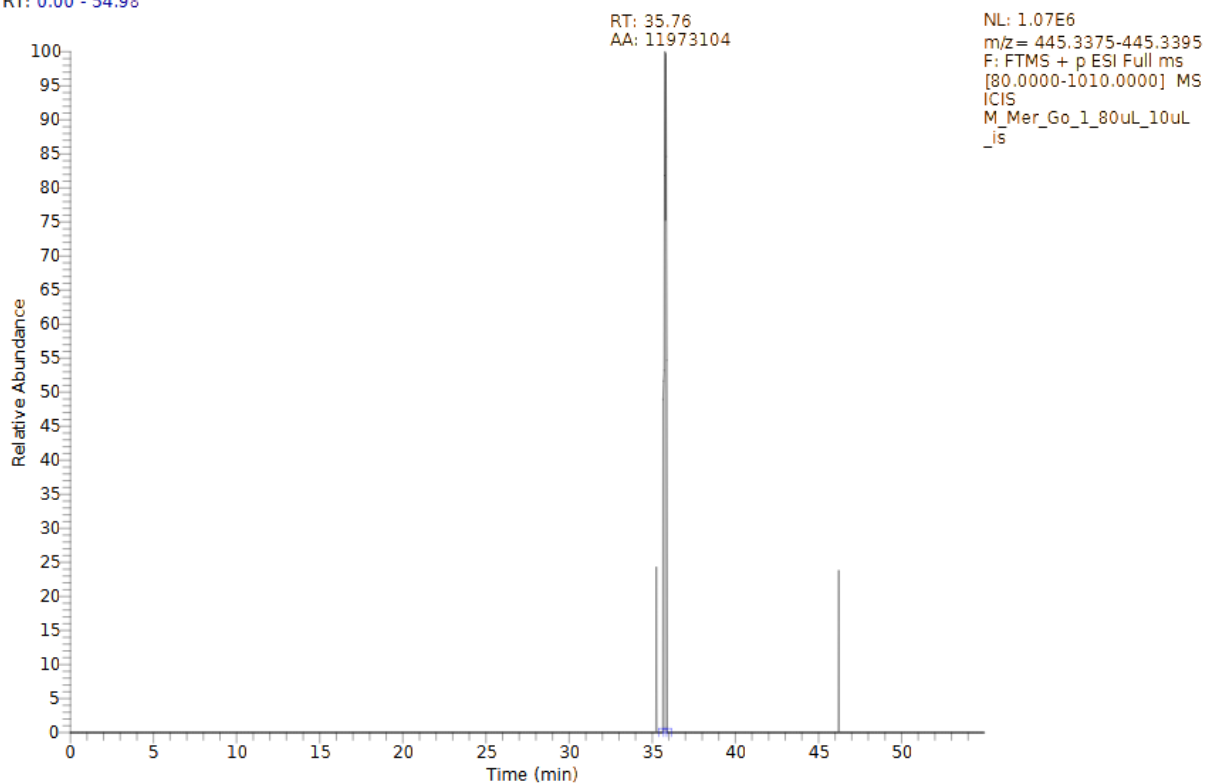
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

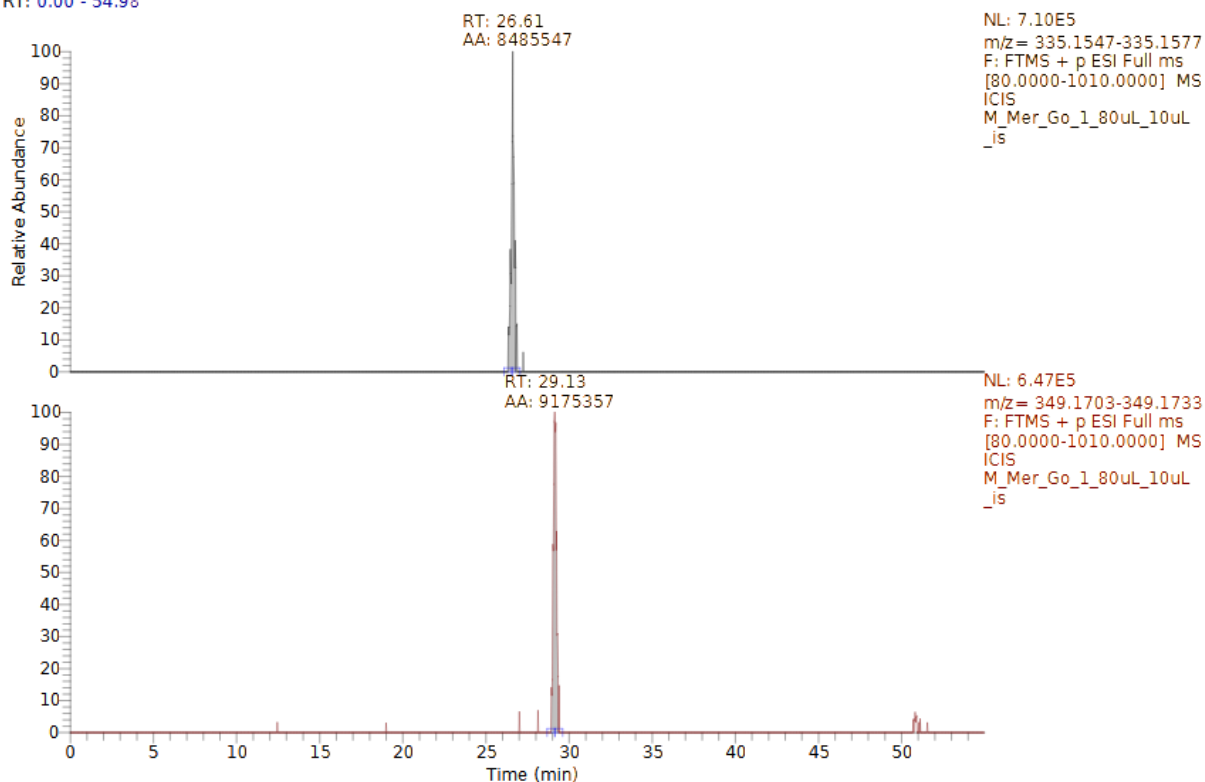
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

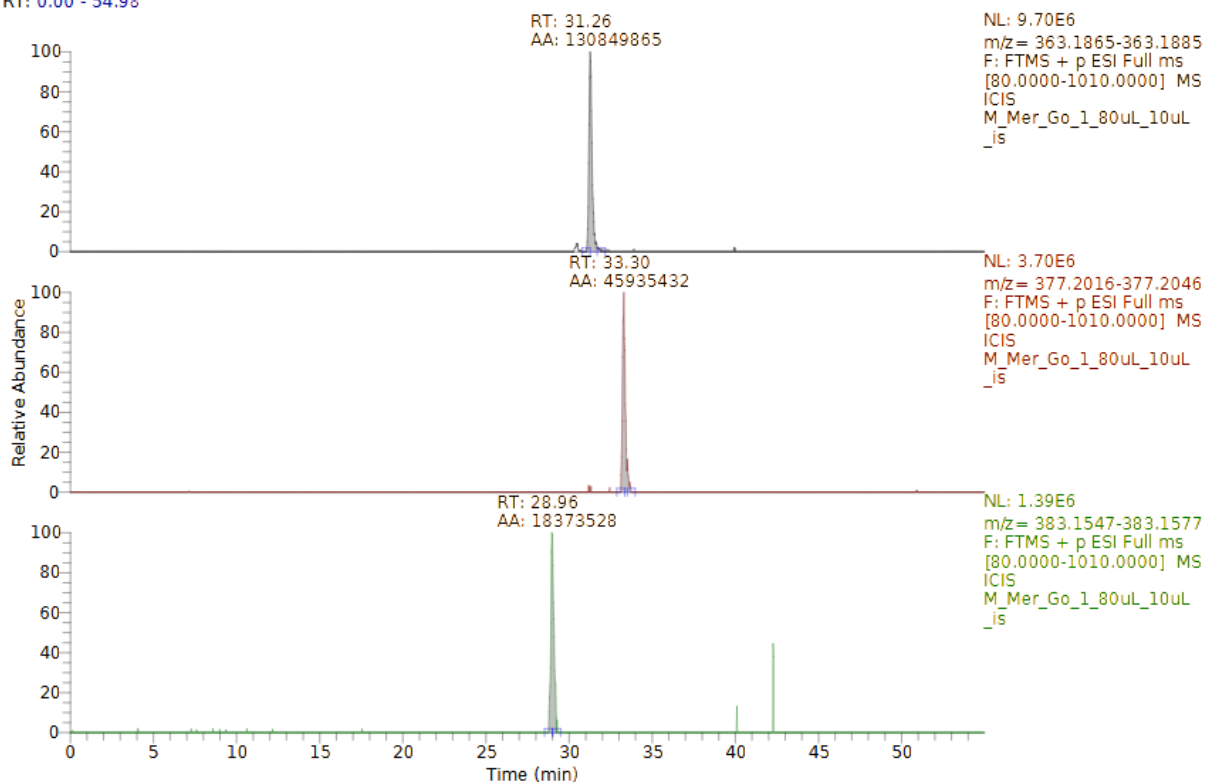
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

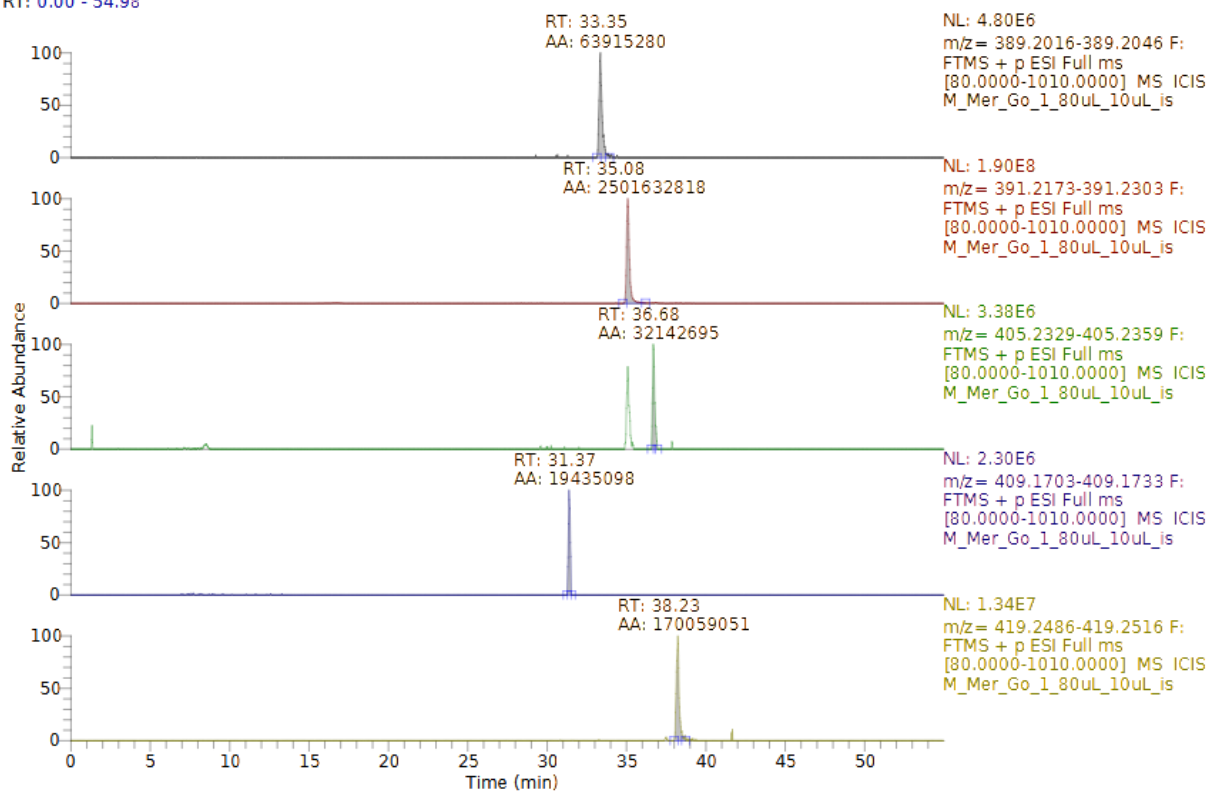
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

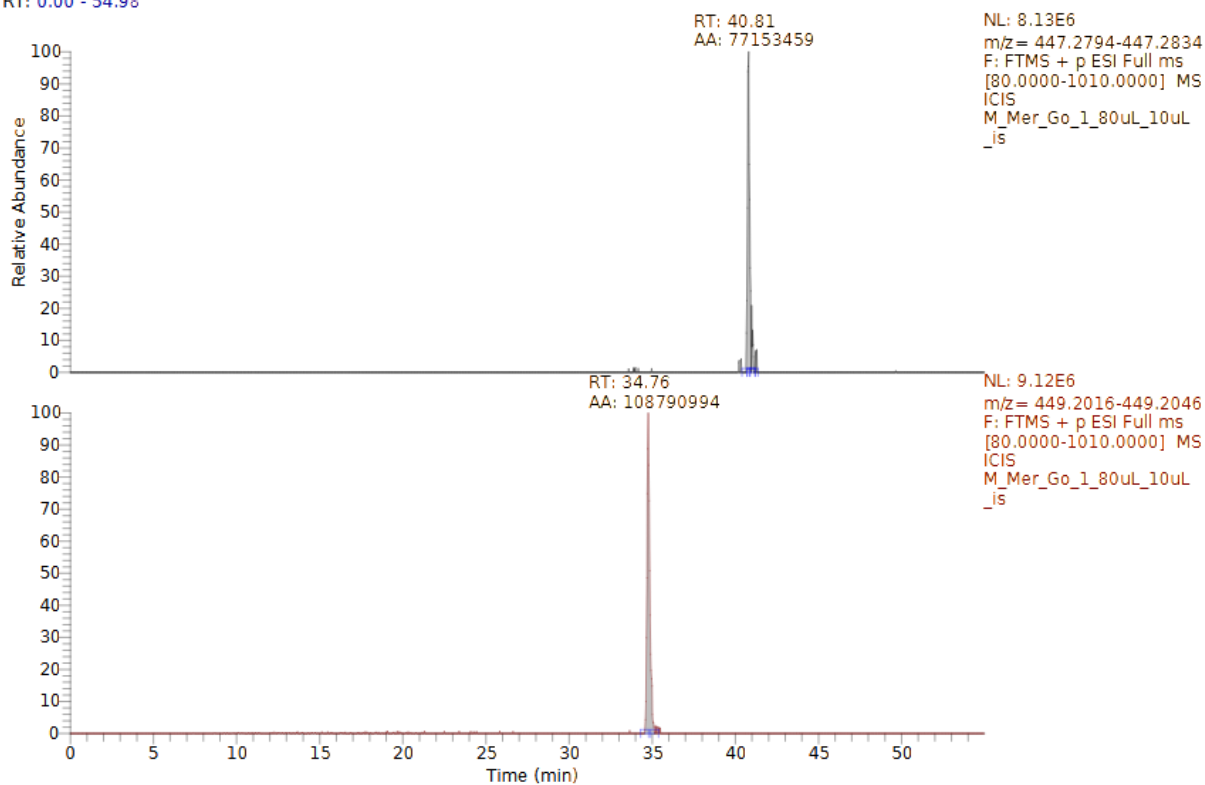
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

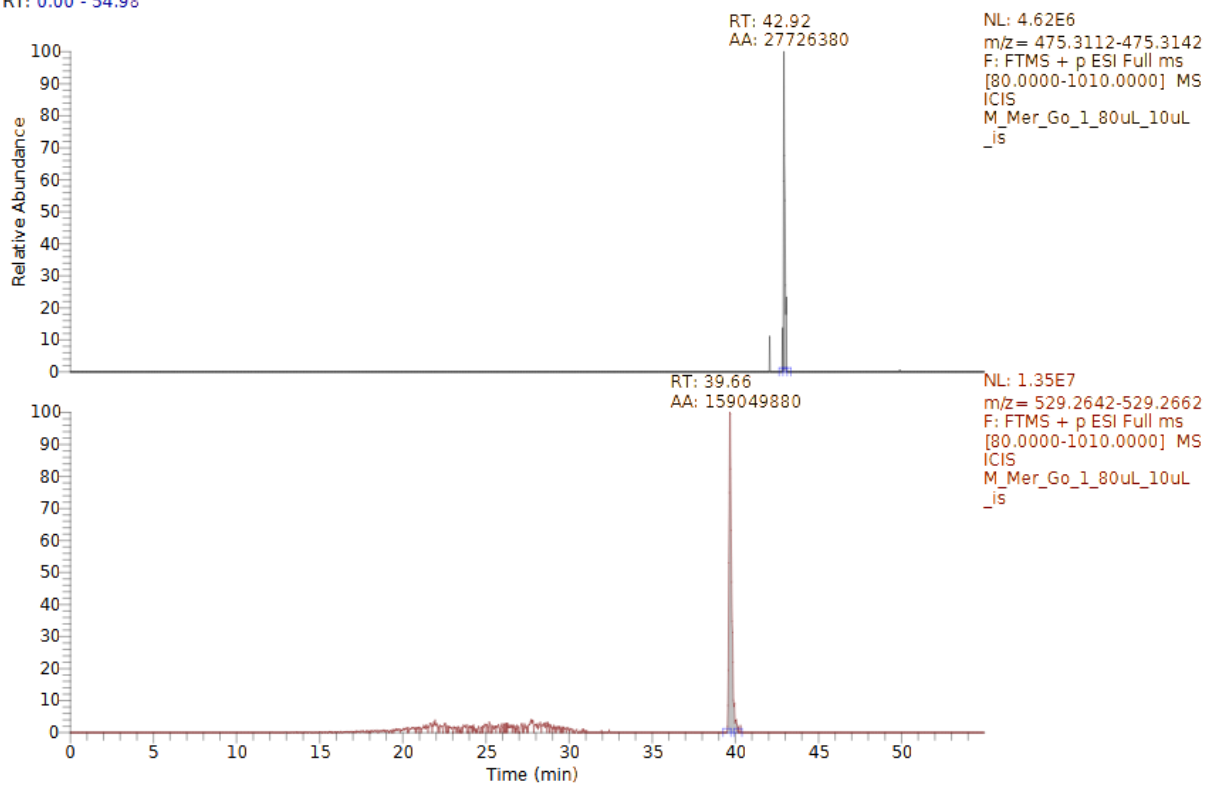
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Go\_1\_80uL\_10uL\_is

11/30/23 14:43:14

RT: 0.00 - 54.98

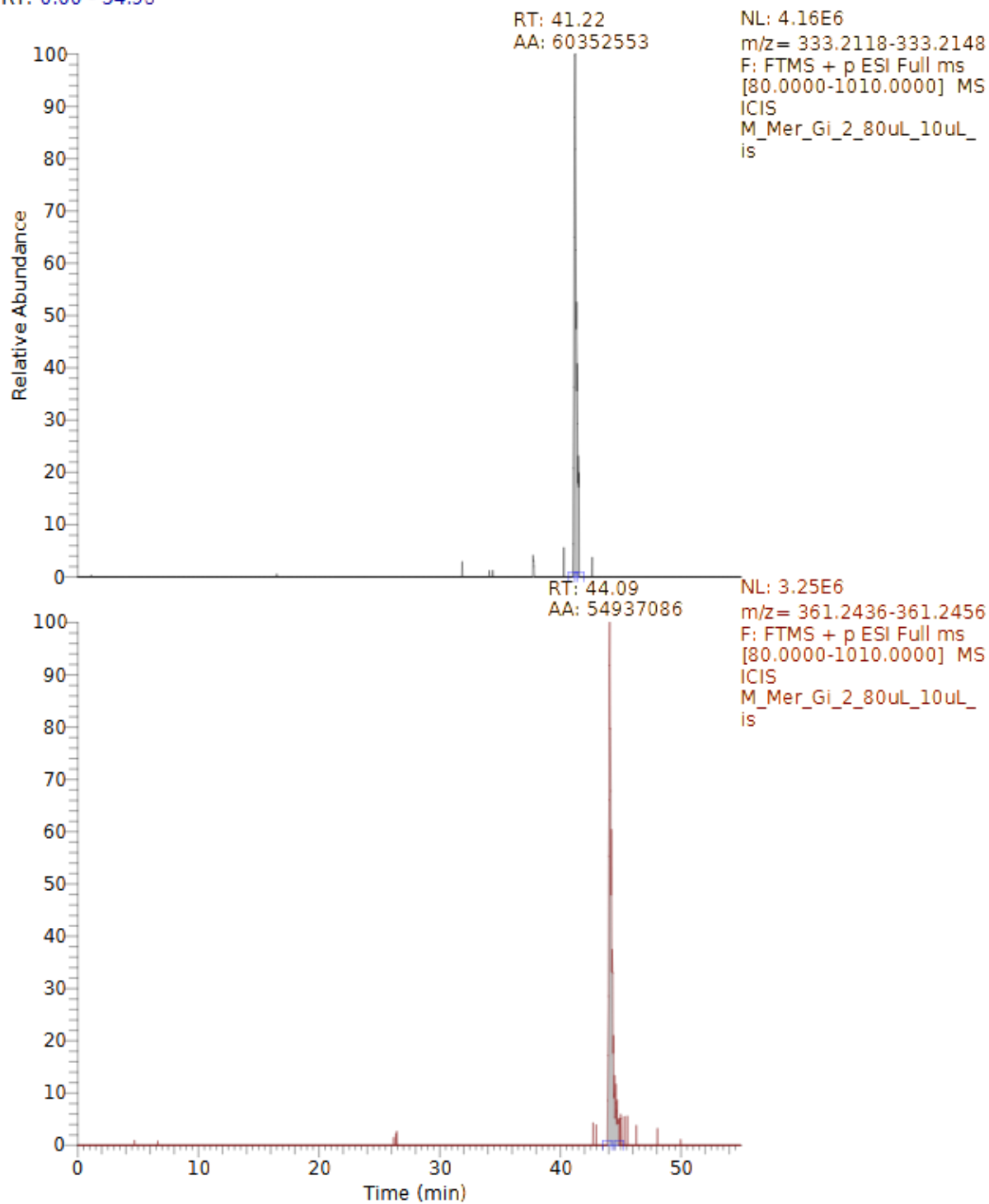


## Βράγγια Gi-2

C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

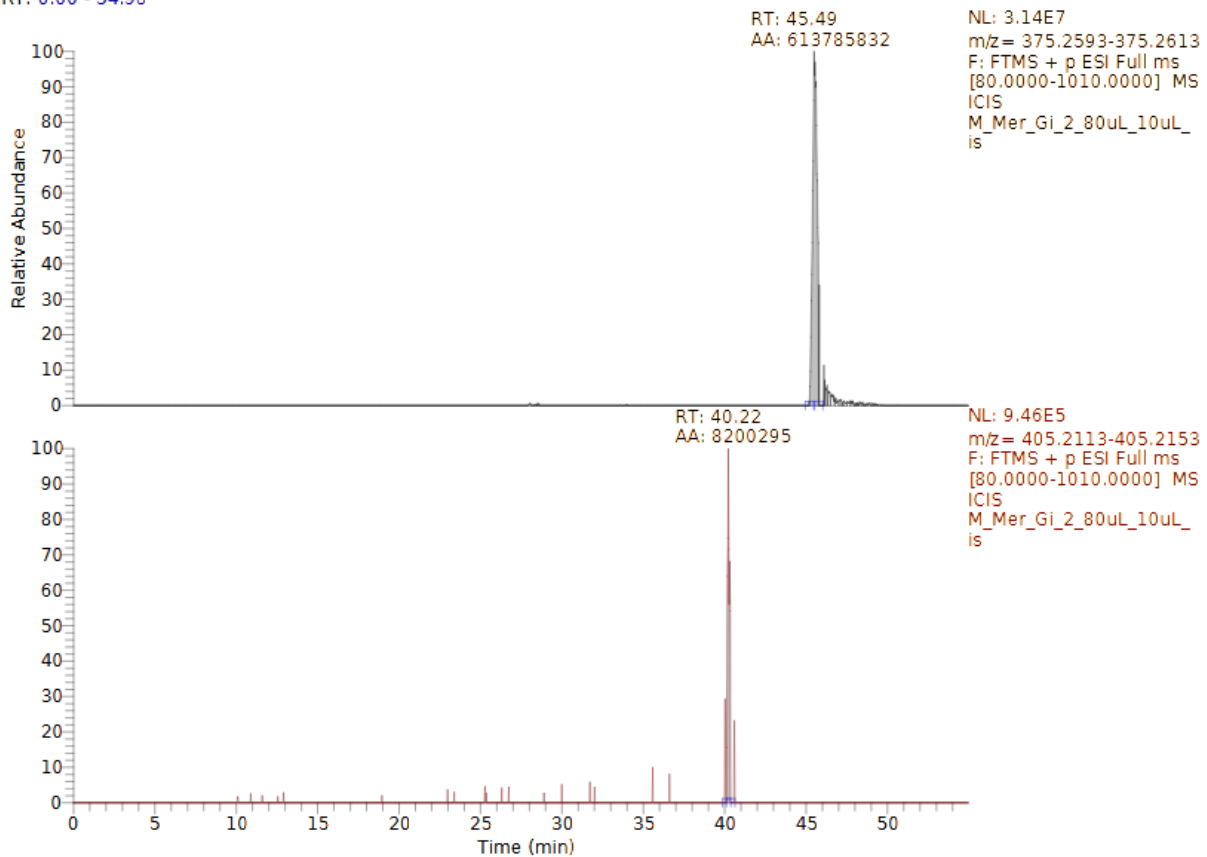
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

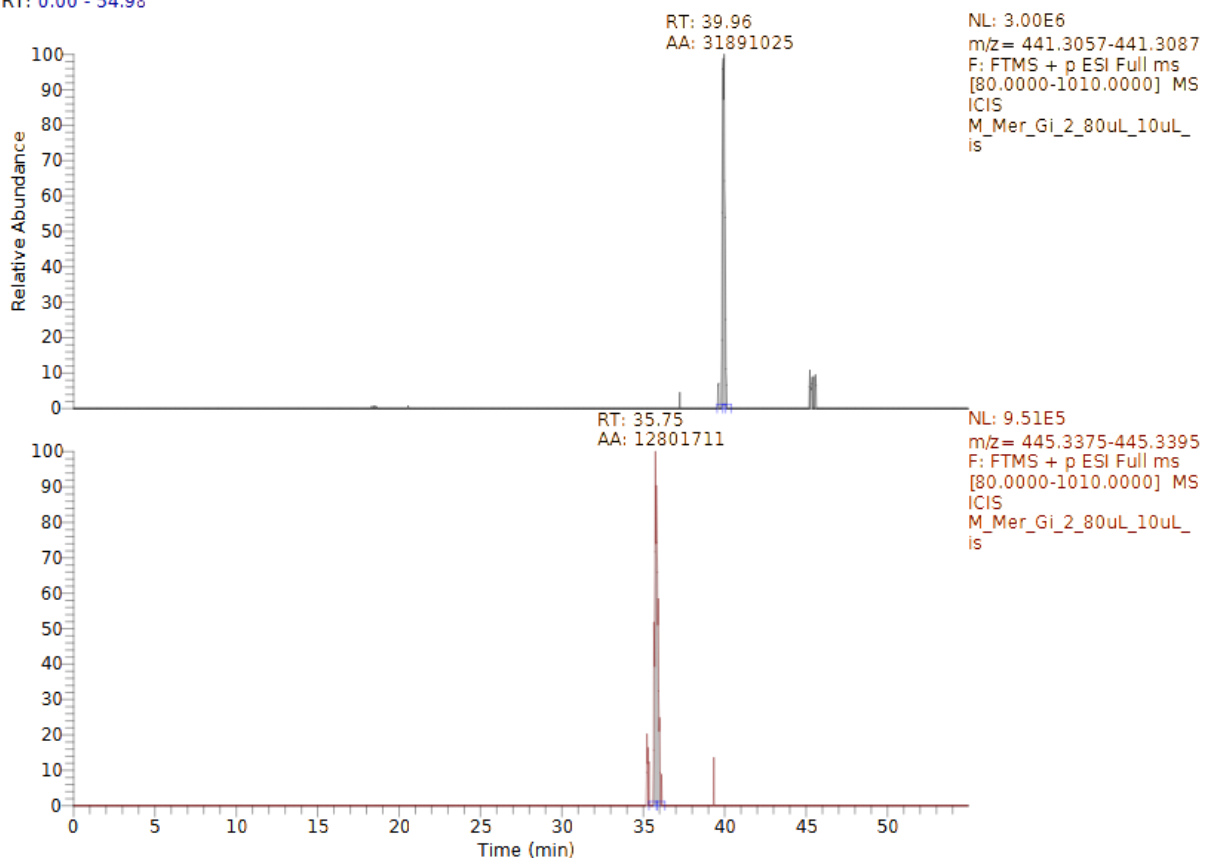
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

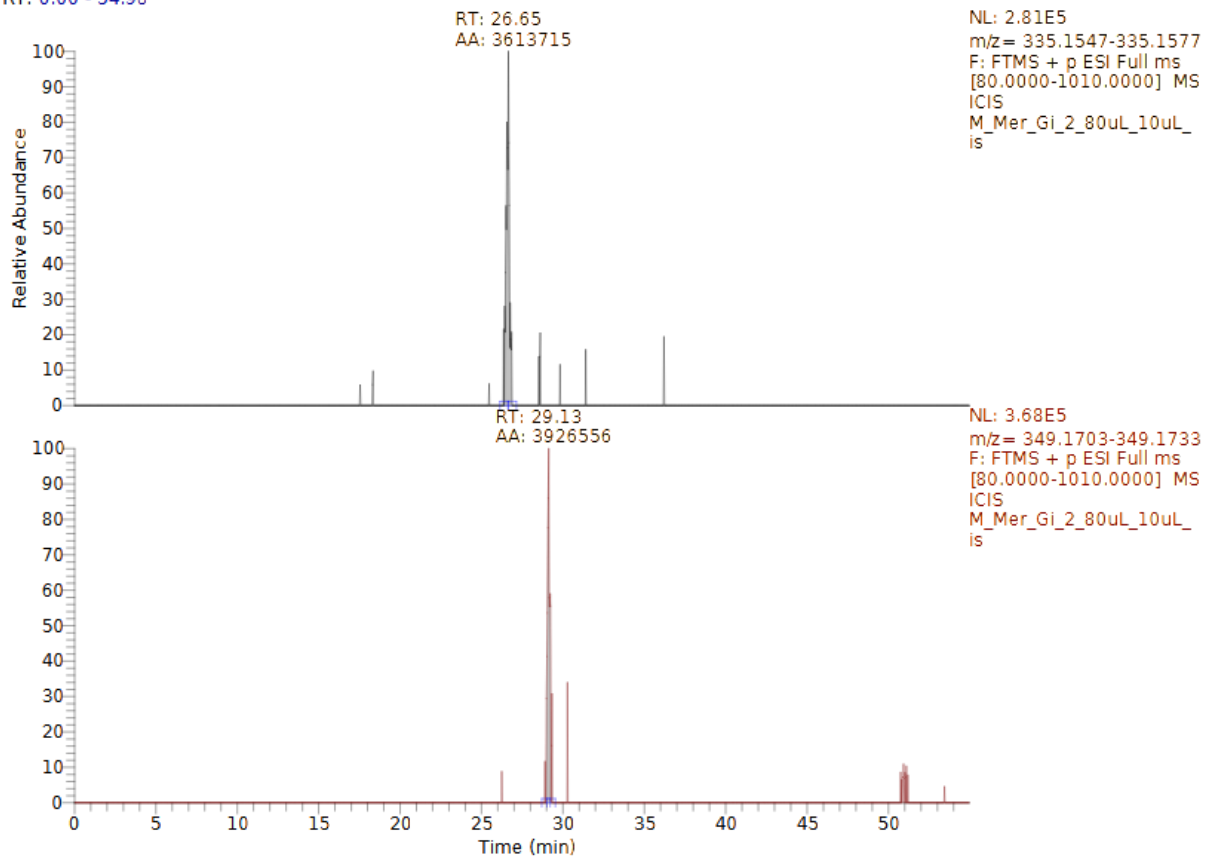
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

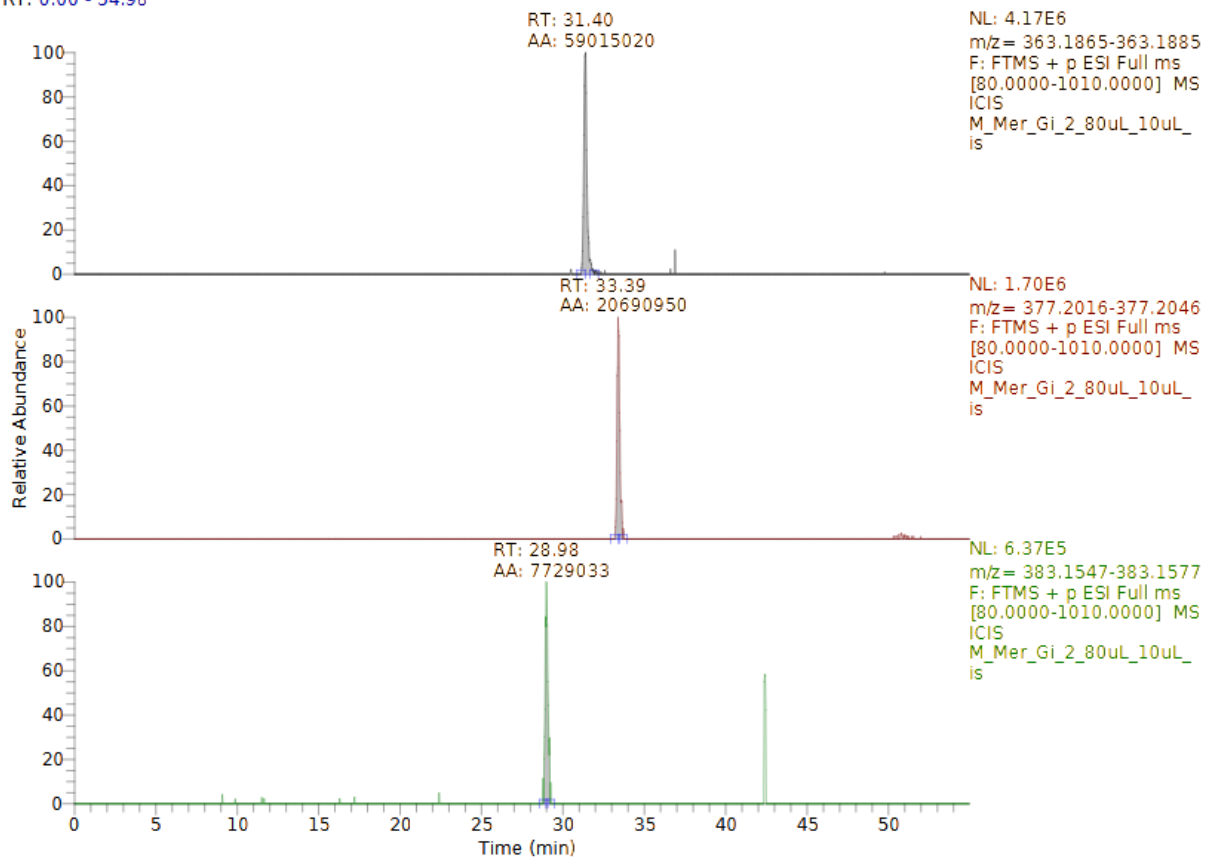
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

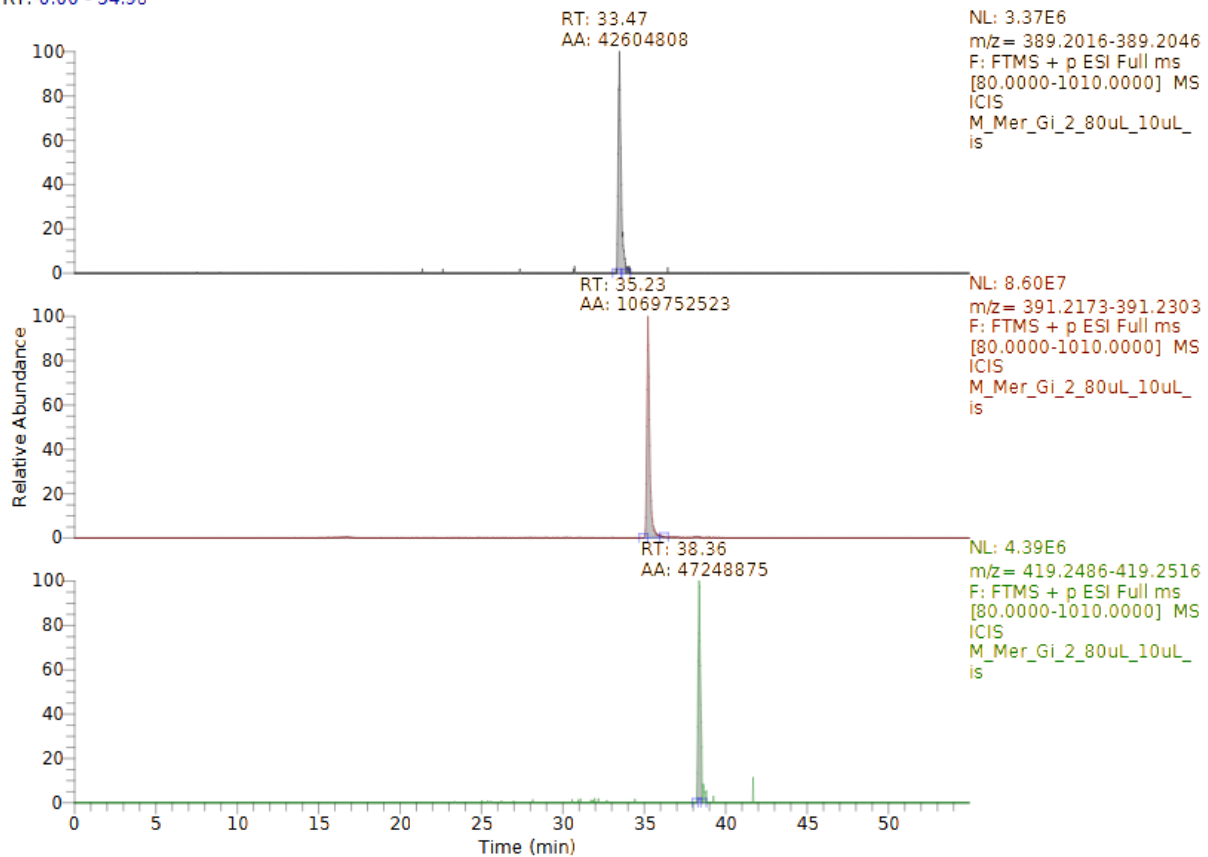
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

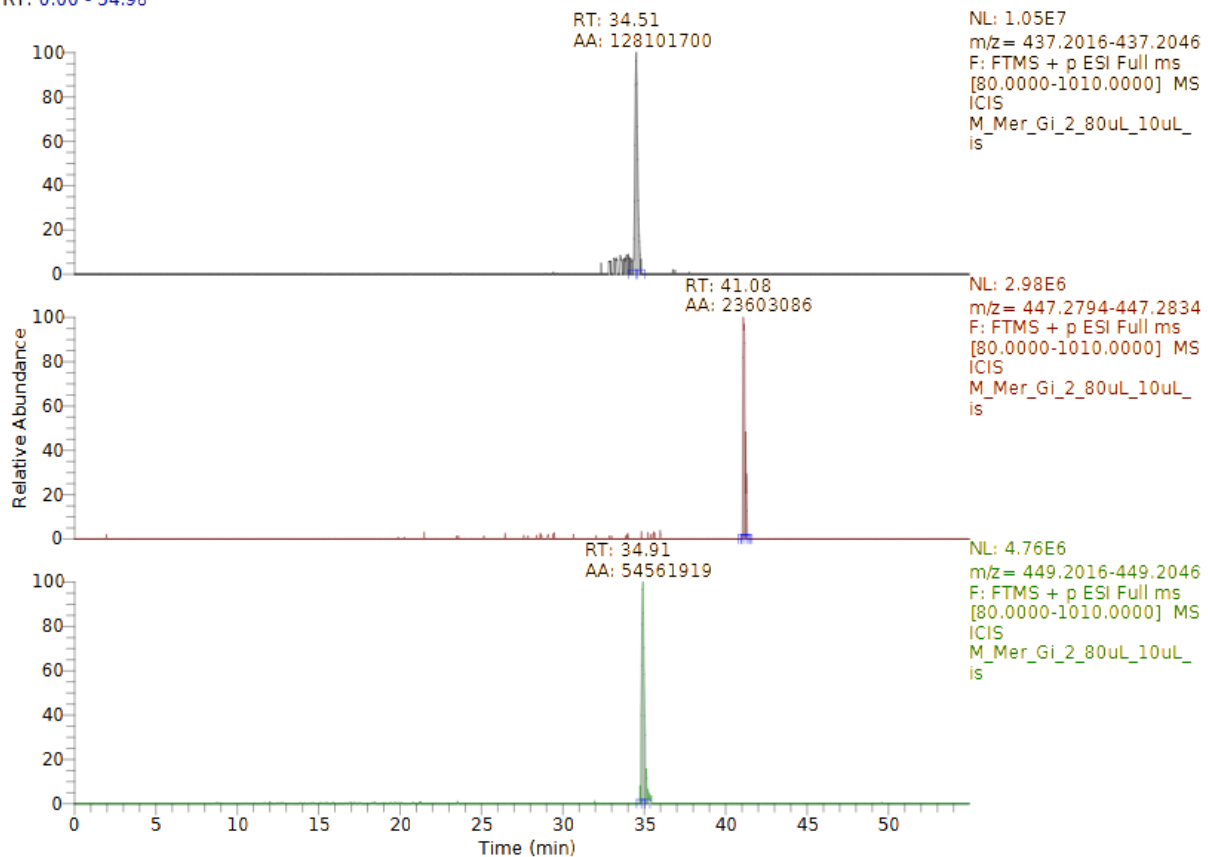
RT: 0.00 - 54.98



C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL\_is

11/22/23 13:09:14

RT: 0.00 - 54.98

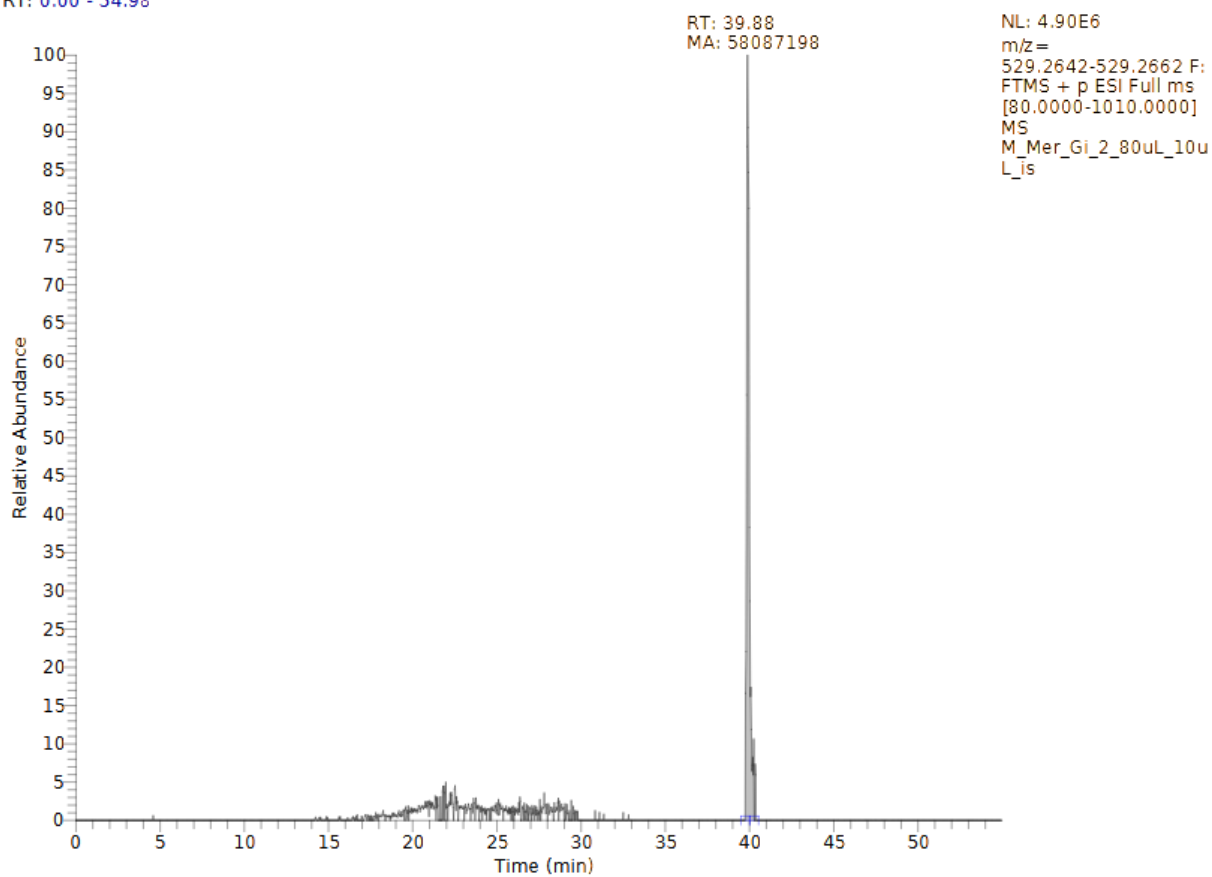




C:\Users\...M\_Mer\_Gi\_2\_80uL\_10uL.js

11/22/23 13:09:14

RT: 0.00 - 54.98



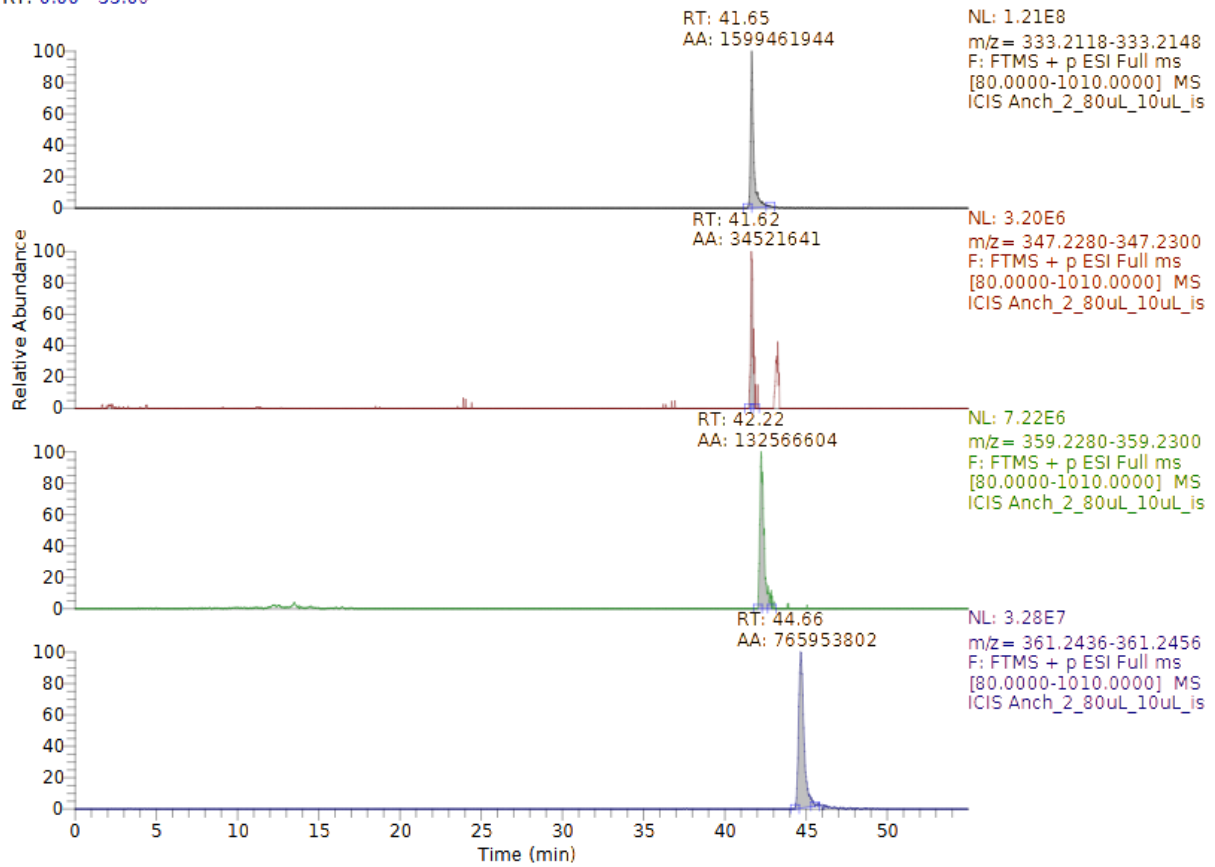
## 7.5 Χρωματογράφημα για το γαύρο

### Γαύρος -2

Anch\_2\_80uL\_10uL\_is

11/16/23 12:18:49

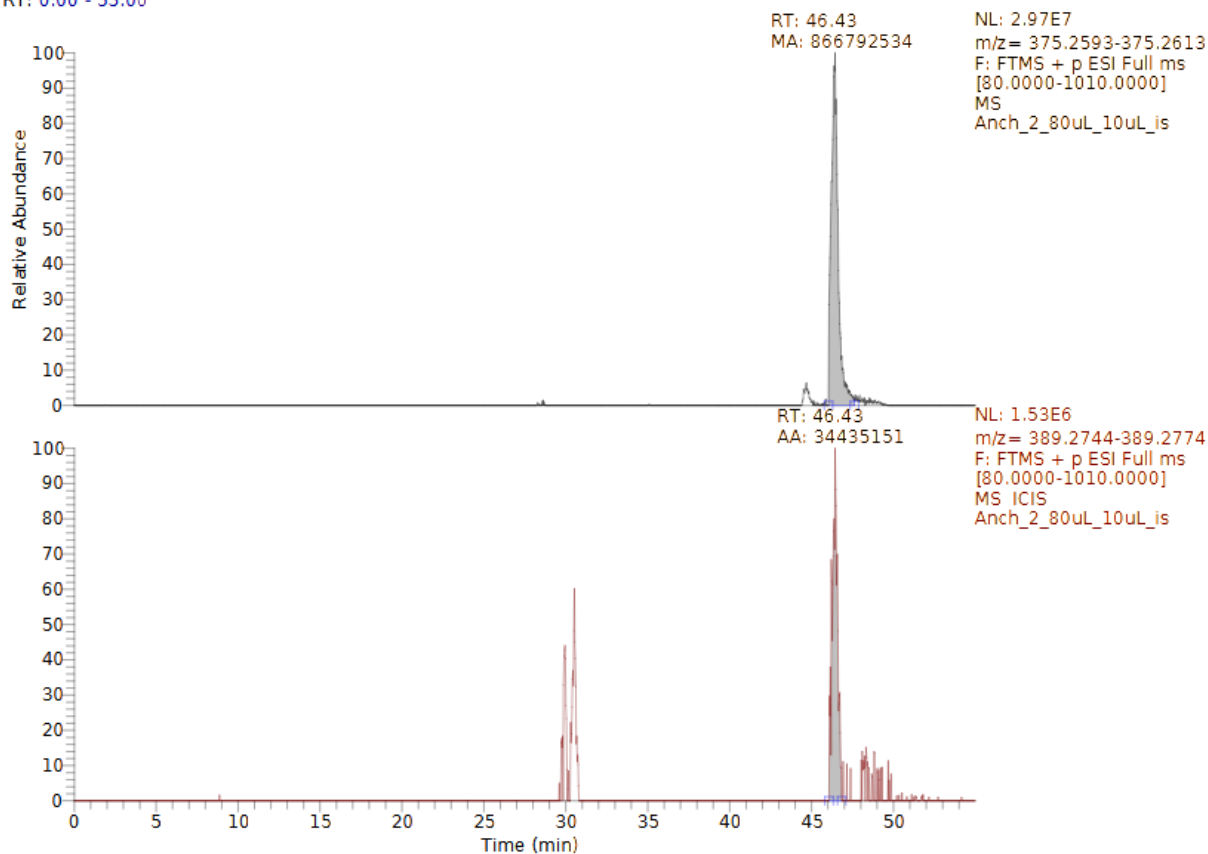
RT: 0.00 - 55.00



Anch\_2\_80uL\_10uL\_is

11/16/23 12:18:49

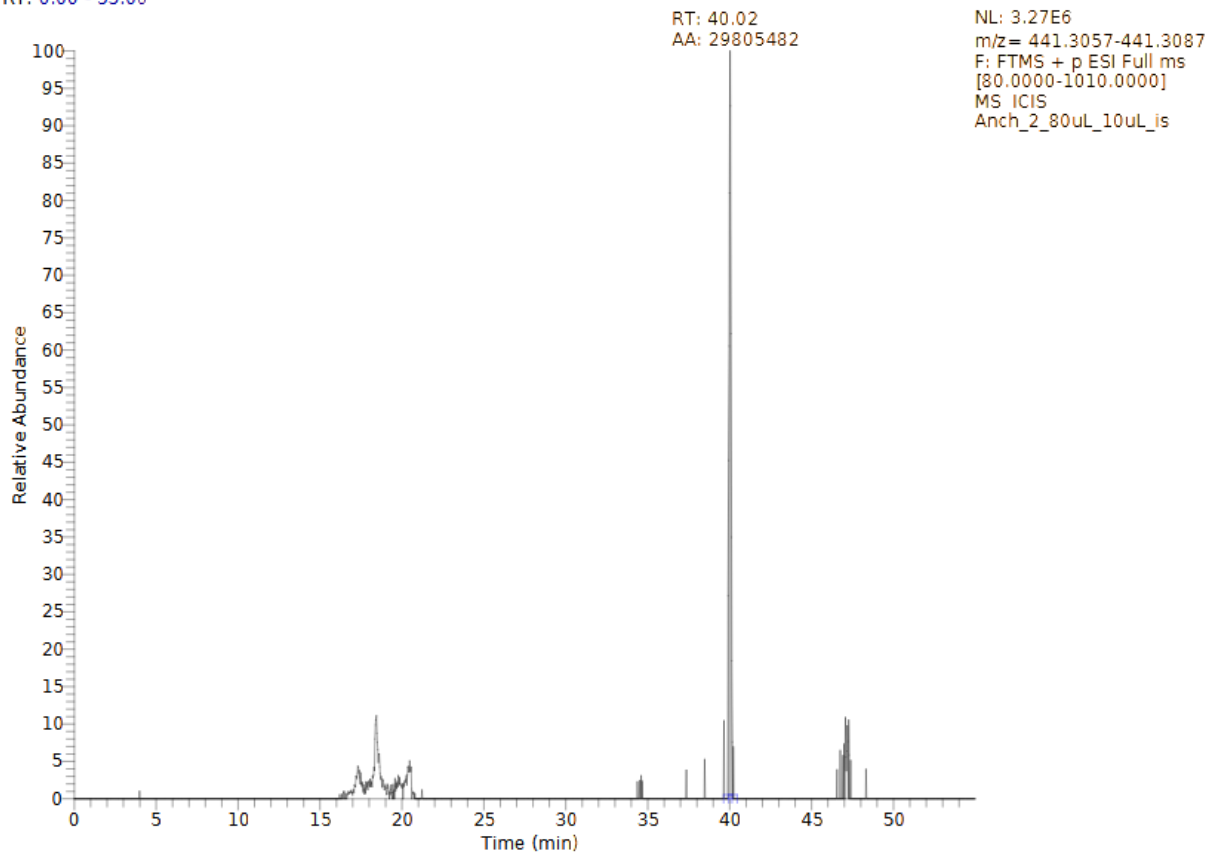
RT: 0.00 - 55.00



Anch\_2\_80uL\_10uL\_is

11/16/23 12:18:49

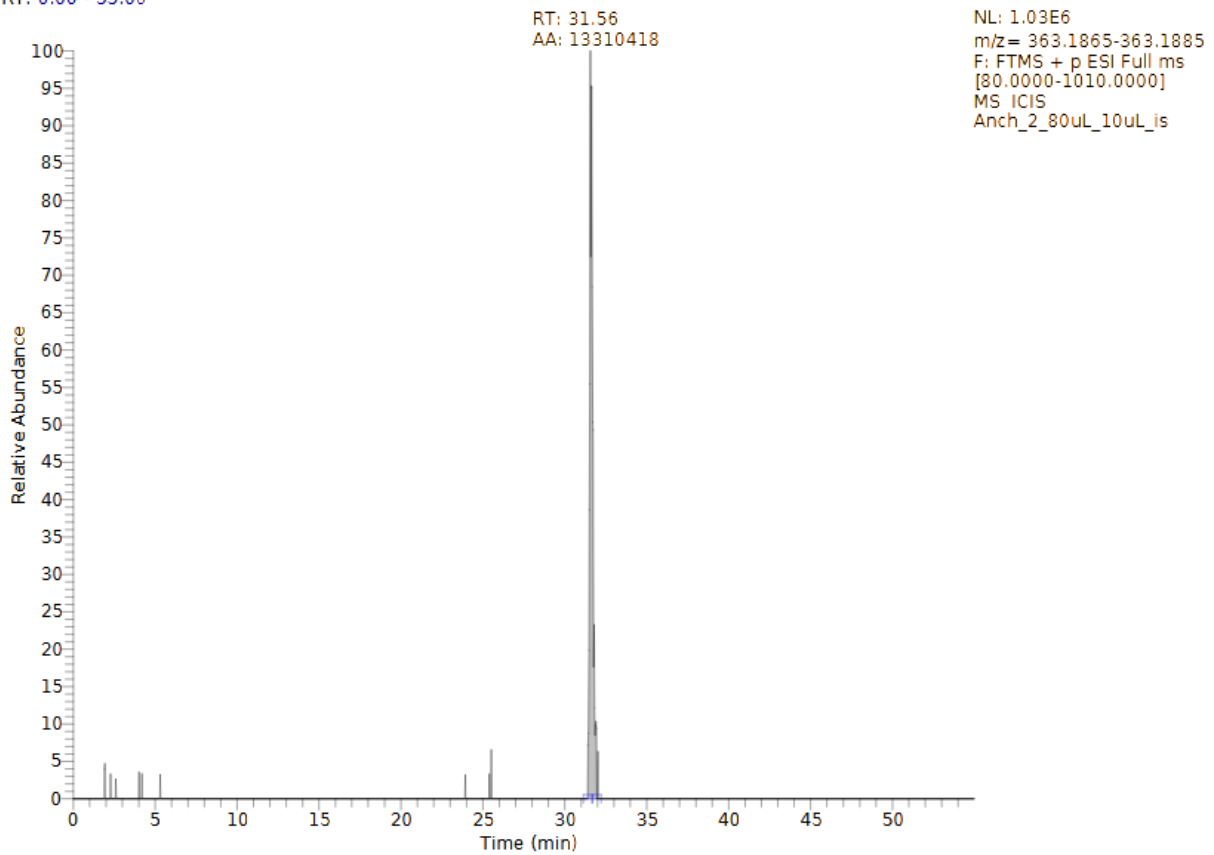
RT: 0.00 - 55.00



Anch\_2\_80uL\_10uL\_is

11/16/23 12:18:49

RT: 0.00 - 55.00



Anch\_2\_80uL\_10uL\_is

11/16/23 12:18:49

RT: 0.00 - 55.00

